



**Neuropathies périphériques et hémopathies B : de
l'étude clinique des neuropathies associées à une
gammopathie monoclonale IgM à activité anti-MAG au
mécanisme de mort cellulaire induit par le Fingolimod
(FTY720) dans les hémopathies B**

Émilien Delmont

► **To cite this version:**

Émilien Delmont. Neuropathies périphériques et hémopathies B : de l'étude clinique des neuropathies associées à une gammopathie monoclonale IgM à activité anti-MAG au mécanisme de mort cellulaire induit par le Fingolimod (FTY720) dans les hémopathies B. Sciences agricoles. Université Nice Sophia Antipolis, 2013. Français. NNT : 2013NICE4090 . tel-00932411

HAL Id: tel-00932411

<https://theses.hal.science/tel-00932411>

Submitted on 17 Jan 2014

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.

UNIVERSITE NICE-SOPHIA-ANTIPOLIS

UFR SCIENCES

Ecole Doctorale Sciences de la Vie et de la Santé

Thèse pour obtenir le titre de Docteur en Sciences

Mention interactions moléculaires et cellulaires

Présentée et soutenue le 26 novembre 2013 par

Emilien Delmont

Neuropathies périphériques et Hémopathies B : de l'étude clinique
des neuropathies associées à une gammapathie monoclonale IgM à
activité anti-MAG au mécanisme de mort cellulaire induit par le
Fingolimod (FTY720) dans les hémopathies B

Directeur de thèse Marcel Deckert

Co-directeur de thèse Claude Desnuelle

Composition du jury

Dr Auberge Patrick, président du jury

Pr Lubetzki Catherine, rapporteur

Pr Levade Thierry, rapporteur

Pr Antoine Jean-Christophe, examinateur

Pr Pouget Jean, examinateur

Dr Deckert Marcel, directeur de thèse

Pr Desnuelle Claude, co-directeur de thèse

Remerciements

Je remercie sincèrement tous les membres du jury d'avoir accepté de juger ce travail. Je ne pouvais pas rêver de meilleur jury.

Je remercie Catherine Lubetzki de nous faire partager son expérience de clinicienne et de chercheuse. Vous avez toujours été une référence dans le monde de la Neurologie.

Je remercie Thierry Levade de nous faire partager sa grande expérience sur ces lipides si complexes que sont les sphingolipides.

Je remercie Patrick Auberger d'avoir accepté de présider ce jury et de m'avoir accueilli dans son bâtiment où il fait bon vivre, le C3M.

Merci à Jean Christophe Antoine de sa gentillesse, de son érudition. C'est toujours un grand plaisir de collaborer avec les Stéphanois.

Merci à Jean Pouget. Vous m'avez tellement appris en 6 mois : la différence entre des socquettes et des chaussettes, pourquoi diable tester un long supinateur ou les fléchisseurs profonds des doigts, comment lire une biopsie ou une imagerie musculaire, l'EMG Avec ou sans bloc de conduction, là n'est pas la question !

Je remercie mes deux directeurs de thèse.

Merci à Marcel Deckert. C'est beau la science avec toi. Que l'on ne soit que tous les deux dans le labo d'immuno ou dans une grande équipe au C3M, tu as toujours été disponible et passionné.

Merci à Claude Desnuelle. Vous m'avez ouvert les portes de votre service, appris à gérer des patients et des équipes. Je vous en serai toujours reconnaissant.

Un grand merci à l'équipe II, Aude, Nicholas, Émilien, Mélanie, Anaïs, Virginie, Moïse, Mathilde. Vous étiez toujours là pour me montrer où était rangé le nouvel anticorps, les membranes, le RPMI, les acides aminés (c'est pénible un médecin) Et toujours dans la bonne humeur ! C'était sympa Nicho d'être co-thésard avec toi ! Merci Sophie de m'avoir adopté en cours de route dans ton équipe.

Un grand merci aux soignants et aux secrétaires du service les Maries (-Cécile, -Claire, -Christine, -Amélie), les Véroniques, Evelyne, Hélène, Georges, Nadia, Audrey, Sévim, Nathalie, Sonia, Pauline, Jérémy, Céline, Brigitte, Karima. Merci aux internes de Neuro Michael, Mael, Amélie, Murielle, Sophie, Elise, Rémy, Claire, Jérôme. L'hôpital c'est souvent stressant, énervant, désespérant Mais c'est tellement agréable de travailler avec vous !!

Merci les MPR Manuela, Cécile, Marianne. C'est plaisant de travailler et de cohabiter avec vous à l'Archet. Merci aux Neurologues, Hématologues et Internistes des AM et du Var, c'est grâce à vous que j'ai pu voir toutes ces neuropathies anti-MAG. Merci Pierre-Yves de tes conseils. Merci la réa med de sauver mes patients. Merci aux patients de me faire confiance (je n'en ferais peut-être pas autant).

Merci Saskia de garder la maison. Tu t'en sors très bien.

Merci Paquita, Tony, pépé, maman et papa de nous avoir hébergés pendant notre été 2013 de SDF. Merci pour votre soutien sans faille : les voisins, Sandrine, Laurent, pépé (tu l'as eu ton Delmont PhD !), beau-papa, belle-maman, Ludo, papa, maman.

Merci Elodie de me supporter encore après 10 ans de vie commune !! Je pourrais t'amener à l'hôtel aux Seychelles, mais je te fais camper sous l'orage et porter des mètres de cordes pour nos vacances canyoning ! Tu as quitté Marseille pour me suivre à Nice et te voilà pour 1 an sous la pluie de Glasgow. Même si tu as parfois le sentiment que je m'occupe plus de mon ordinateur que de toi, tu seras pour toujours mon unique amour.

Table des matières

Résumé	7
Introduction.....	9
I. Gammapathies monoclonales, Néoplasies B et Neuropathies Périphériques	10
I.1. Maturation et prolifération physiologique des lymphocytes B.	10
I.2. Néoplasies B	12
I.2.1. La leucémie lymphoïde chronique (LLC)	13
I.2.2. Les lymphomes :	14
I.2.3. Les myélomes :	17
I.2.4. Traitement des hémopathies B	17
I.3. Gammapathie monoclonale.....	18
I.4. Neuropathies périphériques associées à une gammapathie monoclonale.....	20
I.4.1. Polyneuropathies avec anticorps anti MAG (PN-MAG).....	20
I.4.2. CANOMAD.....	23
I.4.3. Syndrome POEMS.....	24
I.4.4. Amylose AL.....	25
II Mécanismes de mort cellulaire	27
II.1. Apoptose	27
II.2. Autophagie	31
II.3. Nécrose cellulaire.....	33
II.4. Autres morts cellulaires	38
III. Fission et fusion mitochondriale. Rôle de DRP1	40
III.1. La fusion mitochondriale	40
III.2. La fission mitochondriale.....	41
III.3. Contrôle de l'activité de DRP1	42
III.4. Rôle physiologique de la fusion et fission mitochondriale.....	43
III.5. Fission mitochondriale et mort cellulaire programmée.....	44
IV. Sphingolipides et Fingolimod (FTY720)	46
IV.1. Métabolisme des sphingolipides	46
IV.2. Rôle et fonctions physiologiques des sphingolipides.....	50
IV.2.1. Rôles des différents sphingolipides.....	50
IV.2.2. Sphingolipides et maladies métaboliques	52
IV.2.3. Sphingolipides, mort cellulaire et tumorigénèse.....	53
IV.3. Fingolimod (FTY720), un immunosuppresseur utilisé dans la Sclérose en Plaques	54
IV.3.1. FTY720 (fingolimod) et Sclérose en Plaques.	54
IV.3.2. Mécanismes d'action de l'effet immunosuppresseur du FTY720 (fingolimod) dans la Sclérose en Plaques.	55
IV.4. Fingolimod (FTY720), une drogue cytotoxique active dans plusieurs modèles de néoplasie.....	58
Problème posé	60
Résultats	62
Description clinique des neuropathies périphériques associées à une gammapathie monoclonale IgM à activité anti-MAG.....	63
Les polyneuropathies avec IgM monoclonale anti-MAG : étude descriptive, clinique, biologique, électrophysiologique et anatomopathologique d'une cohorte de 13 patients....	63
Traitement par rituximab des neuropathies périphériques associées à une gammapathie monoclonale IgM	73
Treatment with rituximab in patients with polyneuropathy with anti-MAG antibodies	73
Successful treatment with rituximab of one patient with CANOMAD neuropathy	76

Mécanismes de mort cellulaire induit par le FTY720 dans un modèle d'hémopathie B	80
FTY720 induces DRP1-dependent regulated necrosis in chronic lymphocytic leukemia	80
Discussion.....	114
I. Etude clinique des neuropathies périphériques associées à une gammapathie monoclonale IgM à activité anti-MAG	114
II. Le FTY720 induit une nécrose cellulaire programmée dépendante de DRP1 dans la leucémie lymphoïde chronique.....	116
III. Perspectives et développement futur du FTY720.....	122
Conclusions	124
Annexes	125
I. Anti-CD20 et maladies neuromusculaires : quelles indications et quel usage ?	126
II. Efficacité à moyen terme de l'autogreffe de cellules souches hématopoïétiques périphériques sur la polyneuropathie du syndrome POEMS : expérience chez 5 cas.	134
III. Deep Brain Stimulation of the Ventral Intermediate Thalamic Nucleus for Severe Tremor in Anti-MAG Neuropathy	148
Bibliographie.....	150

Principales abréviations

Bcl2 : Berardinelli-Seip Congenital Lipodystrophy 2

CANOMAD : Chronic Ataxic Neuropathy with Ophthalmoplegia, IgM paraproteinemia, cold Agglutinins and Disialosyl antibodies

DRP1 : dynamin related protein 1

ENMG : électroneuromyogramme

HMGB1 : High-mobility group protein B1

FTY720 ou fingolimod : 2-amino-2-[2-(4-octylphenyl)ethyl]propane-1,3-diol

LC3 ou MAP1LC3 : microtubule-associated protein 1 light chain 3

LDH : lactate déshydrogénase

LLC : leucémie lymphoïde chronique

LMP : perméabilisation de la membrane lysosomale

MAG : myelin associated glycoprotein

MGUS : monoclonal gammopathy of undetermined significance

MMP : perméabilisation de la membrane mitochondriale

PARP : polyADP-ribosepolymerase 1

PGAM5 : mitochondrial phosphoglycerate mutase protein phosphatase

PIDC : polyradiculoneuropathie inflammatoire démyélinisante chronique

PMP : perméabilisation de la membrane plasmique

PN-MAG : polyneuropathie à anticorps anti-MAG

POEMS Polyneuropathie, Organomégalie, Endocrinopathie, protéine Monoclonale et anomalies cutanées (Skin changes)

PP2A : protéine phosphatase 2A

RIPK1 : receptor interacting protein 1

ROS : reactive oxygen species

RTX : rituximab

SEP : Sclérose en Plaques

SKI : inhibiteur sphingosine kinase

S1P : sphingosine-1-phosphate

S1PR : récepteur sphingosine-1-phosphate

Résumé

Les neuropathies à anticorps anti-MAG sont secondaires à une gammapathie monoclonale IgM dirigée contre la MAG des gaines de myéline des nerfs périphériques. Le traitement est celui de l'hémopathie sous-jacente.

Même si les thérapeutiques sont de plus en plus efficaces, les hémopathies restent le plus souvent incurables. Le rituximab est couramment utilisé dans le traitement des neuropathies à anticorps anti-MAG, mais son efficacité n'a pas pu être clairement démontrée dans deux études contrôlées.

Le FTY720 ou fingolimod est analogue de la sphingosine. Sa forme phosphorylée inhibe les récepteurs de la sphingosine-1-phosphate (S1P). Le FTY720 est utilisé comme immunosuppresseur dans la Sclérose en Plaques. Des études ont également rapporté un effet cytotoxique du FTY720 dans des hémopathies sans toutefois clairement expliquer son mécanisme d'action. L'objectif de ce travail est d'élucider les mécanismes moléculaires de l'effet cytotoxique du FTY720 dans un modèle d'hémopathie B, la leucémie lymphoïde chronique (LLC). Des cellules leucémiques primaires de LLC et une lignée cellulaire MEC1 ont été utilisées comme modèle expérimental in vitro.

Le FTY720, comme la sphingosine, entraîne une cytotoxicité dose-dépendante dans la LLC. Cet effet, médié par la forme non phosphorylée de FTY720, est indépendant des récepteurs au S1P. Le FTY720 induit l'expression de marqueurs d'apoptose : exposition de la phosphatidylsérine, clivage de PARP et de caspase 3. Cependant sa toxicité apparaît indépendante des caspases. La lipidation accrue de LC3 et la formation d'autophagolysosomes indiquent que le FTY720 augmente également le flux autophagique. Cependant, des inhibiteurs de l'autophagie ne permettent pas de bloquer la mort cellulaire induite par le FTY720, suggérant que l'autophagie a ici un rôle protecteur vis à vis de la toxicité du FTY720.

Plusieurs éléments permettent de conclure que le FTY720 est responsable d'une nécrose cellulaire : aspect morphologique de nécrose en microscopie électronique, perméabilisation membranaire précoce avec relocalisation cytoplasmique de HMGB1, libération extracellulaire de LDH, perméabilisation de la membrane lysosomale associée à une activation des

cathepsines. Au niveau moléculaire, l'action du FTY720 n'est pas bloquée par la nécrostatine 1, indiquant que la nécrose induite par le FTY720 est indépendante de RIPK1 (receptor interacting protein 1), une kinase clef des voies extrinsèques de nécrose cellulaire programmée. Par contre, nos travaux ont établi l'implication de DRP1 (dynamin related protein 1), une enzyme régulatrice de la fission mitochondriale, dans le processus de nécrose induite par le FTY720. En plus d'une relocalisation précoce de DRP1 à la mitochondrie accompagnée d'une augmentation de sa phosphorylation sur des sites régulateurs de son activité, nos expériences montrent que la suppression de son expression par interférence à ARN dans les cellules leucémiques réduit fortement la mort cellulaire induite par le FTY720. Le FTY720 est donc responsable dans la LLC d'une nécrose cellulaire programmée dépendante de DRP1.

Nos résultats illustrent l'implication des sphingolipides dans la régulation de la survie cellulaire et dans les voies de nécrose programmée. Le FTY720 a un mode d'action original différent de l'apoptose induite par les chimiothérapies classiques. Le FTY720 pourrait donc être une alternative thérapeutique dans les néoplasies B résistantes aux chimiothérapies usuelles et dans certaines manifestations auto-immunes des hémopathies comme les neuropathies à anticorps anti-MAG.

Introduction

I. Gammopathies monoclonales, Néoplasies B et Neuropathies Périphériques

Les gammopathies monoclonales résultent d'une anomalie de la maturation et de la prolifération d'un clone lymphocytaire B. Elles sont soit dites « de signification indéterminée » (MGUS) soit associées à une hémopathie maligne. MGUS et hémopathies malignes sont en fait un continuum. Les gammopathies monoclonales n'ont le plus souvent aucune expression clinique mais elles peuvent se révéler par une neuropathie périphérique.

I.1. Maturation et prolifération physiologique des lymphocytes B.

Les lymphocytes B dérivent d'une cellule souche hématopoïétique de la moelle osseuse. Les progéniteurs B vont se différencier en lymphocytes pro-B, puis pré-B et lymphocytes B immatures dans la moelle osseuse sans nécessiter de contact antigénique. Les cellules dont le BCR (B cell receptor) est non fonctionnel sont éliminées. Ces lymphocytes naïfs gagnent ensuite les organes lymphoïdes secondaires où la maturation lymphocytaire est alors dépendante d'une réaction antigénique. Les lymphocytes B activés se différencient en cellules B mémoire ou en plasmocytes(1). Des marqueurs membranaires spécifiques et l'isotype de l'immunoglobuline du BCR permettent de distinguer les différents stades de la maturation des lymphocytes B.

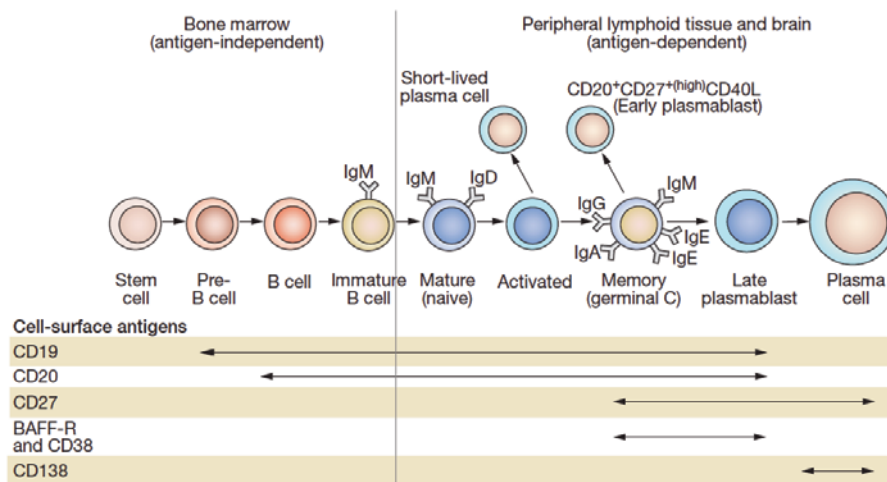


Figure I.1 : stades de différenciation des lymphocytes B, d'après (1). BAFF-R, B cell activating factor receptor.

Différenciation des lymphocytes B dépendante de l'antigène(2) : Les lymphocytes B matures naïfs migrent dans les zones riches en lymphocytes T des organes lymphoïdes. Ils peuvent y être activés par la rencontre de leur antigène spécifique présenté par les cellules présentatrice de l'antigène (cellules dendritiques) et par l'interaction avec des lymphocytes T helper CD4+ spécifiques.

Ces lymphocytes B activés vont soit se différencier directement en plasmablastes et gagner la zone marginale des ganglions lymphatiques, soit se différencier en centroblastes et gagner la zone sombre des centres germinatifs des follicules ganglionnaires. Les centroblastes vont se multiplier et subir un processus d'hypermutation somatique (HMS) des gènes codant pour les régions variables des chaînes lourdes et légères des immunoglobulines. Ces mutations vont soit diminuer soit augmenter l'affinité du BCR des centroblastes pour l'antigène. Les centroblastes gagnent ensuite la zone claire des centres germinatifs où ils se différencient en centrocytes. Les centrocytes interagissent avec des cellules dendritiques et des lymphocytes T helper folliculaires. Ils sont alors sélectionnés en fonction de l'affinité de leur nouveau BCR : les centrocytes peu affins pour l'antigène sont éliminés par apoptose, les centrocytes avec une forte affinité sont conservés et subissent une commutation de classe de leur immunoglobuline. L'isotype M ou D de la partie constante de l'immunoglobuline est remplacé par un isotype G, A ou E en fonction des stimuli externes et de l'ambiance cytokinique. Enfin les centrocytes survivant se différencient en cellules B mémoires ou en plasmocytes, cellules spécialisées dans la synthèse d'anticorps.

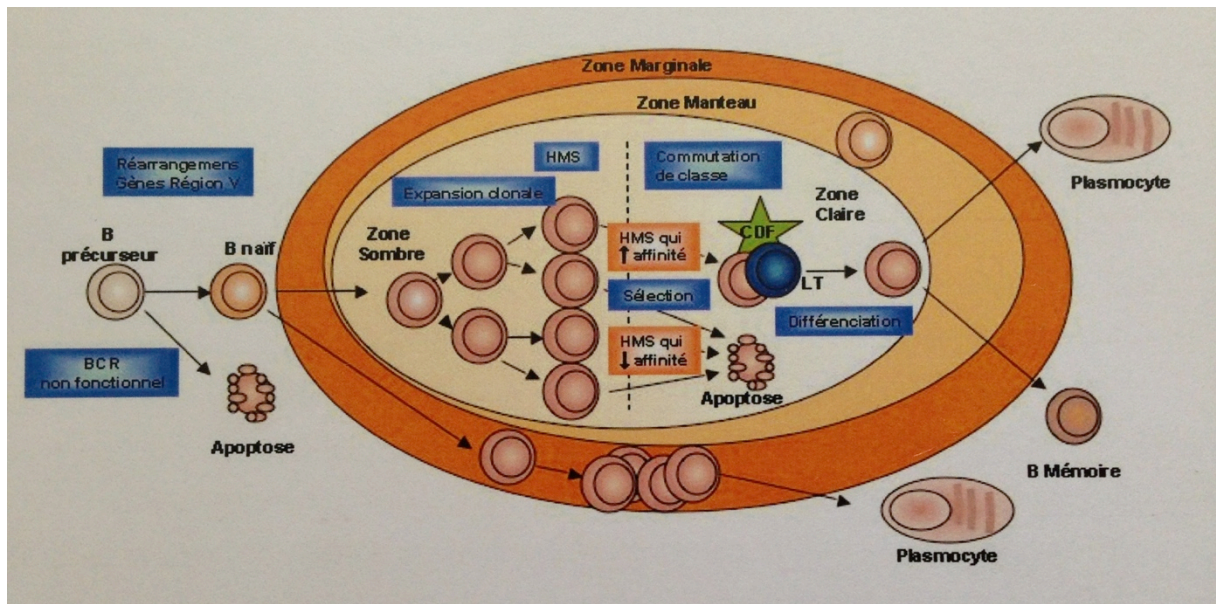
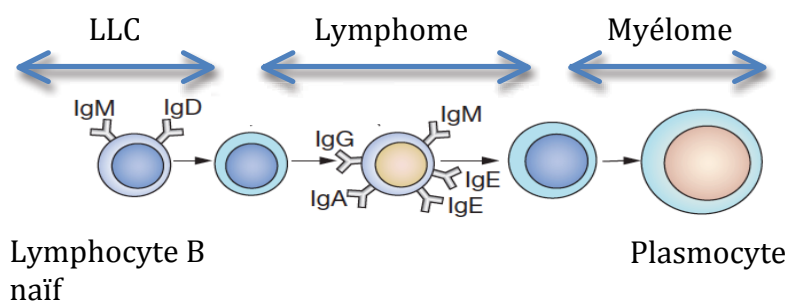


Figure I.2 : Différenciation des lymphocytes B dépendante de l'antigène dans les organes lymphoïdes, d'après Baudot A et (2). La zone marginale sépare les zones folliculaires et extra-folliculaires. La zone du manteau entoure le centre germinatif. HMS, hypermutation somatique ; CDF, cellule dendritique folliculaire ; LT, lymphocyte CD4 helper folliculaire.

I.2. Néoplasies B

Des erreurs de maturation et des défauts d'apoptose au cours de la maturation lymphocytaire B peuvent induire la genèse d'un clone B tumoral(3). Le type de syndrome lympho-prolifératif dépendra du stade de maturation où s'est produit le dysfonctionnement cellulaire (figure I.3).



Le phénotype des lymphocytes B malins permet de classer les différentes hémopathies B en fonction des marqueurs cellulaires exprimés à la surface des cellules.

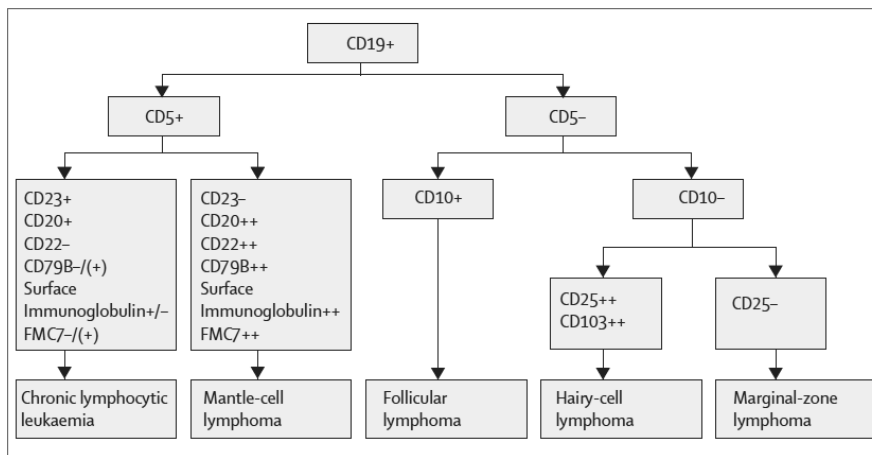


Figure I.4 : diagnostic des différentes hémopathies en fonction du phénotypage des lymphocytes B tumoraux exprimant le CD19 (exclu les plasmocytes), d'après (4)

I.2.1. La leucémie lymphoïde chronique (LLC)

La LLC est la forme la plus fréquente de leucémie en Europe et en Amérique du Nord (incidence 3,5/100000 habitants/an) (4).

Les progrès des phénotypages lymphocytaires sanguins font découvrir des populations de lymphocytes B monoclonaux dans le sang de patients asymptomatiques. Ces « lymphocytoses monoclonales B » sont un stade précurseur de LLC. Le risque de développer une LLC nécessitant un traitement est de 1,1% par an en cas de lymphocytose monoclonale B(5). Le diagnostic de LLC est porté devant une population monoclonale B de phénotype LLC (score de Matutes > 4) à un taux sanguin supérieur à $5 \times 10^9/L$. Les cellules tumorales ont le plus souvent un phénotype de lymphocyte B naïf du manteau. Elles expriment le CD5, le CD23, le CD20 et faiblement une immunoglobuline d'isotype M ou D. Elles répriment l'expression de FMC7 et CD22. Dans certains cas les cellules tumorales expriment des mutations somatiques des gènes des immunoglobulines ce qui correspondrait à un phénotype de lymphocyte B mémoire ayant rencontré un antigène spécifique T-dépendant(3).

Un lymphome à petites cellules B correspond à une infiltration d'organe lymphoïde secondaire (ganglion, rate) par des cellules de phénotype LLC mais avec une population monoclonale B inférieure à $5 \times 10^9/L$ dans le sang(6).

Le diagnostic est souvent porté de manière fortuite devant une lymphocytose découverte sur une prise de sang systématique (jusqu'à 3/4 des diagnostics). Ces patients ne souffrent le plus souvent d'aucun symptôme et ne nécessiteront pas de traitement spécifique. Cependant, la maladie peut être sévère, responsable de manifestations auto-immunes, de syndrome de masse tumorale, d'une immunodépression et de cytopénies.

La classification de Binet distingue les patients en trois catégories :

- A taux d'hémoglobine > 100 g/l et numération des plaquettes > 100 G/l, moins de trois aires ganglionnaires atteintes
- B taux d'hémoglobine > 100 g/l et numération des plaquettes > 100 G/l, plus de trois aires ganglionnaires atteintes
- C taux d'hémoglobine < 100 g/l ou numération des plaquettes < 100 G/l, quel que soit le nombre d'aires lymphoïdes atteintes(7).

Un tiers des patients ne nécessitera jamais de traitement, un tiers nécessitera un traitement après une phase indolente de la maladie et un tiers présentera une forme d'emblée agressive de la maladie.

Le pronostic de la LLC dépend de facteurs biologiques (temps de doublement lymphocytaire, taux de $\beta 2$ microglobuline, expression ZASP70) et cytogénétiques (délétion 13q, trisomie 12, délétion 11q). Les principaux facteurs de mauvais pronostic sont un stade de Binet élevé, une perte de l'expression de p53 (délétion 17p), une absence de mutation des régions variables des gènes des immunoglobulines. La médiane de survie varie de 36 mois pour les patients avec perte d'expression de p53 à plus de 144 mois pour les patients avec mutations des régions variables des gènes des immunoglobulines et un stade A de Binet(4).

1.2.2. Les lymphomes :

Les lymphomes sont des tumeurs malignes développées à partir des lymphocytes le plus souvent B. Ils s'expriment par des masses tumorales au niveau des organes lymphoïdes (adénopathies, splénomégalie) et au niveau extra-ganglionnaire (estomac, système nerveux central, rein, os, testicules).

Les lymphomes sont classés en lymphomes Hodgkiniens et non hodgkiniens (LMNH). Les principaux lymphomes non-Hodgkiniens dérivés des lymphocytes B sont les lymphomes lymphoplasmocytiques, les lymphomes à cellules villeuses, les lymphomes de la zone marginale, les lymphomes de MALT (mucosa-associated lymphoid tissue), les lymphomes folliculaire, les lymphomes du manteau, les lymphomes B diffus à grandes cellules, les lymphomes de Burkitt(6).

La maturation des lymphocytes B dans le centre germinatif implique des facteurs de transcription et des proto-oncogènes. Un défaut de MYC peut induire un lymphome de

Burkitt, de BCL6 (B cell lymphoma 6), de PRDM1 (positive regulatory domain containing 1) ou de NFκB un lymphome B diffus à grande cellules, de BCL2 un lymphome folliculaire et de PAX5 (paired box protein 5) un lymphome lymphoplasmocytaire (et macroglobulinémie de Waldenstrom).

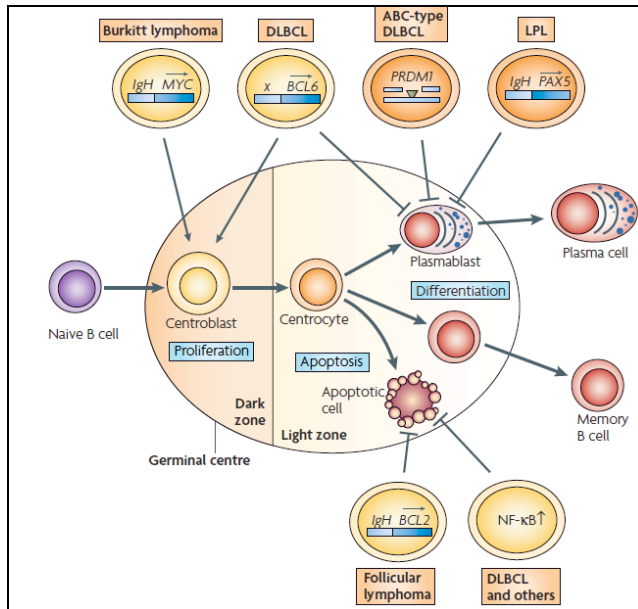


Figure I.5 : néoplasies B en fonction du stade de maturation B altéré au niveau du centre germinatif, d'après (2). LPL, lymphome lymphoplasmocytaire ; DLBCL, lymphome B diffus à grandes cellules.

Les lymphomes folliculaires reproduisent l'architecture des follicules ganglionnaires. Ils représentent 22% des LMNH. Ils sont caractérisés par une translocation t (14;18), une surexpression de Bcl2 et une évolution le plus souvent indolente avec une durée de survie supérieure à 70% à 10 ans(3).

Les lymphomes du manteau dérivent des lymphocytes de la zone du manteau des organes lymphoïdes secondaires. Ils représentent 3-10% des LMNH. La translocation t (11; 14) conduit à une surexpression de cyclinD1. Les patients sont le plus souvent masculins, avec un âge moyen de 60 ans. Il est l'un des lymphomes au pronostic le plus sombre. Les médianes de survie globale pour les patients ne pouvant recevoir de chimiothérapie intensive suivie ou non d'autogreffe, sont de l'ordre de 3 ou 4 ans(8).

Les lymphomes de Burkitt sont des lymphomes agressifs touchant les enfants et l'adulte jeune. Ils sont associés à une translocation de c-MYC et à une infection par le virus d'Epstein-Barr (EBV). La réponse aux chimiothérapies est le plus souvent bonne.

Les lymphomes B diffus à larges cellules représentent 30 à 40% des LMNH. C'est un groupe hétérogène de lymphome. Ils sont souvent associés à une immunodéficience et à une infection par les virus EBV et/ou HHV8 (human herpes viridae 8)(6).

Les lymphomes de la zone marginale(3) touchent un peu plus souvent les femmes à un âge moyen de 60 ans. Ils représentent 7-8% des lymphomes B. Dans la plupart des cas ces lymphomes sont associés aux muqueuses, on parle alors de lymphome MALT (mucosa-associated lymphoid tissue). Ils se développent dans des organes initialement dépourvus de follicules lymphoïdes, mais où vont s'accumuler des lymphocytes B suite à une stimulation antigénique chronique ou une maladie auto-immune. Le lymphome MALT de l'estomac est le plus fréquent. Il est secondaire à une activation de la voie NF κ -B par les antigènes de la bactérie *Helicobacter pylori* dans 90% des cas. Au stade initial de la maladie, une guérison peut être obtenue par l'éradication de *H. pylori* par un traitement antibiotique. Dans le syndrome de Gougerot-Sjögren, le risque de développer un lymphome MALT des glandes salivaires est multiplié par 44. Dans la thyroïdite de Hashimoto, le risque de développer un lymphome MALT de la glande thyroïde est multiplié par 70.

La macroglobulinémie de Waldenstrom est définie par l'association d'un lymphome lymphoplasmocytaire et d'une gammapathie monoclonale d'isotype IgM(9). La maladie est plus fréquente dans la population blanche et chez les personnes âgées. L'incidence est de 3,8/million d'habitants/an.

La maladie est le plus souvent indolente et ne nécessite pas de traitement spécifique. Les manifestations cliniques les plus fréquentes sont une splénomégalie (15%), une hépatomégalie (20%), des adénopathies (15%) et une asthénie secondaire à une anémie. Le risque de thrombose veineuse et de saignement est augmenté du fait d'un taux bas de facteur de von Willebrand. La gammapathie monoclonale peut aussi révéler la maladie et s'exprimer par une neuropathie périphérique, une anémie hémolytique, une amylose AL ou une vascularite à dépôt de complexes immuns. Le syndrome d'hyperviscosité apparaît pour des concentrations d'IgM monoclonale supérieure à 40g/L. l'augmentation de la viscosité sanguine entraîne une augmentation de la perméabilité veineuse se manifestant par des saignements (épistaxis, gingivorragies), un flou visuel (rétinopathie), des vertiges, des céphalées et une grande asthénie.

Les facteurs de mauvais pronostic de la maladie de Waldenstrom comprennent un âge élevé, un taux bas de plaquettes et d'hémoglobine, un taux élevé de la β 2microglobuline et de la gammapathie monoclonale(9).

I.2.3. Les myélomes :

L'incidence de la maladie est de 40/million d'habitant/an(9). Elle se développe à partir des plasmocytes. Les cellules tumorales expriment le phénotype des plasmocytes long survivant post centre germinatif(10). Les cellules tumorales ont subi une hypermutation somatique des gènes des immunoglobulines. Leur phénotype est CD38⁺, CD138⁺, CD19⁻, CD45⁻, CD56⁺. Les cellules myélomateuses diffèrent des plasmocytes normaux par leur capacité de prolifération (1-3% de cellules cyclantes).

Les myélomes s'accompagnent d'une gammapathie monoclonale IgG ou IgA détectée dans le sang et/ou de chaînes légères κ ou λ des immunoglobulines dans les urines (protéinurie de Bence-Jones). Le diagnostic de myélome repose sur la mise en évidence d'une gammapathie monoclonale d'un taux supérieur à 30g/L ou d'une protéine de Bence-Jones d'un taux supérieur à 1g/24heures ou d'une infiltration de la moelle osseuse supérieure à 10% par des plasmocytes monoclonaux(6).

Le myélome peut s'exprimer par des lésions osseuses lytiques ou condensantes, des tumeurs plasmocytaires (plamocytomes), une hypercalcémie, une insuffisance rénale, une amylose AL, des cytopénies et des infections récidivantes secondaire à une immunodépression. En l'absence de manifestation clinique, le myélome est dit asymptomatique ou indolent ou incipiens.

I.2.4. Traitement des hémopathies B

Les hémopathies B sont régulièrement de découverte fortuite. En l'absence d'atteinte spécifique d'organe, une simple surveillance est nécessaire.

Un traitement spécifique est indiqué lorsque la masse tumorale est importante ou lorsque la maladie devient symptomatique (anémie, hypercalcémie, hyperviscosité). Les manifestations « auto-immunes » sont le plus souvent traitées par une monothérapie par rituximab(9). Les manifestations tumorales sont traitées par des polychimiothérapies.

Leucémies Lymphoïde Chronique. Les premiers essais thérapeutiques n'ont pas montré de bénéfice à débiter un traitement précoce dans les LLC asymptomatiques(11). Le consensus actuel est donc de ne traiter que les patients avec masse tumorale élevée ou avec une insuffisance médullaire (stade de Binet B et C). Cependant, la meilleure connaissance des facteurs pronostiques et l'émergence de nouvelles thérapeutiques pourraient faire évoluer ce concept.

En l'absence de traitement curatif, le traitement de la LLC vise à obtenir une maladie résiduelle minimale. Les premiers traitements disponibles ont été un alkylant, le chlorambucyl, puis un analogue des purines, la fludarabine. Actuellement les patients sont traités par une polychimiothérapie comprenant du rituximab, de la fludarabine et du cyclophosphamide (RFC). Le taux de répondeur initial est excellent de l'ordre de 90-95%(12). Cependant la maladie reste incurable et certains patients rechutent précocement notamment en cas de perte de l'expression de p53.

Lymphomes. Les formes symptomatiques de maladie de Waldenstrom (9) sont traitées par une polychimiothérapie comprenant du rituximab, du cyclophosphamide, de la doxorubicine, de la vincristine et de la prednisone (R-CHOP) ou par une trithérapie comprenant du rituximab, du cyclophosphamide et de la dexaméthasone (RCD). Le taux de répondeur avoisine les 90%. A deux ans, 67% des patients n'ont pas de rechute. En cas de maladie réfractaire au traitement, d'autres chimiothérapies (bortezomib, thalidomide, lenalidomide, bendamustine) ou une greffe de moelle osseuse sont indiquées.

Myélome. Le traitement repose sur des chimiothérapies (melphalan, thalidomide, lenalidomide, bortezomib) associées ou non à une auto-greffe de moelle osseuse. La maladie reste à l'heure actuelle incurable mais les progrès thérapeutiques ont permis d'allonger l'espérance de vie de 3 à plus de 6 ans(13).

I.3. Gammapathie monoclonale

Une gammapathie monoclonale, IgG, IgA ou IgM (exceptionnellement IgD ou IgE), est détectée dans le sérum de 4% des patients de plus de 50 ans(14).

Une gammapathie monoclonale est dite de signification indéterminée (MGUS) si (6,15) :

- infiltrat plasmocytaire médullaire <10%
- taux de composant monoclonal <30g/l
- protéinurie de Bence-Jones <1g/24h
- et absence de lésion osseuse ostéolytique, l'absence de cytopénie, d'hypercalcémie ou d'insuffisance rénale.

Dans 15% des MGUS, la gammapathie monoclonale est d'isotype IgM. Ces MGUS-IgM sont associées à un clone lymphocytaire anormal pouvant évoluer vers un lymphome ou une maladie de Waldenstrom. Les MGUS-non IgM et MGUS à chaînes légères sont associées à un clone plasmocytaire pouvant évoluer vers un myélome. Le taux de transformation maligne est de l'ordre de 1% par an. Les facteurs de mauvais pronostic sont une gammapathie monoclonale non IgG, un rapport des chaînes légères κ/λ anormal et un taux de protéine monoclonale supérieur à 15g/L(16).

MGUS, myélome incipiens et myélome sont un continuum(10). La progression du stade précancéreux MGUS à un véritable myélome va dépendre de facteurs micro-environnementaux, d'une dérégulation d'oncogènes et d'anomalies cytogénétiques(16).

La transformation de plasmocyte normal à plasmocyte MGUS est médiée soit par une hyperdiploïdie soit par une translocation dans le gène des chaînes lourdes des immunoglobulines d'un oncogène (CCND, MAF ou MMSET). Ces anomalies conduisent à une dérégulation de l'expression de cyclin D. La transformation en plasmocytes myélomateux requiert l'activation de c-MYC associée ou non à l'activation de K-RAS, une inactivation de p53, une activation NF- κ B ou une délétion du chromosome 13(10).

Dans la majorité des cas les gammapathies monoclonales n'ont aucune expression clinique. Elles sont de découverte fortuite sur un bilan biologique systématique.

Les chaînes légères λ de la gammapathie monoclonale peuvent se déposer dans les tissus sous forme de dépôts d'amylose. L'amylose AL se traduit par des lésions cutanées, une insuffisance cardiaque restrictive, une néphropathie glomérulaire et une neuropathie périphérique douloureuse.

Parfois l'idiotype de la gammapathie monoclonale est dirigée contre un antigène du soi, ce qui va provoquer une maladie auto-immune. L'expression clinique de la gammapathie monoclonale pourra alors être une anémie hémolytique, une cryoglobulinémie, une neuropathie périphérique(9,17).

I.4. Neuropathies périphériques associées à une gammapathie monoclonale

Le bilan étiologique d'une neuropathie périphérique comprend toujours la recherche d'une gammapathie monoclonale. Cependant la fréquence des gammapathies monoclonales et des neuropathies périphériques augmente avec l'âge(14). Il faudra donc toujours démontrer qu'il existe une relation de causalité entre la gammapathie monoclonale et la neuropathie périphérique.

La neuropathie périphérique est secondaire à des dépôts d'immunoglobulines comme dans l'amylose AL, à des mécanismes paranéoplasiques comme dans le syndrome POEMS ou à une activité auto-anticorps de la gammapathie monoclonale comme dans les neuropathies anti-MAG et dans le CANOMAD.

I.4.1. Polyneuropathies avec anticorps anti MAG (PN-MAG)

Les PN-MAG sont des neuropathies périphériques rares secondaires à une gammapathie monoclonale IgM dirigée contre la glycoprotéine associée à la myéline (MAG) des nerfs périphériques(15). Une activité anti-MAG est détectée dans 50 à 60% des neuropathies associées à une IgM monoclonale(18).

La gammapathie monoclonale est le plus souvent une gammapathie monoclonale de signification indéterminée (MGUS), elle est moins fréquemment associée à un processus lymphoprolifératif de type lymphome. Sur 13 patients explorés dans le service, la gammapathie était de type MGUS dans 10 cas et d'isotype IgM kappa dans 11 cas. Le taux de la gammapathie monoclonale est le plus souvent faible, en moyenne de 4,7g/l(19).

Les patients sont plus souvent des hommes d'âge moyen compris entre 61 et 67 ans (20,21). La PN-MAG est une neuropathie périphérique à nette prédominance sensitive. Les patients décrivent une ataxie à la marche et des paresthésies des membres inférieurs. Les douleurs neuropathiques sont fréquentes mais généralement peu intenses(19). Le tremblement d'attitude est classique (30 à 89% des patients) mais rarement invalidant (22). Les déficits moteurs sont rares, présents chez 30% des patients de notre série(19). Ils sont alors à prédominance distale touchant la flexion/extension des orteils et des chevilles aux membres inférieurs. Les formes à prédominance motrice de PN-MAG sont exceptionnelles(23).

L'électroneuromyogramme est évocateur du diagnostic de PN-MAG. Les amplitudes motrices distales sont diminuées aux membres inférieurs et les amplitudes sensibles distales

sont diminuées aux quatre membres. L'étude des conductions nerveuses motrices montre une neuropathie démyélinisante dans près de 90% des cas(20). La démyélinisation est à prédominance distale caractérisée par un allongement des latences motrices distales et des indices de latence terminale bas sur les nerfs médians et ulnaires(24,25). Les blocs de conduction sont rares.

La biopsie de nerf montre des dépôts d'IgM sur les gaines de myéline et une décompaction caractéristique des lamelles périphériques des gaines de myéline(20).

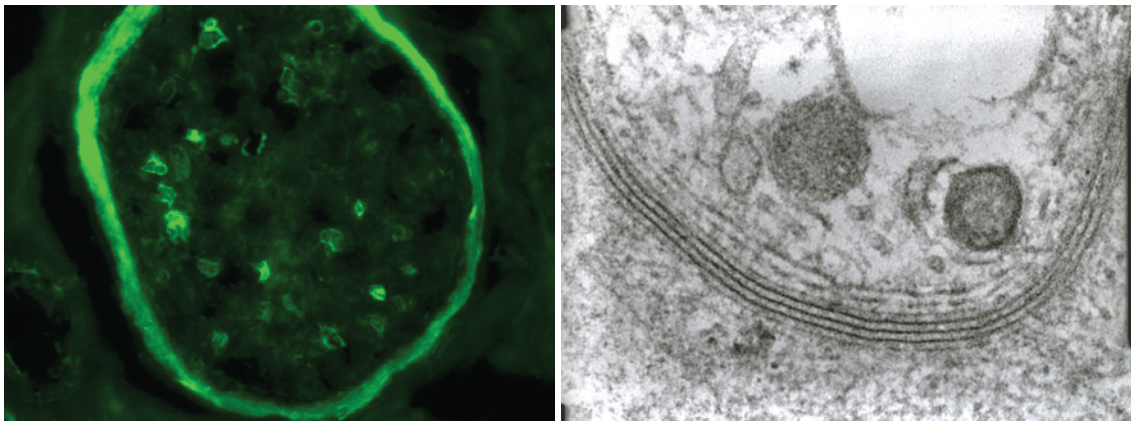


Figure 1.6 : dépôts d'IgM sur les gaines de myéline en immunofluorescence et décompaction des lamelles périphériques des gaines de myéline en microscopie électronique sur une biopsie d'un nerf saphène externe (Butori C, laboratoire de pathologie clinique et expérimentale, CHU de Nice)

Le diagnostic de PN-MAG repose sur la détection de l'activité anti-MAG de la gammopathie monoclonale. Les techniques de western blot et de chromatographie sur couche mince ne sont plus guère utilisées. La technique ELISA est le test de référence actuel. Elle permet un dosage quantitatif de l'activité anti-MAG. Ce test est sensible mais manque de spécificité pour des taux entre 1000 et 10 000 unités BTU en raison de réaction croisée entre la MAG et les gangliosides des nerfs périphériques (26).

La maladie est lentement évolutive. On estime que 24% des patients seront gênés dans leur vie quotidienne à dix ans d'évolution et 50% à quinze ans(27).

Cependant, les manifestations cliniques sont à l'origine d'une incapacité fonctionnelle chez certains patients et il est alors licite de proposer un traitement étiologique. De nombreux schémas thérapeutiques ont été essayés sans avoir jamais montré de réelle efficacité, incluant corticoïdes, immunoglobulines intraveineuses, échanges plasmiques, melphalan, chlorambucil, cyclophosphamide, azathioprine, fludarabine, cladribine(28).

Le rituximab (RTX) est un anticorps monoclonale IgG1 chimérique homme/souris, dirigé contre le CD20. Ce cluster de différenciation est exprimé à la surface des cellules B lors de leur maturation du stade pré-B à celui de plasmablaste de différenciation terminale. Il est exprimé par les cellules B mémoire CD27+, mais pas par les plasmocytes responsables de la synthèse des anticorps. Le rituximab induit une déplétion en cellules B par 3 mécanismes : activation du complément, cytotoxicité cellulaire dépendant des anticorps (ADCC) et induction de l'apoptose. Le rituximab entraîne également une expansion des lymphocytes T régulateurs et une inactivation des lymphocytes T auto-réactifs en inhibant la présentation de l'antigène par les lymphocytes B(12).

Le rituximab a été administré dans plusieurs essais en ouvert à la posologie de quatre perfusions hebdomadaires de 375mg/m² (29-32) et dans une étude à double dose, soit quatre perfusions hebdomadaires de 750mg/m² (33). Ces études ont toutes montré une bonne tolérance. L'efficacité du rituximab est retardée, essentiellement visible six à douze mois après l'administration du traitement. Les scores sensitifs sont améliorés chez 50 à 80% des patients, le testing musculaire chez 60% des patients et les scores d'incapacité chez 0 à 54% des patients. Le taux de l'IgM monoclonale est réduit de 30 à 74% et le taux de l'anticorps anti-MAG de 44 à 87% (cf tableau infra). Une étude randomisée contre placebo a montré une amélioration au huitième mois du score d'incapacité chez 4 sur 12 des patients traités par RTX contre 0 sur 13 sous placebo(34) mais ces résultats ne sont pas significatifs en intention de traiter. L'étude multicentrique RIMAG randomisée contre placebo(35) n'a pas montré d'amélioration significative à douze mois du score de déficit sensitif INCAT sensory sumscore (ISS), choisi comme critère principal, mais montrait une amélioration significative de plusieurs critères secondaires : score d'incapacité INCAT, échelles d'autoévaluation, échelles de qualité de vie.

Des cas d'aggravation précoce de la neuropathie avec une augmentation paradoxale et transitoire du taux d'anticorps anti-MAG ont été rapportés(29,36). Cette aggravation pourrait s'expliquer par une libération d'anticorps par des lymphocytes B lysés et par l'altération transitoire de mécanismes de régulation de l'auto-immunité dont l'augmentation de cellules produisant de l'IL6(36). Ces phénomènes sont à rapprocher des syndromes de lyse tumorale et de l'augmentation du taux d'IgM qui surviennent dans les trois premiers mois d'un traitement par rituximab d'une maladie de Waldenström(37).

Une meilleure efficacité du rituximab est obtenue lorsque le déficit sensitif est sévère(34), que la durée de la maladie est inférieure à dix ans (31) et que le taux d'anti-MAG est soit faible dans une étude (30), soit élevé dans une autre(34).

Une amélioration clinique de la PN-MAG n'est visible que chez certains patients et seulement huit à douze mois après l'administration du RTX. Il faut pour l'instant réserver ce traitement aux patients handicapés dans leur vie quotidienne et dont la neuropathie est évolutive, cependant, le traitement ne doit pas être trop tardif s'il on vise une réversibilité des troubles avant la constitution de lésions axonales irréversibles. Dans certains cas graves réfractaires au traitement, certains ont proposé une intensification de traitement avec une association rituximab-fludarabine (38).

Tableau I. Résultats des essais publiés sur l'efficacité du rituximab (RTX) dans les polyneuropathies avec anticorps anti-myelin associated glycoprotein (MAG).

	Nombre de patients	Évaluation (mois)	Résultats
Renaud et al., 2003	9	12	Amélioration score sensitif (NDS) 6/9 Réduction taux anti-MAG de 52 % Réduction taux IgM monoclonale de 58 %
Renaud et al., 2006	8	12	Amélioration score sensitif (NDS) 4/8 Réduction taux anti-MAG de 59 % Réduction taux IgM monoclonale de 74 %
Pestronk et al., 2003	7	24	Amélioration force (dynamomètre) Réduction taux anti-MAG
Benedetti et al., 2007	13	12	Amélioration score sensitif (ISS) 8/13 Amélioration score moteur (MRC) 8/13 Amélioration score incapacité (ODSS) 7/13 Réduction taux anti-MAG de 87 % Réduction taux IgM monoclonale de 39 %
Niermeijer et al., 2009	6	12 en moyenne	Amélioration score sensitif 3/6 Amélioration score moteur (MRC) 4/6 Amélioration score incapacité (ODSS) 0/6
Delmont et al., 2011	6	9	Amélioration score sensitif (ISS) 5/6 Amélioration score moteur (MRC) 4/6 Amélioration score incapacité (ONLS) 3/6 Réduction taux anti-MAG de 44 % Réduction taux IgM monoclonale de 31 %
Dalakas et al., 2009	12 RTX 13 placebo	8	Groupe RTX Amélioration score incapacité (ODSS) 4/12 Réduction taux anti-MAG de 50 % Réduction taux IgM monoclonale de 34 % Groupe placebo pas d'amélioration
Léger et al., 2011	26 RTX 28 placebo	12	Pas de modification significative ISS Amélioration score d'incapacité (INCAT) groupe RTX vs groupe placebo ($p = 0,03$)

RTX : rituximab ; NDS : *neuropathy disability scale* ; ODSS : *overall disability sum score* ; INCAT : *inflammatory neuropathy cause and treatment* ; ISS : *INCAT sensory sumscore* ; ONLS : *overall neuropathy limitation scale* ; MRC : *medical research council*.

Tableau : Résumé des principales études rapportant l'effet du rituximab dans les neuropathies à anticorps anti MAG d'après (39)

I.4.2. CANOMAD

Le CANOMAD est une neuropathie périphérique exceptionnelle secondaire à une

gammopathie monoclonale IgM dirigée contre les gangliosides disialylés des gaines de myéline des nerfs périphériques (GD3, GQ1b, GD1b and GT1b). L'acronyme signifie Chronic Ataxic Neuropathy with Ophthalmoplegia, IgM paraproteinemia, cold Agglutinins and Disialosyl antibodies(40).

La définition de la maladie est biologique. Son diagnostic repose sur la détection d'anticorps anti gangliosides disialylés dans le sérum des patients.

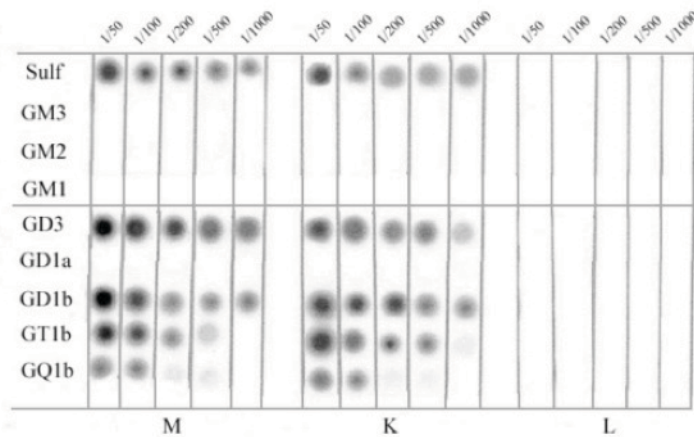


Figure I.7 :Exemple de dot blot montrant la présence dans le sérum d'un patient d'un anticorps IgM kappa dirigé contre les gangliosides GD3, GD1b, GT1b et GQ1b (C Caudie, Service d'immunologie et neuro-immunologie, Hôpital neurologique, Lyon Bron)

La neuropathie périphérique est le plus souvent à prédominance sensitive. Elle se traduit par une ataxie proprioceptive et une ophtalmoplégie. L'atteinte bulbaire décrite dans la publication princeps est moins fréquente.

Vu la rareté de ce syndrome, les modalités thérapeutiques ne sont pas clairement définies. Un traitement par immunoglobulines intraveineuses est volontiers proposé en première intention(40). Nous avons rapporté une bonne efficacité du Rituximab dans un cas de CANOMAD réfractaire aux immunoglobulines intraveineuses(41), mais l'efficacité n'a été que transitoire malgré des traitements répétés.

I.4.3. Syndrome POEMS

Le syndrome POEMS, ou syndrome de Takatsuki, ou syndrome de Crow-Fukase, est une affection multisystémique rare. L'acronyme signifie Polyneuropathie, Organomégalie,

Endocrinopathie, protéine Monoclonale et anomalies cutanées (Skin changes). La prévalence est de 0,3/100 000 habitants au Japon. Elle est moindre en Europe et en Amérique. Le diagnostic est basé sur l'association d'une prolifération plasmocytaire monoclonale et d'une polyneuropathie avec au moins un critère majeur (lésions osseuses sclérotiques ou maladie de Castleman ou élévation du taux de VEGF) et un critère mineur (organomégalie, surcharge extravasculaire, endocrinopathie, modifications cutanées, œdème papillaire, thrombocytose, polyglobulie)(42). Cette affection peut être qualifiée de paranéoplasique car les manifestations cliniques ne sont ni dues à l'infiltration tumorale ni à une action directe de la gammopathie monoclonale.

La neuropathie périphérique est souvent le premier symptôme de la maladie. Elle se traduit par un déficit sensitif et moteur sévère, d'évolution subaigüe, pouvant toucher les quatre membres. L'électroneuromyogramme montre une perte axonale sensitive et motrice aux membres inférieurs et un ralentissement des vitesses de conduction dans les segments intermédiaires des nerfs médians et ulnaires.

