

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية

RÉPUBLIQUE ALGÉRIENNE DÉMOCRATIQUE ET POPULAIRE

وزارة التعليم العالي والبحث العلمي

MINISTÈRE DE L'ENSEIGNEMENT SUPÉRIEUR ET DE LA RECHERCHE
SCIENTIFIQUE

Université Saad Dahleb Blida-1

Faculté de Médecine



جامعة سعد دحلب البليدة-1

كلية الطب

Département de Pharmacie

Mémoire présenté en vue de l'obtention du Diplôme de Doctorat en pharmacie

Intitulé :

Cryoglobulinémie : Manifestations cliniques et immunologiques

Présenté et soutenu par :

Session JUIL 2019

KHEROURI RABAH

DELLAL AYOUB

Jury d'évaluation:

Président du jury : **Dr Boudjella. M.L** Maitre de conférence A.

Examinateur : **Dr RACHEDI. N** Assistante en immunologie.

Examinateur : **Dr ZELTNI. M.L** Assistant en immunologie.

Encadreur : **Dr BENREBHA. N** Assistante en immunologie.

Année universitaire 2018 – 2019

بِسْمِ اللَّهِ الرَّحْمَنِ الرَّحِيمِ

سبحانك لا علم لنا إلا ما علمتنا

إننا أنت العليم الحكيم

سورة البقرة: الآية: 32

صَلِّ عَلَى اللَّهِ الْعَظِيمِ

Remerciements

Tout d'abord, nous remercions Allah le tout puissant et miséricordieux de nous avoir donné le courage de poursuivre nos études, ainsi qu'à nos chers parents qui se sont sacrifiés pour notre réussite.

Un mutuel merci de chacun de nous à l'autre s'impose. Pour l'amour du savoir et pour l'excellence qu'on s'est partagé, pour la confiance et le respect.

Nous tenons ensuite à exprimer notre profonde gratitude au Professeur Meghlaoui pour nous avoir accueillis au sein de son service.

Nous tenons à adresser nos sincères remerciements avec un grand respect à notre promotrice DR BENREBHA pour ses précieux conseils, ses encouragements et surtout sa bonté et son soutien favorable pour l'aboutissement de ce travail.

Nous remercions également à tous nos professeurs qui ont contribué à la formation et l'encadrement dont nous avons bénéficié tout au long de notre cursus en pharmacie.

Nos vifs remerciements vont également aux membres du jury Dr Boudjella L, Dr Rachedi N et Dr Zeltni L pour l'intérêt qu'ils ont porté à notre recherche en acceptant d'examiner notre travail et de l'enrichir par leurs propositions.

Enfin, nous remercions le personnel médical et paramédical qui ont contribué de près ou de loin à la réalisation de ce modeste travail.

DEDICACES

Au nom de dieu le clément et le miséricordieux louange à Allah le tout puissant

Je dédie ce travail en signe de respect, reconnaissance et de remerciement :

*A ma très chère mère **SAFIA***

Quoi que je fasse ou que je dise, je ne saurai point te remercier comme il se doit. Ton affection me couvre, ta bienveillance me guide et ta présence à mes cotes a toujours été ma source de force pour affronter les différents obstacles.

*A mon très cher père **AISSA***

Autant de phrases et d'expressions aussi éloquentes soit elles ne sauraient exprimer ma gratitude et ma reconnaissance. Tu as su m'inculquer le sens de la responsabilité, de l'optimisme et de la confiance en soi face aux difficultés de la vie. Tes conseils ont toujours guidé mes pas vers la réussite. Ta patience sans fin, ta compréhension et ton encouragement sont pour moi le soutien indispensable que tu as toujours su m'apporter. Je te dois ce que je suis aujourd'hui et ce que je serai demain et je ferai toujours de mon mieux pour rester ta fierté et ne jamais te décevoir. Que Dieu le tout puissant te preserve, t'accorde santé, bonheur, quiétude de l'esprit et te protège de tout mal.

*A mon cher frère **SOHEIB** pour leur appui et leur encouragement.*

A tous mes enseignants (es) Merci de m'avoir montré les clés du succès : avoir confiance en soi et en mes capacités, croire en soi et toujours tenter de se dépasser.

*A mes meilleurs amis (es) **OUSSAMA, NACER** et **SIHEM** merci d'être l'épaulé sur laquelle je peux toujours compter, et me rend toujours heureux.*

A tous mes collègues de promo

Qui m'ont aidé de près ou de loin dans la réalisation de ce mémoire.

A toute ma famille

A tous ceux que j'aime et ceux qui m'aiment.

RABAH

DEDICACES

Je dédie cette thèse à ...

*A mes très chers parents **AHMED ET BAHIA**
Ce travail représente le si peu avec lequel je pourrai vous remercier,
aucune dédicace ne
saurait exprimer à sa juste valeur, l'ampleur de l'affection et de
l'admiration que
j'éprouve pour vous.
Que Dieu vous garde et vous accorde longue vie afin que je puisse
à mon tour vous combler.*

*A mes chers frères **MOHAMED, MEROUANE** et ma sœur **SAMIRA**
Je vous dédie ce travail en témoignage de l'amour et du soutien que
vous m'avez
toujours donné. Je vous remercie énormément pour votre soutien.
Que Dieu vous protège et consolide les liens sacrés qui nous unissent.*

*A toute ma famille
Vous m'avez toujours offert soutien et réconfort. J'exprime envers vous
une profonde
admiration, reconnaissance et attachement inconditionnels.*

*A mes amis **RABAH, BILAL** et **CHAHINEZ**
A tous ceux qui me sont trop chers et que j'ai omis de citer.
A tous ceux qui ont contribué, de près ou de loin à l'élaboration de ce
travail.*

*A tous mes camarades de promotion
Veuillez trouver dans ce travail l'expression de mon respect le plus
profond.
Que Dieu tout puissant vous donne la force d'exercer votre profession
avec
dignité.*

A Tous Mes enseignants tout au long de mes études.

AYOUB

Sommaire :

Introduction :.....	1
Partie Théorique	2
I. Définition :	3
II. Historique :.....	3
III. Classification des cryoglobulines :.....	6
III.1. Selon leur aspect à +4°C :.....	6
III.1.a. Sous forme d'un cryoprécipité :.....	6
III.1.b. Sous forme d'un gel :.....	7
III.1.c. Sous forme de cristaux :.....	7
III.2. Selon leur composition immunochimique :	7
III.2.a. Cryoglobulines monoclonales (Type I) :.....	8
III.2.b. Cryoglobulines Type II :.....	9
III.2.c. Cryoglobulines Type III :.....	10
III.2.d. Cryoglobulines type IV :.....	11
IV. Études épidémiologiques :.....	14
V. Physiopathologie :.....	15
V.1. Phénomènes de cryoprécipitation :	16
V.1.a. Existence d'une anomalie de structure :.....	16
V.1.b. Facteurs influençant la précipitation :	16
V.2. Mécanismes lésionnels (aspects anatomo-cliniques) :.....	17
V.2.a. Cryoglobulines monoclonales de type I :.....	17
V.1.d. Cryoglobulines mixtes de type II et III :.....	17
VI. Étiologies des cryoglobulines :.....	18
VI.1. Les maladies auto-immunes :.....	18
VI.2. Syndromes lymphoprolifératifs :.....	18
VI.3. Maladies infectieuses :.....	18
VI.3.a. Les virus :.....	18
VI.3.b. Les bactéries :.....	18
VI.3.c. Les parasites et champignons :.....	19
VII. Manifestations cliniques :	22

VII.1.	Syndrome d'hyperviscosité :.....	22
VII.2.	Manifestations cutanées :.....	22
VII.2.a.	Purpura cutané :.....	23
VII.2.b.	Ulcères cutanés :.....	23
VII.2.c.	Autres manifestations cutanées :	24
VII.3.	Les manifestations vasomotrices :.....	24
VII.3.a.	Acrocyanose des extrémités :.....	24
VII.3.b.	Livédo réticularis :.....	25
VII.3.c.	Syndrome de Raynaud :	25
VII.3.d.	Manifestations rhumatismales :	25
VII.4.	Complications neurologiques :	26
VII.4.a.	Complications neurologiques périphériques :.....	26
VII.5.	Manifestations rénales :	27
VII.6.	Autres manifestations :.....	28
VII.6.a.	Atteintes gastro-intestinales :.....	28
VII.6.b.	Atteintes pulmonaires :.....	28
VII.6.c.	Atteintes cardiaques :	29
VIII.	Manifestations biologiques des cryoglobulinémies :.....	31
IX.	Diagnostic :.....	32
IX.1.	La phase pré analytique :.....	32
IX.1.a.	Obtention des échantillons :.....	32
IX.2.	Recherche de la cryoglobuline:.....	34
IX.2.a.	Obtention du cryoprécipité :.....	34
IX.2.b.	Lecture du cryoprécipité :	34
IX.2.c.	Resolubilisation :	35
IX.2.d.	Isolement et lavage du cryoprécipité :.....	35
IX.3.	Dosage du cryoprécipité :.....	36
IX.3.a.	. Détection quantitative de cryoglobuline par cryocrite :.....	36
IX.3.b.	La teneur totale en protéines :.....	38
IX.4.	Identification de la cryoglobuline : (typage immunochimique) :.....	38
IX.4.a.	Analyse par électrophorèse :	39
IX.4.b.	Analyse par immunofixation (IF) :.....	39

IX.5. Autres techniques d'analyse des cryoglobulines :	40
IX.6. Examens immunochimiques complémentaires :	41
X. Traitement :	42
X.1. Traitement symptomatique :	42
X.2. Traitement étiologique :	42
Partie Pratique	43
OBJECTIFS :	44
I. Chapitre 1 : MATERIEL ET METHODES :	45
I.1. Matériel d'étude :	45
I.1.a. Matériels humains :	45
I.1.b. Matériel non humain :	45
I.2. Méthodes :	49
I.2.a. Phase pré-analytique (prélèvement) :	49
I.2.b. Recherche des cryoglobulines :	50
I.2.c. Quantification et identification des cryoprotéines :	50
II. Chapitre 2 : résultats et discussion	52
II.1. Résultats :	52
Caractéristiques de la population étudiée :	52
II.1.a. Répartition des patients selon le sexe et l'âge :	52
II.1.b. Répartition des patients selon leur service d'origine :	54
II.1.c. Répartition des patients selon les manifestations cliniques	55
II.1.d. RESULTATS DES CAS POSTIFS :	56
II.2. Discussion :	63
II.2.a. Aspect des cryoglobulines :	63
II.2.b. Délai de positivité des cryoglobulines :	63
II.2.c. Caractéristiques immunochimiques des cryoglobulines :	63
XI. Conclusion :	66
Références bibliographiques :	67
Annexe	74
Résumé	79
Abstract	80
ملخص	81

Liste des abréviations :

AAN: Auto anticorps antinucléaires

APL : anticorps anti phospholipides

ANCA : anticorps anti cytoplasme des neutrophiles

CM : cryoglobulinemie mixte

C3 : complément 3

C4 : complément 4

C50 : complément 50

C1q : complément 1q

CCP : anticorps anti protéines citrullinés

EPS : électrophorèse des protéines

FR : facteur rhumatoïde

IF : immunofixation

Ig : immunoglobuline

IgG : immunoglobuline G

IgM : immunoglobuline M

IgA : immunoglobuline A

IFN : interféron

HCV : virus de l'hépatite C

LNH : lymphome non hodgkinien

LLC : leucémie lymphoïde chronique

MICI : maladies inflammatoires chronique de l'intestin

SC : syndrome cryoglobulinemique

SNP : système nerveux périphérique

VIH : virus d'immunodéficience humaine

Listes des tableaux :

Tableau 1 : Historique de la cryoglobulinemie.....	4-5
Tableau 2 : Classification des cryoglobulines proposée par Brouet et al.....	12-13
Tableau 3 : Classification des cryoglobulines proposée par LeCarrer.....	13-14
Tableau 4 : Étiologies des cryoglobulinémies.....	19-20-21
Tableau 5 : Principales manifestations cliniques des cryoglobulines.....	30-31
Tableau 6 : l'interprétation quantitatif des cryoglobulines.....	38
Tableau 7 : Caractéristiques de la population étudiée.....	53
Tableau 8 : Répartition des patients selon le sexe.....	54
Tableau 9 : Répartition des patients selon l'âge.....	54
Tableau 10 : Répartition des patients selon services.....	55
Tableau 11 : Répartition des patients selon les manifestations cliniques.....	56
Tableau 12 : Répartition des patients positifs selon le sexe et l'âge.....	57
Tableau 13 : Fréquence des 2 types immunochimiques de cryoglobulines.....	65

Liste des figures :

Figure 1 : Photo de Maxwell M wintrob.....	5
Figure 2 : Différentes aspect de cryoglobuline.....	6
Figure 3 : cryoglobuline sous forme d'un Cryoprécipité.....	6
Figure 4 : cryoglobuline sous forme d'un gel.....	7
Figure 5 : classification des cryoglobulines.....	8
Figure 6 : Cryoglobuline de type I.....	9
Figure 7 : Cryoglobuline de type II.....	10
Figure 8 : Cryoglobuline mixte de type III.....	10
Figure 9 : cryoglobuline oligoclonale.....	11
Figure 10 : ulcère cutané.....	23
Figure 11 : Les atteintes cutanées en cryoglobulinémie.....	24
Figure 12 : livédo.....	25
Figure 13 : : Micrographie électronique montrant de multiples dépôts anormaux de cryoglobulines dans le nerf saphène.....	26
Figure 14 : étude en immunofluorescence du rein	27
Figure 15 : Vascularite systémique cryoglobulinémique.....	28
Figure 16 : étape de diagnostic de cryoglobulinémie.....	32
Figure 17 : cryoglobuline positive et de sérum lipidique et hémolysé	33
Figure 18 : Différents niveaux de cryoprécipités.....	37
Figure 19 : Immunofixation de cryoprécipités.....	40
Figure 20 : étuve	46
Figure 21 : Centrifugeuse thermo réglable.....	46
Figure 22 : réfrigérateur	47
Figure 23 : vortex	47
Figure 24 : automate SAS1-SAS2.....	48
Figure 25 : Kit EPS	48
Figure 26 : Kit IF.....	49
Figure 27 : répartition selon sexe	52
Figure 28 : répartition selon l'âge	53
Figure 29 : répartition selon services	54
Figure 30 : répartition selon manifestations cliniques	55
Figure 31 : répartition selon la positivité	56

Figure 32 : prélèvement de B.S.....	57
Figure 33 : EPS de B.S	58
Figure 34 : EPS de cryoprécipite du B.S	59
Figure 35 : résultat d'immunofixation du B.S.....	59
Figure 36 : EPS de K.KH	61
Figure 37 : EPS de cryoprécipite de K.KH	61
Figure 38 : résultat d'immunofixation de K.KH.....	62

Liste des annexes :

Annexe 1 : fiche de renseignement.....	67
Annexe 2 : fiche de suivi.....	68
Annexe 3 : protocole de la recherche et l'identification d'une cryoglobuline.....	69-70
Annexe 4 : fiche de résultat d'une cryoglobulinemie positive.....	71

Introduction :

Les cryoglobulines appartiennent au groupe des thermoprotéines, ce groupe particulier comporte un ensemble de protéines plasmatiques dont le comportement physicochimique est anormal à des températures inférieures à 37 °C (correspondant aux cryoprotéines) [1].

Ce sont des complexes multimoléculaires composés d'une ou plusieurs classes d'immunoglobulines, associées parfois à d'autres protéines. Elles ont la propriété de précipiter à basse température et de se redissoudre par réchauffement du sérum à +37 °C [2].

Trois types de cryoglobuline ont été déterminés selon le caractère mono- ou polyclonal de l'Ig ; Cette classification distingue ainsi les cryoglobulinémies de type I, composées d'une immunoglobuline monoclonale unique, et les cryoglobulinémies de type II et de type III, dites mixtes, car composées d'Ig d'isotypes différents. Les cryoglobulinémies de type II sont ainsi composées d'Ig polyclonales associées à un (ou plusieurs) composant(s) monoclonal alors que les cryoglobulinémies de type III sont constituées seulement d'Ig polyclonales [3].

Elles peuvent accompagner de nombreuses maladies : hémopathies lymphoplasmocytaires, maladies immunoprolifératives et maladies inflammatoires chroniques auto-immunes, infectieuses ou virales [4, 5].

La recherche d'une cryoglobuline nécessite des précautions particulières de prélèvement et un laboratoire expérimenté [6].

Notre travail s'est déroulé au sein de l'unité d'immunologie au niveau du UHU HASSIBA BEN BOUALI à BLIDA, dans laquelle nous avons réalisé une étude descriptive porte sur 26 patients, recrutés du janvier 2019 au mai 2019 dont l'objectif est :

- ❖ La recherche d'une cryoglobuline avec l'identification d'isotypage des cas positifs

Partie Théorique

I. Définition :

Les cryoprotéines sont des molécules formant des complexes précipitant à une température inférieure à 37 °C et se redissolvant à chaud. Elles sont composées essentiellement d'immunoglobulines et peuvent précipiter dès 36 °C.

Les cryoglobulinémies sont essentielles (primaires ou idiopathiques, par absence de pathologie sous-jacente), ou secondaires à diverses pathologies, en particulier des syndromes lymphoprolifératifs, des dyscrasies plasmocytaires, des maladies auto-immunes et des infections. Il est à souligner qu'une cryoglobulinémie est une anomalie biologique qui, dans de nombreux cas, reste asymptomatique. Elles se traduisent ou non par des signes cliniques. Elles peuvent précipiter dans les petits et moyens vaisseaux, entraînant une vascularite, en fonction de différents paramètres tels que le froid ou leur propension à former des complexes immuns.

Les cryoglobulines sont composées d'immunoglobulines monoclonales seules, ou associées à des immunoglobulines polyclonales, formant des complexes immuns. [7].

La mise en évidence des cryoglobulines se fait au laboratoire à une température de + 4 °C, mais leur amplitude thermique de précipitation peut varier de + 11 à + 37 °C [7]. Ceci explique la température d'apparition des signes cliniques, mais aussi les anomalies de certains examens biologiques rencontrées chez les patients, dont la cryoglobuline précipite à une température supérieure ou égale à la température ambiante, d'où l'importance dans ce cas d'effectuer ces analyses « à chaud », c'est-à-dire à de 37 °C [8].

II. Historique :

La première observation de précipitation des protéines sériques induite par le froid remonte à 1933, quand le professeur Maxwell Myer Wintrobe, le légendaire médecin scientifique qui a jeté les bases de l'hématologie moderne, décrit, en collaboration avec le Dr M. V. Buell, un cas inhabituel de myélome multiple chez une femme dont le sérum est réversiblement précipité au froid [7]. Après Quatorze ans, Lerner et Watson [10] ont montré des protéines précipitables au froid qui sont des gammaglobulines et les ont nommées « cryoglobulines ». Ils ont également inventé le terme « cryoglobulinémie » pour indiquer l'état clinique correspondant.

À cette époque, il a été pensé que les cryoglobulines sont structurellement formées par une seule protéine. En 1962, après isolement et purification de cryoglobulines par chromatographie échangeuse d'ions, Lospalluto et al en utilisant l'ultracentrifugation analytique [11].

Le syndrome cryoglobulinémique (SC) a été décrit en 1966 par Meltzer et ses collègues [3], qui ont déclaré 29 patients avec cryoglobulines et une présentation clinique commune (purpura, arthralgie et faiblesse), accompagnée par un dysfonctionnement d'organe et des concentrations sériques élevées de facteur rhumatoïde (FR). Ils ont également confirmé que les cryoglobulines sont constituées de deux composantes différentes de globulines et étaient constamment dotées d'une activité de FR. En raison de l'ignorance en ce qui concerne son étiologie, ils ont appelé cet état clinique cryoglobulinémie mixte (CM) « essentielle ».

