

SOMMAIRE

	Pages
INTRODUCTION	1
PREMIERE PARTIE : RAPPELS.....	3
I. RAPPELS SUR LES IMMUNOGLOBULINES	3
I.1. Définition.....	3
I.2. Fonctions générales	3
I.2.1. Liaison à l'antigène	3
I.2.2. Fonctions effectrices	3
I.3. Structure de base des immunoglobulines	4
I.3.1. Chaines lourdes	6
I.3.2. Chaines légères.....	6
I.3.3. Ponts dissulfures	6
I.3.4. Régions variables (V) et Constantes (C).....	6
I.3.5. Région charnière	7
I.3.6. Domaines	7
I.4. Notion d'anticorps monoclonaux et polyclonaux.....	8
I.4.1. Anticorps monoclonaux	8
I.4.2. Anticorps polyclonaux	8
II. RAPPELS SUR LES CRYOGLOBULINES	8
II.1. Définition	8
II.2. Classification.....	9
II.2.1. Classification de Brouet.....	9
II.2.2. Classification de Le Carrer	13
II.3. Physiopathologie	14
II.4. Etiologies	15
II.4.1. Infections.....	16
II.4.2. Maladies auto-immunes	17

II.4.3.	Syndromes lymphoprolifératifs	17
II.4.4.	Cryoglobulinémies essentielles.....	17
II.5.	Manifestations cliniques.....	18
II.5.1.	Manifestations cutanées	18
II.5.2.	Manifestations rhumatismales	19
II.5.3.	Manifestations neurologiques	19
II.5.4.	Manifestations rénales	20
II.6.	Manifestations biologiques accompagnant les cryoglobulines	20
II.6.1.	Anomalies hématologiques.....	20
II.6.2.	Anomalies biochimiques et immunologiques.....	21
II.7.	Diagnostic de la cryoglobulinémie.....	21
	DEUXIEME PARTIE : METHODES ET RESULTATS	22
I.	METHODES	22
I.1.	Cadre d'étude	22
I.2.	Témoins positifs et négatifs.....	22
I.3.	Patients	23
I.4.	Paramètres étudiés	23
I.5.	Méthodes	23
I.5.1.	Matériels pour la réalisation de l'analyse.....	23
I.5.2.	Technique.....	30
I.6.	Considération éthique.....	36
I.7.	Limites de l'étude.....	36
II.	RESULTATS	37
II.1.	Protocole	37
II.1.1.	Obtention des échantillons.....	37
II.1.2.	Obtention du cryorécipité	37
II.1.3.	Lecture du cryoprécipité :	37
II.1.4.	Analyse du cryoprécipité	37

II.1.5. Immunotypage	37
II.2. Résultats des témoins	38
II.2.1. Détection du cryoprécipité.....	38
II.2.2. Quantification du cryoprécipité	38
II.2.3. Immunotyage	38
II.3. Résultats des patients	39
TROISIEME PARTIE : DISCUSSION.....	42
I. Obtention des échantillons	42
II. Obtention du cryoprécipité.....	44
III. Lecture des cryoprécipités et interprétation de la lecture.....	45
IV. Analyse du cryoprécipité.....	46
V. Quantification du cryoprécipité	47
VI. Interprétation de l'immunofixation	49
VII. Discussion Clinique	51
VIII. Protocole finale	57
CONCLUSION.....	59
REFERENCES BIBLIOGRAHIQUES	
ANNEXE	

LISTE DES FIGURES

	Pages
Figure 1 : Structure de base des immunoglobulines	5
Figure 2 : Représentation tridimensionnelle d'une Ig G.....	5
Figure 3 : Organisation en domaine des Immunoglobulines	8
Figure 4 : Cryoglobuline de type I à l'immunofixation, constitué d'IgM kappa monoclonale.	10
Figure 5 : Cryoglobuline de type II à l'immunofixation, associant une IgM Kappa monoclonale et des Ig G polyclonales.....	11
Figure 6 : Cryoglobuline mixte de type III à l'immunofixation, associant principalement des IgM polyclonales avec des IgG et des IgA polyclonales ..	12
Figure 7 : Etuve (maintenu à 37°C)	24
Figure 8 : Aliquote de 2ml	25
Figure 9 : Centrifugeuse thermostatée	26
Figure 10 : Spectrophotomètre.....	27
Figure 11 : Kit Sebia	27
Figure 12 : Contenu du kit sebia	28
Figure 13 : Automate HYDRASIS	28
Figure 14 : Automate HYDRIS.....	29
Figure 15 : Matériels de prélèvement préchauffés à 37°C dans l'étuve	30
Figure 16 : Extrait de la fiche de suivi	31
Figure 17 : Lecture de la détection de la cryoglobuline.....	32
Figure 18 : Protocole pour la réalisation et l'interprétation de l'exploration de la cryoglobulinémie.....	35
Figure 19 : Résultats de la détection des cryoglobulines	40
Figure 20 : Résultats de l'immunofixation	41

LISTE DES TABLEAUX

	Pages
Tableau I : Classification des cryoglobulines proposée par Brouet	13
Tableau II : Classification des cryoglobulines proposée par Le Carrer	14
Tableau III : Reprise du cryorécipité selon son abondance.....	33
Tableau IV : Comparaison des résultats pour la détection des cryoprécipités	38
Tableau V : Comparaison des résultats du dosage des cryorécipités	38
Tableau VI : Comparaison des résultats de l'immunofixation	38
Tableau VII : Résultats de la détection du dosage et de l'immunofixation pour les patients.....	39
Tableau VIII : Libellé pour l'axe quantitatif en vue de l'interprétation des cryoglobulines	52
Tableau IX : Libellé pour l'axe concernant le type de cryoglobuline.....	53
Tableau X : Libellé pour l'axe monoclonal concernant les cryoglobulines de type I.....	53
Tableau XI : Libellé pour l'axe oligoclonal concernant les cryoglobulines de type IIb ...	54
Tableau XII : Libellé pour l'axe polyclonal concernant les cryoglobulines de type IIa et IIb.....	54
Tableau XIII : Libellés pour l'axe polyclonal des cryoglobulines de type III	55
Tableau XIV : Libellé pour les autres commentaires et évolution du taux de cryoglobuline.....	56

LISTE D'ANNEXE

Annexe 1 : Fiche de travail

LISTE DES ABREVIATIONS

CCMH	: Concentration corpusculaire moyenne de l'hémoglobine
CHU-JRA	: Centre hospitalier universitaire Joseph Ravoahangy Andrianavalona
CNBH	: Collège national de biologie des hopitaux
IFE	: Immunofixation
Ig	: Immunoglobuline
NFS	: Numération formule sanguine
VHC	: Virus de l'hépatite C
VIH	: Virus d'immunodéficience humain
VSH	: Vitesse de sédimentation horaire
UPFR	: Unité paraclinique de formation et de recherche

INTRODUCTION

INTRODUCTION

Les cryoglobulines sont des Immunoglobulines ou de véritables complexes immuns précipitant au froid, et qui redeviennent solubles après chauffage à 37°C. La description initiale clinique et physicochimique d'une cryoglobuline est attribuée à *Wintrobe* et *Buell* en 1933, mais il faudra attendre 1953 pour qu'une meilleure connaissance des cryoglobulines et la mise en œuvre de techniques d'analyse sensibles permettent de les isoler et de les caractériser. Et en 1966, *Meltezer* et *Franklin* associent la présence d'une cryoglobuline à la triade clinique purpura, arthralgies et asthénie. [1]. La cryoglobulinémie peut être asymptomatique et rester une anomalie biologique isolée [2] ou responsable de manifestations cliniques bruyantes et graves comme les néphropathies et neuropathies. Généralement secondaires, elles peuvent accompagner de nombreuses maladies telles que les hémopathies lymphoplasmocytaires, les maladies immunoprolifératives et maladies inflammatoires chroniques auto-immunes, les maladies infectieuses ou virales, essentiellement l'hépatite C. Dans 15 à 30% des cas, aucune cause ne peut être identifiée et on parle alors de cryoglobulinémie essentielle.

Dans les pays développés, le dosage et l'analyse des cryoglobulinémies constituent un examen dont la fréquence de prescription a augmenté de façon significative ces dernières années [3]. Aussi l'étude des cryoglobulines a connu un regain d'intérêt du fait de leur grande fréquence dans les infections par le virus de l'hépatite C reconnue comme la cause majeure de cryoglobulinémie. Cependant à Madagascar aucune recherche portant sur le sujet n'a été encore publiée et l'analyse des cryoglobulines est méconnue par la plupart des médecins généralistes et cliniciens. Pourtant, nombreux auteurs étrangers ont rapporté l'importance de l'information apportée par l'analyse et le dosage des cryoglobulines dans l'aide au diagnostic étiologique de certaines manifestations cliniques (purpura vasculaire, syndrome de Raynaud) ou pour orienter vers un diagnostic impliquant la production des immunoglobulines (hémopathies lymphoïdes, maladies virales ou auto-immunes). [4]

En se basant sur les ouvrages de référence [2-4], nous nous proposons, dans notre étude de faire des essais techniques pour l'exploration biologique des cryoglobulines en l'adaptant au plateau technique disponible au laboratoire tout en

maintenant la qualité et la fiabilité des résultats. Notre objectif est alors d'établir un protocole pour le dosage et analyse des cryoglobulines.

Notre travail est divisé en trois grandes parties :

- la première partie est consacrée aux rappels qui sont nécessaires pour la compréhension du sujet ;
- la seconde partie présente les matériels et la méthode et contient une description très détaillée de la technique utilisée ;
- avant la conclusion, la troisième partie est consacrée à la discussion et aux suggestions ainsi que les perspectives.