Le pronostic fonctionnel de cette affection multisystémique est grave et la neuropathie périphérique peut être à l'origine d'un handicap fonctionnel majeur.

Les formes localisées de syndrome POEMS avec moins de deux lésions osseuses sont traitées par radiothérapie locale(43). Le traitement des formes disséminées de syndrome POEMS n'est, lui, pas totalement établi. Les traitements par corticoïdes et immunoglobulines intraveineuses n'ont qu'un effet transitoire. Le traitement le plus efficace reposerait sur l'élimination du clone plasmocytaire par chimiothérapie avec autogreffe de cellules souches hématopoïétiques périphériques. Nous avons récemment montré chez 5 patients une amélioration significative des déficits neurologiques et des paramètres électrophysiologiques à un an d'une autogreffe de moelle osseuse(44). L'efficacité hématologique de l'autogreffe a été rapportée dans de nombreuses séries, mais cette thérapeutique n'a pas encore été validée par une étude contrôlée. Les autres alternatives sont l'utilisation de chimiothérapies utilisées dans le myélome : melfalan, thalidomide, lenalidomide et bortezomide. Une étude comparant l'autogreffe au lenalidomide est actuellement en cours.

1.4.4. Amylose AL

L'amylose AL est secondaire à des dépôts dans les tissus de substance amyloïde formée à

partir de chaînes légères mal plicaturées d'une immunoglobuline monoclonale, le plus souvent λ . L'amylose est associée à un clone plasmocytaire anormal. Contrairement au myélome, l'infiltration médullaire et le taux de la gammopathie monoclonale sont généralement faibles (6). L'incidence de la maladie est de 9 cas par an par million d'habitants. L'âge moyen au diagnostic est de 65 ans (45). Le diagnostic repose sur la mise en évidence de dépôts d'amylose sur les examens anatomopathologiques (biopsie de glande salivaire accessoire, biopsie rectale, biopsie de graisse sous-cutanée, biopsie de nerf).

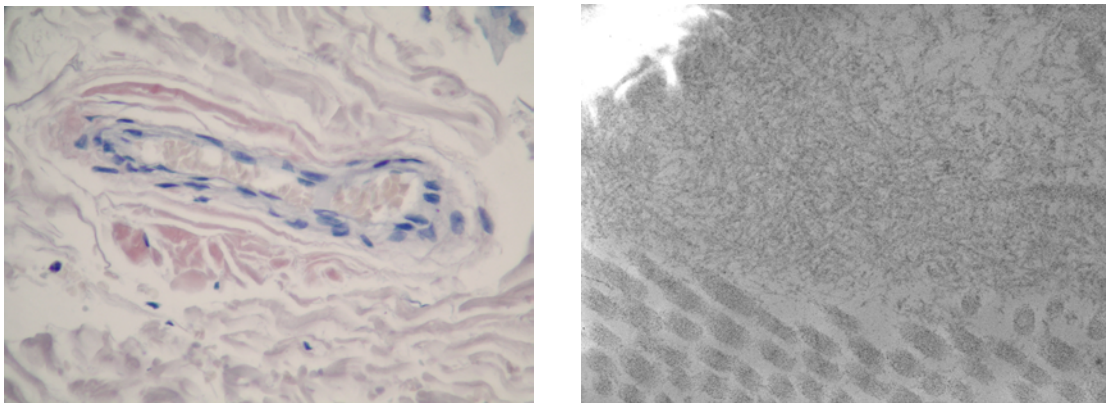


Figure 1.8 : dépôts d'amylose à la coloration rouge Congo et en microscopie électronique sur une biopsie de nerf périphérique, nerf saphène externe (Butori C, laboratoire de pathologie clinique et expérimentale, CHU de Nice)

L'atteinte cardiaque (50% des patients) se manifeste par des troubles de la conduction et une insuffisance cardiaque restrictive. L'atteinte rénale (2/3 des patients) se manifeste par un syndrome glomérulaire et une insuffisance rénale. La neuropathie périphérique s'accompagne de douleurs neuropathiques intenses et d'une dysautonomie (dysurie, alternance diarrhée/constipation, signes cardiovasculaires). L'électroneuromyogramme montre une neuropathie sensitive et motrice axonale chronique longueur dépendante volontiers accompagnée d'une compression des nerfs médians dans les canaux carpiens.

La gravité de la maladie dépend des organes touchés et de la rapidité d'instauration du traitement. Un traitement associant melfalan et dexaméthasone (MDex) a une action comparable à l'autogreffe de moelle osseuse, avec une efficacité hématologique dans 2/3 des cas. Le traitement par bortezomide semble prometteur, mais il s'accompagne régulièrement d'une neuropathie périphérique toxique. La médiane de survie dépasse actuellement les 5 ans.

II Mécanismes de mort cellulaire

La mort cellulaire est physiologique. Elle est indispensable à l'embryogénèse, à la maturation et à l'homéostasie des tissus. Les défauts de mort cellulaire sont impliqués dans les pathologies cancéreuses et auto-immunes. A contrario, les processus de mort cellulaire sont excessifs dans les processus dégénératifs et ischémiques.

Les connaissances sur les mécanismes et types de mort cellulaire programmée ont beaucoup évolué ces dernières années (46-48). On distingue trois grands types de morts cellulaires : l'apoptose, la mort autophagique et la nécrose.

II.1. Apoptose

L'apoptose est une mort cellulaire programmée physiologique. L'absence ou l'altération des voies de l'apoptose sont associées au développement de néoplasies et de maladies auto-immunes.

La première définition de l'apoptose était morphologique, fondée sur les travaux de John Kerr qui avait décrit dans les années 60 des hépatocytes mourant après ischémie avec une morphologie originale, différente de la nécrose. Le terme d'apoptose n'a été introduit qu'en 1972(49) (en grec, chute des feuilles, effondrement de la cellule). Les caractéristiques morphologiques de l'apoptose sont une rétraction des pseudopodes, un détachement du substrat, une diminution du volume cellulaire (pyknosis), une condensation définitive de la chromatine des noyaux (pyknocytose), une fragmentation nucléaire (karyorrhexis) et la formation de corps apoptotiques qui sont dégradés par les cellules phagocytaires in vivo. La membrane plasmique cellulaire reste intègre par définition(47).

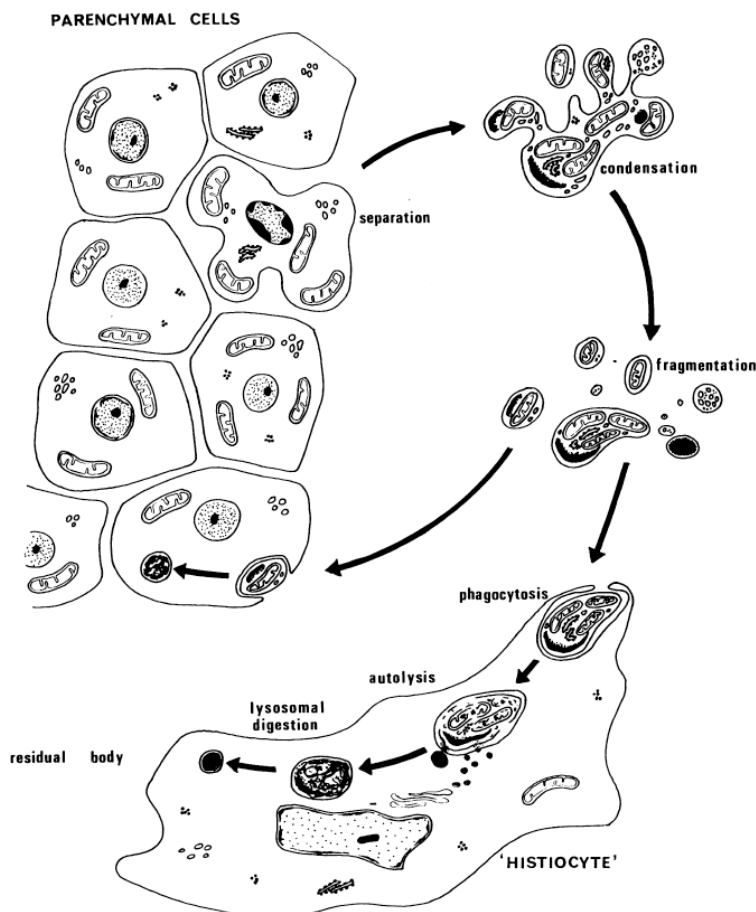


FIG 5 —Diagram to illustrate the morphological features of apoptosis.

Figure II.1 : les cellules apoptotiques se détachent de leur substrat et forment des corps apoptotiques qui sont phagocytés par des cellules spécialisées. D'après (49)

La caractérisation biochimique de l'apoptose comprend une activation des caspases, une perméabilisation de la membrane plasmique mitochondriale (MMP) et une exposition du phospholipide phosphatidylsérine sur la face externe de la membrane plasmique (50). Les caspases sont des cystéine-protéases qui clivent leur substrat après un résidu aspartate. Elles jouent un rôle critique dans l'initiation (caspases 2, 8, 9 et 10) et dans l'exécution de l'apoptose (caspases 3, 6 et 7)(50). La perméabilisation de la membrane mitochondriale (MMP) est mise en évidence par la dissipation du potentiel trans-membranaire mitochondrial, la génération de ROS, la diminution de la production d'ATP et le relargage dans le cytoplasme de molécules mitochondriales(50).

Il existe deux grands types d'apoptose : l'apoptose extrinsèque et intrinsèque.

Apoptose extrinsèque : elle est induite par des signaux de stress extra cellulaires reçus et transmis par des récepteurs spécifiques trans-membranaires appelés récepteurs de mort cellulaire. Les signaux extrinsèques les plus usuels sont FAS/CD95 ligand, Tumor Necrosis

Factor α (TNF α) et TNF-related apoptosis inducing ligand (TRAIL). Les récepteurs de dépendance comme les récepteurs à la netrine induisent au contraire une apoptose lorsque la concentration de leur ligand spécifique est en dessous d'une valeur seuil(48).

L'une des voies de signalisation la mieux connue de l'apoptose est celle de FAS/FASL. La fixation de FASL induit un changement de conformation de FAS permettant l'assemblage d'un complexe dynamique multiprotéique au niveau de sa région intracytosolique appelée death domain (DD). Tous les récepteurs de mort cellulaire partagent le même domaine DD. Les protéines recrutées au niveau du domaine DD de FAS sont RIPK1 (receptor-interacting protein kinase 1), FADD (FAS-associated protein with a death domain), des isoformes de c-FLIP, cIAPs (cellular inhibitor of apoptosis proteins), E3 ubiquitin ligase et procaspase 8. Ce complexe protéique appelé death inducing signaling complex (DISC) régule l'activité de la caspase 8.

Dans les lymphocytes, caspase 8 active directement caspase 3 et la cascade de caspases effectrices de l'apoptose sans dépendre des mitochondries. Dans les autres types cellulaires, caspase 8 clive BID (BH3-interacting domain death agonist) produisant un agent perméabilisant de la membrane plasmique des mitochondries, tBID (truncated BID)(48). La libération de protéines mitochondriales dans le cytosol forme un autre complexe multimoléculaire, l'apoptosome, qui va entraîner dans certaines conditions une activation des caspases et une apoptose. L'apoptosome est formé par l'association de cytochrome c, de deoxyATP, de l'apoptotic protease-activating factor1 (APAF1) et de caspase 9(50).

L'apoptose extrinsèque met toujours en jeu des récepteurs de mort cellulaire ou des récepteurs de dépendance. Elle est toujours caspase-dépendante et peut donc être empêchée par des inhibiteurs chimiques pan-caspases comme le QVD ou le Z-VAD. Hormis dans les lymphocytes, elle dépend de la perméabilisation de la membrane plasmique des mitochondries.

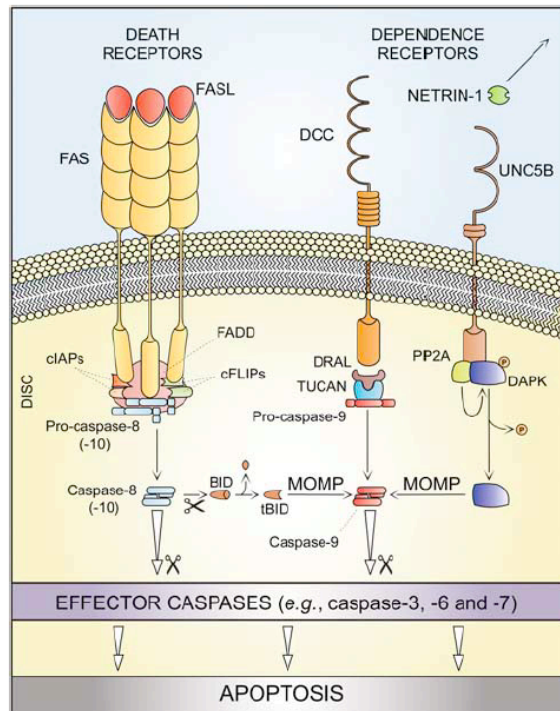


Figure II.2 : apoptose extrinsèque d'après (48). Voir explications dans texte. MOMP mitochondrial outer membrane permeabilization ; DISC death inducing signaling complex.

Apoptose intrinsèque : Elle est favorisée par divers stress cellulaires : stress oxydatif, altération de l'ADN, influx calcique cytosolique, excitotoxicité du glutamate dans le système nerveux, accumulation de protéines mal plicaturées dans le réticulum endoplasmique. Lorsque ces stress sont trop importants, on observe une perméabilisation de la membrane plasmique mitochondriale (MMP). Cette perméabilisation est due à la formation de pores dans la membrane par les protéine pro-apoptotiques BAX et BAK de la famille BCL-2 et par un complexe multi-protéique issu de la membrane mitochondriale interne, le permeability transition pore complex (PTPC). L'ouverture prolongée du PTPC augmente brutalement la perméabilité de la membrane interne mitochondriale aux ions et aux molécules de faibles poids moléculaire provoquant un gonflement osmotique de la matrice mitochondriale et une rupture de la membrane externe mitochondriale.

La MMP induit la formation de l'apoptosome qui active les caspases 9 et 3 qui provoquent une mort apoptotique dépendante des caspases. La MMP entraine également une apoptose non caspase-dépendante en libérant dans le cytosol les protéines AIF (apoptose inducing factor), endonuclease G (ENDOG) et la serine protéase HTRA2 (high temperature requirement protein A2) qui provoquent la dégradation de l'ADN nucléaire et du cytosquelette(48).

La MMP est aussi délétère par la dissipation du potentiel trans-membranaire mitochondrial, la génération de ROS et la diminution de production d'ATP.

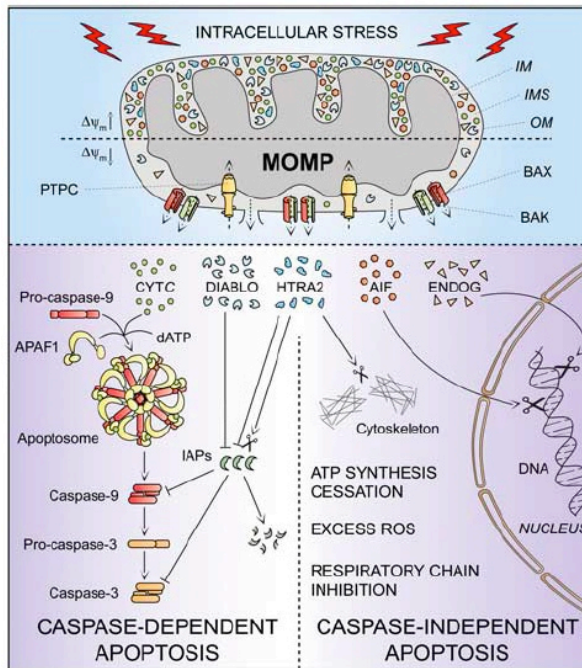


Figure II.3 : apoptose intrinsèque d'après (48). MOMP mitochondrial outer membrane permeabilization ; CYTC cytochrome c ; PTPC permeability transition pore complex.

La perméabilisation de la membrane mitochondriale (MMP) est donc le point de non retour de la cascade biochimique conduisant à une apoptose intrinsèque caspase dépendante et/ou caspase indépendante.

II.2. Autophagie

La mort autophagique est une mort cellulaire accompagnée d'une vacuolisation cytoplasmique massive qui témoigne d'un flux autophagique accru(48).

Les défauts d'autophagie entraînent des troubles du développement et sont associées à certaines pathologies cardiaques, musculaires ou neurodégénératives (51,52)

L'autophagie a été décrite en 1973 par Schweichel et Merker (53) comme un mécanisme essentiel de mort cellulaire. Cependant les travaux plus récents montrent que la mort

autophagique est exceptionnelle et que l'autophagie est plus souvent un mécanisme de défense que de mort cellulaire(50,51).

L'autophagie permet de lutter contre un stress métabolique et de restaurer l'homéostasie cellulaire. Son inhibition aggrave la mort cellulaire dans la plupart des cas. Activer l'autophagie permet de lutter contre des phénomènes de vieillissement, de dégénérescence et d'ischémie. Inhiber l'autophagie permet de sensibiliser des tumeurs à la radiothérapie ou à d'autre chimiothérapies :l'autophagie peut entraîner la mort de certaines cellules cancéreuses n'exprimant plus des protéines régulatrices de l'apoptose comme BAK, BAX ou des caspases(48).

L'autophagie correspond au catabolisme de structures cytoplasmiques dans les lysosomes. Les autophagosomes sont des vésicules composées d'une double membrane. Ils renferment progressivement des structures cytoplasmiques comme des agrégats de protéines et des organelles endommagés ou surnuméraires. Les autophagosomes fusionnent ensuite avec les lysosomes pour former des autophagolysosomes. Les hydrolases lysosomales dégradent la membrane interne et le contenu de l'autophagosome. Les macromolécules obtenus sont alors exportées dans le cytoplasme où elles participent à la production d'énergie ou à la synthèse de nouveaux métabolites(50).

En culture cellulaire, l'activité autophagique d'une cellule est démontrée par la présence d'autophagosomes et d'autophagolysosomes en microscopie électronique et par la détection de la lipidation du microtubule-associated protein 1 light chain 3 (MAP1LC3 ou LC3)(50). Le LC3 II participe à l'élongation des vésicules autophagiques.

Pour définir une mort cellulaire comme une mort autophagique il faut démontrer que l'activité autophagique est augmentée mais également que l'inhibition des processus autophagiques inhibe la mort cellulaire(48).

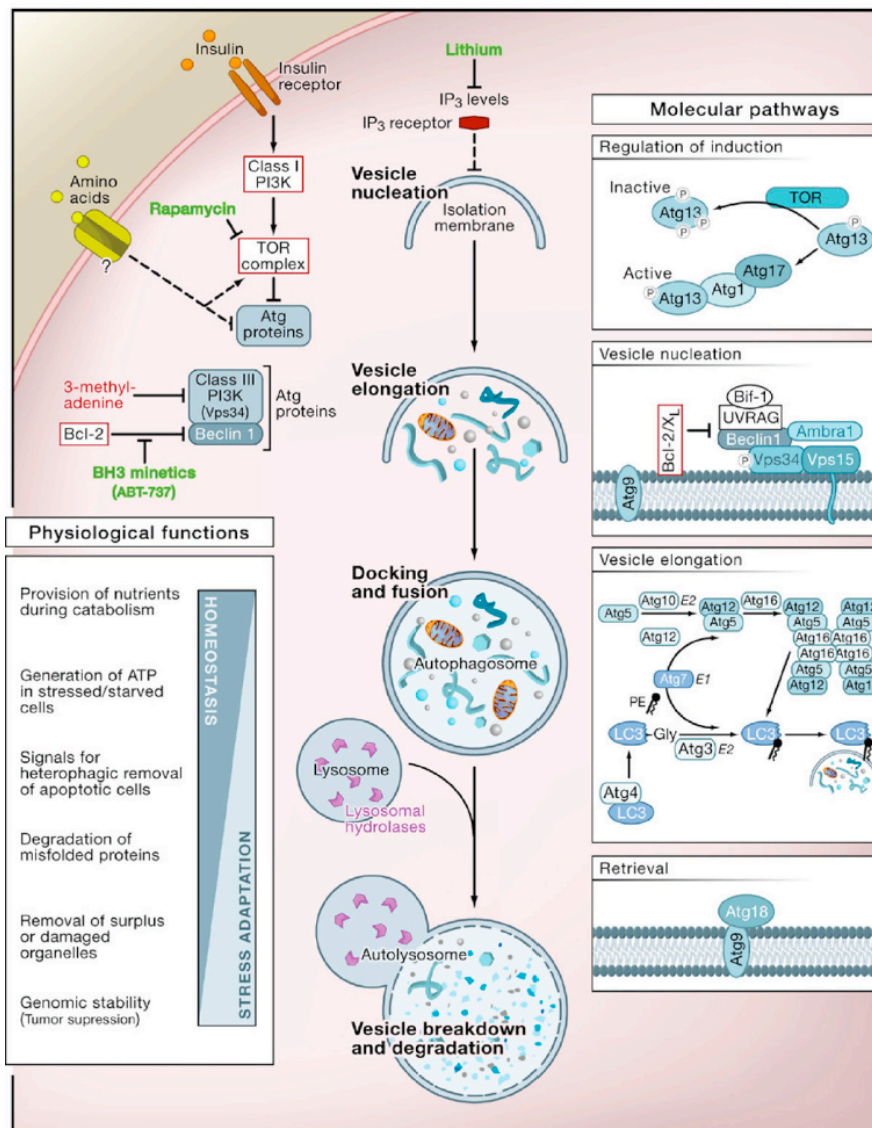


Figure II.4 : autophagie d'après (50).

II.3. Nécrose cellulaire.

La nécrose cellulaire a longtemps été considérée comme accidentelle, passive et toujours pathologique. On sait actuellement que ce mécanisme de mort cellulaire peut être régulé et correspondre à une mort cellulaire programmée physiologique(54). La nécrose correspond à la mort cellulaire de type III de la classification de Schweichel et Merker(53).

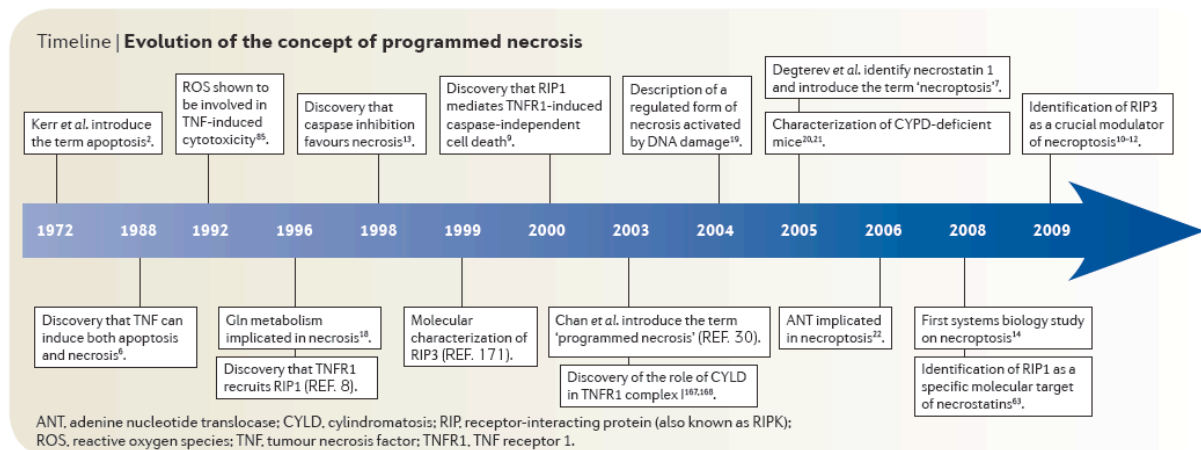


Figure II.5 :chronologie de l'évolution des concepts sur la nécrose cellulaire, d'après (54)

La définition morphologique de la nécrose cellulaire a d'abord été négative, c'est à dire absence d'aspect morphologique d'autophagie ou d'apoptose. Cependant les cellules en voie de nécrose ont des caractéristiques morphologiques spécifiques en microscopie électronique : cytoplasme translucide, gonflement des organelles cytoplasmiques, condensation de la chromatine en amas irréguliers, gonflement cellulaire (oncosis) entraînant une rupture précoce de la membrane plasmique(47).

Il existe peu de marqueurs biochimiques spécifiques de la nécrose cellulaire(54). La perméabilisation des membranes lysosomales et mitochondriales, la génération excessive de ROS (reactive oxygene species), la consommation d'ATP, l'activation de protéases non-caspase comme les cathepsines et la calpaïne et l'augmentation de l'influx calcique intra cellulaire sont également détectés dans l'apoptose. Une perméabilisation précoce des membranes plasmiques est très évocatrice d'un mécanisme de nécrose cellulaire. La présence d'HMGB1 (high-mobility group protein B1) et de CYPA (ou peptidylprolyl isomerase A, PPIA) dans le milieu extracellulaire sont des indicateurs de perméabilisation de la membrane plasmique (PMP), donc de nécrose cellulaire.

Initiation de la nécrose cellulaire

L'activation des récepteurs de mort cellulaire entraîne généralement une apoptose mais dans certaines conditions et sur certains types cellulaires elle entraîne une nécrose cellulaire programmée. Les récepteurs impliqués sont FAS/CD95, TNF receptor 1 et 2 (TNFR), récepteurs TRAIL (TNF-related apoptosis inducing ligand receptor) DR4 et DR5.

La voie régulée de nécrose cellulaire la mieux connue est celle de TNFR1. Le TNF α provoque un changement conformationnel de TNFR lui permettant de recruter au niveau de sa partie cytoplasmique un complexe multi protéique appelé TNFR complexe I(55). Il comprend

les protéines TRADD (TNFR-associated death domain), RIPK1 (receptor-interacting protein kinase), cIAP1 et 2 (cellular inhibitor of apoptosis), TRAF 2 et 5 (TNFR-associated factor). En fonction des stimuli externes et du type de cellules le complexe I va induire une survie cellulaire via la voie NF- κ B ou une mort cellulaire favorisée par le recrutement de ROS-generating NADPH oxydase 1(NOX1) à la membrane plasmique.

Si la voie pro-survie de NF- κ B est inactivée et RIPK1 débiquitylé, le TNFR1 est internalisé dans le cytoplasme cellulaire, ce qui provoque l'assemblage d'un death inducing signaling complex (DISC), ici appelé TNFR complexe II. Il contient TRADD, FADD (FAS-associated protein with a death domain), caspase 8, RIPK 1 et 3 (receptor-interacting protein kinase). Ce complexe peut être rapproché du ripoptosome, qui est également formé par l'association de RIPK1, FADD et caspase 8 dans des conditions de stress cellulaire indépendamment des récepteurs de mort cellulaire (56). Le TNFR complexe II peut induire une apoptose ou une nécrose cellulaire. La caspase 8 promeut une apoptose en inhibant par clivage RIPK 1 et 3 et en activant la cascade des caspases de l'apoptose. Au contraire, si la caspase 8 est inhibée, RIPK 1 et 3 sont phosphorylées et induisent une nécrose cellulaire. RIPK 1 et RIPK3 vont former le nécrosome en association avec d'autres protéines comme MLKL (mixed lineage kinase domain-like) et PGAM5 (mitochondrial phosphoglycerate mutase protein phosphatase)(57).

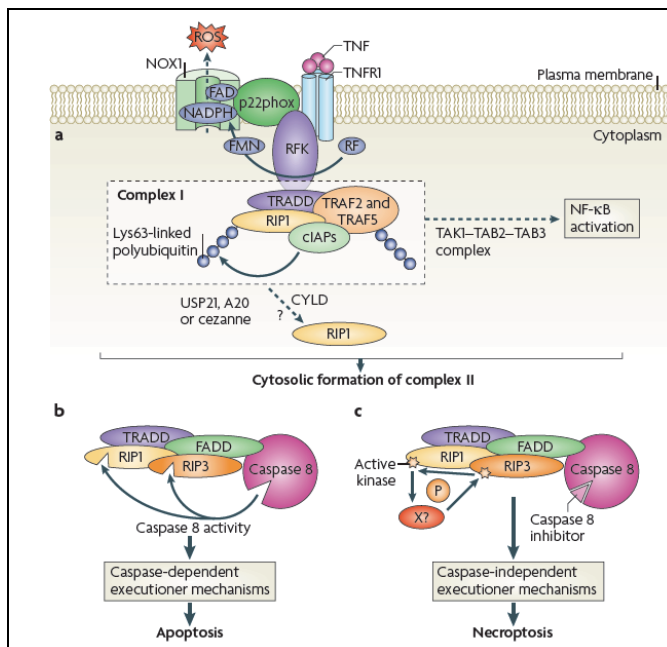


Figure II.6 : l'interaction du TNF et du TNFR conduit à la formation d'un complexe I qui va entraîner soit une survie, soit une mort cellulaire par apoptose ou nécrose en fonction de l'activation ou de l'inhibition de caspase 8. D'après (54)

Le terme de nécroptose désigne stricto-sensu une forme régulée de nécrose qui implique l'activation de RIPK1 et RIPK3 (receptor-interacting protein kinase) après stimulation du récepteur de mort cellulaire TNFR1(48). La nécrostatine est une petite molécule synthétique qui bloque de manière allostérique l'activité kinase de RIPK1 et inhibe la nécroptose(58). Des travaux récents (59) ont montré que RIPK3 pouvait induire une nécrose cellulaire même en l'absence de RIPK1. Les cellules primaires LLC ne formeraient pas le complexe ripoptosome de manière stable, ce qui expliquerait une part de leur résistance aux mécanismes de mort cellulaire (60).

Voie intrinsèque d'activation de la nécrose cellulaire : les ROS et les calcium ionophores peuvent induire une nécrose cellulaire. Cette voie est dépendante de PGAM5 (mitochondrial phosphoglycerate mutase protein phosphatase), mais indépendante des récepteurs de mort cellulaire et des protéines RIPK 1 et 3(57). PGAM5 est activé par les ROS, via Keap-1(61) qui est une protéine sensible au variation du potentiel REDOX cellulaire.

Exécution de la nécrose cellulaire(54)

L'exécution de la nécrose cellulaire repose sur des perturbations bioénergétiques, la production excessive de ROS, et la perméabilisation des membranes des mitochondries et des lysosomes

L'adénine nucléotide translocase (ANT) est une protéine de la membrane interne mitochondriale. Elle échange l'ATP produit par la mitochondrie avec l'ADP cytosolique. RIPK1 inhibe ANT, ce qui diminue la production mitochondriale d'ATP et modifie le potentiel membranaire mitochondrial.

Le nécrosome active les sphingomyélinases (SMase) qui libèrent des céramides et de la sphingosine. Le nécrosome augmente l'influx calcique ce qui active les calpaïnes et la phospholipase A2 plasmique (cPLA2) qui libère à partir des phospholipides de l'acide arachidonique, lui-même transformé en hydroperoxydes lipidiques par la lipoxygénase. Sphingosines, calpaïnes et hydroxydes lipidiques provoquent une perméabilisation des membranes lysosomales (LMP) ce qui entraîne une libération des hydrolases acides lysosomales dans le cytoplasme.

Le nécrosome augmente le pool d'ion fer libre en activant la dégradation de la ferritine et stimule la glycogénolyse et la glutaminolyse. Le métabolisme oxydatif, le métabolisme des céramides, l'augmentation du pool d'ions fer libres et l'activation de NOX1 produisent des ROS (reactive oxygen species). Les ROS entraînent une peroxydation lipidique, des anomalies de la chaîne respiratoire mitochondriale. Le stress oxydatif et l'augmentation du

taux de calcium favorisent l'ouverture prolongée du permeability transition pore complex (PTPC) qui conduit à la perméabilisation de la membrane mitochondriale (MMP). Le PTPC implique les protéines ANT, VDAC (voltage dependant anion channel), cyclophilin D (CYPD). La MMP entraîne une libération de molécule mitochondriale cytotoxique. AIF (apoptosis inducing factor) dégrade l'ADN nucléaire ce qui augmente l'activité réparatrice de PARP-1 (polyADP-ribosepolymerase 1) sur l'ADN mais épuise rapidement les stock d'ATP.

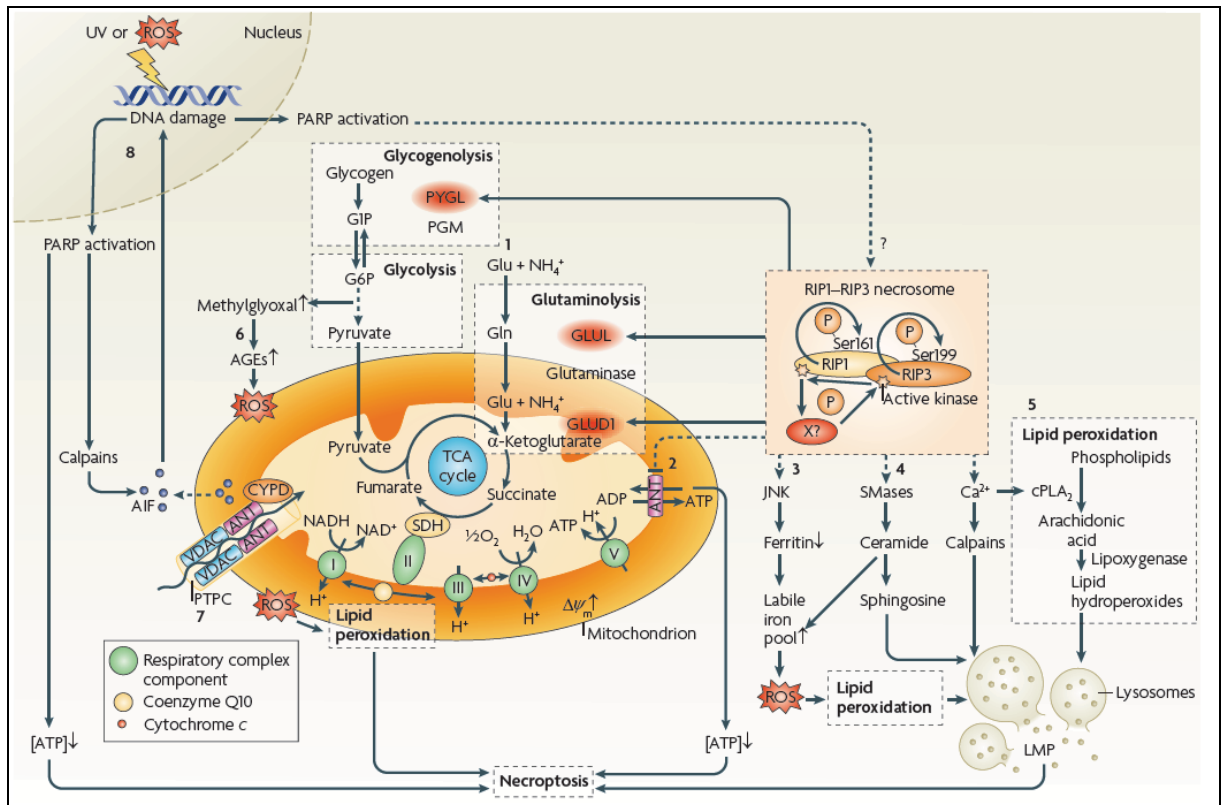


Figure II.7 : Exécution de la nécrose cellulaire d'après (54).

La phosphatase mitochondriale PGAM5 (mitochondrial phosphoglycerate mutase protein phosphatase) est activée dans les voies intrinsèques et extrinsèques d'induction de la nécrose cellulaire. Elle se lie au nécrosome dans une atmosphère hydrophobe, probablement au site de fission mitochondriale où est localisée DRP1 (dynamin related protein). PGAM5 active DRP1 en déphosphorylant sa serine 637(57). DRP1 contrôle la fission mitochondriale (62). La translocation de DRP1 du cytoplasme à la mitochondrie provoque une fragmentation des mitochondries, une altération de la chaîne respiratoire mitochondriale, une dissipation du potentiel trans-membranaire mitochondrial, une génération de ROS et une baisse du niveau d'ATP (63). Le niveau d'expression de DRP1 est corrélée à la susceptibilité de cellules primaire de LLC (leucémie lymphoïde chronique) d'entrer en mort nécrotique (63).

L'inhibition de DRP1 par des agents chimiques ou des siRNA diminue la nécrose induite par le $\text{TNF}\alpha$ (57).

II.4. Autres morts cellulaires

D'autres types de mort cellulaire ont été décrits(48,50). Ils correspondent à des cas spécifiques, parfois débattus, et partagent souvent des caractéristiques de l'apoptose ou de la nécrose.

Catastrophe mitotique : c'est une mort cellulaire survenant pendant ou peu de temps après un échec de mitose. Les cellules ont des micronoyaux et sont multinuclées.

Anoikis : forme d'apoptose provoquée par le détachement des cellules de la matrice extra-cellulaire.

Entosis : une cellule phagocyte une cellule voisine vivante qui va alors mourir par digestion dans le phagosome

Parthanatos : mort caspase indépendante, induite par PARP-1 (polyADP-ribose polymérase 1), médiée par des facteurs induisant une apoptose.

Autoschizis : mort induite par l'association de vitamine C et K3 dans certaines cellules cancéreuses, conduisant à une auto-excision du cytoplasme.

Pyroptosis : activation de la caspase 1, production d'interleukine 1β , aspect morphologique d'apoptose ou de nécrose.

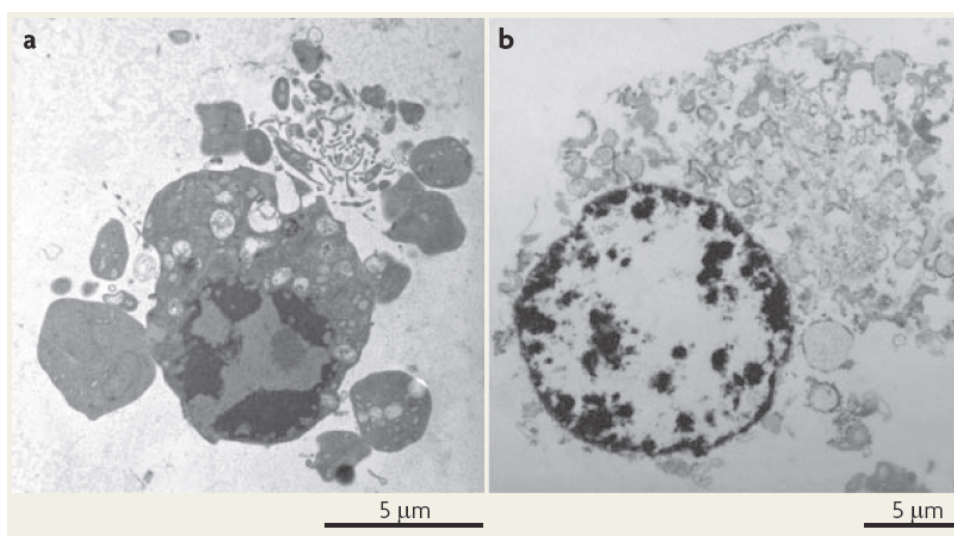


Figure II.8 : aspect morphologique de cellules mourant par apoptose (a) ou nécrose (b) d'après (54)

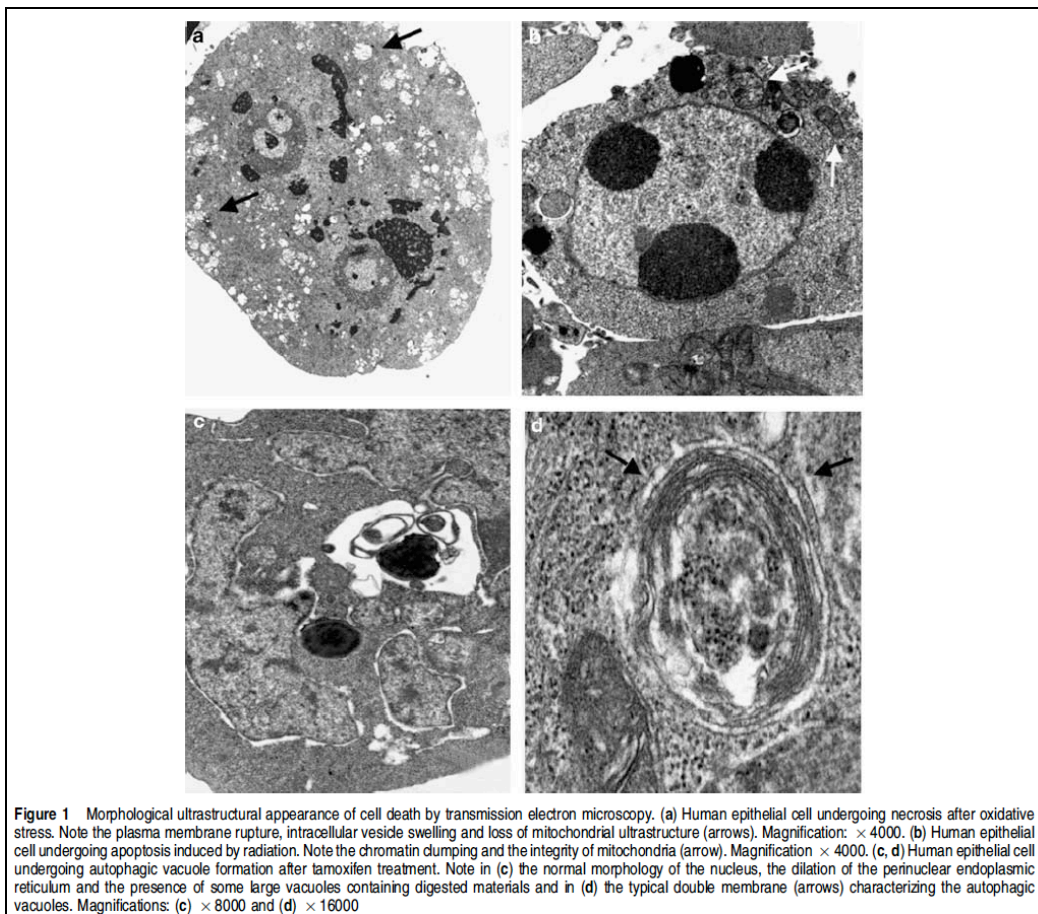


Figure II.9 : aspect morphologique de cellules mourant par nécrose (a), apoptose (b) et autophagie (c et d) d'après (46)

III. Fission et fusion mitochondriale. Rôle de DRP1

Les mitochondries sont des organelles indispensables à la survie cellulaire. Comme nous l'avons vu précédemment, elles sont impliquées dans les mécanismes de mort cellulaires par apoptose et par nécrose. Elles sont responsables de la production d'énergie (ATP), du contrôle des flux calciques, du maintien du potentiel membranaire.

Ce n'est que plus récemment que des travaux sur les levures ont montré que les mitochondries étaient des organelles dynamiques en perpétuels cycles de fission et de fusion(64). Ces processus actifs permettent aux mitochondries de communiquer, de migrer dans la cellule et de s'adapter aux besoins énergétiques locaux de la cellule. La dynamique mitochondriale est contrôlée par des protéines GTPases conservées dans l'évolution. Chez les mammifères, la fusion dépend de la mitofusine 1 et 2 (Mfn 1 et 2) et de optic-atrophy 1 (OPA1), la fission de la dynamin related protein 1 (DRP1).

III.1. La fusion mitochondriale

Elle débute par la fusion de la membrane externe puis de la membrane interne. La mitofusine s'insère dans la couche lipidique de la membrane externe par sa zone hydrophobe (paddle). Mitofusine forme des dimères qui rapprochent les mitochondries. L'hydrolyse de GTP par le domaine GTPase permet un changement de conformation de Mitofusine et une fusion des membranes externes de deux mitochondries adjacentes (figure infra). OPA1 régule la fusion des membranes internes mitochondriales.

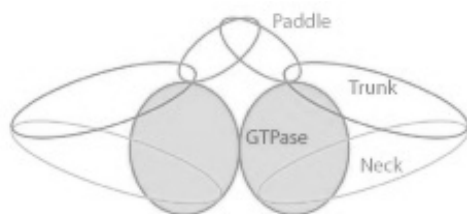
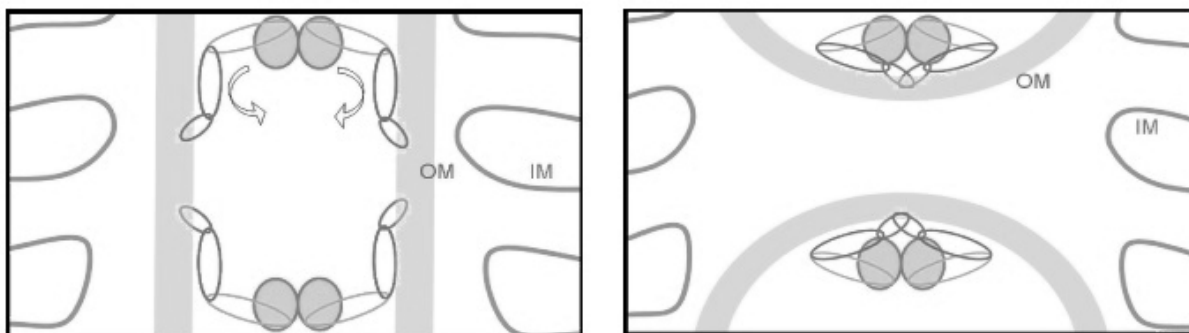


Figure III.1 :modélisation de Mfn2 en 4 domaines



et mécanisme de fusion de la membrane externe (OM) (65)

III.2. La fission mitochondriale

Elle est contrôlée par la dynamin related protein 1 (DRP1). La dynamin est une GTPase impliquée dans la scission des vésicules d'endocytose.

DRP1 est composé de 736 acides aminés. Son poids est de 82 kDa. Son homologue chez la levure est Dnm1 (dynamine 1). DRP1 est composé de trois domaines conservés dans l'évolution : un domaine GTPase N-terminal, un domaine central en hélice et un domaine GED (GTP effector domain qui contribue à la fission mitochondriale(65). DRP1 effectue un va et vient perpétuel entre le cytosol et la membrane mitochondriale en moyenne toutes les 50 secondes(66). Chez la levure la localisation de DRP1 à la membrane mitochondriale est favorisée par une interaction indirecte avec Fis1, protéine de bas poids moléculaire de la membrane mitochondriale externe(67). Le rôle de son homologue hFIS chez l'homme est lui débattu. Le Mitochondrial fission factor (Mff) interagit avec DRP1 et semble indispensable à la fission mitochondriale(68).

DRP1 forme des dimères puis des oligomères qui vont former une « ceinture » autour de la mitochondrie qui va constricter la membrane plasmique et provoquer une fission. Cette action de DRP1 est dépendante de son activité GTPase(65).

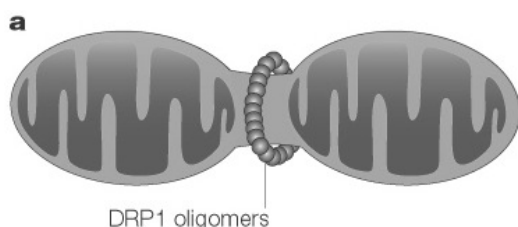


Figure III.2 :Fission mitochondriale (69)

III.3. Contrôle de l'activité de DRP1

L'activité de DRP1 est principalement régulée par des phosphorylations, une sumoylation et une ubiquitination.

- **Phosphorylation/déphosphorylation :**

La phosphorylation et la déphosphorylation de DRP1 en différents sites peuvent soit augmenter soit inhiber l'activité de DRP1.

- Résidus 656 : la protéine kinase A (PKA) phosphoryle DRP1 en 656, ce qui inhibe l'activité GTPase et la fission mitochondriale. La protéine phosphatase 2A (PP2A)(70) déphosphoryle DRP1 en 656 et l'active.

- Résidus 616 : la phosphorylation en 616 par cdk1 (cyclinB) (71) au cours de la mitose augmente l'activité de DRP1. L'acide okadaïque augmente l'activité de cdk1 et la phosphorylation en 616 de DRP1(72). PP2A inhibe la phosphorylation en 616 (72).

- Résidus 637 : la déphosphorylation de la sérine 637 par la calcineurine (73) ou par PGAM5 (57) favorise la fission mitochondriale, tandis que la phosphorylation en 637 par PKA favorise la fusion (73).

- **Sumoylation :**

L'adjonction d'un résidu SUMO (small ubiquitin-related modifier) sur une lysine d'une protéine est une modification post-traductionnelle. Il existe 4 isoformes de SUMO chez les mammifères(74). La Sumoylation est réversible. Ses conséquences sont variables en fonction de son substrat. La Sumoylation de DRP1 empêche sa dégradation, stabilise sa liaison à la membrane mitochondriale et favorise la fission mitochondriale(75). Les protéines pro-apoptotiques Bax et Bak de la famille Bcl2 favorisent la Sumoylation de DRP1(66). SENP5 (SUMO1/sentrin specific peptidase 5) inhibe la sumoylation de DRP1.

- **Ubiquitination**

DRP1 est ubiquitinylé par MARCH5 (membrane associated RING-CH5), ce qui entraîne une altération de la morphologie mitochondriale. L'action activatrice ou inhibitrice sur DRP1 est débattue (65).

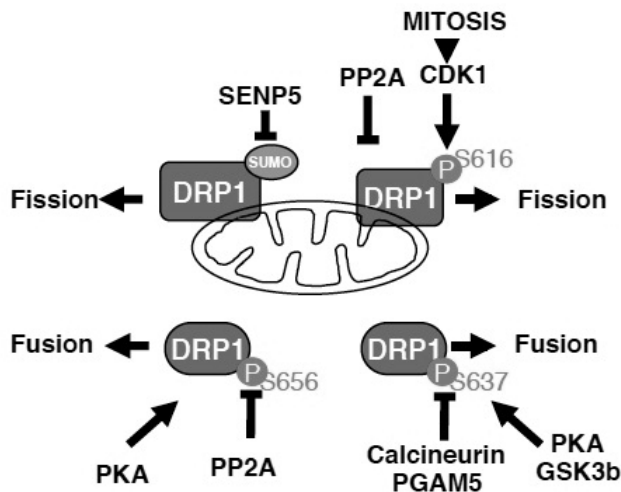


Figure III.3 : Résumé des mécanismes de régulation de l'activité de DRP1

III.4. Rôle physiologique de la fusion et fission mitochondriale

Fission et fusion mitochondriales sont essentielles pour les cellules en voie de croissance et de division. La phosphorylation en 616 par cdk1 (cyclinB) (71) au cours de la mitose augmente l'activité de DRP1. L'amplification des processus de fission permet d'augmenter le nombre de mitochondries et de les distribuer entre les deux cellules filles au cours de la mitose. MITOFUSINE et DRP sont indispensables au cours de l'embryogénèse. L'absence d'expression de l'une ou de l'autre de ces protéines entraîne une mort in utero (65,76). Les mutations de MITOFUSINE sont la première cause des formes axonales autosomique dominante de la neuropathie héréditaire de Charcot-Marie-Tooth (CMT2A)(77). Les mutations de OPA1 sont responsables d'une cécité par atrophie du nerf optique de transmission autosomique dominante. Les mutations de DRP1 sont plus délétères et entraîne une mort précoce(65).

La fusion est stimulée par un accroissement de la demande énergétique. La chaîne respiratoire des mitochondries fusionnées est plus efficace, ce qui permet une plus grande production d'ATP.

Les mitochondries sont altérées par des stress exogène et endogène : radiations, toxiques, production de ROS par le métabolisme oxydatif. La fusion permet aux mitochondries défectueuses de se réparer en s'amalgamant avec une mitochondrie intègre. Au contraire la fission permet de concentrer les débris et anomalies dans certaines mitochondries (en jaune sur le schéma infra). Ces mitochondries deviennent non fonctionnelles et perdent leur

potentiel transmembranaire. Cette altération du potentiel active la kinase PINK1 (PTEN-induced putative kinase 1) qui recrute la E3 ligase Parkin du cytosol à la membrane externe mitochondriale. Parkin ubiquitine les protéines de la membrane mitochondriale. Ce signal adresse la mitochondrie déficiente dans un autophagosome où elle sera dégradée et recyclée par autophagie (id mitophagie). Des mutations de Parkin et PINK1 sont responsables de certaines maladies de Parkinson héréditaires(76).

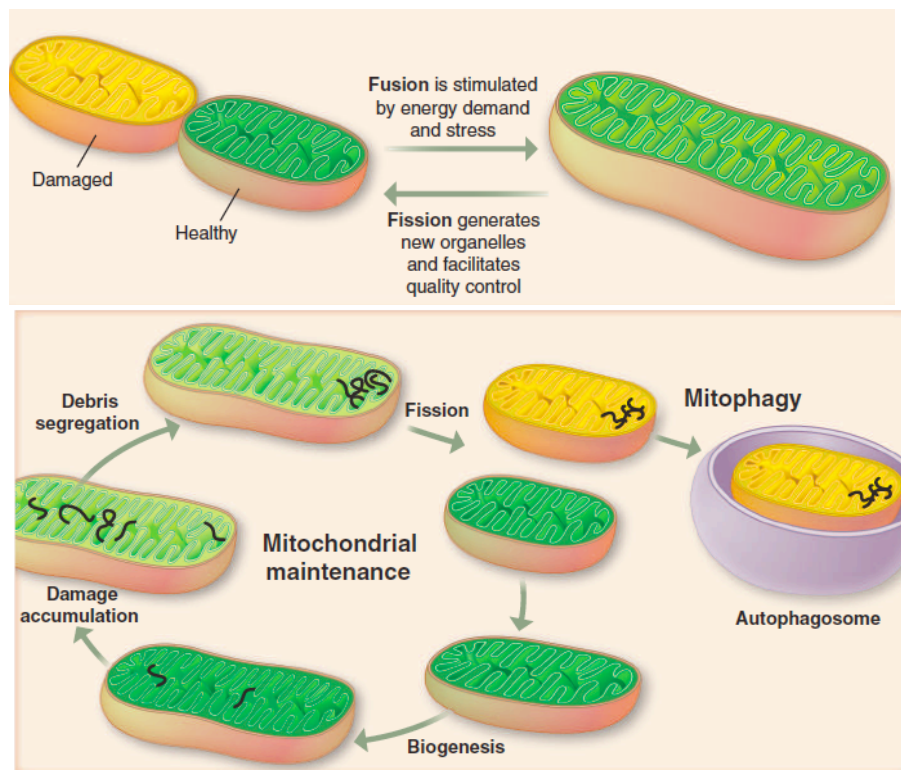


Figure III.4 :Lorsque les mitochondries sont altérées, la fusion permet de les réparer et la fission de dégrader les mitochondries les plus altérées (76)

III.5. Fission mitochondriale et mort cellulaire programmée

La fission mitochondriale est de survenue précoce dans l'apoptose et la nécrose cellulaire. Elle favorise la perméabilisation de la membrane plasmique des mitochondries et le relargage du cytochrome C. Les protéines pro-apoptotiques BAX et BAK interagissent avec les protéines MITOFUSINE et DRP1. Au cours de l'apoptose la protéine BAX colocalise avec DRP1 et MITOFUSINE sur la membrane mitochondriale externe(76). L'inactivation de DRP1 inhibe la cytotoxicité induite par les radiations ionisantes, la staurosporine, l'étoposide

ou le TNF α (57,63,65). La délétion du gène Dnm1, homologue fongique de DRP1, augmente la durée de vie de certaines levures (78).

Bien que les différents types de mort cellulaire s'accompagnent souvent d'une fission mitochondriale, cette dernière n'est pas forcément indispensable à dans la cytotoxicité induite par différentes drogues.