Dans les années qui ont suivi, de nombreux chercheurs ont réalisé des études immunochimiques d'un certain nombre de cryoglobulines isolées et ont démontré leur hétérogénéité structurale. Sur la base de ces études et sur un examen de 86 patients, Brouet et al. [12] ont classé les cryoglobulines en trois types principaux. Les données historiques de développement de la cryoglobulinémie et un certain nombre d'avancées jusqu'à 2011 sont résumées dans le tableau :

Tableau 1: Historique de la cryoglobulinémie

<i>Année</i>	<i>Observations</i>
1933	Une protéine précipitable à froid est découverte dans le sérum d'un patient atteint de myélome multiple.
1947	Les termes «cryoglobuline» et «cryoglobulinémie» sont proposés et le phénomène est observé dans diverses maladies.
1966	Le tableau clinique et l'hétérogénéité structurale connue sous le nom de cryoglobulinémie mixte «essentielle» (CM) sont clairement définis.
1968-1970	Différentes cryoglobulines sont immunochimiquement caractérisées et leur importance comme inducteurs de lésions tissulaires est soulignée.
1974	Les cryoglobulines sont classées en trois types principaux.
1977	Le possible rôle étiologique du virus de l'hépatite B dans la CM «essentielle» est revendiqué, mais pas confirmé dans des études ultérieures.
1987	Le traitement par l'interféron α - (IFN- α recombinant se révèle être efficace chez les patients atteints de CM «essentielle».

1990-1994	La grande majorité des patients atteints de CM sont jugés infectés par le virus de l'hépatite C (HCV).
1994	Une progression potentielle de CM vers un lymphome non hodgkinien (LNH) évident est signalée par différents groupes, mais avec de fortes variations géographiques.
2003	Le rituximab, un anticorps monoclonal anti-CD20 chimérique, se trouve être cliniquement efficace chez les patients atteints de CM récurrente ou réfractaire, mais qui se traduit souvent par une augmentation des taux d'ARN sérique du HCV.
2005	Par analogie avec l'infection chronique HCV non cryoglobulinémique, l'IFN- α pégylé plus ribavirine sont proposés comme norme de soins de CM liées au HCV
2011	L'administration de nouveaux inhibiteurs de la protéase et de nouveaux anticorps monoclonaux anti-CD20 (Ofatumumab) est susceptible d'entraîner de meilleurs résultats que la thérapie PIRR.



Figure 1: Maxwell M. Wintrobe

III. Classification des cryoglobulines :

Le processus de cryoprécipitation se manifeste de façon très variable quantitativement mais aussi qualitativement ; c'est ainsi qu'il est possible de distinguer plusieurs types de cryoglobulines, selon leur aspect à +4 °C et surtout selon leur composition immunochimique [13].

III.1. Selon leur aspect à +4°C :

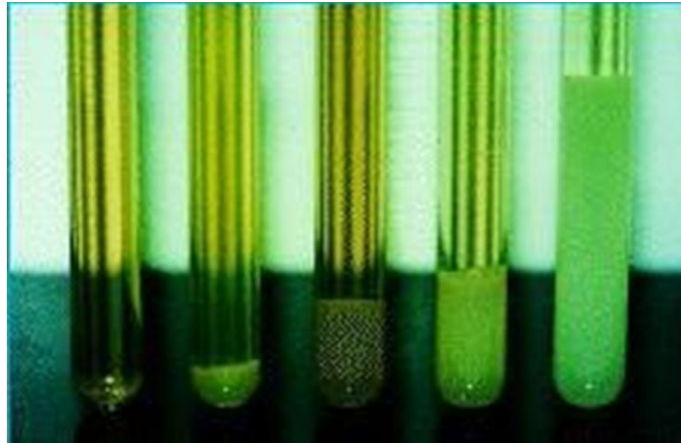


Figure 2: Différents aspect de cryoglobuline

III.1.a. Sous forme d'un cryoprécipité : cryoglobulines (les plus fréquentes).



Figure 3: cryoglobuline sous forme d'un cryoprécipité

III.1.b. Sous forme d'un gel :
cryoglobulines d'opacité et de viscosité variables (rares).



Figure 4: cryoglobuline sous forme d'un gel

III.1.c. Sous forme de cristaux :
cryocristalloglobulines (très rares).

III.2. Selon leur composition immunochimique :

En 1974, Brouet *et al.* [11] ont proposé une classification immunochimique des cryoglobulines basée sur l'immunoélectrophorèse. Cette classification est toujours utilisée.

L'amélioration des techniques biologiques de dépistage et de typage des cryoglobulines a permis la mise en évidence de cryoglobulines en concentrations moins importantes, dans les pathologies infectieuses ou auto-immunes. En utilisant ces techniques de typage, Le Carrer a proposé une nouvelle classification. Schifferli *et al.* [14] ont défini une classe appelée II-III correspondant à la classe IIb définie par Le Carrer.

Figure 5: classification des cryoglobulines

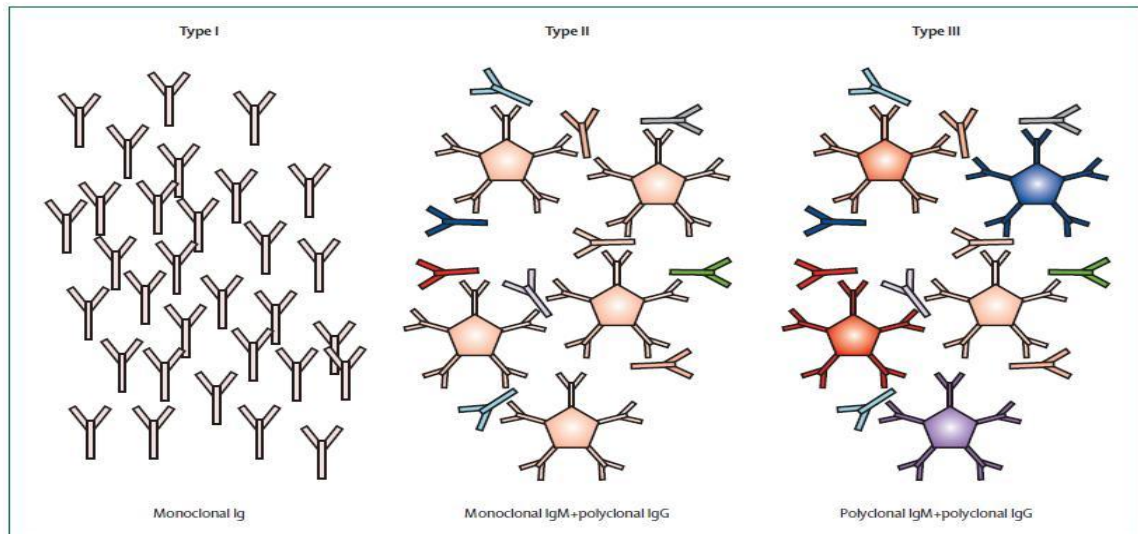


Figure 1: Classification of cryoglobulinaemia*

III.2.a. Cryoglobulines monoclonales (Type I) :

Ce sont surtout des IgM monoclonales, des IgG parfois (IgG2 ou IgG3), des IgA rarement, ou de rarissimes chaînes légères libres monoclonales : leur cryoprécipitation est rapide (en général en quelques heures à +4°C) et leur concentration élevée, souvent supérieure à 5g /L.

Leur précipitation peut survenir à des températures élevées, parfois supérieures à +30°C et la symptomatologie est liée à la fois à la cryoglobuline monoclonale mais aussi à l'hyperviscosité du sérum dont elle est parfois responsable. Leur aspect est le plus souvent celui d'un précipité, mais certaines IgM monoclonales peuvent former des cryogels et plus rarement, en particulier pour les IgG de sous classe IgG2, la cryoprécipitation peut se faire sous la forme de cristaux.

[14]

La détection et le typage de ce type de cryoglobulines sont intéressantes car elles accompagnent, mais précèdent aussi parfois de longue date, l'apparition d'une hémopathie maligne.

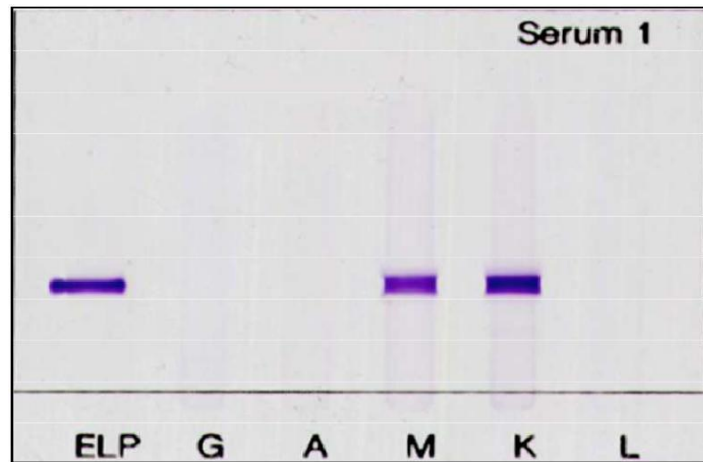


Figure 6: Cryoglobuline de type I, constituée d'IgM kappa monoclonale. [15]

III.2.b. Cryoglobulines Type II :

Ces cryoglobulines sont composées d'Ig appartenant à deux classes différentes, l'une d'entre elles étant monoclonale, on peut ainsi y trouver en ordre de fréquence trois types principaux de complexes immuns d'Ig :

Une IgM monoclonale associée à des IgG polyclonales. La fraction IgM monoclonale est douée d'une activité facteur rhumatoïde (FR) (IgM à activité anti IgG). Ce sont les cryoglobulines de type II les plus fréquentes ; Une IgG monoclonale associée à des IgG polyclonales (IgG à activité anti IgG), IgG monoclonale y étant souvent majoritaire Une IgA monoclonale associée à des IgG polyclonales (IgA à activité anti IgG) ; ce sont les cryoglobulines mixtes de type II les plus rares et il existe fréquemment dans ce cas une cryogélification. [14]

La cryoprécipitation des cryoglobulines de type II est en général assez rapide (une journée), les Ig étant parfois associées à des fractions du complément. Leur concentration est variable, généralement comprise entre 1 et 5 g /L et leur amplitude thermique très variable.

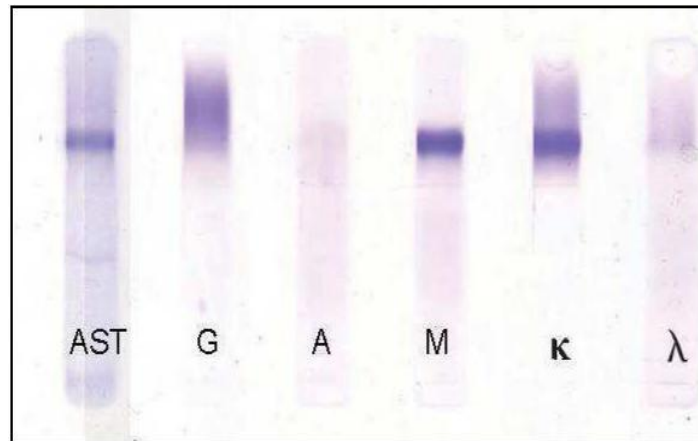


Figure 7: Cryoglobuline de type II associant une IgM Kappa monoclonale et des IgG polyclonales [20].

AST : Anti-sérum total

III.2.c. Cryoglobulines Type III :

Ce sont le plus souvent des complexes d'IgM polyclonales et d'IgG polyclonales ; comportant plus rarement des IgA polyclonales. Les Ig sont parfois associées à des fractions du complément (C4 ou C1q) ou à d'autres protéines sériques (lipoprotéines). Leur cryoprécipitation est en général lente (souvent plusieurs jours) et leur concentration assez faible dépasse très rarement 1 g/l. [14]

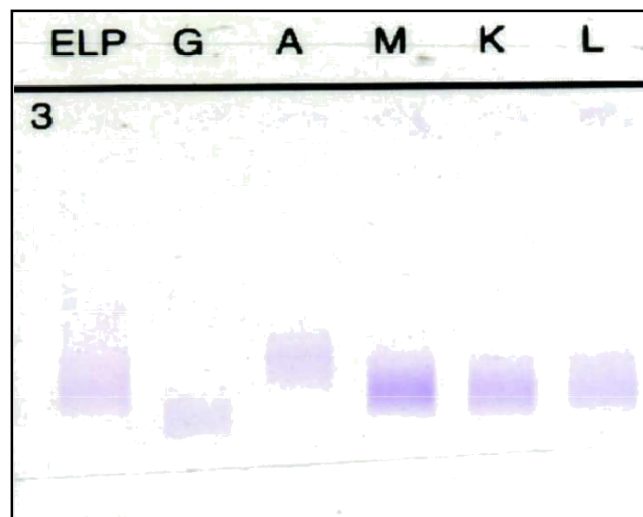


Figure 8: Cryoglobuline mixte de type III associant principalement des IgM polyclonales avec des IgG et des IgA polyclonales [15].

III.2.d. Cryoglobulines type IV :

À côté des types II et III, existe un troisième type de cryoglobulines mixtes (CM) montrant une composition micro hétérogène, dont la structure immunochimique ne peut pas être ajustée dans aucune des catégories décrites ci-dessus. L'utilisation des méthodes sensibles, telles que l'immunofixation (IF), immunoblot ou électrophorèse bidimensionnelle sur gel de polyacrylamide [15, 20, 21], montre qu'il s'agit de cryoglobulines comportant des Ig oligoclonales dont l'aspect multi-bandes en IF est très caractéristique, rencontré notamment dans le sérum de patients présentant une pathologie infectieuse virale (VIH ou hépatite C par exemple).

Cet aspect particulier de CM formée par IgM et/ou IgG oligoclonale et des traces d'immunoglobulines polyclonales est classé par certains auteurs comme étant un « pré-type » ou « type III oligoclonal », ou « type II – I II » [19] ou « IIb » comme défini par Le Carrer [15].

Une illustration du typage par immunofixation d'une cryoglobuline de ce type est présentée sur la figure 9.

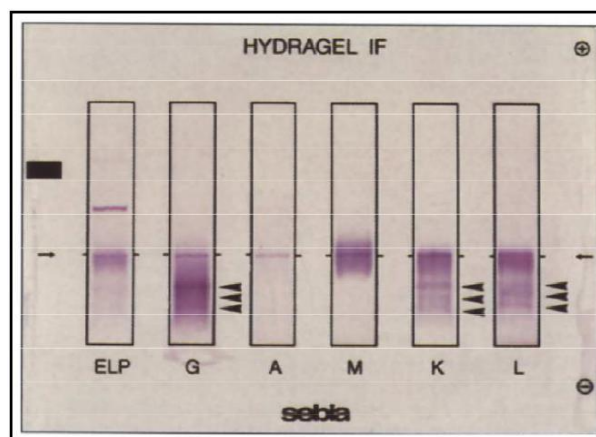


Figure 9: Cryoglobuline mixte comportant des IgM polyclonales et des IgG oligoclonales (◄) dans le cadre d'une hépatite virale [15].

En outre, Musset et al ont rapporté que 12% des 210 cas de CM présentaient une IgG monoclonale supplémentaire sur immunoblot caractérisée par les isotypes IgG1 (37 %) et IgG3 (63%). Les IgG3 ont un rôle particulier dans la génération des cryoglobulines, en raison de leur propriété physicochimique à se réunir grâce à l'interaction Fc-Fc spontanée et au potentiel cryogénique d'IgM-FR avec la spécificité d'activité anti IgG3 [23].

Tableau 2: Classification des cryoglobulines proposée par Brouet et al. [17, 12, 24, 25]

<i>Type de cryoglobuline</i>	<i>Type I : monoclonale</i>	<i>Type II : mixte monoclonale et polyclonale</i>	<i>Type III : mixte polyclonale</i>
<i>Caractère des Ig la composant</i>	Une Ig monoclonale	Une Ig monoclonale + une ou plusieurs classes d'Ig polyclonales	Une ou plusieurs classes d'Ig polyclonales
<i>Classe des Ig rentrant dans sa composition</i>	<ul style="list-style-type: none"> • IgM monoclonale (le plus souvent) • IgG monoclonale • IgA monoclonale • Chaînes légères libres d'Ig (très rares) 	<ul style="list-style-type: none"> • IgM monoclonale + IgG polyclonales (le plus souvent) • IgG monoclonale + IgG polyclonales • IgA monoclonale + IgG polyclonales • IgM monoclonale + IgG et IgA polyclonales 	<ul style="list-style-type: none"> • IgM ou IgG ou IgA polyclonales • IgG + IgM polyclonales • IgG + IgA polyclonales • IgM + IgG + IgA polyclonales
<i>Concentrations usuelles</i>	5-20 g/L	1-5 g/L	0,06-1 g/L
<i>Fréquence</i>	5-25%	40-60%	40-50%
<i>Type de cryoglobuline</i>	Type I : monoclonale	Type II : mixte monoclonale et polyclonale	Type III : mixte polyclonale

Seuil thermique commun / vitesse de précipitation / autres caractéristiques de laboratoire	>32°C / rapide (minutes-heures) / gélification de sang / formation de rouleaux sur le film de sang.	Généralement >23°C / intermédiaire (heures à jours) / C4 bas.	Variable, beaucoup sont < 23°C et peu susceptibles d'être cliniquement significative / lente (3-7 jours).
Maladies sous-jacentes	Troubles lymphoprolifératifs multiples : myélome, M.Waldenström, LLC, LNH à cellules B.	«Essentielle» ou secondaire aux infections (VHC, autres), troubles auto-immuns et /ou lymphoprolifératifs	«Essentielle» ou secondaire aux infections par (VHC et autres virus, bactéries, fongiques, parasitaires), maladies auto-immunes.

Tableau 3: Classification des cryoglobulines proposée par LeCarrer [57].

Type de la cryoglobuline	Caractère des Ig la composant	Classe des Ig rentrant dans sa composition
Type I : monoclonale	Une Ig monoclonale	<ul style="list-style-type: none"> • IgM monoclonale (le plus souvent) • IgG monoclonale • IgA monoclonale • Chaînes légères libres d'Ig (très rares)
Type IIa mixte : monoclonale et polyclonale	Une Ig monoclonale + une ou plusieurs classes d'Ig polyclonales	<ul style="list-style-type: none"> • IgM monoclonale + IgG polyclonales • IgG monoclonale + IgG polyclonales • IgA monoclonale + IgG polyclonales

		<ul style="list-style-type: none"> • IgM monoclonale + IgG et IgA polyclonales
<i>Type IIb mixte : oligoclonale et polyclonale</i>	Une ou plusieurs classes d'Ig oligoclonales + une ou plusieurs classes d'Ig polyclonales	IgG ou / et IgM oligoclonales+ IgG ou / et IgM polyclonales
<i>Type III mixte : polyclonale</i>	Une ou plusieurs classes d'Ig polyclonales	<ul style="list-style-type: none"> • IgM ou IgG ou IgA polyclonales • IgG + IgM polyclonales • IgG + IgA polyclonales • IgM + IgG + IgA polyclonales

IV. Études épidémiologiques :

Le syndrome cryoglobulinémique (SC) est considéré comme un trouble relativement rare, il n'existe pas encore d'études épidémiologiques suffisante concernant sa prévalence globale.

La fréquence des trois types de cryoglobulines est assez difficile à préciser, et leurs répartitions dépendant essentiellement de l'orientation médicale du laboratoire qui effectue les examens et des principaux services demandeurs. Les cryoglobulines de type III sont certainement plus fréquentes, les cryoglobulines de type I et II sont plus rares. Les chiffres les plus fréquemment donnés sont ceux de Brouet et al [19] à savoir

- « Type I 25%. » (38 %, constitués majoritairement d'une IgM kappa monoclonale.)
- « Type II 25%. » (37%, essentiellement une IgM kappa monoclonale associée à des IgG polyclonales.)
- « Type III 50%. » (25 %, surtout composées de complexes IgG polyclonales et IgM polyclonales.)

V. Physiopathologie :

Les cryoglobulines sont générées par l'expansion clonale des lymphocytes B, soit dans le cadre de syndromes lymphoprolifératifs, soit par la stimulation immunitaire persistante déclenchée par des infections chroniques ou des maladies auto-immunes.

Les cryoglobulinémies de types I et II résultent de l'expansion monoclonale d'un clone qui peut être ouvertement malin (myélome multiple), qui couvre (macroglobulinémie de Waldenström, lymphome plasmacytoïdes), ou indolent (comme dans gammopathie monoclonale de signification indéterminée). Par contre, l'expansion des cellules B est polyclonale dans la cryoglobulinémie type III [20].