PREMIERE PARTIE : RAPPELS

PREMIERE PARTIE : RAPPELS

I. RAPPELS SUR LES IMMUNOGLOBULINES

I.1. Définition

Les immunoglobulines sont des glycoprotéines qui sont produites par les plasmocytes en réponse à un immunogène et qui fonctionnent comme des anticorps [3]. Les immunoglobulines tirent leur nom de la découverte qu'elles migrent avec les protéines globulaires lorsqu'un sérum immun (contenant des anticorps) est placé dans un champ électrique (électrophorèse des protéines sériques). Elles sont présentes sous forme soluble dans le plasma et dans de nombreuses sécrétions, et sous forme membranaire jouant le rôle de récepteur de l'antigène à la surface des lymphocytes B. [4]

I.2. Fonctions générales

I.2.1. Liaison à l'antigène

Les immunoglobulines se lient de façon spécifique à un ou plusieurs antigènes apparentés. Chaque immunoglobuline se lie à un déterminant antigénique spécifique. Cette liaison à l'antigène est la première fonction des anticorps qui, en tant que telle, peut assurer une protection de l'hôte.

I.2.2. Fonctions effectrices

Souvent, la liaison de l'anticorps à l'antigène ne conduit à aucun effet biologique direct. Les effets biologiques importants des anticorps sont plutôt la conséquence de fonctions effectrices secondaires. Les immunoglobulines possèdent des fonctions effectrices variées. En général, pour qu'une fonction effectrice soit mise en œuvre, il faut que l'anticorps se lie à l'antigène. Les immunoglobulines ne présentent pas toutes l'ensemble des fonctions effectrices.

Ces fonctions effectrices incluent :

- Fixation du complément : cela conduit à la lyse des cellules et au relâchement de molécules biologiquement actives ;
- Liaison à des types cellulaires variés. : les phagocytes, les lymphocytes, les plaquettes, les mastocytes, les basophiles possèdent des récepteurs pour les immunoglobulines. Cette liaison peut conduire les cellules à s'activer et à mettre en œuvre des fonctions effectrices.

Certaines immunoglobulines peuvent aussi se lier à des récepteurs sur les trophoblastes du placenta, ce qui conduit à leur passage au travers de la barrière placentaire. En conséquence, les anticorps maternels transférés assurent l'immunité du fœtus et du nouveau-né.

I.3. Structure de base des immunoglobulines

Bien que différentes immunoglobulines puissent présenter des variations structurales, elles sont toutes construites sur la même unité de base. Les immunoglobulines sont des molécules symétriques formées de quatre chaînes polypeptidiques homologues 2 à 2 et reliées par des ponts disulfures : deux chaînes lourdes (H pour « heavy ») et deux chaînes légères (L pour « light »). [4]

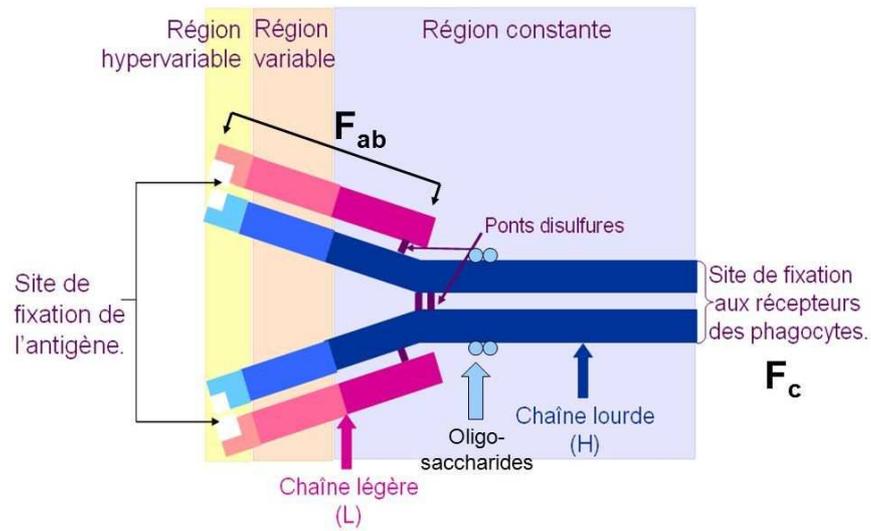


Figure 1 : Structure de base des immunoglobulines

Source : Beauvillaina C, Renierb G, Jeannina P, Ifrahc N, Chevaillera A. Les Immunoglobulines. Rev Fr Lab 2008

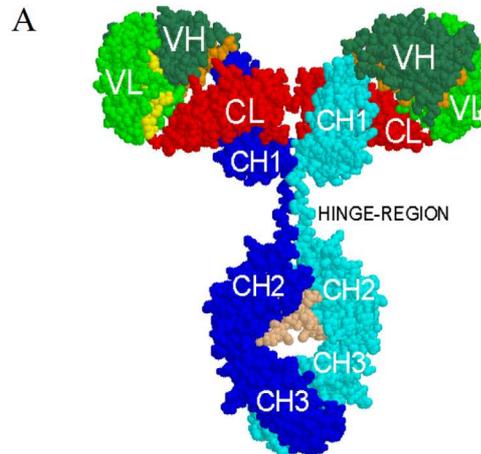


Figure 2 : Représentation tridimensionnelle d'une Ig G

VH, VL : régions variables des chaînes lourdes et chaînes légères

CH, CL : régions constantes des chaînes lourdes et chaînes légères

Hinge region : région charnière

Source : La France 23

I.3.1. Chaînes lourdes

Il existe cinq types de chaînes lourdes, désignées par les lettres grecques γ (gamma), α (alpha), μ (mu), δ (delta), ϵ (epsilon) qui définissent les cinq **classes** d'immunoglobulines, qui sont respectivement IgG, IgA, IgM, IgD, et IgE.

Certaines classes sont divisées en sous classes comme pour les IgG (IgG1 à IgG4) et les IgA (IgA1 et IgA2).

I.3.2. Chaînes légères

Il existe deux types de chaînes légères, appelées κ (kappa) et λ (lambda) qui peuvent se combiner avec n'importe quel type de chaîne lourde. Pour une immunoglobuline donnée, les deux chaînes légères sont toujours identiques.

I.3.3. Ponts dissulfures

I.3.3.1. Ponts dissulfures inter-chaînes

Les chaînes lourdes et légères, d'une part, et les deux chaînes lourdes, d'autre part, sont maintenues ensemble par des ponts-disulfures inter-chaînes ainsi que des liaisons non-covalentes. Le nombre de ponts disulfures inter-chaînes varie en fonction des molécules d'immunoglobulines

I.3.3.2. Ponts dissulfures intra-chaînes

On trouve également des ponts disulfures intra-chaîne au sein de chaque chaîne polypeptidique. [4]

I.3.4. Régions variables (V) et Constantes (C)

Lorsque l'on compare les séquences en acides aminés de nombreuses chaînes légères et chaînes lourdes différentes, il apparaît qu'à la fois les chaînes lourdes et les chaînes légères peuvent être divisées en deux régions basées sur la variabilité des séquences.

Ce sont :

- Pour la chaîne légère : les régions VL (110 acides aminés) et CL (110 acides aminés) ;
- Pour la chaîne lourde : les régions VH (110 acides aminés) et CH (330-440 acides aminés)

I.3.5. Région charnière

C'est la région au niveau de laquelle les bras de la structure d'anticorps sont en forme de Y. Cette région est appelée « charnière » car c'est à ce niveau que la molécule présente un certain degré de flexibilité.

I.3.6. Domaines

La représentation tridimensionnelle est plus complexe. En effet la molécule est plutôt structurée en régions globulaires, chacune d'entre elles contenant un pont disulfure intra-chaîne. Ces régions sont appelées domaines (contenant 110 AA)

- Domaines de la chaîne légère : VL et CL
- Domaines de la chaîne lourde VH, CH1 à CH3 (éventuellement CH4)

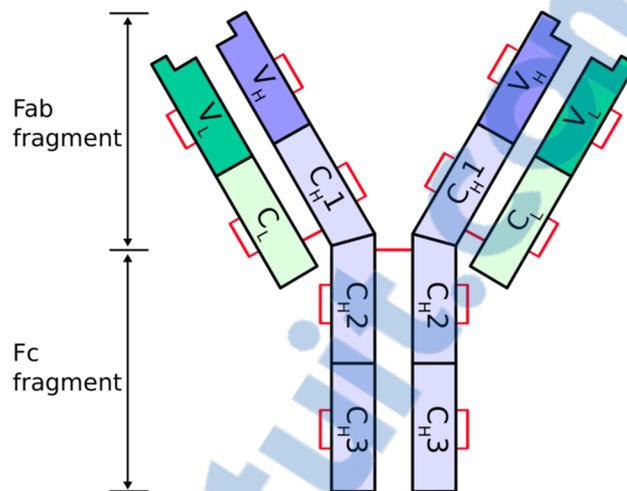


Figure 3 : Organisation en domaine des Immunoglobulines

VH et CH : les chaînes lourdes

VL et CL : les chaînes légères

Source : www.slideplayer.fr

I.4. Notion d'anticorps monoclonaux et polyclonaux

I.4.1. Anticorps monoclonaux

Anticorps résultant de la stimulation d'un seul clone de lymphocytes B par la reconnaissance d'un seul épitope.

I.4.2. Anticorps polyclonaux

Mélange d'Anticorps produits par différents clones de lymphocytes B par stimulation de plusieurs épitopes.

II. RAPPELS SUR LES CRYOGLOBULINES

II.1. Définition

Les cryoglobulines sont des complexes multimoléculaires composés d'une ou plusieurs classes d'immunoglobulines qui ont la propriété de précipiter à basse température et de se redissoudre par réchauffement du sérum à 37 °C. [5-7]. Ce sont des immunoglobulines qui se précipitent au froid et peuvent être à l'origine de vascularites à complexes immuns parfois sévères avec atteinte multiviscérale. [8].