La fission mitochondriale est dépendante de l'activité GTPase de DRP1. En revanche les mécanismes de mort cellulaire impliquant DRP1 sont indépendants de son activité GTPase (65,66). Par exemple, la nécrose cellulaire induite par la liaison de CD47 sur des lymphocytes B nécessite la présence de DRP1, mais l'inactivation du site GTPase de DRP1 ne modifie pas la cytotoxicité de CD47 dans ce modèle(63). C'est le maintien de DRP1 sur la membrane mitochondriale par l'arrêt de son va et vient entre cytosol et mitochondrie qui est responsable de l'effet cytotoxique de DRP1 (66). DRP1 peut altérer la chaîne respiratoire mitochondriale, provoquant une perte du potentiel transmembranaire, la génèse de ROS (reactive oxygen species) et l'arrêt de la production d'énergie sous forme d'ATP (63).

DRP1 est responsable d'une fission mitochondriale dépendante de son activité GTPase, alors que son action cytotoxique est indépendante de son activité GTPase.

IV. Sphingolipides et Fingolimod (FTY720)

IV.1. Métabolisme des sphingolipides

Le nom de sphingolipide vient du Sphinx, en raison du caractère mystérieux de ces lipides au moment de leur découverte. Les sphingolipides sont des lipides complexes qui résultent de l'amidification d'un acide gras sur une sphingosine. La famille des sphingolipides comprend des molécules très diverses en fonction de la présence ou de la substitution du groupe hydroxyl porté par le premier carbone C1 de la sphingosine. Si le groupe R du schéma infra est un atome d'hydrogène, la molécule est un céramide. Si le groupe R est une phosphocholine, la molécule est une sphingomyéline et si le groupe R est un sucre, la molécule est un glycosphingolipide.

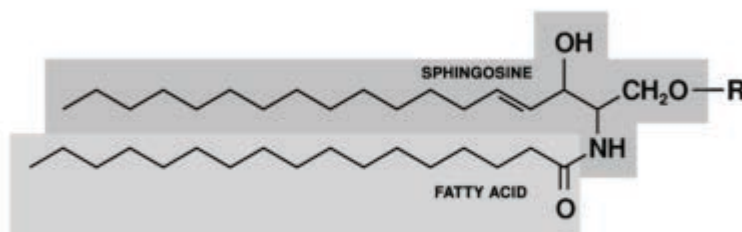


Figure IV.1

Les céramides sont l'élément central du métabolisme des sphingolipides. Ils sont synthétisés de novo au niveau de la surface cytosolique du reticulum endoplasmique : un acide aminé sérine et un acide gras palmitoyl-CoA sont transformés par la sérine palmitoyltransferase (SPT) en 3-kéto-dihydrosphingosine, qui est réduite en dihydrosphingosine puis N-acylée avec différents acides gras (acyl-CoA) par la céramide

synthase. Ces dihydrocéramides sont désaturés pour donner des céramides. Les céramides sont en fait très variés en fonction de l'acide gras dont ils sont composés(79,80).

Les céramides sont ensuite transportés du reticulum endoplasmique à l'appareil de Golgi par des céramide transfert protein (CERT)(81). Les céramides peuvent y être glycosylés pour donner des glucosylcéramides qui sont transférés dans la lumière du Golgi pour y être convertis en glycosphingolipides complexes. Les céramides présents au niveau du Golgi peuvent également être transformés en sphingomyéline par l'adjonction d'une phosphocholine. Glycosphingolipides et sphingomyélines sont transportés par des vésicules de l'appareil de Golgi aux membranes plasmiques(79).

Les sphingomyélines présents au niveau des membranes plasmiques peuvent être transformés en céramides par la sphingomyélinase puis en sphingosine par des céramidases. La sphingosine est ensuite phosphorylée par des sphingosine kinases en S1P (sphingosine1phosphate) (82). La sphingosine kinase 1 est localisée au niveau du cytoplasme et de la membrane plasmique lorsqu'elle est activée. La sphingosine kinase 2 est localisée dans le cytoplasme et dans les noyaux cellulaires(79).

Au niveau du reticulum endoplasmique, le S1P peut soit redonner de la sphingosine et des céramides via des S1P phosphatases et des céramides synthases, soit être irréversiblement dégradé par une S1P lyase située sur la face cytosolique de la membrane du reticulum endoplasmique. Le S1P synthétisé au niveau des membranes plasmiques est très mobile dans la cellule, il disparaît rapidement de la zone de la membrane plasmique. Le S1P est exporté dans le milieu extracellulaire par des transporteurs membranaires notamment ABCC1, ABCG2 et Spns2(79,82). Les taux de S1P est élevé dans le secteur plasmatique (environ 0,5µM(80)) où il est lié pour 30% à l'albumine et pour 65% aux HDL (high density lipoprotein). Dans le secteur plasmatique, le S1P est chaperonné par l'HDL-associated ApoM, au contraire des céramides et des glycosphingolipides qui, sont associés aux LDL et VLDL (low density et very low density lipoprotein)(81).

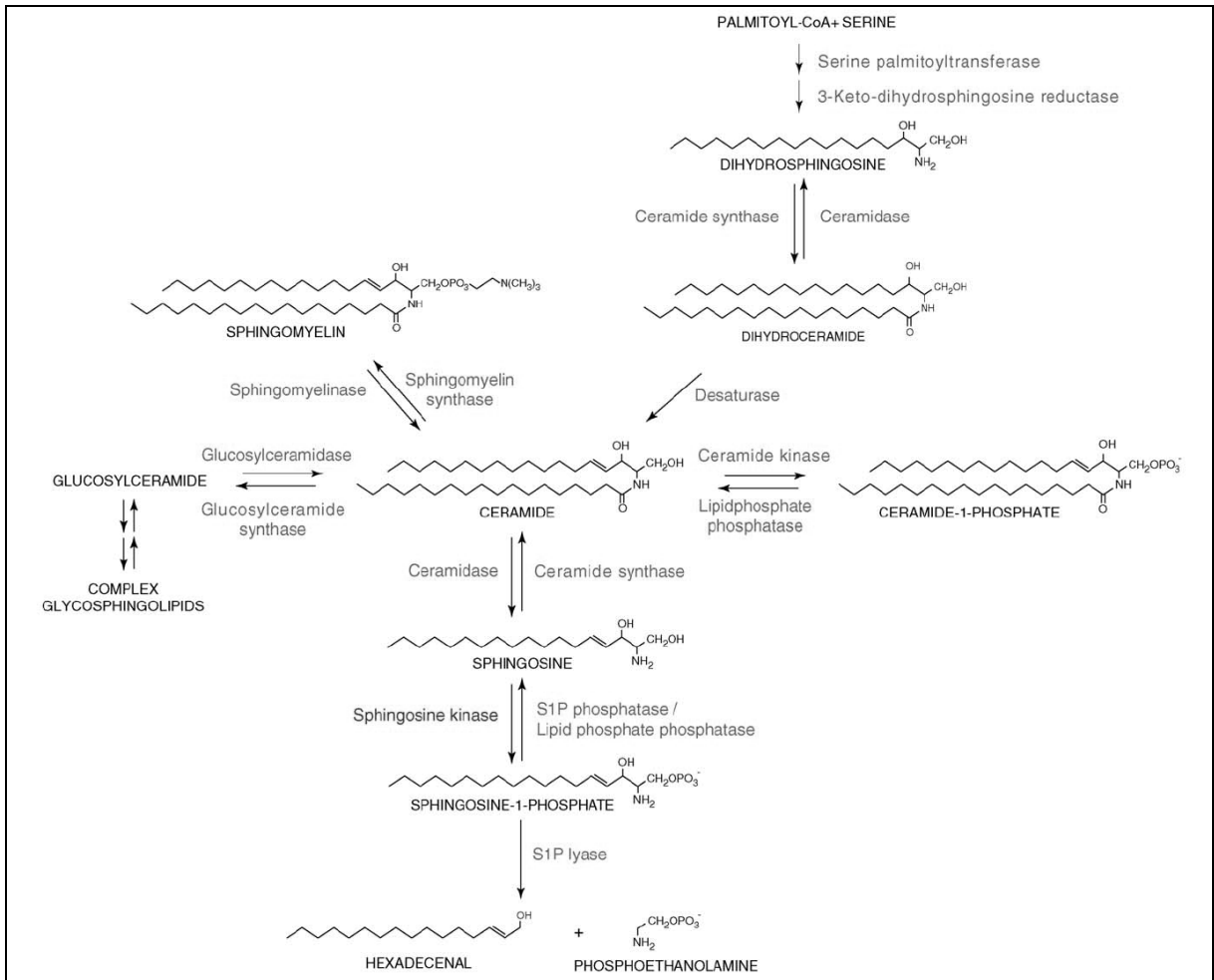


Figure IV.2 : Métabolisme des sphingolipides d'après (79)

Les glycosphingolipides et les gangliosides sont des sphingolipides complexes. Les gangliosides sont formés d'un céramide associé à des sucres neutres (β galactose, N-acetyl- β -galactosamine, α galactose, glucose) liant un ou plusieurs acides sialiques (ou acide neuraminique, NeuAc). La nomenclature de Svennerholm(83) désigne les gangliosides sous la forme GXyz : G pour ganglioside, X pour le nombre d'acide sialique, y indique la longueur de la séquence de sucres neutres (5 moins le nombre de sucres) et z l'isomère (a, b ou c) qui dépend de la position des acides sialiques.

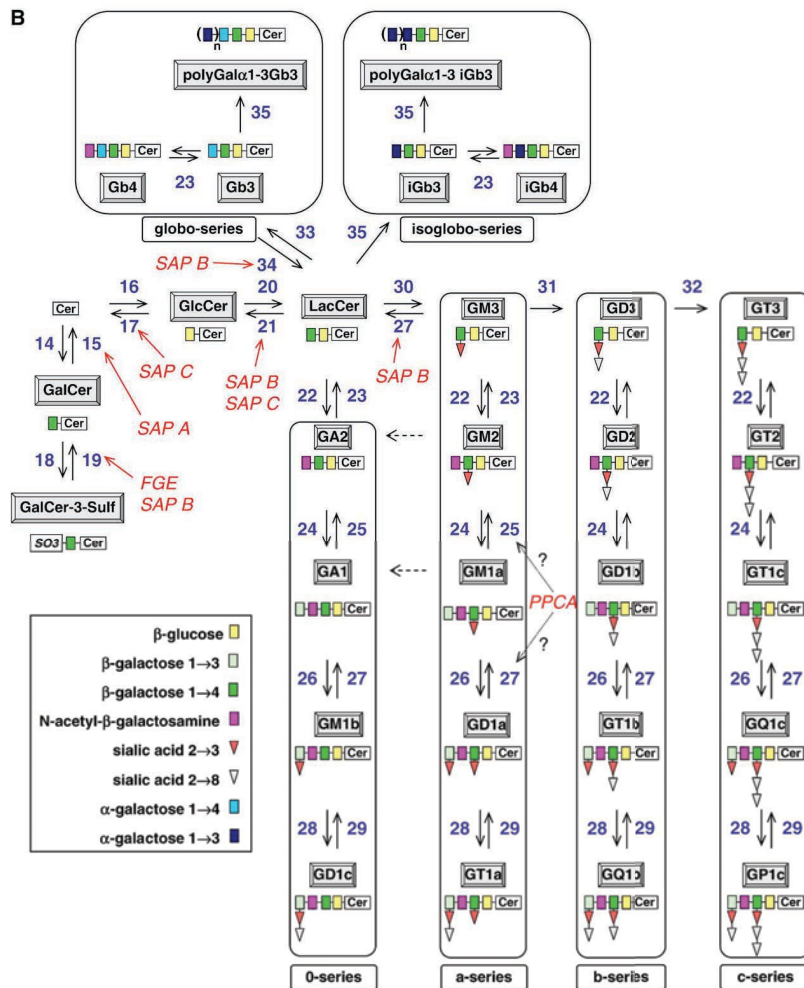


Figure IV.3 : métabolisme des sphingolipides complexes, d'après (80)

Régulation du métabolisme des sphingolipides.

La synthèse des sphingolipides de novo est régulée par l'abondance des substrats palmitoylCoA et sérine. Dans l'obésité et le syndrome métabolique, l'augmentation du taux de palmitoyl-CoA stimule la production de sphingolipides. La régulation du métabolisme des sphingolipides s'effectue au niveau de plusieurs enzymes clef de leur métabolisme : sérine palmitoyl transférase (SPT), céramide transfert protein (CERT), céramide synthase et sphingosines kinases.

La sérine palmitoyl transférase (SPT) est composée de 3 sous-unités, SPTLC1, SPTLC2 et ssPT. L'hétérodimère SPTLC1 et SPTLC2 a une faible activité enzymatique, mais l'association avec ssPT augmente fortement cette activité(84). Dans les levures, un stress de la membrane plasmique (étirement) ou une déplétion en sphingolipide entraînent une translocation de la protéine Slm1 qui va activer le complexe kinase TORC2 (target of

rapamycin complex 2) qui phosphoryle la kinase Ypk1 (homologue de la serum and glucocorticoid-induced kinase des mammifères). Ypk1 activé va phosphoryler le complexe Orm et ce fait lever l'inhibition sur le complexe SPT et augmenter la synthèse de novo de sphingolipides(85).

Chez les mammifères, l'activité des protéines de transport des céramides (CERT) vers l'appareil de Golgi est régulée par la teneur intracellulaire en sphingolipides (81).

Le taux de shingosine est maintenu bas dans les membranes plasmiques par les sphingosine kinases et la céramide synthase. Les sphingosine kinase 1 et 2 phosphorylent la sphingosine en S1P qui est rapidement exporté dans le milieu extracellulaire(80). La céramide synthase reforme des céramides à partir des sphingosines.

IV.2. Rôle et fonctions physiologiques des sphingolipides

Les sphingolipides sont des lipides complexes spécifiques des organismes eukaryotes, des levures aux mammifères. Associés au cholestérol, ils ont un rôle structurel dans la composition des membranes plasmiques et des gaines de myéline. Ils sont indispensables à la formation de zones spécialisées de ces membranes plasmiques, les rafts et les caveola. Enfin, les sphingolipides jouent un rôle dans la signalisation cellulaire.

IV.2.1. Rôles des différents sphingolipides

Sphingolipides simples et céramides : leur présence est indispensable à la survie cellulaire. La sérine palmitoyltransferase (SPTLC1) est impliquée dans la première étape de la synthèse des sphingolipides. Les mutations de SPTLC1 sont responsables d'une neuropathie périphérique héréditaire de transmission autosomique dominante qui s'exprime essentiellement par des déficits sensitifs et des maux perforants(77). Une mutation génétique de la sphingomyélinase acide entraîne une maladie de surcharge avec accumulation de sphingomyéline dans les lysosomes de la plupart des tissus s'exprimant par une hépatomégalie et une altération neurologique progressive (maladie de Niemann-Pick).

Sphingosine 1-phosphate : Le S1P est synthétisé par la plupart des cellules de l'organisme à partir des sphingolipides de la membrane plasmique. Il se lie à des récepteurs

membranaires spécifiques couplés à des protéines G, les S1PR. Il existe 5 types de S1PR exprimés par différents types cellulaires et associés à différentes cascades de signaux intracellulaires(80,86). Les principales fonctions des récepteurs S1P concernent les systèmes nerveux, cardio-vasculaires et immunitaires. Nous développerons infra le rôle du S1P dans la circulation lymphocytaire dans les organes lymphoïdes secondaires.

Récepteur	Distribution tissulaire	Principales fonctions
S1P ₁	Ubiquitaire (Lymphocytes, neurones, endothélium vasculaire)	Sortie des lymphocytes des organes lymphoïdes secondaires Migration et fonction neuronale Développement embryonnaire du système cardiovasculaire et nerveux Fonction de la barrière endothéliale Sécrétion insuline
S1P ₂	Ubiquitaire	Tonus vasculaire Fonction de la barrière endothéliale Oreille interne Conduction nerveuse
S1P ₃	Ubiquitaire	Migration et fonction neuronale Fonction de la barrière endothéliale
S1P ₄	Lymphocytes	Peu connu
S1P ₅	Cerveau	Fonction des oligodendrocytes Migration cellules Natural killer

Tableau IV.1 : Distribution et fonction des différents récepteurs du S1P d'après (86)

Sphingolipides complexes :

Les galactosylcéramides et les sulfatides sont essentiellement retrouvés dans les gaines de myéline. Le glucosylcéramide est le précurseur des glycosphingolipides, il est impliqué dans la différenciation neuronale et dans l'homéostasie cutanée. Les gangliosides sont particulièrement abondants dans les membranes plasmiques des neurones. Les gangliosides représentent 10-20% des lipides totaux des membranes des neurones soit 10 fois plus que dans les autres cellules. Il sont la cible d'une réaction auto-immune par mimétisme moléculaire dans les polyradiculonévrites aiguës ou syndrome de Guillain-Barré(87). Les gangliosides ne sont pas indispensables au développement initial du système nerveux, mais ils contribuent à la conduction nerveuse et à la régénération nerveuse.

Fonction	Sphingolipide impliqué
Apoptose Survie Chemotaxisme/migration	Céramide S1P S1P
Embryogénèse Développement système vasculaire Développement squelette spermatogénèse	S1P, glucosylcéramide, glycosphingolipides S1P Céramide Glucosylcéramide, glycosphingolipides
Neurogénèse Différenciation neuronale Interaction axone/glie Régénération nerveuse Excitabilité neuronale Myélinisation Audition	S1P Glucosylcéramide Gangliosides GD3 S1P Glucosylcéramide, sulfatide S1P
Homéostasie cutanée	Glucosylcéramides, gangliosides
Métabolisme glucidique	Céramides, gangliosides

Tableau IV.2 : Résumé des principales fonctions des sphingolipides d'après (80)

IV.2.2. Sphingolipides et maladies métaboliques

Athérosclérose : le taux de sphingomyéline plasmique est corrélé à l'incidence des maladies cardiovasculaires. L'inhibition de SPT par la myriocine réduit le taux de sphingomyéline et les lésions d'athérosclérose dans un modèle murin (88). Les céramides favorisent l'agrégation des LDL et des VLD qui sont phagocytées par des macrophages transformés en cellules spumeuses dans la plaque d'athérome(81).

Résistance à l'insuline : L'obésité augmente le taux de sphingolipide en activant leur synthèse endogène par la SPT. L'augmentation du taux de céramides bloque le signal induit par l'insuline via Akt. In vitro, le S1P augmente la survie des cellules β des îlots de Langerhans et stimule la production d'insuline. L'augmentation des sphingolipides dans l'obésité est responsable d'une perte d'efficacité et d'une sécrétion accrue d'insuline (résistance à l'insuline).

L'effet protecteur du HDL sur les maladies cardio vasculaires dépend en partie de son interaction avec le S1P(81).

IV.2.3. Sphingolipides, mort cellulaire et tumorigénèse

Sphingolipides, des molécules favorisant la survie cellulaire.

La privation de nutriments entraîne une augmentation de l'activité des sphingosine kinases et une augmentation du S1P favorisant une autophagie et une survie cellulaire(89).

Certains sphingolipides favorisent les processus cancéreux en inhibant la mort cellulaire, en favorisant le potentiel métastatique des tumeurs, en favorisant la néo-angiogénèse néoplasique ou en rendant résistante les tumeurs à l'immunité anti-tumorale et aux chimiothérapies.

L'expression des gangliosides GM3 et GD3 est corrélée au potentiel métastatique de certains mélanomes (90,91). Les gangliosides favorisent l'adhésion des cellules tumorales sur l'endothélium ce qui favorise leur dissémination(90). Des gangliosides produits par les cellules néoplasiques vont inhiber l'immunité anti-tumorale : inhibition des cellules natural killer, des lymphocytes B et T(92), déviation de l'immunité Th1 vers une immunité Th2(93).

La sphingosine1-phosphate (S1P) et la céramide 1-phosphate sont des molécules anti-apoptotiques. Le S1P inhibe l'activation des caspases et la libération du cytochrome c des mitochondries induites par les céramides. Le S1P favorise la néo-angiogénèse, la synthèse de VEGF (vascular endothelial growth factor) et peut inhiber l'immunité anti-tumorale via ses récepteurs S1PR(90,94,95).

Sphingolipides, des molécules favorisant la mort cellulaire

Les céramides favorisent la mort cellulaire en modulant différentes voies de signalisation cellulaire dont PKC, PP1, JNK(79). Elles activent PP2A qui inhibe Bcl-2 (96) et favorisent l'expression de caspase 9 par épissage alternatif (97). CD95L (Fas ligand) induit une augmentation du taux endogène de céramides qui induisent une apoptose dépendante de caspase 9 (98).

Les céramides forment des macro-domaines dans la membrane mitochondriale externe au niveau desquels se polymérisent des protéines Bax pour créer des pores et une perméabilisation de la membrane mitochondriale (MMP)(99). Les céramides sont donc impliquées dans l'apoptose intrinsèque et extrinsèque dépendante des mitochondries (cf chapitre mécanisme de mort cellulaire).

Les sphingolipides entraînent également des morts cellulaires indépendantes des caspases. La sphingosine peut provoquer une perméabilisation de la membrane lysosomale et la libération des protéases lysosomales dans le cytosol(100). Les céramides peuvent directement activer les cathepsines des lysosomes(90). Dans différents modèles de néoplasies, les

céramides sont impliquées dans des phénomènes de nécrose cellulaire médiés par le TNF α et RIPK1 (receptor-interacting protein kinases-1) (101).

Balance céramide/S1P

Schématiquement, les céramides inhibent la croissance cellulaire et favorisent la mort cellulaire et le S1P le contraire. Le taux de S1P est augmenté par les sphingosine kinases et diminué par les S1P lyase et S1P phosphohydrolase. Dans certaines tumeurs, la surexpression du gène de la sphingosine kinase 1 ou la délétion du gène de la S1P lyase, augmente le taux de S1P, diminue le taux de céramides et favorise la prolifération tumorale (90).

Les balances sphingomyéline/céramide et galactosylcéramide/glucosylcéramide régulent également la survie cellulaire(90).

IV.3. Fingolimod (FTY720), un immunosuppresseur utilisé dans la Sclérose en Plaques

IV.3.1. FTY720 (fingolimod) et Sclérose en Plaques.

Le FTY720 ou fingolimod est un dérivé de la myriocine, isolée à partir d'un champignon, l'ascomycete *Isaria sinclairii*(102). Le FTY720 est un immunosuppresseur récemment approuvé dans le traitement de la Sclérose en Plaques (SEP) (103-105).

La SEP est une maladie auto-immune chronique spécifique d'organe du système nerveux central. Elle débute chez les adultes jeunes, chez qui elle est la principale cause d'handicap neurologique. La maladie évolue par poussées (forme rémittente) ou sur un mode progressif (formes primaire progressive et secondairement progressive).

Le diagnostic est confirmé par une dissémination des lésions cérébrales dans le temps et dans l'espace et l'exclusion d'autres pathologies auto-immunes ou infectieuses(106). Les progrès récents de l'IRM (imagerie par résonance magnétique) cérébrale et médullaire ont permis un diagnostic plus précoce de la maladie et de définir les syndromes cliniquement isolés.

Les poussées de la maladie sont traitées par des bolus de corticoïdes à haute dose. Le traitement de fond repose sur une immunomodulation par injection de copaxone (acétate de glatiramère) ou d'interféron β 1a ou 1b. Les formes sévères de la maladie résistante à ces

traitements de première intention sont traitées par des immunosuppresseurs : cyclophosphamide, mitoxantrone, natalizumab et depuis peu FTY720(107).

Les traitements modernes de la SEP doivent diminuer le taux de poussées de la maladie, limiter le handicap à long terme avec le minimum d'effet secondaire et si possible être disponible sous forme orale. Le FTY720 semble correspondre à ces impératifs. La prise quotidienne de 0.5mg de FTY720 per os entraîne une diminution du taux annualisé de poussées et du risque d'aggravation du handicap dans une étude randomisée en double aveugle contre placebo sur 24 mois sur 1033 patients (104). Une autre étude randomisée a montré une réduction plus importante du taux de poussées dans les groupes FTY720 versus interféron β 1A intra-musculaire(103). Les principaux effets secondaires du FTY 720 sont une majoration du risque infectieux, une bradycardie, un risque de bloc auriculo-ventriculaire à l'initiation du traitement, un œdème maculaire de la rétine, une cytolyse hépatique et une aggravation d'une hypertension artérielle. Le risque infectieux est majoré (103) mais aucun cas de leucoencéphalopathie multifocale progressive (LEMP) n'a encore été décrit avec cet immunosuppresseur. Le FTY720 serait donc une alternative au natalizumab en cas de SEP sévère et de sérologie positive pour le virus JC(105).

IV.3.2. Mécanismes d'action de l'effet immunosuppresseur du FTY720 (fingolimod) dans la Sclérose en Plaques.

Le FTY720 est un sphingolipide, analogue de la sphingosine(82). Comme la sphingosine, le FTY720 est phosphorylé par les sphingosine kinases. Le FTY-phosphate se lie aux S1PR, provoque leur internalisation et leur inactivation. Le FTY inhibe plus spécifiquement les S1PR-1, 3, 4 et 5 (102).

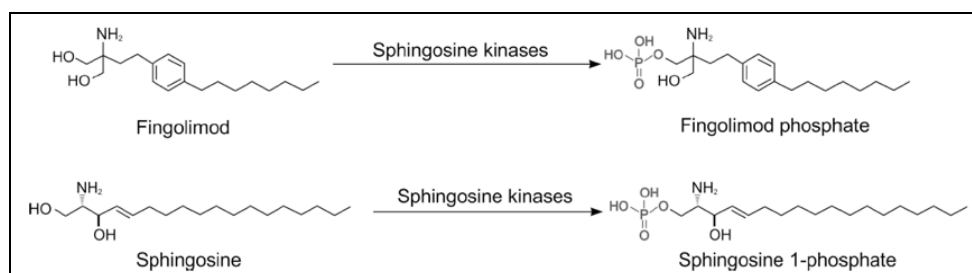


Figure IV.4 : Phosphorylation du FTY720 et de la sphingosine par les sphingosine kinases d'après (86)

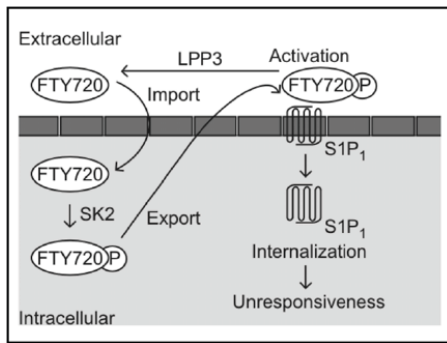


Figure IV.5 : Interaction du FTY720 phosphorylé avec les récepteurs du S1P de type 1 ou S_1P_1 , d'après (108)

S1P et système immunitaire

La circulation des lymphocytes T et B entre les tissus, le système sanguin et les ganglions lymphatiques est régulée entre autres par l'interaction entre le S1P et le S1PR-1.

Le S1P synthétisé par les cellules endothéliales des vaisseaux des ganglions lymphatiques active le S1PR-1 des lymphocytes et permet leur sortie du ganglion lymphatique. L'activation du S1PR-1 permet d'annuler des signaux de rétention (homing) des lymphocytes dans le ganglion lymphatique médiés notamment par le récepteur de chemokine CCR7. L'inactivation du S1PR par le FTY720 entraîne donc une séquestration dans les ganglions lymphatiques des lymphocytes exprimant le CCR7 soit les lymphocytes T naïfs, les lymphocytes T centraux mémoires (TCM) et les lymphocytes B. Les lymphocytes T effecteurs différenciés et les lymphocytes T effecteurs mémoires expriment peu le CCR7 et ne sont pas séquestrés dans les ganglions lymphatiques par l'action du FTY720 (109). Au cours d'une première réponse immunitaire physiologique spécifique d'un antigène, il y a production de lymphocytes T mémoires, les lymphocytes T centraux mémoires et les lymphocytes T effecteurs mémoires. Ces lymphocytes mémoires ont des rôles différents. Les lymphocytes T centraux mémoires (TCM) expriment le CCR7 et répriment le CD45RA (CCR7⁺ CD45RA⁻). Ils circulent dans le sang et les ganglions lymphatiques où ils orchestrent la réponse immunitaire en cas de nouvelle présentation de leur antigène spécifique. Les lymphocytes effecteurs mémoire (TEM) répriment le CCR7 et le CD45RA (CCR7⁻ CD45RA⁻). Ils circulent dans le sang et les ganglions lymphatiques mais patrouillent également dans les tissus périphériques (110). Les lymphocytes T helper sont classés en fonction de leur action et de leur sécrétion de cytokines en Th1, Th2, T régulateurs et Th17. Les lymphocytes CD4 Th17 sont impliqués dans de nombreuses pathologies auto-immunes dont la SEP. Ils appartiennent le plus souvent aux groupes des lymphocytes T centraux mémoires et sont donc inhibés par le FTY720.

L'administration orale de FTY720 chez les patients atteints de SEP entraîne une diminution de la production d'IL17 et une lymphopénie avec diminution du taux sanguin de lymphocytes T naïfs, de lymphocytes T centraux mémoires mais un maintien du taux sanguin de lymphocytes T effecteur mémoire(109).

L'action immunosuppressive du FTY720 est donc due à une séquestration des lymphocytes dans les ganglions lymphatiques, notamment les lymphocytes Th17(102) qui ne peuvent plus gagner leur tissu cible où ils exercent leur action délétère auto immune.

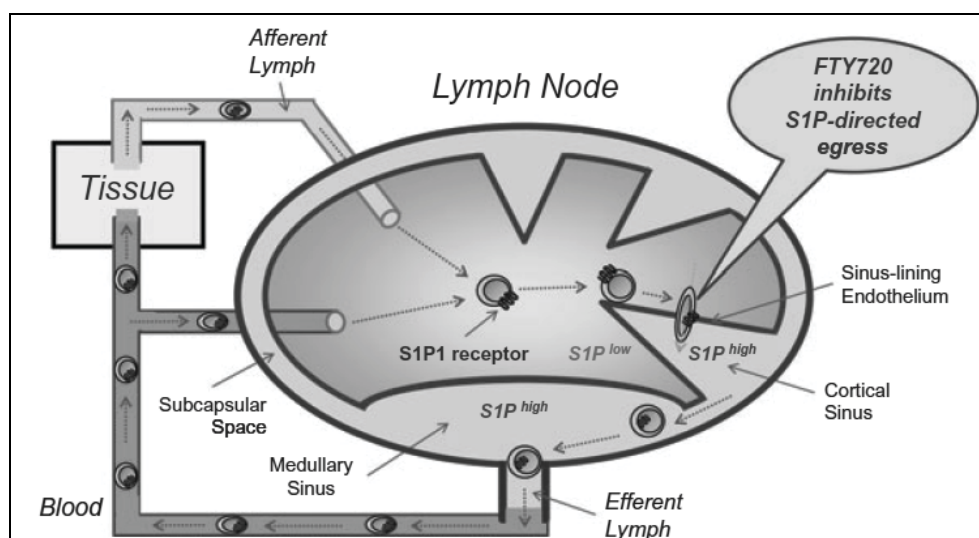


Figure IV.6 : Séquestration des lymphocytes dans les ganglions lymphatiques, d'après (109)

S1P et système nerveux central

Les S1PR sont exprimés par la plupart des cellules du système nerveux central, neurones, microglie, astrocytes et oligodendrocytes. Le FTY a un effet potentiel sur de nombreuses fonctions physiologiques du système nerveux central : migration de progéniteurs neuronaux, migration astrocytaire, survie des oligodendrocytes, modulation des phénomènes de remyélinisation, régulation de l'activité microgliale et maintien de la barrière hémato-méningée (82).

Mécanismes d'action du FTY720 dans la SEP

La physiopathologie de la SEP et les différentes actions du FTY720 sont résumées dans la figure ci-dessous. Le FTY720 agit dans la SEP à plusieurs niveaux : séquestration de lymphocytes auto-réactifs dans les ganglions lymphatiques, restauration de la barrière hémato-méningée, rôle protecteur sur les oligodendrocytes impliqués dans la remyélinisation.

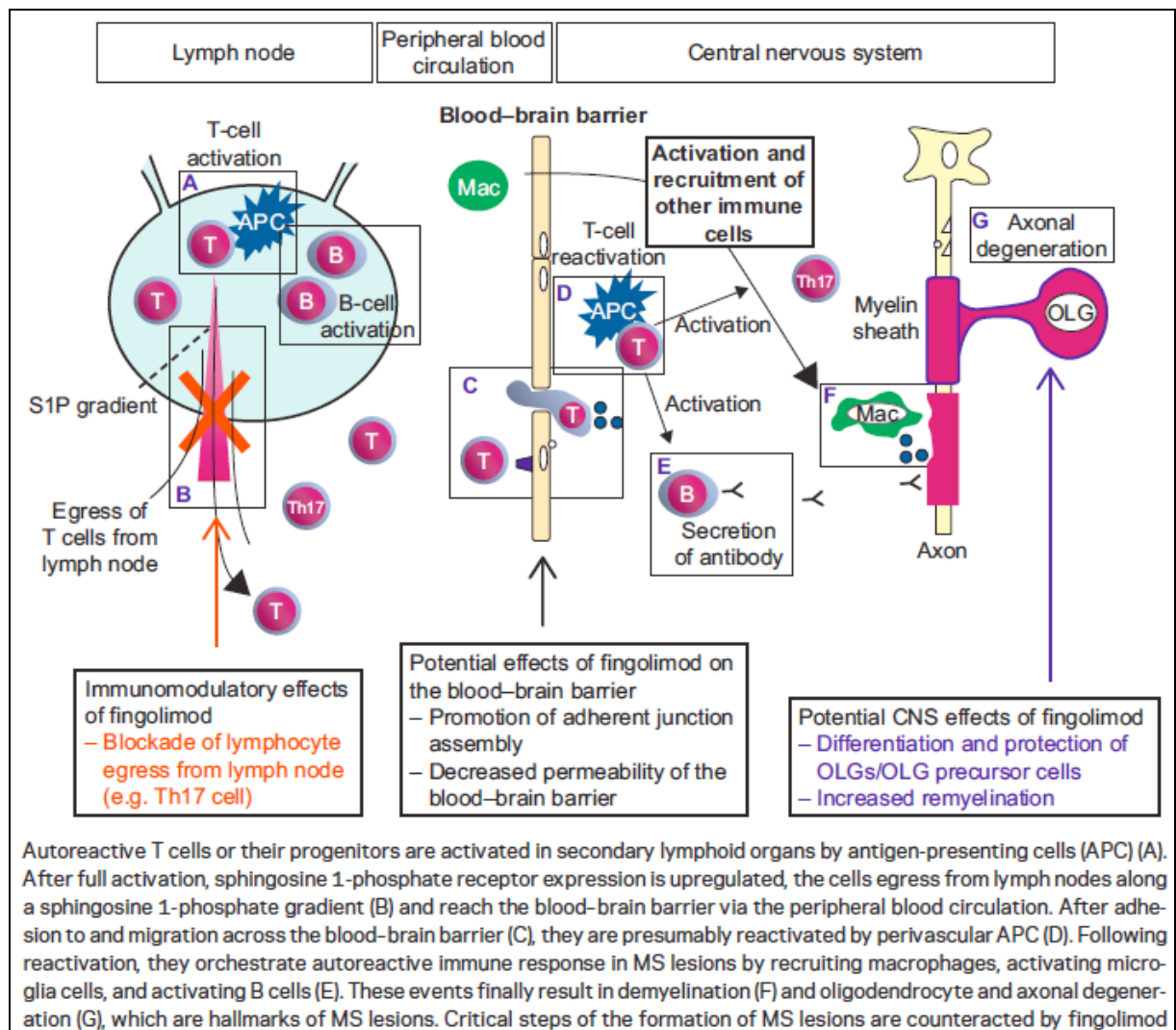


Figure IV.7 : Mécanismes d'action du FTY720 dans la SEP d'après (102)

IV.4. Fingolimod (FTY720), une drogue cytotoxique active dans plusieurs modèles de néoplasie

Le FTY720 a démontré une action cytotoxique sur des fibroblastes (111) et sur plusieurs types d'hémopathies malignes : leucémie lymphoïde aigue(112), leucémie lymphoïde chronique(113), leucémie myéloïde chronique (114) et lymphome du manteau(115).

Le FTY720 est également cytotoxique sur des lignées de tumeur solides : cancer de l'ovaire (89), mélanome métastatique (116), cancer de la prostate (117), cancer du sein(118), cancer de la vessie(119), hépatocarcinome (120) et cancer du poumon (121).

L'action cytotoxique est attribuée à la forme non-phosphorylée du FTY720, hormis dans deux publications où il est rapporté une action anti-néo-angiogénèse tumorale de la forme phosphorylée du FTY720 (116,122).

Le type de mort cellulaire induit par le FTY720 reste équivoque. Pour certains, il s'agit d'une apoptose (111,114,117-119), alors que pour d'autres la mort cellulaire est caspase-indépendante (89,112,113,115). Dans certains modèles cellulaires, le FTY720 augmente le flux autophagique (89,112). Enfin, la cytotoxicité du FTY720 s'accompagne de production de ROS (reactive oxygen species) (112,120) et de stigmates de nécrose cellulaire (89,121) dans d'autres études.

Les mécanismes d'action du FTY720 seraient une activation de la protéine phosphatase 2A (PP2A) (113,114,121), une activation de PKC δ (120) ou une inhibition de la sphingosine kinase-1(117).

L'effet cytotoxique du FTY720 est donc démontré dans plusieurs types de néoplasies in vitro et parfois sur des modèles animaux. Le FTY semble être une drogue anticancéreuse prometteuse, cependant son développement clinique n'a pas débuté contrairement à son développement comme immunosuppresseur dans la SEP.

Problème posé

Les gammopathies monoclonales sont fréquentes. Elles sont détectées dans le sérum de 4% des patients de plus de 50 ans(14). Elles traduisent un désordre de la prolifération lymphocytaire B allant d'une MGUS à une néoplasie B. Les gammopathies monoclonales peuvent être responsables de neuropathies périphériques. Une activité anti-MAG de la gammopathie est retrouvée dans 50 à 60% des neuropathies secondaires à une IgM monoclonale(18).

Les neuropathies à anticorps anti-MAG (PN-MAG) sont lentement évolutives. Elles s'expriment par des douleurs neuropathiques, une ataxie proprioceptive et des déficits moteurs(20,21) qui sont handicapant dans la vie quotidienne(27).

Le traitement des PN-MAG est celui de l'hémopathie sous-jacente. Les traitements par chimiothérapie ont fait de grands progrès mais les néoplasies B restent le plus souvent incurables(12,13). Lorsque les manifestations auto-immunes sont isolées comme dans les PN-MAG, le traitement repose sur une monothérapie par un anticorps monoclonal dirigé contre le CD20 des lymphocytes B, le Rituximab(9). Ce traitement est efficace et bien toléré dans les anémies et les thrombopénies auto-immunes(123) mais il est parfois décevant dans les PN-MAG. Le rituximab n'améliore que la moitié des patients traités pour une PN-MAG, souvent 6 à 12 mois après le début des perfusions (32). Deux essais randomisés n'ont pas permis d'établir clairement l'efficacité du rituximab dans les PN-MAG (34,35).

Il est donc nécessaire de tester de nouvelles molécules pour optimiser le traitement des hémopathies B et des neuropathies périphériques associées aux gammopathies monoclonales. Les dernières avancées thérapeutiques reposent sur des anticorps monoclonaux dirigés contre des cibles cellulaires précises comme l'alemtuzumab et le CD52 ou contre des facteurs de croissance des lymphocytes B comme BAFF et APRIL(1). Le fingolimod ou FTY720 est original car c'est un analogue d'un sphingolipide, la sphingosine. Le FTY720 est actuellement utilisé de manière courante dans le traitement des formes agressives de Sclérose en Plaques

(105). Des études montrent son action anti néoplasique dans des modèles d'hémopathies B sans toutefois clairement expliquer son mécanisme d'action : leucémie lymphoïde aigue(112), leucémie lymphoïde chronique(113), leucémie myéloïde chronique (114). L'objectif de ce travail est de mieux caractériser les mécanismes moléculaires de l'effet cytotoxique du FTY720 dans un modèle d'hémopathie B, la leucémie lymphoïde chronique. Nous avons choisi la leucémie lymphoïde chronique car cette maladie se caractérise par une prolifération monoclonale et par une dérégulation du système immunitaire conduisant à des pathologies auto-immunes(124).

Cette thèse comprend plusieurs travaux :

- Une description clinique des neuropathies périphériques associées aux gammopathies monoclonales à activité anti MAG
- Les résultats du traitement par rituximab des patients suivis dans le service pour une neuropathie périphérique associée à une gammopathie monoclonale dirigée contre la MAG ou contre les gangliosides disialosylés.
- L'étude des mécanismes moléculaires de l'effet cytotoxique du FTY720 dans un modèle d'hémopathie dans la perspective d'un traitement des neuropathies associées aux gammopathies monoclonales.

Résultats

Description clinique des neuropathies périphériques associées à une gammopathie monoclonale IgM à activité anti-MAG

Les polyneuropathies avec IgM monoclonale anti-MAG : étude descriptive, clinique, biologique, électrophysiologique et anatomopathologique d'une cohorte de 13 patients.

Dans cet article nous avons repris l'ensemble des données cliniques et paracliniques des premiers patients suivis dans le service pour une polyneuropathie à anticorps anti-MAG (PN-MAG).

Nos 13 patients correspondaient aux données de la littérature, à savoir un âge moyen de 61 ans, une neuropathie symétrique et bilatérale à nette prédominance sensitive. Le handicap fonctionnel était modéré. 9/13 patients présentaient une ataxie proprioceptive et 4/13 un déficit moteur distal. L'électromyogramme ne retrouvait une démyélinisation à prédominance distale que dans la moitié des cas. La biopsie de nerf montrait des dépôts d'immunoglobulines IgM et une décompaction des gaines de myéline dans 5/7 cas.

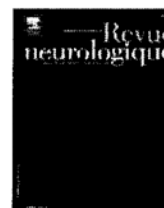
L'un des intérêts de cet article était de comparer les différentes techniques alors utilisées pour détecter les anticorps IgM dirigés contre la gaine de myéline des nerfs périphériques : technique ELISA pour les anticorps anti MAG et anti SGPG, chromatographie sur couche mince SGPG, western blot de MAG recombinante. Dans notre cohorte, la technique de western blot était moins sensible que la technique ELISA pour la détection des anticorps anti MAG.

Notre conclusion était que le diagnostic de PN-MAG nécessitait de combiner les résultats de plusieurs tests biologiques. Depuis, la technique ELISA est devenu la technique de référence de détection des anticorps anti MAG. Une corrélation entre données cliniques, électrophysiologiques et biologiques reste cependant indispensable pour porter le diagnostic de PN-MAG.



Disponible en ligne sur
 ScienceDirect
 www.sciencedirect.com

Elsevier Masson France
 EM|consulte
 www.em-consulte.com



Mémoire

Les polyneuropathies avec IgM monoclonale anti-MAG : étude descriptive clinique, biologique, électrophysiologique et anatomopathologique d'une cohorte de 13 patients

Anti-MAG paraproteinemic demyelinating polyneuropathy: A clinical, biological, electrophysiological and anatomopathological descriptive study of a 13-patients' cohort

M. Launay^{a,*}, E. Delmont^a, C. Benaim^a, S. Sacconi^a, C. Butori^b, C. Desnuelle^a

^a Centre de référence pour les maladies neuromusculaires et la SLA, hôpital Archet 1, CHU de Nice, route Saint-Antoine de Ginestière, BP 3079, 06202 Nice cedex 3, France

^b Laboratoire de pathologie clinique et expérimentale, hôpital Pasteur, CHU de Nice, Nice, France

INFO ARTICLE

Historique de l'article :

Reçu le 24 octobre 2008

Reçu sous la forme révisée le
17 mars 2009

Accepté le 24 avril 2009

Disponible sur Internet le
31 mai 2009

Mots clés :

Polyneuropathie anti-MAG

ONLS

Électroneuromyogramme

Anticorps anti-MAG

Keywords:

Anti-MAG polyneuropathy

ONLS

Electroneuromyogram

Anti-MAG antibodies

RÉSUMÉ

Introduction. – Les polyneuropathies associées à une gammopathie monoclonale IgM dirigée contre la glycoprotéine associée à la myéline (PNMAG) sont différentes des autres neuropathies dysimmunes.

Méthodes. – Les données cliniques, biologiques, électrophysiologiques d'une cohorte de 13 patients atteints de PNMAG ont été recueillies dans une étude rétrospective.

Résultats. – Sept hommes et six femmes étaient suivis en moyenne depuis deux ans (0,5–6,5 ans). L'âge au diagnostic était de 61 ans (44,5 ans ; 85,5 ans). Les patients décrivaient des paresthésies symétriques et bilatérales (11/13) prédominantes aux membres inférieurs. Neuf patients présentaient une ataxie proprioceptive à l'orthostatisme et quatre patients un déficit moteur distal modéré des membres inférieurs. L'échelle Overall Neuropathy Limitation Scale était en moyenne de 2,3 (0 ; 5). L'électroneuromyogramme montrait une démyélinisation distale : allongement des latences distales sur les nerfs médians (en moyenne, 206 % de la normale) et ulnaires (en moyenne, 150 % de la normale) ; index de latences terminales inférieurs à 0,25 sur au moins deux nerfs pour 7/13 patients. Dix patients présentaient une gammopathie monoclonale de signification indéterminée et trois patients un lymphome non hodgkinien. Un dépôt d'IgM et une décompaction des lamelles des gaines de myéline étaient mis en évidence sur 5/7 biopsies de nerf sural. Tous les patients avaient des anticorps anti-MAG en technique Enzyme-Linked Immunosorbent Assay et 8/12 en western blot.

Conclusions. – Les PNMAG sont des neuropathies à nette prédominance sensitive et ataxiante. Le handicap fonctionnel est souvent modéré. Les données électrophysiologiques sont caractéristiques et fortement évocatrices dans plus de 50 % des cas. Les techniques de détection des anticorps anti-MAG doivent être combinées pour améliorer la sensibilité et la spécificité.

© 2009 Elsevier Masson SAS. Tous droits réservés.

* Auteur correspondant.

Adresse e-mail : mael0480@yahoo.fr (M. Launay).

0035-3787/\$ – see front matter © 2009 Elsevier Masson SAS. Tous droits réservés.

doi:10.1016/j.neurol.2009.04.008

A B S T R A C T

Introduction. – Polyneuropathies associated with IgM paraproteinemia and anti-myelin associated glycoprotein (MAG) antibodies (MAG-PN) have to be differentiated from chronic inflammatory demyelinating polyneuropathies.

Methods. – In a retrospective study, we have analyzed clinical, electrophysiological, biological and pathological data from MAG-PN patients.

Results. – Seven male and six female patients were followed in the department for a mean 2 years (0.5–6.5 years). Mean age at diagnosis was 61 years (44.5–85.5 years). Patients had symmetrical bilateral paresthesia (11/13) and hypoesthesia (11/13) prominent in the lower limbs. Nine patients developed gait ataxia and four patients had moderate distal weakness in the lower limbs. Mean Overall Neuropathy Limitation Scale was 2.3 (0–5). Nerve conduction study showed demyelinating features though delayed distal motor latency on median (206 % of normal value) and ulnar nerves (150% of normal value). Seven out of thirteen patients had at least two nerves with terminal latency index below 0.25. IgM paraproteinemia was of undetermined significance in ten cases and three patients had non-Hodgkin lymphoma. IgM deposits and widening of the peripheral myelin were observed in 5/7 sural nerve biopsies. Anti-MAG antibodies were detected in the sera of all patients using enzyme-linked immunosorbent assay and in 8/12 patients using western blot analysis.

Conclusions. – MAG-PN have distinctive clinical, electrophysiological and pathological features. It is a chronic, slowly progressive, predominantly sensory and ataxic neuropathy. Disability is usually moderate. Electrophysiological study shows distal demyelinating process and is highly suggestive of MAG-PN in more than one half of our patients. Several techniques may detect anti-MAG antibodies, they have to be associated to improve sensitivity and specificity of the test.

© 2009 Elsevier Masson SAS. All rights reserved.

1. Introduction

La recherche d'une gammapathie monoclonale est systématique dans le bilan étiologique d'une neuropathie périphérique. Seule la détection d'une activité auto-anticorps de la gammapathie monoclonale prouvera son lien de causalité avec la neuropathie périphérique. Une activité anti-myelin-associated glycoprotein (anti-MAG) et anti-glycosphingolipide (SGPG/SGLP) est détectée dans 50 à 60 % des neuropathies associées à une dysglobulinémie monoclonale IgM (Smith et al., 1983; Nobile-Orazio et al., 1994). La présence de cet auto-anticorps définit les polyneuropathies associées à une gammapathie monoclonale anti-MAG (PNMAG). Elles ont des caractéristiques propres qui les distinguent des autres polyneuropathies chroniques démyélinisantes.

Dans cette étude, nous rapportons les données cliniques, immunologiques, électrophysiologiques et anatomopathologiques de 13 patients atteints de PNMAG.

2. Patients et méthodes

Nous avons inclus tous les patients suivis dans le centre de référence pour les maladies neuromusculaires et la SLA du CHU de Nice qui ont reçu depuis 2001 un diagnostic de PNMAG. Tous les patients ont été examinés par le même neurologue.

L'âge, le sexe du patient, la durée d'évolution de la maladie, la durée de suivi depuis le diagnostic et les données de l'examen clinique ont été recensés. Le score INCAT sensory sumscore (ISS) (Merkies et al., 2000) était utilisé pour évaluer le déficit sensitif. Pour évaluer le déficit moteur, le score Medical

Research Council (MRC) était calculé sur neuf muscles ou groupes musculaires à chaque bras (abduction d'épaule, flexion/extension du coude, du poignet, des doigts, court abducteur du pouce, interosseux dorsaux) et sur cinq groupes musculaires à chaque membre inférieur (flexion de hanche, flexion/extension du genou et du pied). Le score maximum était de 140. Nous avons évalué pour chaque patient le retentissement fonctionnel de la neuropathie en utilisant l'échelle d'incapacité Overall Neuropathy Limitation Scale (ONLS) (Graham et Hughes, 2006).

Tous les patients ont eu une recherche d'anticorps anti-MAG par la technique de diagnostic enzyme-linked immunosorbent assay (Elisa) Bühlmann. Le diagnostic de PNMAG était retenu si le taux d'anticorps anti-MAG était positif (entre 10 000 et 70 000 unités BTU) ou fortement positif (supérieur à 700 000 unités BTU). En cas de faible positivité (1000 à 10 000 unités BTU), la spécificité du test baissant à 86 %, nous exigeons pour retenir le diagnostic d'avoir une positivité par la technique d'immunochromatographie sur couche mince (Caudie et al., 2006) et une positivité des anticorps anti-SGPG en Elisa (positif supérieur à 1). Chez chaque patient étaient également dosés les anticorps anti-MAG en western blot, les anticorps antigangliosides et antisulfatides en technique dot blot. Les données immunologiques étaient analysées dans le service d'immunologie et neuro-immunologie à l'hôpital neurologique de Lyon-Bron et dans le laboratoire d'immunologie de l'AP-HM la Conception à Marseille. Une immunofixation des protéines sériques était réalisée pour chercher et typer (lambda ou kappa) la gammapathie monoclonale IgM. Le taux de l'IgM monoclonale était donné par le dosage pondéral des immunoglobulines.

Une biopsie de nerf sural a été réalisée chez sept patients. L'analyse était faite dans le laboratoire de pathologie clinique et expérimentale du CHU de Nice. Un fragment était fixé dans le glutaraldéhyde avec une portion incluse en paraffine colorée à l'hématoxyline-éosine-safran et l'autre incluse en épon avec réalisation de coupes semi-fines longitudinales et transversales des faisceaux et filets nerveux pour l'étude de la myélinisation. Les études immunohistochimiques étaient réalisées sur un fragment congelé à l'isopentane refroidi dans l'azote liquide.

Nous avons analysé pour chaque patient l'électromyogramme (ENMG) (Keypoint, Medtronic) le plus récent. La température cutanée était supérieure à 34 °C. L'examen comprenait une étude étagée des nerfs médians, ulnaires, fibulaires et tibiaux de façon bilatérale. Si nécessaire, la stimulation au point d'Erb était réalisée en monopolaire. Nous avons calculé la moyenne des vitesses de conduction nerveuse motrices sur les nerfs médians et ulnaires à l'avant-bras. Nous avons calculé les amplitudes motrices distales moyennes des potentiels globaux d'action moteurs (PGAM) des nerfs médians, ulnaires, tibiaux et fibulaires. Les vitesses de conduction sensitive étaient mesurées en technique antidromique bilatéralement sur les nerfs médians, ulnaires et suraux. Nous avons calculé les moyennes des vitesses de conduction sensitive et des amplitudes des potentiels sensitifs sur les nerfs médians, ulnaires et suraux. Nous avons calculé pour chaque patient la valeur moyenne des index de latence terminale (Kaku et al., 1994), des latences résiduelles (Radziwill et al., 2003), des Modified F Ratio (MFR) (Attarian et al., 2001) pour les deux nerfs ulnaires et les deux nerfs médians.

Un bloc de conduction certain et un aspect de dispersion temporelle étaient définis d'après les critères de l'European Federation of Neurological Societies (EFNS) (Hughes et al., 2006).

3. Résultats

Quatorze patients présentaient une PNMG. Un patient a été exclu en raison d'une hépatite C chronique active et la prise de médicaments neurotoxiques rendant difficile l'interprétation des données clinicoélectrophysiologiques.

3.1. Données cliniques

Les données cliniques des 13 patients sont présentées dans le Tableau 1. L'âge moyen au diagnostic était de 61 ans (44,5-85,5 ans). Les troubles sensitifs subjectifs et objectifs recouvraient chez la majorité des patients une topographie distale en gants et en chaussettes. Les paresthésies étaient ressenties comme douloureuses chez huit patients. Neuf patients présentaient une ataxie proprioceptive. Quatre patients avaient un déficit moteur stable ou lentement évolutif. Le déficit moteur des jambiers antérieurs était symétrique chez deux patients (patients 2 et 6) et asymétrique chez deux patients (patients 1 et 8). Le score MRC d'un patient n'a pas été retenu dans l'étude statistique car le patient présentait un déficit moteur distal du membre supérieur droit séquellaire d'une poliomyélite aiguë survenue dans l'enfance (patient 10).

Le score ISS moyen était de 5,9 (1-13). Le score moyen à l'échelle ONLS était d'un aux membres supérieurs (0-3) et de

1,3 aux membres inférieurs (0-3). Le score total moyen à l'échelle ONLS était de 2,3 (0-5).

3.2. Données électrophysiologiques

Les données électrophysiologiques sont présentées dans les Tableaux 2 et 3. Le délai moyen entre le début de l'évolution de la maladie et la réalisation de l'ENMG analysé était de 63 mois (18-215). Cinq patients avaient reçu préalablement un traitement immunosuppresseur ; mais ils ne prenaient plus de traitement depuis au moins un an au moment de l'examen (patients 1, 2, 7, 8 et 11). Quatre patients ont reçu des immunoglobulines intraveineuses, trois patients du chloraminophène, un patient du cyclophosphamide, deux patients de l'azathioprine et un patient du rituximab.

Des tracés de dénervation n'étaient trouvés à l'examen de détection que dans les muscles cliniquement déficitaires.