La physiopathologie des cryoglobulinémies n'est que partiellement élucidée. Les paramètres physico-chimiques favorisant la cryoprécipitation sont mal connus. Brouet [3] souligne l'importance du pont disulfure, et l'abondance des résidus tyrosines comme facteurs favorisant la cryoprécipitation, ainsi que la salinité, le pH et la température du milieu qui déterminent la solubilité des complexes immuns circulants. De nombreuses autres hypothèses ont été avancées, portant principalement sur les caractéristiques structurales de l'immunoglobuline cryoprécipitante : composition en acides aminés, charge électrique, glycosylation. Néanmoins aucune explication univoque n'a été trouvée et de manière générale les cryoglobulines ne pourraient être considérées comme des molécules anormales, caractérisées par une conformation et un poids moléculaire singuliers. La spécificité anticorps de l'immunoglobuline cryoprécipitante est variable et inconstamment identifiée. Il s'agit le plus souvent d'une activité de type rhumatoïde (cryoglobulines de types II et III). Plus rarement la cible identifiée est de nature non immunoglobulinique [8]. De même, une cryoglobulinémie monoclonale IgG1 kappa de spécificité anti-streptolysine O (ASLO) a été décrite. Dans Certains cas, la liaison de l'antigène à son anticorps conférerait à celui-ci des propriétés cryoprécipitantes. Les cryoglobulines peuvent entraîner des lésions consécutives à des dépôts de complexes immuns circulants telles qu'une vascularite leucocytoclasique [3] et une obstruction des vaisseaux, essentiellement mais non exclusivement de petit calibre, à l'origine de phénomènes ischémiques [8].

V.1. Phénomènes de cryoprécipitation :

De nombreuses conditions physiques et chimiques peuvent influencer la précipitation des cryoglobulines : conditions liées aux molécules d'immunoglobulines (Ig) elles-mêmes et conditions liées à l'environnement de ces immunoglobulines.

V.1.a. Existence d'une anomalie de structure :

Les cryoglobulines ne pourraient être considérées comme des molécules anormales caractérisées par une conformation ou un poids moléculaire singulier. Cependant ; des hypothèses controversées ont été avancées concernant une modification de la structure des immunoglobulines, responsable de leur précipitation [4, 26, 27].

- Abondance des résidus tyrosine favorisant la précipitation.

- Oxydation de groupements thiols responsable de la polymérisation à froid des immunoglobulines et de leur précipitation.

V.1.b. Facteurs influençant la précipitation :

V.1.b.1. La température :

La condition essentielle pour la précipitation d'une cryoglobuline est la baisse de la température. Certaines cryoglobulines précipitent à température élevée, supérieure à +30°C, ceci pouvant expliquer en partie l'apparition d'un purpura puisque la température de la peau est fréquemment +28 °C. [4, 26, 27]

V.1.b.2. La force ionique :

La diminution de solubilité de la cryoglobuline est parallèle à la diminution de la force ionique du milieu. In vitro, un abaissement modère de la force ionique du milieu augmente la précipitation de certaines cryoglobulines. Une hyponatrémie vraie peut donc représenter un facteur de risque de précipitation. [4, 26, 27]

V.1.b.3. La concentration en ions du milieu réactionnel :

La précipitation des cryoglobulines est en fonction des ions présents dans le milieu : certaines précipitent seulement en présence d'une concentration définie en calcium. D'autres ions, baryum, manganèse, strontium, cobalt, influencent la précipitation des cryoglobulines sans qu'il soit possible d'en comprendre le mécanisme. [4, 26, 27]

V.1.b.4. La présence d'autres protéines plasmatiques dans le cryoprecipite :

La fibronectine jouerait un rôle dans la précipitation. [4, 26, 27]

V.1.b.5. La concentration en cryoglobuline:

Plus la concentration en cryoglobuline est importante, plus la température de précipitation est élevée. L'inverse a été démontré : une baisse de la concentration en cryoglobuline par plasmaphérèse diminue le seuil de température auquel débute la cryoprecipitation. Au niveau rénal, la filtration glomérulaire concentre les protéines sanguines, entraînant probablement une précipitation locale. [4, 26, 27]

V.2. Mécanismes lésionnels (aspects anatomo-cliniques) :

V.2.a. Cryoglobulines monoclonales de type I :

La symptomatologie observée peut être liée à la précipitation intra vasculaire de la cryoglobuline, hypothèse confirmée par les études anatomiques. Cette cryoprécipitation de l'Ig monoclonale étant favorisée par l'hyperviscosité et le froid est responsable secondairement d'une obstruction mécanique partielle ou complète des vaisseaux avec ischémie en aval.

Si le rôle du froid est évident lorsqu'il s'agit de vaisseaux superficiels, des dépôts observés dans les vaisseaux de viscères profonds protégés des variations thermiques (rein, mésentère), ont démontré que le froid n'est pas le seul facteur intervenant dans le dépôt intra vasculaire de la cryoglobuline [7]. Des modifications de la microcirculation, le rôle de l'ultrafiltration dans le rein, qui augmente la concentration en protéines et la viscosité sanguine, jouent fort probablement un rôle important [16].

V.1.d. Cryoglobulines mixtes de type II et III :

Les manifestations cliniques sont dues à la formation puis au dépôt dans la microcirculation de complexes immuns circulants responsables de lésions atteignant préférentiellement la peau et le rein (dépôts confirmés par des études en immunofluorescence sur biopsie rénale ou cutanée). Les immuns complexes circulants peuvent déclencher une cascade de phénomènes inflammatoires responsables d'une vascularite ; certaines cryoglobulines mixtes peuvent toutefois rester asymptomatiques pendant plusieurs années. La majorité des cryoglobulines mixtes peuvent interagir avec le complément, et, pour certaines du moins, la cryoprécipitation nécessite la présence de C1q, cette incorporation du complément augmentant la capacité de la cryoglobuline à provoquer des lésions tissulaires. [8]

VI. Étiologies des cryoglobulines :

Les étiologies des cryoglobulinémies mixtes sont très nombreuses (*tableau 4*). Tous les agents infectieux impliqués ont la particularité de persister longtemps dans l'organisme hôte conduisant donc à une stimulation antigénique prolongée et notamment les lymphocytes B. Les cryoglobulines mixtes disparaissent en même temps que l'agent causal [44 ;45].

VI.1. Les maladies auto-immunes :

La principale maladie auto-immune mise en cause est le lupus érythémateux aigu disséminé, surtout au moment des poussées lupiques. On notera également le syndrome de Gougerot sjögren, la spondylarthrite ankylosante, la polyarthrite rhumatoïde, la périarthrite noueuse, le syndrome de Kawasaki, les polymyosites, la sclérodermie, la cirrhose biliaire primitive, les maladies inflammatoires chroniques de l'intestin (MICI), les thyroïdites, la sarcoïdose, le syndrome POEMS ainsi que la maladie chronique des agglutinines froides [17, 9]

VI.2. Syndromes lymphoprolifératifs :

Les syndromes lymphoprolifératifs à cellules B sont la principale cause de cryoglobulinémie associée à la malignité. Les cryoglobulines de type I ou II peuvent être retrouvées dans 7 à 20 % des cas de maladie de Waldenström, dans 5 à 10 % des myélomes multiples, dans les plasmocytomes, les lymphomes non hodgkiniens et la maladie de Hodgkin, et dans une plus faible proportion, au cours des leucémies lymphoïdes chroniques [4, 10].

VI.3. Maladies infectieuses :

VI.3.a. Les virus :

C'est le virus de l'hépatite C qui est principalement en cause. L'implication de ce virus dans la vascularite cryoglobulinémique est très importante.

Beaucoup d'autres virus peuvent également être en cause comme le virus de l'hépatite B, de l'hépatite A, le virus de l'immunodéficience humaine, l'Epstein Barr virus, le cytomegalovirus ainsi que tous les adénovirus [46, 47].

VI.3.b. Les bactéries :

On retrouve notamment les infections à staphylocoques, la syphilis secondaire, la lèpre, les bactéries issues de court circuits intestinaux, la brucellose, la tuberculose pulmonaire, la fièvre Q, sans oublier les bactéries pourvoyeuses d'endocardites infectieuses. [4, 17, 9, 19].

VI.3.c. Les parasites et champignons :

On retrouve notamment le paludisme, la splénomégalie tropicale, la toxoplasmose, la leishmaniose viscérale, ainsi que les coccidioïdomycoses [4, 17, 9, 19].

Tableau 4: Étiologies des cryoglobulinémies [17, 9]

	<i>Pathologies</i>	<i>Type de cryoglobulines</i>
Hémopathies malignes lymphoïde B	<ul style="list-style-type: none"> - Myélome Multiple - Maladie de Waldenström - Plasmocytome - Lymphome B non Hodgkinien - Leucémie lymphoïde chronique - Leucémie à tricholeucocytes 	Cryoglobulines type I ou II
Maladies systémiques ou Auto-immunes	<ul style="list-style-type: none"> Syndrome de Gougerot-Sjögren - Lupus érythémateux disséminé - Dermatopolymyosite - Sclérodemie - Thyroïdites auto-immunes - Cirrhose biliaire primitive - Hépatites auto-immunes - Maladie cœliaque - Périarthrite noueuse - Granulomatose de Wegener - Purpura rhumatoïde - Maladie de Behcet 	Cryoglobulines type II et III

	<ul style="list-style-type: none">- Sarcoidose- Pemphigus Vulgaire- Fibrose endomyocardique- Fibrose pulmonaire idiopathique	
Maladies infectieuses Virales	<ul style="list-style-type: none">- Hépatite chronique C- Hépatite chronique B- Virus de l'immunodéficience Humaine- Hépatite aiguë virale A- Virus d'Epstein Barr- Cytomégalovirus- Adénovirus	Cryoglobulines type II et III
Maladies infectieuses Bactériennes	<ul style="list-style-type: none">- Endocardites subaiguës- Syphilis- maladie de lyme- Brucellose- Fièvre boutonneuse Méditerranéenne- Glomérulonéphrite aiguë Post-streptococcique- Lèpre	Cryoglobulines type II et III

Maladies parasitaires Et fongiques	<ul style="list-style-type: none">- Paludisme- Splénomégalie tropicale- toxoplasmose- Leishmaniose viscérale- Schistosomiase- Échinococcose- Coccidioïdomycose	Cryoglobulines type II et III
Autres	<ul style="list-style-type: none">- Glomérulonéphrite Extra- capillaire- Cancers : sein, nasopharynx œsophage	Cryoglobulines type II et III

VII. Manifestations cliniques :

Ce sont souvent les signes cliniques qui évoquent la présence d'une cryoglobuline, les plus caractéristiques étant ceux dont l'apparition est nettement provoquée par le froid (troubles vasomoteurs ou purpura en particulier).

Les manifestations cliniques d'une cryoglobulinémie varient des formes asymptomatiques aux formes graves mettant parfois en jeu le pronostic vital de certains organes [17].

Parmi les cryoglobulinémies mixtes, il semble que les types II soient plus symptomatiques que les types III [18]. Elles seraient responsables de l'apparition du syndrome de cryoglobulinémie mixte qui est caractérisé par la triade purpura, arthralgie et asthénie.

Mais la vascularite engendrée par les cryoglobulines de manière générale peut avoir d'autres manifestations cliniques [4].

Le pourcentage de patients avec des cryoglobulines circulantes qui développent des symptômes varie de 2 % à 50 %.

VII.1. Syndrome d'hyperviscosité :

Le syndrome d'hyperviscosité se développe principalement chez les patients avec cryoglobulinémie type I, et est très rare chez les patients avec cryoglobulinémie mixte (< 3 %).

Les symptômes clés sont d'ordre neurologique (maux de tête, confusion), oculaire (vision floue, perte de vision) et rhino-otologique (épistaxis, perte d'audition).

Chez les patients pour lesquels on suspecte un syndrome d'hyperviscosité, il est utile de mesurer la viscosité du sérum. Habituellement, les patients deviennent symptomatiques à des mesures de viscosité qui dépassent 4.0 centipoises, mais certains sont symptomatiques avec des viscosités inférieures. L'hyperviscosité symptomatique nécessite un traitement d'urgence (par exemple, l'échange de plasma) [4].

VII.2. Manifestations cutanées :

Les manifestations cutanées sont les plus fréquentes et souvent révélatrices [17]. Elles procèdent en deux mécanismes :

Elles peuvent être liées à la précipitation au froid d'immunoglobulines dans la microcirculation, entraînant une hyperviscosité et une thrombose des petits vaisseaux (principalement au cours des cryoglobulinémies de type I).

Elles peuvent également être liées à des dépôts intravasculaires de complexes immuns circulants, entraînant des lésions de vascularite (principalement au cours des cryoglobulinémies mixtes, de type II et III) [4]

VII.2.a. Purpura cutané :

Le purpura cutané est probablement le plus caractéristique des manifestations de vascularite cryoglobulinémique (54 à 82 %) [4].

Son incidence varie de 15 à 33 % chez les patients présentant une cryoglobuline de type I, de 60 à 93 % pour le type II et de 70 à 83 % pour le type III [27].

Il survient volontiers au cours des périodes hivernales, il est non prurigineux, intermittent et débute toujours aux membres inférieurs pouvant étendre progressivement jusqu'à l'abdomen et, moins fréquemment, les membres supérieurs et le thorax. Il s'agit d'un purpura vasculaire donc infiltré, d'aspect papillaire ou pétéchial dans les jambes, rarement nécrotique sauf dans les cryoglobulinémies de type I, les lésions bulleuses ou vésiculaires sont rares.

Le pronostic peut être aggravé par des ulcères cutanés supramalléolaires torpides causés par la coalescence des lésions de vascularite ou ischémie dans les régions distales (mains, pieds, lèvres, oreilles et nez) [4].

VII.2.b. Ulcères cutanés :

Récidivants, ils sont le plus souvent supramalléolaires, s'accompagnent parfois de purpura, peuvent être déclenchés par le froid et sont à l'origine de cicatrices brunâtres [18]. Ces ulcères pourraient être plus fréquents chez les porteurs d'un génotype 2 du HCV [12,11].



Figure 10: : ulcère cutané

VII.2.c. Autres manifestations cutanées :

VII.2.c.1. Urticaire au froid :

L'urticaire systémique (4 à 10 %) est constamment induite par le froid. Il est purpurique, d'allure chronique, avec des plaques qui restent fixes au-delà de 24 h, sans prurit et laisse des cicatrices pigmentées [12,11].



Figure 11: Les atteintes cutanées en cryoglobulinémie [4]

(A) Purpura au niveau des jambes, (B) Purpura atypique, (C) Ulcères cutanés,

(D) Nécrose digitale

VII.3. Les manifestations vasomotrices :

VII.3.a. Acrocyanose des extrémités :

Une acrocyanose du nez et des oreilles peut survenir mais elle est moins fréquente que dans la maladie des agglutinines froides [19].

VII.3.b. Livédo réticularis :

La livedo réticulaire, actif, majoré également par le froid, est observée chez 8 à 19 % des patients. Les cryoglobulines précipitent préférentiellement au niveau des mailles où, selon certaines études, un retentissement hémodynamique est mesurable en vélocimétrie doppler [18].



Figure 12: livédo

VII.3.c. Syndrome de Raynaud :

Classiquement bilatéral, pouvant concerner les quatre membres et nettement influencé par la température, il est significativement plus fréquent dans les cryoglobulinémies de type I, mais plus sévère lors de cryoglobulinémies de type II [19]. Il est retrouvé chez 19 à 50 % des patients cryoglobulinémiques et se complique dans 25 % des cas en nécrose douloureuse des extrémités lors de l'exposition au froid [20, 19].

VII.3.d. Manifestations rhumatismales :

Il s'agit principalement d'arthralgies touchant les mains, les poignets et les genoux, plus rarement les chevilles ou les coudes, bilatérales et symétriques, non déformantes et non migratrices. Intermittentes et souvent inaugurales, elles sont retrouvées chez 50 à 83% des patients. Une arthrite vraie ou une atteinte du rachis sont beaucoup plus rares.

Des myalgies sont rapportées chez 15% des patients et s'intègrent parfois dans un tableau ressemblant à un syndrome de fatigue chronique ou à une fibromyalgie [8].

VII.4. Complications neurologiques :

VII.4.a. Complications neurologiques périphériques :

Deux types de vascularite sont rencontrés en neuropathie cryoglobulinémique :

- Vascularite nécrosante

Caractérisée par une nécrose fibrinoïde transmurale de la paroi du vaisseau, occlusion thrombotique de la lumière du vaisseau et infiltration polynucléaires

- microvascularite

Une forme lymphocytaire non nécrosante affectant les artères de petite taille.

En outre, la présence d'infiltrats péri vasculaires peut être le signe de « vascularite probable » si elle est associée à la régénération de petits vaisseaux, purpura endoneural, perte de fibre asymétrique ou dégénérescence axonale aiguë asymétrique [22].

La prévalence d'atteinte du système nerveux périphérique (SNP) dans la cryoglobulinémie est variable, en grande partie en fonction du type de cryoglobuline, la présence d'une infection chronique par le VHC, d'autres comorbidités et les facteurs iatrogènes. Selon certaines études, [26, 23, 24, 25], entre 17 % et 60% des patients cryoglobulinémiques présentent une neuropathie périphérique, qui peut être le premier signe de la cryoglobulinémie [27].

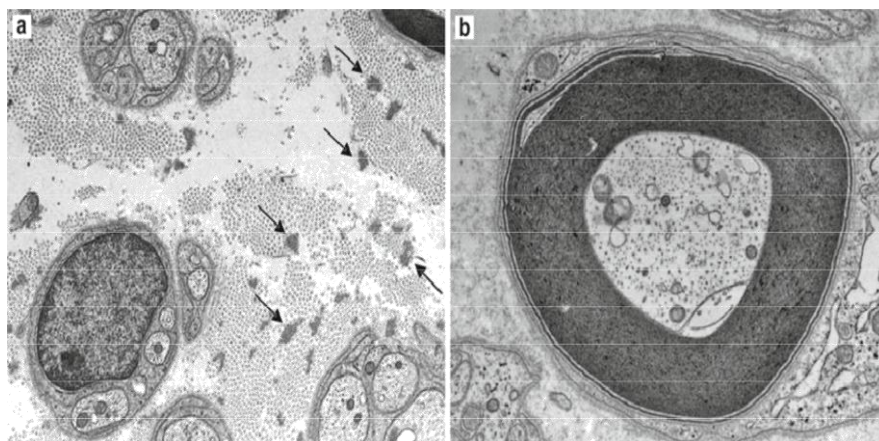


Figure 13: Micrographie électronique montrant de multiples dépôts anormaux de cryoglobulines (flèches) dans le nerf saphène d'un patient avec cryoglobulinémie type I et neuropathie (6300 ×). (b) des élargissements périphériques de lamelles myéline chez un patient

VII.5. Manifestations rénales :

Le capillaire glomérulaire est l'un des premiers sites de dépôt des complexes immuns comme les cryoglobulines. L'atteinte rénale chez les patients avec cryoglobulinémie est appelée glomérulopathie cryoglobulinémique, est le plus souvent retardée mais peut cependant être révélatrice. Environ 20% des patients atteints de cryoglobulinémie présente une néphropathie au moment du diagnostic et 30% ont des complications rénales au cours de l'évolution de la maladie [26, 28, 29, 25, 30, 31, 32].

Entre 21 et 29 % des patients cryoglobulinémiques présentent des manifestations rénales [33]. L'atteinte rénale prédomine dans les cryoglobulinémies de type II [33, 35], surtout si le composant monoclonal est une IgM kappa. Deux tableaux peuvent être observés :

1. Souvent l'atteinte rénale est latente, exprimée par une protéinurie et une hématurie microscopique chronique. La protéinurie peut être abondante allant jusqu'à définir un syndrome néphrotique [35, 34]. L'insuffisance rénale est absente ou modérée ;
2. Parfois l'atteinte rénale est plus importante soit d'emblée soit au cours de l'évolution. Elle associe hématurie macroscopique, protéinurie, hypertension artérielle et insuffisance rénale allant jusqu'à l'oligo-anurie [36, 34].

En microscopie électronique, les dépôts sous-endothéliaux et intraluminaux présentent un aspect cristalloïde pathognomonique en cas de cryoglobulinémie de type II.

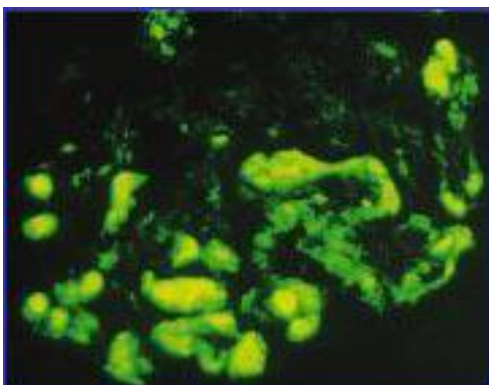


Figure 14: GNMP au cours d'une cryoglobulinémie de type II : nombreux thrombi dans les anses capillaires glomérulaires, révélés par le sérum anti-immunoglobulines M (étude en immunofluorescence) [37].