La cryoglobuline doit être distinguée des autres cryoprotéines à savoir le cryofibrinogène, le complexe protéine C réactive- albumine, et les agglutinines froides. [9]

II.2. Classification

II.2.1. Classification de Brouet

La première classification est celle de *Brouet et al* (tableau I), proposée depuis 1974 et reposant sur l'analyse immunochimique de ces cryoglobulines. On en définit 3 types :

- les cryoglobulines de type I composées d'une immunoglobuline monoclonale unique ;
- les cryoglobulines de type II représentant les cryoglobulinémies mixtes, avec le cryoglobuline de type III, composées d'immunoglobulines polyclonales associées à un ou plusieurs constituants monoclonaux. [8]

II.2.1.1. Cryoglobulinémies monoclonales de type I

Elles représentent 6 à 25% des cryoglobulinémies. Elles sont constituées d'une immunoglobuline monoclonale unique, le plus souvent une IgM (parfois IgG, rarement IgA) ou exceptionnellement de chaînes légères libres monoclonales. Elles s'observent principalement en association avec des pathologies lymphoprolifératives telles le myélome multiple et la macroglobulinémie de Waldenström.

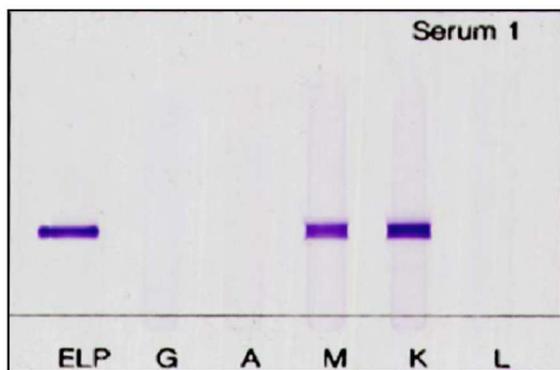


Figure 4 : Cryoglobuline de type I à l'immunofixation, constitué d'IgM kappa monoclonale.

Source : Szymanowicz A, Neyron M J. Analyse statistique sur 20 mois des types de cryoglobulines et d'isotypie des cryoglobulines impliquées. Im-an Bio Spé. 2010

II.2.1.2. Cryoglobulinémies mixtes de type II

Elles sont de l'ordre de 25 à 62% des cryoglobulinémies. Elles sont composées de deux types d'immunoglobulines : l'une monoclonale et les autres polyclonales. Le plus souvent, il s'agit d'une IgM monoclonale associée à des IgG et IgA polyclonales. L'IgM ici a une activité facteur rhumatoïde anti – IgG. S'observant également dans les pathologies lymphoprolifératives, elles sont aussi associées à des maladies auto-immunes telles les collagénoses et les polyarthrites rhumatoïdes.

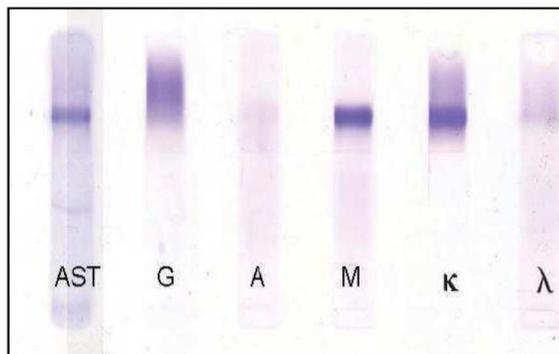


Figure 5 : Cryoglobuline de type II à l'immunofixation, associant une IgM Kappa monoclonale et des Ig G polyclonales.

Source : Kolopp- Sardaa M N, Chapuis- Celliera C, Dimeta I, Lombarda C.

Protéines précipitantes en pathologie : cryoglobuline et cryofibrinogène. Rev Fra Lab. 2014

II.2.1.3. Cryoglobulinémies mixtes de type III

Elles représentent 32 à 50% des cas retrouvés et caractérisées par des complexes d'IgG polyclonales et d'IgM polyclonales. Elles sont de taux souvent faible et dont la cryoprécipitation est plus lente. Elles représentent la plus fréquente des cryoglobulinémies et se retrouvent dans la majorité des cas associées à une infection par le virus de l'hépatite virale C.

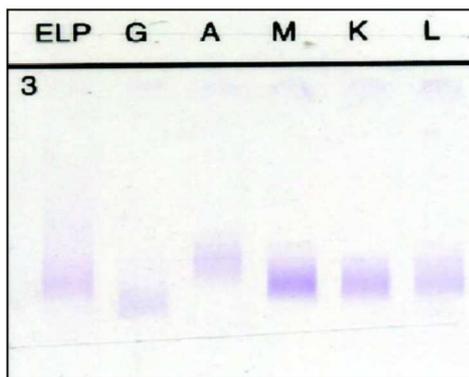


Figure 6 : Cryoglobuline mixte de type III à l'immunofixation, associant principalement des IgM polyclonales avec des IgG et des IgA polyclonales

Source : Szymanowicz A, Neyron M J. Analyse statistique sur 20 mois des types de cryoglobulines et d'isotypie des cryoglobulines impliquées. Im-an Bio Spé.

2010

Tableau I : Classification des cryoglobulines proposée par Brouet

Type de la cryoglobuline	Caractère des Ig la composant	Classe des Ig rentrant dans sa composition
Type I monoclonale	Une Ig monoclonale	-IgM monoclonale (le plus souvent) -IgG monoclonale -IgA monoclonale Chaînes légères libres d'Ig (très rares)
Type II mixte monoclonale et polyclonale	Une Ig monoclonale + une ou plusieurs classes d'Ig polyclonales	-IgM monoclonale + IgG polyclonales (le plus souvent) -IgG monoclonale + IgG polyclonales -IgA monoclonale + IgG polyclonales -IgM monoclonale + IgG et IgA polyclonales
Type III mixte polyclonale	Une ou plusieurs classes d'Ig polyclonales IgM ou IgG ou IgA polyclonales	-IgG + IgM polyclonales -IgG + IgA polyclonales -IgM + IgG + IgA polyclonales

Source : Brouet JC, Clauvel JP, Danon F. Biologic and clinical significance of cryoglobulins: a report of 86 cases. Am J Med. 1974

II.2.2. Classification de Le Carrer

L'amélioration des techniques biologiques de dépistage et de typage des cryoglobulines a permis la mise en évidence de cryoglobulines en concentration moins importantes, dans les pathologies infectieuses ou auto-immunes [13]. En utilisant ces techniques de typage, *Le Carrer D* [14] a proposé une nouvelle classification (tableau II)

Tableau II : Classification des cryoglobulines proposée par Le Carrer

Type de la cryoglobuline	Caractère des Ig la composant	Classe des Ig rentrant dans sa composition
Type I monoclonale	Une Ig monoclonale	-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	-IgM monoclonale + IgG polyclonales -IgG monoclonale + IgG polyclonales -IgA monoclonale + IgG polyclonales -IgM monoclonale + IgG et IgA polyclonales
Type IIb mixte oligoclonale et polyclonale	Une ou plusieurs classes d'Ig oligoclonales + une ou plusieurs classes d'Ig polyclonales	IgG ou/et IgM oligoclonales + IgG ou/et IgM polyclonales
Type III mixte polyclonale	Une ou plusieurs classes d'Ig polyclonales	IgM ou IgG ou IgA polyclonales IgG + IgM polyclonales IgG + IgA polyclonales IgM + IgG + IgA polyclonales

Source : Le Carrer D. Cryoglobulinémies : proposition d'un protocole d'exploration biologique. Actualisation de leur classification. Feu Bio. 1998

II.3. Physiopathologie

La physiopathologie est incomplètement élucidée. [15] Cependant l'hypothèse principale fait intervenir un défaut de la fibrinolyse en raison d'une augmentation de l' α 1-antitrypsine et de l' α 2-macroglobuline qui sont des inhibiteurs de la plasmine et donc de la fibrinolyse. [16]

Il en résulte une accumulation de cryofibrinogène entraînant la formation de caillots. Ceci explique les manifestations cliniques thrombotiques avec occlusion des artères de petits et moyens calibres.

En outre, plusieurs hypothèses peuvent être envisagées concernant l'influence de quelques paramètres sur la cryoprécipitation selon *Coppo et al* en 2000. [17] Ces paramètres influençant sont représentés par :

- **La température** : La condition essentielle pour la précipitation d'une cryoglobuline est la baisse de la température [17,18]. La température de cryoprécipitation diffère d'une cryoglobuline à une autre. Certaines peuvent se précipiter dès +30°C expliquant en partie les purpuras cutanés vu que la température de la peau avoisine +28°C ou même moins. Elle dépend aussi de la concentration en cryoglobuline : plus la concentration est élevée, plus la température de cryoprécipitation est haute [17, 18]
- **Le pH et la force ionique** : on note une diminution de la solubilité de la cryoglobuline parallèle à la diminution de la force des ions notamment le sodium expliquant le fait qu'une hyponatrémie vraie pourrait représenter un facteur de risque à la précipitation. [17-19]
- **La présence d'autres protéines sériques** comme la fibronectine ou cold insoluble globuline.