La moyenne des amplitudes motrices distales des potentiels moteurs était normale à 5,57 mV (0,35-10,45 mV) sur les nerfs médians, normale à 5,6 mV (2,95-8,95 mV) sur les nerfs ulnaires et diminuée à 0,6 mV (0-2,075 mV) sur les nerfs tibiaux et fibulaires.

Les vitesses de conduction nerveuse motrices à l'avant-bras étaient ralenties chez 9/13 sur le nerf médian et 5/13 sur le nerf ulnaire. Les vitesses de conduction nerveuse motrices n'étaient pas enregistrables sur les nerfs tibiaux et fibulaires chez 9/13 patients ; elles étaient abaissées chez un patient et normales chez trois patients.

La moyenne des latences motrices distales était de 8,25 ms (3,6-14,8 ms) pour les nerfs médians, soit 206 % de la valeur normale (4 ms dans notre laboratoire) et de 4,5 ms (2,9-8,4) pour les nerfs ulnaires, soit 150 % de la valeur normale (3 ms dans notre laboratoire).

La moyenne des index de latence terminale était de 0,3 (0,19-0,51) pour les nerfs ulnaires et de 0,26 (0,15-0,65) pour les nerfs médians. Sept patients avaient au moins deux nerfs avec un index de latence terminale inférieur à 0,25. Vingt-trois des 49 des nerfs étudiés (47 %) avaient un index de latence terminale inférieur à 0,25.

Aucun bloc de conduction n'était mis en évidence. Des aspects de dispersion temporelle étaient retrouvés chez un patient sur le nerf médian droit et sur les deux nerfs ulnaires aux avant-bras.

Les vitesses de conduction sensitive et les amplitudes des potentiels sensitifs n'étaient pas enregistrables pour quatre patients sur les nerfs ulnaires et médians et pour huit patients sur les nerfs suraux.

3.3. Données biologiques

La chaîne légère de la gammopathie monoclonale IgM était Kappa chez 11 patients et Lambda chez deux patients. La gammopathie monoclonale était d'origine indéterminée chez dix patients. Trois patients avaient un lymphome non hodgkinien (patient 3, 6, 13). Le taux moyen de l'IgM monoclonale au dosage pondéral des immunoglobulines était de 4,7 g/l (1,6-9,9).

L'étude du liquide cébrospinal montrait une hyperprotéinorachie chez sept patients (7/10), avec une protéinorra-

Tableau 1 – Données démographiques, cliniques et scores ISS, ONLS et MRC des 13 patients présentant une PNMAg.
 Demographic, clinical and MRC scales features of 13 patients carrying a demyelinating polyneuropathy associated with IgM paraproteinemia and high titers of anti-MAG IgM antibodies.

Patient/ Sexe/ Âge	Durée évolution (année)	Durée suivi (année)	ONLS	ISS	Troubles sensitifs subjectifs	Douleurs Neurogènes ^a	Hypoesthésie tact	Pallesthésie	Score d'ataxie ^b	Tremblement	Déficit moteur	MRC/ 140
F/62	8	6,5	5	12	0	-	Gants/chaussettes	Diminuée : genou/ styloïde ulnaire	1	-	CAP : 1 bilat	119
M/57	2	2	5	12	Chaussettes	-	Chaussettes	Diminuée : malléoles	2	++	IO : 3 bilat JA : 4 Dt, 2 G CAP : 4 bilat JA : 3 bilat	133
M/76	3	0,5	1	5	Chaussettes	++	0	Diminuée : malléoles	1	-	JA : 3 bilat	140
F/65	4	1	1	13	Gants/chaussettes Dt > G	+	Mi-bas/doigts	Diminuée : coudes/ crêtes iliaques	1	-	0	140
M/55	3	1	0	1	Chaussettes	-	0	Normale	0	+	0	140
M/68	5	0,5	4	6	Mi-bas	++	Mi-bas	Abolis : genoux	1	+	Deltoides : 4 IO : 4 bilat JA : 4 bilat TS : 3 bilat IJ : 4 Dt	129
F/77	9	5	2	4	Chaussettes	+	Chaussettes	Normale	1	-	0	140
M/86	2,5	0,5	2	2	Socquettes	-	Socquettes	diminuée : orteils	1	-	JA Dt : 1	136
F/46	11	1,5	1	4	Socquettes	+	Socquettes	Diminuée : orteils	1	-	0	140
F/68	2,5	2	2	4	Doigts/chaussettes	+	Doigts/chaussettes	Diminuée : orteils	0	-	N/A	N/A
M/57	5	4,5	2	2	Gants/socquettes	+	Gants/socquettes	Diminuée : orteils	0	-	0	140
M/72	3,5	1,5	1	4	Chaussettes	+	Chaussettes	Diminuée : malléoles	1	+	0	140
F/79	18	0,5	4	7	Chaussettes	-	Chaussettes	Diminuée : doigts/ malléoles	0	+	JA : 4 bilat	140
Moyenne	4,9	2,2	2,3	5,9								136,4

G : gauche ; Dt : droit ; F : féminin ; M : masculin ; CAP : court abducteur du pouce ; IO : interosseux ; JA : jambier antérieur ; bilat : bilatéral ; TS : triceps sural ; IJ : ischio-jambiers ; N/A : non applicable.

^a - : absent ; + : faible ; ++ : sévère.

^b Score d'ataxie à la manœuvre de Romberg : 0 : normal ; 1 : légères oscillations ; 2 : oscillations marquées sans chutes.

Tableau 2 - Données des électroneuromyogrammes des 13 patients présentant une PNMG. Pour chaque patient, les chiffres rapportés dans le tableau correspondent à la moyenne des côtés droit et gauche.
Electrophysiological features of 13 patients with a demyelinating polyneuropathy associated with IgM paraproteinemia and high titers of anti-MAG IgM antibodies.

Patient/Sexe/Âge		ENMG		VCN (m/s)		LMD (ms)		Durée PGAM D (ms)		AMD (mV)		VCS (m/s)		APS (mV)		Détection	

VCN : vitesses de conduction nerveuse motrice à l'avant-bras ; LMD : latence motrice distale ; PGAM D : potentiel global d'action moteur distal ; AMD : amplitudes motrices distales ; VCS : vitesses de conduction sensibles ; M : nerf médian ; U : nerf ulnaire ; FT : nerfs fibulaire et tibial ; S : nerf sural ; NE : non enregistrable ; N/A : non applicable ; NS : non significatif ; NC : neurogène chronique ; JA : muscle jambier antérieur ; 1^{er} IO : muscle première interosseuse ; Dt : droit ; G : gauche ; bilat : bilatéral.

Tableau 3 – Indices utilisés en électroneuromyogrammes dans les PNMG chez les 13 patients.
Electrophysiological index used for the 13 patients with demyelinating polyneuropathy associated with high titers of anti-MAG IgM antibodies.

Patient/Sexe/Âge	Indices					
	ILT		MFR		LR	
	Médians	Ulnaires	Médians	Ulnaires	Médians	Ulnaires
F/62	0,15	0,3	N/A	2,2	17,1	3,83
M/57	0,25	0,19	1,08	1,63	7,1	6,9
M/76	0,29	0,28	1,61	3,44	5,27	3,02
F/65	0,65	0,24	1,28	3,68	3,28	2,75
M/55	0,15	0,22	1	2,37	8,73	3,82
M/68	0,2	0,19	1,5	2,43	6,29	3,82
F/77	0,26	0,21	1,37	1	5,55	5,52
M/86	0,28	0,33	1,76	2,99	4,35	2,7
F/46	0,22	0,4	1,19	3,31	6,62	1,78
F/68	0,3	0,31	1,8	3,44	4,29	2,34
M/57	0,33	0,33	2,32	3,64	2,47	1,96
M/72	0,25	0,39	1,61	3,23	4,45	1,81
F/79	0,17	0,51	0,7	3,3	9,03	1,9
Moyenne	0,26	0,3	1,44	2,82	6,5	3,24

ILT : index de latence terminale ; MFR : modified F ratio ; LR : latence résiduelle.

chique moyenne de 0,95 (0,25-2,32). Aucune pléiocytose n'était retrouvée à l'analyse du liquide cébrospinal.

Les données immunologiques concernant les anticorps anti-MAG/SGPG/SGLPG sont présentées dans le Tableau 4. Pour le dosage des anticorps anti-MAG, en technique de diagnostic Elisa Bühlmann, neuf patients étaient positifs et quatre patients avaient une faible positivité. Pour le dosage des anticorps anti-MAG en western blot, huit patients (8/12, 67 %) étaient positifs ou faiblement positifs. Aucun patient était positif pour la recherche d'anticorps antigangliosides ou antisulfatides.

3.4. Biopsies de nerfs

Sept biopsies de nerf sural ont été réalisées avant le diagnostic de PNMG (patients 1, 2, 3, 4, 7, 11, 12).

Une seule était normale en microscopie optique. Les biopsies montraient des signes de démyélinisation : gaine de myéline trop fine par rapport au diamètre de l'axone avec perte élective en fibres myélinisées de gros calibre. Des ébauches de bulbe d'oignon étaient trouvées chez cinq patients. Des dépôts d'IgM étaient observés en immunofluorescence indirecte chez cinq patients.

Tableau 4 – Données immunologiques des 13 patients présentant une PNMG.
Immunological features of 13 patients with a demyelinating polyneuropathy associated with IgM paraproteinemia and high titers of anti-MAG IgM antibodies.

Patient/Sexe/Âge	Techniques de dosage des anticorps anti-MAG/SGPG/SGLPG			
	Anticorps anti-MAG		Anticorps anti-SGPG	
	Elisa Bühlman (BTU)	Western blot	Immunochromatographie sur couche mince	Elisa
F/62	6600	–	++	+
M/57	1277	±	++	+
M/76	2558	–	N/A	+
F/65	> 70000	+	+	+
M/55	> 70000	+	N/A	+
M/68	16620	N/A	+	+
F/77	> 70000	+	++	+
M/86	25131	–	+	+
F/46	> 70000	+	++	+
F/68	17707	±	++	+
M/57	3774	+	N/A	+
M/72	13726	–	++	+
F/79	> 70000	+	++	+

++ : fortement positif ; + : positif ; ± : faiblement positif ; – : négatif.

La microscopie électronique montrait une décompaction des lamelles périphériques de la myéline chez cinq patients.

4. Discussion

Nous avons analysé rétrospectivement les caractéristiques cliniques, biologiques, anatomopathologiques et électrophysiologiques de 13 patients présentant une PNMG évoluant en moyenne depuis 5,9 ans.

Les patients avaient des phénotypes cliniques classiques de PNMG, avec un âge de survenue moyen de 61 ans, un déficit à prédominance sensitif, plus marqué aux membres inférieurs, une ataxie proprioceptive et une évolution lente peu invalidante (Nobile-Orazio et al., 1994 ; Van den Berg et al., 1996 ; Elie et al., 1996 ; Chassande et al., 1998 ; Isoardo et al., 2005). Le déficit moteur est rare et souvent au second plan (Antoine et al., 1993). Il existe une variabilité phénotypique (Van den Berg et al., 1996), avec d'autres modes de présentation plus sévères souvent en rapport avec un déficit moteur distal. Quatre des patients présentaient en plus des déficits sensitifs un déficit moteur à prédominance distale. Ce déficit peut être nettement asymétrique, comme ce fut le cas pour les patients 1 et 8. Enfin, plusieurs séries font état de rares formes à prédominance motrice (Antoine et al., 1993 ; Van den Berg et al., 1996 ; Chassande et al., 1998), non rencontrées dans notre cohorte. Le tremblement d'attitude est fréquent et varie entre 30 à 89 % dans la littérature (Nobile-Orazio et al., 1994 ; Bain et al., 1996 ; Chassande et al., 1998) : dans notre cohorte, 38 % des patients présentaient des tremblements d'attitude. Des douleurs neuropathiques étaient présentes chez huit patients (8/13, 61,5 %). Celles-ci étaient rares pour Steck et al. (1984) alors que Isoardo et al. (2005) ont rapporté des douleurs fréquentes, mais peu intenses et peu invalidantes.

L'incapacité fonctionnelle secondaire à la neuropathie était faible dans notre étude, avec un score ONLS moyen à 2,3 (extrêmes de 0 à 5). Le caractère peu invalidant et lentement évolutif de la PNMG est bien connu (Nobile-Orazio et al., 2000).

Actuellement pour le diagnostic de PNMG, plusieurs techniques immunologiques sont disponibles : immunofluorescence indirecte sur coupe de nerf sciatique de singe, Elisa avec antigène cible MAG, Elisa avec antigène cible SGPG, immunochromatographie sur couche mince et western blot avec antigène cible MAG de singe ou d'homme. Certains auteurs privilégient comme méthode de référence la technique de western blot pour la recherche des IgM anti-MAG (Jaskowski et al., 2004) ; d'autres auteurs préconisent la technique d'immunochromatographie sur couche mince sur gel de silice (Caudie et al., 2006). Nos résultats confirment le manque de sensibilité de la technique de western blot, avec uniquement 67 % de positivité chez les patients. Le western blot est très spécifique, mais moins sensible, ce qui donne des faux-négatifs pouvant conduire à réaliser une biopsie de nerf si les autres techniques ne sont pas utilisées. Les techniques utilisant l'antigène cible SGPG semblent à privilégier comme test diagnostique en raison du bon compromis sensibilité-spécificité (Caudie et al., 2006 ; Jaskowski et al., 2004). La technique Elisa Bühlmann est facilement réalisable et présente un intérêt dans le suivi quantitatif de l'efficacité du traitement par rituximab (Levine et Pestronk, 1999 ; Renaud

et al., 2003 ; Caudie et al., 2006). En revanche, elle manque de spécificité pour des taux entre 1000 et 10 000 unités BTU en raison de réactions croisées entre la MAG et le ganglioside GM1 et les gangliosides disialylés (Caudie et al., 2006). Il nous semble difficile de choisir une seule méthode de référence pour le diagnostic de PNMG après analyse des études comparant ces différentes techniques (Trojaborg et al., 1995 ; Van den Berg et al., 1996 ; Chassande et al., 1998 ; Jaskowski et al., 2004 ; Caudie et al., 2006). Actuellement, il nous paraît licite pour le diagnostic immunologique de coupler des techniques avec cibles antigéniques différentes (MAG et SGPG) pour augmenter la sensibilité et la spécificité en attendant une harmonisation des techniques dans l'avenir.

Sur le plan anatomopathologique, les résultats d'une biopsie de nerf sural ont été étudiés chez sept patients. Leur réalisation était antérieure au diagnostic de PNMG à une période où les techniques de diagnostic immunologiques n'étaient pas aussi performantes qu'aujourd'hui. Les anomalies retrouvées sont conformes aux données de la littérature. L'examen morphométrique montrait des lésions de démyélinisation chronique non spécifique associées à une atteinte axonale d'importance variable (Vital et al., 1989 ; Nobile-Orazio, 1998 ; Steck et Kuntzer, 2002). En immunofluorescence indirecte, des dépôts d'IgM ou de complément sont observés dans les gaines de myéline. L'aspect le plus caractéristique des PNMG reste la décompaction des lamelles périphériques de myéline en microscopie électronique.

Les données de l'EMNG sont souvent évocatrices du diagnostic de PNMG. Les potentiels sensitifs sont très altérés, voire abolis principalement sur les membres inférieurs. Ces anomalies sont très sévères par rapport aux plaintes des patients réalisant une discordance clinique/électrophysiologique (Chassande et al., 1998 ; Capasso et al., 2002). Les vitesses de conduction nerveuse motrices des nerfs tibiaux et fibulaires étaient très altérées au point de ne pas être enregistrables chez huit patients (8/13). Ce pattern EMNG d'atteinte prédominante aux membres inférieurs est classique (Kaku et al., 1994 ; Trojaborg et al., 1995 ; Maisonneuve et al., 1996 ; Capasso et al., 2002). Les anomalies de la conduction motrice prédominent en distalité des nerfs. La démyélinisation distale est évoquée dans un premier temps sur l'allongement des latences motrices distales des nerfs médians et ulnaires trouvé chez 12 patients (12/13). Des indices ont été créés pour le diagnostic différentiel avec les autres neuropathies démyélinisantes dysimmunitaires et avec certaines neuropathies héréditaires. Le plus classique et le mieux étudié est l'index de latence terminale. Il compare la conduction nerveuse distale et intermédiaire ; un index de latence terminale bas est en faveur d'une démyélinisation distale. Les PNMG sont caractérisées par un index de latence terminale bas sur les nerfs médians et ulnaires (Kaku et al., 1994). Un index de latence terminale inférieur à 0,25 sur au moins deux nerfs est plus en faveur d'une PNMG que d'une polyradiculonévrite inflammatoire démyélinisante chronique (PIDC) (Kaku et al., 1994 ; Attarian et al., 2001). Selon ces critères, seuls 54 % des patients de notre étude avaient un EMNG très en faveur de PNMG. Ce manque de sensibilité de l'index de latence terminale comme marqueur électrophysiologique de PNMG a conduit à proposer d'autres indices comme les latences résiduelles des nerfs ulnaires (Trojaborg et al., 1995 ; Radziwill et al., 2003 ; Lupu et al., 2007), les MFR des nerfs

médians et ulnaires (Attarian et al., 2001 ; Radziwill et al., 2003 ; Lupu et al., 2007) et la durée du PGAM distale (Thaisethawatkul et al., 2002 ; Gondim et al., 2007). La latence résiduelle est la différence entre la latence motrice distale mesurée et la latence motrice distale théorique. Pour Radziwill et al. (2003), l'association d'une latence motrice distale supérieure à 7 ms et d'une latence résiduelle supérieure à 4 ms sur les nerfs ulnaires est fortement suggestive du diagnostic de PNMG plutôt que de PIDC. Ce critère est peu sensible car seuls deux patients remplissaient ces critères (patients 2 et 7). Le MFR étudie le rapport entre la conduction proximale et distale. Nos résultats sont en faveur de PNMG, mais sont plus élevés que dans les autres études (Attarian et al., 2001 ; Radziwill et al., 2003 ; Lupu et al., 2007). Gondim et al. (2007) proposent une durée inférieure à 9 ms du PGAM distal associée à un ralentissement disproportionné de la conduction nerveuse distale comme suggestif de PNMG plutôt que de PIDC ; ces critères sont validés chez six patients (6/8). Les résultats de notre étude concernant ces indices (latence résiduelle, MFR, durée du PGAM) bien que compatibles avec une démyélinisation distale ne sont pas toujours en adéquation avec la littérature. Des études sur des populations plus importantes sont nécessaires pour l'établissement de normes. Actuellement, l'index de latence terminale est l'indice le plus utile en pratique courante.

Dans le profil ENMG des PNMG, les blocs de conduction sont classiquement absents. Nous n'avons trouvé aucun bloc de conduction chez les patients en appliquant les critères de l'EFNS. Dans les autres études, la proportion des blocs de conduction est soit nulle (Kaku et al., 1994, Attarian et al., 2001 ; Capasso et al., 2002) si les critères employés sont les mêmes que les nôtres, soit faible allant de six à 14 % (Ellie et al., 1996 ; Maissonobe et al., 1996 ; Notermans et al., 2000) si ces critères sont moins restrictifs. Un patient présentait des aspects de dispersion temporelle, ce qui est possible, mais peu fréquent dans les PNMG (Gondim et al., 2007).

En conclusion, la PNMG est une neuropathie survenant entre 60 et 65 ans à nette prédominance sensitive, ataxiante lentement évolutive avec un retentissement fonctionnel modéré bien que des phénotypes plus sévères existent en rapport avec un déficit moteur plus marqué. L'ENMG est en faveur d'une démyélinisation distale avec des index de latence terminale bas. La place des autres indices reste à préciser. La biopsie de nerf devient moins utile, compte tenu des progrès réalisés dans la détection des anticorps anti-MAG/SGPG/SGLP. À ce jour, les techniques de dosage doivent être associées pour améliorer sensibilité et spécificité.

5. Conflits d'intérêts

Les auteurs n'ont aucun conflit d'intérêts à déclarer en lien avec l'article.

RÉFÉRENCES

Antoine JC, Steck A, Michel D. Neuropathie périphérique avec atteinte motrice prédominante associée à une gammopathie IgM monoclonale anti-MAG. *Rev Neurol (Paris)* 1993;149:496-9.

- Attarian S, Azulay JP, Boucraut J, Escande N, Pouget J. Terminal latency index and modified F ratio in distinction of chronic demyelinating neuropathies. *Clin Neurophysiol* 2001;112:457-63.
- Bain PG, Britton TC, Jenkins IH, Thompson PD, Rothwell JC, Thomas PK, et al. Tremor associated with benign IgM paraproteinaemic neuropathy. *Brain* 1996;119:789-99.
- Capasso M, Torrieri F, Di Muzio A, De Angelis MV, Lugaresi A, Uncini A. Can electrophysiology differentiate polyneuropathy with anti-MAG/SGPG antibodies from chronic inflammatory demyelinating polyneuropathy. *Clin Neurophysiol* 2002;113:346-53.
- Caudie C, Kaygisiz F, Jaquet P, Petiot P, Gonnard PM, Antoine JC, et al. Diagnostic value of autoantibodies to MAG by Elisa Bühlmann in 117 immune-mediated peripheral neuropathies associated with monoclonal IgM to SGPG/SGLP. *Ann Biol Clin (Paris)* 2006;64:353-9.
- Chassande B, Léger JM, Ben Younes-Chennoufi A, Bengoufa D, Maissonobe T, Bouche P, et al. Peripheral neuropathy associated with IgM monoclonal gammopathy: correlations between M-protein antibody activity and clinical/electrophysiological features in 40 cases. *Muscle Nerve* 1998;21:55-62.
- Ellie E, Vital A, Steck AJ, Boiron JM, Vital C, Julien J. Neuropathy associated with "benign" anti-myelin-associated glycoprotein IgM gammopathy: clinical, immunological, neurophysiological pathological findings and response to treatment in 33 cases. *J Neurol* 1996;243:34-43.
- Gondim FAA, De Souza EA, Latov N, Sander HW, Chin RL, Brannagan TH. Anti-MAG/SGPG associated neuropathy does not commonly cause distal nerve temporal dispersion. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 2007;78:902-4.
- Graham RC, Hughes RA. A modified peripheral neuropathy scale: the Overall Neuropathy Limitations Scale. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 2006;77:899-900.
- Hughes RA, Bouche P, Cornblath D, Evers E, Hadden RD, Hahn A, et al. European Federation of Neurological Societies/Peripheral Nerve Society guideline on management of chronic inflammatory demyelinating polyradiculoneuropathy: report of a joint task force of the European Federation of Neurological Societies and the Peripheral Nerve Society. *Europ J Neurol* 2006;13:326-32.
- Isoardo G, Migliaretti G, Ciaramitaro P, Rota E, Poglio F, Tavella A, et al. Differential diagnosis of chronic dysimmune demyelinating polyneuropathies with and without anti-MAG antibodies. *Muscle Nerve* 2005;31:52-8.
- Jaskowski TD, Martins TB, Litwin CM, Hill HR. Immunoglobulin (Ig) M antibody against myelin-associated glycoprotein (MAG): a comparison of methods. *J Clin Lab Anal* 2004;18:247-50.
- Kaku DA, England JD, Summer AJ. Distal accentuation of conduction slowing in polyneuropathy associated with antibodies to myelin-associated glycoprotein and sulphated glucuronyl-paragloboside. *Brain* 1994;117:941-7.
- Levine TD, Pestronk A. IgM antibody-related polyneuropathies: B-cell depletion chemotherapy using rituximab. *Neurology* 1999;52:1701-4.
- Lupu VD, Mora CA, Dambrosia J, Meer J, Dalakas M, Floeter MK. Terminal latency index in neuropathy with antibodies against myelin-associated glycoproteins. *Muscle Nerve* 2007;35:196-202.
- Maissonobe T, Chassande B, Verin M, Jouni M, Léger JM, Bouche P. Chronic dysimmune demyelinating polyneuropathy: a clinical and electrophysiological study of 93 patients. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 1996;61:39-42.
- Merkies IS, Scmitz PI, Van de meché FG, Van Doorn PA. Psychometric evaluation of new sensory scale in immune-mediated polyneuropathies. *Neurology* 2000;54:943-9.

- Nobile-Orazio E, Manfredini E, Carpo M, Meucci N, Monaco S, Ferrari S, et al. Frequency and clinical correlates of anti-neural IgM antibodies in neuropathy associated with IgM monoclonal gammopathy. *Ann Neurol* 1994;36:416-24.
- Nobile-Orazio E. Neuropathies associated with anti-MAG antibodies and IgM monoclonal gammopathies. In: Latov Wokke JHJ, Kelly JJ, editors. *Immunological and infectious diseases of the peripheral nerves*. Cambridge: Cambridge University Press; 1998. p. 168-89.
- Nobile-Orazio E, Meucci N, Baldini L, Di Troia A, Scarlato G. Long-term prognosis of neuropathy associated with anti-MAG M-proteins and its relationship to immune therapies. *Brain* 2000;123:710-7.
- Notermans NC, Franssen H, Eurlings M, Van der Graaf Y, Wokke JH. Diagnostic criteria for demyelinating polyneuropathy associated with monoclonal gammopathy. *Muscle Nerve* 2000;23:73-9.
- Radziwill A, Steck AJ, Renaud S, Fuhr P. Distal motor latency and residual latency as sensitive markers of anti-MAG polyneuropathy. *J Neurol* 2003;250:962-6.
- Renaud S, Gregor M, Fuhr P, Schweikert K, Lorenz D, Daniels C, et al. Rituximab in the treatment of polyneuropathy associated with anti-MAG antibodies. *Muscle Nerve* 2003;27:611-5.
- Smith IS, Kahn SN, Lacey BW, King RH, Eames RA, Whybrew DJ, et al. Chronic demyelinating neuropathy associated with benign IgM paraproteinaemia. *Brain* 1983;106:169-95.
- Steck AJ, Meier C, Vandeveld M, Regli F. Polyneuropathies et gammopathies: une forme avec antiglycoprotéine MAG. *Rev Neurol (Paris)* 1984;140:28-36.
- Steck AJ, Kuntzer T. Dysglobulinémies IgM et complications neurologiques. *Rev Neurol (Paris)* 2002;158:971-8.
- Thaisethawatkul P, Logigian EL, Herrmann DN. Dispersion of the distal compound muscle action potential as a diagnostic criterion for chronic inflammatory demyelinating polyneuropathy. *Neurology* 2002;59:1526-32.
- Trojaborg W, Hays AP, Vandenberg L, Younger DS, Latov N. Motor conduction parameters in neuropathies associated with antibodies with anti-MAG antibodies and other types of demyelinating and axonal neuropathies. *Muscle Nerve* 1995;18:730-5.
- Van den Berg LH, Hays AP, Nobile-Orazio E, Kinsella LJ, Manfredini E, Corbo M, et al. Anti-MAG and anti-SGPG antibodies in neuropathy. *Muscle Nerve* 1996;19:637-43.
- Vital A, Vital C, Julien J, Baquay A, Steck AJ. Polyneuropathy associated with IgM monoclonal gammopathy. Immunological and pathological study in 31 patients. *Acta Neuropathol (Berl)* 1989;79:160-7.

Traitement par rituximab des neuropathies périphériques associées à une gammapathie monoclonale IgM

Treatment with rituximab in patients with polyneuropathy with anti-MAG antibodies

Aucun traitement n'a pour l'heure formellement démontré son efficacité dans la polyneuropathie à anticorps anti-MAG (PN-MAG). Nous avons rapporté l'effet de 4 perfusions hebdomadaires de rituximab (475mg/m²) chez 6 patients consécutifs.

Un examen clinique quantifié, un dosage des anticorps anti-MAG, des lymphocytes B et du taux de la gammapathie monoclonale étaient réalisés un mois après le début des perfusions puis tous les 3 mois pendant 9 mois. Un électromyogramme était réalisé avant et 9 mois après le traitement.

L'incapacité fonctionnelle, le déficit moteur et le déficit sensitif était améliorés respectivement chez 3/6 patients, 4/5 patients et 5/6 patients. Les lymphocytes B n'étaient plus détectés dans le sang des patients 3 mois après le traitement par rituximab, mais leur taux remontait progressivement à partir du sixième mois. Le taux de la gammapathie monoclonale diminuait de 30 à 74% et le taux des anticorps anti-MAG de 44 à 87% selon les patients par rapport aux dosages avant traitement. Les données électrophysiologiques étaient inchangées. La tolérance était bonne. Aucun facteur prédictif d'une bonne réponse au traitement n'était retrouvé sur cette cohorte.

Le rituximab semble efficace dans les PN-MAG. Cependant, l'amélioration est lente, ne survenant que 6 à 9 mois après le début des perfusions et seulement la moitié des patients traités ont une amélioration de leur incapacité fonctionnelle.

Treatment with rituximab in patients with polyneuropathy with anti-MAG antibodies

Emilien Delmont · P. Y. Jeandel · C. Benaïm ·
E. Rosenthal · J. G. Fuzibet · C. Desnuelle

Received: 15 January 2011 / Revised: 20 February 2011 / Accepted: 3 March 2011
© Springer-Verlag 2011

Dear Sirs,

Efficacy of rituximab (RTX), a monoclonal anti-CD20 antibody, has been suggested in a recent controlled trial in polyneuropathies with antibodies against myelin-associated glycoprotein (PN-MAG) [1]. Aims of this study were to evaluate the efficacy and safety of RTX in PN-MAG and to search for predictive factors of response to treatment.

Six patients fulfilling diagnosis criteria for PN-MAG [2] received four weekly infusions of RTX (375 mg/m²). Clinical status of each patient was evaluated, before treatment (M0) then every 3 months during 9 months, by assessing Overall Neuropathy Limitation Scale (ONLS) [3], INCAT Sensory Score (ISS) [4], and MRC sum score on 28 muscle groups [5]. Anti-MAG titers (Buhlmann ELISA technique) and B cells expressing CD19 blood count were concomitantly quantified. Nerve conduction studies were performed before treatment and 9 months after (M9), on fibular, tibial, median and ulnar nerves [5]. Treatment was considered efficient only when ONLS score decreased by at least 1 point at M9. Demographic, clinical, biological and electrophysiological status before RTX, were statistically compared between patients with efficient and non-efficient response to treatment using the Mann-Whitney and Fisher's exact tests. The level of statistical significance was set at $p = 0.05$. Patients were asked to

give informed consent for use of data in a journal publication.

Mean age of patients (70 years old, range 57–86 years), duration before treatment from onset of the disease (5 years, range 2–10 years), main clinical manifestations of each patient and previous immunotherapies are detailed in Table 1. Before RTX treatment, ONLS score ranged from 2 to 6 (mean 3.7) and ISS score from 2 to 12 (mean 6.2). Nine months after the last RTX infusion, ONLS score improved by 1 point in two patients, by 2 points in one, remained stable in the three others. ISS score improved in five patients (mean 3.8 points), MRC score improved in three patients (mean 2.7 points). Decrease of anti-MAG titers was observed in all the six patients at M9 by a mean of 43% (Fig. 1). By the meantime, IgM monoclonal titers decreased in five patients but did not change in one. As expected, CD19 B-cells blood count dramatically decreased, after treatment and stayed low at M9 ($138 \times 10^9/l$ at M0 vs. $2.5 \times 10^9/l$ at M3 vs. $40 \times 10^9/l$ at M9). RTX treatment did not modify the mean CD4 and CD8 lymphocytes blood counts (respectively $674 \times 10^9/l$ at M0 vs. $789 \times 10^9/l$ at M9; and $448 \times 10^9/l$ at M0 vs. $416 \times 10^9/l$ at M9) as the mean gammaglobulins titers ($9.7 g/l$ at M0 vs. $9 g/l$ at M9). No change in individual or overall electrophysiological data was evidenced when comparing examination before treatment and 9 months after treatment. No serious adverse event was reported.

Demographic, clinical, biological and electrophysiological data at baseline, including MAG titers and IgM monoclonal titers, were not statistically different in the three patients who improved their ONLS score at M9 compared to the three patients who did not.

Experimental pathogenicity of anti-MAG antibodies has been established in anti-MAG polyneuropathies [6]. RTX is a monoclonal antibody designed to target the B-cells

E. Delmont (✉) · C. Benaïm · C. Desnuelle
Centre de Référence Maladies Neuromusculaires et SLA,
hôpital Archet 1, route Saint Antoine de Ginestiere,
Nice 06200, France
e-mail: delmont.e@chu-nice.fr

P. Y. Jeandel · E. Rosenthal · J. G. Fuzibet
Service de Médecine Interne, hôpital Archet 1,
route Saint Antoine de Ginestiere, Nice 06200, France

Table 1 Demographic and clinical data

	Age (years)	Main clinical feature	Hemopathy	Time from onset of the disease (years)	Treatment before RTX	ONLS		ISS		MRC	
						M0	M9	M0	M9	M0	M9
1, M	57	A, W, T	MGUS	2	CPH, IVIg	6	4	11	3	136	140
2, M	68	A, P	WM	6	0	4	3	6	4	140	138
3, F	68	A, W	MGUS	3	0	3	2	2	0	129	131
4, M	86	W	WM	2	0	2	2	2	2	136	136
5, F	62	A, W	MGUS	8	CHL, PD	5	5	12	7	123	127
6, F	77	A	NHL	10	AZA, PD, IVIg	2	2	4	2	140	140
Mean	70			5		3, 7	3	6	3	134	135

ISS INCAT sensory score, MRC sumscore on 28 muscle groups (max 140)

M male, F female, A sensory ataxia, W distal muscle weakness, T postural tremor, P neuropathic pain, MGUS monoclonal gammopathy of undetermined significance, WM Waldenström macroglobulinemia, NHL Non-Hodgkin's lymphoma, CPH cyclophosphamide, CHL chlorambucil, AZA azathioprine, PD prednisone, IVIg intravenous immunoglobulin, ONLS Overall Neuropathy Limitation Scale

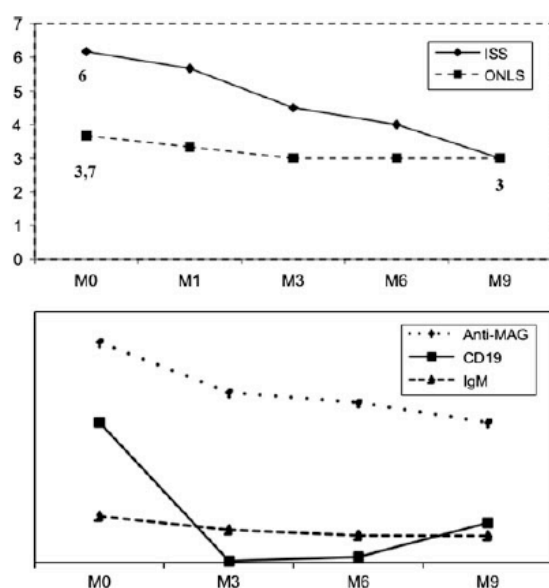


Fig. 1 Clinical and biological follow-up ONLS, ISS, titers of anti-MAG (BTU, Bühlmann titer units) and of monoclonal IgM gammopathy and CD19 cells blood counts are the average of the data of the six patients

producing anti-MAG antibodies and then expected to reverse the pathogenic process.

In clinical practice, therapeutic benefits of RTX are known to be delayed and are reported to be more evident on sensory deficiency than on functional disability. Our results confirm those of previous studies: improvement of sensory deficiency in half to 2/3 of the treated patients, improvement of the functional disability in less than half of the treated patients, decrease of IgM monoclonal component and of anti-MAG titers respectively by 30–74% and by 44–87%, as assessed 8 or 12 months after the RTX infusions [1, 7–10].

In this study, we did not find any predictive factor of response to RTX treatment, including type of the underlying hemopathy and disease duration prior to treatment. Predictive value of anti-MAG antibodies titers is not clear in the literature: RTX is more efficient when anti-MAG antibodies titers are moderately elevated in one study [9] and when titers are high in another [1]. Better improvement was reported in patients with more severe sensory deficit at baseline [1].

Treatment with RTX improved functional disability in half of our PN-MAG population. Treatment was safe, no serious adverse event occurred during the 9 months of follow up. As no predictive factor of efficacy appears informative, RTX should be reserved for patients impaired in their daily life. Studies in larger cohorts are needed to confirm.

Approval from the ethics committee of CHU de Nice was obtained and patients gave informed consent.

Conflict of interest None.

References

1. Dalakas MC, Rakocevic G, Salajegheh M, Dambrosia JM, Hahn AF, Raju R, McElroy B (2009) Placebo controlled-trial of rituximab in IgM anti-MAG antibody demyelinating neuropathy. *Ann Neurol*; 65(3):286–293
2. Joint Task Force of the EFNS and the PNS (2010) Guideline on management of paraproteinemic demyelinating neuropathies Report of a Joint Task Force of the European Federation of Neurological Societies and the Peripheral Nerve Society—first revision. *J Peripher Nerv Syst* 15(3):185–195
3. Graham RC, Hughes RA (2006) A modified peripheral neuropathy scale: the Overall Neuropathy Limitations Scale. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 77:973–976
4. Merkies IS, Schmitz PI, van de Meche FG, van Doorn PA (2002) Psychometric evaluation of new sensory scale in immune mediated polyneuropathies. *Neurology* 54:943–949
5. Delmont E, Benaïm C, Launay M, Sacconi S, Soriani MH, Desnuelle C (2009) Do patients having a decrease in SNAP

- amplitude during the course of MMN present with a different condition? *J Neurol* 256(11):1876–1880
6. Latov N, Renaud S (2004) Effector mechanisms in anti-MAG antibody-mediated and other demyelinating neuropathies. *J Neurol Sci* 220:127–129
 7. Renaud S, Gregor M, Fuhr P, Lorenz D, Deuschl G, Gratwohl A, Steck AJ (2003) Rituximab in the treatment of polyneuropathy associated with anti-MAG antibodies. *Muscle Nerve* 27(5):611–615
 8. Renaud S, Fuhr P, Gregor M, Schweikert K, Lorenz D, Daniels C, Deuschl G, Gratwohl A, Steck AJ (2006) High-dose rituximab and anti-MAG-associated polyneuropathy. *Neurology* 66(5):742–744
 9. Benedetti L, Briani C, Grandis M, Vigo T, Gobbi M, Ghiglione E, Carpo M, Cocito D, Caporale CM, Sormani MP, Mancardi GL, Nobile-Orazio E, Schenone A (2007) Predictors of response to rituximab in patients with neuropathy and anti-myelin associated glycoprotein immunoglobulin M. *J Peripher Nerv Syst* 12(2):102–107
 10. Niermeijer JM, Eurlings M, Lokhorst HL, van der Pol WL, Franssen H, Wokke JH, Notermans NC (2009) Rituximab for polyneuropathy with IgM monoclonal gammopathy. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 80(9):1036–1039

Successful treatment with rituximab of one patient with CANOMAD neuropathy

Le CANOMAD est une neuropathie périphérique exceptionnelle secondaire à une gammapathie monoclonale d'isotype IgM dirigées contre les gangliosides disialylés des gaines de myéline des nerfs périphériques. La neuropathie s'exprime classiquement par une ataxie proprioceptive et une ophtalmoparésie.

Nous rapportons le cas d'une patiente de 77 ans traitée par rituximab. La neuropathie était sévère et résistante aux précédents traitements (chlorambucil, corticoïdes, immunoglobulines intra-veineuses). La tolérance et l'efficacité du traitement étaient bonnes : amélioration de l'incapacité fonctionnelle, diminution des déficits moteurs et sensitifs, diminution de l'ataxie proprioceptive, diminution du taux de la gammapathie monoclonale et du titre des anticorps anti gangliosides.

Cependant, l'efficacité clinique n'était évidente que 3 mois après les perfusions de rituximab et l'effet était transitoire nécessitant une nouvelle administration de rituximab 6 mois plus tard.

Successful treatment with rituximab of one patient with CANOMAD neuropathy

Emilien Delmont · P. Y. Jeandel · A. M. Hubert ·
L. Marcq · J. Boucraut · C. Desnuelle

Received: 7 August 2009 / Revised: 12 November 2009 / Accepted: 20 November 2009 / Published online: 4 December 2009
© Springer-Verlag 2009

Abstract We report a successful treatment with rituximab in a patient with CANOMAD neuropathy resistant to previous therapy. The titers of anti-disialosyl antibodies were decreased 3 months after the beginning of the treatment and the sensory ataxia clearly improved after 9 months of therapy.

Keywords CANOMAD · Ataxic neuropathy · Disialosyl antibodies · Rituximab

Introduction

Chronic ataxic neuropathy with ophthalmoplegia, IgM paraproteinemia, cold agglutinins and disialosyl antibodies (CANOMAD) is a rare neuropathy. Auto-reactive B cells produce a monoclonal IgM paraprotein, which reacts with disialosyl gangliosides of myeline surface [9]. B cells are involved in the pathophysiology of many neurologic diseases via production of autoantibodies, cytokine secretion or by acting as antigen-presenting cells leading to T cell activation. Intravenous immunoglobulins (IVIg) are usually proposed in first line therapy [1, 9], but efficacy has not

been proved in controlled trial. Rituximab (RTX) is a monoclonal anti-CD20 antibody used in the management of B cell malignancies and of some neuromuscular diseases mediated by auto-antibodies [7]. We report successful treatment with RTX in a case of CANOMAD resistant to usual therapy.

Case report

A 77 year-old woman had an 8 year history of sensory ataxia, paresthesia of the four limbs, oculomotor paresis and generalized areflexia. Nerve conduction study showed sensory neuronopathy. The diagnosis of CANOMAD was confirmed through immunological studies which evidenced combination of monoclonal IgM lambda gammopathy of undetermined significance, anti-I1 cold agglutinin, IgM antibodies against disialosyl gangliosides GD3, GQ1b, GD1b and GT1b. Bone marrow biopsy and thoraco-abdominal CT scan were normal. Sural nerve biopsy revealed demyelinating features.

After a slowly progressive deterioration, consecutive treatments with IVIg, corticosteroids and chlorambucil allowed the patient to walk independently for 3 years. A severe relapse increased unsteadiness and weakness of proximal lower limbs and the patient became wheelchair-bound. She then received RTX according to the regimen approved for rheumatoid arthritis (1,000 mg at day 1, day 15 and month 6) [3]. Clinical and biological data were recorded before treatment, at 1 month (M1) and every 3 months after the first RTX infusion during 1 year of follow-up. Neurologic deficiency was quantified by the use of the INCAT disability scale [4], INCAT sensory score [5], MRC sumscore on 28 muscle groups [2], static posturography [11] and the 9 holes peg test on the right hand.

E. Delmont (✉) · C. Desnuelle
Centre de Référence Maladies Neuromusculaires, Hôpital Archet
1, route Saint Antoine de Ginestiere, 06200 Nice, France
e-mail: delmont.e@chu-nice.fr

P. Y. Jeandel · L. Marcq
Service de Médecine Interne, Hôpital Archet 1, route Saint
Antoine de Ginestiere, 06200 Nice, France

A. M. Hubert · J. Boucraut
Laboratoire d'Immunologie, Hôpital de La Conception,
147 bd Baille, 13385 Marseille, France

Table 1 Clinical and biological evaluation of the patient after rituximab (RTX) infusions

	M0	M1	M3	M6	M9	M12
ISS	10	10	9	5	4	4
INCAT disability scale						
Lower limbs	5	4	2	3	2	2
Upper limbs	2	2	2	2	2	2
MRC	115	138	140	136	137	137
Static posturography (mm)	Impossible	Impossible	7,845	8,006	5,371	3,444
9HPT (s)	31	25	22	28	22	21
Anti-ganglioside titer						
GD1b	640	640	<20	40	<20	20
GQ1b	1,280	1,280	<20	80	20	40
GT1b	1,280	1,280	<20	80	20	40
IgM (g/l)	3.18	3.26	2.56	2.06	1.55	1.25
B cells CD19+ ($\times 10^9$ per l)	132	1.7	4.8	7.8	5.2	1.6

RTX was delivered the day after evaluation of M0 and M6. Static posturography was impossible to realize at M0 and M1 because of major sensory ataxia

ISS: INCAT sensory scale (range 0–20). INCAT disability scale (range 0–5 upper arms; 0–7 lower arms). MRC sumscore on 28 muscle groups (range 0–140). 9HPT: 9 holes pegs test

Blood samples were analyzed using an ELISA technique [1, 8] throughout the same experimentation to determine the titers of anti-disialosyl antibodies GQ1b, GD1b and GT1b (cut-off value 20). Quantification of B cells expressing CD19 and concentration of IgM paraprotein were assessed.

Clinical improvement occurred at M3, but the patient worsened at M6 before re-injection of RTX (Table 1). Sensory ataxia and muscle weakness clearly improved at M9 and remained stable at M12. Ophthalmoparesis did not change. Titers of anti disialosyl antibodies, concentrations of monoclonal IgM and levels of circulating B cells were significantly decreased since M3. No side effect of the treatment was recorded.

Discussion

Sensitization of rabbits with GD1b induces an experimental sensory ataxic neuropathy characterized by axonal degeneration in the dorsal roots of the spinal cord and production of anti-GD1b antibodies [10]. Passive transfer of these antibodies provokes degeneration of rabbit sensory neurons [10]. Thus, antibodies directed against disialosyl gangliosides (GD3, GQ1b, GD1b and GT1b) seem to be an important pathogenic factor in experimental sensory neuropathy and in CANOMAD. We tested treatment with RTX in our patient because this monoclonal chimeric antibody targets the B cells, which produce anti-gangliosides antibodies.

The effects of RTX in CANOMAD has been reported only once [6]. Four weekly infusions (375 mg/m²) were

given to a man with a disabling neuropathy. This treatment restored patient's responsiveness to IVIg. In the present case, RTX therapy induced an improvement of sensory ataxia, focused on static posturography and clinimetric measurements and was associated with a decrease in the titer of disialosyl antibodies. Clinical improvement was delayed if compared to the first report [6] but RTX was administrated in monotherapy and with a different regimen usually allowing to lower dosage. B cells were not totally depleted in our case, which suggests that higher doses of RTX could be used.

RTX seems to be safe and efficient in the treatment of CANOMAD. This result must be confirmed by further studies.

Acknowledgments Ethics committee of CHU de Nice approval was obtained and the patient gave informed consent.

Conflict of interest statement Authors report no financial disclosure.

References

1. Attarian S, Boucraut J, Hubert AM, Uzenot D, Delmont E, Verschueren A, Franques J, Azulay JP, Pouget J (2009) Chronic ataxic neuropathies associated with anti-GD1b IgM antibodies: response to IVIg therapy. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. doi: 10.1136/jnnp.2009.185736
2. Delmont E, Benaïm C, Launay M, Sacconi S, Soriani MH, Desnuelle C (2009) Do patients having a decrease in SNAP amplitude during the course of MMN present with a different condition? *J Neurol* 256(11):1876–1880
3. Edwards JC, Szczepanski L, Szechinski J, Filipowicz-Sosnowska A, Emery P, Close DR, Stevens RM, Shaw T (2004) Efficacy of

- B-cell-targeted therapy with rituximab in patients with rheumatoid arthritis. *N Engl J Med* 350:2572–2581
4. Graham RC, Hughes RA (2006) A modified peripheral neuropathy scale: the overall neuropathy limitations scale. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 77:973–976
 5. Merkies IS, Schmitz PI, van de Meche FG, van Doorn PA (2002) Psychometric evaluation of new sensory scale in immune mediated polyneuropathies. *Neurology* 54:943–949
 6. Siddiqui K, Cahalane E, Keogan M, Hardiman O (2003) Chronic ataxic neuropathy with cold agglutinins: atypical phenotype and response to anti-CD20 antibodies. *Neurology* 61:1307–1308
 7. Stübgen JP (2008) B cell-targeted therapy with rituximab and autoimmune neuromuscular disorders. *J Neuroimmunol* 204:1–12
 8. Willison HJ, O'Hanlon GM (1999) The immunopathogenesis of Miller-Fisher syndrome. *J Neuroimmunol* 100:3–12
 9. Willison HJ, O'Leary CP, Veitch J, Blumhardt LD, Busby M, Donaghy M, Fuhr P, Ford H, Hahn A, Renaud S, Katifi HA, Ponsford S, Reuber M, Steck A, Sutton I, Schady W, Thomas PK, Thompson AJ, Vallat JM, Winer J (2001) The clinical and laboratory features of chronic sensory ataxic neuropathy with anti-disialosyl IgM antibodies. *Brain* 124:1968–1977
 10. Willison HJ, Yuki N (2002) Peripheral neuropathies and anti-glycolipid antibodies. *Brain* 125:2591–2625
 11. Yelnik A, Bonan I (2008) Clinical tools for assessing balance disorders. *Neurophysiol Clin* 38:439–445

Mécanismes de mort cellulaire induit par le FTY720 dans un modèle d'hémopathie B

FTY720 induces DRP1-dependent regulated necrosis in chronic lymphocytic leukemia

Les gammopathies monoclonales d'isotype IgM sont responsables de neuropathies périphériques lorsque leur idiotype est dirigé contre la MAG ou les gangliosides disialylés. Ces neuropathies peuvent être invalidantes. Le traitement par rituximab est bien toléré, mais son efficacité est inconstante et toujours retardée de plusieurs mois. C'est dans l'optique du traitement des neuropathies périphériques associées aux hémopathies que nous nous sommes intéressés à l'action du FTY720 dans un modèle bien connu de néoplasie B, la leucémie lymphoïde chronique. Le FTY720 ou fingolimod est un analogue de la sphingosine. Il est utilisé comme immunosuppresseur dans la Sclérose en Plaques. Des études ont également rapporté un effet cytotoxique du FTY720 dans des hémopathies sans toutefois clairement expliquer son mécanisme d'action. L'objectif de ce travail est d'élucider les mécanismes moléculaires de l'effet cytotoxique du FTY720 dans un modèle d'hémopathie B, la leucémie lymphoïde chronique (LLC). Des cellules leucémiques primaires de LLC et une lignée cellulaire MEC1 ont été utilisées comme modèle expérimental in vitro.

Le FTY720, comme la sphingosine, entraîne une cytotoxicité dose-dépendante dans la LLC. Cet effet, médié par la forme non phosphorylée de FTY720, est indépendant des récepteurs au S1P. Le FTY720 induit l'expression de marqueurs d'apoptose : exposition de la phosphatidylsérine, clivage de PARP et de caspase 3. Cependant sa toxicité apparaît indépendante des caspases. La lipidation accrue de LC3 et la formation d'autophagolysosomes associée à une activité cathepsin B/L accrue indiquent que le FTY720 augmente également le flux autophagique. Cependant, des inhibiteurs de l'autophagie ne permettent pas de bloquer la mort cellulaire induite par le FTY720, suggérant que l'autophagie a ici un rôle protecteur vis à

vis de la toxicité du FTY720. Plusieurs éléments permettent de conclure que le FTY720 est responsable d'une nécrose cellulaire : aspect morphologique de nécrose en microscopie électronique, perméabilisation membranaire précoce avec relocalisation cytoplasmique et extracellulaire de HMGB1, accompagnée de libération de LDH. Au niveau moléculaire, l'action du FTY720 n'est pas bloquée par la nécrostatine 1, indiquant que la nécrose induite par le FTY720 est indépendante de RIPK1 (receptor interacting protein 1), une kinase clef des voies extrinsèques de nécrose cellulaire programmée. Par contre, nos travaux ont établi l'implication de DRP1 (dynamin related protein 1), une enzyme régulatrice de la fission mitochondriale, dans le processus de nécrose induite par le FTY720. En plus d'une relocalisation précoce de DRP1 à la mitochondrie accompagnée de modification de sa phosphorylation sur des sites régulateurs de son activité, nos expériences montrent que la suppression de son expression par interférence à ARN dans les cellules leucémiques réduit fortement la mort cellulaire induite par le FTY720. Le FTY720 est donc responsable dans la LLC d'une nécrose cellulaire programmée dépendante de DRP1.

Nos résultats illustrent l'implication des sphingolipides dans la régulation de la survie cellulaire et dans les voies de nécrose programmée. Le FTY720 a un mode d'action original différent de l'apoptose induite par les chimiothérapies classiques. Le FTY720 pourrait donc être une alternative thérapeutique dans les néoplasies B résistantes aux chimiothérapies usuelles et dans certaines manifestations auto-immunes des hémopathies.

FTY720 induces DRP1-dependent regulated necrosis in chronic lymphocytic leukemia

Emilien Delmont^{1,5,*}, Nicholas Dubois^{1,3,*}, Guillaume Robert^{2,3}, Frederic Larbret^{3,4}, Vincent Marechal⁸, Claude Desnuelle⁵, Patrick Auberger^{2,3}, Pierre-Yves Jeandel^{1,6}, Michel Ticchioni^{1,7}, Sophie Tartare-Deckert^{1,3}, and Marcel Deckert^{1,3}

¹INSERM, U1065, C3M, Microenvironment, Signalisation and Cancer, Nice, France

²INSERM, U1065, C3M, Cell Death, Differentiation, Inflammation and Cancer, Nice, France

³Université de Nice Sophia-Antipolis, Faculté de Médecine, Nice, France

⁴INSERM, U576, Flow cytometry facility, Hôpital Archet 1, Nice, France

⁵Centre de référence maladies neuromusculaires et SLA, ⁶Département de médecine interne, ⁷Service d'Immunologie, CHU de Nice, Nice, France

⁸Centre de Recherche des Cordeliers, Université Pierre et Marie Curie, UMRS 872, France

*Equal contribution

Running title:

FTY720 and DRP1-dependent necrosis

Corresponding author:

Marcel Deckert, INSERM U1065/C3M, Team 11, Bâtiment Universitaire Archimed, 151 Route de Ginestière, BP 23194, F-06204 Nice cedex 3
France. Tel: 33 (0) 4 89 06 43 10. Fax: 33 (0) 4 89 06 42 21. E-mail: deckert@unice.fr

Abstract

Fingolimod (FTY720) is an immunosuppressive drug that was recently approved for the treatment of multiple sclerosis and is currently under pre-clinical investigation as a therapy for a number of haematological malignancies. Previous studies have indicated a role for FTY720 in inducing autophagy and caspase-independent cell death in cancer cells through incompletely characterized molecular mechanisms. Our study thus aims at a better understanding of the way of action of FTY720. In chronic lymphocytic leukaemia (CLL) cells, FTY720 induced cell death with typical features of apoptosis, including phosphatidylserine exposure and caspase-3 activation, and features of autophagy, including LC3 conversion, autophagolysosome formation and lysosomal cathepsins activation. However, neither caspase nor autophagy blockade prevented the cytotoxic effect of FTY720, suggesting another mechanism of cell death. Using electron and fluorescence microscopy, flow cytometry and biochemical analyses, we found that FTY720 treatment increased a fraction of annexin V/7-AAD⁺ cells both in primary and transformed leukemic cells and induced morphological changes representative of necrosis, including oncosis, mitochondrial and plasma membrane alteration. FTY720 treatment resulted in increased plasma membrane permeability as shown by the extracellular translocation of the nuclear high mobility group box 1 (HMGB1) protein and by the release into the culture medium of the cytosolic enzyme lactate dehydrogenase (LDH). Interestingly, cell death induced by FTY720 was not prevented by pharmacological inhibition of RIPK1 and PP2A. In contrast, FTY720-induced necrosis was accompanied by an early relocation to the mitochondria of Dynamin-Related Protein 1, DRP1. Importantly, FTY720 stimulation led to major changes in the phosphorylation of serine residues associated with the mitochondrial fission activity of DRP1. Finally, siRNA-mediated knockdown of DRP1 significantly reduced necrotic cell death induced by FTY720. In this study, we thus demonstrate that in leukemic cells the cytotoxic effect of the immunosuppressive drug Fingolimod involves a DRP1-dependent regulated necrosis. These observations are important in line of the future development of Fingolimod as a new therapeutic agent in haematological malignancies.