VII.6. Autres manifestations :

VII.6.a. Atteintes gastro-intestinales :

2 à 6 % des patients ont une *implication gastro-intestinale* [23, 25, 38]. Une ischémie intestinale doit être suspectée chez les patients qui présentent une douleur abdominale aiguë et un malaise général. La fièvre et les selles sanglantes sont rapportées chez un tiers des patients (**figure 15A**). Certains patients présentent une perforation intestinale. Une vascularite cryoglobulinémique impliquant le tractus gastro-intestinal peut mimer la cholécystite pancréatique [38].

VII.6.b. Atteintes pulmonaires :

L'atteinte pulmonaire se produit chez moins de 5% de patients [26, 23, 39]. Chez les patients présentant une dyspnée d'effort d'intensité légère à modérée et une toux sèche, la fibrose pulmonaire interstitielle doit être suspectée [40]. Quelques patients se présentent avec une hémorragie alvéolaire aiguë (hémoptysie, échec respiratoire, et diffusion d'infiltrats pulmonaires) [41] (**figure 15B**). Les épanchements pleuraux sont rares [42].

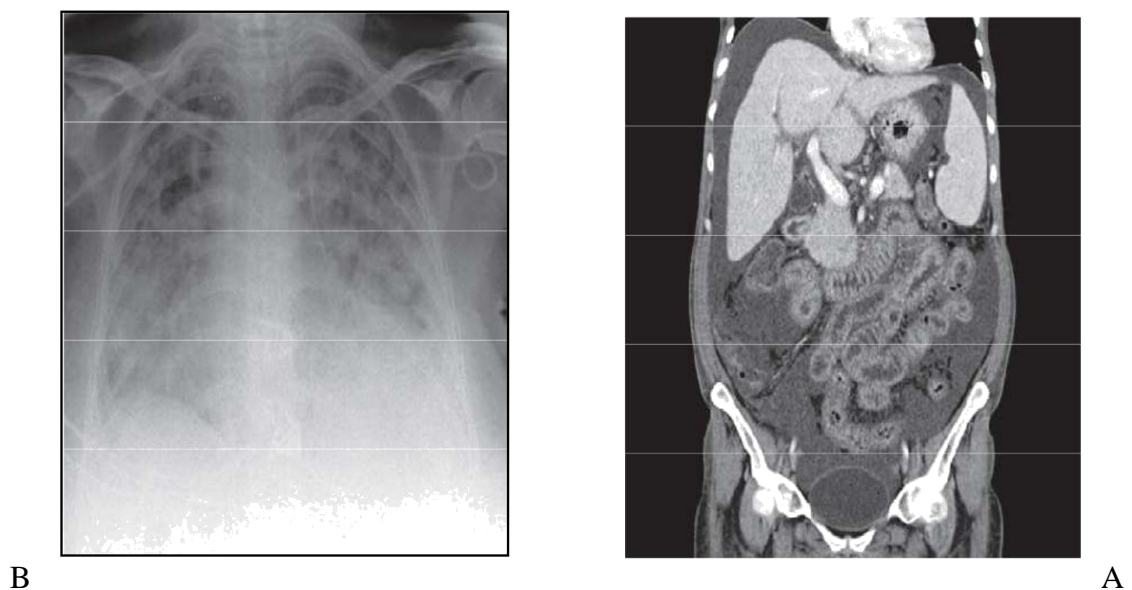


Figure 15: Vascularite systémique cryoglobulinémique :(A) Ischémie intestinale (œdème diffus de la paroi intestinale), (B) Hémorragie pulmonaire [4].

VII.6.c. Atteintes cardiaques :

Moins de dix cas de **vascularites myocardiques** ont été rapportés chez des patients cryoglobulinémiques. Ces patients peuvent avoir un infarctus du myocarde, en l'absence de facteurs de risque cardiovasculaires [41]. Il existe des rapports de péricardite ou insuffisance cardiaque congestive en cas d'une cryoglobulinémie compliquée [41, 43].

Au niveau de l'œil, il est possible d'observer une thrombose veineuse rétinienne.

Tableau 5: Principales manifestations cliniques des cryoglobulines [17]

<p>1. Manifestations cutanées (très fréquentes 55 % des cas)</p>	<ul style="list-style-type: none"> • Purpura vasculaire pétéchial (le plus fréquent) prédominant aux membres inférieurs • Ulcère des jambes • Nodules, lésions bulleuses ou vésiculeuses • Purpura nécrotique • Urticaire survenant au froid • Gangrène distale
<p>2. Manifestations vasomotrices</p>	<ul style="list-style-type: none"> • Syndrome de Raynaud (15 % des cas) • Acrocyanose des extrémités • Livedo réticulaire ou nécrose cutanée pouvant toucher le nez, les oreilles ou les membres
<p>3. Manifestations rénales (atteintes viscérales les plus fréquentes 30 % des cas)</p>	<ul style="list-style-type: none"> • Glomérulonéphrite membrano-proliférative avec protéinurie et hématurie
<p>4. Manifestations articulaires (fréquentes : 50 à 70 % des cas)</p>	<ul style="list-style-type: none"> • Arthralgies inflammatoires • Arthrites des mains, des genoux et des chevilles
<p>5. Manifestations neurologiques</p>	<ul style="list-style-type: none"> • Polynévrites • Neuropathies périphériques

6. Autres manifestations viscérales	<ul style="list-style-type: none">• Atteintes hépatiques non spécifiques• Vascularite intestinale avec douleur et/ou hémorragies, parfois nécroses intestinales• Atteinte pulmonaire clinique (très rare) mais signes radiologiques d'atteinte interstitielle dans 75% des cas de cryoglobulines essentielles
7. Autres manifestations cliniques	<ul style="list-style-type: none">• Syndrome d'hyperviscosité lorsque l'Ig monoclonale est présente à un taux important (rare) avec troubles neurosensoriels et hémorragies au niveau des muqueuses• Signes ophtalmologiques consécutifs aux troubles circulatoires (hémorragies ou thromboses)• Syndrome sec

Le développement des symptômes cryoglobulinémiques est lié à la maladie sous-jacente (comme l'infection par le VHC) et aux caractéristiques des cryoglobulines (type II, concentrations sériques élevées).

Bien qu'il existe un chevauchement entre les caractéristiques cliniques des cryoglobulinémies de types I, II et III, en général, la cryoglobulinémie type I provoque rarement des symptômes liés à une vascularite et tend à être associée à des signes d'occlusion périphérique du vaisseau. Dans ce cas, la manifestation clinique associée à un syndrome d'hyperviscosité peut être observée ainsi que des lésions de purpura, acrocyanose, Phénomènes de Raynaud, des manifestations dystrophiques jusqu'à la formation d'ulcères torpides et la gangrène. La cryoglobulinémie type I se trouve généralement associée à des maladies lymphoprolifératives et les patients sont cliniquement indiscernables de ceux avec macroglobulinémie de Waldenstrom, myélome multiple, ou leucémie lymphoïde chronique.

Le syndrome de cryoglobulinémie mixte est caractérisé par une triade clinique typique : purpura, faiblesse et arthralgies. L'atteinte de plusieurs organes, y compris une hépatite chronique, glomérulonéphrite membranoproliférative et neuropathie périphérique due à une vascularite leucocytoclasique des petits et moyens vaisseaux est souvent observée. [4]

VIII. Manifestations biologiques des cryoglobulinémies :

La présence d'une cryoglobuline peut être suspectée devant un certain nombre d'anomalies biologiques : [21]

- ❖ Positivité du facteur rhumatoïde (IgM anti-IgG),
- ❖ Pseudo hyperleucocytose,
- ❖ Pseudo-thrombocytes,
- ❖ Fausse macrocytes (ces anomalies fluctuantes peuvent apparaître lors du comptage automatique à + 20 °C),
- ❖ Pseudo-hypo protidémie et fausse hypo-gammaglobulinémie (sous-estimation du taux de protéines par cryoprécipitation),
- ❖ Fluctuation de la vitesse de sédimentation selon la température,
- ❖ Modification du tracé électrophorétique des protéines sériques, hypo-complémentémie avec diminution de la fraction C4 du complément, de la fraction C1q accompagnée ou non d'une baisse du complément hémolytique 50 (CH 50) et de la fraction C3 et augmentation des composants tardifs (C5 et C9) et du C1 inhibiteur.

Les anomalies biologiques hépatiques sont extrêmement fréquentes au cours des cryoglobulinémies mixtes, avec une élévation des transaminases et des phosphatases alcalines.

Une cryoglobuline peut venir perturber des tests sérologiques ainsi que la recherche d'auto-anticorps. [21]

IX. Diagnostic :

L'analyse de cryoglobuline est effectuée sur sérum [48, 49]. Leur recherche, leur quantification et leur identification se fait en quatre étapes. Plusieurs auteurs ont décrit les différentes approches analytiques pour la détection de cryoglobuline. Malheureusement, il n'existe pas de norme internationalement acceptée [52, 50, 51].

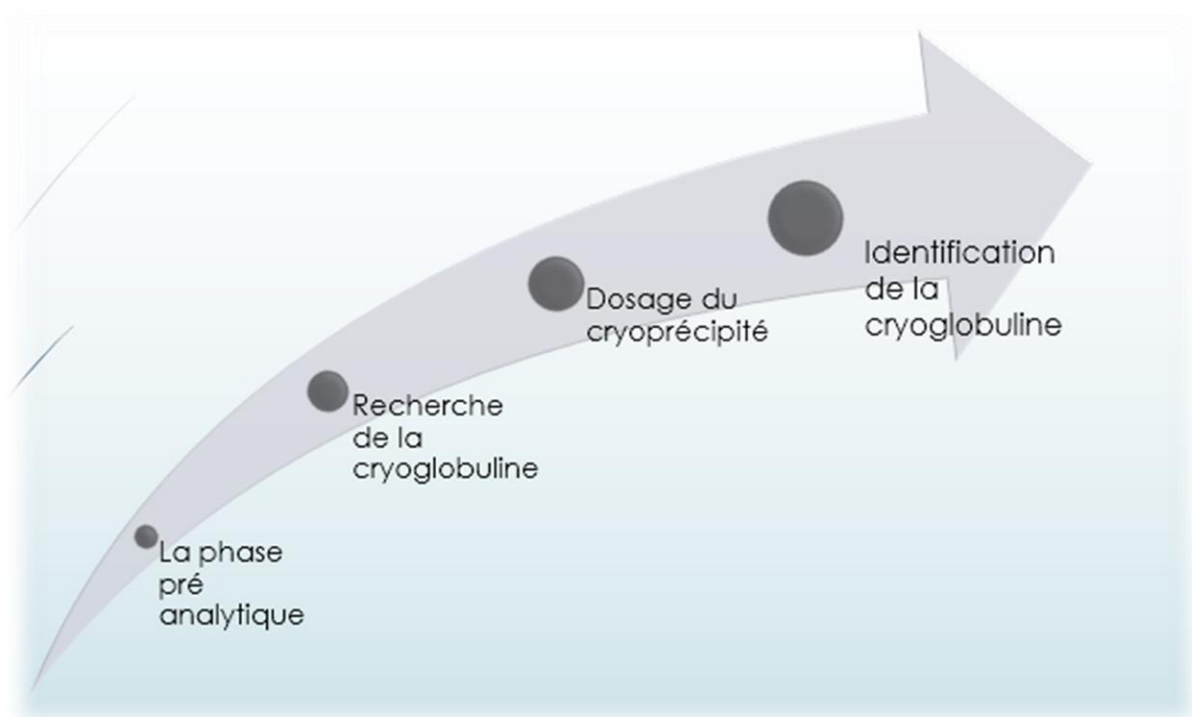


Figure 16: étapes de diagnostic de cryoglobulinémie

IX.1. La phase pré analytique :

IX.1.a. Obtention des échantillons :

Le prélèvement de l'échantillon est la phase la plus critique dans l'analyse de cryoglobuline.

La température à laquelle une cryoglobuline est susceptible de précipiter est éminemment variable d'un patient à un autre et peut être aussi élevée que +36 °C. Il en résulte qu'une grande rigueur s'impose quant à la qualité du prélèvement, de son acheminement au laboratoire et à sa prise en charge à l'intérieur de celui-ci. Les précautions pré analytiques suivantes doivent être respectées [19, 53] :

- ❖ Il est recommandé que le patient soit à jeun depuis 12 heures, les lipides pouvant gêner l'interprétation lors de la recherche d'un cryoprécipité.
- ❖ Il est indispensable qu'il soit dans une pièce à +37 °C.
- ❖ Il est indispensable que les tubes de prélèvement, dépourvus de gel et de tout additif, soient préchauffés à +37 °C.
- ❖ Le mieux est d'utiliser trois tubes secs, sous vide de 5 ml (ou deux tubes de 7 ml) pour obtenir un volume de sang d'environ 14 ml [19]
- ❖ L'acheminement au laboratoire doit se faire à l'aide d'un dispositif permettant de maintenir la température à +37 °C par exemple une valisette thermostatée chauffée à +37–39 °C et le retard de livraison de l'échantillon au laboratoire (à faire en sorte que la température ne descend pas au-dessous de +37°C à tout moment
- ❖ La durée de la décantation est de 4h à 24h sinon ils sont Complètement hémolysés et la recherche n'est plus réalisable. Suivi par une centrifugation à 37°C grâce à une centrifugeuse thermo réglable. [19, 53]

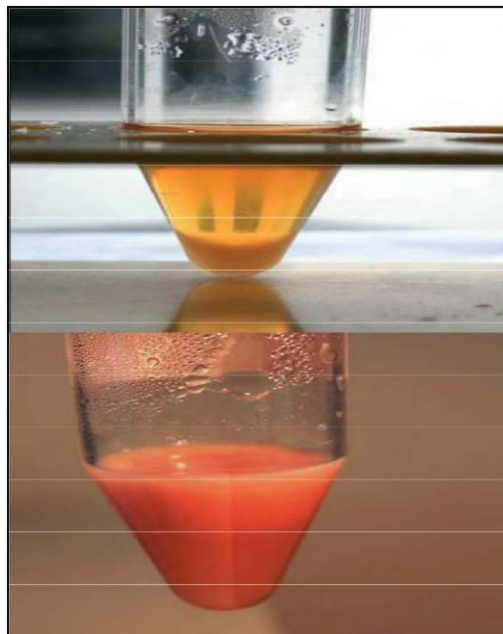


Figure 17: Exemple de cryoglobuline positive (haut) et de sérum lipidique et hémolysé (bas) dans lequel il est impossible de détecter un cryoprécipit [53].

IX.2. Recherche de la cryoglobuline: Cette phase contient les étapes suivantes:

- Obtention du cryoprécipité
- Lecture du cryoprécipité
- Resolubilisation
- Isolement et lavage du cryoprécipité

IX.2.a. Obtention du cryoprécipité :

Le respect de ces précautions pré-analytiques permet d'obtenir des résultats fiables en évitant la perte de la cryoglobuline au cours de ces premières étapes.

Une fois le sérum décanté dans deux tubes stériles de 5 ml en plastique transparent (recueillir environ 2,5 ml par tube), une deuxième centrifugation dans les mêmes conditions (+37 °C) est réalisée. Elle a pour but d'éliminer tout ce qui peut gêner visiblement l'interprétation (résidus de membranes cellulaires, fibrine par coagulation incomplète notamment).

Après l'étape de centrifugation, deux parties aliquotes de 2 ml, précisément mesurées avec une pipette automatique, sont mises dans deux tubes stériles coniques en plastique transparent puis les tubes sont placés dans un réfrigérateur à +4 °C pendant des temps variables selon les laboratoires (de 12 h à 9 jours dans l'étude de Vermeesch et al [54]) ; 7 jours étant recommandés afin que toutes les cryoprotéines seraient précipité.

Les deux parties aliquotes entreposées à +4 °C sont quotidiennement inspectées sachant que la cryoprécipitation peut survenir en quelques heures pour les cryoglobulines de type I et quelques type II ou en plusieurs jours le plus souvent pour les cryoglobulines mixtes de type II et III.

IX.2.b. Lecture du cryoprécipité :

Le cryoprécipité peut se présenter sous différentes formes : précipité blanc de volume variable au fond du tube, précipité formant de fines volutes, floconneux au sein du sérum ou formation d'un cryogel dans certain type de cryoglobulines pouvant se traduire par une prise en masse du sérum. Ce cryogel est souvent difficile à observer et surtout difficile à isoler du fait de sa structure, il ne faut pas le perdre lors des différents lavages.

Donc si un dépôt est visible au fond du tube, il convient alors de noter la positivité sur la fiche le jour même de la lecture. Le septième jour au plus tôt, les tubes considérés comme positifs sont montrés au biologiste qui confirmera la présence probable et l'aspect du cryoprécipité.

La présence de lipides, l'hémolyse et encore plus les deux phénomènes associés rendent difficile voire impossible l'interprétation de cette recherche. Un nouveau prélèvement à jeun devra être demandé [53].

Au bout de sept jours, si le sérum est toujours clair et fluide dans les deux tubes entreposés à +4 °C, la recherche de cryoglobuline s'avère alors négative.

Dans tous les cas, il faut attendre sept jours avant de rendre la lecture définitive du tube. En effet, certaines cryoglobulines de type III ne précipitent significativement qu'au bout de cinq à six jours [55].

IX.2.c. Resolubilisation :

La redissolution du précipité de cryoglobuline par un nouveau chauffage à +37°C est très importante [56].

Le cryoprecipité se redissout lors du réchauffement

Il s'agit de fibrinogène lorsqu'il reste précipité

IX.2.d. Isolement et lavage du cryoprécipité :

Nous n'utilisons, pour l'isolement en vue du dosage qu'un des tubes de chaque « doublet », celui présentant le précipité apparemment le plus abondant. Le second est gardé en réserve en cas d'incident éventuel de manipulation. Cette organisation évite d'avoir à prélever à nouveau le patient, très souvent sorti de l'hôpital avant le retour des résultats de cet examen nécessairement long [55].

Toutes les étapes suivantes sont réalisées à froid (centrifugation à +4 °C). Si la température ambiante est levée, il faut travailler avec les tubes mis dans la glace [53].

Le précipité est isolé après centrifugation 3500 (rpm × 15 minutes à +4°C). Après élimination du sérum surnageant, il est lavé trois fois par 2 ml de solution de chlorure de sodium à 0,9 %, maintenu au réfrigérateur à +4 °C selon la séquence explicitée suivante : Le culot est remis en suspension par agitation au vortex 20 secondes (s). Puis le mélange est centrifugé (3500 rpm × 15 minutes à +4°C) cela afin d'éliminer toutes traces de protéines non cryoprécipitantes.

Finalement, le cryoprécipité est redissous dans un volume d'une solution de chlorure de sodium isotonique de 100 µl additionnée de 100 µl de Fluidil. Le précipité est agité au vortex 20 s, puis placé une nuit à l'étuve à +37 °C. Il convient de vortex 20 s tous les quarts d'heure pour favoriser la redissolution pendant la première heure et le dernier précédent le dosage. En fonction de l'importance du précipité, ce volume peut être modifié après concertation avec le biologiste. Le volume de reprise doit être précisément mesuré pour permettre le dosage.

IX.3. Dosage du cryoprécipité :

Après observation visuelle, le précipité formé à +4°C peut être rapporté dans l'une des deux façons suivantes [54] :

- Cryocrite
- La teneur totale en protéines

IX.3.a. . Détection quantitative de cryoglobuline par cryocrite :

Le cryocrite c'est à dire le volume emballé du précipité par rapport au volume de sérum d'origine, est une méthode simple et largement utilisée [57].

Un tube conique spéciale (Wintrobe) est rempli de 5 à 10 ml de sérum et laissé dans un réfrigérateur pendant 3-7 jours. Le tube est centrifugé et le volume de CG précipité est lu à partir des repères de tube (**fig. 18**). Le pourcentage du volume total occupé par le cryoprécipité est déterminé visuellement [56, 58].

Le cryocrite chez les personnes sans cryoglobulinémie est proche de zéro.

L'estimation du cryocrite nécessite un grand volume de sérum. Elle est influencée par les protéines contaminantes et les étapes de lavage et de resolubilisation [56].