D'autres études [20-21] ont énoncé certaines théories pour laquelle la présence de cryoglobuline serait liée à :

- La modification de séquence des acides aminés au niveau des immunoglobulines en cause
- Une plus grande proportion des tyrosines des immunoglobulines impliquées
- La diminution de la proportion d'acide sialique

II.4. Etiologies

Il faut distinguer les cryoglobulinémies secondaires des cryoglobulines dites essentielles pour lesquelles les examens cliniques et biologiques ne mettent en évidence aucune pathologie associée. [20]

II.4.1. Infections

Certaines infections s'accompagnent de la production de cryoglobulines. Les agents infectieux impliqués ont la particularité de persister longtemps chez l'hôte, induisant la stimulation antigénique prolongée du système immunitaire, notamment lymphocytaire B. Ces cryoglobulines de type II ou III sont souvent transitoires et disparaissent avec l'agent causal. [21]

II.4.1.1. Infections virales

a. Virus de l'hépatite

Sur la base de l'association fréquente entre cryoglobulinémie et une atteinte hépatique, une hypothèse du rôle du virus de l'hépatite dans l'étiopathogénie a été émise depuis le début des années 1970. [19, 22]

Actuellement le VHB est considéré être à l'origine des cryoglobulinémies dans moins de 5% des cas. [23]

L'étude de *Mistaken* a démontré l'étroite relation entre la cryoglobulinémie et VHC avec une incidence comprise entre 40 et 100% [20]

b. VIH

Une forte prévalence des cryoglobulines a été également observée chez les patients porteurs du VIH, avec ou sans coïnfection avec le VHC. Dans la plupart des cas, les cryoglobulinémies sont asymptomatiques et appartiennent au type III de la classification de Brouet. Chez les patients mono-infectés par le VIH, la prévalence se situe entre 3% et 27%. [24, 25]

c. Autres virus

D'autres virus ont été cités associés à la cryofibrinogénémie, mais sans évaluation clinico-sérologiques suffisantes. Les cryoglobulines ont été trouvées chez les patients infectés par le virus de l'hépatite A, du virus de l'herpès Zoster, du cytomégalovirus, parvovirus B19. [26]

II.4.1.2. Infections bactériennes

Des cas de cryoglobulines ont été retrouvés au cours des endocardites infectieuses, des infections à staphylocoque, de la syphilis secondaire, de la lèpre, de la tuberculose pulmonaire, de la brucellose et de la fièvre Q. [17]

II.4.1.3. Infections parasitaires et fongiques

Les cryoglobulinémies peuvent rarement être secondaires à la toxoplasmose, leishmaniose, paludisme, splénomégalie hyperréactive tropicale, trypanosomiase africaine, bilharziose, coccidioïmycose. [17, 26]

II.4.2. Maladies auto-immunes

Les cryoglobulines retrouvées dans les pathologies autoimmunes et systémiques sont de type II ou III. Le lupus érythémateux disséminé, en particulier en poussée, le syndrome de Gougerot-Sjögren, la spondylarthrite ankylosante, la polyarthrite rhumatoïde, la périartérite noueuse, le syndrome de Kawazaki, les polymyosites, la sclérodermie, la cirrhose biliaire primitive, les pathologies inflammatoires du tube digestif, les thyroïdites, la sarcoïdose, les POEMS syndromes, la maladie chronique des agglutinines froides (IgM cryoprécipitante anti D) peuvent être accompagnés d'une cryoglobuline. [17, 27]

II.4.3. Syndromes lymphoprolifératifs

Les syndromes lymphoprolifératifs à cellules B sont la principale cause de cryoglobulinémie associée à la malignité. Les cryoglobulines de type I et II sont retrouvées dans 7 à 20 % des maladies de Waldenström, dans les plasmocytomes, les lymphomes non Hodgkiniens et maladies de Hodgking et une faible proportion au cours des leucémies lymphoïdes chroniques [16, 17]. La cryoglobulinémie est retrouvée dans 5-10% des myélomes multiple.

II.4.4. Cryoglobulinémies essentielles

Dans 10% des cas, les cryoglobulinémies mixtes sont considérées idiopathiques ou essentielles. [23]

II.5. Manifestations cliniques

Les manifestations cliniques sont variables et inconstantes. Seules 15% des cryoglobulinémies mixtes sont symptomatiques et environ la moitié des celles monoclonales. Les signes cutanés sont quasi constants avec des troubles vasomoteurs, parfois des lésions neurologiques et ou rénales. [4]

Ces manifestations sont souvent liées aux troubles de la circulation relatifs à la précipitation de la cryoglobuline dans le sang.

II.5.1. Manifestations cutanées

Les manifestations cutanées sont les plus fréquents, notamment le purpura vasculaire qui est présent dans 88 à 100% des cas. [28] Il est souvent révélateur, survenant en hiver, non prurigineux et intermittent. [9]

Le purpura atteint invariablement les membres inférieurs, parfois le bas de l'abdomen, rarement les extrémités supérieures. La face et le tronc sont toujours épargnés. Ce sont des lésions pétéchiales ou papulaires évoluant en livedo, en hyperpigmentation et ou ulcération. Ce purpura associé à des macules érythémateuses et à des nodules dermiques constituent le trisymptôme dans la maladie de Gougerot. [9]

Cependant, il faut noter qu'il n'existe aucune corrélation entre la température ambiante et les symptômes cutanés.

Les autres lésions cutanées pouvant être rencontrées sont :

- la nécrose cutanée, moins fréquente mais retrouvée surtout dans les cryoglobulinémies de type I. Elle est souvent distale et touche les régions périmalloolaires, le nez et les doigts ainsi que les oreilles,
- l'urticaire au froid qui est une éruption urticarienne systémique dont les plaques restent fixées au-delà de 24h, sans prurit mais déclenchée par une baisse relative de la température extérieure d'où sa reproduction au cours du test du glaçon effectué au niveau de l'avant-bras,
- Le syndrome de Raynaud qui est bilatéral le plus souvent. Il s'observe chez 10 à 35% des patients et est plus fréquent dans les cryoglobulinémies de type I et plus sévère dans les types II. On peut aussi observer une acrocyanose touchant le nez et les oreilles. [16]

Le purpura vasculaire et les troubles vasomoteurs légers sont le plus souvent retrouvés chez les porteurs de cryoglobulinémies mixtes. Par contre, la nécrose cutanée, le purpura nécrotique et le phénomène de Raynaud sévères sont l'apanage de ceux ayant une cryoglobulinémie de type I. Les manifestations sont plus fréquentes dans les cryoglobulinémies mixtes associées à une infection par le VHC.

II.5.2. 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 [9,12, 29, 30]. Une arthrite vraie ou une atteinte du rachis sont beaucoup plus rares. Ce tableau peut poser des difficultés diagnostiques avec une polyarthrite rhumatoïde débutante d'autant qu'existe un facteur rhumatoïde. Le dosage des anticorps anti-CCP permet de faire la distinction car s'ils sont présents chez 75 à 85% des patients ayant une polyarthrite rhumatoïde on ne les retrouve que chez moins de 5% des patients infectés par le VHC [29]. 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 [31, 32].

II.5.3. Manifestations neurologiques

Les manifestations neurologiques sont présentes chez 9 à 45% patients. [12, 27, 33, 34]. Les atteintes sont souvent périphériques [32]. Plusieurs tableaux peuvent se voir allant d'une polyneuropathie symétrique sensitive ou sensitivomotrice distale à une mononeuropathie multiple.

L'atteinte initiale est souvent représentée par des troubles sensitifs superficiels avec douleur et paresthésies asymétriques secondairement symétriques. Ainsi une polyneuropathie périphérique sensitive doit faire rechercher des cryoglobulines dans le plasma surtout lorsqu'elle est associée à un purpura.

Le déficit moteur est inconstant et d'installation progressive, prédominant sur les loges antéro-externes des membres inférieurs et sont plutôt asymétriques.

L'atteinte du système nerveux central est exceptionnelle associant des convulsions, une encéphalopathie avec coma, une atteinte des nerfs crâniens voire un accident vasculaire cérébral [35, 36].

II.5.4. Manifestations rénales

Elles constituent surtout des atteintes des vaisseaux rénaux. Ces atteintes vasculaires sont plus fréquentes, retrouvées dans 25% des patients et de survenue souvent tardive [37]. On note le plus souvent une protéinurie et une hématurie microscopique ainsi qu'une insuffisance rénale modérée.

Un syndrome néphritique aigu peut aussi se voir ainsi qu'un syndrome néphrotique dans 20% des observations [37].

L'hypertension artérielle retrouvée dans 85% des cas est souvent sévère.

Ces atteintes rénales s'observent préférentiellement chez les patients ayant une cryoglobulinémie de type II dont l'IgM kappa est le composant monoclonal.

Histologiquement, il s'agit d'une glomérulonéphrite membrano-proliférative avec typiquement des dépôts PAS positifs intraluminaux. Ceci est décrit par plusieurs auteurs dans des études immunohistochimiques [38- 40].

II.6. Manifestations biologiques accompagnant les cryoglobulines

Les anomalies biologiques s'observent le plus souvent lors de la réalisation de certains examens hématologiques ou biochimiques de routine particulièrement si la température de précipitation des cryoglobulines est supérieure ou égale à la température ambiante du laboratoire.

II.6.1. Anomalies hématologiques

On peut observer une vitesse de sédimentation élevée à +37°C alors qu'elle est faussement normale à +20°C [16]. Cette différence peut être très importante.

Une pseudo-hyperleucocytose ou une pseudo- thrombocytose peut se voir à la numération formule sanguine NFS effectuée par automate à +20°C, alors que cette NFS est normale quand le comptage se fait à +37°C ou au comptage manuel.

Ces anomalies de l'hémogramme, bien que rares sont observables avec les trois types de cryoglobulines.

Une des anomalies aussi est la présence des agglutinines froides. En leur présence, les érythrocytes se mettent en auto-agglutination, donnant ainsi des fausses macrocytoses, des taux abaissés d'hématies, un chiffre élevé de la concentration corpusculaire moyenne en hémoglobine CCMH, d'où la précaution de toujours travailler à +37°C dans ses laboratoires d'hématologie [41]

II.6.2. Anomalies biochimiques et immunologiques

Une pseudo-hypoprotidémie avec fausse hypogammaglobulinémie est observée à l'électrophorèse des protéines sériques si la température de précipitation est élevée.