Keywords

Fingolimod, FTY720, necrosis, chronic lymphocytic leukemia, DRP1

Introduction

Chronic lymphocytic leukaemia (CLL) is the commonest form of leukaemia in Western countries ¹. Available treatments generally induce remission, although nearly all the patients relapse and CLL remains an incurable disease. The purine analogue fludarabine, alone or in combination with cyclophosphamide and the anti-CD20 monoclonal antibody rituximab, has become the standard chemotherapy in most countries for CLL ^{2,3}. In the majority of cases, the treatment with fludarabine induces an apoptotic death dependent on the tumor suppressor p53. However, patients with mutation or loss of p53 have high risk to develop a CLL refractory to fludarabine and other usual chemotherapies ³. Despite clear advances in therapies targeting leukemic B cell signalling pathways ⁴), it is still a major issue to develop new therapeutic strategies in patients with CLL and poor prognosis factors.

Fingolimod (Gilenya, FTY720, 2-amino-2 propane-1,3-diolhydrochloride) is an oral immunosuppressive drug approved in the management of Multiple Sclerosis (MS) ^{5,6}. FTY720 is a structural analogue of sphingosine, an 18-carbon amino alcohol member of cell membrane sphingolipids ⁷. Upon phosphorylation by type 1 or type 2 sphingosine kinases (SPHK1 and SPHK2), sphingosine is modified into sphingosine-1-phosphate (S1P), which functions as an important signalling molecule during lymphocyte trafficking ⁸. S1P can be degraded into phosphoethanolamine by S1P lyase or further metabolized into ceramide, another potent signalling lipid in cell proliferation and cell death. Similar to sphingosine, fingolimod can be phosphorylated by SPHK1/2 ^{7,9}. Binding of fingolimod phosphate (FTY720-P) to sphingosine-1-phosphate receptors (S1PRs) expressed by lymphocytes induces their internalization and inhibition ¹⁰. During MS treatment with fingolimod, this process results in the blocking of lymphocyte egress from lymph nodes, preventing autoimmune lymphocytes from contributing to the harmful autoimmune reaction ¹¹. Recent studies have indicated a role for fingolimod in inducing cell death in a variety of human and mice cancer models, including solid tumors ¹²⁻¹⁶ and hematological malignancies ¹⁷⁻²⁰. The cytotoxic effects of fingolimod appear highly cell context dependent and a variety of cell death mechanisms have been associated to fingolimod treatment, including apoptosis ¹³, caspase-independent cell death ^{17,20}, increased autophagic flux ^{14,17} and necrosis ^{14,16}. At the molecular level, how fingolimod triggers cell death is unclear ²¹. In prostate cancer, fingolimod has been shown to sensitize tumor cells to radiotherapy through inhibition of SPHK1 independently of S1PRs ¹⁵. More recently, studies in lung adenocarcinoma, Jak2V617F-driven myeloproliferative neoplasms and chronic myeloid leukemic stem cells have implicated a I2PP2A/SET-mediated activation of the tumor suppressor protein phosphatase 2A (PP2A) ^{16,18,22}. In CLL cells, FTY720-induced toxicity was also linked to PP2A activation ²⁰. However, the exact underlying molecular mechanisms of fingolimod antileukemic activity are still ill defined.

In this study, we found that fingolimod activated apoptotic and autophagic events that were unnecessary to its effects on CLL cell death. Instead, fingolimod treatment induced morphological and biochemical events that were typical of cells undergoing necrotic death, including oncosis, mitochondrial alteration and increased plasma membrane permeability associated with the extracellular release of high mobility group box 1 (HMGB1) protein and lactate dehydrogenase (LDH). Fingolimod-induced cell death required neither RIPK1 nor PP2A activity, but was associated with the mitochondrial relocalization of phosphorylated Dynamin-Related Protein 1 (DRP1). Consistently, knockdown of DRP1 expression in CLL cells impaired FTY720-induced necrotic death. These observations have important clinical implications since Fingolimod is now largely considered as a potential therapeutic agent in haematological malignancies.

Results

Fingolimod and sphingosine induced caspase-independent death of CLL cells. The exact mechanism of cytotoxicity of Fingolimod (FTY720) on CLL cells is still ill defined. To model the action of FTY720 in vitro, we used the MEC1 cell line that was established from a patient with B CLL in prolymphocytoid transformation²³. Treatment with increasing concentration of FTY720 and of its cellular analogue sphingosine for 24, 48 and 72 h resulted in a dose-dependent reduction in cell viability in MEC1 cells (Figure 1a and 1b). IC₅₀ value for FTY720 was calculated at 7 μ M in MEC1 cell line, whereas IC₅₀ value for sphingosine was calculated at 12 μ M (Figure 1b). FTY720 and sphingosine can be phosphorylated by intracellular sphingosine kinase⁷. We therefore addressed the level of toxicity of FTY720-P and sphingosine-1-phosphate (S1P) in CLL cells. As shown in Figure 1c, neither FTY720-P nor S1P had significant cytotoxic activities in MEC1 cells. Consistently, an inhibitor of sphingosine kinases (SKI) cooperated with FTY720 and sphingosine to decrease MEC1 cell survival (Figure 1c). The effect of FTY720 and sphingosine on cell death induction was confirmed with primary leukemic cells obtained from CLL patients (Figure 1d).

Next we investigated the biochemical pathways involved in the antileukemic activity of FTY720 and sphingosine. Following treatment of MEC1 cells with FTY720 and sphingosine, the cleavage of two apoptosis markers, caspase 3 and PARP1 was observed (Figure 2a). Consistent with their lack of cytotoxic activities, FTY720-P and S1P had not effect on these biochemical events typical of apoptotic cell death. Caspase 3 activation by FTY720 and sphingosine was confirmed by directly assessing its activity on cell lysates obtained from treated leukemic cells (Figure 2b). However, incubation of primary leukemic cells with the pan-caspase inhibitor QVD-Oph did not prevent FTY720-induced cell death measured by flow cytometric analysis of Annexin V and 7-AAD staining, in contrast to what was observed with the proapoptotic compound staurosporine (STS) (Figure 2c). The efficient blockade of caspase 3 by QVD-Oph was shown further by the analysis of its effect on FTY720-induced caspase

3 activity measured by intracellular flow cytometry (Figure 2d). Another pan-caspase inhibitor, ZVAD-fmk, that prevented the proteolytic processing of procaspase 3 and PARP1 in MEC1 cells, also failed to block cell death (Supplementary Figure S1).

Cell death induced by Fingolimod was associated with autophagolysosome formation and increased cathepsin activities. In order to evaluate the role of autophagy in cell death induced by Fingolimod, we first assessed the effect of FTY720 and sphingosine in MEC1 cells stably transfected with mCherry-LC3 (Supplementary Figure S2). Since the redistribution of LC3 to the autophagosomal membranes is associated to the process of autophagy²⁴, examination of the cellular location of fluorescent LC3 allows the quantification of autophagosome formation²⁵. Following treatment with FTY720 and sphingosine, mCherry-LC3 redistributed from a diffuse cytoplasmic pattern to a punctate pattern of vesicles stained by the lysosome specific fluorescent dye LysoTracker Green, indicating that these compounds effectively increased the formation of autophagolysosomes in the leukemic cells (Figure 3a). The ultrastructural morphological changes associated with the formation of autophagosomes were confirmed by transmission electron microscopy analysis. MEC1 cells treated with FTY720 exhibit typical features of cells undergoing autophagy such as large vacuoles with double membrane containing digested materials (Figure 3b, arrows). During autophagosome formation, the cytosolic form of LC3, LC3-I is matured into the autophagosome-associated form LC3-II detectable by immunoblot analysis. As shown in Figure 3c, FTY720 and sphingosine, but not their phosphorylated forms FTY720-P and S1P, induced the conversion of LC3-I to LC3-II. Of note, treatment of primary leukemic cells with FTY720 led to a similar LC3-I to LC3-II conversion, whereas the apoptosis inducer staurosporine had no effect on LC3 conversion (Supplementary Figure S3). The effect of FTY720 on autophagic flux was further supported by the observations that the lysosomal inhibitor bafilomycin A1 prevented the effect of FTY720 on the reduction of the protein levels of p62/SQSTM1, a marker of autophagic activity²⁶ (Supplementary Figure S4). Further supporting the notion that FTY720 and sphingosine activated the lysosomal pathway, we found that FTY720 and sphingosine significantly increased the activity of two lysosomal proteases, cathepsin B and L, a process usually associated with lysosomal membrane permeabilization (Figure 3d). Together, these results indicate that both FTY720 and sphingosine induces autophagy in CLL cells. Because cases of cell death by autophagy have been reported²⁷, we thus examined the effect of bafilomycin A1 and 3-methyladenine (3MA), two inhibitors of the early and late stages of the autophagy pathway²⁸, on FTY720-induced cell death. When incubated in the presence of QVD-Oph in order to prevent the basal toxicity of bafilomycin A1 and 3MA in leukemic cells (data not shown), both compounds cooperated with FTY720 to further decrease cell survival (Figure 3e). Moreover, the cathepsin inhibitor CA-074Me²⁹ failed to prevent the cytotoxicity of FTY720 and sphingosine (Figure 3f), although it effectively blocked cathepsin B/L in vitro activities (data not shown). These results indicate that autophagic cell death does not impart the cytotoxic activities of FTY720 and sphingosine

on CLL cells and also that apoptosis is not responsible for the accentuated cell death observed when autophagy is blocked.

Fingolimod and sphingosine induces necrotic cell death in CLL cells. Next we examined the possibility that FTY720 treated leukemic cells underwent necrotic cell death. Necrosis is a form of cell death with typical morphological and biochemical features, including oncosis, plasma membrane permeabilization (PMP) and release of cellular content in the extracellular milieu^{30,31}. First, we examined by flow cytometry the incorporation of the exclusion dye 7-AAD in FTY720-treated MEC1 cells in the presence of the pan-caspase inhibitor QVD-Oph. As shown in Figure 4a, FTY720 and sphingosine, but not by their phosphorylated forms FTY720-P and S1P significantly increased the fraction of Annexin V negative and 7-AAD positive cells. FTY720 and sphingosine treatment had similar effect on 7-AAD incorporation compared to the treatment with hydrogen peroxide (H₂O₂), a typical inducer of necrotic cell death. In contrast, the apoptotic compound staurosporine had no significant effect of 7-AAD staining. When assayed in QVD-Oph-treated primary leukemic cells purified from 6 different patients with CLL, we confirmed the observations that FTY720, but not staurosporine, increased incorporation of 7-AAD (Figure 4b). Next, the morphological features typically associated with necrosis were investigated by electron microscopy analysis (Figure 4c). In contrast to untreated cells, FTY720 and sphingosine-treated cells displayed several traits of necrosis, including increased cell volume, organelles swelling and loss of mitochondrial ultrastructure, condensation of chromatin into small irregular patches, disruption of the plasma cell membrane and translucent cytoplasm. Induction of PMP by FTY720 and sphingosine was also evidenced by the increased release of lactate dehydrogenase in cell culture supernatants (Figure 4d). In contrast, neither FTY720-P nor S1P were able to induce membrane permeabilization in leukemic cells. As a control, the apoptosis inducer staurosporine also failed to induce PMP.

The measure of the extracellular release of the chromatin-binding protein HMGB1 (high mobility group box 1) is a common method for assessing necrotic cell death³¹). Using MEC1 cells stably transfected with HMGB1-EGFP (Supplementary Figure S5), we first observed by fluorescence microscopy that addition of FTY720 and sphingosine to the cells resulted in the translocation of HMGB1-EGFP from the nucleus to the cytoplasm (Figure 5a). Cellular fractionation further showed that endogenous HMGB1 was already detectable in the cytoplasm of MEC1 cells 6 h following the addition of FTY720 (Figure 5b). Finally, immunoblot analysis performed on culture supernatants from HMGB1-EGFP transfected cells showed that only FTY720 and sphingosine had the capacity to induce the release into the extracellular milieu of HMGB1, in contrast to their phosphorylated counterparts or the two apoptosis inducers staurosporine and BAY61-3606³² (Figure 5c). Collectively, these data indicate the ability of Fingolimod and its cellular counterpart sphingosine to induce a necrotic cell death in CLL cells.

FTY720-induced necrotic cell death proceeds independently of RIPK1 and PP2A in CLL cells. A major form of necrotic cell death is mediated by the receptor interacting protein (RIP) kinase 1 (RIPK1) downstream tumour necrosis factor (TNF) receptor 1 (TNFR1)³³. In order to test whether the pathway of necrotic death induced by Fingolimod involves RIPK1 activation, we incubated cells treated with FTY720 and QVD-Oph in the presence of the selective RIPK1 inhibitor, Necrostatin-1³⁴, and measured cell viability. In MEC1 CLL cells, Necrostatin-1 failed to prevent the cytotoxic effect of FTY720 and of STS. As a control, cell death induced by TNF α in the presence of QVD-Oph was blocked by Necrostatin-1 in the promonocytic leukemia cells U937 (Figure 6a).

The caspase-independent death of CLL cells induced by FTY720 has been linked to the activity of the tumor suppressor PP2A, and treatment with the PP2A inhibitor okadaic acid (OA) reduced FTY720-induced cell toxicity²⁰. We therefore tested the impact of PP2A inhibition on cell death induction by FTY720 in our system. In MEC1 cells treated or not with FTY720 and QVD-Oph in the presence of increasing doses of okadaic acid, we observed no effect on the decrease viability induced by FTY720. At higher concentrations, okadaic acid was even toxic by itself (Figure 6b). Similar results were obtained when we evaluated the impact of okadaic acid on FTY720-induced death of primary leukemic cells from CLL patients (data not shown).

FTY720-induced necrotic CLL cell death requires the expression of DRP1.

DRP1 (Dynamin Related Protein 1) is a cytosolic protein involved in regulation of mitochondrial fission upon its signal-induced phosphorylation, translocation and oligomerization at the mitochondrial membrane^{35,36}. Recent studies have involved DRP1 in several forms of necrotic cell death, including caspase-independent leukemic cell death³⁷, neuronal cell death³⁸ and programmed necrosis mediated by RIPK family³⁹. To examine if the necrotic cell death caused by FTY720 treatment implicates DRP1, we first used cell fractionation assay and immunoblot analysis of DRP1 location and phosphorylation in MEC1 cells. FTY720 treatment induced a prompt relocation (< 15 min) of DRP1 from the cytosol to the membrane/organelle fraction enriched in mitochondria as evidenced by VDAC1 (Voltage-dependent anion channel 1) immunoblot (Figure 7a). The relocation of DRP1 to mitochondria, which was observed up to 2 h following FTY720 treatment, was accompanied by a decreased phosphorylation of DRP1 on serine 637 and serine 616, two sites associated with changes in the activity of DRP1³⁹⁻⁴¹. Interestingly, increased phosphorylation of DRP1 serine 616 was observed after 2 h of FTY720 stimulation. The modulation of DRP1 phosphorylation was paralleled by a rapid disparition of the phosphorylated forms of ERK1/2 and Akt, whereas increased phosphorylation of p38 was observed in the cytosol of FTY720-treated cells. When membrane/organelle protein extracts were separated under nonreducing conditions, a band of DRP1 migrating with higher apparent molecular weight was observed upon 30 min of FTY720 stimulation, indicating that FTY720 led to DRP1 dimerization at the mitochondria (Figure 7b). The specificity of the anti-DRP1 immunoblots under reduced *versus* unreduced conditions was confirmed in siRNA-

mediated DRP1 knockdown cells (Supplemental Figure S6). Finally, whereas overexpression of EGFP-DRP1 proteins in MEC1 cells resulted in the aggravation of cell death induced by FTY720 (Figure 7c), the reduction of endogenous DRP1 expression by siRNAs against DRP1 significantly impaired the cytotoxic activity of FTY720 in both MEC1 cells (Figure 7d) and primary CLL cells (Supplementary Figure S7).

Discussion

Fingolimod (FTY720) is used as an immunosuppressive drug in Multiple Sclerosis (MS) ⁶. This effect is mediated by phosphorylated FTY720 through S1P receptors at low nanomolar concentrations ⁴². The cytotoxic effect induced by FTY720 requires higher concentration of drug than for its immunosuppressive action. To induce cytotoxicity, the IC₅₀ of FTY720 treatment ranges from 4 to 13 μM depending of the type of neoplastic cells ^{14 17,20 16,18}. However, high doses of FTY720 up to 10mg/kg/day have been administrated orally or intraperitoneally to mice with anti-neoplastic effect, without any apparent toxicity ^{16,43}. S1P and phosphorylated FTY720 neither induced autophagy nor cell death in CLL cells, and S1P failed to rescue MEC1 cells from death induced by FTY720. In addition, a sphingosine kinase inhibitor, that is known to inhibit the phosphorylation of FTY720 and sphingosine, increased their cytotoxicity in CLL cells. All these data indicate that FTY720 cytotoxicity is not mediated by FTY720-P through S1P receptors, consistent with previous reports ^{16,20,43}.

FTY720 has a cytotoxic effect in various types of cancer, but the exact underlying mechanisms are still unclear ²¹. Several studies indicate a cell type-specific effect of FTY720. It induces caspase-dependent apoptosis in both MCF7 breast cancer cells ¹² and Huh7 hepatoma cells ¹³, whereas inhibition of caspase does not inhibit its cytotoxicity in ovarian cancer ¹⁴ and in haematological cancers ^{17,19,20}, in agreement with our observations in CLL cells. Despite induction of autophagy in CLL cells, as well as in other cancers ^{14,17}, FTY720 did not cause autophagic CLL cell death and autophagy inhibitors aggravated its antileukemic activity. Autophagy is a lysosomal degradation pathway that is essential for survival, differentiation and homeostasis, and principally serves an adaptive role to protect organisms against diverse pathologies, including infections, cancer, and neurodegeneration. The autophagic process caused by FTY720 may thus serve as a defense mechanism in leukemic cells against the stress caused by its own cytotoxic activity. In line with this notion, FTY720 stimulation induced a rapid phosphorylation of the MAPK p38, a kinase involved in stress responses. Thus, the apoptotic features that we observed in CLL cells stimulated by FTY720 and its cellular analogue sphingosine can thus be seen as the failure to adapt to cellular stress through the autophagic pathway. In addition, the observed activation of effector caspases could be the consequence of the FTY720-induced release of cathepsins B and L, a group of lysosomal cysteine

proteases that have been linked to the activation of the mitochondrial pathway of apoptosis^{44, 45}. Consistently, the conversion of sphingomyelin into sphingosine is an important trigger of lysosomal apoptosis⁴⁵ and TNF α -induced lysosomal membrane permeabilization (LMP)⁴⁶.

Nevertheless, the fact that inhibition of both autophagy and apoptosis did not prevent the cytotoxic action of FTY720 in CLL cells led us to examine its action on necrosis, a third type of cell death mechanism long regarded as a passive and unregulated process³³. Previous studies showed that FTY720 induced caspase-independent cell death or necrosis in ovarian cancer¹⁴, lung tumor¹⁶, and leukemia^{17,20}. In our study, CLL cells treated with FTY720 clearly displayed both morphological and biochemical features of cells undergoing necrosis^{31,33}, including cytoplasmic swelling, mitochondrial and plasma membrane alteration, activation of cathepsins, nuclear dye staining, and extracellular release of the nuclear protein HMGB1 and of the cytosolic enzyme LDH. Recent studies have implicated the binding of FTY720 to the inhibitor of PP2A, I2PP2A/SET, in the killing effect of FTY720^{16,18,22}. In CLL cells, FTY720-induced caspase independent cell death was also linked to PP2A activation²⁰ and the oncoprotein SET was found overexpressed⁴⁷. However, we found no evidence that the toxicity of FTY720 in CLL cells involved PP2A activity, because the PP2A inhibitor okadaic acid could not prevent the effect of FTY720 on cell death at a range of concentrations from 0.1 to 100 nM, even in the presence of the apoptosis inhibitor QVD-Oph. Currently, the reason for this discrepancy is unknown but the activation of PP2A downstream FTY720 was not implicated in several other malignancies, such as ovarian cancer cells¹⁴ and hepatocellular carcinomas¹³. Another molecular pathway leading to regulated necrosis (necroptosis) is initiated by the ligation of death receptors, such as CD95, TNFR1/2 and TNF-related apoptosis-inducing ligand receptors (TRAILR1/2), in the presence of either endogenous or exogenous inhibitors of apoptosis. The process of regulated necrosis also requires the activity of RIPK1/3³³. Interestingly, the PP2A-dependent killing effect of FTY720 in lung cancer was recently linked to the activation of RIPK1¹⁶. In contrast, the cytotoxicity of FTY720 in CLL cells appears independent of RIPK1 activity, because Necrostatin-1, a highly specific inhibitor of RIPK1³⁴, could not prevent the loss of cell viability induced by FTY720 in leukemic cells. However, the implication of RIPK3 in FTY720-induced necroptosis in CLL cells can not be rule out, in line of a recent study that has indicated that RIPK1 is not mandatory in programmed necrotic death caused by TNF α ⁴⁸.

In addition to lysosomal and plasma membranes ruptures, necroptosis involves the active impairment of mitochondrial functions³³. Recent reports have implicated the regulator of mitochondrial fission, DRP1³⁵, in multiple necrosis pathways³⁹. Mitochondria dynamics involve constant fusion and fission processes that play a crucial role in the maintenance of mitochondrial functions and in cellular adaptation to physiological and pathological cues. In mammalian cells, binding of DRP1 to Fis1 and Mff on the outer mitochondrial membrane regulates mitochondrial fission, whereas mitochondrial fusion relies on mitofusins and optic atrophy 1 (OPA1)^{36,49}. Importantly, the activity of DRP1 is regulated by post-translational modifications, such as reversible phosphorylation events³⁶. Notably,

DRP1 activity and mitochondrial fission are prevented when DRP1 is phosphorylated by cyclic AMP-dependent kinase (PKA) at serine 637 phosphorylation ^{40,41}. In this study, we found that siRNA-mediated knockdown of DRP1 significantly reduced the killing effect of FTY720 in CLL cells, whereas DRP1 overexpression dramatically increased cell death. FTY720 treatment also caused a very rapid relocation of DRP1 to mitochondria, accompanied by dephosphorylation of DRP1 at serine 637 in leukemic cells. Interestingly, a previous study has shown that DRP1 expression correlated with the susceptibility of normal and leukemic B cells to undergo regulated necrosis following the engagement of CD47 ³⁷. Consistent with FTY720-mediated events involved in CLL cells necrosis, CD47 ligation on B cells resulted in the translocation of DRP1 from the cytosol to mitochondria, impairment of the mitochondrial electron transport chain, a drop in ATP levels and ROS generation ³⁷. The mitochondrial protein phosphatase phosphoglycerate mutase/protein phosphatase 5, PGAM5, was recently identified as the DRP1 serine 637 phosphatase, during necrosis caused by TNF α , calcium overload and ROS ³⁹. Whether PGAM5 could also be involved in FTY720-induced necrosis in CLL cells is currently under investigations. Finally, a late increase in the phosphorylation of DRP1 at serine 616 was also observed following FTY720 stimulation. Because the phosphorylation by cyclin-dependent kinase Cdk1 at serine 616 has been linked to DRP1-mediated mitochondrial fission during mitosis ⁵⁰, the significance of this event for FTY720-mediated cell death is unclear. However, one could speculate that DRP1 serine 616 could be the substrate of additional kinases involved in the regulation of necrotic death pathways.

In conclusion, we propose that the treatment of CLL cells by FTY720 mimics some intracellular effects of sphingosine, including lysosomal membrane permeabilization, cathepsins activation and ROS generation. In addition to mitochondrial uncoupling and lipid peroxidation ³³, ROS would activate PGAM5, leading to DRP1 dephosphorylation at the mitochondria outer membrane and increased mitochondrial fragmentation activity (Figure 8). The combination of fludarabine, rituximab and cyclophosphamide has significantly improved the outcome of patients with CLL. Regardless to this success, some patients relapse and develop neoplastic cells resistant to conventional therapy and apoptotic cell death ³. In this context, the pronecrotic activity of FTY720 should prove clinically useful in the treatment of refractory CLL.

Materials and Methods

Cell lines, Primary cell preparation and culture conditions. The human B chronic lymphocytic leukemia cell line MEC1 ²³ was from DSMZ (Germany). The human promonocytic leukemia cell line U937 was from the American Type Culture Collection (ATCC). Primary CLL cells were obtained at the Nice University Hospital (CHU Nice) from peripheral blood samples of CLL patients after informed

consent. The diagnosis of CLL was based on clinical and immunophenotypic criteria ¹. All patients included in this study were either untreated or had not received chemotherapy or steroids for at least 6 months prior to the investigation. Peripheral mononuclear cells were isolated from peripheral blood by Ficoll-Hypaque density gradient centrifugation. Leukemic B cells were isolated by magnetic selection as previously described ^{32,51}. Cells were cultured in RPMI 1640 medium (Gibco, UK) at 37°C in 5% CO₂ atmosphere. Medium was supplemented with 10% foetal bovine serum (Hyclone, USA), 1% penicillin G/streptomycin, and 1% pyruvate (Gibco).

Reagents, Antibodies, siRNA and Plasmids. Sphingosine, phosphorylated form of sphingosine (S1P), staurosporine (STS), bafilomycin, 3-methyl adenosine (3MA), TNF α were provided by Sigma Aldrich (St Louis, MI), sphingosine kinase inhibitor 2, FTY720phosphate by Cayman Chemical (Ann Arbor, MI), FTY720 by Calbiochem (La Jolla, CA), QVD-OPH by MP-Biomedicals (Aurora, OH) and Necrostatin-1 by Enzo (France).

Antibodies against Caspase-3, LCR, HMGB1, VDAC-1, phosphorylated forms of DRP1, P-p38MAPK, P-JNK, SMAC and HRP-conjugated secondary antibodies were purchased from Cell Signaling Technology (Beverly, MA), against PARP-1 from Calbiochem (La Jolla, CA), against α -tubulin from Sigma Aldrich (St Louis, MI), against nucleoporine, DRP-1 and ERK2 from Santa Cruz Biotechnology Santa Cruz, CA). DRP1 specific siRNA were from Santa Cruz, CA. The plasmid for HMGB1-EGFP was described before ⁵². The plasmid encoding EGFP-DRP1 was a kind gift from M. Schrader ⁵³. To generate the mCherry-LC3 construct, GFP cDNA from a GFP-LC3 plasmid (Cell Biolabs) was replaced by mCherry sequence using BsrG1 and SalI enzymes. mCherry-LC3 cDNA was then cloned into pRRLSIN.cPPT.PGK-EGFP.WPRE vector (Addgene plasmid #12252) using AgeI and SalI restriction sites in place of EGFP cDNA.

Analysis of cell viability. Cells were seeded in triplicates into 96-well plates. After the indicated treatments at 37°C, cell metabolism was measured by a MTS conversion assay using the CellTiter 96[®] Aqueous Non-Radioactive Cell Proliferation kit (Promega, Madison WI) according to the manufacturer instructions. Cell death was assessed by flow cytometry (BD FACSCanto II, BD Biosciences) following staining with Annexin V-PE/7-AAD (BD Pharmingen) as previously described ³², or by measurement of LDH release using the CytoTox-ONE homogeneous membrane integrity assay as recommended by the manufacturer (Promega).

Caspase-3 and Cathepsin activity measurement. After stimulation, cells were lysed for 30 minutes at 4°C in lysis buffer (50 mM TRIS pH 7.4, 150 mM NaCl, 1 mM PMSF, 1% Triton X-100) and cellular extracts were incubated in 96-well plates with z-FR-AMC (cathepsin B/L) or Ac-DEVD-AMC (caspase 3) as substrates at 37°C. Cathepsin and caspase-3 activities were measured by following emission at 460nm (excitation at 390nm). Enzyme activities were expressed as arbitrary units/mg of protein. Each experiment

was performed in quadruplicates and repeated at least three times. Caspase-3 activity was also measured by flow cytometry using anti-active caspase-3-FITC antibody (BD Pharmingen) as described before ³².

Cell transfection. Stable transfections into MEC1 cells were performed by electroporation (270mV, 975 μ F) using a Gene Pulser system (Bio-Rad Laboratories). Transfected cells were transferred to 37°C preheated medium and after 24 hrs at 37°C, 5% CO₂, cells were selected in geneticin-containing culture medium. Transient transfections into MEC1 or primary leukemic cells were performed using the AMAXA nucleofection system (Lonza, Switzerland) as previously described ³².

Subcellular fractionation and Western Blot Analysis. For preparation of nuclear, microsomal and cytoplasmic protein extracts, cell extracts from 1x10⁶ were prepared using the ProteoExtract Subcellular proteome extraction kit (Merck, Germany), according to the manufacturer instructions. For preparation of whole-cell lysates, cells were lysed in ice-cold lysis buffer: 1% Triton X-100 in 150 mM NaCl, 50 mM Tris-HCl, pH 7.5, 0.1% SDS, 0.1% sodium deoxycholate supplemented with protease and phosphatase inhibitors (Roche Diagnostics) for 30 min on ice. Lysates were clarified by centrifugation at 15,000 g for 15 minutes at 4°C. Protein extracts (30 μ g per lane) were then separated by SDS-PAGE and transferred to a nitrocellulose membrane. Membranes were probed by immunoblotting with primary and horseradish peroxidase (HRP)-conjugated proper secondary antibodies followed by enhanced chemiluminescence detection. Intensity of the bands was evaluated and optic densities (OD) were compared using ImageJ software.

Fluorescence microscopy. Cells stably transfected with mCherry-LC3 or HMGB1-EGFP were seeded onto sterile chamber slide and treated with different reagents for the indicated times at 37°C. Cells were then incubated with 300 nM DAPI (Sigma-Aldrich) in the presence or not of 100 nM LysoTracker Green (Invitrogen) for 30 min at 37°C, centrifugated and resuspended in fresh prewarmed culture medium. Cells were then analyzed using a Zeiss Axiovert 200M fluorescence microscope (Zeiss Leica Microsystems, ON) equipped by a Hamamatsu ORCA-ER digital camera (Hamamatsu, Japan). Image analysis was performed with Volocity software (Improvision Inc, Waltham, MA).

Electron microscopy. Electron microscopy was performed on the CCMA EM Core facility (University of Nice Sophia Antipolis). Cells were pelleted and fixed with 1.6% glutaraldehyde in 0.1 M phosphate buffer pH 7.2 at room temperature, washed with the same buffer, and then postfixed with 1% osmium tetroxide and 1% potassium ferricyanid. Finally, cells were rinsed with distilled water, dehydrated with ethanol and embedded in Epon. Ultrathin sections were contrasted with 4% uranyl acetate and lead nitrate and examined under a JEOL JEM-1400 transmission electron microscope equipped with a Morada CCD camera (Olympus).

Statistical analysis. Comparisons between two groups were performed using the Wilcoxon signed rank test for paired measures and between multiple groups using the Friedman test. Difference was statistically significant for $p < 0.05$.

Conflict of interest

The authors declare no conflict of interest.

Acknowledgments

This work was supported by INSERM and in part by a grant from the Association Laurette Fugain. N.D. was supported by the Ministère de l'Éducation Nationale et de la Recherche and by a doctoral fellowship from Fondation ARC. The authors greatly acknowledge S. Pagnotta and the CCMA (Centre Commun de Microscopie Appliquée, University of Nice Sophia Antipolis, Microscopy and Imaging platform Côte d'Azur, MICA) for electron microscopy analysis, and D. Alcor (INSERM U1065/C3M, Nice, France) for assistance with confocal microscope.

References

1. Dighiero G, Hamblin TJ. Chronic lymphocytic leukaemia. *Lancet*. 2008;371:1017-1029.
2. Steurer M, Pall G, Richards S, Schwarzer G, Bohlius J, Greil R. Single-agent purine analogues for the treatment of chronic lymphocytic leukaemia: a systematic review and meta-analysis. *Cancer Treat Rev*. 2006;32:377-389.
3. Zenz T, Gribben JG, Hallek M, Dohner H, Keating MJ, Stilgenbauer S. Risk categories and refractory CLL in the era of chemoimmunotherapy. *Blood*. 2012;119:4101-4107.
4. Ramsay AD, Rodriguez-Justo M. Chronic lymphocytic leukaemia--the role of the microenvironment pathogenesis and therapy. *Br J Haematol*. 2013;162:15-24.
5. Kappos L, Radue EW, O'Connor P, et al. A placebo-controlled trial of oral fingolimod in relapsing multiple sclerosis. *N Engl J Med*. 2010;362:387-401.
6. Pelletier D, Hafler DA. Fingolimod for multiple sclerosis. *N Engl J Med*. 2012;366:339-347.
7. Takabe K, Paugh SW, Milstien S, Spiegel S. "Inside-out" signaling of sphingosine-1-phosphate: therapeutic targets. *Pharmacol Rev*. 2008;60:181-195.
8. Cyster JG. Chemokines, sphingosine-1-phosphate, and cell migration in secondary lymphoid organs. *Annu Rev Immunol*. 2005;23:127-159.
9. Paugh SW, Payne SG, Barbour SE, Milstien S, Spiegel S. The immunosuppressant FTY720 is phosphorylated by sphingosine kinase type 2. *FEBS Lett*. 2003;554:189-193.
10. Chiba K. FTY720, a new class of immunomodulator, inhibits lymphocyte egress from

- secondary lymphoid tissues and thymus by agonistic activity at sphingosine 1-phosphate receptors. *Pharmacol Ther.* 2005;108:308-319.
11. Brinkmann V, Billich A, Baumruker T, et al. Fingolimod (FTY720): discovery and development of an oral drug to treat multiple sclerosis. *Nat Rev Drug Discov.* 2010;9:883-897.
 12. Azuma H, Takahara S, Ichimaru N, et al. Marked prevention of tumor growth and metastasis by a novel immunosuppressive agent, FTY720, in mouse breast cancer models. *Cancer Res.* 2002;62:1410-1419.
 13. Hung JH, Lu YS, Wang YC, et al. FTY720 induces apoptosis in hepatocellular carcinoma cells through activation of protein kinase C delta signaling. *Cancer Res.* 2008;68:1204-1212.
 14. Zhang N, Qi Y, Wadham C, et al. FTY720 induces necrotic cell death and autophagy in ovarian cancer cells: a protective role of autophagy. *Autophagy.* 2010;6:1157-1167.
 15. Pchejetski D, Bohler T, Brizuela L, et al. FTY720 (fingolimod) sensitizes prostate cancer cells to radiotherapy by inhibition of sphingosine kinase-1. *Cancer Res.* 2010;70:8651-8661.
 16. Saddoughi SA, Gencer S, Peterson YK, et al. Sphingosine analogue drug FTY720 targets I2PP2A/SET and mediates lung tumour suppression via activation of PP2A-RIPK1-dependent necroptosis. *EMBO Mol Med.* 2012;5:105-121.
 17. Wallington-Beddoe CT, Hewson J, Bradstock KF, Bendall LJ. FTY720 produces caspase-independent cell death of acute lymphoblastic leukemia cells. *Autophagy.* 2011;7:707-715.
 18. Neviani P, Harb JG, Oaks JJ, et al. PP2A-activating drugs selectively eradicate TKI-resistant chronic myeloid leukemic stem cells. *J Clin Invest.* 2013.
 19. Liu Q, Alinari L, Chen CS, et al. FTY720 shows promising in vitro and in vivo preclinical activity by downmodulating Cyclin D1 and phospho-Akt in mantle cell lymphoma. *Clin Cancer Res.* 2010;16:3182-3192.
 20. Liu Q, Zhao X, Frizzera F, et al. FTY720 demonstrates promising preclinical activity for chronic lymphocytic leukemia and lymphoblastic leukemia/lymphoma. *Blood.* 2008;111:275-284.
 21. Pitman MR, Woodcock JM, Lopez AF, Pitson SM. Molecular targets of FTY720 (fingolimod). *Curr Mol Med.* 2012;12:1207-1219.
 22. Oaks JJ, Santhanam R, Walker CJ, et al. Antagonistic activities of the immunomodulator and PP2A-activating drug FTY720 (Fingolimod, Gilenya) in Jak2-driven hematologic malignancies. *Blood.* 2013;122:1923-1934.
 23. Stacchini A, Aragno M, Vallario A, et al. MEC1 and MEC2: two new cell lines derived from B-chronic lymphocytic leukaemia in prolymphocytoid transformation. *Leuk Res.* 1999;23:127-136.
 24. Kabeya Y, Mizushima N, Ueno T, et al. LC3, a mammalian homologue of yeast Apg8p, is localized in autophagosome membranes after processing. *EMBO J.* 2000;19:5720-5728.

25. Klionsky DJ, Abeliovich H, Agostinis P, et al. Guidelines for the use and interpretation of assays for monitoring autophagy in higher eukaryotes. *Autophagy*. 2008;4:151-175.
26. Bjorkoy G, Lamark T, Brech A, et al. p62/SQSTM1 forms protein aggregates degraded by autophagy and has a protective effect on huntingtin-induced cell death. *J Cell Biol*. 2005;171:603-614.
27. Kroemer G, Levine B. Autophagic cell death: the story of a misnomer. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2008;9:1004-1010.
28. Galluzzi L, Vitale I, Abrams JM, et al. Molecular definitions of cell death subroutines: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2012. *Cell Death Differ*. 2012;19:107-120.
29. Yamashima T, Kohda Y, Tsuchiya K, et al. Inhibition of ischaemic hippocampal neuronal death in primates with cathepsin B inhibitor CA-074: a novel strategy for neuroprotection based on 'calpain-cathepsin hypothesis'. *Eur J Neurosci*. 1998;10:1723-1733.
30. Vanden Berghe T, Vanlangenakker N, Parthoens E, et al. Necroptosis, necrosis and secondary necrosis converge on similar cellular disintegration features. *Cell Death Differ*. 2010;17:922-930.
31. Kepp O, Galluzzi L, Lipinski M, Yuan J, Kroemer G. Cell death assays for drug discovery. *Nat Rev Drug Discov*. 2011;10:221-237.
32. Baudot AD, Jeandel PY, Mouska X, et al. The tyrosine kinase Syk regulates the survival of chronic lymphocytic leukemia B cells through PKCdelta and proteasome-dependent regulation of Mcl-1 expression. *Oncogene*. 2009;28:3261-3273.
33. Vandenabeele P, Galluzzi L, Vanden Berghe T, Kroemer G. Molecular mechanisms of necroptosis: an ordered cellular explosion. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2010;11:700-714.
34. Degterev A, Hitomi J, Gemscheid M, et al. Identification of RIP1 kinase as a specific cellular target of necrostatins. *Nat Chem Biol*. 2008;4:313-321.
35. Smirnova E, Griparic L, Shurland DL, van der Bliek AM. Dynamin-related protein Drp1 is required for mitochondrial division in mammalian cells. *Mol Biol Cell*. 2001;12:2245-2256.
36. Westermann B. Mitochondrial fusion and fission in cell life and death. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2010;11:872-884.
37. Bras M, Yuste VJ, Roue G, et al. Drp1 mediates caspase-independent type III cell death in normal and leukemic cells. *Mol Cell Biol*. 2007;27:7073-7088.
38. Knott AB, Perkins G, Schwarzenbacher R, Bossy-Wetzel E. Mitochondrial fragmentation in neurodegeneration. *Nat Rev Neurosci*. 2008;9:505-518.
39. Wang Z, Jiang H, Chen S, Du F, Wang X. The mitochondrial phosphatase PGAM5 functions at the convergence point of multiple necrotic death pathways. *Cell*. 2012;148:228-243.
40. Chang CR, Blackstone C. Cyclic AMP-dependent protein kinase phosphorylation of

- Drp1 regulates its GTPase activity and mitochondrial morphology. *J Biol Chem.* 2007;282:21583-21587.
41. Cribbs JT, Strack S. Reversible phosphorylation of Drp1 by cyclic AMP-dependent protein kinase and calcineurin regulates mitochondrial fission and cell death. *EMBO Rep.* 2007;8:939-944.
 42. Brinkmann V. Sphingosine 1-phosphate receptors in health and disease: mechanistic insights from gene deletion studies and reverse pharmacology. *Pharmacol Ther.* 2007;115:84-105.
 43. Neviani P, Santhanam R, Oaks JJ, et al. FTY720, a new alternative for treating blast crisis chronic myelogenous leukemia and Philadelphia chromosome-positive acute lymphocytic leukemia. *J Clin Invest.* 2007;117:2408-2421.
 44. Kirkegaard T, Jaattela M. Lysosomal involvement in cell death and cancer. *Biochim Biophys Acta.* 2009;1793:746-754.
 45. Cesen MH, Pegan K, Spes A, Turk B. Lysosomal pathways to cell death and their therapeutic applications. *Exp Cell Res.* 2012;318:1245-1251.
 46. Ullio C, Casas J, Brunk UT, et al. Sphingosine mediates TNF α -induced lysosomal membrane permeabilization and ensuing programmed cell death in hepatoma cells. *J Lipid Res.* 2012;53:1134-1143.
 47. Christensen DJ, Chen Y, Oddo J, et al. SET oncoprotein overexpression in B-cell chronic lymphocytic leukemia and non-Hodgkin lymphoma: a predictor of aggressive disease and a new treatment target. *Blood.* 2011;118:4150-4158.
 48. Moujalled DM, Cook WD, Okamoto T, et al. TNF can activate RIPK3 and cause programmed necrosis in the absence of RIPK1. *Cell Death Dis.* 2013;4:e465.
 49. Otera H, Mihara K. Molecular mechanisms and physiologic functions of mitochondrial dynamics. *J Biochem.* 2011;149:241-251.
 50. Taguchi N, Ishihara N, Jofuku A, Oka T, Mihara K. Mitotic phosphorylation of dynamin-related GTPase Drp1 participates in mitochondrial fission. *J Biol Chem.* 2007;282:11521-11529.
 51. Ticchioni M, Essafi M, Jeandel PY, et al. Homeostatic chemokines increase survival of B-chronic lymphocytic leukemia cells through inactivation of transcription factor FOXO3a. *Oncogene.* 2007;26:7081-7091.
 52. Pallier C, Scaffidi P, Chopineau-Proust S, et al. Association of chromatin proteins high mobility group box (HMGB) 1 and HMGB2 with mitotic chromosomes. *Mol Biol Cell.* 2003;14:3414-3426.
 53. Koch A, Thiemann M, Grabenbauer M, Yoon Y, McNiven MA, Schrader M. Dynamin-like protein 1 is involved in peroxisomal fission. *J Biol Chem.* 2003;278:8597-8605.

Figure 1

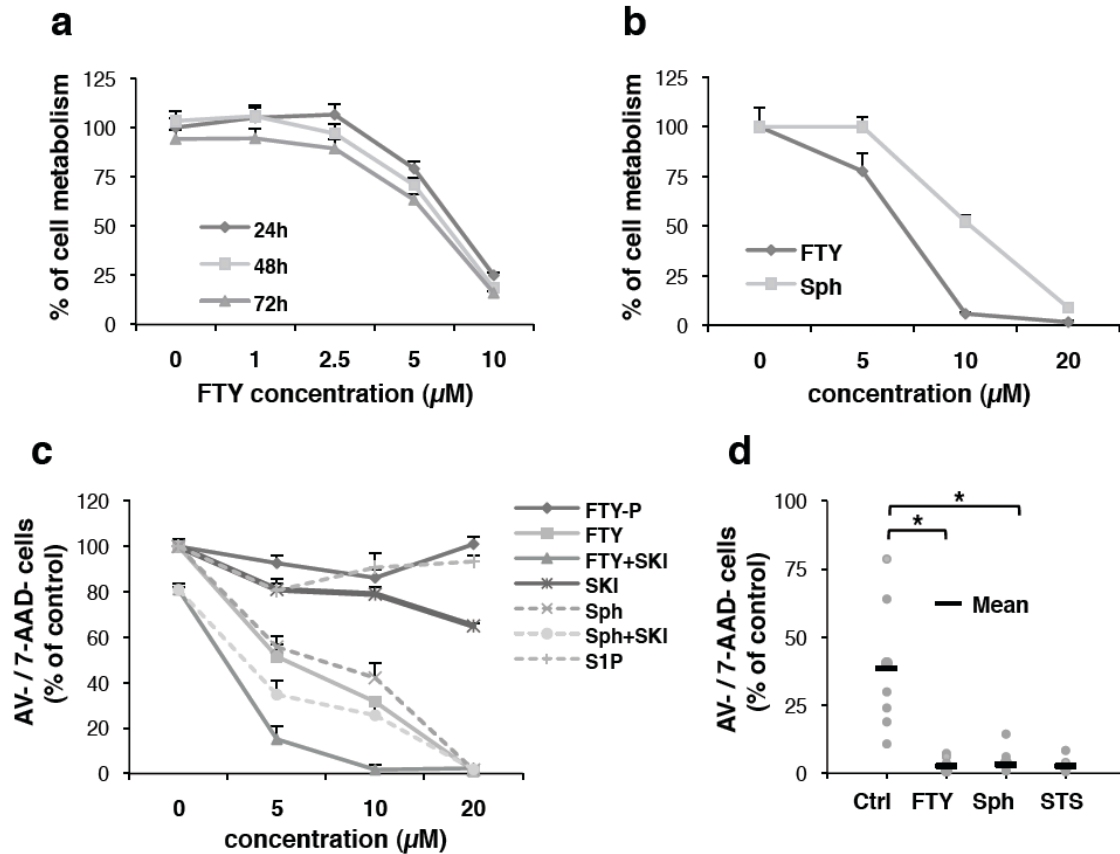


Figure 1 The cytotoxic effects of FTY720 and sphingosine in CLL cells. (a) MEC1 cells were incubated with increasing concentrations of FTY720 (FTY720) during 24, 48 or 72h at 37°C. Cell metabolism was measured by a MTS conversion assay as described in Materials and Methods section. (b) MEC1 cells were treated for 24h at 37°C with FTY720 or sphingosine (Sph) at different concentrations. Cell metabolism was measured as in (a). (c) MEC1 cell were treated for 24 h with increasing amounts of FTY720-P, FTY720, sphingosine kinase inhibitor (SKI), sphingosine-1-P (S1P) or sphingosine in the presence or not of 5μM SKI. Cell viability was assessed with AnnexinV and 7-AAD flow cytometry staining and represented as the percentage of AnnexinV/7-AAD⁺ cells. Data represent the mean $\pm$ s.d from two independent experiments performed in duplicate. (d) Primary leukemic B cells purified from 8 CLL patients were treated with 10μM FTY720, 20μM Sphingosine or 1μM staurosporine (STS) for 24 hours at 37°C. Cell viability was assessed as in (c). Bars indicate the mean of data obtained from the individual patient cell samples. * indicates a statistical significance ($p < 0.01$).

**Figure
2**

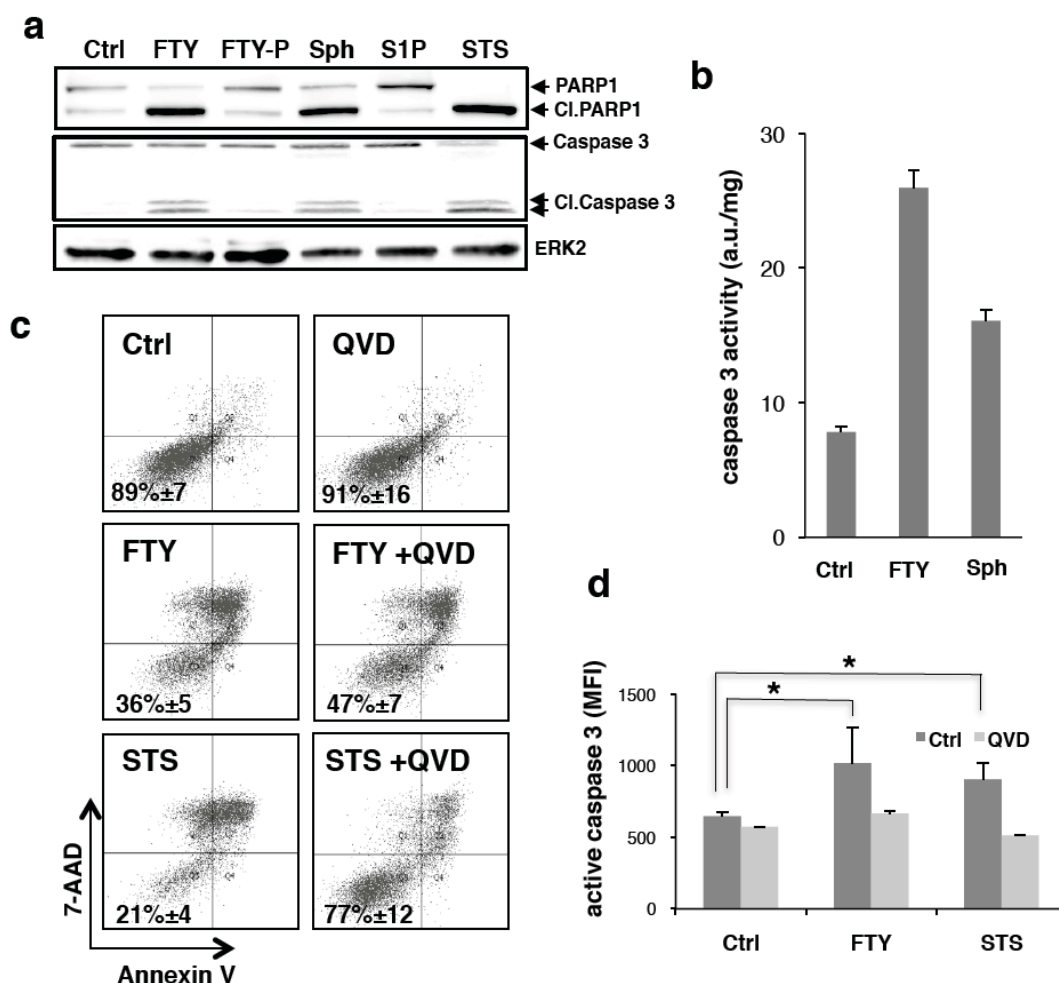


Figure 2 FTY720 induces a caspase-independent cell death in CLL cells. (a) MEC1 cells were treated with 10μM FTY720, 10μM FTY720-P, 20μM Sph, 20μM S1P or 1μM STS for 24 h at 37°C. Cells were lysed and proteins were subjected to immunoblot analysis with anti-PARP1 and anti-caspase 3 using ERK2 antibody as a loading control. (b) MEC1 cells incubated with 10μM FTY720 or 20μM Sph for 24h were lysed in caspase buffer and caspase activity was determined as described in Materials and Methods section. Data are the mean ± s.d of quadruplicate determinations. (c) MEC1 cells were treated with 10μM FTY720 or 1μM STS in the presence or not of 20μM QVD-Oph for 24h at 37°C. Cell viability was assessed by Annexin-V/7-AAD staining. Numbers represent the percentage of AnnexinV⁺/7-AAD⁺ cells expressed as the mean ± s.d of three independent determinations. (d) Cells were treated as in (c) and caspase-3 activity was measured by flow cytometry using anti-active caspase 3-FITC staining. Data represent the mean fluorescence intensity (MFI) of active caspase 3 staining from two independent experiments in duplicates (*, p<0.01).

Figure 3

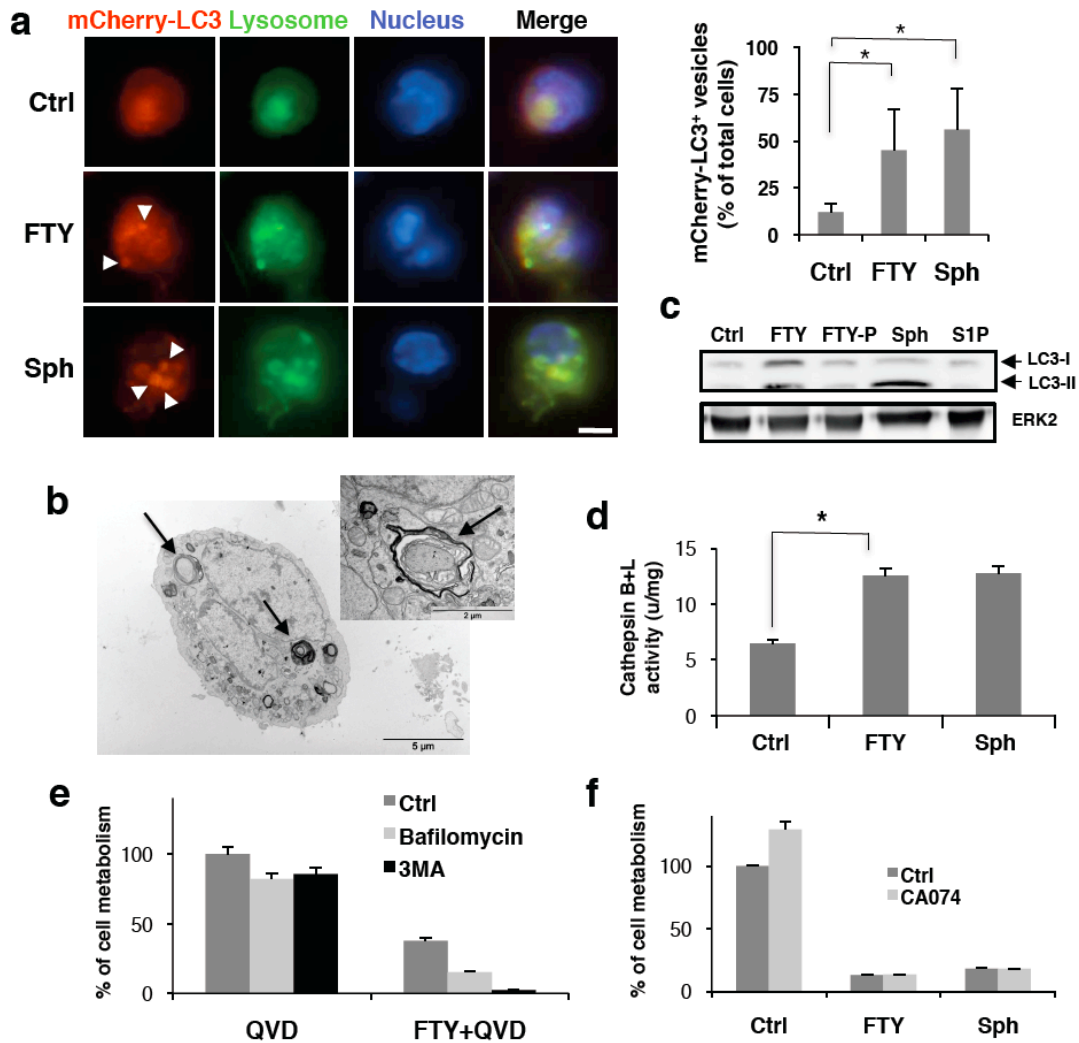


Figure 3 FTY720 leads to autophagolysosome formation and cathepsin activation in CLL cells. (a) MEC1 cells stably transfected with mCherry-LC3 were treated with 10 μ M FTY720 or 20 μ M Sph. After 24h at 37°C, nuclei and lysosomes were respectively stained with DAPI and LysoTracker Green for 30 min at 37°C. Cells were then analyzed under a fluorescence microscope. Arrowheads show representative accumulations of mCherry-LC3 in intracytoplasmic vesicles stained by the LysoTracker dye (left panels). Histograms represent the percentage of cells with mCherry-LC3 positive vesicles counted from >200 cells. Data are expressed as the mean $\pm$ s.d of two independent determinations (*,

$p < 0.001$). Scale bar = $5\mu\text{m}$. (b) MEC1 cells were treated during 24 hours with $10\mu\text{M}$ FTY720, $10\mu\text{M}$ FTY720-P, $20\mu\text{M}$ Sph or $20\mu\text{M}$ S1P. Cell lysates were analysed by immunoblot with anti-LC3 antibody. ERK2 was used as a loading control. (c) Transmission electron microscopy analysis was performed on MEC1 cells treated with $10\mu\text{M}$ FTY720 for 24 hours at 37°C . Micrographs depict large autophagic vacuoles with typical double membrane containing digested materials (arrow). (d) MEC1 cells incubated with $10\mu\text{M}$ FTY720 or $20\mu\text{M}$ Sph for 24h were lysed and cathepsin B and L activity was determined as described in Materials and Methods section. Data are the mean $\pm$ s.d of quadruplicate determinations. (e) Cells were treated with $1\mu\text{M}$ of the cathepsin inhibitor CA074 for 1h at 37°C prior treatment with $10\mu\text{M}$ FTY720 or $20\mu\text{M}$ Sphingosine 24 hours. Cell metabolism was measured by a MTS conversion assay. Data are the mean $\pm$ s.d from two independent experiments performed in triplicates. (f) Cells were incubated with 25nM Bafilomycin or 2.5mM 3-methyladenine (3MA) in the presence of $20\mu\text{M}$ QVD-Oph 1h at 37°C . $10\mu\text{M}$ FTY720 or control vehicle was then added for 24h. Cell metabolism was measured as in (e). Histograms show mean $\pm$ s.d from two independent experiments.