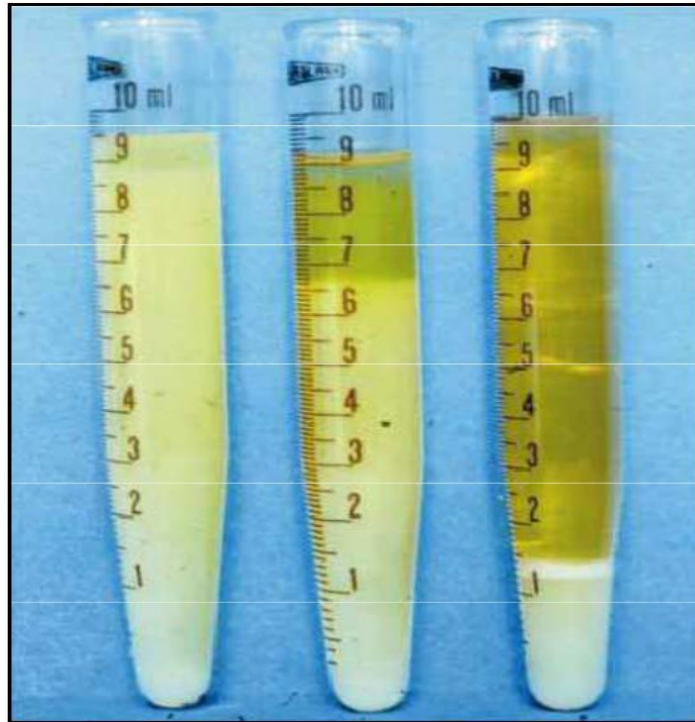


Figure 18: Différents niveaux de cryoprécipités blanchâtres après la mise en garde du tube Wintrobe

Tableau 6: l'interprétation quantitatif des cryoglobulines [55]

Libellé	Élément déclenchant (g/l)
Cryoglobuline en faible concentration	< 0,1g/l
Cryoglobuline en concentration moyenne	Compris entre 0,1 et 0,5g/l
Cryoglobuline en concentration importante	Compris entre 0,5et 1g/l
Cryoglobuline en concentration très importante	Compris entre 1et 5 g/l
Cryoglobuline en concentration massive	> 5 g/l

Les cryoglobulines très importantes sont souvent de type I monoclonal dans le cadre d'hémopathies lymphoïdes (Waldenström, myélome). Les cryoglobulines massives sont aussi de type I (IgM associées à la maladie de Waldenström).

IX.3.b. La teneur totale en protéines :

IX.3.b.1. Technique du Biuret inverse :

La technique dite du Biuret inverse pour le dosage de protéines en faible concentration est préconisée par Le Carrer [57] pour le dosage des cryoglobulines. Il s'agit d'une technique colorimétrique dérivée de la méthode du Biuret inverse de Matsushita *et al.* [60].

IX.3.b.2. Technique au rouge de pyrogallol :

Cette réaction, décrite en 1983, a été adaptée au dosage des protéines urinaires [61] en 1986. Le rouge de pyrogallol se combine avec le molybdate pour former un complexe coloré qui absorbe à 460 nm. Quand ce complexe est associé à des protéines en milieu acide, le pic d'absorption se déplace à 598 nm Pour la détermination de la protéinurie [62].

❖ Évaluation de chaque technique :

Les deux techniques colorimétriques (Biuret inverse et rouge de pyrogallol) sont sensibles, faciles à mettre en œuvre et peu coûteuses.

Les avantages de la technique du Biuret inverse sont la réactivité identique du colorant quelle que soit la protéine à doser, la limite de détection basse et le domaine de linéarité étendu.

Les avantages de la technique au rouge de pyrogallol sont : son automatisation aisée sur un automate de biochimie ouvert, sa limite de détection basse. Son inconvénient principal est la différence de réactivité du colorant entre l'albumine et les immunoglobulines [62].

IX.4. Identification de la cryoglobuline : (typage immunochimique) :

Le typage immunochimique est réalisé par une technique d'immunoélectrophorèse (IEP) ; par immunofixation (IF) ou immunosoustraction IS.

Ces trois méthodes utilisent des antisérums mono-spécifiques anti (IgG), anti (IgA), anti (IgM), anti kappa, anti lambda.

IX.4.a. Analyse par électrophorèse :

C'est la méthode de référence, mais le délai de réponse est long et la technique, difficilement automatisable, nécessite une grande expertise pour sa réalisation et son interprétation. L'électrophorèse sur gel d'agarose des cryocrits est un examen important qui nous renseigne sur les éléments suivants :

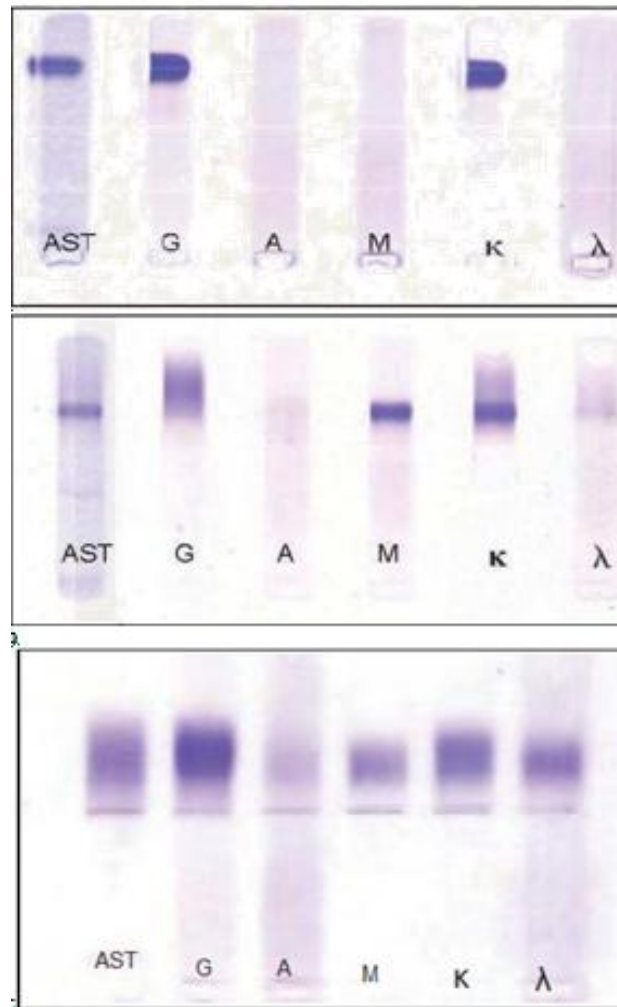
1. Pureté du cryoprécipité, vérification d'une éventuelle contamination par l'albumine (Alb). En cas de présence d'albumine ou d'autres protéines avec une grande intensité sur les membranes, nous avons dû refaire les étapes de lavages avant de passer au typage par immunofixation (IF).
2. Nature de ce cryocrite, les cryoglobulinémies migrent le plus souvent dans la région des gammaglobulines. Tous les aspects obtenus après migration des cryocrits sur ces membranes d'agarose ont été décrits.

IX.4.b. Analyse par immunofixation (IF) :

Cette méthode sensible, rapide et en partie automatisable, est souvent utilisée dans les laboratoires polyvalents.

Si le résultat du dosage est inférieur à 0,02 g/l, le résultat rendu est « faiblement positif, quantité insuffisante pour l'isotypage ». Si le résultat du dosage est supérieur ou égal à 0,02 g/l : une fiche est remplie (**Fig. 19**) en vue de l'identification immunologique par immunofixation (IF) de la cryoglobuline [55].

A



C

Figure 19: Immunofixation de cryoprécipités [53]

AST: anti-sérum total, **G:** Acs anti- γ , **A:** Acs anti- α , **M:** Acs anti- μ , κ : Acs anti- κ ,

λ : Acs anti- λ , Helena Biosciences.

a. Cryoglobuline de type I composée d'une IgG Kappa monoclonale.

b. Cryoglobuline de type II associant une IgM Kappa monoclonale et des IgG polyclonales.

c. Cryoglobuline de type III composée d'IgG et d'IgM polyclonales

IX.5. Autres techniques d'analyse des cryoglobulines :

D'autres techniques pour l'analyse des cryoglobulines ont été rapportées au cours des années. Certains rapports de cas ont révélé des cryoglobulines dans des frottis sanguins. Les cryoglobulines peuvent apparaître sous forme de dépôts amorphes entre les globules rouges

ainsi que dans les globules blancs [63, 64]. Surtout dans les neutrophiles, ils révèlent plusieurs vacuoles rondes avec une couleur bleu pâle particulière [63, 65]. En outre, la présence de cristaux bleuâtres, disparaissant au réchauffement du sang à +37 °C, a été décrite dans un frottis de sang périphérique d'un patient avec des manifestations cliniques de cryoglobulinémie [66].

Bien que de tels résultats des frottis sanguins indiquent la présence de cryoglobulines, la détection par des méthodes classiques reste essentielle pour faire le diagnostic final.

IX.6. Examens immunochimiques complémentaires :

La découverte d'une cryoglobulinémie doit inciter à effectuer les examens biologiques complémentaires suivants :

- Recherche de l'existence d'une gammapathie monoclonale.
- Exploration du complément : il existe souvent dans les cryoglobulinemies mixtes un abaissement profond et durable du complément total (CH 50) et des composants précoces (C1q, C2, C4) alors que la diminution du C3 est en général plus inconstante et que les composants tardifs (C5 à C9) sont à des taux normaux ou même augmentés.
- Recherche de facteurs rhumatoïdes habituellement positifs sur sérum ou sur la cryoglobuline dans les cryoglobulines mixtes.
- Recherche de la présence éventuelle dans le sérum de divers auto-anticorps notamment anti-nucléaires [59].

X. Traitement :

En premier lieu, il faut éviter l'exposition au froid.

X.1. Traitement symptomatique :

Dans les formes mineures de cryoglobulinémies, il est important d'éviter l'exposition au froid en demandant au patient de se vêtir chaudement au niveau du corps et des extrémités pour éviter les manifestations cliniques de la cryoglobulinémie ; les épisodes aigus de cryoglobulinémie, habituellement dus à des immuns complexes, sont traités par corticothérapie. [67].

Dans les formes sévères ou invalidantes (néphropathie glomérulaire avec insuffisance rénale, nécrose cutanée ou neuropathie sensitivo-motrice), les échanges plasmatiques en atmosphère chaude à + 37 °C permettent de diminuer le taux des cryoglobulines circulantes et se révèlent efficaces dès les premières semaines, mais leur efficacité est souvent transitoire, ils sont souvent associés à une corticothérapie et aux immunosuppresseurs. [68].

X.2. Traitement étiologique :

Le traitement étiologique doit être adapté (chimiothérapie / hémopathies, traitement antiviral / HCV), associé à des corticoïdes et immunosuppresseurs (corticoïdes, cyclophosphamide, azathioprine...) [70].

Le traitement des cryoglobulines symptomatiques repose sur le traitement de l'hémopathie sous-jacente : poly-chimiothérapie du lymphome ou le traitement d'un myélome sous-jacent (comprenant en particulier thalidomide ou un agent alkylant) [14]. Une autogreffe peut être également indiquée pour cryoglobulinémies associées aux myélomes. Le rituximab est plus volontiers utilisé [54]. Certaines atteintes sévères rénales ou les ulcères nécrotiques extensifs de jambes justifient également d'un traitement par échanges plasmatiques [69]. Une éviction du froid est recommandée en raison de son rôle aggravant sur la cryoglobulinémie [65,71].

De même, dans le cadre des hépatites C compliquées de vascularites à cryoglobulines, une étude récente montre l'intérêt de l'association traitements anti-viraux/rituximab, permettant de gérer l'infection et les complications de vascularites liées aux cryoglobulines [72].

- NB : Le plus souvent les cryoglobulinémies asymptomatiques sont suivies mais non traitées.

Partie Pratique

OBJECTIFS :

- ❖ Notre étude a pour principal objectif la description des caractéristiques cliniques et immunologiques des cryoglobulines.
- ❖ Compléter les paramètres immunologiques chez les patients positifs (FR, AAN, C3, C4)

I. Chapitre 1 : MATERIEL ET METHODES :

I.1. Matériel d'étude :

I.1.a. Matériels humains :

I.1.a.1. Population étudiée :

Afin de répondre aux objectifs fixés nous avons réalisé une étude descriptive au niveau de l'unité d'immunologie au UHU Hassiba Ben Bouali-blida, portant sur 26 patients orientés des établissements de santé publics et privés (externes) dans une période de 5 mois s'étalant du janvier au mai 2019.

I.1.a.2. Critères d'inclusion :

Tout patient destiné à notre service pour la recherche d'une cryoglobuline

I.1.a.3. Critères de non inclusion :

Le non-respect de la phase pré analytique

I.1.a.4. Critères d'exclusion :

Sérum hémolysé, sérum lipémique, tube cassé.

I.1.a.5. Recueil des données :

Les différentes données cliniques, épidémiologiques et biologiques ont été récupérées directement suite d'un interrogatoire des patients et ont été mises dans un tableau d'EXCEL.

I.1.a.6. Recueil des sérums :

Les différents sérums ont été recueillis à partir des prélèvements du sang veineux sur tube à vis ; après centrifugation (3500 trs/ 10 mn)

Ces prélèvements ont été effectués directement au niveau de l'unité d'immunologie.

I.1.b. Matériel non humain :

I.1.b.1. Fiche de renseignements :

Rapportent les renseignements cliniques et biologique des patients (annexe1).

I.1.b.2. Fiche de suivi :

Pour le suivi du sérum pendant 21 jours (annexe 2)

I.1.b.3. Appareillages :

- Étuve



Figure 20: Étuve

- Centrifugeuse thermo réglable de type CR3i multifonction.



Figure 21: Centrifugeuse thermo réglable

- Réfrigérateur



Figure 22: Réfrigérateur

- Vortex



Figure 23: Vortex

- Micropipettes
- SAS1 et SAS2



Figure 24: automate SAS1-SAS2

I.1.b.4. Consommables :

Tube à vis, tub sec, embouts, gants, compresse, eau distillée, eppendofs, portoir, embouts récipients.

I.1.b.5. Réactifs :

- Réactif pour électrophorèse des protéines : (SAS-1 SP-24 SB Kit REF 200200/ Helena Biosciences Europe).



Figure 25: kit EPS

La durée de la décantation est de 4h à 24h, suivi par une centrifugation à 37°C grâce à une centrifugeuse thermo réglable à raison de 3500 trs/min pendant 10 min (Figure 21).

Après centrifugation, nous avons récupéré un volume de sérum qui varie de 4 à 5 ml, qui sont ensuite partagés dans 2 tubes

I.2.b. Recherche des cryoglobulines :

Nous avons recherché simultanément la formation des cryoglobulines (sur sérum) pour chaque patient, par observation quotidienne, pendant 21 jours, des 2 tubes placés à + 4°C.

Toutes les observations sont notées dans des fiches de lecture. « Annexe2 »

Chaque patient possède une fiche de suivi, permettant de suivre le malade et suivre une éventuelle apparition

I.2.c. Quantification et identification des cryoprotéines :

I.2.c.1. Analyses électrophorétiques :

Nous avons réalisé, pour les échantillons positifs une électrophorèse (à l'état pur) sur gel d'agarose (SAS-1 SP-24 SB Kit REF 200200/ Helena Biosciences Europe).

La technique est réalisée, selon les recommandations du fournisseur, sur deux appareils semi-automatiques SAS-1 et le SAS-2

Principe :

L'électrophorèse des protéines sériques permet la séparation des protéines du sang, sous l'influence d'un champ électrique dans un milieu alcalin.

Les protéines sont séparées en fonction de leur charge électrique respectives, à un pH de 8,8 sur gel d'agarose.

L'électrophorèse permet de traiter simultanément plusieurs échantillons en même temps (24 patients).

Après avoir scanner le gel, l'interprétation des résultats se fait à l'aide d'un logiciel **Helena**

I.2.c.2. Typage par immunofixation :

Nous avons réalisé, pour les échantillons positifs une immunofixation (IF) sur gel d'agarose (SAS-1IFE-4 Kit REF 200300/ Helena Biosciences Europe). La technique est réalisée selon les recommandations du fournisseur sur les deux appareils semi-automatiques SAS-1 et le SAS-2.

L'immunofixation est une technique immunologique permettant de mettre en évidence et de préciser le typage d'une immunoglobuline monoclonale dans le sérum ou les urines d'un patient.

Principe :

L'immunofixation se déroule en deux temps :

Utilisant l'électrophorèse haute résolution en gel d'agarose dans en premier temps puis l'immunoprécipitation dans un deuxième temps.

Le Kit SAS- IFE sépare les protéines sériques selon leur charge en gel d'agarose. Les protéines sont ensuite mises en contact avec un antiserum monospécifique, lavées et colorées pour permettre la visualisation de l'immunoprécipité en vue d'une interprétation qualitative.

La classification des cryoglobulines prend en compte la clonalité des immunoglobulines constituant le précipité (immunoglobulines monoclonales ou polyclonales) , il est donc essentiel lors de l'identification de déterminer le type (IgG, IgA ou IgM, Kappa ou Lambda) et l'aspect monoclonal (une bande nette avec un antiserum anti-chaîne lourde γ , α ou μ au même niveau qu'une bande avec un anti-sérum anti-chaîne légère k ou λ) et/ou polyclonal des immunoglobulines (aspect homogène étalé dans la zone des immunoglobulines)[6].

I.2.c.2.1. Interprétation de l'immunofixation (IF) :

On fait l'interprétation en tenant compte de toutes les données cliniques et biologiques.

On a suivi le protocole utilisé au niveau de l'unité d'immunologie (Hassiba BENBOUALI) pour la recherche et la caractérisation d'une cryoglobuline. **Annexe 3**

II. Chapitre 2 : résultats et discussion

II.1. Résultats :

Caractéristiques de la population étudiée :

26 patients orientés des établissements de santé publics et privés (de différents services), étaient munis de leurs lettres de liaison (annexe 2). Tous de ces patients ont été recrutés au sein d'unité d'immunologie de HASSIBA BEN BOUALI et ont bénéficiés d'un interrogatoire avec le remplissage de la fiche de renseignement.

Tableau 7: Caractéristiques de la population étudiée

	<i>Patients</i>
<i>Nombre</i>	26
<i>Âge moyen</i>	40 ans
<i>Âges extrêmes</i>	[17 – 84] ans
<i>Sexe Ratio</i>	0,53 (9♂/17♀)

II.1.a. Répartition des patients selon le sexe et l'âge :

La répartition des patients selon le sexe montre que 17 patients (65%) sont de sexe féminin et 9 patients (35%) sont de sexe masculin, soit un Sexe ratio de 9♂/17♀ (0,53). La moyenne d'âge des patients de sexe féminin est de 39,8 ans et celle des patients de sexe masculin est de 49,6 ans (Tableau8).

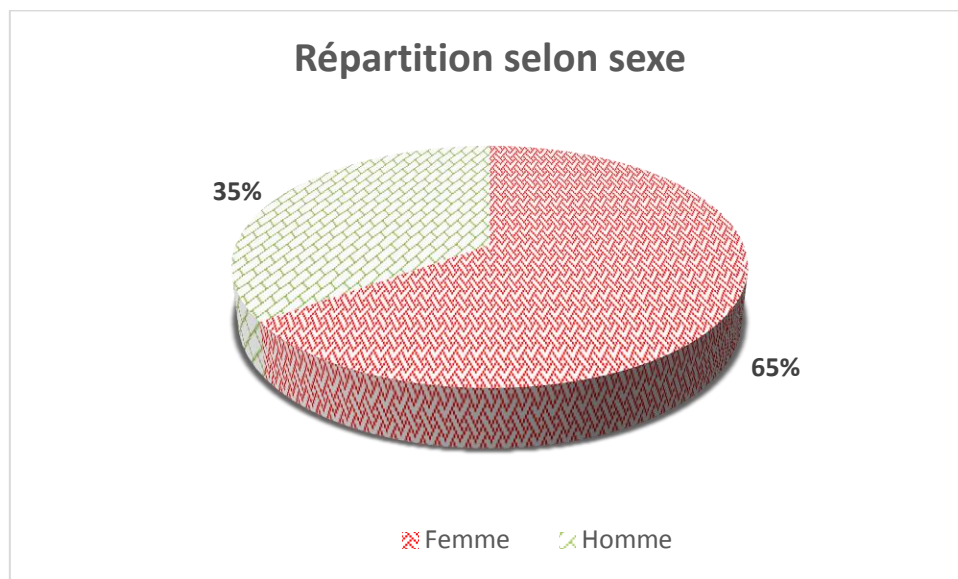


Figure 27 répartition selon sexe

Tableau 8 caractéristique de la population étudiée

	<i>Sexe féminin</i>	<i>Sexe masculin</i>
<i>Âges extrêmes</i>	17 – 68 ans	27– 84 ans
<i>La moyenne Âge</i>	39,8 ans	49,6 ans

Les caractéristiques de ce groupe sont résumées dans le tableau 8 déjà présenté plus haut. L'âge des patients varie entre 17 et 84 ans avec une moyenne de 40 ans.