Des anomalies du complément sont observées et elles sont relativement spécifiques :

- Une diminution des composants précoces C1q, C2 et C4
- Une concentration normale de C3
- Une augmentation des composants tardifs C5 et C9

Les troubles de la fonction hépatique sont fréquents dans les cryoglobulinémies mixtes avec élévation des transaminases et des phosphatases alcalines chez 50 à 70% des patients. [16]

II.7. Diagnostic de la cryoglobulinémie

Repose sur la recherche de la cryoglobuline par une mise en évidence de la présence du cryoprécipité qui apparaît à une température inférieure à 37°C (variable selon le type), appréciation de son caractère soluble à haute température. Une recherche positive emmène à un dosage selon différentes méthodes et éventuellement un typage par immunoélectrophorèse, immunofixation ou immunoempreinte sur nitrocellulose.

DEUXIEME PARTIE : METHODES ET RESULTATS

DEUXIEME PARTIE : METHODES ET RESULTATS

I. METHODES

I.1. Cadre d'étude

Notre étude a été réalisée au sein de l'Unité Paraclinique de Formation et de Recherche Immunologie au Centre Hospitalier Universitaire Joseph Ravoahangy Andrianavalona (CHU-JRA) d'Antananarivo.

En tant que centre de formation et de recherche, elle participe à la formation spécialisée en biologie médicale des médecins spécialistes, des étudiants en médecine, des étudiants en filière paramédical et pharmacie.

En tant que unité paraclinique, l'UPFR Immunologie reçoit et effectue des analyses médicales spécialisées et diverses sérologies provenant des services cliniques de différents Centres Hospitaliers Universitaires, des différents centres hospitaliers publics et privés des environs de la capitale, ainsi que des demandes d'examen immunologiques des médecins praticiens de ville. Ces analyses sont :

- Sérologies : VIH, hépatite B, hépatite C, sérologie bilharzienne, sérologie toxoplasmosique, sérologie de la cysticercose, sérologie de la syphilis
- Recherche d'auto-Anticorps
- Recherche de compléments
- Dosage d'IgE total

I.2. Témoins positifs et négatifs

Deux patients atteints de myélome, suivis à l'UPFR hématologie CHU-JRA et dont le profil cryoglobulinémique est déjà connu sont pris comme témoins de l'analyse. Ces patients ont bénéficié d'un dosage de cryoglobuline au laboratoire BIOREUNION.

- Témoin positif : un patient connu présentant une cryoglobuline positive
- Témoin négatif : un patient connu présentant une cryoglobuline négative

I.3. Patients

Comme les 2 témoins sont atteints de myélome multiple, et compte tenu de la fréquence assez élevée de cryoglobulinémie chez les patients atteints de myélome multiples (5-10%) [17], nous avons alors pris 10 patients qui sont atteints de myélome multiple et faisant leur suivi au sein de l'UPFR hématologie pour faire l'essai de la technique.

I.4. Paramètres étudiés

Chaque étape de la technique sera analysée et étudiée notamment :

- le recueil des échantillons ;
- l'obtention du cryoprécipité ;
- la lecture du cryoprécipité ;
- l'analyse du cryoprécipité ;
- la quantification du cryoprécipité ;
- l'immunofixation ;
- la discussion clinique.

I.5. Méthodes

Notre étude consiste tout d'abord à consulter les articles de référence afin de comprendre et de maîtriser en théorie les différents points clés de l'analyse. Ensuite la réalisation des essais techniques sur les témoins et les patients a été faite en second lieu en suivant les recommandations tout en apportant des mises au point par rapport aux ressources disponibles au laboratoire.

I.5.1. Matériels pour la réalisation de l'analyse

I.5.1.1. Etape préanalytique :

- Tube secs sans gels de 5 ml ;
- Aiguille 22 G ;
- Etuve à 37°C ; (figure 7)
- Portoir pour tubes et matériels de prélèvements (gants, désinfectant...).

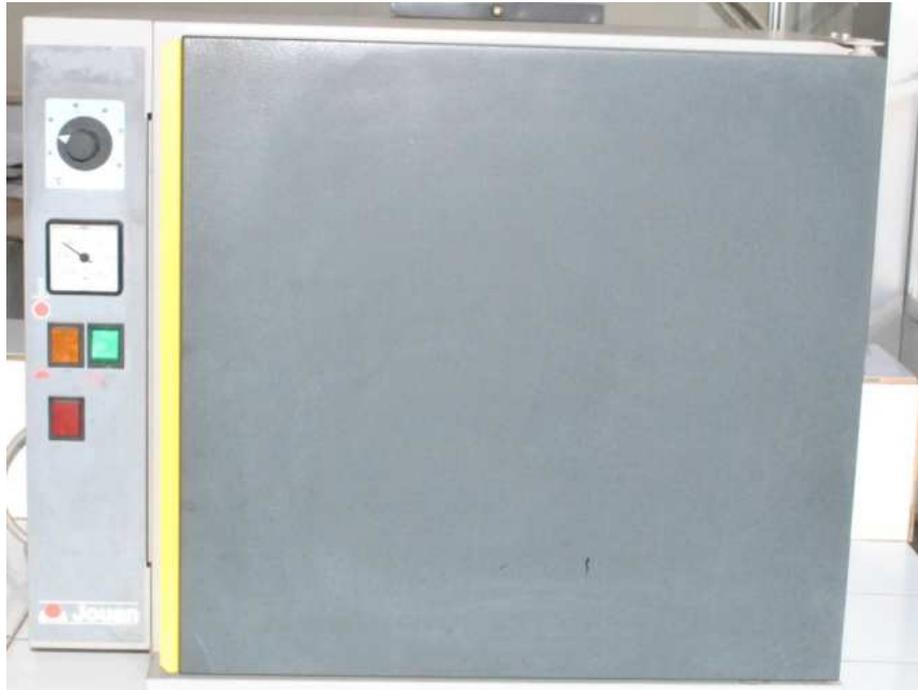


Figure 7 : Etuve (maintenu à 37°C)
Source : UPFR Immunologie, CHUJRA

I.5.1.2. Etape analytique :

- Aliquotes de 2ml stériles (figure 8) ;
- Micropipette de 1000 μ l ;
- Centrifugeuse thermostatée à 4°C et 37°C type Jouan SA modèle GR 20 22 (figure 9) ;
- Réfrigérateur 4°C ;
- Spectrophotomètre (Basic secomam France[®]) (figure 10) ;
- Kit protéines urinaires Spinereact France[®] ;
- Automates pour immunofixation (Hydrasis et Hydrys 2 SEBIA France[®]) (figure 13, 14) ;
- NaCl à 9°/oo ;
- Kit Fluidil SEBIA France[®] (figure 11, 12).

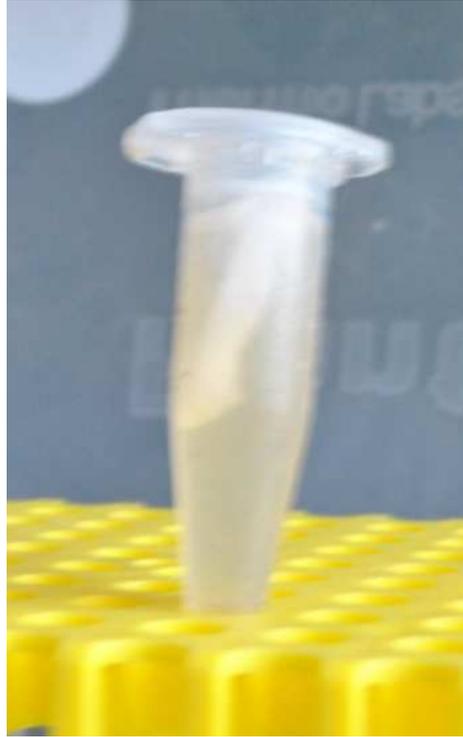


Figure 8 : Aliquote de 2ml

Source : UPFR Immunologie, CHUJRA



Figure 9 : Centrifugeuse thermostatée
Source : UPFR Immunologie, CHUJRA



Figure 12 : Contenu du kit sebia
Source : UPFR Biochimie, CHUJRA



Figure 13 : Automate HYDRASIS
Source : UPFR Biochimie, CHUJRA



Figure 14 : Automate HYDRIS
Source : UPFR Biochimie, CHUJRA

I.5.1.3. Etape post analytique

- Ordinateur de bureau ;
- Imprimante.

I.5.2. Technique

I.5.2.1. Recueil des échantillons

Tous les patients ont été prélevés dans les conditions suivantes :

- Le patient doit être à jeun depuis 12 h,
- Les tubes de prélèvement dépourvus de gel et de tout additif et les aiguilles de prélèvement ont été préalablement préchauffés à 37 °C à l'étuve la veille des prélèvements, (figure 15)
- Trois tubes secs par patient ont été utilisés pour obtenir un volume de sérum d'environ 5 ml,
- Le prélèvement est effectué obligatoirement au laboratoire.