Figure 4

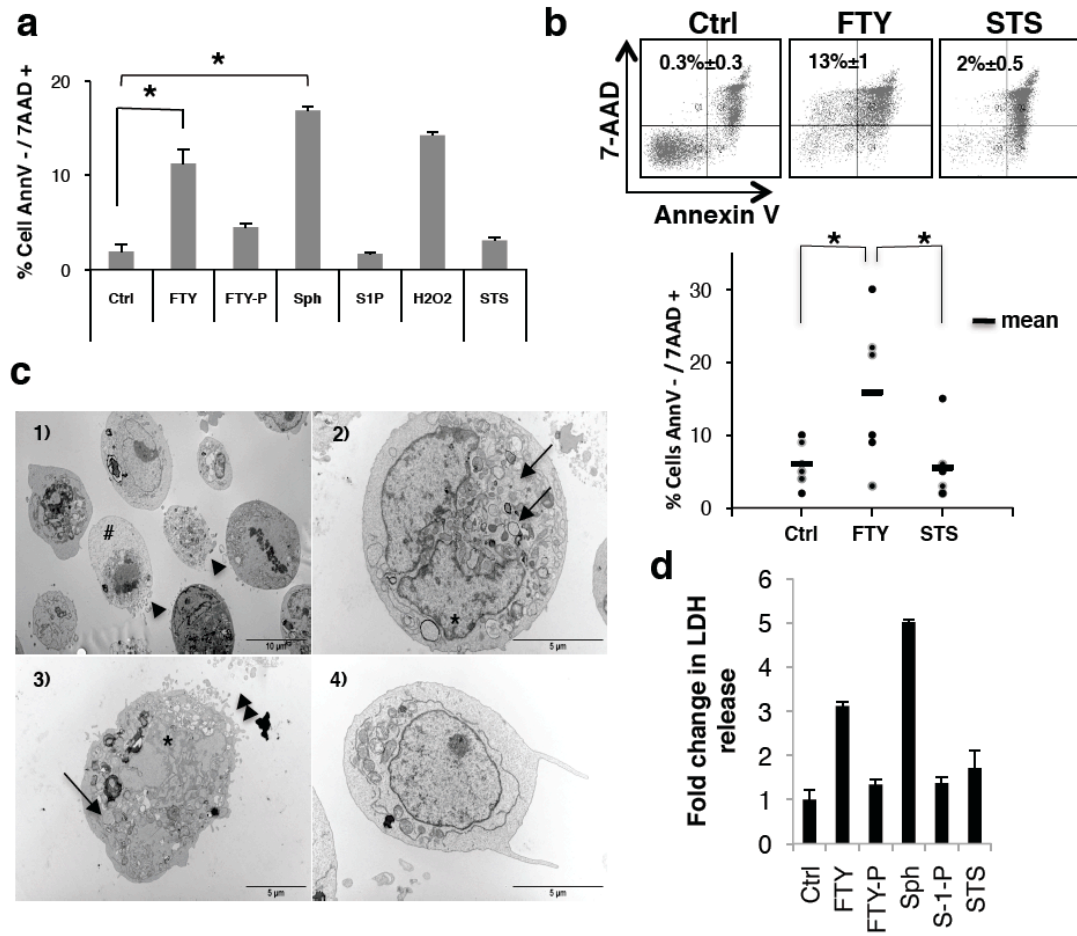


Figure 4 FTY720 and Sphingosine induce necrotic death in MEC1 cells and in primary leukemic cells. (a) MEC1 cells were treated with 10 μ M FTY720, 10 μ M FTY720-P, 20 μ M Sph, 20 μ M SIP, or 1mM H₂O₂ in the presence of 20 μ M QVD-Oph, and with 1 μ M STS in the absence of QVD-Oph overnight at 37°C. Cell necrosis was assessed by AnnexinV and 7-AAD staining and represented as the percentage of AnnexinV/7-AAD⁺ cells. Histograms show the mean $\pm$ s.d of 3 independently performed experiments (*, $p < 0.01$). (b) MEC1 cells were incubated with 10 μ M FTY720 (1, 2), 20 μ M Sph (3), or control vehicle (4) in the presence of 20 μ M QVD-Oph for 16h at 37°C. Cells were then analyzed by electron microscopy analysis and representative images are shown. Ultrastructural features of necrosis include increased cell volume (oncosis), organelles swelling and loss of mitochondrial ultrastructure (arrows), condensation of chromatin into small irregular patches (*), disruption of the plasma cell membrane (arrowhead) and translucent cytoplasm (#). (c) Primary leukemic cells purified from CLL patients were treated during 24 hours with 10 μ M FTY720 in the presence of QVD-Oph or with 1 μ M STS in the absence of QVD-Oph. The percentage of necrotic cells in each conditions was examined by AnnexinV/7-AAD staining (% of AnnexinV/7-AAD⁺ cells). Upper panels show a FACS analysis from one patient sample. Numbers represent the averaged percentage of AnnexinV/7-AAD⁺ cells $\pm$ s.d of 2 independent determinations. Lower histograms display the results obtained from 6 CLL patient samples analyzed in duplicates. Differences are statistically significant (*, $p = 0.03$). (d) MEC1 cells were treated as described in (a). LDH release in the cell culture supernatants was determined as described in the Materials and Methods section. Data are shown as the fold change over control vehicle-treated cells $\pm$ s.d of triplicate determinations.

Figure 5

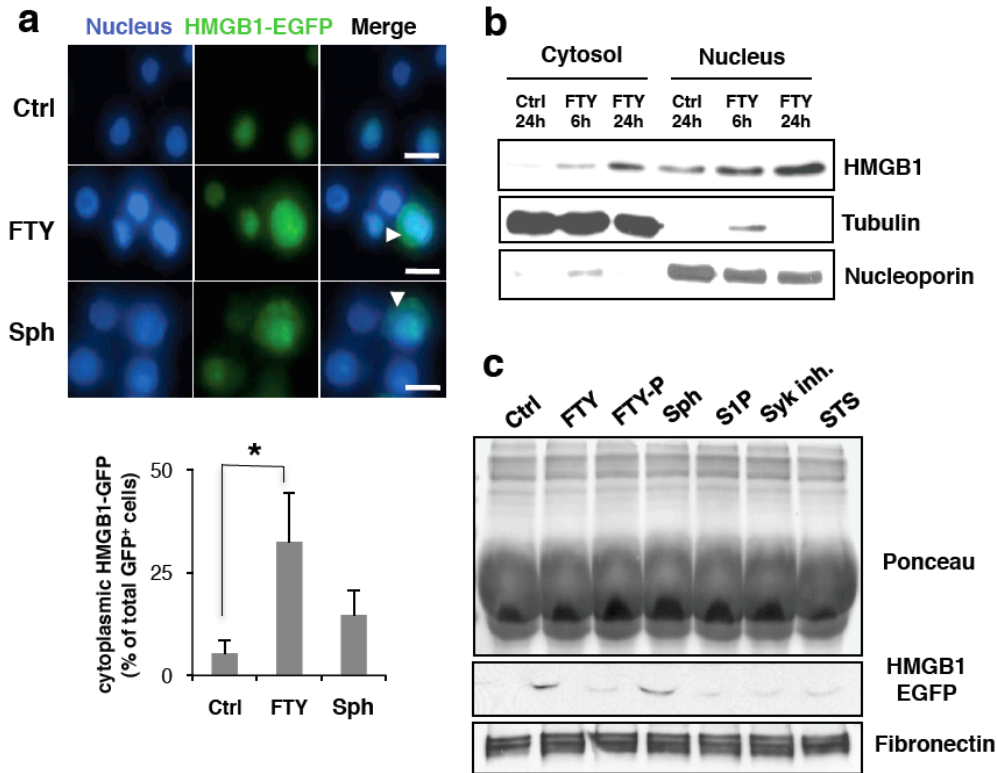


Figure 5 FTY720 promotes HMGB1 release from CLL cells. (a) MEC1 cells stably transfected with HMGB1-EGFP were treated with 10 μ M FTY720 or 20 μ M Sph for 16h at 37°C. After nucleus staining with DAPI, cells were analyzed with a fluorescence microscope. Arrowheads show representative accumulation of HMGB1-EGFP in the cytoplasm (upper panels). Lower histograms represent the percentage of cells with cytoplasmic HMGB1-EGFP counted from >200 cells. Data are expressed as the mean $\pm$ s.d of two independent determinations (*, $p < 0.01$). Scale bar = 10 μ m. (b) MEC1 cells were treated either with DMSO (Ctrl) for 24h or with 10 μ M FTY720 for 6h and 24h at 37°C. Cell extracts were then fractionated and same amounts of nuclear and cytoplasmic protein extracts were immunoblotted with antibodies against HMGB1, tubulin and nucleoporin. (c) HMGB1-EGFP transfected MEC1 cells were treated with DMSO (Ctrl), 10 μ M FTY720 or FTY720-P, 20 μ M Sph or S1P, 5 μ M BAY61-3606 (Syk inh.) or 1 μ M STS for 24 h at 37°C. Cell culture supernatants were collected and equal amounts of extracellular proteins from each conditions were resolved on SDS-PAGE and transferred to nitrocellulose membranes. Following staining with Ponceau solution, membranes were immunoblotted with antibodies against EGFP and fibronectin.

Figure 6

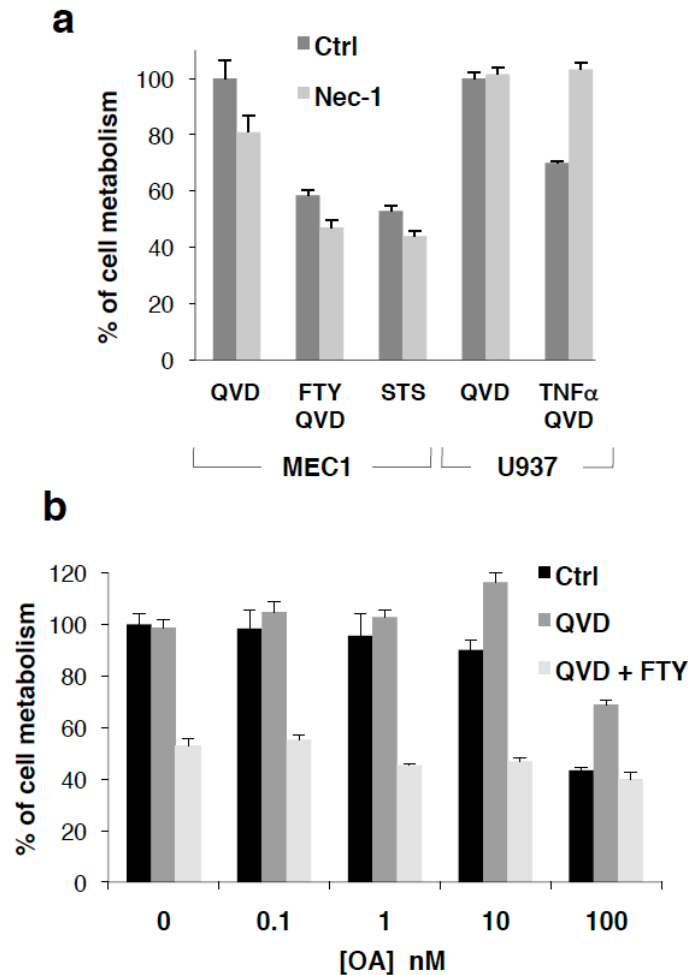


Figure 6 FTY720 causes cell death independently of RIPK1 and PP2A in MEC1 cells. (a) MEC1 and U937 cells were incubated with 20 μ M necrostatin-1 (Nec-1) for 1h at 37°C. MEC1 cells were then left untreated or treated with 10 μ M FTY720 with and 20 μ M QVD-Oph or 1 μ M STS, whereas U937 were untreated or treated with 10ng/ml TNF α for 48h at 37°C. Cell metabolism was measured by a MTS conversion assay. Data represent the mean $\pm$ s.d of three independent determinations. (b) MEC1 cells were treated with the indicated doses of okadaic acid (OA) in the presence or not of 20 μ M QVD-Oph. Cells were then either left untreated or treated with 10 μ M FTY720 for 24h and cell metabolism was determined as in (a).

**Figure
7**

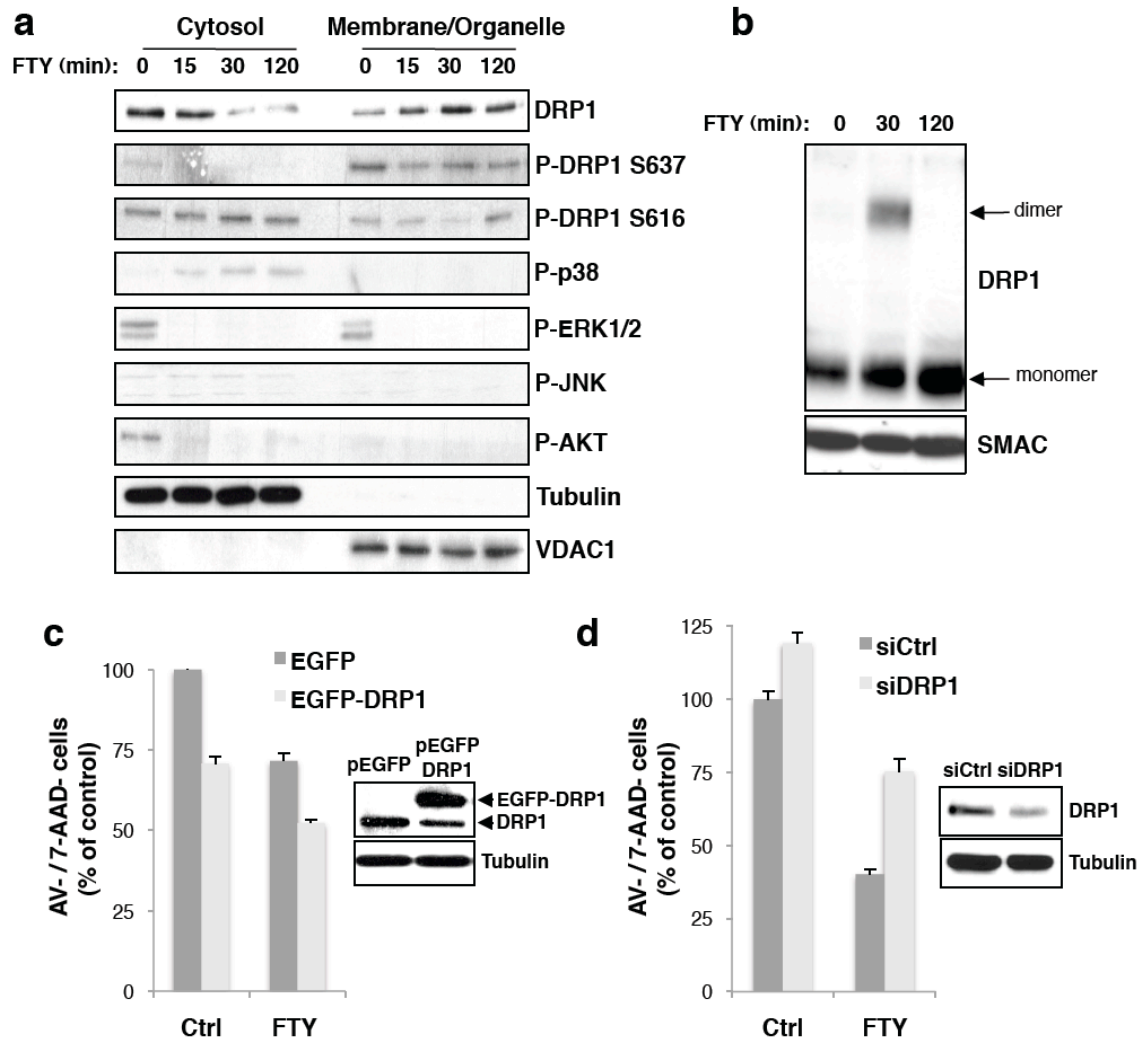


Figure 7 CLL cell necrosis induced by FTY720 is DRP1-dependent. (a) MEC1 cells were treated during 0, 15, 30 and 120 min with 10 μ M FTY720. Cell extracts were fractionated and same amounts of membrane/organelle and cytoplasmic protein extracts were immunoblotted with antibodies against total DRP1, tubulin and VDAC-1 or phosphorylated forms of DRP1, p38, ERK1/2, JNK, and AKT. (b) Membrane/organelle protein extracts were prepared from MEC1 cells treated with 10 μ M of FTY720 for the indicated times at 37°C. Equal amounts of proteins were separated by SDS-PAGE under non reducing conditions and immunoblotted with antibodies against DRP1 and the mitochondrial protein SMAC as loading control. (c) MEC1 cells were transfected with plasmids encoding EGFP or EGFP-DRP1 overnight at 37°C. Cells were then incubated with or without 10 μ M FTY720 in the presence of 20 μ M QVD. Cell viability was assessed by Annexin-V/7-AAD staining. Histograms represent the mean $\pm$ s.d from 2 independent experiments. Control immunoblots (right panels) show the expression of EGFP-DRP1 in transfected cells. (d) MEC1 cells were transfected with luciferase siRNA (siCtrl) and DRP1 siRNA (siDRP1) overnight at 37°C. Cells were then treated with 10 μ M FTY720 in the presence of QVD for 24h and cell viability was analyzed as in (c). Data are mean $\pm$ s.d from 2 independent experiments (*, $p < 0.01$). Lysates from transfected cells MEC1 were immunoblotted with DRP1 and tubulin antibodies (right panels).

Figure 8

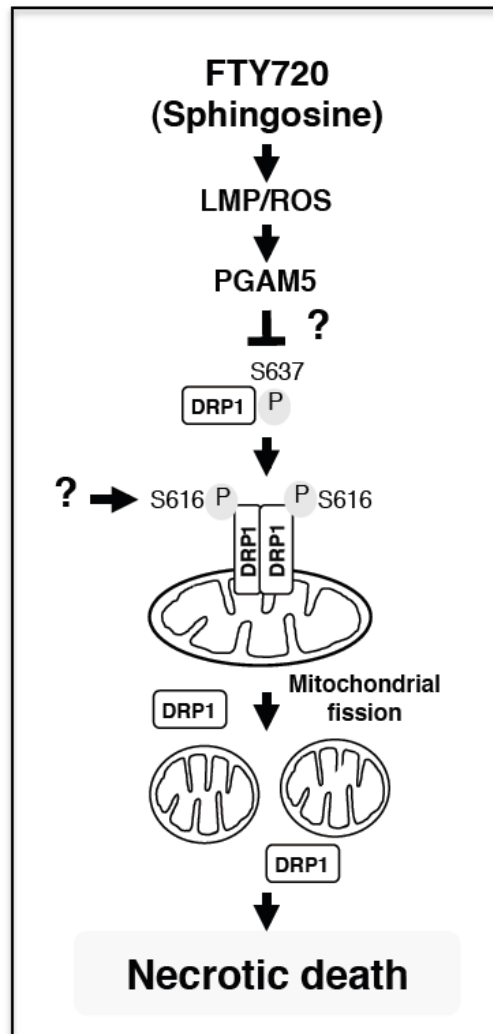
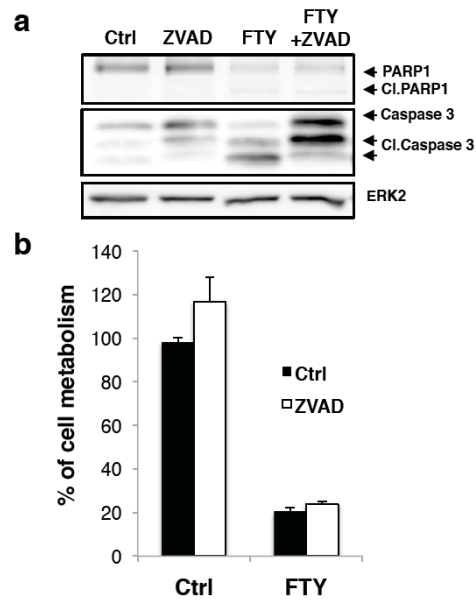
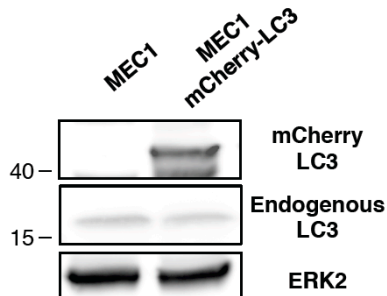


Figure 8 Model of DRP1-dependent necrotic cell death induced by FTY720 and sphingosine in CLL cells. LMP: lysosomal membrane permeabilization; ROS: reactive oxygen species; PGAM5: phosphoglycerate mutase family member 5.

Supplementary Figure S1



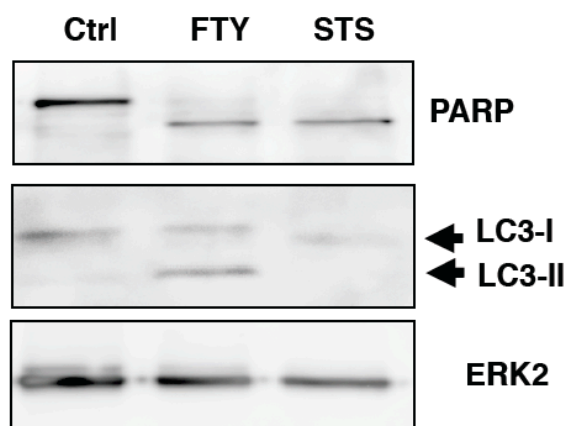
Supplementary Figure S2



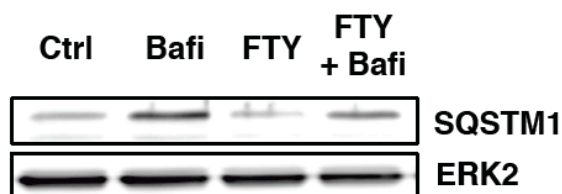
Supplementary Figure S1 The pan-caspase inhibitor ZVAD-fmk does not block FTY720-induced CLL cell death. (a) MEC1 cells were treated with 10 μ M FTY in the presence or not of ZVAD-fmk (50 μ M) for 24 h at 37°C. Cell lysates were then immunoblotted with anti-PARP1 and anti-caspase 3 using ERK2 antibody as a loading control. (b) Cells were treated as in (a) and cell metabolism was assessed by a MTS conversion assay as described in Materials and Methods section. Data represent the mean $\pm$ s.d of two independent determinations.

Supplementary Figure S2 Stable expression of LC3-mCherry in MEC1 cells. Cells were transfected with mCherry-LC3 plasmid and sorted by FACS for mCherry expression. Lysates from mCherry⁺ MEC1 cells and from untransfected MEC1 cells were blotted with antibodies against LC3 and mCherry with anti-ERK2 as loading control.

Supplementary Figure S3



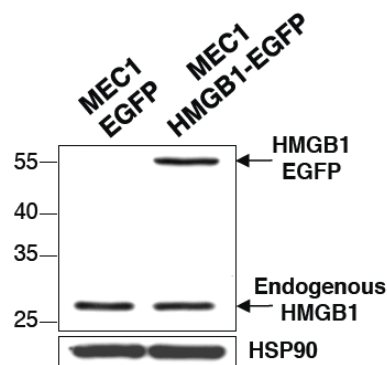
Supplementary Figure S4



Supplementary Figure S3 FTY720 leads to LC3 conversion in primary leukemic CLL cells. CLL cells were treated with 10 μ M FTY or 1 μ M STS for 24 hours at 37°C. Cell lysates were analyzed by immunoblot with antibodies against LC3 and PARP. Anti-ERK2 was used as a loading control.

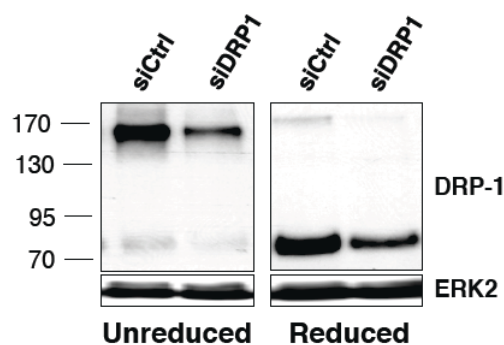
Supplementary Figure S4 Effect of FTY720 on autophagic flux in MEC1 cells. Cells were treated with 10 μ M FTY720 in the presence or not of 10nM bafilomycin (Bafi) for 24h at 37°C. Cells were lysed and equal amount of proteins were separated by SDS-PAGE and immunoblotted with antibodies against p62 SQSTM and ERK2 as a loading control.

Supplementary Figure S5



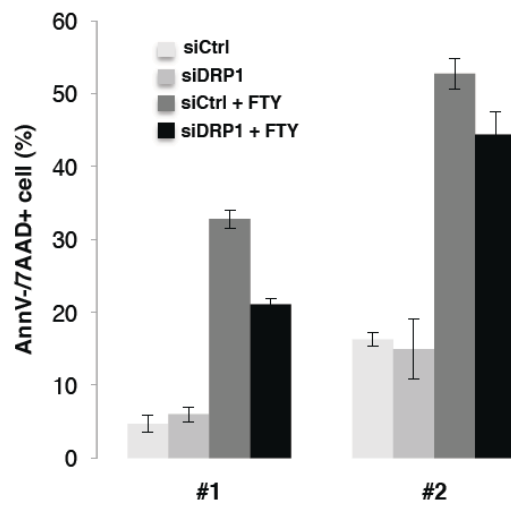
Supplementary Figure S5 Stable expression of HMGB1-EGFP in MEC1 cells. Cells were transfected with HMGB1-EGFP or EGFP plasmids. After 2 weeks of selection in geneticin-containing culture media, cells were sorted by flow cytometry for EGFP expression. Lysates from MEC1 cells stably expressing HMGB1-EGFP and EGFP were blotted with anti-HMGB1 and HSP90 as loading control.

Supplementary Figure S6



Supplementary Figure S6 Effect of siRNA-mediated knockdown of DRP1 on dimer formation. MEC-1 cells were transfected with control siRNA (siCtrl) or DRP1 siRNA (siDRP1) for 48 h. Whole cell extracts were separated by SDS-PAGE under unreduced or reduced conditions and immunoblotted with antibodies against DRP1 and ERK2.

Supplementary Figure S7



Supplementary Figure S7 DRP1 knockdown reduces FTY720-induced necrotic death in primary CLL cells. Purified CLL cells were nucleofected with luciferase siRNA (siCtrl) and DRP1 siRNA (siDRP1) overnight at 37°C. Cells were treated with 10 μ M FTY in the presence of QVD for 24h and cell necrosis was assessed by AnnexinV/7-AAD staining. Data show the percentage of AnnexinV/7-AAD⁺ necrotic cells. Histograms represent the mean $\pm$ s.d from 2 independent determinations.

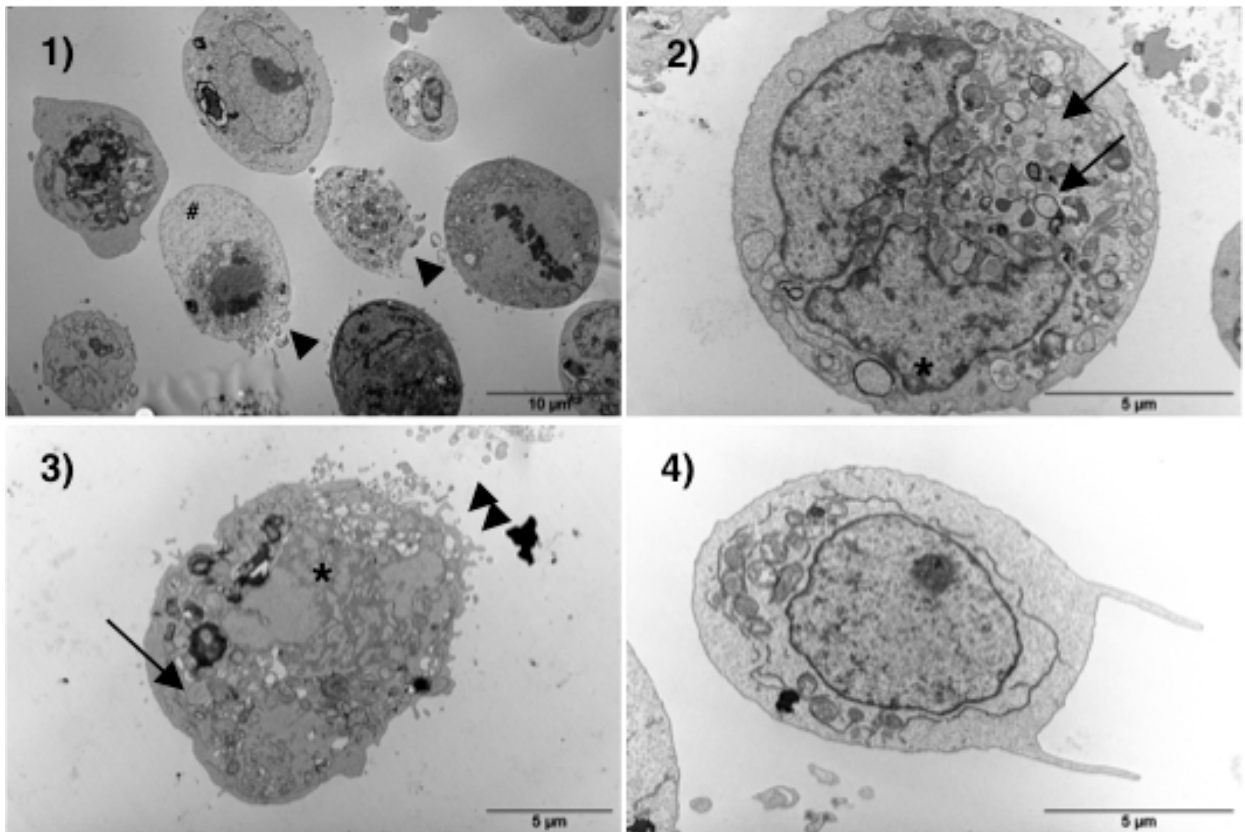


Figure 4c (agrandissement)

L'observation en microscopie électronique de cellules MEC1 traité avec 10μM FTY720 a1 et 2) ou 20μM de sphingosine (3) pendant 24 heures montre des stigmates caractéristiques d'une nécrose cellulaire: cytoplasme translucide (#), gonflement des organelles cytoplasmiques (flèches), condensation de la chromatine en amas irréguliers (*), gonflement cellulaire (oncosis) et rupture de la membrane plasmique (tête de flèche). Morphologie normale d'une cellule MEC1 (4)

Discussion

I. Etude clinique des neuropathies périphériques associées à une gammapathie monoclonale IgM à activité anti-MAG

La neuropathie périphérique associée à une gammapathie monoclonale IgM à activité anti MAG (PN-MAG) est associée à une MGUS IgM (plus de 70% des cas) ou à un syndrome lymphoprolifératif de type lymphome(19). Le diagnostic de ces neuropathies repose sur une clinique compatible, une démyélinisation à prédominance distale sur l'ENMG et la détection d'anticorps anti-MAG. Le diagnostic a récemment été facilité par le développement de kits ELISA commerciaux dédiés à la détection des anticorps anti-MAG.

Les patients sont le plus souvent âgés, en moyenne 64 ans (20,21). La neuropathie s'exprime par des paresthésies, une ataxie proprioceptive et un tremblement d'attitude. Le handicap est modéré. On estime que 16% des patients marcheront avec une canne après 5 ans d'évolution, 24% après 10 ans et 50% après 15 ans(27). Cependant, la neuropathie est parfois sévère et nécessite alors un traitement spécifique. Environ 1/3 des patients suivis dans le service ont nécessité un traitement étiologique de leur neuropathie.

La présence d'une démyélinisation sur l'ENMG et sur les biopsies de nerf fait volontiers classer cette neuropathie dans les neuropathies dysimmunitaires. Cependant, à la différence des PIDC, ni les corticoïdes, ni les immunoglobulines intraveineuses, ni les échanges plasmiques n'ont jamais démontré leur efficacité dans les PN-MAG(28). La maladie est secondaire aux dépôts d'IgM anti MAG sur les nerfs périphériques. Le traitement est celui du syndrome lymphoprolifératif sous jacent afin de diminuer la production d'IgM anti-MAG. Les chimiothérapies classiques (cyclophosphamide, melphalan, chlorambucil, azathioprine,

fludarabine, cladribine) ne semble pas efficaces en monothérapie ou ont un mauvais rapport efficacité/effet secondaire(27,28). Depuis 2003, plusieurs études non contrôlées ont montré un effet prometteur du rituximab avec une amélioration clinique pour la moitié des patients (39). Cependant deux études randomisées contre placebo n'ont pas totalement démontré l'efficacité du rituximab dans les PN-MAG (34,35).

Dans la partie résultat de cette thèse nous rapportons notre expérience sur 6 patients PN-MAG évalué 9 mois après un traitement par rituximab(32). Nous avons récemment repris les données cliniques et paracliniques de 10 patients traités par 4 perfusions hebdomadaires de rituximab à plus long terme (non publié). L'incapacité (score ONLS) est améliorée chez 4/10 patients 1 an après le traitement et chez 6/9 patients 2 ans après le traitement par rituximab sans autre traitement spécifique. Chez ces patients, le taux d'anticorps anti-MAG n'est pas significativement diminué après le traitement et le taux de la gammapathie monoclonale n'est significativement diminué que deux ans après le traitement par rituximab (3,4g/l avant traitement vs 1,9g/l à deux ans, $p < 0,05$). Un patient présentait un tremblement d'attitude majeur non modifié par les traitements symptomatiques ou immunosuppresseurs et n'a été amélioré que par une stimulation cérébrale profonde bilatérale du noyau ventral intermédiaire du thalamus(125). Ainsi, même si le rituximab est clairement efficace chez certains patients, son action est lente et nécessite 6 à 24 mois pour être objectivable.

Il subsiste de nombreuses questions dans l'utilisation du rituximab dans les PN-MAG. Ce traitement est le plus souvent réservé aux formes sévères et évolutives de la maladie. Vu la bonne tolérance du rituximab on pourrait imaginer traiter les patients avant que la maladie ne devienne invalidante. La principale difficulté serait d'évaluer cette pratique : la maladie évoluant lentement, il faudrait suivre les patients traités et non traités pendant des années avant de pouvoir juger d'un éventuel effet bénéfique d'un traitement préventif. Il existe également un risque infectieux et allergique qui limite l'utilisation du rituximab chez des patients peu handicapés dans leur vie quotidienne. Une autre possibilité serait d'associer le rituximab à d'autres chimiothérapies dans les formes sévères de la maladie mais avec un risque de toxicité accru. L'association de rituximab et de fludarabine pendant 6 mois a été rapportée comme peu toxique et efficace chez 4/5 patients à la fois sur le taux d'anticorps anti-MAG et sur les déficits cliniques.

Il est également souhaitable de développer de nouvelles molécules dans le traitement des PN-MAG. C'est dans cette optique que nous avons décidé d'étudier l'action du FTY720 dans un modèle d'hémopathie B. Le FTY720 présentait plusieurs avantages : une forme orale, une efficacité démontrée dans une maladie auto-immune du système nerveux, des résultats

prometteurs in-vitro et dans des modèles animaux d'hémopathies et un mécanisme d'action original.

II. Le FTY720 induit une nécrose cellulaire programmée dépendante de DRP1 dans la leucémie lymphoïde chronique

II.1 L'action cytotoxique du FTY720 est indépendante des récepteurs au S1P

Le fingolimod ou FTY720 est utilisé comme immunosuppresseur dans la Sclérose en Plaques(104,107,126). Son action immunosuppressive est médiée par la forme phosphorylée du FTY720 qui se lie au récepteur de la sphingosine-1-phosphate (S1P) ou S1PR(109) et les inactivent en provoquant leur internalisation. L'interaction entre FTY720 phosphorylé et le S1PR des lymphocytes va entraîner une séquestration des lymphocytes T naïfs et centraux-mémoire dans les organes lymphoïdes secondaires et diminuer la synthèse d'interleukine 17. L'interaction entre FTY720 phosphorylé et S1PR joue également un rôle dans la restauration de la barrière hémato-méningée et dans la remyélinisation médiée par les oligodendrocytes(102).

En revanche l'effet cytotoxique du FTY720 n'est pas médié par l'interaction de sa forme phosphorylée sur les S1PR. Le FTY-phosphate n'a pas d'effet cytotoxique sur les cellules MEC1. Il n'entraîne pas de clivage de caspase3 (Fig 2a), il n'augmente pas le flux autophagique, ils n'augmente pas la libération de LDH et n'induit pas de perméabilisation des membranes plasmiques. Les sphingosine kinases phosphorylent le FTY720 en FTY-phosphate. Les inhibiteurs des sphingosine kinases (SKI) empêchent la synthèse de FTY-phosphate et augmentent la cytotoxicité du FTY720. L'absence de cytotoxicité induite par le FTY-phosphate a déjà été décrite dans un modèle de leucémie lymphoïde chronique(113), de leucémie myéloïde chronique et de leucémie lymphoïde aiguë(114), de cancer de la prostate(117), et dans les cancers du poumon(121). Seules deux publications rapportent une action anti-tumorale du FTY-phosphate par son action anti-néo-angiogénèse tumorale secondaire à l'inhibition de l'autotaxine(122) et des S1PR des cellules endothéliales(116).

II. Le FTY720 induit une nécrose cellulaire dans la LLC et dans les cellules MEC1

L'effet anti-tumoral du FTY720 est régulièrement rapporté, mais les mécanismes de sa cytotoxicité restent équivoques. Pour certains, le FTY720 entraîne un phénomène d'apoptose dans des fibroblastes(111) dans des leucémies myéloïdes et lymphoïdes chroniques avec chromosome de Philadelphie (translocation BCR/Abelson)(114), dans des tumeurs hépatiques(120), dans des tumeurs du sein (118) ou de la vessie (119). Nous avons montré que le FTY720 induisait l'expression de marqueurs classiques de l'apoptose dans notre modèle de LLC : clivage de PARP1 et de caspase3, augmentation de l'activité catalytique de caspase3 et exposition de la phosphatidylsérine sur la face externe de la membrane plasmique. Cependant, des inhibiteurs pan caspase, comme le QVD et le ZVAD, n'inhibent pas l'effet cytotoxique du FTY720 sur les cellules MEC1 et sur les cellules primaires de LLC et l'examen de microscopie électronique ne montre pas d'altération morphologique compatible avec une mort cellulaire par apoptose. D'autres études ont montré comme dans notre modèle que le FTY720 induisait une mort cellulaire caspase indépendante dans la LLC(113), dans la leucémie aiguë lymphoïde(112) et dans des tumeurs ovariennes(89). Ces apparentes contradictions font penser que le FTY720 pourrait agir différemment en fonction du type de tumeur étudiée.

Le FTY720 augmente le flux autophagique dans des hémopathies (112) et des tumeurs solides(89). Il accroît la lipidation de LC3 et la formation d'autophagosome dans les cellules MEC1. Le FTY720 induit une autophagie mais il ne provoque pas une mort cellulaire par autophagie(48). En effet, l'inhibition de l'autophagie, n'empêche pas la cytotoxicité du FTY720 et l'accroît même. L'autophagie est un mécanisme de dégradation lysosomale indispensable à l'homéostasie cellulaire. L'autophagie permet une adaptation face à différent stress cellulaire, comprenant les infections, les néoplasies, les processus dégénératifs et les stress oxydatifs. Parfois, le caractère pro-survie de l'autophagie peut être délétère comme dans certaines cellules cancéreuses dont elle favorise la survie et la résistance aux chimiothérapies. L'inhibition de l'autophagie est une voie de recherche pour majorer l'efficacité des chimiothérapies et de la radiothérapie(127).

L'autophagie induite par le FTY720 est un mécanisme de défense cellulaire vis à vis de l'action cytotoxique du FTY720. On pourra mettre en parallèle la phosphorylation précoce de MAPK p38, une kinase impliquée dans la réponse au stress cellulaire, dans les cellules exposées au FTY720.

L'activation des caspases dans les cellules exposées au FTY720 pourrait être le fait des cathepsines libérées par la perméabilisation des membranes lysosomales induite par le FTY720. Les cathepsines sont des cystéine-protéases lysosomales. Une fois libérées dans le cytoplasme, elles activent les voies de l'apoptose en inhibant Bcl2, en favorisant le clivage des caspases et en clivant Bid qui est responsable de la perméabilisation des membranes mitochondriales(128).

Le FTY720 induit une mort cellulaire par nécrose dans les cellules primaires LLC et dans les cellules MEC1. L'analyse en microscopie électronique confirme la morphologie caractéristique de nécrose cellulaire des cellules MEC1 traitées par FTY720 : altérations des mitochondries et des membranes plasmiques, ballonnement cellulaire (oncosis) et condensation de la chromatine en amas irréguliers. La perméabilisation des membranes plasmiques (PMP) et nucléaires est objectivée par le marquage 7AAD en cytométrie de flux, l'augmentation du taux de LDH dans le milieu de culture et la relocalisation d'HMGB1 dans le cytoplasme et dans le milieu extra-cellulaire. L'augmentation des cathepsines est en faveur d'une perméabilisation des membranes lysosomales (LMP). Une nécrose cellulaire induite par le FTY720 a déjà été décrite dans des tumeurs de l'ovaire (89) et des tumeurs pulmonaires(121).

III. Mécanismes de la nécrose cellulaire induite par FTY720

La nécrose cellulaire a longtemps été considérée comme un phénomène non spécifique, incontrôlable et non régulé. On sait aujourd'hui qu'il existe bien des nécroses cellulaires programmées(54,129). La voie de nécrose régulée la mieux connue est celle de du TNFR-1 (récepteur 1 au tumor necrosis factor). La liaison du $TNF\alpha$ à son récepteur TNFR-1 conduit en fonction du type cellulaire et du micro environnement à une survie, une apoptose ou à une nécrose cellulaire. Lorsque la caspase 8 est inactivée, l'interaction du $TNF\alpha$ et de son récepteur entraîne une phosphorylation des receptor interacting protein kinase 1 et 3 (RIPK1 et RIPK3) et une mort cellulaire par nécrose programmée(48).

La nécrose induite par le FTY720 n'est pas inhibée par la nécrostatine, elle est donc indépendante de RPK1. L'activation de RIPK1 est une étape clef de la nécrose cellulaire programmée médiée par des récepteurs membranaires comme le récepteur au $TNF\alpha$ (54). L'absence d'implication de RIPK1 dans la nécrose induite par le FTY720 peut

vraisemblablement s'expliquer par une activation intrinsèque directe des voies de nécrose par le FTY720 et non par une activation extrinsèque via des récepteurs membranaires. RIPK1 n'est pas indispensable à la nécrose cellulaire. Une étude récente a montré que RIPK3 pouvait médier une nécrose induite par le TNF α en l'absence de RIPK1(59). Nous n'avons pas étudié l'influence spécifique de RIPK3 dans notre modèle. Enfin, les cellules primaires LLC n'exprimeraient pas de manière stable le ripoptosome(60), un complexe formé de RIPK1, FADD et caspase 8, responsable d'une nécrose dans des conditions de stress cellulaire(56). Ces différences expliqueraient pourquoi la nécrose induite par le FTY720 est dépendante de RIPK1 dans le cancer du poumon(121) mais pas dans la LLC.

La nécrose cellulaire implique une dégradation active des mitochondries médiée par DRP1 (dynamin related protein 1)(57). Les mitochondries sont des organelles interconnectées. Elles subissent en permanence des changements dynamiques de fusion et fission en fonction des modifications physiologiques ou pathologiques de l'environnement cellulaire. Chez les mammifères, la fusion mitochondriale est sous la dépendance des protéines OPA1 (optic atrophy 1) et mitofusine 1 et 2 tandis que la fission mitochondriale est contrôlée par DRP1(62). Pendant la nécrose cellulaire, DRP1 se relocalise du cytoplasme à la membrane mitochondriale. DRP1 provoque une fragmentation des mitochondries et une altération de la chaîne respiratoire mitochondriale, ce qui dissipe le potentiel membranaire mitochondrial entraîne la génération de reactive oxygen species (ROS) et une déplétion en ATP(63). Le niveau d'expression des ARNm de DRP1 est corrélé à la susceptibilité des lymphocytes B à subir une nécrose programmée(63). L'activité de DRP1 est étroitement contrôlée par ubiquitination, sumoylation et phosphorylation(65).

Le FTY720 induit une activation de DRP1 : dimérisation, relocalisation à la membrane mitochondriale, diminution de la forme inactive phosphorylée en 637, augmentation de la forme activée phosphorylée en 616. La sous- et la sur-expression de DRP1 modifient la cytotoxicité du FTY720 dans les cellules MEC1. La nécrose induite par le FTY20 est donc dépendante de DRP1.

Le FTY720 peut activer DRP1 d'au moins deux manières différentes (figure infra) : via la protéine phosphatase 2A (PP2A) ou via la mitochondrial phosphoglycerate mutase protein phosphatase 5 (PGAM5).

La cytotoxicité du FTY720 est dépendante de la protéine phosphatase 2A (PP2A) dans certains modèles d'hémopathies(113,114,130) et dans des tumeurs pulmonaires (121). I2PP2A/SET est un inhibiteur de PP2A. Dans la LLC, son activité est augmentée et corrélée à la gravité de la maladie(131). Le FTY720 et les céramides activent PP2A en se liant directement à I2PP2A/SET, ce qui augmente l'activité phosphatase de PP2A(121,132). PP2A ainsi activé peut alors déphosphoryler DRP1 sur la sérine 656 ce qui conduit à une fragmentation mitochondriale(70). L'acide okadaïque est un inhibiteur de PP2A, certaines études montrent qu'il inhibe l'effet cytotoxique du FTY720(113,114,121,130). Comme rapporté dans un modèle de tumeur ovarienne(89) et de tumeur hépatique(120), nous n'avons pas retrouvé cet effet de l'acide okadaïque dans les cellules MEC1. Les hypothèses sont que l'acide okadaïque, même s'il inhibe PP2A, peut activer DRP1 en favorisant sa phosphorylation en 616 par la cycline B(72) et que le FTY720 peut activer DRP1 via des voies de signalisation indépendantes de PP2A.

Le FTY720 est un analogue de la sphingosine qui peut être transformé en céramide par les céramide-synthases. La sphingosine et les céramides provoquent une perméabilisation de la membrane lysosomale et la libération des protéases lysosomales (dont cathepsines) dans le cytosol(100) entraînant une génération de ROS (reactive oxygen species). Il a déjà été démontré que le FTY720 induisait une production de ROS dans des tumeurs hépatiques(120) et dans des hémopathies(112,115). Les ROS entraînent un cercle vicieux de dommages cellulaires accompagnés d'altérations mitochondriales et de peroxydation des lipides membranaires(54). Les ROS activent PGAM5 via Keap-1(61) qui est une protéine sensible au variation du potentiel redox cellulaire. PGAM5 est une enzyme clef de la voie intrinsèque de nécrose cellulaire programmée. Elle se lie au nécrosome dans une atmosphère hydrophobe, probablement au site de fission mitochondriale où est localisée DRP1. PGAM5 déphosphoryle DRP1 sur la sérine 637, augmente son activité GTPase et stabilise sa localisation sur la membrane mitochondriale(57).

D'autres mécanismes d'action de FTY720 ont été décrits : activation de PKC δ (120), inhibition de la sphingosine kinase-1(117), de cycline D1 et phosphoAkt(115), inhibition S1P lyase. Enfin, le FTY720 participe au métabolisme des sphingolipides et à la balance S1P/céramide qui régule la survie cellulaire(90).

En résumé, le FTY720 induit une nécrose des cellules LLC dépendante de DRP1, en mimant certains effets de la sphingosine. Il provoque une perméabilisation de la membrane lysosomale, une activation des cathepsines et une production de ROS. Nous spéculons que ces

ROS activent PGAM5 qui déphosphoryle DRP1 et entraînent une fragmentation mitochondriale.

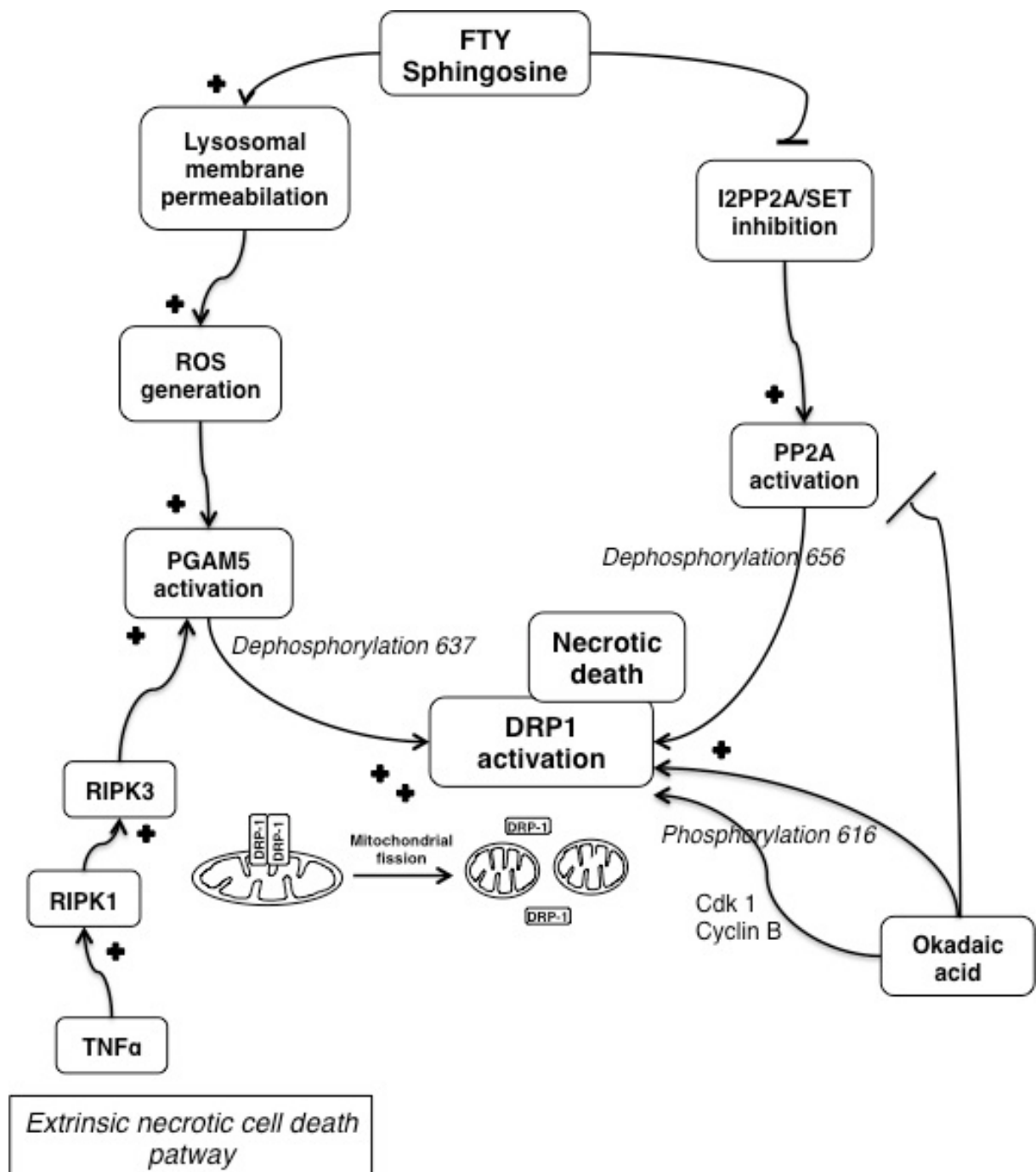


Figure : Mécanismes présumés de l'activation de DRP1 par le FTY720 et la sphingosine

III. Perspectives et développement futur du FTY720

La forme phosphorylée du FTY720 est responsable de son action immunosuppressive dans la Sclérose en Plaques. Elle se lie au récepteur de la sphingosine1phosphate (S1P) pour de très faibles concentrations de l'ordre du nanomolaire (133). La posologie du Gilenya® dans la Sclérose en Plaques est de 0,5mg par jour par voie orale.

L'effet cytotoxique du FTY720 nécessite de plus fortes concentrations de l'ordre de 4 à 13 micromolaires en fonction des tumeurs étudiées(89,113). Cependant ces concentrations semblent atteignables en pratiques cliniques car de fortes doses jusqu'à 10mg/kg/jour de FTY720 ont déjà été administrées à des souris soit par voie orale soit par voie intrapéritonéale avec un effet patent anti-tumoral et sans effet secondaire prohibitif(114,118,121,122,130). De plus, une équipe a récemment synthétisé des liposomes contenant du FTY720, ce qui permet une meilleure biodisponibilité et une élimination plus lente du FTY720(134). Ces liposomes peuvent également intégrer dans leurs membranes des anticorps dirigés contre les tumeurs cibles pour augmenter la spécificité et l'efficacité de cette thérapeutique (exemple : anti CD19 ou anti CD20 dans les hémopathies).

Le FTY720 n'est pas dénué d'effets secondaires. Comme tout immunosuppresseur, il augmente le risque infectieux. Deux patients sont décédés d'infection par herpes viridae au cours de l'étude TRANSFORMS(103). Aucun cas de leucoencéphalopathie multifocale progressive (LEMP) n'a encore été directement lié à cette thérapeutique. Le FTY720 serait donc une alternative au natalizumab en cas de Sclérose en Plaques sévère et de sérologie positive pour le virus JC(105).

La première administration de FTY720 doit être réalisée sous surveillance médicale à cause du risque de bradycardie et de bloc auriculo-ventriculaire de premier degré. Cet effet secondaire est transitoire, il est médié par les récepteurs cardiaques du S1P. A plus long terme, la tension artérielle peut être modérément augmentée(105).