Tableau9: Répartitions des patients selon l'âge

<i>Age</i>	Nombre	<i>Pourcentage</i>
<i>0-20 ans</i>	2	7%
<i>21-40</i>	11	43%
<i>41-60</i>	7	27%
<i>61-80</i>	4	16%
<i>81-100</i>	2	7%

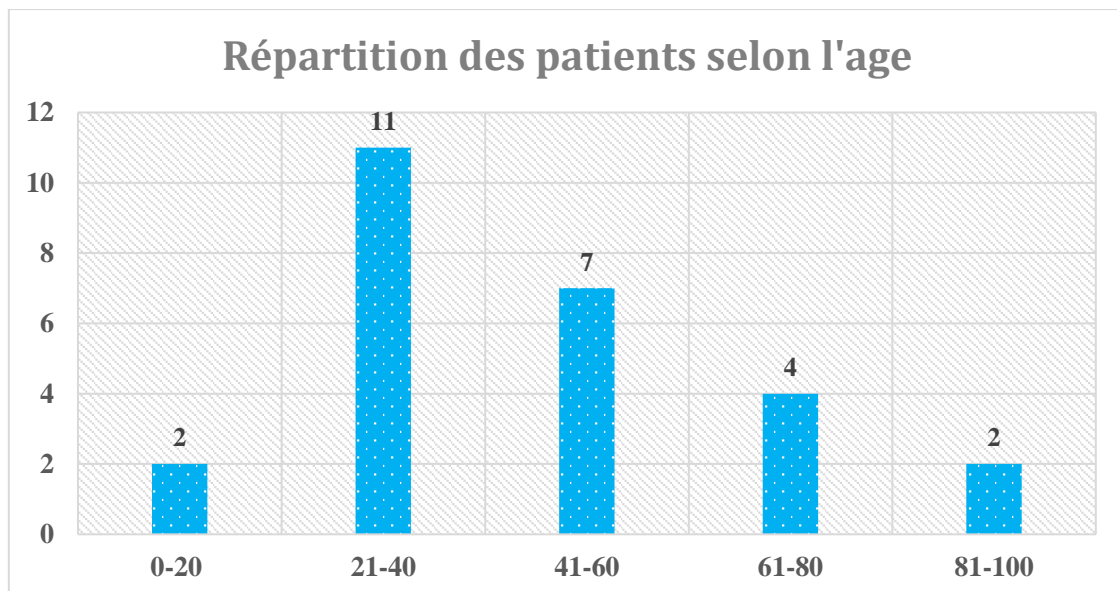


Figure 28 répartition selon l'âge

II.1.b. Répartition des patients selon leur service d'origine :

Les patients recrutés à l'unité d'immunologie de HASSIBA BEN BOUALI sont issus de différents services, principalement du service de médecine interne (38%), de néphrologie (23%), d'hématologie (16%), de rhumatologie (11,5%), et 11,5% d'autres services (Figure26).

Tableau 10: Répartition des patients selon services

<i>Service</i>	<i>Nombre</i>	<i>Pourcentage</i>
<i>Médecine interne</i>	10	38%
<i>Néphrologie</i>	6	23 %
<i>Hématologie</i>	4	16%
<i>Rhumatologie</i>	3	11,5%
<i>Autres</i>	3	11,5%

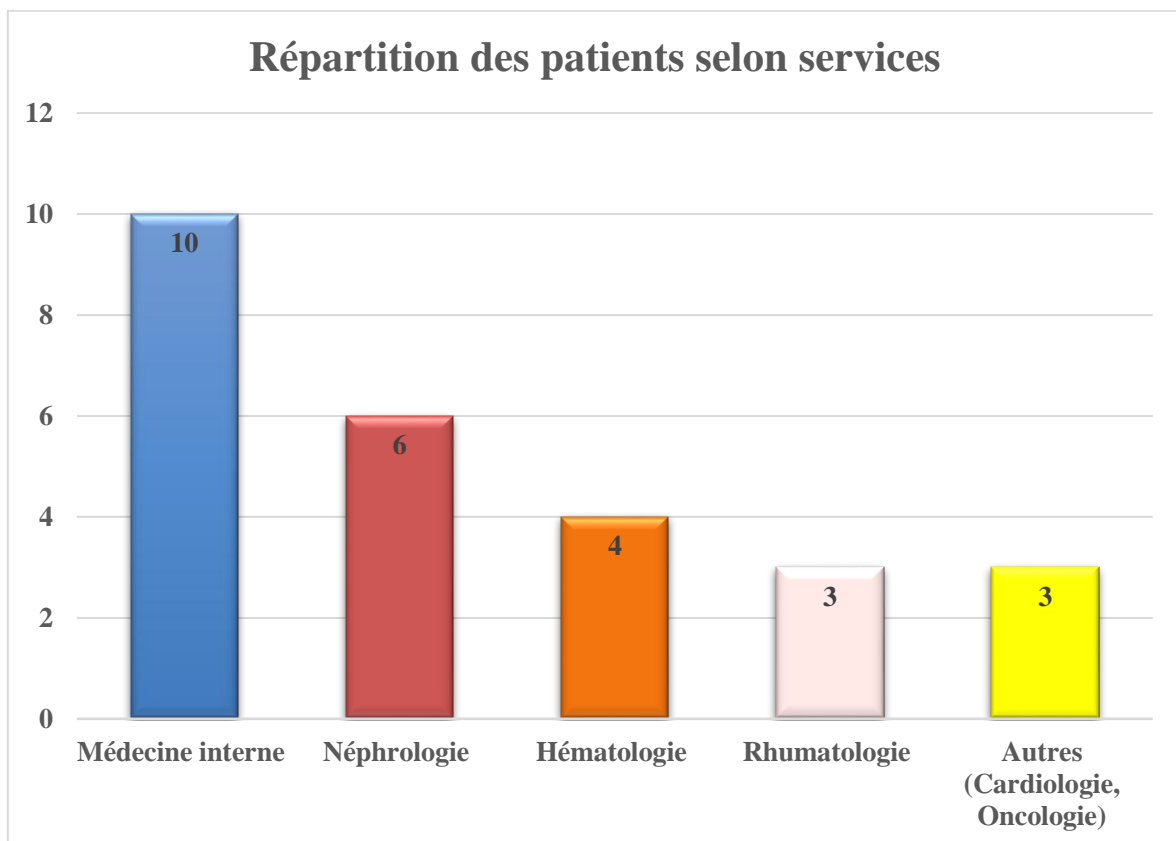


Figure 29 répartition selon services

II.1.c. Répartition des patients selon les manifestations cliniques

Les patients de notre étude ont été répartis en six groupes selon les manifestations cliniques dans le tableau suivant

Tableau 11: Répartition des patients selon les manifestations cliniques

<i>Signes cliniques</i>	<i>Nombre</i>	<i>Pourcentage</i>
<i>Polyarthralgie</i>	6	23 %
<i>Syndrome de Raynaud</i>	7	26 %
<i>Purpura</i>	3	12 %
<i>Thrombose veineuse</i>	2	7,5 %
<i>Livédo</i>	1	4 %
<i>Manifestations générales</i>	8	30 %

Plusieurs patients présentent le syndrome de Raynaud comme signe majeur (7 malades soit 26 %) ensuite une polyarthralgie (6 malades soit 23 %).

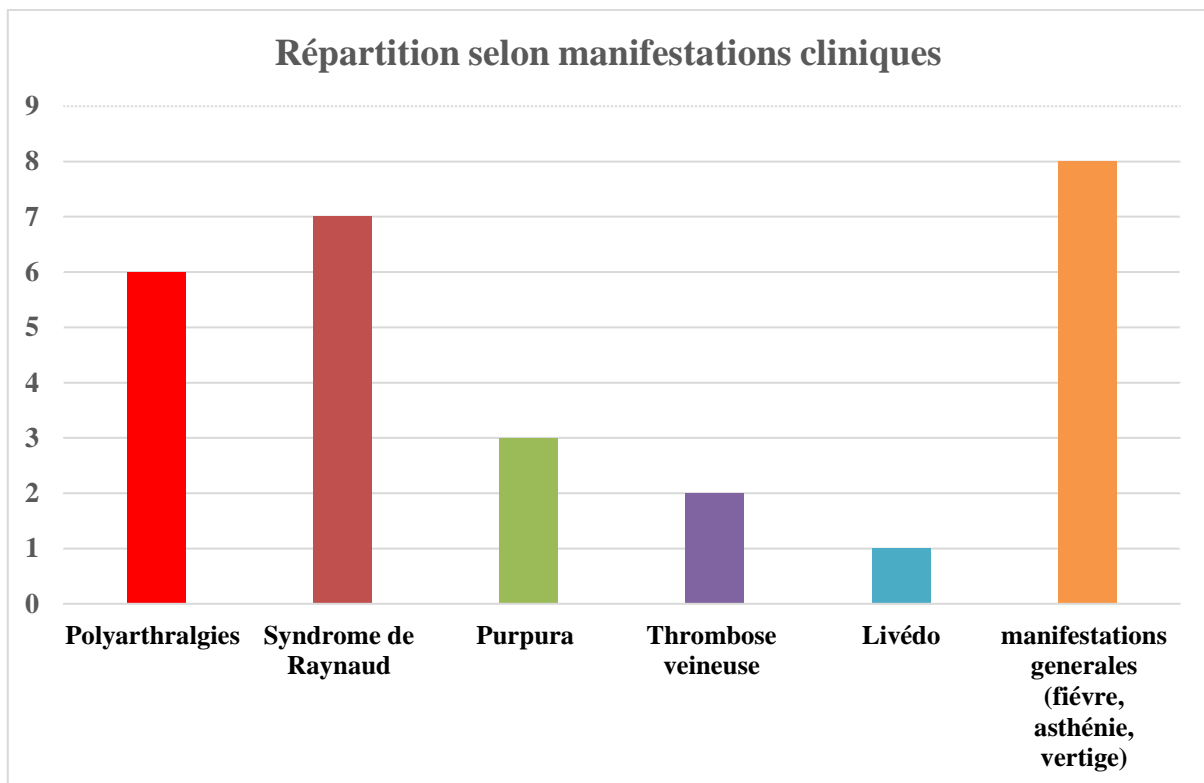


Figure 30 répartition selon manifestations cliniques

II.1.d. RESULTATS DES CAS POSTIFS :

La recherche de cryoglobulines parmi les 26 patients a montré que 2 patients soit 8%, étaient positifs (Figure31). Les caractéristiques des patients avec cryoglobulinémies positives sont résumées dans le tableau 10. Le sexe ratio étant de 1♀/ 1 ♂ (≈1) en faveur d'une égalité. La moyenne d'âge des patients de 54 ans.

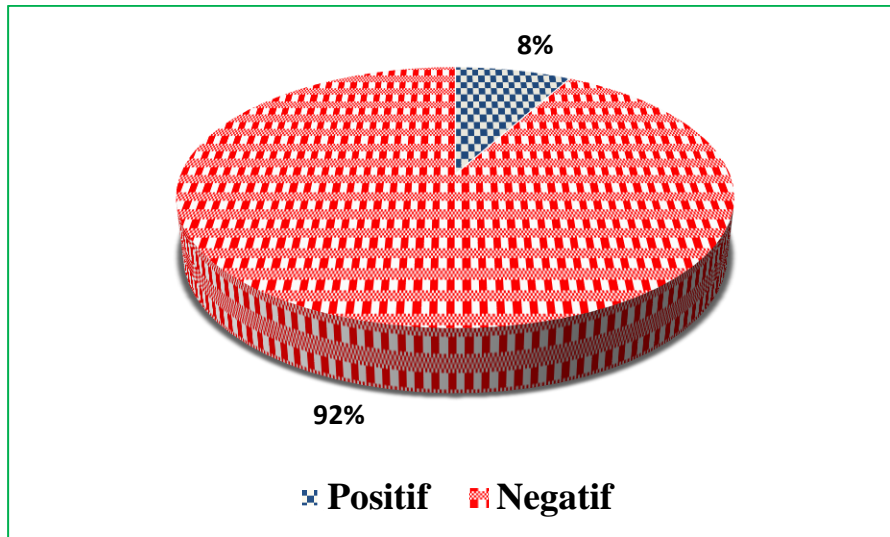


Figure 31 répartition des cas selon positivité

Répartition des patients selon le sexe et l'âge :

Tableau 12: Répartition des patients selon le sexe et l'âge

	<i>Patients avec cryoglobulines</i>	<i>Sexe féminin</i>	<i>Sexe masculin</i>
Nombre (%)	2(7,69%)	1 (50%)	1(50%)
Âge moyen	54 ans	68 ans	40 ans
Sexe Ratio	1 (1♀/1♂)	/	/

Dans notre travail qui a duré 5 mois on a trouvé 2 cas positifs :

1^{er} cas :

Il s'agit du patient B.S âgé de 40 ans demeurant à Blida orienté à notre niveau du service de néphrologie présent comme :

- Signes cliniques :
 - ❖ Un purpura vasculaire.
 - ❖ Une hypertension artérielle.
 - ❖ Une insuffisance rénale.
 - ❖ Anémie normocytaire normochrome.
 - ❖ Polyarthralgies.

Le patient est mis sous la chimiothérapie, présent d'un syndrome de Waldenström

Leur médecin traitant a demandé de faire : CRYO, EPS, C3, C4, FR

Le 10 février 2019, le patient a bénéficié d'un prélèvement pour la recherche d'une cryoglobuline.



Figure 32: prélèvement du B.S

Résultats biologiques :

C3 : 0,73 g/l. (0,82-1,60 g/l)

C4 : 0,06 g/l. (0,17-0,53 g/l)

FR : positif 128 UI/ml.

AAN : la recherche des auto anticorps anti-nucléaires est négative.



Figure 33: Électrophorèse des protéines sériques du B.S

À L'EPS : Présence d'une bande en position gamma.

-Après trois jours de suivi le sérum se positive avec une formation d'un cryoprécipité.
Après l'obtention de ce cryoprécipité, le Lavage du précipité par l'eau physiologique avec l'élimination de surnageant suivi par une redissolution du cryoprecipite est déroulées à température + 4

- On a fait une EPS de la cryo



Figure 34: Électrophorèse de cryoprécipité du B.S

À l'électrophorèse des protéines sériques :

Présence d'un pic en position Gamma, a une concentration estimée à 6 g/l

➤ À Immunofixation :

Le typage par immunofixation révèle qu'il s'agit d'une IgM monoclonal a chaîne légère kappa.

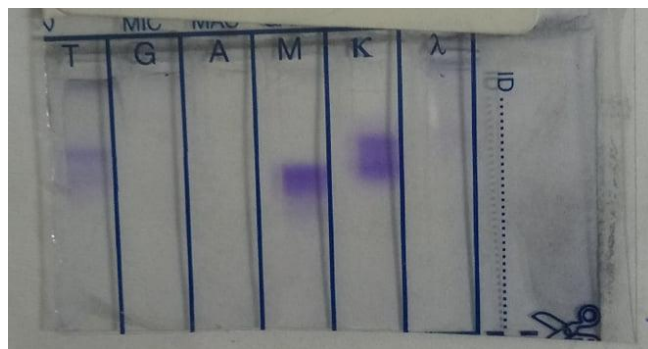


Figure 35: résultat d'immunofixation du B.S

Remarque :

L'étude quantitative n'a pas été faite suite à un incident technique.

2 ème cas :

Il s'agit de la patiente K.KH âgée de 68 ans demeurant à Tiaret ; orienté à notre niveau du service de néphrologie présent depuis 06 ans :

- Signes cliniques
 - ❖ Syndrome de Reynaud
 - ❖ Douleur osseuse
 - ❖ Polyarthralgies.
 - ❖ Fourmiment des extrémités

Orienter à notre niveau pour la recherche d'une cryoglobulinémie, et l'exploration d'autre paramètre immunologique il a demandé de faire : AAN, APL, FR, CCP.

Le 02 avril 2019, la patiente a été prélevée.

Les résultats biologiques :

FR positif 28 UI/ml

AAN négatif

APL négatif

Anti CCP négatif

-Après deux jours de suivi le sérum se positive avec une formation d'un cryoprécipité.

- Après l'obtention de ce cryoprécipité, toutes les étapes suivantes se sont déroulées à température + 4 :

- Lavage du précipité par l'eau physiologique avec l'élimination de surnageant suivi par une redissolution du cryoprécipité.

Quantification de cryoglobuline :

Se fait par la technique de rouge de pyrogallol (technique colorimétrique) au niveau de l'unité de biochimie (unité Hassiba BEN BOUALI)

Le taux de cryoglobulinémie était 0,3g/l (titre moyen 0,1-0,5g/l)

- On a fait une électrophorèse des protéines sériques de la cryoglobuline.

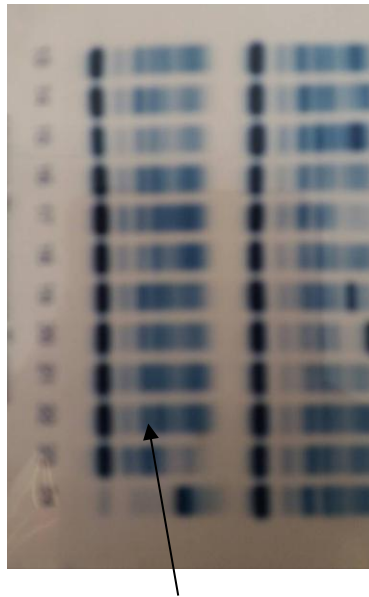


Figure 36: Électrophorèse des protéines sériques du K.KH

Il s'agit d'un syndrome inflammatoire chronique (EPS)



Figure 37: Électrophorèse de Cryoprécipité du K.KH

➤ À Immunofixation :

La patiente présente cryoglobuline type IIa IgM kappa monoclonal avec IgG kappa polyclonale.

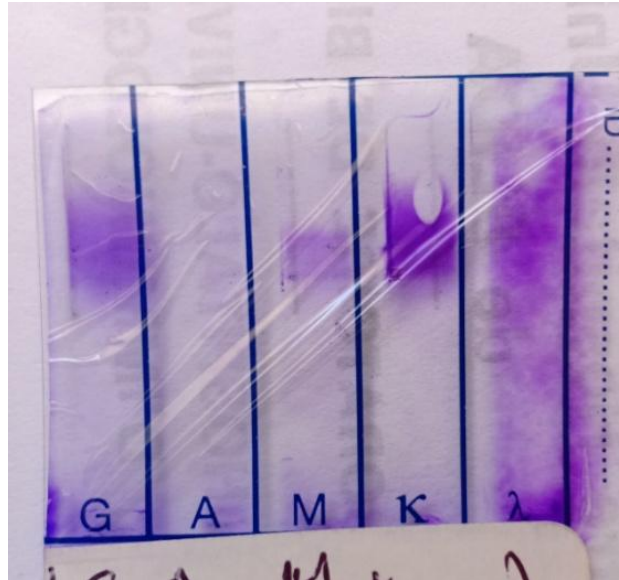


Figure 38: résultat d'immunofixation du K.K

II.2. Discussion :

II.2.a. Aspect des cryoglobulines :

L'aspect de cryocrit retrouvé dans notre travail est cryoprécipité.

Nos résultats concordent avec ceux de l'équipe de **le Carrer [8]** qui décrit le cryoprécipité comme l'aspect le plus fréquent.

II.2.b. Délai de positivité des cryoglobulines :

La positivité des deux cas est précoce, (dans les 3 premiers jours d'observation) L'activité facteur rhumatoïde de ces cryoglobulines pourrait aussi expliquer cette formation précoce et indépendante de la quantité de cryocrit car la majorité des cryoglobulines apparaissant entre le 1er et le 3ème jour ont une activité FR. Le type de cryoglobuline conditionne également le délai de positivité et de la formation de cryocrits.