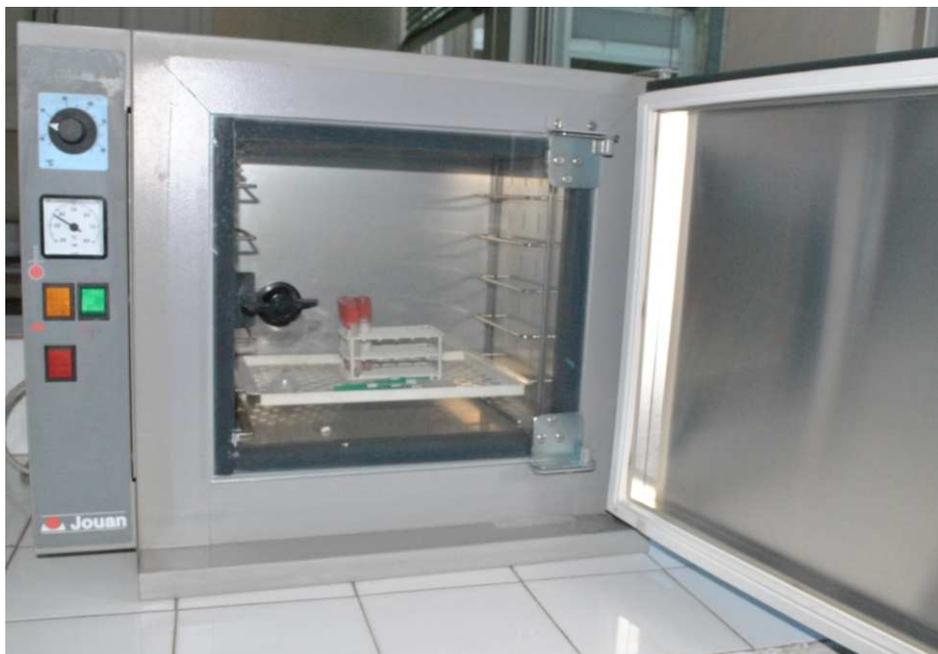


Figure 15 : Matériels de prélèvement préchauffés à 37°C dans l'étuve

Source : UPFR Immunologie CHUJRA

I.5.2.2.Obtention du cryoprécipité

Une fois le prélèvement effectué, les tubes doivent être placés immédiatement dans une étuve à 37 °C. La rétraction du caillot se fait pendant au moins deux heures et ne doit pas dépasser 24 heures.

Après la coagulation, la centrifugation est réalisée à 3500 rpm pendant 15 minutes à 37 °C dans une centrifugeuse thermostatée.

Une fois centrifugés, les tubes ont été décantés dans 3 aliquotes de 2 ml stériles coniques en plastique transparent étiquetés comme suit :

- Numéro du patient suivi d'une lettre a (premier aliquote pour le dépistage), b (deuxième aliquote pour la typisation), c (troisième aliquote pour la réserve).

Exemple :

1a 20/08/10 → $\left\{ \begin{array}{l} 1 : \text{numéro du patient} \\ a : \text{premier tube conique pour le dépistage} \\ 20/08/10 : \text{date du prélèvement} \end{array} \right.$

Seulement 2 des 3 tubes sont placés dans un réfrigérateur, à 4 °C. Un portoir identifié est destiné à l'observation des cryoprécipités, et permet le rangement chronologique des échantillons par doublet.

Les aliquotes entreposées à 4 °C sont quotidiennement inspectées sachant que la cryoprécipitation peut survenir en quelques heures pour les cryoglobulines de type I et type II ou en plusieurs jours le plus souvent pour celles de type III. Le suivi des lectures se fait en reportant les résultats sur une fiche dont un modèle est présenté (Fig. 16).

Jours	J1	J2	J3	J4	J5	J6	J7	J8	J9	J10
Cryoprécipité										

Noter (+) s'il y a formation de cryoprécipité

Noter (-) s'il n'y a pas de cryoprécipité

Figure 16 : Extrait de la fiche de suivi

I.5.2.3. Lecture des cryoprécipités et interprétation de la lecture

Au bout de 10 jours, la recherche de cryoglobuline se révèle négative si le sérum est toujours clair et fluide dans les trois aliquotes entreposées à 4 °C, si aucun dépôt n'est visible au fond du tube conique et si aucune volute n'est visible par agitation manuelle douce du tube (Figure 17). Le libellé « recherche négative » est alors saisi.

Dans le cas où un flocculat d'apparence gélatineuse ou cristalline apparaît dans les deux tubes entreposés à 4 °C ou 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.



Figure 17 : Lecture de la détection de la cryoglobuline

A gauche : présence de cryoglobuline sous forme de précipitation

Au milieu : recherche négative

A droite : présence de cryoglobuline sous forme de gélification partielle

Source : UPFR Immunologie, CHUJRA

I.5.2.4. Analyse du cryoprécipité

- Redissoudre à +37°C le cryoprécipité. Si le cryoprécipité ne se dissout pas en 30min on passe à +45°C,
- Diluer le cryoprécipité selon son abondance (tableau III)

Tableau III : Reprise du cryoprécipité selon son abondance

Appréciation du cryoprécipité	Volume de NaCl 9 ‰ (µl)
Cryoprécipité minime	100
Cryoprécipité net	300
Cryoprécipité abondant	500
Cryoprécipité très abondant	1 000

Tous les tubes d'un même patient présentant un cryoprécipité sont traités de façon similaire jusqu'au dosage des protéines totales. On utilise, pour le dosage un des tubes présentant le précipité le plus important. Cette organisation évite d'avoir à prélever de nouveau le patient.

Le précipité est isolé après centrifugation (3500 rpm x 15 min à 4 °C). Après élimination du surnageant, il est lavé 3 fois par une solution de chlorure de sodium à 0,9%, maintenue à 4 °C, d'un volume égal au volume initial de sérum.

Le culot est remis en suspension par agitation au vortex 20 secondes. Puis le mélange est centrifugé (3500 rpm x 15 min à 4 °C) afin d'éliminer toutes traces de protéines non cryoprécipitantes. Enfin, le cryoprécipité est redissout dans 100 µl d'une solution de chlorure de sodium isotonique additionnée de 100 µl de Fluidil®.

Il faut vortexer 20 fois tous les quarts d'heure pour favoriser la redissolution pendant la première heure et la dernière précédant le dosage.

La concentration de la cryoglobuline est alors déterminée par le dosage des protéines totales urinaires par la méthode au chlorure de benzéthonium sur un

Spectrophotomètre (Basic secomam France[®]) sur l'échantillon repris par 200 µl de volume final.

Le résultat est recalculé pour rendre le taux en g/l en tenant compte du facteur de concentration du précipité qui est de 10 (2 ml de sérum ramené à 200 µl de solution de redissolution).

Le résultat brut du dosage est donc divisé par dix pour ramener le taux de cryoglobuline par litre de sérum initial

Si le résultat du dosage est supérieur à 0,050 g/l, le libellé « cryoglobuline positive » et l'analyse d'identification est déclenchée en vue de l'identification immunologique par immunofixation (Hydrasis et Hydris 2 SEBIA France[®]) de la cryoglobuline.

I.5.2.5. Réalisation et Interprétation de l'immunofixation

La technique utilisée est basée sur le principe de l'électrophorèse sur gel d'agarose suivie d'une immunofixation.

On procède alors comme suit :

- séparation des protéines sériques selon leur charge,
- incubation du gel avec différents antisérums spécifiques ciblés contre :
 - Gamma- (IgG), alpha- (IgA), Mu- (IgM) chaînes lourdes,
 - Kappa (k) et lambda (λ) des chaînes légères libres et liées.
- Le gel est ensuite traité afin d'éliminer l'excès d'antisérum, avant l'étape de coloration finale. Le gel est interprété visuellement pour saisir toutes les immunoglobulines.

Dans le cas d'échantillons itératifs, l'IFE est réalisée sur l'isolat présentant la concentration la plus importante.

L'ensemble du protocole est décrit par la figure 18.

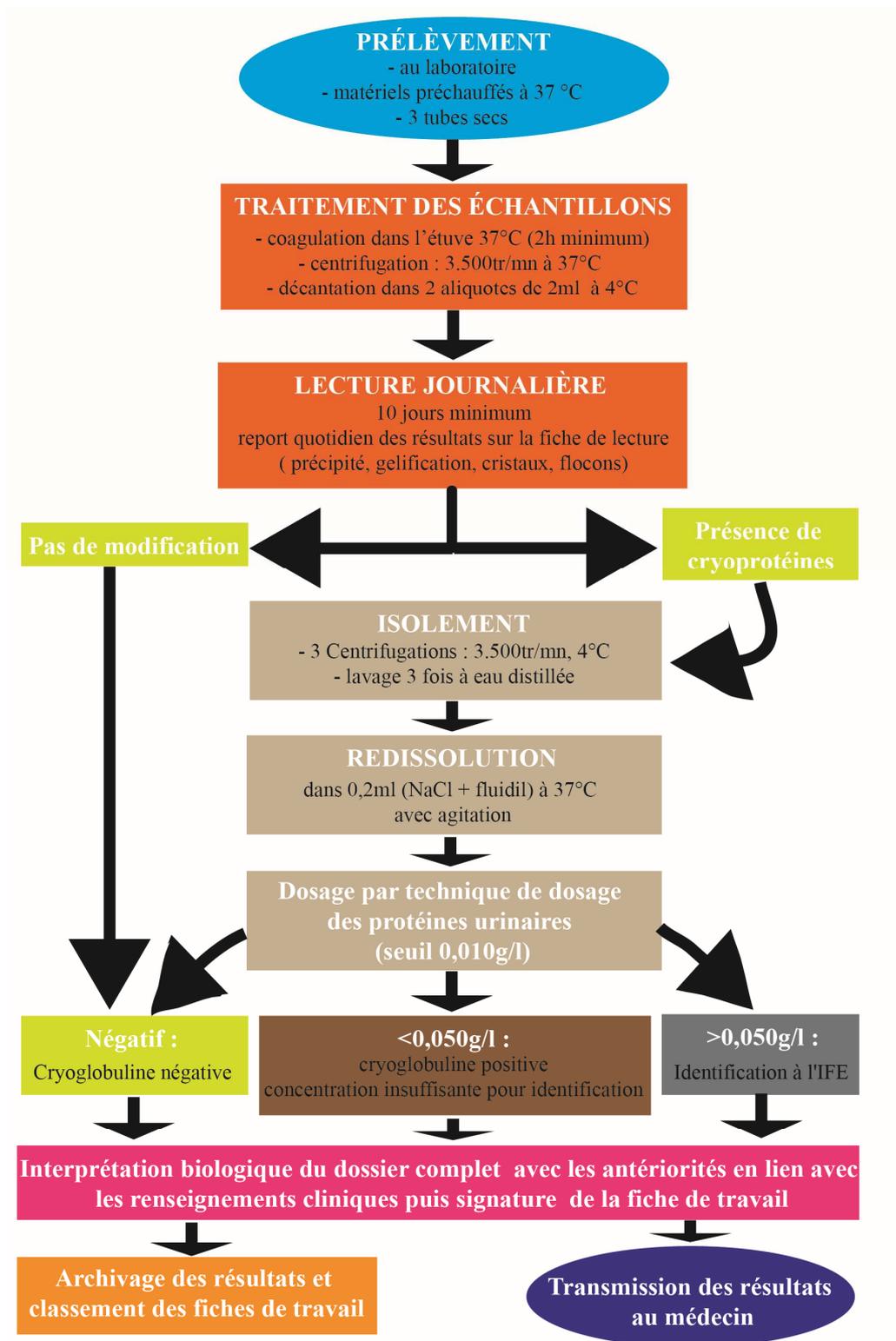


Figure 18 : Protocole pour la réalisation et l'interprétation de l'exploration de la cryoglobulinémie

I.6. Considération éthique

Après l'autorisation du chef de service, cette étude a respecté les normes en matière de considération éthique notamment le consentement éclairé, la confidentialité, le secret professionnel et les droits humains.