Dans moins de 1% des cas, le FTY720 peut entraîner un œdème maculaire, le plus souvent asymptomatique et régressant à l'arrêt du traitement mais justifiant une surveillance ophtalmologique. Le FTY720 est tératogène chez le rat, ce qui contre indique une grossesse chez les patientes. Les premiers essais notaient une discrète élévation du risque de mélanome(135). Le risque oncogène à long terme n'est pas encore connu et doit être surveillé(136).

L'ensemble de ces effets secondaires pourraient être majorés par l'utilisation de plus fortes doses de FTY720 à visée anti néoplasique.

La plupart des chimiothérapies anti-cancéreuses provoquent une mort apoptotique caspase-dépendante. Les récives tumorales et les résistances aux chimiothérapies sont secondaires à la disparition des voies de signalisation conduisant à l'apoptose dans les cellules tumorales. Le principal facteur de mauvais pronostic dans la leucémie lymphoïde chronique (LLC) est la perte de l'expression de p53, qui rend les cellules tumorales résistantes à l'action de la fludarabine(12). p53 est un facteur de transcription qui active en outre, la protéine BAX qui est responsable d'une perméabilisation de la membrane mitochondriale point clef de l'apoptose(137). Il est donc nécessaire de développer des drogues anti-cancéreuses entraînant une mort cellulaire différente de l'apoptose. Le FTY720 provoque une nécrose cellulaire programmée dans les cellules leucémiques primaires de LLC et dans les cellules MEC1, qui sont des modèles de LLC qui n'expriment pas constitutionnellement p53(138). Le FTY720 pourrait donc être prometteur dans le traitement des hémopathies résistantes aux chimiothérapies conventionnelles(113).

Le FTY720 a un effet cytotoxique dans les hémopathies, mais également un effet immunosuppresseur par séquestration des lymphocytes T. Ces deux propriétés pourraient le faire indiquer dans les manifestations auto-immunes des hémopathies, comme les neuropathies à anticorps anti-MAG. Notre travail sur le FTY720 doit être complété. Il faudrait tester in-vitro l'effet cytotoxique du FTY720 sur des lymphocytes B synthétisant des anticorps anti-MAG, avant d'envisager un éventuel essai clinique dans les PN-MAG.

Conclusions

Le FTY720 ou fingolimod est un analogue d'un sphingolipide, la sphingosine. Il est utilisé comme immunosuppresseur dans la Sclérose en Plaques. L'objectif de ce travail était d'étudier l'effet cytotoxique du FTY720 dans un modèle d'hémopathie B, la leucémie lymphoïde chronique (LLC).

Nous avons montré que le FTY720 augmentait le flux autophagique et qu'il entraînait une mort indépendante des caspases par nécrose cellulaire programmée.

Par rapport aux précédents travaux publiés, nous montrons que dans notre modèle cellulaire, la nécrose induite par le FTY720 est indépendante de RIPK1 mais dépendante de DRP1, protéine responsable de la fission mitochondriale. Notre étude doit être complétée. Il faudrait affiner notre compréhension des mécanismes d'action du FTY720 et déterminer son action dans d'autres hémopathies que la LLC. L'effet cytotoxique du FTY720 sur des lymphocytes B non tumoraux reste à préciser.

Ces résultats illustrent l'implication des sphingolipides dans la régulation de la survie cellulaire et dans les voies de nécrose programmée. Le FTY720 a un mode d'action original différent de l'apoptose induite par les chimiothérapies classiques. Le FTY720 pourrait être une alternative thérapeutique dans les néoplasies B résistantes aux chimiothérapies usuelles et dans certaines manifestations auto-immunes des hémopathies comme les neuropathies périphériques associées à une gammapathie monoclonale IgM à activité anti-MAG.

Annexes

Autres articles publiés cités dans la thèse

I. Anti-CD20 et maladies neuromusculaires : quelles indications et quel usage ?

Pratique Neurologique – FMC 2012;3:111–118

Immunité ; maladies neuromusculaires

Anti-CD20 et maladies neuromusculaires : quelles indications et quel usage ?

*Anti-CD20 and neuromuscular disease:
Indications and use*

Centre de référence maladies neuromusculaires et la SLA, hôpital Archet-1, route Saint-Antoine-de-Ginestière, 06200 Nice cedex 3, France

E. Delmont

Le rituximab (RTX) est un anticorps monoclonal IgG1 chimérique homme/souris, dirigé contre le CD20. Ce cluster de différenciation est exprimé à la surface des cellules B lors de leur maturation du stade pré-B à celui de plasmablaste de différenciation terminale. Il est exprimé par les cellules B mémoire CD27+, mais pas par les plasmocytes responsables de la synthèse des anticorps. Le RTX induit une déplétion en cellules B par trois mécanismes : activation du complément, cytotoxicité cellulaire dépendant des anticorps (ADCC) et induction de l'apoptose.

Les cellules B sont impliquées dans des pathologies tumorales comme les lymphomes mais également dans des maladies auto-immunes. Elles peuvent synthétiser des auto-anticorps et favoriser le développement de maladies auto-immunes par leur rôle de cellules présentatrices de l'antigène aux lymphocytes T CD4+ et par la synthèse de cytokines pro-inflammatoires.

Le RTX a ainsi reçu l'autorisation des autorités de santé pour son utilisation dans le traitement des lymphomes non-Hodgkinien depuis 1997 et plus récemment dans le traitement de la Polyarthrite Rhumatoïde. De nombreuses maladies neuromusculaires ont une origine auto-immune et se caractérisent par la présence d'auto anticorps (antirécepteur à l'acétylcholine, anti-MAG, antisynthétase...). Il y a donc un rationnel à utiliser ce traitement dans ces maladies dysimmunitaires à médiation humorale. Nous reprendrons dans cet article notre expérience et les données

publiées sur l'usage du RTX dans les maladies neuromusculaires.

POLYNEUROPATHIES AVEC ANTICORPS ANTI-MYELIN ASSOCIÉES À GLYCOPROTEIN (PN-MAG)

Les PN-MAG s'expriment le plus souvent par des paresthésies des membres inférieurs, un tremblement de posture et une ataxie proprioceptive. Ces symptômes restent généralement modérés et ne justifient pas d'un traitement intensif. On estime que 24 % des patients seront gênés à dix ans et 50 % à 15 ans (Nobile-Orazio et al., 2000). Cependant, les manifestations cliniques sont source de handicap chez certains patients et il est alors licite de proposer un traitement étiologique. De nombreux schémas thérapeutiques ont été essayés sans avoir jamais montré de réelle efficacité, comprenant corticoïdes, immunoglobulines intraveineuses (IgIV), échanges plasmatiques, melphalan, chlorambucil, cyclophosphamide, azathioprine, fludarabine, cladribine (Lunn et Nobile-Orazio, 2006). Les PN-MAG étant secondaires à une gammapathie monoclonale IgM dirigée contre la MAG des nerfs périphériques, il est licite de tester l'efficacité du RTX dans cette indication. Le RTX a été administré dans plusieurs essais en ouvert à la posologie de quatre perfusions hebdomadaires de 375 mg/m² (Benedetti et al., 2007 ; Delmont et al., 2011 ; Niermeijer et al., 2009 ; Renaud et al., 2003) et dans une

Mots clés

Rituximab
Maladies neuromusculaires
Neuropathie anti-MAG
Neuropathie motrice multifocale
Myasthénie
Myopathie

Keywords

Rituximab
Anti-MAG polyneuropathy
Myasthenia gravis
Multifocal motor neuropathy
Inflammatory myopathy

Adresse e-mail :
delmont.e@chu-nice.fr

étude à double dose, soit quatre perfusions hebdomadaires de 750 mg/m² (Renaud et al., 2006). Ces études ont toutes montré une bonne tolérance au RTX. L'efficacité du RTX était retardée essentiellement visible de six à 12 mois après l'administration du traitement. Les scores sensitifs étaient améliorés chez 50 à 80 % des patients, le testing musculaire chez 60 % des patients et les scores d'incapacité chez 0–54 % des patients. Le taux de l'IgM monoclonale était réduit de 30–74 % et le taux de l'anticorps anti-MAG de 44–87 % (Tableau I).

Une étude randomisée contre placebo a montré une amélioration au huitième mois du score d'incapacité chez quatre des 12 patients traités par RTX contre zéro des 13 patients sous placebo (Dalakas et al., 2009) mais ces

résultats ne sont pas significatifs en intention de traiter. L'étude multicentrique RIMAG randomisée contre placebo (Léger et al., 2011) n'a pas montré d'amélioration significative à 12 mois du score de déficit sensitif, INCAT sensory sumscore (ISS), choisi comme critère principal, mais montrait une amélioration significative de plusieurs critères secondaires : score d'incapacité INCAT, échelles d'autoévaluation, échelles de qualité de vie.

Des cas d'aggravation précoce de la neuropathie avec une augmentation paradoxale et transitoire du taux d'anticorps anti-MAG ont été rapportés (Broglio et Lauria, 2005 ; Gironi et al., 2006 ; Renaud et al., 2003). Cette aggravation s'explique par une libération d'anticorps par des lymphocytes B lysés et par l'altération transitoire de

Tableau I. Résultats des essais publiés sur l'efficacité du rituximab (RTX) dans les polyneuropathies avec anticorps anti-myelin associated glycoprotein (MAG).

	Nombre de patients	Évaluation (mois)	Résultats
Renaud et al., 2003	9	12	Amélioration score sensitif (NDS) 6/9 Réduction taux anti-MAG de 52 % Réduction taux IgM monoclonale de 58 %
Renaud et al., 2006	8	12	Amélioration score sensitif (NDS) 4/8 Réduction taux anti-MAG de 59 % Réduction taux IgM monoclonale de 74 %
Pestronk et al., 2003	7	24	Amélioration force (dynamomètre) Réduction taux anti-MAG
Benedetti et al., 2007	13	12	Amélioration score sensitif (ISS) 8/13 Amélioration score moteur (MRC) 8/13 Amélioration score incapacité (ODSS) 7/13 Réduction taux anti-MAG de 87 % Réduction taux IgM monoclonale de 39 %
Niermeijer et al., 2009	6	12 en moyenne	Amélioration score sensitif 3/6 Amélioration score moteur (MRC) 4/6 Amélioration score incapacité (ODSS) 0/6
Delmont et al., 2011	6	9	Amélioration score sensitif (ISS) 5/6 Amélioration score moteur (MRC) 4/6 Amélioration score incapacité (ONLS) 3/6 Réduction taux anti-MAG de 44 % Réduction taux IgM monoclonale de 31 %
Dalakas et al., 2009	12 RTX 13 placebo	8	Groupe RTX Amélioration score incapacité (ODSS) 4/12 Réduction taux anti-MAG de 50 % Réduction taux IgM monoclonale de 34 % Groupe placebo pas d'amélioration
Léger et al., 2011	26 RTX 28 placebo	12	Pas de modification significative ISS Amélioration score d'incapacité (INCAT) groupe RTX vs groupe placebo ($p = 0,03$)

RTX : rituximab ; NDS : neuropathy disability scale ; ODSS : overall disability sum score ; INCAT : inflammatory neuropathy cause and treatment ; ISS : INCAT sensory sumscore ; ONLS : overall neuropathy limitation scale ; MRC : medical research council.

mécanisme de régulation de l'auto-immunité dont l'augmentation de cellules produisant de l'IL6 (Gironi et al., 2006). Ces phénomènes sont à rapprocher des syndromes de lyse tumorale et de l'augmentation du taux d'IgM qui surviennent dans les trois premiers mois d'un traitement par RTX d'une maladie de Waldenström (Ghobrial et al., 2004).

Une meilleure efficacité du RTX a été obtenue lorsque le déficit sensitif était sévère (Dalakas et al., 2009), que la durée de la maladie était inférieure à dix ans (Niemmeijer et al., 2009) et que le taux d'anti-MAG était soit faible dans une étude (Benedetti et al., 2007) soit élevé dans une autre (Dalakas et al., 2009).

Une amélioration clinique de la PN-MAG n'est visible que chez certains patients et seulement huit à 12 mois après l'administration du RTX. Il faut pour l'instant réserver ce traitement aux patients handicapés dans leur vie quotidienne et dont la neuropathie est évolutive.

NEUROPATHIE MOTRICE MULTIFOCALE AVEC BLOCS DE CONDUCTION (NMMBC)

La plupart des patients atteints de NMMBC s'améliorent sous IgIV, mais un tiers des patients restent dépendants de ce traitement (Delmont et al., 2007). Les corticoïdes et les échanges plasmatiques peuvent, en revanche, aggraver les déficits moteurs. Aucune étude contrôlée n'a démontré l'efficacité d'un traitement immunosuppresseur dans les formes sévères de NMMBC (EFNS/PNS, 2010). Le cyclophosphamide a montré une certaine efficacité dans des séries non contrôlées mais sa toxicité limite sa prescription.

La présence d'anticorps anti-GM1, l'action du sérum de patients dans des modèles expérimentaux et un cas exceptionnel de transmission materno-fœtale (Attarian et al., 2004) suggèrent une implication de l'immunité humorale dans les NMMBC. Le RTX a été prescrit soit en monothérapie, soit associé aux IgIV (Tableau II). Malgré certains échecs (Gorson et al., 2007 ; Rojas-Garcia et al., 2003) dont une étude où l'on peut discuter la faible posologie de RTX utilisée (Chaudhry et Cornblath, 2010), le RTX semble améliorer les déficits moteurs et parfois permettre une diminution de la posologie des IgIV (Michaud et al., 2011 ; Pestronk et al., 2003 ; Rüegg et al., 2004 ; Stieglbauer et al., 2009). Ces résultats restent à confirmer dans de plus larges séries.

POLYRADICULONÉVRITE INFLAMMATOIRE DÉMYÉLINISANTE CHRONIQUE (PIDC)

L'expérience est encore plus limitée dans les PIDC. Benedetti et al. (2011) rapportent une amélioration pour

neuf patients sur 13 présentant soit une PIDC réfractaire à tout traitement soit une forte dépendance aux IgIV ou aux échanges plasmatiques. Il faut noter que sept des neuf patients améliorés présentaient une pathologie hématologique (gammopathie monoclonale, lymphome ou purpura thrombopénique idiopathique).

MYASTHÉNIE AUTO-IMMUNE

Le RTX est régulièrement prescrit dans les cas de myasthénies réfractaires. Elles se définissent par une corticodépendance et/ou une aggravation malgré plusieurs lignes de thérapeutiques conventionnelles (échanges plasmatiques, IgIV, immunosuppresseurs). Plus de 70 patients traités par RTX ont été rapportés dans la littérature (Tableau III).

Nous avons traité 13 myasthénies réfractaires dans le centre de Nice (dix RACH, un MuSK et deux double-séronégatifs). Les patients ont reçu quatre perfusions hebdomadaires de 375 m/m² puis deux perfusions hebdomadaires de 375 m/m² six mois plus tard. Dès le premier mois de traitement, 11 patients étaient déjà améliorés avec une augmentation moyenne de 16 points par patient du *myasthenia muscular score* (MMS) (Burns, 2010). À 12 mois de traitement, 11/13 patients étaient améliorés avec une augmentation moyenne de 22 points par patient du MMS et une diminution de 59 % de la dose de corticoïdes chez neuf des dix patients par rapport à l'évaluation avant le début du RTX.

Dans les cas rapportés dans la littérature, l'amélioration clinique est nette chez 60 à 100 % des patients traités (Tableau III). Cependant, cette amélioration semble moins fréquente pour des protocoles de RTX utilisant de plus faibles doses (Blum et al., 2010 ; Maddison et al., 2011). Le RTX permet le plus souvent de diminuer la posologie des corticoïdes et des autres immunosuppresseurs. Le RTX est généralement prescrit à la posologie de quatre perfusions hebdomadaires de 375 m/m². Le traitement d'entretien est lui très variable en fonction des cas rapportés (Tableau III).

Le RTX semble donc prometteur dans les cas de myasthénie réfractaire. Une amélioration clinique est mesurable dès le premier mois et se prolonge en fonction des cas et des protocoles thérapeutiques utilisés. Il manque encore un essai randomisé et contrôlé dans cette indication. Les résultats d'un essai français prospectif non contrôlé sont en attente (protocole FORCE¹).

¹FORCE. Rituximab for the Treatment of Refractory Inflammatory Myopathies and Refractory Myasthenia Gravis. Clinical trials.gov: NCT00774462. <http://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT00774462>.

Tableau II. Résultats des essais publiés sur l'efficacité du rituximab (RTX) dans les neuropathies motrices multifocales avec blocs de conduction.

	Posologie du RTX	Traitements associés	Nombre de patients	Durée du suivi	Effet mesuré sur la neuropathie	Effet sur le sevrage en IgIV
Stieglbauer et al., 2009	375 mg/m ² 1 fois/semaine pendant 2 semaines	Aucun (arrêt IgIV > 1 mois avant)	3	39 mois	Amélioration du déficit moteur évalué sur le score MRC	Sevrage possible durant le suivi (RTX en monothérapie)
Rüegg et al., 2004	375 mg/m ² , 1 fois/semaine pendant 4 semaines consécutives	IgIV (2 g/kg/cure) depuis 4 ans, toutes les 6 semaines	1	4 ans	Stabilité clinique	Sevrage impossible, mais allongement de l'intercure du traitement par IgIV de 7 à 12 jours
Gorson et al., 2007	375 mg/m ² , 1 fois/semaine pendant 4 semaines consécutives	IgIV depuis 5 ans en moyenne (1-9 ans) toutes les 3 à 12 semaines	2	12 mois	Stabilité du score MRC et du Rankin	Diminution posologie IgIV chez 1 patient (630 vs 1100 g/an) Augmentation posologie IgIV chez 1 patient (2880 vs 2320 g/an)
Rojas-Garcia et al., 2003	375 mg/m ² , 1 fois/semaine pendant 4 semaines consécutives	Aucun (arrêt IgIV > 1 mois avant le RTX)	2	12 mois	Pas de modification score MRC et INCAT	Sevrage possible durant le suivi (RTX en monothérapie) puis reprise des IgIV (dès 3 mois pour 1 des patients)
Pestronk et al., 2003	1 ^{re} ligne : 375 mg/m ² , 1 fois/semaine pendant 4 semaines consécutives 2 ^e ligne : J1-J15 puis 1 fois/10 semaines	Aucun	11	2 ans	Amélioration de la force motrice évaluée par dynamométrie, et diminution du taux d'antigangliosides	Sevrage possible durant le suivi (RTX en monothérapie)
Chaudhry et Cornblath, 2010	1 g 1 fois/semaine pendant 2 semaines	IgIV toutes les 2,9 semaines en moyenne (2-4 semaines)	6	12 mois	Pas de modification significative des scores MRC, grip strength, ONLS et score of the Rotterdam handicap scale	Pas de modification significative de la dose cumulée annuelle d'IgIV
Michaud et al., 2011	1 g à j1 et j15 Puis cures à 375 mg/m ² , 1 fois/semaine pendant 4 semaines consécutives	IgIV (2 g/kg/cure) toutes les 4 semaines	1	37 mois	Amélioration du déficit moteur (score MRC) et de l'incapacité fonctionnelle (score ONLS)	Pas de modification des posologie et fréquence d'administration des IgIV

Tableau III. Résultats des essais publiés sur l'efficacité du rituximab (RTX) dans la myasthénie auto-immune.

		Protocole administration rituximab	Résultats
Illa et al., 2008	RACH 3 MuSK 3	375 mg/m ² × 4 puis 375 mg/m ² /mois durant 2 mois	Suivi de 9–22 mois Amélioration clinique 6/6 à 9 mois Diminution taux RACH et MuSK
Lebrun et al., 2009	RACH 1 MuSK 3 Double neg 2	375 mg/m ² × 4 puis 375 mg/m ² /2 mois	Suivi moyen 18 mois (9–26 mois) Amélioration clinique 6/6 (score MMS) Arrêt CT 5/6 ; diminution dose pyridostigmine 6/6
Stieglbauer et al., 2009	RACH 2 MuSK 1	375 mg/m ² × 2 puis 1 fois la réascension des CD19	Suivi 24–33 mois Amélioration clinique 3/3 (score QMG)
Zebardast et al., 2010	RACH 2 MuSK 4	375 mg/m ² × 4 ou 6 maintenance variable	Amélioration clinique et/ou diminution dose CT et autres immunosuppresseurs
Lindberg et Bokarewa, 2010	RACH 5	375 mg/m ² × 4 puis 1 × 2 g pour 4 patients	Amélioration clinique 5/5 (score QMG)
Nowak et al., 2011	RACH 6 MuSK 8	375 mg/m ² × 4 répété tous les 6 mois	À 12 mois : réduction dose CT de 86 % et taux de RACH de 52 %
Blum et al., 2010	RACH 11 MuSK 3	500 mg/semaine × 2 5 patients retraités 5–23 mois après	Suivi moyen 14 mois (4–47 mois) Amélioration clinique 11/14 Réduction dose CT de 52 %
Maddison et al., 2011	RACH 7	375 mg/m ² × 4 (6 patients) 375 mg/m ² × 1 ou 2 (4 patients)	Suivi 12–48 mois Amélioration clinique 6/10
Notre série	RACH 10 MuSK 1 Double neg 2	375 mg/m ² × 4 puis 375 mg/m ² × 2 à 6 mois	Évaluation à 12 mois Amélioration clinique 11/13 (score MMS) Diminution dose CT 9/10 de 59 %

RACH : récepteur acétyl choline ; MuSK : *muscle specific kinase* ; Double neg : patient négatif pour anti-RACH et anti-MuSK ; CD19 : lymphocytes B exprimant le CD19 ; CT : corticoïdes ; MMS : *myasthenia muscular score* ; QMG : score quantitative myasthenia gravis score.

MYOPATHIES AUTO-IMMUNES

L'utilisation du RTX a essentiellement été rapporté dans la dermatomyosite (Levine, 2005) et dans une dizaine de cas de polymyosite (Mok et al., 2007), de syndrome des anti synthétases (Sem et al., 2009) ou de myosite avec anticorps *antisignal recognition particle* (SRP) (Valiyl et al., 2010). Le traitement est bien toléré et permet dans ces cas de myopathies auto-immunes résistantes aux autres traitements de diminuer les taux de CPK et d'améliorer le testing musculaire. Dans une revue de la littérature, Rios Fernández et al. (2009) rapportent 49 cas de myopathies auto-immunes traitées avec un taux de succès estimé à 72–75 % des cas. Sont en attente les résultats d'une étude randomisée contrôlée contre placebo dans les DM et PM réfractaires

après corticoïdes et au moins un immunosuppresseur (RIM study²) ainsi que ceux d'une étude ouverte non contrôlée dans les myopathies avec anticorps anti-SRP et antisynthétase (FORCE¹).

EFFETS SECONDAIRES ET TOLÉRANCE DU RITUXIMAB

Le principal effet secondaire à court terme est une réaction allergique pouvant aller jusqu'au choc

² RIM study: phase II trial. Rituximab for the treatment of refractory adult and juvenile dermatomyositis (DM) and adult polymyositis (PM) (clinical trials.gov NCT 00106184). <http://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT00106184>.

anaphylactique lors de la première perfusion de RTX. Cette première perfusion doit être réalisée en hospitalisation conventionnelle, les suivantes seront réalisées en hospitalisation de jour si la tolérance est bonne. Les réactions allergiques sont prévenues par l'administration préalable de corticoïdes et d'antihistaminiques. Le RTX est contre indiqué chez les patients atteints d'insuffisance cardiaque et coronarienne non contrôlée.

Le risque infectieux est majoré, comme dans tout traitement immunosuppresseur. Cinquante-sept cas de leucoencéphalopathie multifocale progressive (LEMP) ont été rapportés après traitement par RTX (Tan et Korolnik, 2010) pour un syndrome lymphoprolifératif (incidence < 1/10 000). Dans le traitement des maladies auto-immunes, deux cas de LEMP ont été déclarés dans le traitement d'une maladie lupique, un cas dans le traitement d'une vascularite et un cas dans le traitement d'une polymyosite (données Afssaps). Tous les patients ayant présenté une LEMP après traitement par RTX avaient reçu au préalable de lourds traitements immunosuppresseurs, majorant ainsi le risque d'infection par le virus JC.

Dans le centre de Nice, 43 patients ont reçu du RTX pour une maladie neuromusculaire auto-immune (un CANOMAD, un NMMBC, 10 PN-MAG, 19 myasthénies, six myopathies auto-immunes, six vascularites). Aucun patient n'a présenté de réaction allergique grave empêchant la poursuite du traitement. Les deux complications infectieuses recensées étaient favorisées par une immunosuppression concomitante touchant les lymphocytes T (azathioprine et bolus de corticoïdes).

QUESTIONS EN SUSPENS ET CONCLUSION

La tolérance au RTX est bonne dans les séries publiées. Le RTX est prescrit depuis plus de dix ans dans le

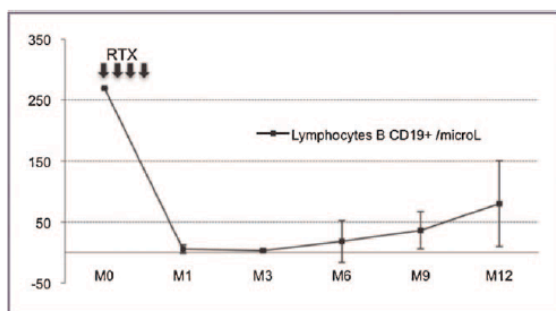


Figure 1. Taux de lymphocytes B exprimant le CD19 mesuré en cytométrie de flux chez sept patients présentant une polyneuropathie à anticorps anti-myéline associée à la glycoprotéine (MAG) ayant reçu quatre perfusions de ituximab (RTX) hebdomadaires de 375 mg/m² à M0.

Points essentiels

- Le RTX est un anticorps monoclonal dirigé contre les lymphocytes B. Son utilisation se développe dans le traitement des maladies neuromusculaires auto-immunes.
- Les essais contrôlés dans les polyneuropathies avec anticorps anti-MAG ont montré une efficacité partielle neuf à 12 mois après administration du RTX. Les résultats semblent plus convaincants dans les myasthénies et dans les myopathies auto-immunes même s'ils doivent être confirmés par des essais contrôlés.
- L'expérience est encore trop limitée pour juger de l'efficacité du RTX dans les polyradiculonévrites inflammatoires démyélinisantes chroniques et dans les neuropathies motrices multifocales.
- La tolérance à court terme du RTX est bonne, elle reste à préciser à long terme.
- Le RTX est prometteur dans le traitement des maladies neuromusculaires réfractaires aux immunosuppresseurs conventionnels. Ses indications et ses modalités de prescription restent à préciser.

traitement des syndromes lymphoprolifératif. Les effets secondaires à court terme sont bien connus mais la tolérance au long court reste à préciser.

Le traitement par RTX semble efficace dans la plupart des maladies neuromusculaires auto-immunes même si les meilleurs résultats sont obtenus dans les myopathies et les myasthénies. Ces résultats doivent être confirmés dans des études contrôlées. Les indications d'utilisation du RTX doivent être précisées afin de mieux cerner sa place dans l'arsenal des thérapeutiques immunosuppressives.

Le traitement doit être généralement répété pour obtenir une immunosuppression suffisante et contrôler la maladie dans le temps. Après quatre perfusions hebdomadaires de RTX, le taux de lymphocytes B circulant exprimant le CD19 remonte six à neuf mois plus tard (Fig. 1). Certains vont donc retraiter les patients systématiquement tous les six mois pour empêcher la réapparition des lymphocytes B, d'autres attendront cette réascension avant de retraiter et enfin certains ne retraiteront qu'en cas de réaggravation clinique de la maladie auto-immune. Les modalités du traitement d'entretien restent donc à préciser.

Déclaration d'intérêts

L'auteur déclare ne pas avoir de conflits d'intérêts en relation avec cet article.

RÉFÉRENCES

- Attarian S, Azulay JP, Chabrol B, Escande-Beillard N, Pouget J, Boucraut J. Neonatal lower motor neuron syndrome associated with maternal neuropathy with anti-GM1 IgG. *Neurology* 2004;63(2):379–81.
- Benedetti L, Briani C, Grandis M, Vigo T, Gobbi M, Ghiglione E, et al. Predictors of response to rituximab in patients with neuropathy and anti-myelin associated glycoprotein immunoglobulin M. *J Peripher Nerv Syst* 2007;12(2):102–7.
- Benedetti L, Briani C, Franciotta D, Fazio R, Paolasso I, Comi C, et al. Rituximab in patients with chronic inflammatory demyelinating polyradiculoneuropathy: a report of 13 cases and review of the literature. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 2011;82(3):306–8.
- Blum S, Gillis D, Brown H, Boyle R, Henderson R, Heyworth-Smith D, et al. Use and monitoring of low dose rituximab in myasthenia gravis. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 2010;82(6):659–63.
- Broglio L, Lauria G. Worsening after rituximab treatment in anti-mag neuropathy. *Muscle Nerve* 2005;32(3):378–9.
- Burns TM. History of outcome measures for myasthenia gravis. *Muscle Nerve* 2010;42(1):5–13.
- Chaudhry V, Cornblath DR. An open-label trial of rituximab (Rituxan®) in multifocal motor neuropathy. *J Peripher Nerv Syst* 2010;15:196–201.
- Dalakas MC, Rakocevic G, Salajegheh M, Dambrosia JM, Hahn AF, Raju R, et al. Placebo-controlled trial of rituximab in IgM anti-myelin-associated glycoprotein antibody demyelinating neuropathy. *Ann Neurol* 2009;65(3):286–93.
- Delmont E, Azulay JP, Uzenot D, Attarian S, Verschueren A, Pouget J. Long-term follow-up of multifocal motor neuropathy with conduction block under intravenous immunoglobulin. *Rev Neurol* 2007;163(1):82–8.
- Delmont E, Jeandel PY, Benaïm C, Rosenthal E, Fuzibet JG, Desnuelle C. Treatment with rituximab in patients with polyneuropathy with anti-MAG antibodies. *J Neurol* 2011;258(9):1717–9.
- Ghobrial IM, Fonseca R, Greipp PR, Blood E, Rue M, Vesole DH, et al. Initial immunoglobulin M "flare" after rituximab therapy in patients diagnosed with Waldenström macroglobulinemia: an Eastern Cooperative Oncology Group Study. *Cancer* 2004;101(11):2593–8.
- Gironi M, Saresella M, Ceresa L, Calvo M, Ferrante P, Merli F, et al. Clinical and immunological worsening in a patient affected with Waldenström macroglobulinemia and anti-mag neuropathy after treatment with rituximab. *Haematologica* 2006;91:51–2.
- Gorson KC, Natarajan N, Ropper AH, Weinstein R. Rituximab treatment in patients with IgIV-dependent immune polyneuropathy: a prospective pilot trial. *Muscle Nerve* 2007;35:66–9.
- Illa I, Diaz-Manera J, Rojas-Garcia R, Pradas J, Rey A, Blesa R, et al. Sustained response to Rituximab in anti-AChR and anti-MuSK positive Myasthenia Gravis patients. *J Neuroimmunol* 2008;201:2:90–4.
- Joint Task Force of the EFNS and the PNS. European Federation of Neurological Societies/Peripheral Nerve Society guideline on management of multifocal motor neuropathy. Report of a joint task force of the European Federation of Neurological Societies and the Peripheral Nerve Society. *J Peripher Nerv Syst* 2010;15(4):295–301.
- Léger JM, Viala K, Nicolas G, Créange A, Vallat JM, Pouget J, et al. A randomized placebo controlled trial of rituximab in IgM anti myelin associated glycoprotein antibody demyelinating neuropathy (RIMAG study). *J Peripher Nerv Syst* 2011;16:S73–4.
- Lebrun C, Bourg V, Tieulle N, Thomas P. Sustained response to Rituximab in anti-AChR and anti-MuSK positive Myasthenia Gravis patients. *Eur J Neurol* 2009;16(2):246–50.
- Levine TD. Rituximab in the treatment of dermatomyositis: an open-label pilot study. *Arthritis Rheum* 2005;52(2):601–7.
- Lindberg C, Bokarewa M. Rituximab for severe myasthenia gravis – experience from five patients. *Acta Neurol Scand* 2010;122(4):225–8.
- Lunn MP, Nobile-Orazio E. Immunotherapy for IgM anti-myelin-associated glycoprotein paraprotein-associated peripheral neuropathies. *Cochrane Database Syst Rev* 2006;19(2):CD002827.
- Maddison P, McConville J, Farrugia ME, Davies N, Rose M, Norwood F, et al. The use of rituximab in myasthenia gravis and Lambert-Eaton myasthenic syndrome. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 2011;82(6):671–3.
- Michaud A, Delmont E, Jeandel PY, Desnuelle C. Amélioration d'un cas de neuropathie motrice multifocale avec blocs de conduction sévère, dépendant des immunoglobulines intraveineuses, après adjonction de rituximab au long cours. *Rev Neurol* 2011;167(12):916–20.
- Mok CC, Ho LY, To CH. Rituximab for refractory polymyositis: an open-label prospective study. *J Rheumatol* 2007;34(9):1864–8.
- Niemeijer JM, Eurelings M, Lokhorst HL, van der Pol WL, Franssen H, Wokke JH, et al. Rituximab for polyneuropathy with IgM monoclonal gammopathy. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 2009;80(9):1036–9.
- Nobile-Orazio E, Meucci N, Baldini L, Di Troia A, Scarlato G. Long-term prognosis of neuropathy associated with anti-MAG IgM M-proteins and its relationship to immune therapies. *Brain* 2000;123:710–7.
- Nowak RJ, Dicapua DB, Zebardast N, Goldstein JM. Response of patients with refractory myasthenia gravis to rituximab: a retrospective study. *Ther Adv Neurol Disord* 2011;4(5):259–66.
- Pestronk A, Florence J, Miller T, Choksi R, Al-Lozi MT, Levine TD. Treatment of IgM antibody associated polyneuropathies using rituximab. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 2003;74:485–9.
- Renaud S, Fuhr P, Gregor M, Schweikert K, Lorenz D, Daniels C, et al. High-dose rituximab and anti-MAG-associated polyneuropathy. *Neurology* 2006;66(5):742–4.
- Renaud S, Gregor M, Fuhr P, Lorenz D, Deuschl G, Gratwohl A, et al. Rituximab in the treatment of polyneuropathy associated with anti-MAG antibodies. *Muscle Nerve* 2003;27(5):611–5.
- Rios Fernández R, Callejas Rubio JL, Sánchez Cano D, Sáez Moreno JA, Ortego Centeno N. Rituximab in the treatment of dermatomyositis and other inflammatory myopathies. A report of 4 cases and review of the literature. *Clin Exp Rheumatol* 2009;27(6):1009–16.
- Rojas-Garcia R, Gallardo E, de Andrés I, de Luna N, Juárez C, Sanchez P. Chronic neuropathy with IgM anti-gangliosides antibodies: lack of long term response to rituximab. *Neurology* 2003;61:1814–6.
- Rüegg SJ, Fuhr P, Steck AJ. Rituximab stabilizes multifocal motor neuropathy increasingly less responsive to IVIg. *Neurology* 2004;63:2178–9.

- Sem M, Molberg O, Lund MB, Gran JT. Rituximab treatment of the anti-synthetase syndrome: a retrospective case series. *Rheumatology* 2009;48(8):968–71.
- Stieglbauer K, Topakian R, Hinterberger G, Aichner FT. Beneficial effect of rituximab monotherapy in multifocal motor neuropathy. *Neuromuscular disorders* 2009;19:473–5.
- Tan CS, Koralnik IJ. Beyond progressive multifocal leukoencephalopathy: expanded pathogenesis of JC virus infection in the central nervous system. *Lancet Neurol* 2010;9(4):425–37.
- Valiyil R, Casciola-Rosen L, Hong G, Mammen A, Christopher-Stine L. Rituximab therapy for myopathy associated with anti-signal recognition particle antibodies: a case series. *Arthritis Care Res* 2010;62(9):1328–34.
- Zebardast N, Patwa HS, Novella SP, Goldstein JM. Successful treatment of refractory generalized myasthenia gravis with rituximab. *Muscle Nerve* 2010;41(3):375–8.

II. Efficacité à moyen terme de l'autogreffe de cellules souches hématopoïétiques périphériques sur la polyneuropathie du syndrome POEMS : expérience chez 5 cas.

(1) Gronier S, (1) Delmont E, (2) Legros L, (3) Launay M, (4) Jeandel PY, (4) Fuzibet JG, (1) Desnuelle C (1)

(1) Centre de référence Maladies NeuroMusculaires et SLA. (2) Service d'Hématologie. (3) Service d'Exploration Fonctionnelle Système Nerveux. (4) Service de Médecine Interne. CHU de Nice.

RESUME

INTRODUCTION:

L'évaluation de la réponse neurologique après autogreffe pour un syndrome POEMS (Polyneuropathie **O**rganomégalie **E**ndocrinopathie, protéine **M**onoclonale et anomalies cutanées) est le plus souvent subjective dans les études publiées.

Notre étude rétrospective a pour objectif de décrire la neuropathie du syndrome POEMS et d'évaluer l'efficacité de l'autogreffe de cellules souches hématopoïétiques périphériques (CSP), par des données cliniques et électrophysiologiques objectives.

METHODES :

Cinq patients ont reçu un traitement par autogreffe de CSP pour un syndrome POEMS. L'évaluation clinique initiale, à 6 et 12 mois, portait sur le score ONLS (Overall Neuropathy Limitation Scale) et MRC. L'analyse électroneuromyographique (ENMG) portait sur les nerfs médians, ulnaires, fibulaires communs, tibiaux postérieurs et suraux, avant et à un an de l'autogreffe.

RESULTATS :

L'âge moyen était 60.6 ans (49-70). La durée de la maladie avant autogreffe était de 15.4 mois (2-33). Avant autogreffe, le score ONLS moyen était de 4.2 (1-10) et le MRC de 115.8/140 (74-140). Les scores moyens ONLS et MRC s'amélioraient chez tous les patients, respectivement à M6 et M12: score ONLS: 3 (0-8) et 2.2 (0-7), score MRC: 118/140 (77-140) et 122.4/140 (80-140). Une amélioration significative sur les données ENMG était observée à un an aux membres supérieurs, sur les nerfs médians et ulnaires, pour les vitesses de conduction nerveuses (45.47 vs 34.41 m/s, $p < 0.001$), les amplitudes motrices distales (5.94 vs

5.04 mV ; $p=0.004$) et les vitesses de conduction sensibles (49.20 vs 43.20 m/s $p=0.001$). Les amplitudes motrices distales restaient effondrées aux membres inférieurs sur les nerfs fibulaires et tibiaux (0.17 vs 0.41 mV).

CONCLUSION / DISCUSSION:

Notre étude montre une amélioration clinique et ENMG de la neuropathie périphérique chez tous les patients après autogreffe dans le cadre d'un syndrome POEMS. Un suivi prolongé est nécessaire pour évaluer les possibilités de récupération neurologique à long terme.

INTRODUCTION

Le syndrome POEMS (polyneuropathie, organomégalie, endocrinopathie, protéine monoclonale et anomalies cutanées) est une affection multisystémique rare. Le diagnostic est basé sur l'association d'une prolifération plasmocytaire monoclonale et d'une polyneuropathie avec au moins un critère majeur (lésions osseuses sclérotiques, maladie de Castleman, élévation du taux de VEGF) et un critère mineur (organomégalie, surcharge extravasculaire, endocrinopathie, modifications cutanées, œdème papillaire, thrombocytose/polyglobulie) (Dispenzieri, 2011). La neuropathie périphérique est souvent le premier symptôme de la maladie. Elle se traduit par un déficit sensitif et moteur sévère, d'évolution subaigüe, pouvant toucher les quatre membres. Le pronostic fonctionnel de cette affection multisystémique est grave et la neuropathie périphérique peut être à l'origine d'un handicap fonctionnel majeur. Le traitement des formes disséminées de syndrome POEMS n'est pas totalement établi, le traitement le plus efficace reposerait sur l'élimination du clone plasmocytaire par chimiothérapie avec autogreffe de cellules souches hématopoïétiques périphériques ou autogreffe de CSP, (Dispenzieri, 2012). Cette attitude thérapeutique n'a pas encore été validée par une étude randomisée. Dans les séries de cas cliniques publiées, l'évaluation de la réponse neurologique après autogreffe est le plus souvent subjective, basée sur des impressions cliniques.

L'objectif de notre étude est de décrire de manière objective, par des critères cliniques, électroneuromyographiques (ENMG) et des échelles fonctionnelles validées, l'aspect initial et l'évolution de la neuropathie périphérique chez cinq patients à six mois et un an d'une autogreffe de CSP dans le cadre d'un syndrome POEMS.

PATIENTS ET METHODES

Cinq patients traités par autogreffe de CSP pour un syndrome POEMS entre septembre 2007 et août 2012 au CHU de Nice ont été étudiés rétrospectivement.

Le diagnostic de syndrome POEMS respectait les critères proposés par Dispenzieri, 2011. Aucun patient ne présentait de contre indication cardiologique ou infectieuse à l'autogreffe.

Le recueil des CSP était réalisé après mobilisation des progéniteurs hématopoïétiques par Ciclophosphamide et/ou facteurs de croissances. Le conditionnement à la greffe par Melphalan à la posologie de 200 mg/m² chez trois patients et 140 mg/m² chez les deux patients les plus âgés. Il n'y a pas eu de chimiothérapie post-greffe.

L'évaluation clinique était réalisée prospectivement avant le traitement, à six mois et à un an par les échelles cliniques et d'incapacité fonctionnelle standardisées: INCAT Sensory Score, ISS, (Merkies, 2000) MRC sumscore sur 28 groupes musculaires (9 muscles aux membres supérieurs de manière bilatérale: interosseux, court abducteur du pouce, flexion et extension des doigts, du poignet et du coude, abducteur de l'épaule et 5 muscles aux membres inférieurs de manière bilatérale: flexion de hanche, flexion et extension de genou et cheville), Overall Neuropathy Limitation Scale, ONLS, (Graham, 2006) et Rasch-built overall disability scale, R-ODS, (Van Nes, 2011). Ces valeurs étaient recueillies chez tous les patients.

L'évaluation biologique comprenait le dosage du VEGF (vascular endothelial growth factor, laboratoire d'immunochimie, groupe Hospitalier de la Pitié-Salpêtrière à Paris), une immunofixation sérique avec dosage pondéral sérique des immunoglobulines, et des chaînes légères Kappa/Lambda. La valeur normale de la concentration de VEGF était 500 pg/ml, une augmentation était retenue pour des valeurs supérieures à deux fois la valeur normale, soit 1000 pg/ml. Un myélogramme avec immunophénotypage de moelle osseuse et une ponction lombaire étaient réalisés dans le bilan étiologique initial.

Le suivi radiologique comprenait initialement des radiographies du squelette, une imagerie fonctionnelle par TEP-TDM corps entier au fluorodésoxyglucose (FDG), ainsi qu'une IRM du rachis. La TEP-TDM était contrôlé à un an, en cas d'anomalie initiale.

Une évaluation électrophysiologique était réalisée avant traitement chez tous les patients puis six mois après l'autogreffe pour un patient et à un an après l'autogreffe pour les quatre autres patients.

Les nerfs moteurs médians, ulnaires, fibulaires communs et tibiaux postérieurs et les nerfs sensitifs médians, ulnaires et suraux étaient enregistrés de manière bilatérale (Delmont, 2006). Les éléments analysés étaient: les latences motrices distales (M), les vitesses de conduction

nerveuses (VCN), les vitesses de conduction sensibles (VCS), les amplitudes motrices et sensibles distales, la latence des ondes F, l'index de latence terminale (ILT) et le ratio F modifié (MFR) (Attarian et al , 2001) sur les nerfs médians, la présence de bloc de conduction (BC) ou de dispersion temporelle (DT) comme définis par l'EFNS/PNS (Hugues, 2006). Un ILT inférieur à 0.34 témoignait d'une démyélinisation prédominant dans les segments distaux des nerfs (Antoine, 2005), un MFR supérieur 2.5, d'une démyélinisation prédominant dans les segments proximaux des nerfs (Attarian, 2001), des VCN diminuées aux avant-bras correspondaient à une démyélinisation sur les segments intermédiaires.

Le recueil des potentiels sensitifs était réalisé avec des électrodes de surfaces bipolaires par stimulation antidromique. Pour les nerfs médians, le recueil était sur le IIe doigt. Pour les nerfs ulnaires, le recueil était sur le Ve doigt. Aux membres inférieurs, les nerfs saphènes externes étaient étudiés.

L'électromyographie ou détection avec une aiguille électrode permettait d'étudier les activités de repos et à l'effort des muscles: tibial antérieur, vaste externe, 1^{er} interosseux dorsal et deltoïde.

Bien qu'il ne s'agisse pas d'une polyradiculonévrite chronique, nous avons évalué si les neuropathies remplissaient les critères diagnostiques de PIDC, établis par l'EFNS/PNS 2010 (Van Schaik, 2010). De même, bien que l'atteinte démyélinisante dans la polyneuropathie du syndrome POEMS ne soit pas expliquée par les mêmes mécanismes physiopathologiques que dans les PIDC, les valeurs pathologiques de la conduction nerveuse motrice en faveur d'une démyélinisation faisaient références aux valeurs utilisées dans la stratégie diagnostique des PIDC, (Antoine, 2005).

Nous avons réalisé des moyennes des VCN, des VCS ainsi que des amplitudes motrices et sensibles sur les nerfs médians et ulnaires aux membres supérieurs et fibulaires communs, tibiaux postérieurs et saphènes externes aux membres inférieurs.

Le test statistique de Student était utilisé pour les données appariées et le test Wilcoxon - Mann Whitney pour les concentrations de VEGF et les données électrophysiologiques, avec une différence significative pour $p < 0.05$.

RESULTATS

Evaluation initiale

Nous avons suivi trois femmes pour deux hommes pour un syndrome POEMS, traités par autogreffe de CSP, entre septembre 2007 et août 2012 au CHU de Nice.

Population

L'âge moyen au moment de l'autogreffe était de 60.6 ans (49-70 ans). Le délai moyen entre le début des symptômes et le diagnostic était de 7.6 mois (1 à 24 mois). Le délai moyen entre le diagnostic et l'autogreffe de moelle était de 7.8 mois (1 à 12 mois).

Formes cliniques

Les critères majeurs : l'augmentation de la concentration de VEGF était retrouvée chez tous les patients et des lésions ostéocondensantes chez deux d'entre eux. Il n'y avait pas de maladie de Castleman associée chez les cinq patients.

Les critères diagnostiques mineurs comportaient une thrombocytose (quatre patients), des œdèmes des membres inférieurs (trois patients), une endocrinopathie (hypogonadisme chez deux patients, hypocortisolisme chez un patient), une atteinte cutanée (trois patients) et un œdème papillaire (un patient).

L'examen neurologique révélait un déficit sensitif et moteur distal des membres inférieurs chez trois patients, des quatre membres chez un patient et essentiellement sensitive distale des membres inférieurs chez une patiente. Les réflexes tendineux étaient globalement abolis chez deux patients, il existait une aréflexie achilléenne isolée chez trois patients. Une amyotrophie distale des membres inférieurs était présente chez trois patients et au niveau des quatre membres chez un patient. *Tableau 1*

Avant l'autogreffe, le score ONLS moyen était de 4.2 (1-10) et le score MRC de 115.8/140 (74-140). Les critères cliniques de PIDC atypique étaient remplis avec une neuropathie plutôt sensitive distale et prédominante sur les membres inférieurs.

Données biologiques et radiologiques

Quatre patients avaient une IgA Lambda, un patient avait une IgA Lambda et une IgG Kappa. La concentration de VEGF était augmentée, supérieure à deux fois la normale chez tous les patients, avec une valeur moyenne de 4188 pg/ml (1300-7740).

Les trois patients ayant eu une ponction lombaire avaient un taux moyen de protéinorachie de 0.98 g/L (0.66 à 1.74) et une moyenne de 1.3 éléments (0 à 3). Un seul patient avait des lésions fixantes sur TEP-TDM.

Données électrophysiologiques

Tous les patients remplissaient initialement les critères ENMG de PIDC (Hugues, 2006; Van Schaik, 2010).

Les amplitudes des potentiels d'action moteurs chez quatre patients étaient diminuées aux membres inférieurs, alors qu'ils étaient normaux aux membres supérieurs. Les VCN étaient

diminuées chez tous les patients aux membres supérieurs et inférieurs (moyenne membres supérieurs: 34.4 m/s, moyenne membres inférieurs : 9.1 m/s). Les amplitudes des potentiels sensitifs et les VCS étaient normales aux membres supérieurs chez quatre patients alors qu'elles étaient diminuées aux membres inférieurs chez tous les patients.

Les latences des ondes F étaient allongées chez quatre patients. Les ondes F étaient absentes chez le patient le plus sévère.

On retrouvait des blocs de conduction (BC) ou dispersions temporelles (DT) chez trois patients: un patient avait deux BC sur les nerfs fibulaires communs aux jambes, un patient des DT au point d'Erb pour les nerfs médian droit et ulnaires, un patient des BC à l'avant bras pour les nerfs médian gauche et ulnaires et une DT à l'aisselle pour le nerf médian gauche.

L'étude du MFR sur les nerfs médians, retrouvait une valeur supérieure à 2.5, chez trois patients sur quatre (un patient avait des amplitudes motrices trop effondrées pour calculer cet index). L'ILT était supérieur à 0.34 chez tous les patients.

Des activités spontanées de type fibrillation étaient retrouvées au repos à l'examen de détection chez quatre patients.

L'analyse initiale ENMG retrouvait une neuropathie sensitivo-motrice des quatre membres avec une prédominance de l'atteinte axonale sur les membres inférieurs, et sur les membres supérieurs une distribution des ralentissements des VCN prédominants sur les segments intermédiaires chez deux patients et sur les segments intermédiaires et proximaux chez les trois autres. *Tableau 2.*

Autogreffe et morbidité

Le délai moyen entre le début des symptômes et l'autogreffe de moelle était de 15.4 mois (2 à 33 mois). Ce délai était plus important (33 mois) pour le patient ayant la neuropathie la plus sévère.

La durée moyenne d'aplasie était de 8.4 jours (6 à 12 jours). Tous les patients ont présenté des complications lors de leur séjour en unité protégée d'hématologie. Les principales complications étaient infectieuses, présentes chez quatre patients, dont un sepsis sévère (autres complications infectieuses : une diarrhée fébrile, deux épisodes fébriles avec point d'appel pulmonaire et prélèvements bactériologiques négatifs, quatre mucites). Quatre patients ont eu des effets secondaires digestifs à type de nausées, gastralgie ou diarrhées. Un syndrome confusionnel aux morphiniques et un syndrome de reprise de greffe ou syndrome d'engraftment (fièvre, éruption cutanée, diarrhée, prise de poids et œdème pulmonaire non causés par une infection) sont survenus au décours de la greffe.

La durée d'hospitalisation moyenne lors de l'autogreffe était de 24,4 jours (17-30).

Suivi

Evolution clinique

L'évolution clinique est décrite à six mois (M6) et un an (M12). Quatre des cinq patients avaient une amélioration du score MRC, le patient n'ayant pas d'amélioration n'avait initialement pas de déficit moteur. Deux patients avaient une amélioration de l'échelle ISS et des douleurs neuropathiques à un an (2 vs 5, 8 vs 11). Les scores R-ODS restaient globalement stables. Les scores ONLS et MRC s'amélioraient chez tous les patients à M6 et M12. Cette différence n'était pas significative. Une amélioration clinique était obtenue chez tous les patients. *Tableau 3.*

Réponse hématologique

Une réponse hématologique complète, avec disparition de la gammapathie monoclonale était obtenue à M6 chez deux patients et à M12 chez quatre patients. Un patient avait toujours une immunofixation sérique pathologique à M12, avec un pic monoclonal estimé à 3.4 g/L.

Une normalisation de la concentration de VEGF était obtenue à M6 chez un patient et à M12 chez deux patients. Une réponse partielle, avec diminution de 50% du taux de VEGF était obtenue dès M6 chez un patient. A M12, deux patients gardaient un taux de VEGF augmenté. Le taux moyen de VEGF était diminué à M6 (701 pg/ml, $p < 0.05$) et à M12 (966.5 pg/ml, $p > 0.05$) par rapport aux valeurs initiales. *Tableau 3.*

Evolution radiologique

Les lésions hyperfixantes sur la TEP-TDM retrouvées chez un patient étaient inchangées au contrôle réalisé un an après.

Evolution électrophysiologique

Seul un patient remplissait toujours les critères diagnostiques ENMG de l'EFNS/PNS de PIDC. Les VCN s'amélioraient à un an chez tous les patients. Aux membres supérieurs, elles s'étaient normalisées chez quatre patients. Il existait une amélioration statistiquement significative aux membres supérieur, sur les nerfs médians et ulnaires, des moyennes : des VCN à l'avant-bras (45,5 vs 34,4 $p < 0.001$), des amplitudes motrices (5,94 vs 5,04 mV $p = 0.044$) et des VCS (49,2 vs 43,2 m/s $p = 0.0014$), et des VCN à l'avant-bras sur les nerfs médians (43,9 vs 34,4 m/s $p = 0.002$). Il persistait une perte axonale aux membres inférieurs (0,17 vs 0,41 mV, $p > 0,05$), sur les nerfs fibulaires communs et tibiaux postérieurs. *Tableau 4.*

DISCUSSION

Notre étude montre une amélioration clinique et électrophysiologique significative à un an de la neuropathie périphérique chez cinq patients traités par autogreffe de CSP pour un syndrome POEMS.

Le syndrome POEMS est un diagnostic différentiel des PIDC. Tous nos patients remplissaient initialement les critères diagnostiques cliniques et électromyographiques de PIDC proposés par l'EFNS/PNS (Van Schaik, 2010). Deux principales études décrivent la présentation clinique et électrophysiologique de la neuropathie dans le cadre d'un syndrome POEMS. La première compare 51 patients ayant un POEMS avec 46 patients ayant une PIDC, (Nasu et al, 2012), la seconde 138 patients ayant un POEMS et 69 patients ayant une PIDC (Mauermann et al, 2012). Elles mettent en évidence dans les syndromes POEMS une atteinte démyélinisante prédominante sur les segments intermédiaires, une atteinte axonale plus marquée sur les membres inférieurs, et un index de latence terminale (ILT) plus élevé que dans les PIDC. Nos données électrophysiologiques sont comparables: ralentissement des vitesses de conduction dans les segments intermédiaires et proximaux et perte axonale prédominante sur les membres inférieurs.

Les formes disséminées de syndrome POEMS sont définies par la présence de plus de deux lésions osseuses et/ou d'un prélèvement de moelle osseuse anormale. Ces formes disséminées ne répondent pas aux traitements par corticothérapie, immunoglobulines intraveineuses ou radiothérapie. Un traitement par autogreffe de CSP associée à une chimiothérapie par Melfalan est généralement proposé comme traitement de première intention (Abrisqueta, 2007 ; Ganti, 2005 ; Hogan, 2001 ; Laurenti, 2007 ; Peggs, 2002 ; Soubrier, 2002). Dans ces études, le suivi des patients met en évidence une réponse biologique complète avec normalisation de l'immunoélectrophorèse sérique et de la concentration de VEGF. Dans une étude de plus grande envergure (59 patients, médiane de suivi 45 mois), la disparition de la gammopathie monoclonale et la normalisation des concentrations de VEGF sont respectivement de 68% et 80% pour 92% de réponse clinique à un an (la normalisation des paramètres biologiques prenaient 2 à 3 ans pour 7% d'entre eux). Le taux de progression ou rechute après autogreffe de CSP serait de 25% à 5 ans, assez bien corrélé à l'augmentation des concentrations de VEGF, qui est néanmoins mieux corrélé avec l'évolution des lésions osseuses (D'Souza, 2012). La progression de la maladie est précocement corrélée à des

anomalies sur l'imagerie (TEP-TDM) et la biologie (ascension de la concentration de VEGF). Une amélioration clinique de la neuropathie est décrite dès 3 mois et progresse jusqu'à 3 ans après autogreffe, néanmoins, dans cette étude, l'évaluation neurologique est subjective et il n'y a pas de données sur l'évolution électrophysiologique des neuropathies.