Le cryoglobuline de « type I » avec activité FR, est d'apparition très précoce dans les trois premiers jours d'observation, concordant avec ce qui a été décrit par **Chihabi [73]**.

Le cryoglobuline de « type IIa » est d'apparition précoce, Leur activité FR serait responsable de leur apparition précoce puisque leur concentration n'est pas aussi importantes que celles du « type I » [73].

II.2.c. Caractéristiques immunochimiques des cryoglobulines :

Différents aspects à l'EPS des cryocrits ont été observés sur gel d'agarose, ces aspects confirment la nature immunoglobulinique, renseignent sur leurs caractères immunochimiques. Nous avons noté que le patient avec une cryoglobuline de « type I » a une bande homogène au niveau de la région gamma à l'EPS, le patient avec une cryoglobuline de « type IIa » a un aspect de bande homogène et hétérogène au niveau de la région des gammas à l'EPS.

II.2.c.1. *Typage des cryoglobulines :*

Le typage des cryoglobulines par IFX dans notre travail :

Le premier patient a une cryoglobulinémie type I.

Le deuxième patient a une cryoglobulinémie type IIa.

La fréquence est très différente des résultats des études anciennes comme celle de **Brouet et al [74]**. Deux éléments peuvent expliquer cette différence entre l'étude de 1974 et les deux dernières plus récentes. Le premier est en relation avec le fait que les hémopathies lymphoplasmocytaires malignes sont plus précocement diagnostiquées et mieux pris en charge que dans les années 1970, conduisant à une découverte de cryoglobuline de type I moins fréquente lors de ces dernières années.

Tableau 13: Fréquence des 2 types immunochimiques de cryoglobulines

<i>Auteurs</i>	<i>Année</i>	<i>Pays</i>	<i>% Type I</i>	<i>% Type IIa</i>
<i>Brouet et al [74]</i>	1983	France	25%	25%
<i>Le Carrer [8]</i>	1995	FRANCE	38%	37%
<i>Monti et al [75]</i>	1995	ITALIE	6% - 25%	25% - 62%
<i>Chihabi [73]</i>	2006	CALIFORNIE	5% - 15%	40% - 60%
<i>Szymanowicz</i>	2010	FRANCE	12%	32%

Quantification de cryoglobuline :

Chez le deuxième patient la concentration est de 0,3 g/l à titre moyen cela concorde avec l'étude de **Szymanowicz** en 2010[76].

II.2.c.2. *Isotypes d'immunoglobulines dans les cryoglobulines :*

Les isotypes des immunoglobulines impliquées dans la formation des cryoglobulines en fonction du type immunochimique diffèrent d'une étude à une autre, Dans notre travail l'isotype du premier patient est l'IgM monoclonale (le type I).

Pour le deuxième patient l'isotype est IgM monoclonale et IgG polyclonale (type IIa), les résultats sont comparables à ceux de l'étude de **le Carrer [76]**

II.2.c.3. Manifestations cliniques observées au cours des cryoglobulinémies :

II.2.c.3.1. Manifestations cutanées :

❖ Purpura vasculaire :

Il est particulièrement évocateur des cryoglobulines, majoré par le froid, son incidence varie d'un type à un autre, présenté chez le premier patient (cryoglobulinémie type I), cela concorde avec celle de **Ghillani P, Musset L. [27]**

II.2.c.3.2. Manifestations articulaires :

Il s'agit principalement des arthralgies touchant les mains et les genoux plus rarement les chevilles ou les coudes, la cryoglobuline peut entraîner une cristallisation du liquide synoviale et provoque des destructions articulaires, dans notre travail les deux patients présentent une polyarthralgie, cela concorde avec les données de **Cacoub P, Sène D. [19]** et **Musset L, et al [79]**.

II.2.c.3.3. Manifestations vasomotrices :

❖ Syndrome de Raynaud :

Il est significativement plus fréquent dans la cryoglobulinémie type I mais plus sévère lors de cryoglobulinémie type II. Présenté chez le deuxième patient, qui a une cryoglobulinémie de type IIa, ce résultat est similaire avec celle de **Romaszko JP, Tridon A [81]**

II.2.c.3.4. Manifestations rénales :

Entre 21 et 29 % des patients cryoglobulinémiques présentent des manifestations rénales selon **Dispenzieri et al [19]**.

Dans notre travail le premier patient présente une insuffisance rénale chronique cela concorde avec celle de la littérature. **[82,83,84,85]**

II.2.c.3.5. Manifestations lymphoprolifératives :

Les syndromes lymphoprolifératifs sont la principale cause de cryoglobulinémie associée à la malignité. Les cryoglobulines de type I ou II peuvent être retrouvées dans 7 à 20 % des cas de maladie de Waldenström.

Dans notre travail le premier patient présente une maladie de Waldenström, ce qui est similaire avec celle de la littérature. **[86,87,88]**

XI. Conclusion :

Le froid entraîne des signes cliniques chez certains sujets du fait de la précipitation de protéines sériques ou plasmatiques dans les vaisseaux de petit et moyen calibre, telles que les cryoglobulines. Elles sont constituées principalement d'immunoglobulines monoclonales ou polyclonales. Elles sont essentielles ou secondaires à des pathologies immunoprolifératives, auto-immunes ou infectieuses. Les signes cliniques associés sont des vascularites, se traduisant par des signes cutanés (purpura, phénomène de Raynaud), des arthralgies, une insuffisance rénale et des neuropathies périphériques.

Le traitement des formes symptomatiques repose d'abord sur celui de la cause (traitement antiviral, chimiothérapie, etc.) en association ou non avec le rituximab. Dans les formes sévères, des échanges plasmatiques ou l'introduction d'un immunosuppresseur peuvent être discutés.

La polyarthralgie, le syndrome de Raynaud sont considéré comme principaux signes cliniques de cette recherche.

Le type I et le type IIa sont été retrouver dans notre travail.

Le type III est souvent associe à des maladies infectieuses tels que (VIH, HCV), l'absence de ce dernier dans notre travail concorde avec l'absence des patients présentaient une symptomatologie infectieuse.

De ce fait ; on aimerait bien rechercher ce type de cryoglobuline (typeIII) dans d'autres travail de recherche.

La recherche de ces cryoprotéines exige des conditions pré-analytiques très strictes : prélèvement, transport et coagulation à 37 °C. Les demandes doivent être initiées dans un contexte clinique évocateur, car le diagnostic d'une cryoglobulinémie est difficile : d'une part ces cryoprotéines sont présentes chez des sujets asymptomatiques et d'autre part leur concentration n'est pas toujours proportionnelle à la sévérité des signes cliniques. La recherche et le suivi de ces cryoprotéines sont essentiels car leur présence peut entraîner des complications graves par atteinte d'organes vitaux ou développement de néoplasie.

Références bibliographiques :

- 1- HOBBS J.R.-Cryoproteins. Ann. Med. Int., 1986, 3: 254-259.
- 2- A. Szymanowicz, M.-J. Neyron Analyse statistique, sur 20 mois, des types de cryoglobulines et de l'isotypie des immunoglobulines impliquées, Immuno-analyse et biologie spécialisée (2010) 25 ; 179-184
- 3- Meltzer M, Franklin EC (1966) Cryoglobulinaemia: a study of 29 patients. I: IgG and IgM cryoglobulins and factors effecting cryoprecipitability. Am J Med 40: 828–836
- 4- Ramos-Casals M, Stone JH, Cid MC, Bosch X (2012) the cryoglobulinaemias. Lancet 379 : 348–360
- 5- Terrier B, Cacoub P (2013) Cryoglobulinemia vasculitis: an update. Curr Opin Rheumatol 25 : 10–18
- 6- Jennette JC, Falk RJ, Bacon PA, Basu N, CidMC, Ferrario F, Flores- Suarez LF, Gross WL, Guillevin L, Hagen EC, Hoffman GS, Jayne DR, Kallenberg CGM, Lamprecht P, Langford CA, Luqmani RA, Mahr AD, Matteson EL, Merkel PA, Ozen S, Pusey CD, Rasmussen N, Rees AJ, Scott DGI, Specks U, Stone JH, Takahashi K, Watts RA (2013) 2012 Revised international Chapel Hill consensus conference nomenclature of vasculitides. Arthritis Rheum 65 : 1–11
- 7- Wintrobe MM, Buell MV (1933) Hypertension associated with multiple myeloma. Bull Johns Hopkins Hosp 52 : 156–165
- 8- Le Carrer D. « Les cryoglobulinémies: exploration biologique et signification clinique ». *Revue française des laboratoires* : 44–50 (1995).
- 9- P. Cacoub, D. Sène, D. Saadoun, Les cryoglobulinémies, La Revue de médecine interne 29 (2008) : 200–208
- 10- Lerner AB, Watson CJ (1947) Studies of cryoglobulins I: unusual purpura associated with the presence of a high concentration of cryoglobulin (cold precipitable serum globulin). Am J Med Sci 214 : 410–415
- 11- Lospalluto J, Dorward B, Miller W Jr et al (1962) Cryoglobulinemia based on interaction between a gamma macroglobulin and 7S gamma globulin. Am J Med 32 : 142–147
- 12- Brouet JC, Clauvel JP, Danon F, Klein M, Seligmann M (1974) Biologic and clinical significance of cryoglobulins: a report of 86 cases. Am J Med 57 : 775–788
- 13- Le Carrer D. Les cryoglobulinémies: exploration biologique et signification clinique. *Revue française des laboratoires* 1995 ; 279 : 43-51.

- 14- Schifferli J, Frencil L, Tissot J. Infection par le virus de l'hépatite C, cryoglobulinémie et glomérulonéphrite. Paris : Flammarion Médecine Sciences, - 1994 : 107-8.
- 15- A. Szymanowicz, M.-J. Neyron Analyse statistique, sur 20 mois, des types de cryoglobulines et de l'isotypie des immunoglobulines impliquées, Immuno-analyse et biologie spécialisée (2010) 25 ; 179-184
- 16- Le Carrer D. Les cryoglobulinémies: exploration biologique et signification clinique. Revue française des laboratoires 1995 ; 279 : 43-51.
- 17- Szymanowicz A, Doche C, Coulhon H, Hennache B, Coquelin H, Berkhane Z, et al. Recommandations pour l'isolement, l'identification et l'interprétation des cryoglobulines. Spectra Biol 2007 ; 161 : 41—52.
- 18- Speight E.L., Lawrence C.M.1993. Reticulate purpura, cryoglobulinemia and livedo reticularis. Br J Dermatol 129 : 319-323
- 19- Olivier M, Coton T, Ragot C, Delpy R, Moalic JL, Debonne JM. Les cryoglobulinémies. Ann Biol Clin 2004 ; 5 : 521—8.
- 20- Coppo P, & Lassoued K. « Cryoglobulinémies : diagnostic, étiologies ». *Medecine thérapeutique* : 48 - 53 (2000).
- 21- Sargur R, White P, Egner W. Cryoglobulin evaluation: best practice? Ann Clin Biochem 2010 ; 47(Pt 1): 8-16.
- 22- Vital C, Vital A, Canron M-H, Jaffrè A et al (2006) Combined nerve and muscle biopsy in the diagnosis of vasculitis neuropathy. A 16-year retrospective study of 202 cases. J Peripher Nerv Syst 11 : 20–29
- 23- Trejo O, Ramos-Casals M, Garcia-Carrasco M et al (2001) Cryoglobulinemia: study of etiologic factors and clinical and immunologic features in 443 patients from a single center. Medicine (Baltimore) 80 : 252–262
- 24- Sene D, Ghillani-Dalbin P, Thibault V, et al. Longterm course of mixed cryoglobulinaemia in patients infected with hepatitis C virus. J Rheumatol 2004 ; 31 : 2199–206.
- 25- Della Rossa A, Tavoni A, D'Ascanio A, et al. Mortality rate and outcome factors in mixed cryoglobulinaemia: the impact of hepatitis C virus. Scand J Rheumatol 2010 ; 39: 167– 70.
- 26- Ferri C, Sebastiani M, Giuggioli D et al. Mixed cryoglobulinemia: demographic, clinical, and serologic features and survival in 321 patients Seminars Arthritis and rheumatism 2004; 33: 355–374.

- 27- Gemignani F, Melli G, Inglese C, Marbini A. Cryoglobulinaemia is a frequent cause of peripheral neuropathy in undiagnosed referral patients. *J Peripher Nerv Syst* 2002; 7: 59–64.
- 28- Ferri C (2008) Mixed cryoglobulinemia. *Orphan J Rare Dis* 3: 25
- 29- Bryce AH, Kyle RA, Dispenzieri A et al (2006) Natural history and therapy of 66 patients with mixed cryoglobulinemia. *Am J Hematol* 81 (7): 511–518
- 30- T.Maisonoble, J.M.Léger, L.Musset, P.Cacoub; Neurological manifestations in cryoglobulinemia, *Rev Neurol (Paris)* 2002; 158: 10, 920-924
- 31- Sansonno D, Dammacco F. Hepatitis C virus, cryoglobulinaemia, and vasculitis: immune complex relations. *Lancet Infect Dis* 2005 ; 5: 227–36
- 32- Beddhu S, Bastacky S, Johnson JP. The clinical and morphologic spectrum of renal cryoglobulinaemia. *Medicine (Baltimore)* 2002; 81: 398–409.
- 33- Leone N, Pellicano R, Ariata Maiocco I et al (2002) Mixed cryoglobulinaemia and chronic hepatitis C virus infection: the rheumatic manifestations. *J Med Virol* 66(2): 200–203
- 34- Willems M, Sheng L, Roskams T et al (1994) Hepatitis C virus and its genotypes in patients suffering from chronic hepatitis C with or without a cryoglobulinemia-related syndrome. *J Med Virol* 44 (3): 266–271
- 35- Terrier B, Karras A, Kahn JE, et al. The spectrum of type I cryoglobulinemia vasculitis: New insights based on 64 cases. *Medicine (Baltimore)* 2012 (in press).
- 36- Kayali Z, Buckwold VE, Zimmerman B, Schmidt WN(2002) Hepatitis C, cryoglobulinemia, and cirrhosis: a metaanalysis. *Hepatology* 36 (4 Pt 1): 978–985
- 37- Musset L, Diemert MC, Taibi F, et al. Characterization of cryoglobulins by immunoblotting. *Clin Chem* 1992; 38: 798–802.
- 38- Terrier B, Saadoun D, Sene D, Scerra S, Musset L, Cacoub P. Presentation and outcome of gastro-intestinal involvement in hepatitis C virus-related systemic vasculitis: a case-control study from a single-centre cohort of 163 patients. *Gut* 2010; 59: 1709–15.
- 39- Amital H, Rubinow A, Naparstek Y. Alveolar hemorrhage in cryoglobulinaemia—an indicator of poor prognosis. *Clin Exp Rheumatol* 2005; 23: 616–20.
- 40- Ferri C, La Civita L, Fazzi P, et al. Interstitial lung fibrosis and rheumatic disorders in patients with hepatitis C virus infection. *Br J Rheumatol* 1997; 36: 360–65

- 41- Retamozo S, Diaz-Lagares C, Bosch X, De Vita S, Ramos-Casals M. Life-threatening cryoglobulinemia. In: Khamashta MA, Ramos-Casals M, eds. Autoimmune diseases: acute and complex situations London: Springer-Verlag, 2011: 133–62.
- 42- Rieu V, Cohen P, Andre MH, et al. Characteristics and outcome of 49 patients with symptomatic cryoglobulinaemia. *Rheumatology (Oxford)* 2002; 41: 290–300.
- 43- Safadi R, Ilan Y, Ashur Y, Shouval D. Hepatitis C-associated cryoglobulinaemia presenting with pericardial effusion. *Am J Gastroenterol* 1997; 92: 710–12.
- 44- Wintrobe MM, Buell MV (1933) Hypertension associated with multiple myeloma. *Bull Johns Hopkins Hosp* 52: 156–165
- 45- Meltzer M, Franklin EC (1966) Cryoglobulinaemia: a study of 29 patients. I: IgG and IgM cryoglobulins and factors effecting cryoprecipitability. *Am J Med* 40: 828–836
- 46- Pagnoux C, Cohen P, Guillevin L (2006) Vasculitides secondary to infections. *Clin Exp Rheumatol* 24 (2 Suppl41): S71–S81 (Review)
- 47- Galli M, Monti G, Cereda UG et al (1984) Transient symptomatic cryoglobulinemia in gram-negative bacteria infections. *Boll Ist Sieroter Milan* 63 (1): 57–60
- 48- Gorevic PD, Galanakis D. Cryoglobulins, cryofibrinogenemia and pyroglobulins. In: Detrick B, Hamilton RG, Folds JD, eds. *Manual of molecular and clinical laboratory immunology*. 7th ed: ASM Press, 2006: 101–11.
- 49- U. Kallemuchikkal, P.D. Gorevic, Evaluation of cryoglobulins, *Arch. Pathol. Lab. Med.* 123 (1999) 119–125.
- 50- Ferri C, Zignego AL, Pileri SA. Cryoglobulins. *J Clin Pathol* 2002; 55: 4–13.
- 51- Gabriela Motyckova and Mandakolathur Murali; Laboratory testing for cryoglobulins *Am. J. Hematol.* 86: 500–502, 2011.
- 52- Shihabi ZK. Cryoglobulins: an important but neglected clinical test. *Ann Clin Lab Sci* 2006; 36: 395–408.
- 53- Marie-Nathalie Kolopp-Sarda, Colette Chapuis-Celliera, Isabelle Dimeta, Christine Lombarda; Protéines cryoprécipitantes en pathologie: cryoglobuline et cryofibrinogène, *revue francophone des laboratoires* - juillet-août 2012 - n° 444
- 54- Vermeersch P, Gijbels K, Mariën G, Lunn R, Egner W, White P, Bossuyt X (2008) A critical appraisal of current practice in the detection, analysis, and reporting of cryoglobulins. *Clin Chem* 54: 39–43
- 55- Szymanowicz A, Neyron MJ, Denis I. Protocole pratique pour la détection, la caractérisation et l'interprétation des cryoglobulines. *IBS* 2006; 21: 319–26.

- 56- Sargur R, White P, Egner W. Cryoglobulin evaluation: best practice? *Ann Clin Biochem* 2010; 47(Pt 1): 8-16.
- 57- Jan Damoiseaux & Jan Willem Cohen Tervaert. Diagnostics and Treatment of Cryoglobulinaemia: It Takes Two to Tango, *Clinic Rev Allerg Immunol* (2013)
- 58- F. Dammacco, D. Sansonno, C. Piccoli, F. A. Tucci and V. Racanelli; The cryoglobulins: an overview. *European Journal of Clinical Investigation* (2001) 31, 628-638
- 59- Le Carrer D. Cryoglobulinémies : proposition d'un protocole d'exploration biologique. Actualisation de leur classification. *Les feuillets de biologie* 1998; 221 : 55-65.
- 60- Matsushita M, Irino T, Komoda T, Sakagishi Y. Determination of proteins by a reverse Biuret method combined with the copper-bathocuproin chelate reaction. *Clin Chim Acta* 1993; 216: 103-11.
- 61- Watanabe N, Kamei S, Ohkubo A, *et al.* Urinary protein as measurement with a pyrogallol red-molybdate complex, manually and in Hitachi 726 automated analyser. *Clin Chem* 1986; 32: 1551-4.
- 62- Olivier M, Coton T, Ragot C, Chianéa D, Moalic J-L, Debonne J-M. Cryoglobuline : recherche et quantification. Étude chez le sujet sa in et chez des patients atteints d'une hépatite C chronique. *Ann Biol Clin (Paris)* 2005; 1: 59-65.
- 63- Maitra A, Ward PC, Kroft SH, Levinson BS, Jamal S, Fishleder AJ, Sendelbach KM, McKenna RW (2000) Cytoplasmic inclusions in leukocytes. An unusual manifestation of cryoglobulinemia. *Am J Clin Pathol* 113: 107-112
- 64- Fohlen-Walter A, Jacob C, Lecompte T, Lesesve JF (2002) Laboratory identification of cryoglobulinemia from automated blood cell counts, fresh blood samples, and blood films. *Am J Clin Pathol* 117: 606-614
- 65- Lesesve J-F, Muller M, Vautrin A, Odinotte A, Etienne Y (2011) Cryoglobulin detection from blood and peritoneal fluid smears. *Int Jnl Lab Hem* 33: 201-204
- 66- Shirato K, Reid C, Ibbetson JS, Hissaria P, Shireen S (2009) Diagnosis of type I cryoglobulinaemia made through identifying crystals in the blood smear. *Australas J Dermatol* 50: 281-284
- 67- BROUET J.C. - *Les cryoglobulinémies. Presse M-d., 1983, 47 : 2991-2996.*
- 68- HOBBS J.R. - *Cryoproteins. Ann. M-d. Int., 1986, 3 : 254- 259.*
- 69- De Vita S, Sacco C, Sansonno D, Gloghini A, Dammacco F, Crovatto M *et al.* « Characterization of overt B-cell lymphomas in patients with hepatitis C virus infection ». *Blood* : 776-782 (1997).