Chaque individu a été informé des objectifs de la recherche avant toute participation qui permet d'avoir leur consentement. La confidentialité et l'anonymat des données recueillies sont bien respectés selon les règles du secret professionnel.

I.7. Limites de l'étude

Aucun contrôle qualité n'est possible pour ces analyses, de ce fait la rigueur et l'application des manipulateurs sont donc les seuls garants de la qualité des résultats.

II. RESULTATS

En nous basant toujours sur les articles de référence et en apportant nos mises au point, nous avons obtenu les résultats suivants

II.1. Protocole

II.1.1. Obtention des échantillons

- Conditions de prélèvements :
 - Prélèvement au laboratoire,
 - Patient à jeun,
 - Matériels de prélèvement préchauffés 24h avant.
- Quantité prélevée :
 - prélever 5ml de sang dans 3 tubes secs.

II.1.2. Obtention du cryoprécipité

- Coagulation :
 - A 37°C,
 - Durant 2h à 24h.
- Centrifugation :
 - Dans une centrifugeuse thermostatée à 37°C type Jouan SA modèle GT 422.

II.1.3. Lecture du cryoprécipité :

- Lecture journalière
- Recherche de modification du sérum : gélification, précipité

II.1.4. Analyse du cryoprécipité

Quantification du cryoprécipité obtenu par la méthode de dosage des protéines urinaires.

II.1.5. Immunotypage

Le typage des cryoglobulines est fait par immunofixation et le seuil de démarrage de l'immunofixation est fixé à 0,050mg/l.

II.2. Résultats des témoins

II.2.1. Détection du cryoprécipité

Nous avons représenté les résultats antérieurs des témoins en comparaison avec les résultats obtenus à partir de notre technique dans le tableau IV :

Tableau IV : Comparaison des résultats pour la détection des cryoprécipités

Témoins	Résultats antérieurs	Résultats actuels
Positif	Modification du sérum à J1	Modification du sérum à J1
Négatif	Pas de modification du sérum jusqu'à J7	Pas de modification du sérum jusqu'à J10

Les résultats des deux techniques sont identiques

II.2.2. Quantification du cryoprécipité

Seul le témoin positif a été quantifié et les résultats antérieur et obtenu à partir de notre technique sont représentés sur le tableau V

Tableau V : Comparaison des résultats du dosage des cryoprécipités

Résultat antérieur	Résultat de notre technique
1,40 mg/l	1,33 mg/l

Les deux résultats sont superposables

II.2.3. Immunotyage

Comme le taux de la cryoglobuline est significatif, les résultats de l'immunofixation sont transcrits dans le tableau VI :

Tableau VI : Comparaison des résultats de l'immunofixation

Résultat antérieur	Résultat à partir de notre technique
Ig G kappa	Ig G kappa

Les résultats sont les mêmes pour l'immunotypage.

II.3. Résultats des patients

Les résultats de nos essais à partir des patients sont représentés par le tableau VII

Tableau VII : Résultats de la détection du dosage et de l'immunofixation pour les patients

Patients	Jour de positivité	Taux de cryoglobuline	Type de cryoglobuline
1	Négatif jusqu'à J10		
2	Négatif jusqu'à J10		
3	J3	0,77 mg/l	Ig G lambda
4	Négatif jusqu'à J10		
5	Négatif jusqu'à J10		
6	Négatif jusqu'à J10		
7	Négatif jusqu'à J10		
8	Négatif jusqu'à J10		
9	Négatif jusqu'à J10		
10	Négatif jusqu'à J10		

Les essais faits sur les patients ont pu mettre en évidence une recherche positive chez un patient et négative chez 9 patients.

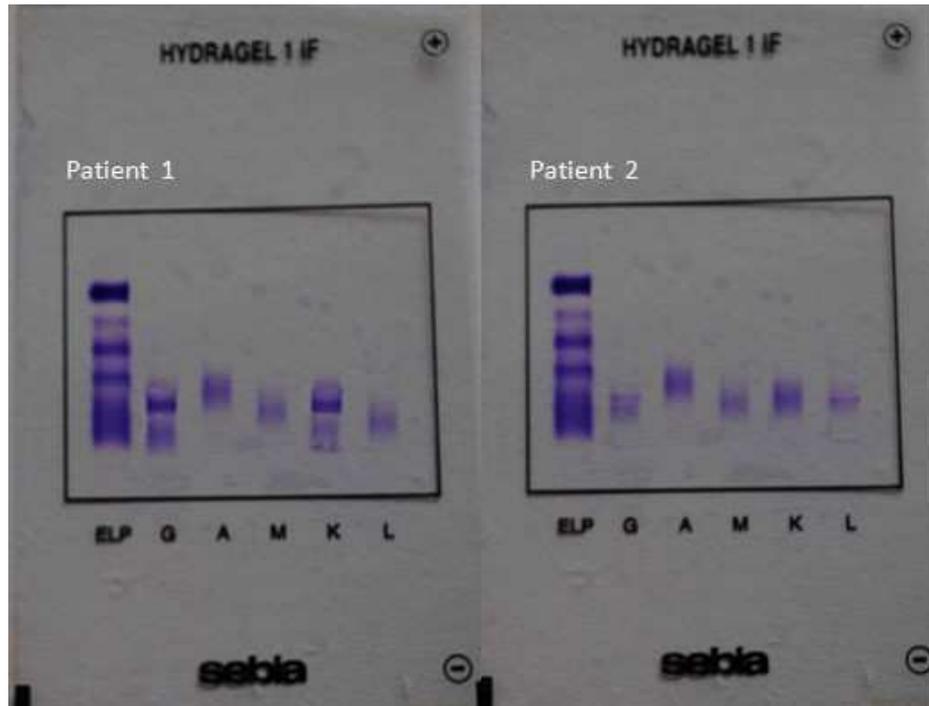


Figure 19 : Résultats de la détection des cryoglobulines

A gauche : témoin positif où il y a modification du sérum à type de gélification

A droite : patient N°3 où il y a modification du sérum à type de précipitation

Source : UPFR Immunologie CHUJRA



Patient 1 : IgG G kappa c'est-à-dire présence de bande

patient 2 : IgG G lambda

Figure 20 : Résultats de l'immunofixation

Source : UPFR Biochimie CHUJRA

TROISIEME PARTIE : DISCUSSION

TROISIEME PARTIE : DISCUSSION

L'analyse des cryoglobulines est à la portée de tous les laboratoires même dans les pays en voie de développement, toutefois des recommandations préconisées dans les articles de référence doivent être respectées pour garantir la qualité des résultats [42-46]. Nous allons dans cette dernière partie discuter des modifications qu'on avait emmené afin d'adopter la technique à la situation actuelle de notre pays et aux matériels disponibles au laboratoire.

I. Obtention des échantillons

Dans notre étude, les prélèvements ont été réalisés obligatoirement au laboratoire, comme celle de l'équipe de *M. Olivier* [45] afin de s'affranchir des faux négatifs liés à la précipitation précoce des cryoglobulines. Ceci nous permet ainsi de placer les échantillons dans l'étuve immédiatement après prélèvement pour une prise en charge optimale des échantillons à 37°C. Cette initiative pose problème chez les personnes grabataires, où l'utilisation d'un dispositif permettant de maintenir les tubes à 37 °C est nécessaire.

Les équipes de la CNBH utilisent des dispositifs à type de valisette thermostatée maintenue à 37°C pour permettre l'acheminement des échantillons lors des prélèvements au lit des malades [46]. Une alternative possible est d'utiliser des bouteilles thermos remplies de sable de Fontainebleu afin de permettre de faire des prélèvements chez des patients non déplaçables. Toutefois, l'utilisation de ces matériels nécessitera des ressources humaines et financières supplémentaires qui engendreront des couts supplémentaires aux patients.

La littérature rapporte en fait que la température à laquelle une cryoglobuline est susceptible de précipiter est variable d'un patient à un autre et peut être aussi élevée que 36 °C. Cette caractéristique implique qu'une grande rigueur s'impose au niveau de la qualité du prélèvement, de son acheminement et de sa prise en charge au laboratoire. Seuls les laboratoires connaissant bien les problèmes posés par la recherche et l'identification des cryoglobulines et respectant les précautions préanalytiques sont susceptibles d'obtenir des résultats fiables [45] Dans le cas contraire des résultats faussement négatifs peuvent être rendus. [46]

Plusieurs auteurs ont insisté sur l'impérieuse nécessité de prélever, de transporter, et de laisser coaguler et de centrifuger les échantillons de sérum à 37 °C. [6,10, 42, 45, 47]. Il est important de garder les échantillons à 37°C avant la séparation du sérum pour éviter la perte des cryoglobulines, surtout pour le type I qui sont généralement présents à une concentration >5g/l, [48]. Les cryoglobulines monoclonales de forte concentration ont en effet tendance à précipiter tôt et à haute température [49]. Des faux-négatifs également ont été rapportés pour le type II liés au contrôle inadéquat de la température [50]. Cependant, pour les types III, aucun problème n'est rencontré dans cette étape car ces derniers ne précipitent que tardivement (en quelques jours).