Bien que des concentrations de VEGF jusqu'à 3500 pg/ml ne sont pas spécifiques du syndrome POEMS (Nobile-Orazio, 2009), pour certains une concentration de VEGF supérieur à 200 pg/mL aurait une spécificité de 95% et une sensibilité de 68% pour le syndrome POEMS (D'Souza, 2011)

L'ensemble des patients de notre étude a une amélioration clinique à un an objectivée par une diminution du score ONLS et une amélioration du score MRC même chez le patient gardant une gammopathie monoclonale détectable sur l'immunofixation sérique. Les patients s'améliorent sur le plan fonctionnel sur le déficit moteur, les troubles sensitifs et les douleurs neuropathiques. Le taux de VEGF est diminué, mais la normalisation de la concentration de VEGF n'est pas obtenue chez tous les patients. Par ailleurs, chez deux patients, une ré-ascension de la concentration de VEGF à un an ne s'est pas accompagnée d'une rechute clinique à court terme.

L'évolution de la neuropathie après autogreffe de CSP est peu détaillée dans la littérature, en particulier l'évolution des paramètres électrophysiologiques. Des études de cas, montrent une amélioration des paramètres clinique et électrophysiologique de la neuropathie chez quelques patients (Dispenzieri, 2004 ; Ganti, 2005 ; Hoggan, 2001 ; Laurenti, 2007 ; Peggs, 2002, Soubrier, 2002). *Tableau 5.* La série la plus détaillée évaluant objectivement la réponse neurologique après autogreffe de CSP porte sur neufs patients suivis pendant une période moyenne de vingt mois (Kuwabara, 2008). Cette étude met en évidence une amélioration tant clinique, sur le score de Hughes, qu'électrophysiologique, sur l'étude de la conduction nerveuse et des amplitudes des potentiels moteurs des nerfs médians et ulnaires. L'amélioration clinique est très précoce dès un mois post-greffe, alors que l'amélioration des paramètres électrophysiologiques apparaît à six mois et continue à évoluer à vingt mois. Les vitesses de conduction nerveuse sont normalisées à un an chez deux patients, elles s'améliorent de façon significative chez huit patients sur l'étude des nerfs médians (36 vs 42, $p < 0.001$), les amplitudes des potentiels moteurs s'améliorent chez presque tous les patients. Dans notre étude, l'évolution électrophysiologique est comparable, avec une amélioration significative des VCN sur les nerfs médians.

La durée de suivi dans notre étude est insuffisante pour mettre en évidence une éventuelle rechute clinique qui pourrait être précédée par une rechute biologique. De même, le suivi à court terme ne montre pas une amélioration de la neuropathie périphérique sur tous les paramètres étudiés, en particulier la perte axonale. En effet, il persiste une perte axonale aux membres inférieurs, pouvant témoigner d'une moins bonne réponse au traitement du processus de perte axonale distale, ou d'une récupération plus tardive par régénération axonale.

Dans notre étude, le patient ayant un délai entre le début des symptômes et le traitement par autogreffe supérieur aux autres patients, a une neuropathie plus sévère avec une perte axonale plus marquée. Il répond au traitement avec une amélioration clinique et électrophysiologique principalement sur les signes de démyélinisation. La perte axonale reste sévère à un an. Une prise en charge plus tardive semble moins efficace, probablement en rapport avec une évolution plus marquée de la neuropathie. Un des facteurs pronostiques serait donc la prise en charge précoce avant l'apparition d'une atteinte axonale sévère. Les facteurs de mauvais pronostic rapportés dans la littérature sont : les lésions à l'imagerie, l'absence de réponse biologique, la présence d'une IgG lambda, les patients âgés de 50 ans ou moins (D'Souza, 2012). Le traitement doit être proposé le plus précocement possible, lorsque l'état général du patient est préservé et l'évolution neurologique peu marquée, (Laurenti, 2008).

Dans la littérature, 50% des autogreffes de moelle par cellules souches périphériques sont associées à la survenue d'un syndrome post-greffe ou syndrome de prise de greffe provoquant entre autre : fièvre, non causée par une infection, éruption cutanée, diarrhée, gain de poids et œdème pulmonaire (Dispenzieri, 2004). Cette fréquence n'est pas retrouvée dans notre étude où un seul cas est à déplorer. Le taux de mortalité est de 2%, (Hogan, 2001). Il n'existe pas de morbidité accrue chez les patients ayant un syndrome POEMS, par rapport aux patients traités pour un myélome, contrairement à ceux ayant une amylose (Peggs, 2002).

Dans la littérature, un suivi trimestriel est proposé durant la première année à la fois clinique et hématologique avec surveillance de la concentration du VEGF et de la présence d'une protéine monoclonale, puis le suivi doit se prolonger à vie de façon annuelle ou semestrielle (Dispenzieri, 2011). Devant la persistance d'hyperfixation de lésions osseuses au TEP TDM, un traitement par radiothérapie devra être proposé, devant la persistance d'anomalie biologique (VEGF et protéine monoclonale), une chimiothérapie adjuvante sera administrée en fonction des symptômes cliniques associés (Dispenzieri, 2011).

L'intérêt de notre étude est de préciser, par une approche neurologique, avec des critères cliniques et électrophysiologiques objectifs, l'aspect initial et l'évolution de la neuropathie chez cinq patients traités par autogreffe de CSP dans le cadre d'un syndrome POEMS. Cette étude confirme les données de la littérature, sur la présentation de la neuropathie (atteinte démyélinisante aux membres supérieurs prédominant sur les segments proximaux et intermédiaires et perte axonale aux membres inférieurs), ainsi que l'efficacité du traitement du syndrome POEMS par autogreffe de CSP. Le diagnostic précoce et le traitement rapide par autogreffe de CSP permettent une amélioration clinique et ENMG de la neuropathie périphérique du syndrome POEMS. Toutefois, le recul est probablement insuffisant pour évaluer la récupération neurologique globale en particulier sur la perte axonale distale aux membres inférieurs. Un suivi prolongé est donc nécessaire pour évaluer les possibilités de récupération neurologique à long terme et déceler d'éventuelles rechutes biologiques et cliniques.

BIBLIOGRAPHIE

Abrisqueta P, Rovira M, Cibiera MT, Vallansot R, Gutierrez G, Bladé J, et al. Autologous haematopoietic stem cell transplantation in POEMS syndrome: results in 4 cases. *Med Clin* 2007 Oct 27;129(15):578-81.

Antoine J C, Azulay J P, Bouche P, Créange A, Fournier E, Gallouedec G, et al. Pratique neurologique, Polyradiculonévrites inflammatoires démyélinisantes chroniques: stratégie diagnostique Recommandations du groupe d'Étude français des PIDC Groupe d'Étude français des PIDC. *Rev Neurol (Paris)* 2005; 161: 10, 988-996.

Attarian S, Azulay JP, Boucraut J, Escande N, Pouget J. Terminal latency index and modified F ratio in distinction of chronic demyelinating neuropathies. *Clin Neurophysiol* 2001; 112(3):457-63.

Delmont E, Azulay J.P, Giorgi R, Attarian S, Verschueren A, Uzenot D and Pouget J. Multifocal motor neuropathy with and without conduction block: A single entity? *Neurology* 2006; 67; 592-596.

Dispenzieri A, Moreno-Aspitia A, Suarez A, Lacy M, Colon-Otero G, Teffery A et al. Peripheral blood stem cell transplantation in 16 patients with POEMS syndrome, and a review of the literature. *Blood* 2004; 104: 3400-3407.

Dispenzieri A. POEMS syndrome: 2011 update on diagnosis, risk-stratification, and management. *Am J Hematol* 2011; 86(7):591-601.

Dispenzieri A. How I treat POEMS syndrome. *Blood* 2012; 119(24):5650-8D'Souza A, Lacy M, Gertz M, Kumar S, Buadi F, Hayman S, et al. Long-term outcomes after autologous stem cell transplantation for patients with POEMS syndrome (osteosclerotic myeloma): a single-center experience. *Blood* 2012; 120(1):56-62.

D'Souza A, Hayman SR, Buadi F, et al. The utility of plasma vascular endothelial growth factor levels in the diagnosis and follow-up of patients with POEMS syndrome. *Blood* 2011;118(17):4663-4665

Ganti AK, Pipinos I, Culcea E, Armitage JO, Tarantolo S. Successful hematopoietic stem-cell transplantation in multicentric Castleman disease complicated by POEMS syndrome. *American Journal of Hematology* 2005 Jul; 79(3):206-10.

Graham R C and Hughes R A C. A modified peripheral neuropathy scale: the Overall Neuropathy Limitations Scale. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry* 2006; 77:973-976.

Hogan WJ, Lacy MQ, Wiseman GA et al. Successful treatment of POEMS syndrome with autologous hematopoietic progenitor cell transplantation. *Bone Marrow Transplant* 2001 Aug; 28(3):305-9.

Hughes RA, Bouche P, Cornblath DR, Evers E, Hadden RD, Hahn A et al. European Federation of Neurological Societies/Peripheral Nerve Society guideline on management of chronic inflammatory demyelinating polyradiculoneuropathy: report of a joint task force of the European Federation of Neurological Societies and the Peripheral Nerve Society. *Eur J Neurol* 2006; 13(4):326-32.

Kuwabara S, Misawa S, Kanai K, Suzuki Y, Kikkawa Y, Sawai S, et al. Neurologic improvement after peripheral blood stem cell transplantation in POEMS syndrome. *Neurology* 2008; 71(21):1691-5.

Laurenti L, De Matteis S, Sabatelli M, Conte A, Chiusolo P, Sora F, et al. Early diagnosis followed by front-line autologous peripheral blood stem cell transplantation for patients affected by POEMS syndrome. *Leukemia Research* 2008 Aug; 32(8):1309-12.

Mauermann ML, Sorenson EJ, Dispenzieri A, Mandrekar J, Suarez GA, Dyck PJ, et al. Uniform demyelination and more severe axonal loss distinguish POEMS syndrome from CIDP. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 2012; 83(5):480-6.

Merkies IS, Schmitz PI, van der Meché FG, van Doorn PA. Psychometric evaluation of a new sensory scale in immune-mediated polyneuropathies. *Neurology* 2000 Feb 22; 54(4): 943-9.

Nasu S, Misawa S, Sekiguchi Y, Shibuya K, Kanai K, Fujimaki Y, et al. Different neurological and physiological profiles in POEMS syndrome and chronic inflammatory demyelinating polyneuropathy. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 2012 ; 83(5):476-9.

Nobile-Orazio E, Terenghi F, Giannotta C, Gallia F, Nozza A. Serum VEGF levels in POEMS syndrome and in immune-mediated neuropathies. *Neurology*. 2009 Mar 17;72(11):1024-6.

Peggs KS, Paneesha S, Kottaridis PD, Chakraverty RK, Tobias G, Mahendra P, et al. Peripheral blood stem cell transplantation for POEMS syndrome? *Bone Marrow Transplant* 2002 Sep; 30(6):401-4.

Soubrier M, Ruivard M, Dubost JJ, Sauvezie B, Philippe P. Successful use of autologous bone marrow transplantation in treating a patient with POEMS syndrome. *Bone Marrow Transplant* 2002 Jul; 30(1):61-2.

Van Nes et al. Rasch-built Overall Disability Scale (R-ODS) for immune-mediated peripheral neuropathies. *Neurology* 2011 Jan 25; 76(4):337-45.

Van Schaik IN, Léger JM, Nobile-Orazio E, Cornblath DR, Hadden RD, Koski CL, et al. European Federation of Neurological Societies/Peripheral Nerve Society guideline on management of multifocal motor neuropathy. Report of a joint task force of the European Federation of Neurological Societies and the Peripheral Nerve Society-first revision. *J Peripher Nerv Syst*. 2010 Dec;15(4):295-301.

AUTEURS	PATIENTS: nombre, sexe, âge moyen	DUREE MOYENNE DE SUIVI	SUIVI NEUROLOGIQUE CLINIQUE	SUIVI ELECTROPHYSIOLOGIQUE
GANTI 2005	<u>1 F</u> , 39 ans	24 mois	amélioration de la marche, autonomie à 24 mois	amélioration: réapparition d'une réponse motrice et sensitive nerf ulnaire à 1 an
LAURENTI 2007	<u>4: 3 H/ 1 F</u> , 53 ans (44-62)	40,5 mois (12-52)	amélioration score MRC chez 3 patients	amélioration, paramètres non précisés
PEGGS, 2002	<u>2 F</u> , 56 ans	2 ans	amélioration clinique subjective à 2 semaines	amélioration, paramètres non précisés
	38 ans	6mois	non renseigné	pas d'amélioration
HOGAN, 2001	<u>1 H</u> , 41 ans	23 mois	Amélioration de la marche, autonomie à 23 mois	amélioration: VCN latence onde F nerf ulnaire, amplitude potentiel sensitif nerf médian à 6 mois
SOUBRIER, 2002	<u>2:</u> <u>1 H</u> 43 ans	10 ans	amélioration clinique subjective	non renseigné
	<u>1 F</u> 59 ans	6mois	amélioration clinique subjective	non renseigné
D'SOUZA, 2012	<u>59: 25% H</u> , 51 ans (20-70)	45 mois	réponse clinique: 92% à 1an; amélioration neuropathie dès 3 mois, maximale à 3 ans	non renseigné
			progression/ rechute: 25% à 5 ans	
KUWABARA, 2008	<u>9: 7 H/2 F</u> , 49 ans (38-55)	20 mois	amélioration Score de Hugues, Score MRC, Grip test à 3 mois	amélioration: VCN (globalement 16%) et amplitude potentiel moteur nerf médian chez 8 patients à 20 mois
DISPENZIERI, 2004	<u>16: 14 H/ 2 F</u> , 51 ans (19-62)	24 mois	amélioration Score NIS 4/7 à 1 an	amélioration: amplitudes potentiels moteurs MS et MI chez 4/5 patients à 1 an
GRONIER, 2013	<u>5: 2 H/ 3 F</u> , 61 ans (49-70)	1 an	amélioration ONLS, MRC à 6 mois et 1 an	amélioration: VCN, amplitudes potentiels moteurs et VCS aux MS à 1 an

III. Deep Brain Stimulation of the Ventral Intermediate Thalamic Nucleus for Severe Tremor in Anti-MAG Neuropathy

Movement Disorders
Vol. 00, No. 00, 2009, pp. 000–000
© 2009 Movement Disorder Society

Letters to the Editor

Deep Brain Stimulation of the Ventral Intermediate Thalamic Nucleus for Severe Tremor in Anti-MAG Neuropathy

Video 

A 55-year-old left-handed man, without family history of tremor, was referred for distal limb paresthesias progressing for several weeks. Neurological examination showed sensory ataxia, distal sensory loss, distal lower limb weakness, abolished deep tendon reflexes, and slight postural tremor of upper limbs. Electrophysiological studies confirmed peripheral neuropathy with distal demyelination. CSF proteins were elevated (1.2 g/L). A monoclonal IgM gammopathy of undetermined significance was detected (normal bone marrow biopsy and chest and abdominal CT-scan). Sural nerve biopsy showed a demyelinating process, deposits of IgM on peripheral nerve myelin and peripheral myelin widening on electronic microscopy. Positive antimyelin-associated glycoprotein IgM antibodies (anti-MAG) confirmed the diagnosis of polyneuropathy associated with anti-MAG (PNMAG). Treatment by intravenous immunoglobulins, cyclophosphamide, and rituximab were administered successively over the following years. Sensory ataxia and motor weakness improved slightly but the tremor progressively worsened. The tremor was present in upper limbs during posture and action, sometimes persisted during rest and was unchanged after consumption of alcoholic beverages. Tremor did not respond to symptomatic treatments including propranolol (up to 1200 mg/day), primidone (up to 500 mg/day), gabapentin (up to 2000 mg/day), pregabalin (up to 300 mg/L), topiramate (up to 150 mg/day), alprazolam (up to 1500 mg/day), and L-dopa (up to 300 mg/day) in monotherapy or combination. Only oral clonazepam (1.2 mg/day) led to some relief. Three years after disease onset, tremor had become severe and interfered with daily activities like feeding, dressing, and writing. Bilateral deep brain stimulation (DBS) of the ventral intermediate thalamic nucleus (VIM) was proposed. Electrodes (DBS 3389, Medtronic, Minneapolis, MN) were implanted stereotactically under local anesthesia after microelectrode recording (without specific rhythmic activities) and peroperative stimulation in the VIM, and connected to a subcutaneous stimulator (Kinetra, Medtronic). Postoperative MRI confirmed the location of the electrodes in the VIM. Chronic

monopolar stimulation parameters were: 130 Hz, left: contact 1 negative, 3.0V, 90 microseconds; right: contact 4 negative, 3.0 V, 60 microseconds.

The tremor dramatically improved when stimulation was switched on (see Fig. 1, Supporting Information Video) leading to improvement of quality of life. The Overall Neuropathy Limitations Scale¹ score for upper limbs decreased from 3 to 1. Voltage increase was limited by the occurrence of mild dysarthria. When stimulation was switched off, the tremor rapidly reappeared. Six months later, the effects remained unchanged.

Postural tremor is a common symptom in PNMAG² and occurs in up to 90%.³ Although DBS of VIM is a well-established therapeutic option in disabling, drug-resistant tremor of central origin in Parkinson's disease and essential tremor (ET),⁴ this treatment is not usually proposed for tremor associated with peripheral nervous system diseases. Tremor in PNMAG shares many clinical features with ET, including frequency, presence in posture and action and predominance

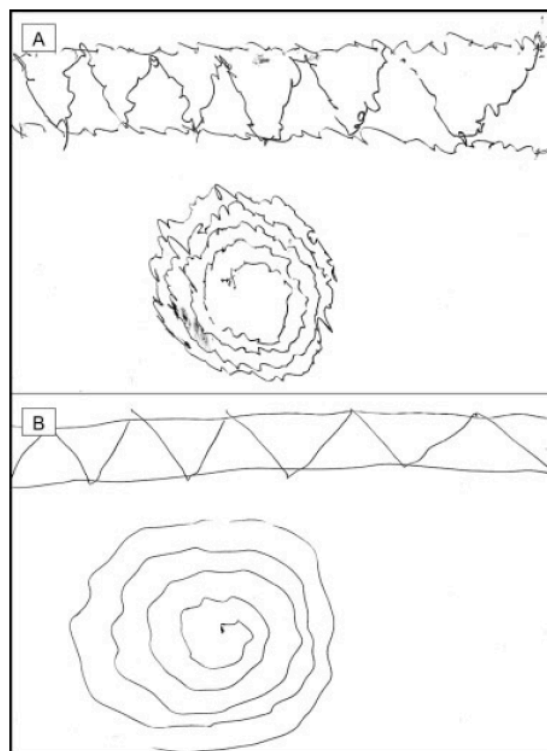


FIG. 1. Drawings with left (dominant) hand before (A, above), and 2 months after DBS (B, below), illustrating dramatic improvement of tremor.

Additional Supporting Information may be found in the online version of this article.

Potential conflict of interest: Nothing to report.

Published online in Wiley InterScience(www.interscience.wiley.com). DOI: 10.1002/mds.22604

in distal muscles.² In our patient, the close temporal association between the onset of the neuropathy and the appearance of the tremor suggested that the tremor was related to the neuropathy. Moreover, prevalence of postural tremor in patients with PNMAg is 10 to 200 times higher than the prevalence of ET in the general population.³ The absence of family history of tremor and the absence of response to alcohol were additional arguments against the diagnosis of ET. However, an incidental association of ET and PNMAg cannot be excluded.

Pathophysiological mechanisms of tremor in PNMAg are unclear. As there is lack of correlation between slowing of nerve conduction and presence of tremor, and as tremor is not related to weakness or sensory loss, tremor could be generated in the CNS.² Tremor might be due to loss or modification of peripheral input to CNS.³ The cerebellum could be implicated in both neuropathic tremor and ET.⁵ The similarities between tremor associated to PNMAg and ET, and the disability due to the tremor despite immunosuppressive and symptomatic therapies justified to propose VIM-DBS to our patient.

To our knowledge, DBS has been reported for two patients with neuropathic tremor: one case of successful DBS for severe tremor due to a similar condition has been reported in your journal several years ago for a man with neuropathy with monoclonal IgM gammopathy.⁶ Another patient with a hereditary neuropathy had a 30% improvement.⁷ DBS of VIM could be useful for severe, drug-resistant neuropathic tremor, but larger studies are needed to prove its efficiency.

Caroline Bayreuther, MD*
Service de Neurologie
Hôpital Pasteur
Nice, France

*E-mail: bayreuther.c@chu-nice.fr

Emilien Delmont, MD
Centre de Référence des Maladies
Neuromusculaires et SLA
Nice, France

Michel Borg, MD
Service de Neurologie
Hôpital Pasteur
Nice, France

Denys Fontaine, MD
Service de Neurochirurgie
Hôpital Pasteur
Nice, France

References

1. Graham RC, Hughes RA. A modified peripheral neuropathy scale: the Overall Neuropathy Limitations Scale. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 2006;77:973–976.
2. Smith IS. Tremor in peripheral neuropathy. In: Findley LJ, Koller WC, editors. *Handbook of tremor disorders*. New York: Marcel Dekker, Inc.; 1995. p 443–454.
3. Bain PG, Britton TC, Jenkins IH, et al. Tremor associated with benign IgM paraproteinaemic neuropathy. *Brain* 1996;119:789–799.
4. Limousin P, Speelman JD, Gielen F, Janssens M. Multicentre European study of thalamic stimulation in parkinsonian and essential tremor. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 1999;66:289–296.
5. Boecker H, Brooks DJ. Functional imaging of tremor. *Mov Disord* 1998;13(Suppl 3):64–72.
6. Ruzicka E, Jech R, Zárubová K, Roth J, Urgosík D. VIM thalamic stimulation for tremor in a patient with IgM paraproteinaemic demyelinating neuropathy. *Mov Disord* 2003;18:1192–1195.
7. Breit S, Wächter T, Schöls L, et al. Effective thalamic deep brain stimulation for neuropathic tremor in a patient with severe demyelinating neuropathy. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 2009;80:235–236.

Bibliographie

1. Dalakas MC. B cells as therapeutic targets in autoimmune neurological disorders. *Nat Clin Pract Neurol*. 2008 Sep 23;4(10):557–67.
2. Klein U, Dalla-Favera R. Germinal centres: role in B-cell physiology and malignancy. *Nat Rev Immunol*. 2008 Jan;8(1):22–33.
3. Shaffer AL, Rosenwald A, Staudt LM. Decision making in the immune system: Lymphoid Malignancies: the dark side of B-cell differentiation. *Nat Rev Immunol*. 2002 Dec;2(12):920–33.
4. Dighiero G, Hamblin TJ. Chronic lymphocytic leukaemia. *Lancet*. 2008 Mar 22;371(9617):1017–29.
5. Rawstron AC, Bennett FL, O'Connor SJM, Kwok M, Fenton JAL, Plummer M, et al. Monoclonal B-cell lymphocytosis and chronic lymphocytic leukemia. *N Engl J Med*. 2008 Aug 7;359(6):575–83.
6. Campo E, Swerdlow SH, Harris NL, Pileri S, Stein H, Jaffe ES. The 2008 WHO classification of lymphoid neoplasms and beyond: evolving concepts and practical applications. *Blood*. 2011 May 12;117(19):5019–32.
7. Binet JL, Lepoprier M, Dighiero G, Charron D, D'Athis P, Vaugier G, et al. A clinical staging system for chronic lymphocytic leukemia: prognostic significance. *Cancer*. 1977 Aug;40(2):855–64.
8. Pileri SA, Falini B. Mantle cell lymphoma. *Haematologica*. 2009 Nov;94(11):1488–92.
9. Gertz MA. Waldenström macroglobulinemia: 2013 update on diagnosis, risk stratification, and management. 2013 Jul 12;:1–9.
10. Kuehl WM, Bergsagel PL. Molecular pathogenesis of multiple myeloma and its premalignant precursor. *J. Clin. Invest*. 2012 Oct 1;122(10):3456–63.
11. Group CTC. Chemotherapeutic options in chronic lymphocytic leukemia: a meta-analysis of the randomized trials. CLL Trialists' Collaborative Group. *J. Natl. Cancer Inst*. 1999 May 19;91(10):861–8.
12. Zenz T, Gribben JG, Hallek M, et al. Risk categories and refractory CLL in the era of chemoimmunotherapy. *Blood*. 2012 May 3;119(18):4101–7.
13. Mahindra A, Laubach J, Raje N, Munshi N, Richardson PG, Anderson K. Latest advances and current challenges in the treatment of multiple myeloma. *Nat Rev*

Clin Oncol. 2012 Mar;9(3):135–43.

14. Kyle RA, Therneau TM, Rajkumar SV, Larson DR, Plevak MF, Offord JR, et al. Prevalence of monoclonal gammopathy of undetermined significance. *N Engl J Med*. 2006 Mar 30;354(13):1362–9.
15. Joint Task Force of the EFNS and the PNS. European Federation of Neurological Societies/Peripheral Nerve Society Guideline on management of paraproteinemic demyelinating neuropathies. Report of a Joint Task Force of the European Federation of Neurological Societies and the Peripheral Nerve Society—first revision. *J. Peripher. Nerv. Syst.* 2010. pp. 185–95.
16. Merlini G, Palladini G. Differential diagnosis of monoclonal gammopathy of undetermined significance. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*. 2012;2012:595–603.
17. Delmont E, Jeandel P-Y, Hubert AM, Marcq L, Boucraut J, Desnuelle C. Successful treatment with rituximab of one patient with CANOMAD neuropathy. *J. Neurol.* 2009 Dec 4;257(4):655–7.
18. Nobile-Orazio E, Manfredini E, Carpo M, Meucci N, Monaco S, Ferrari S, et al. Frequency and clinical correlates of anti-neural IgM antibodies in neuropathy associated with IgM monoclonal gammopathy. *Ann Neurol*. 1994 Sep;36(3):416–24.
19. Launay M, Delmont E, Benaïm C, Sacconi S, Butori C, Desnuelle C. Les polyneuropathies avec IgM monoclonale anti-MAG : étude descriptive clinique, biologique, électrophysiologique et anatomopathologique d’une cohorte de 13 patients. *Rev. Neurol. (Paris)*. 2009 Dec;165(12):1071–9.
20. Ellie E, Vital A, Steck A, Boiron JM, Vital C, Julien J. Neuropathy associated with “benign” anti-myelin-associated glycoprotein IgM gammopathy: clinical, immunological, neurophysiological pathological findings and response to treatment in 33 cases. *J. Neurol.* 1996 Jan;243(1):34–43.
21. Chassande B, Leger JM, Younes-Chennoufi AB, Bengoufa D, Maisonobe T, Bouche P, et al. Peripheral neuropathy associated with IgM monoclonal gammopathy: correlations between M-protein antibody activity and clinical/electrophysiological features in 40 cases. *Muscle Nerve*. 1998 Jan;21(1):55–62.
22. Bayreuther C, Delmont E, Borg M, Fontaine D. Deep brain stimulation of the ventral intermediate thalamic nucleus for severe tremor in anti-MAG neuropathy. *Mov. Disord*. 2009 Oct 30;24(14):2157–8.
23. Antoine JC, Steck A, Michel D. [Fatal peripheral neuropathy with predominant motor involvement associated with anti-MAG IgM monoclonal gammopathy]. *Rev. Neurol. (Paris)*. 1993;149(8-9):496–9.
24. Attarian S, Azulay JP, Boucraut J, Escande N, Pouget J. Terminal latency index and modified F ratio in distinction of chronic demyelinating neuropathies. *Clin*

Neurophysiol. 2001 Mar;112(3):457–63.

25. Kaku DA, England JD, Sumner AJ. Distal accentuation of conduction slowing in polyneuropathy associated with antibodies to myelin-associated glycoprotein and sulphated glucuronyl paragloboside. *Brain*. 1994 Oct;117 (Pt 5):941–7.
26. Caudie C, Kaygisiz F, Jaquet P, Petiot P, Gonnaud P-M, Antoine JC, et al. [Diagnostic value of autoantibodies to MAG by ELISA Bühlmann in 117 immune-mediated peripheral neuropathies associated with monoclonal IgM to SGPG/SGLPG]. *Ann. Biol. Clin. (Paris)*. 2006 Jul;64(4):353–9.
27. Nobile-Orazio E, Nobile-Orazio E, Meucci N, Meucci N, Baldini L, Baldini L, et al. Long-term prognosis of neuropathy associated with anti-MAG IgM M-proteins and its relationship to immune therapies. *Brain*. 2000 Apr;123 (Pt 4):710–7.
28. Lunn MPT, Nobile-Orazio E. Immunotherapy for IgM anti-myelin-associated glycoprotein paraprotein-associated peripheral neuropathies. *Cochrane Database Syst Rev*. 2012;5:CD002827.
29. Renaud S, Renaud S, Gregor M, Gregor M, Fuhr P, Fuhr P, et al. Rituximab in the treatment of polyneuropathy associated with anti-MAG antibodies. *Muscle Nerve*. 2003 May;27(5):611–5.
30. Benedetti L, Benedetti L, Briani C, Briani C, Grandis M, Grandis M, et al. Predictors of response to rituximab in patients with neuropathy and anti-myelin associated glycoprotein immunoglobulin M. *J. Peripher. Nerv. Syst*. 2007 Jun;12(2):102–7.
31. Niermeijer JMF, Niermeijer JMF, Eurelings M, Eurelings M, Lokhorst HL, Lokhorst HL, et al. Rituximab for polyneuropathy with IgM monoclonal gammopathy. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatr*. 2009 Aug 14;80(9):1036–9.
32. Delmont E, Jeandel P-Y, Benaïm C, Rosenthal E, Fuzibet JG, Desnuelle C. Treatment with rituximab in patients with polyneuropathy with anti-MAG antibodies. *J. Neurol*. 2011 Mar 25;258(9):1717–9.
33. Renaud S, Renaud S, Fuhr P, Fuhr P, Gregor M, Gregor M, et al. High-dose rituximab and anti-MAG-associated polyneuropathy. *Neurology*. 2006 Mar 14;66(5):742–4.
34. Dalakas MC, Rakocevic G, Rakocevic G, Salajegheh M, Salajegheh M, Dambrosia JM, et al. Placebo-controlled trial of rituximab in IgM anti-myelin-associated glycoprotein antibody demyelinating neuropathy. *Ann Neurol*. 2009 Mar;65(3):286–93.
35. Léger J-M, Viala K, Nicolas G, et al. Placebo-controlled trial of rituximab in IgM anti-myelin-associated glycoprotein neuropathy. *Neurology*. 2013 May 10.
36. Gironi M, Saresella M, Ceresa L, Calvo M, Ferrante P, Merli F, et al. Clinical and immunological worsening in a patient affected with Waldenstrom macroglobulinemia and anti-mag neuropathy after treatment with rituximab.

Haematologica. 2006 Jun;91(6 Suppl):ECR17.

37. Ghobrial IM, Fonseca R, Greipp PR, Blood E, Rue M, Vesole DH, et al. Initial immunoglobulin M “flare” after rituximab therapy in patients diagnosed with Waldenstrom macroglobulinemia: an Eastern Cooperative Oncology Group Study. *Cancer*. 2004 Dec 1;101(11):2593–8.
38. Gruson B, Ghomari K, Beaumont M, Garidi R, Just A, Merle P, et al. Long-term response to rituximab and fludarabine combination in IgM anti-myelin-associated glycoprotein neuropathy. *J. Peripher. Nerv. Syst.* 2011 Sep;16(3):180–5.
39. Delmont E. Anti-CD20 et maladies neuromusculaires : quelles indications et quel usage ? *Pratique Neurologique - FMC*. 2012 Apr;3(2):111–8.
40. Willison HJ, O'Leary CP, Veitch J et al. The clinical and laboratory features of chronic sensory ataxic neuropathy with anti-disialosyl IgM antibodies. *Brain*. 2001 Oct;124(Pt 10):1968–77.
41. Delmont E, Jeandel P-Y, Hubert AM, Marcq L, Boucraut J, Desnuelle C. Successful treatment with rituximab of one patient with CANOMAD neuropathy. *J. Neurol.* 2010 Apr;257(4):655–7.
42. Dispenzieri A. POEMS syndrome: Update on diagnosis, risk-stratification, and management. *Am. J. Hematol.* 2012 Jul 17;87(8):804–14.
43. Dispenzieri A A. How I treat POEMS syndrome. *Blood*. 2012 Jun 14;119(24):5650–8.
44. Gronier S, Delmont E, Legros L, Launay M, Jeandel P-Y, Fuzibet JG, et al. Efficacité à moyen terme de l'autogreffe de cellules souches hématopoïétiques périphériques sur la polyneuropathie du syndrome POEMS : expérience chez 5 cas. *Revue Neurologique*; 2013 Oct.
45. Desport E, Bridoux F, Sirac C, Delbes S, Bender S, Fernandez B, et al. Al amyloidosis. *Orphanet J Rare Dis*. 2012;7:54.
46. Kroemer G, El-Deiry WS, Golstein P, Peter ME, Vaux D, Vandenabeele P, et al. Classification of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death. *Cell Death Differ*. 2005 Nov;12:1463–7.
47. Kroemer G, Galluzzi L, Vandenabeele P, Abrams J, Alnemri ES, Baehrecke EH, et al. Classification of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2009. *Cell Death Differ*. 2008 Oct 10;16(1):3–11.
48. Galluzzi L, Vitale I, Abrams JM, et al. Molecular definitions of cell death subroutines: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2012. *Cell Death Differ*. [Internet]. Nature Publishing Group; 2011 Jul 15;19(1):107–20.
49. Kerr JF, Wyllie AH, Currie AR. Apoptosis: a basic biological phenomenon with

- wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br. J. Cancer*. 1972 Aug;26(4):239–57.
50. Kepp O, Galluzzi L, Lipinski M, Yuan J, Kroemer G. Cell death assays for drug discovery. *Nature Publishing Group*. *Nature Publishing Group*; 2011 Mar 1;10(3):221–37.
 51. Levine B, Kroemer G. Autophagy in the Pathogenesis of Disease. *Cell*. 2008 Jan;132(1):27–42.
 52. Desnuelle C, Salviati L. Challenges in diagnosis and treatment of late-onset Pompe disease. *Current Opinion in Neurology*. 2011 Oct;24(5):443–8.
 53. Schweichel JU, Merker HJ. The morphology of various types of cell death in prenatal tissues. *Teratology*. 1973 Jun;7(3):253–66.
 54. Vandenabeele P, Galluzzi L, Berghe TV, Kroemer G. Molecular mechanisms of necroptosis: an ordered cellular explosion. *Nature Publishing Group*. *Nature Publishing Group*; 2010 Sep 8;11(10):700–15.
 55. Micheau O, Tschopp J. Induction of TNF receptor I-mediated apoptosis via two sequential signaling complexes. *Cell*. 2003 Jul 25;114(2):181–90.
 56. Tenev T, Bianchi K, Darding M, Broemer M, Langlais C, Wallberg F, et al. The Ripoptosome, a signaling platform that assembles in response to genotoxic stress and loss of IAPs. *Mol. Cell*. 2011 Aug 5;43(3):432–48.
 57. Wang Z, Jiang H, Chen S, Du F, Wang X. The Mitochondrial Phosphatase PGAM5 Functions at the Convergence Point of Multiple Necrotic Death Pathways. *Cell*. Elsevier Inc; 2012 Jan 20;148(1-2):228–43.
 58. Degterev A, Degterev A, Hitomi J, Hitomi J, Gemscheid M, Gemscheid M, et al. Identification of RIP1 kinase as a specific cellular target of necrostatins. *Nat. Chem. Biol.* 2008 May;4(5):313–21.
 59. Moujalled DM, Cook WD, Okamoto T, Murphy J, Lawlor KE, Vince JE, et al. TNF can activate RIPK3 and cause programmed necrosis in the absence of RIPK1. *Cell Death Dis.* 2013;4:e465.
 60. Maas C, Tromp JM, van Laar J, Thijssen R, Elias JA, Malara A, et al. CLL cells are resistant to smac mimetics because of an inability to form a ripoptosome complex. *Nature Publishing Group*; 2013 Aug 20;4(8):e782–9.
 61. Lo S-C, Hannink M. PGAM5 tethers a ternary complex containing Keap1 and Nrf2 to mitochondria. *Exp. Cell Res.* 2008 May 1;314(8):1789–803.
 62. Otera H, Otera H, Mihara K, Mihara K. Molecular mechanisms and physiologic functions of mitochondrial dynamics. *J. Biochem.* 2011 Mar;149(3):241–51.
 63. Bras M, Yuste VJ, Roue G, Barbier S, Sancho P, Virely C, et al. Drp1 Mediates Caspase-Independent Type III Cell Death in Normal and Leukemic Cells. 2007

Oct 1;27(20):7073–88.

64. Bereiter-Hahn J, Vöth M. Dynamics of mitochondria in living cells: shape changes, dislocations, fusion, and fission of mitochondria. *Microsc. Res. Tech.* 1994 Feb 15;27(3):198–219.
65. Knott AB, Perkins G, Schwarzenbacher R, Bossy-Wetzel E. Mitochondrial fragmentation in neurodegeneration. *Nat Rev Neurosci.* 2008 Jul;9(7):505–18.
66. Wasiak S, Zunino R, McBride HM. Bax/Bak promote sumoylation of DRP1 and its stable association with mitochondria during apoptotic cell death. *J. Cell Biol.* 2007 May 7;177(3):439–50.
67. Yoon Y, Krueger EW, Oswald BJ, McNiven MA. The mitochondrial protein hFis1 regulates mitochondrial fission in mammalian cells through an interaction with the dynamin-like protein DLP1. *Mol. Cell. Biol.* 2003 Aug;23(15):5409–20.
68. Otera H, Wang C, Cleland MM, Setoguchi K, Yokota S, Youle RJ, et al. Mff is an essential factor for mitochondrial recruitment of Drp1 during mitochondrial fission in mammalian cells. *J. Cell Biol.* 2010 Dec 13;191(6):1141–58.
69. Youle RJ, Karbowski M. Mitochondrial fission in apoptosis. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2005 Aug;6(8):657–63.
70. Dickey AS, Strack S. PKA/AKAP1 and PP2A/B 2 Regulate Neuronal Morphogenesis via Drp1 Phosphorylation and Mitochondrial Bioenergetics. *Journal of Neuroscience.* 2011 Nov 2;31(44):15716–26.
71. Taguchi N, Ishihara N, Jofuku A, Oka T, Mihara K. Mitotic phosphorylation of dynamin-related GTPase Drp1 participates in mitochondrial fission. *J. Biochem.* 2007 Apr 13;282(15):11521–9.
72. Cho M-H, Kim D-H, Choi J-E, Chang E-J, Seung-YongYoon. Increased phosphorylation of dynamin-related protein 1 and mitochondrial fission in okadaic acid-treated neurons. *Brain Research. Elsevier B.V.*; 2012 Mar 26;;1–11.
73. Gomes LC, Di Benedetto G, Scorrano L. During autophagy mitochondria elongate, are spared from degradation and sustain cell viability. *Nature Publishing Group. Nature Publishing Group*; 2011 Apr 10;13(5):589–98.
74. Figueroa-Romero C, Iñiguez-Lluhí JA, Stadler J, Chang C-R, Arnoult D, Keller PJ, et al. SUMOylation of the mitochondrial fission protein Drp1 occurs at multiple nonconsensus sites within the B domain and is linked to its activity cycle. *FASEB J.* 2009 Nov;23(11):3917–27.
75. Harder Z, Zunino R, McBride H. Sumo1 Conjugates Mitochondrial Substrates and Participates in Mitochondrial Fission. *Current Biology.* 2004 Feb;14(4):340–5.
76. Youle RJ, van der Bliek AM. Mitochondrial Fission, Fusion, and Stress. *Science.* 2012 Aug 30;337(6098):1062–5.

77. Reilly MM, Khan S, Murphy SM, Zhou L, Laurá M. Charcot-Marie-Tooth disease. *J. Peripher. Nerv. Syst.* 2011 Mar;16(1):1–14.
78. Scheckhuber CQ, Erjavec N, Tinazli A, Hamann A, Nyström T, Osiewacz HD. Reducing mitochondrial fission results in increased life span and fitness of two fungal ageing models. *Nat. Cell Biol.* 2007 Jan;9(1):99–105.
79. Pitson SM. Regulation of sphingosine kinase and sphingolipid signaling. *Trends in Biochemical Sciences.* Elsevier Ltd; 2011 Feb 1;36(2):97–107.
80. Sabourdy F, Kedjouar B, Sorli SC, Colié S, Milhas D, Salma Y, et al. Functions of sphingolipid metabolism in mammals — Lessons from genetic defects. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids.* 2008 Apr;1781(4):145–83.
81. Hla T, Dannenberg AJ. Sphingolipid Signaling in Metabolic Disorders. *CMET.* Elsevier; 2012 Oct 3;16(4):420–34.
82. Hla T, Brinkmann V. Sphingosine 1-phosphate (S1P): Physiology and the effects of S1P receptor modulation. *Neurology.* 2011 Feb 22;76(8 Suppl 3):S3–8.
83. Svennerholm L. Designation and schematic structure of gangliosides and allied glycosphingolipids. *Prog. Brain Res.* 1994;101:XI–XIV.
84. Lowther J, Naismith JH, Dunn TM, Campopiano DJ. Structural, mechanistic and regulatory studies of serine palmitoyltransferase. *Biochem. Soc. Trans.* 2012 Jun 1;40(3):547–54.
85. Breslow DK, Weissman JS. Membranes in balance: mechanisms of sphingolipid homeostasis. *Mol. Cell.* 2010 Oct 22;40(2):267–79.
86. Chun J, Hartung H-P. Mechanism of action of oral fingolimod (FTY720) in multiple sclerosis. *Clin Neuropharmacol.* 2010 Mar;33(2):91–101.
87. Plomp JJ, Willison HJ. Pathophysiological actions of neuropathy-related anti-ganglioside antibodies at the neuromuscular junction. *The Journal of Physiology.* 2009 Aug 14;587(16):3979–99.
88. Hojjati MR, Li Z, Zhou H, Tang S, Huan C, Ooi E, et al. Effect of myriocin on plasma sphingolipid metabolism and atherosclerosis in apoE-deficient mice. *J. Biochem.* 2005 Mar 18;280(11):10284–9.
89. Zhang N, Qi Y, Wadham C, Wang L, Warren A, Di W, et al. FTY720 induces necrotic cell death and autophagy in ovarian cancer cells: A protective role of autophagy. *autophagy.* 2010 Nov 16;6(8):1157–67.
90. Segui B, Andrieuabadie N, Jaffrezou J, Benoist H, Levade T. Sphingolipids as modulators of cancer cell death: Potential therapeutic targets. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes.* 2006 Dec;1758(12):2104–20.
91. Saha S, Mohanty KC. Correlation of gangliosides GM2 and GM3 with metastatic

- potential to lungs of mouse B16 melanoma. *J. Exp. Clin. Cancer Res.* 2003 Mar;22(1):125–34.
92. McKallip R, Li R, Ladisch S. Tumor gangliosides inhibit the tumor-specific immune response. *J. Immunol.* 1999 Oct 1;163(7):3718–26.
 93. Crespo FA, Sun X, Cripps JG, Fernandez-Botran R. The immunoregulatory effects of gangliosides involve immune deviation favoring type-2 T cell responses. *J. Leukoc. Biol.* 2006 Mar;79(3):586–95.
 94. Hait NC, Oskeritzian CA, Paugh SW, Milstien S, Spiegel S. Sphingosine kinases, sphingosine 1-phosphate, apoptosis and diseases. *Biochim. Biophys. Acta.* 2006 Dec;1758(12):2016–26.
 95. Taha TA, Mullen TD, Obeid LM. A house divided: ceramide, sphingosine, and sphingosine-1-phosphate in programmed cell death. *Biochim. Biophys. Acta.* 2006 Dec;1758(12):2027–36.
 96. Ruvolo PP, Deng X, Ito T, Carr BK, May WS. Ceramide induces Bcl2 dephosphorylation via a mechanism involving mitochondrial PP2A. *J. Biochem.* 1999 Jul 16;274(29):20296–300.
 97. Chalfant CE, Rathman K, Pinkerman RL, Wood RE, Obeid LM, Ogretmen B, et al. De novo ceramide regulates the alternative splicing of caspase 9 and Bcl-x in A549 lung adenocarcinoma cells. Dependence on protein phosphatase-1. *J. Biochem.* 2002 Apr 12;277(15):12587–95.
 98. Lafont E, Dupont R, Andrieu-Abadie N, Okazaki T, Schulze-Osthoff K, Levade T, et al. *Biochimica et Biophysica Acta. BBA - Molecular and Cell Biology of Lipids.* Elsevier B.V; 2012 Apr 1;1821(4):684–93.
 99. Lee H, Rotolo JA, Mesicek J, Penate-Medina T, Rimner A, Liao W-C, et al. Mitochondrial ceramide-rich macrodomains functionalize Bax upon irradiation. *PLoS ONE.* 2011;6(6):e19783.
 100. Kågedal K, Zhao M, Svensson I, Brunk UT. Sphingosine-induced apoptosis is dependent on lysosomal proteases. *Biochem. J.* 2001 Oct 15;359(Pt 2):335–43.
 101. Thon L, Möhlig H, Mathieu S, Lange A, Bulanova E, Winoto-Morbach S, et al. Ceramide mediates caspase-independent programmed cell death. *FASEB J.* 2005 Dec;19(14):1945–56.
 102. Mehling M, Johnson TA, Antel J, Kappos L, Bar-Or A. Clinical immunology of the sphingosine 1-phosphate receptor modulator fingolimod (FTY720) in multiple sclerosis. *Neurology.* 2011 Feb 22;76(8 Suppl 3):S20–7.
 103. Cohen JA, Barkhof F, Comi G, Hartung H-P, Khatri BO, Montalban X, et al. Oral fingolimod or intramuscular interferon for relapsing multiple sclerosis. *N Engl J Med.* 2010 Feb 4;362(5):402–15.
 104. Kappos L, Radue E-W, O'Connor P, Polman C, Hohlfeld R, Calabresi P, et al. A

- Placebo-Controlled Trial of Oral Fingolimod in Relapsing Multiple Sclerosis. *N Engl J Med.* 2010 Feb 4;362(5):387–401.
105. Pelletier D, Hafler DA. Fingolimod for multiple sclerosis. *N Engl J Med.* 2012 Jan 26;366(4):339–47.
 106. Polman CH, Reingold SC, Banwell B, Clanet M, Cohen JA, Filippi M, et al. Diagnostic criteria for multiple sclerosis: 2010 revisions to the McDonald criteria. *Ann Neurol.* 2011 Feb;69(2):292–302.
 107. Lubetzki C. [Multiple sclerosis: emerging treatments]. *Bull. Acad. Natl. Med.* 2010 Apr;194(4-5):745–50–discussion751–2.
 108. Gräler MH. Targeting sphingosine 1-phosphate (S1P) levels and S1P receptor functions for therapeutic immune interventions. *Cell. Physiol. Biochem.* 2010;26(1):79–86.
 109. Brinkmann V. FTY720 (fingolimod) in Multiple Sclerosis: therapeutic effects in the immune and the central nervous system. *Br. J. Pharmacol.* 2009 Nov;158(5):1173–82.
 110. Andrian von UH, Mackay CR. T-cell function and migration. Two sides of the same coin. *N Engl J Med.* 2000 Oct 5;343(14):1020–34.
 111. Potteck H, Nieuwenhuis B, Lüth A, van der Giet M, Kleuser B. Phosphorylation of the immunomodulator FTY720 inhibits programmed cell death of fibroblasts via the S1P3 receptor subtype and Bcl-2 activation. *Cell. Physiol. Biochem.* 2010;26(1):67–78.
 112. Wallington-Beddoe CT, Hewson J, Bradstock KF, Bendall LJ. FTY720 produces caspase-independent cell death of acute lymphoblastic leukemia cells. autophagy. 2011 Feb 21;7(7):707–15.
 113. Liu Q, Liu Q, Zhao X, Zhao X, Frissora F, Frissora F, et al. FTY720 demonstrates promising preclinical activity for chronic lymphocytic leukemia and lymphoblastic leukemia/lymphoma. *Blood.* 2007 Dec 21;111(1):275–84.
 114. Neviani P, Neviani P, Santhanam R, Santhanam R, Oaks JJ, Oaks JJ, et al. FTY720, a new alternative for treating blast crisis chronic myelogenous leukemia and Philadelphia chromosome-positive acute lymphocytic leukemia. *J. Clin. Invest.* 2007 Sep;117(9):2408–21.
 115. Liu Q, Alinari L, Chen C-S, Yan F, Dalton JT, Lapalombella R, et al. FTY720 shows promising in vitro and in vivo preclinical activity by downmodulating Cyclin D1 and phospho-Akt in mantle cell lymphoma. *Clin. Cancer Res.* 2010 Jun 15;16(12):3182–92.
 116. LaMontagne K, Littlewood-Evans A, Schnell C, O'Reilly T, Wyder L, Sanchez T, et al. Antagonism of sphingosine-1-phosphate receptors by FTY720 inhibits angiogenesis and tumor vascularization. *Cancer Res.* 2006 Jan 1;66(1):221–31.

117. Pchejetski D, Bohler T, Brizuela L, Sauer L, Doumerc N, Golzio M, et al. FTY720 (Fingolimod) Sensitizes Prostate Cancer Cells to Radiotherapy by Inhibition of Sphingosine Kinase-1. *Cancer Res.* 2010 Oct 31;70(21):8651–61.
118. Azuma H, Takahara S, Ichimaru N, Wang JD, Itoh Y, Otsuki Y, et al. Marked prevention of tumor growth and metastasis by a novel immunosuppressive agent, FTY720, in mouse breast cancer models. *Cancer Res.* 2002 Mar 1;62(5):1410–9.
119. Azuma H, Takahara S, Horie S et al. Induction of apoptosis in human bladder cancer cells in vitro and in vivo caused by FTY720 treatment. *J. Urol.* 2003 Jun;169(6):2372–7.
120. Hung J-H, Lu Y-S, Wang Y-C, Ma Y-H, Wang D-S, Kulp SK, et al. FTY720 induces apoptosis in hepatocellular carcinoma cells through activation of protein kinase C delta signaling. *Cancer Res.* 2008 Feb 15;68(4):1204–12.
121. Saddoughi SA, Bozzolo E, Gencer S, et al. Sphingosine analogue drug FTY720 targets I2PP2A/SET and mediates lung tumour suppression via activation of PP2A-RIPK1-dependent necroptosis. *EMBO Mol Med.* 2012 Nov 25;5(1):105–21.
122. van Meeteren LA, Brinkmann V, Saulnier-Blache JS, Lynch KR, Moolenaar WH. Anticancer activity of FTY720: Phosphorylated FTY720 inhibits autotaxin, a metastasis-enhancing and angiogenic lysophospholipase D. *Cancer Lett.* 2008 Aug;266(2):203–8.
123. Avivi I, Stroopinsky D, Katz T. Anti-CD20 monoclonal antibodies: Beyond B-cells. *Blood Reviews.* Elsevier Ltd; 2013 Aug 13;:1–7.
124. D'Arena G, Rossi G, Vannata B, Deaglio S. REGULATORY T-CELLS IN CHRONIC LYMPHOCYTIC LEUKEMIA. *Mediterr J Hematol Infect Dis.* 2012 Jan 15;4(1).
125. Bayreuther C, Delmont E, Borg M, Fontaine D. Deep brain stimulation of the ventral intermediate thalamic nucleus for severe tremor in anti-MAG neuropathy. *Mov. Disord.* 2009 Oct 30;24(14):2157–8.
126. Khatri B, Barkhof F, Comi G, Hartung H-P, Kappos L, Montalban X, et al. Comparison of fingolimod with interferon beta-1a in relapsing-remitting multiple sclerosis: a randomised extension of the TRANSFORMS study. *Lancet Neurol.* 2011 Jun;10(6):520–9.
127. Bellodi C, Roth S, Bellodi C, Lidonnici MR, Delmont E, Lidonnici MR, et al. Targeting autophagy potentiates tyrosine kinase inhibitor-induced cell death in Philadelphia chromosome-positive cells, including primary CML stem cells. *J. Clin. Invest.* 2009 May;119(5):1109–23.
128. Česen MH, Pegan K, Spes A, Turk B. Lysosomal pathways to cell death and their therapeutic applications. *Exp. Cell Res.* 2012 Jul 1;318(11):1245–51.
129. Kaczmarek A, Vandenabeele P, Krysko DV. Necroptosis: The Release of Damage-Associated Molecular Patterns and Its Physiological Relevance. *Immunity.*

Elsevier Inc; 2013 Feb 21;38(2):209–23.

130. Oaks JJ, Santhanam R, Walker CJ, Roof S, Harb JG, Ferencak G, et al. Antagonistic activities of the immunomodulator and PP2A-activating drug FTY720 (Fingolimod, Gilenya) in Jak2-driven hematologic malignancies. *Blood*. 2013 Sep 12;122(11):1923–34.
131. Christensen DJ, Chen Y, Oddo J, Matta KM, Neil J, Davis ED, et al. SET oncoprotein overexpression in B-cell chronic lymphocytic leukemia and non-Hodgkin lymphoma: a predictor of aggressive disease and a new treatment target. *Blood*. 2011 Oct 13;118(15):4150–8.
132. Ogretmen B, Hannun YA. Biologically active sphingolipids in cancer pathogenesis and treatment. *Nature Reviews Cancer*. 2004 Aug;4(8):604–16.
133. Brinkmann V. Sphingosine 1-phosphate receptors in health and disease: mechanistic insights from gene deletion studies and reverse pharmacology. *Pharmacol. Ther.* 2007 Jul;115(1):84–105.
134. Mao Y, Wang J, Zhao Y, Wu Y, Kwak KJ, Chen C-S, et al. A novel liposomal formulation of FTY720 (Fingolimod) for promising enhanced targeted delivery. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine*. 2013 Aug 20.
135. Conzett KB, Kolm I, Jelcic I, Kamarachev J, Dummer R, Braun R, et al. Melanoma occurring during treatment with fingolimod for multiple sclerosis: a case report. *Arch Dermatol*. 2011 Aug;147(8):991–2.
136. Lorvik KB, Bogen B, Corthay A. Fingolimod blocks immunosurveillance of myeloma and B-cell lymphoma resulting in cancer development in mice. *Blood*. 2012 Mar 1;119(9):2176–7.
137. Harris SL, Levine AJ. The p53 pathway: positive and negative feedback loops. *Oncogene*. 2005 Apr 18;24(17):2899–908.
138. Stacchini A, Aragno M, Vallario A et al. MEC1 and MEC2: two new cell lines derived from B-chronic lymphocytic leukaemia in prolymphocytoid transformation. *Leuk. Res.* 1999 Feb;23(2):127–36.