- 70- Monti G, Galli M, Invernizzi F et al (1995) Cryoglobulinaemias: a multi-centre study of the early clinical and laboratory manifestations of primary and secondary disease. GISC – Italian Group for the Study of Cryoglobulinaemias. *QJM* 88 (2): 115–126
- 71- Jacquot C, Pauti M & Meeus F. « Cryoglobulinémies ». *Encycl Med Chir*: 285 - 293 (2000).
- 72- Saadoun D, Resche-Rigon M, Thibault V, et al. Antiviral therapy for hepatitis C virus–associated mixed cryoglobulinemia vasculitis: a long-term followup study. *Arthritis Rheum* 2006; 54: 3696–3706.
- 73- (20)1 Chihabi, Z. « Cryoglobulins: An Important but Neglected Clinical Test ». *Annals of Clinical & Laboratory Science* 36, 395–408 (2006).
- 74- Brouet J.C et al. « Les cryoglobulinémies ». *Presse Méd* 47: 2991-2996 (1983).
- 75- (F)[3] Monti G, Galli M, Invernizzi F, Pioltelli P, Saccardo F, Monteverde A, et al. «Cryoglobulinaemias: a multi-centre study of the early clinical and laboratory manifestations of primary and secondary disease ». GISC. Italian Group for the Study of Cryoglobulinaemias. *Q J Med*;88: 115-26 (1995).
- 76- A. & Neyron, M.-J. « Analyse statistique, sur 20 mois, des types de cryoglobulines et de l'isotypie des immunoglobulines impliquées ». *Revue générales et analyses prospectives* 25 :179-184 (2010).
- 77- Marie-Nathalie Kolopp-Sardaa, *. C.-C. (2012, aout 10). *Protéines cryoprécipitantes en pathologie :cryoglobuline et cryofibrinogène*. Récupéré sur REVUE FRANCOPHONE DES LABORATOIRES Centre hospitalier Lyon-Sud.
- 78- Monti G, Galli M, Invernizzi F, et al. Cryoglobulinaemias: a multi-centre study of the early clinical and laboratory manifestations of primary and secondary disease. GISC. Italian Group for the Study of Cryoglobulinaemias. *QJM Mon J Assoc Phys* 1995;88:115–26.
- 79- Le Carrer D. « Cryoglobulinémies : proposition d'un protocole d'exploration biologique. Actualisation de leur classification ». *Les feuillets de biologie* : 29 – 33 (1998).
- 80- Taibi F & Myara I. « Etude d'une cryoglobulinémie ». *L'Eurobiologiste* 295-299 (1990).
- 81- Dispenzieri A, Gorevic P. « Cryoglobulinemia ». *Hematol Oncol Clin N Am*: 1315-49 (1999).
- 82- Trejo O, Ramos-Casals M, Garcia-Carrasco M, Yague J, Jimenez S, de la Red G, et al. Cryoglobulinemia: study of etiologic factors and clinical and

- immunologic features in 443 patients from a single center. *Medicine* 2001;80(4): 252–62.
- 83- Harel S, Mohr M, Jahn I, Aucouturier F, Galicier L, Asli B, et al. Clinico-biological characteristics and treatment of type I monoclonal cryoglobulinaemia: a study of 64 cases. *Br J Haematol* 2015;168(5):671–8.
- 84- Terrier B, Karras A, Kahn JE, Le Guenno G, Marie I, Benarous L, et al. The spectrum of type I cryoglobulinemia vasculitis: new insights based on 64 cases. *Medicine* 2013;92(2):61–8.
- 85- Nasr SH, Markowitz GS, Reddy BS, Maesaka J, Swidler MA, D’Agati VD. Dysproteinemia, proteinuria, and glomerulonephritis. *Kidney Int* 2006;69(4):772–5.
- 86- Le Carrer D. Cryoglobulinémies : proposition d’un protocole d’exploration biologique. Actualisation de leur classification. *Les feuillets de biologie* 1998; 221 : 55-65.
- 87- Ramos-Casals M, Stone JH, Cid MC, Bosch X (2012) the cryoglobulinaemias. *Lancet* 379: 348–360
- 88- Saccardo F, Novati P, Sironi D et al (2007) Causes of death in symptomatic cryoglobulinemia: 30 years of observation in a Department of Internal Medicine. *Dig Liver Dis* 39 (Suppl 1): S52–S54

Annexe

Annexe 1 : Fiche de renseignements

Pour récolter les renseignements cliniques et biologiques des patients recrutés pour les besoins de notre étude, nous avons utilisé la fiche suivante :

CENTRE HOSPITALO-UNIVERSITAIRE DE BLIDA
UNITE HASSIBA BEN-BOUALI
UNITE HOSPITALO-UNIVERSITAIRE D'IMMUNOLOGIE
Chef d'unité : Pr A.MEGHLOUI
Tél : 025411895/96 poste : 220
FICHE DE RENSEIGNEMENTS CRYOGLOBULINEMIE

N° d'identification :	Date :
Nom :	Prénom(s) :
Date de naissance :	Sexe :
Hospitalisé <input type="checkbox"/>	Externe <input type="checkbox"/>
CHU :	Service : Médecin traitant :

Antécédents :

Début de la symptomatologie :

Signes cliniques :

Signes biologiques :

Diagnostics suspectés :

Traitements :

Examens demandés :

Cryoglobuline.

Electrophorèse des protéines sériques.

AAN ANCA APL FR

Autres :

Médecin traitant

Annexe 2 : pour le suivie quotidien on a utilisé la fiche de lecture suivante

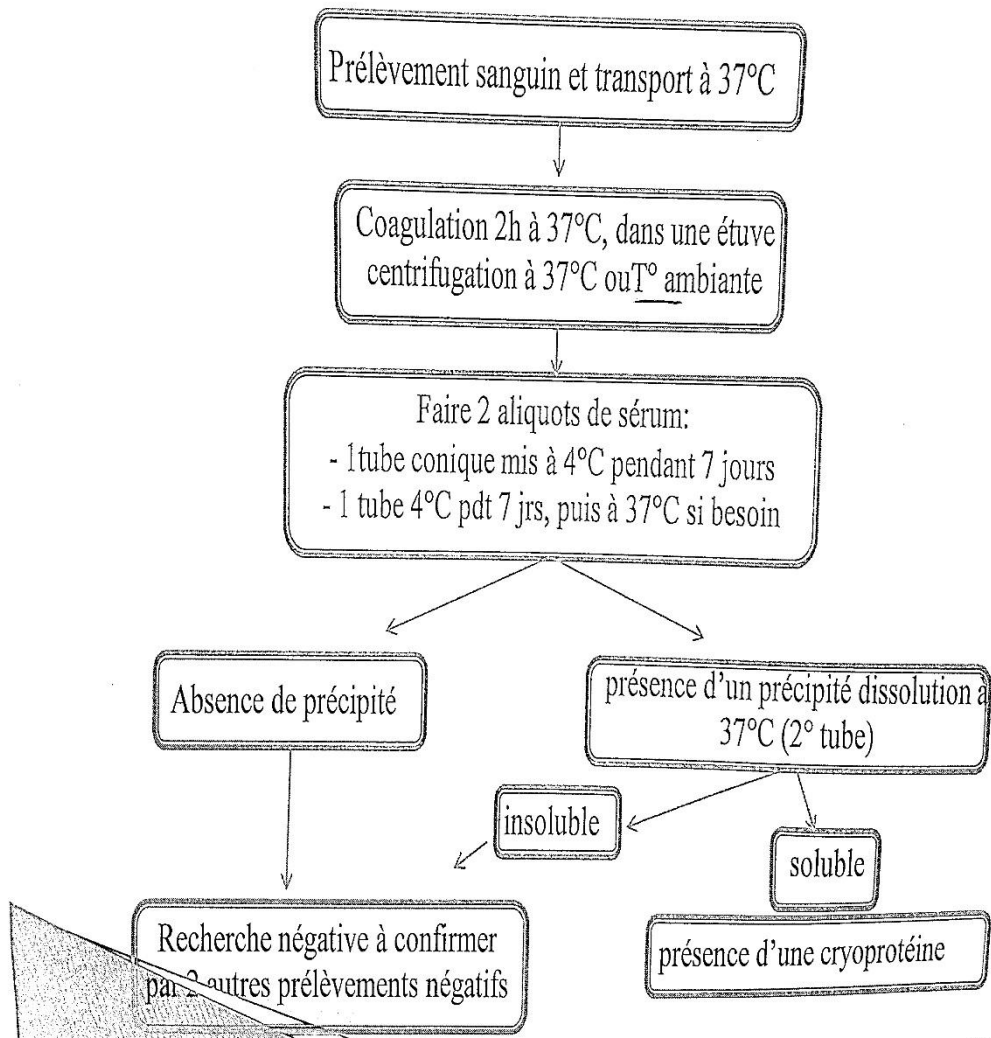
Liste d'observation des cryoglobulines					
Numéro du travail					
Nom et prénom					
Date de prélevement					
J1					
J2					
J3					
J4					
J5					
J6					
J7					
J8					
J9					
J10					
J11					
J12					
J13					
J14					
J15					
J16					
J17					
J18					
J19					
J20					
J21					

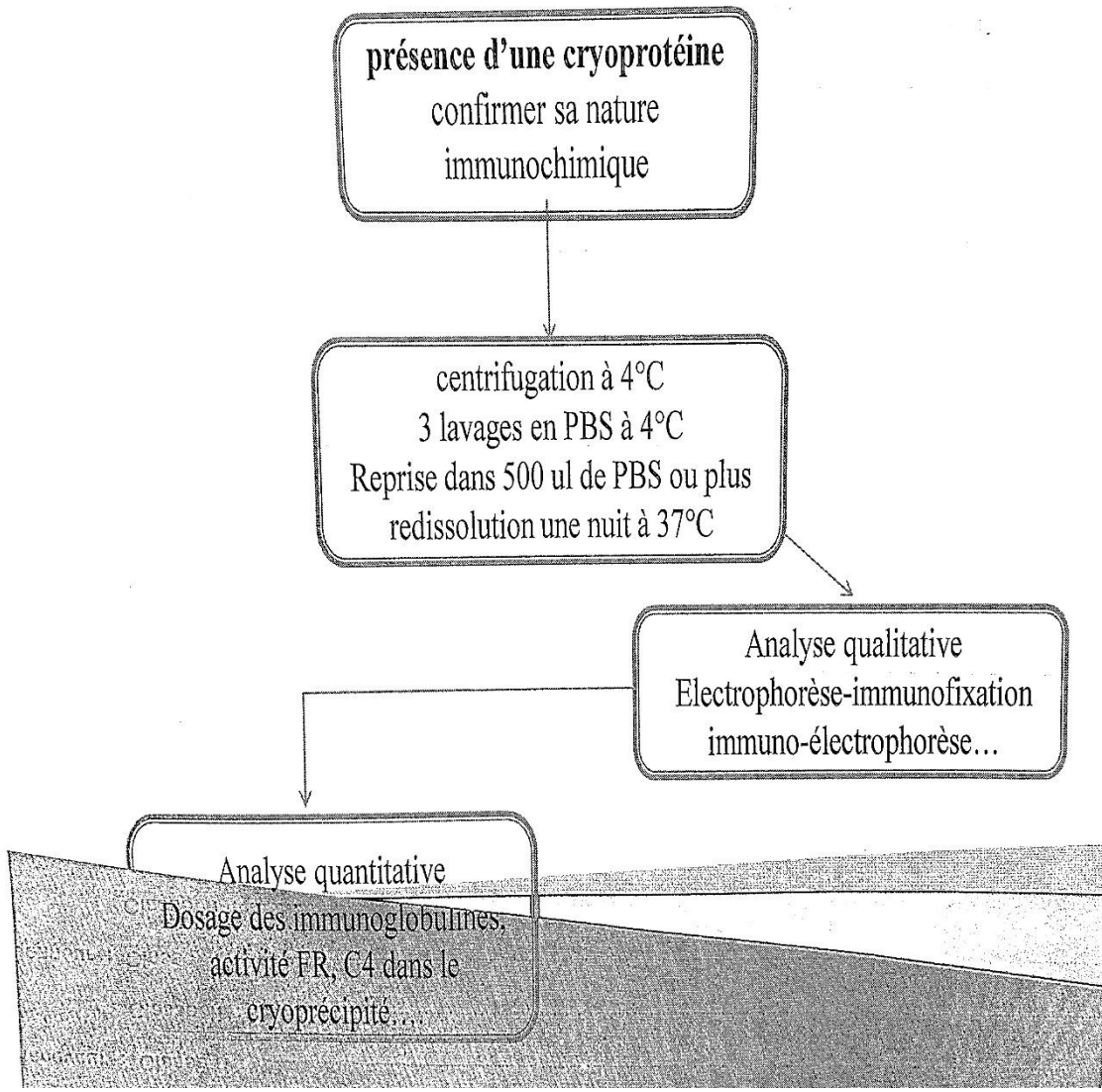
(+) **Présence de précipité blanchâtre, gel ou des cristaux**

(-) **Absence de précipité**

Annexe 3 : Protocole de la recherche et l'identification d'une cryoglobuline.

Logigramme de recherche, d'identification, et de quantification d'une cryoglobuline





Résumé

Titre : cryoglobulinemies : Manifestations cliniques et immunologiques.

Mots clés : Cryoglobuline, gammopathie monoclonale, maladies auto immunes.

Les cryoglobulines sont des immunoglobulines qui précipitent au froid. Elles sont classées en cryoglobulines monoclonales (type I) et en cryoglobulines mixtes (type II et type III). Elles peuvent être à l'origine de vascularites à complexes immuns (vascularites cryoglobulinémiques) parfois sévères, avec atteinte multiviscérale comprenant le plus souvent une atteinte cutanée, neurologique et rénale. Sur le plan biologique, le caractère symptomatique des cryoglobulinémies est associé à un effondrement de la fraction C4 du complément sérique et moins fréquemment la fraction C3 avec un complément hémolytique 50 le plus souvent normal.

Les cryoglobulinémies de type I sont toujours associées à des hémopathies B malignes tel le myélome malin et les lymphomes B, et leur traitement rejoint celui de la cause. Les cryoglobulinémies mixtes sont majoritairement liées à l'infection chronique par le virus de l'hépatite C, et secondairement aux connectivites et aux lymphomes B.

La recherche de cryoglobulines exige des conditions pré-analytiques très strictes. Les demandes doivent être initiées dans un contexte clinique évocateur, car le diagnostic d'une cryoglobulinémie est difficile : d'une part ces cryoglobulines sont présentes chez des sujets asymptomatiques et d'autre part leur concentration n'est pas toujours proportionnelle à la sévérité des signes cliniques. La recherche et le suivi de ces cryoglobulines sont essentiels car leur présence peut entraîner des complications graves par atteinte d'organes vitaux ou développement de néoplasie.

Dans une période de 5 mois s'étale de Janvier 2019 au Mai 2019 nous avons trouvé deux cas positifs de cryoglobuline :

Premier Cas : c'est une cryoglobulinemie type I (IgM monoclonal) dont le patient se présente pour un syndrome de Waldenström avec une insuffisance rénale, Anémie normocytaire normochrome, Polyarthralgies.

Deuxième cas : C'est une cryoglobulinemie type II a (IgM monoclonal+ IgG polyclonal) chez une pataiente avec syndrome de Reynaud, Douleur osseuse, Polyarthralgies, Fourmiment des extrémités

Abstract

Title: Cryoglobulinemia: Clinical and immunological manifestations

Key words: Cryoglobulins, monoclonal gammopathy, autoimmune diseases.

Cryoglobulins are immunoglobulins that precipitate cold. They are classified monoclonal cryoglobulins (type I) and mixed cryoglobulins (type II and type III). They can cause immune complex vasculitis (vasculitis cryoglobulinemic) sometimes severe, multisystem disease including with usually a skin disease, neurological and kidney.

Biologically, the symptomatic nature of cryoglobulinemia is associated with a collapse of the serum complement C4 fraction and less frequently the fraction C3 with a 50 haemolytic complement usually normal.

Type I cryoglobulinemia are always associated with hematological malignancies B as malignant myeloma and B-cell lymphomas and their treatment joins that of the cause. Mixed cryoglobulinemia are mostly related to chronic infection with hepatitis C, and secondarily with connective and B-cell lymphomas

Search cryoglobulins requires strict preanalytical conditions. Applications must be initiated in the clinical presentation because the diagnosis of cryoglobulinemia is difficult: firstly, these cryoglobulins are present in asymptomatic patients and their concentration is not always proportional to the severity of clinical signs. Research and monitoring of these cryoglobulins are essential because their presence can cause serious complications for reaching vital organs or developing neoplasia.

In a 5-month period from January 2019 to May 2019, we found two positive cases of cryoglobulin

First case: it is a cryoglobulinemia type I (IgM monoclonal) wich the patient presents for a syndrome of waldenstrom, with renal insufficiency, normochromic normocytic anemia, polyarthralgia.

Second case: It is a type II cryoglobulinemia (monoclonal IgM + polyclonal IgG) in a pataiente with Reynaud syndrome, bone pain, Polyarthralgia, Fourmiment of the extremities

ملخص

العنوان: الكريوغلوبيولينات، المظاهر السريرية والمناعية.

الكلمات الأساسية: كريوغلوبيولين، اعتلال أحادي النسيلة وأمراض المناعة الذاتية.

الكريوغلوبيولينات هي غلوبولينات مناعية تترسب في درجة حرارة منخفضة، وهي تصنف إلى كريوغلوبيولينات وحيدة النسلة (النوع الأول) وكريوغلوبيولينات مختلطة (النوع الثاني والثالث). يمكن أن تكون سبب التهاب الأوعية الدموية منيعة (التهاب الأوعية الدموية الكريوغلوبيولينية) خطيرة في بعض الأحيان، مع إصابة عدة أعضاء من بينها نجد غالباً إصابات جلدية وعصبية وكلوية.

إن الطبيعة العرضية للكريوغلوبيولينيميا بيولوجياً مرتبطة بنقصان الجزء C4 للمكمل المصلي، وبحدة أقل الجزء C3 وغالباً ما يبقى المكمل الانحلالي كالمعتاد.

إن الكريوغلوبيولينيميا من النوع الأول مرتبطة دائماً بالأمراض الدموية ب الخبيثة مثل المرض النقوي الخبيث والأورام اللمفاوية ب وعلاجها مرتبط بمسبباتها، ووجود الكريوغلوبيولينيميا المختلطة مرتبط أساساً بالعدوى المزمنة بفيروس التهاب الكبدى س وثانياً بأمراض النسيج الضام والأمراض اللمفاوية ب.

إن البحث عن الكريوغلوبيولينات يتطلب شروط صارمة قبل التحليل. ويجب تقديم طلبات في سياقات سريرية موحية، لأنه يصعب تشخيص الكريوغلوبيولينيميا: من جهة الكريوغلوبيولينات موجودة عند أشخاص لا تظهر عليهم أعراض، ومن جهة أخرى تركيزها ليس دائماً متناسب مع خطورة الأعراض السريرية، البحث عنها وتتبعها ضروري لأن وجودها قد يتسبب بمضاعفات خطيرة بإصابة أعضاء حيوية في الجسم أو قد تؤدي إلى تطور أورام.

في فترة 5 أشهر من يناير 2019 إلى مايو 2019 ، وجدنا حالتين إيجابيتين من كريوجلوبيولين:

حالة الأولى: هو نوع من غلوبولين الدم من النوع الأول (IgM أحادي النسيلة) الذي يقدمه المريض لمتلازمة والدنستروم مع قصور كلوي ، وفقر الدم النحاسي القاعدي الطبيعي.

الحالة الثانية: هي من النوع الثاني من داء البروجينية الغلوبولين الحميد (IgM أحادي النسيلة + IgG متعدد النسيلة) مع متلازمة رينود ، ألم العظام ، أربعة أطراف