L'erreur de contrôle de température est reconnue comme la seule grande et importante cause d'erreur dans le dosage des cryoglobulines [6] Toutefois, il n'est pas nécessaire de placer les patients dans une salle à 37°C. [46] mais de faire les prélèvements avec des matériels réchauffés au préalable. [42-44], dans notre étude, toutes les aiguilles et tubes utilisés ont été préchauffés avant leur utilisation.

Le jeûne est obligatoire dans notre étude ainsi que dans les articles de référence [45, 46] car l'aspect lipémique du sérum dû au non-respect du jeûne peut provoquer une turbidité du sérum et interférer avec une identification correcte de la cryoglobuline. [6]

Par rapport à la quantité du prélèvement, on a choisi de prélever 5ml dans 3 tubes .On notera que c'est la valeur retenue par la majorité des équipes impliquées dans le groupe de travail du CNBH [46], excepté celle de Chambéry qui privilégie un volume de 10 ml dans un seul tube pour augmenter la sensibilité de la méthode. Un autre auteur a aussi énoncé que l'augmentation du volume de sang prélevé permet d'augmenter la sensibilité de détection et donc de dépister des cryoglobulines à faible concentration [45]

II. Obtention du cryoprécipité

Après le prélèvement, la coagulation est effectuée toujours en gardant les échantillons à 37°C. Dans notre étude, elle a été réalisée dans l'étuve qui est maintenue à 37°C comme celle de l'équipe de *M. Olivier* [45] tandis que pour les équipes de la CNBH, elle a été réalisée dans la valisette de transport même [46]. *Ramos-Calsas* a énoncé la possibilité de laisser coaguler le sérum dans un bain marie à 37°C. [51]

Dans notre étude, la durée de la coagulation est de 2h au moins jusqu'à 24h. Certaines équipes préconisent 5h au minimum sans toutefois dépasser 24h car il survient au-delà de cette durée un phénomène d'hémolyse [46]. Le tube de prélèvement sanguin est maintenu à 37 °C pendant au moins 1 heure avant la centrifugation à 37 °C pour *Cacoub P.* [52]

La centrifugation doit être réalisée à 37°C également. Dans notre étude, on l'a réalisée dans une centrifugeuse type Jouan SA modèle GT 422. Dans le cas échéant, l'utilisation de plots de centrifugation préalablement chauffés à 37 °C est possible et pratiquée par certains groupes [46]. Seul le respect le plus rigoureux de ces précautions pré-analytiques permet d'obtenir des résultats fiables.

Cette étape de centrifugation préalable à l'observation est en effet très importante et présente deux intérêts principaux [45] :

- sensibilisation de la détection puisque cette étape permet de rassembler au fond du tube les petites particules de cryoglobulines en suspension et invisibles à l'œil nu ;
- possibilité de travailler sur des sérums troubles ou lactescents : après l'étape de centrifugation, le cryoprécipité constitue le culot de centrifugation, les chylomicrons éventuellement présents se retrouvant dans le surnageant.

Pour les étapes de cryoinsulobilitation, dans notre étude, les aliquotes ont été réparties dans des tubes coniques, et transparents facilitant la lecture, les lavages et l'isolement du culot. Leur manipulation est facile également et ils existent dans la plupart des laboratoires. C'est aussi la recommandation de l'équipe de *Le carrer D.* [53]

III. Lecture des cryoprécipités et interprétation de la lecture

Les deux aliquotes entreposées à 4 °C sont quotidiennement observées sachant que la cryoprécipitation peut survenir en quelques heures pour les cryoglobulines de type I et de type II ou en plusieurs jours, le plus souvent, pour celles de type III. Dans tous les cas, il convient d'attendre 10 jours pour rendre la lecture définitive du résultat. En effet, certaines cryoglobulines de type III ne précipitent significativement qu'au bout de 5 à 6 jours [9] voire plus selon l'expérience des centres hospitaliers de Lille et de Lyon.

Pour ne pas manquer le diagnostic des cryoglobulines mixtes, notre équipe a pris comme délai de lecture 10 jours. On notera que ce temps relativement plus long que ce qui est habituellement recommandé est également proposé par M. Olivier *et al.* [45]. Tandis que Selon A. *Szymanowicz*, au bout de sept jours, si le sérum est toujours clair et fluide dans les deux tubes entreposés à 4 °C, si aucun dépôt n'est visible au fond du tube conique et si aucune volute n'est visible par agitation rotative douce manuelle du tube : la recherche de cryoglobuline s'avère alors négative. [46]

En cas de doute sur la présence de cryoprécipité, une centrifugation est réalisée afin de déterminer si un culot est éventuellement présent. Si c'est effectivement le cas, l'échantillon sera traité comme positif.

Quant au test de thermosolubilisation à 37°C du cryoprécipité, les limites de sa sensibilité et de sa spécificité ainsi que son interprétation qui reste trop subjective nous ont conduit à préconiser son abandon. Ce point de vue est partagé par *M Olivier et al* lors de leurs étude en 2005 résultant d'un travail approfondi et bien documenté [45] et conforté par une recherche de *Zak.K* en 2006 qui a montré que les cryoglobulines varient considérablement d'un patient à l'autre, et leur comportement face à la température diffère largement : certaines cryoglobulines dissolvent facilement à chaud dans des solutions salines tandis que d'autres non.[54]

La resolubilisation est toutefois une étape importante dont dépend l'IFE. Ainsi dans notre étude, si elle ne se fait pas au bout de 30mn à 37°C, on passe à +45°C. Certaines équipes utilisent du Fluidil gel pour faciliter cette resolubilisation. [10]

IV. Analyse du cryoprécipité

Dans notre étude : le précipité est isolé après centrifugation (3500 rpm x 15 min à 4 °C) comme dans les articles de référence. Après élimination du surnageant, il est lavé 3 fois par une solution de chlorure de sodium à 0,9 %, maintenue à 4 °C, d'un volume égal au volume initial de sérum.

Cette étape de lavage est cruciale, elle a pour but d'éliminer les protéines non précipitant qui contaminent les cryoglobulines et majorent ainsi leur concentration lors du dosage quantitatif. *Kllemuchikkal U et al* a confirmé cela par la mise en évidence de la présence d'albumine à l'électrophorèse ou par des méthodes de dosage de microalbumine [55]. Ce sont en effet les protéines normales du patient qui peuvent contaminer le précipité, notamment des protéines sériques adhérant aux parois des tubes. [54]

D'une autre part, le lavage peut par contre conduire à la perte des cryoglobulines. Selon un auteur, environ 1/3 de la quantité des cryoglobulines est perdu à chaque étape de lavage [55], ce qui est regrettable si on travaille sur une petite quantité de précipité.

L'équipe de Lille préfère réaliser un lavage par de l'eau distillée afin de diminuer les risques de perte de cryoglobulines pendant les étapes de lavage. [46].

Quant au nombre de lavage, nous avons préféré le faire 3 fois pour pouvoir balancer entre ces problèmes de contamination et de perte du cryoprécipité. Mais ce nombre varie d'un laboratoire à un autre et est compris entre 1 et 5 fois.

Le précipité est agité au vortex 20 secondes, puis placé une nuit à l'étuve à 37 °C. Il convient de vortexer 20 secondes tous les quarts d'heure pour favoriser la redissolution pendant la première heure de mise au bain-marie et la dernière heure qui précède 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.

V. Quantification du cryoprécipité

Il n'existe pas, à notre connaissance, ni de standardisation ou ni de technique de référence pour le dosage des cryoglobulines [45].

Dans notre étude, on a réalisé la quantification des cryoglobulines avec la méthode de dosage des protéines urinaires.

D'après la littérature, en général, 3 grands volets de méthode sont possibles et discutés par les auteurs :

- 1) Détermination du cryocrite : consiste à une appréciation du précipité après centrifugation du sérum total dans un tube à hématocrite. Le pourcentage du volume total occupé par le cryoprécipité est déterminé visuellement. Bien que moins coûteuse, cette technique imprécise n'est applicable qu'aux cryoglobulines en concentration importante [21]. Cette méthode rencontre également un problème pour les cas particuliers de cryoglobulines qui ne resolubilisent pas à 37°C. Ces situations requièrent un nouveau prélèvement chez le patient, dans de bonnes conditions et de mettre directement le sérum dans un tube à macrohématocrite [56]. Cependant, pour des raisons de rapidité de mise en œuvre, la mesure du cryocrite peut être parfois utilisée dans les rares cas du suivi de l'évolution d'un patient en cours de traitement. Compte tenu de ces inconvénients, cette technique n'est pas utilisée dans notre étude.
- 2) Le dosage différentiel des protéines ou des immunoglobulines avant et après la cryoprécipitation rencontre les mêmes problèmes de sensibilité mais également un problème lié au dosage néphélométrique des immunoglobulines dû à la présence d'immunoglobulines monoclonales et/ou de complexes immuns circulants [45]. Cette méthode consiste à faire le dosage des protéines à deux temps, dont le premier avant et l'autre après extraction du cryoprécipité. Cette technique revient à un coût très élevé, pourtant, dans un pays en voie de développement qu'est le nôtre, il conviendrait de réduire au maximum le coût des analyses.
- 3) La technique utilisée dans notre étude est le dosage des protéines du cryoprécipité qui consiste à quantifier directement le cryoprécipité à

partir d'une quantité donnée de sérum. Le dosage des protéines est variable d'un laboratoire à un autre. Le laboratoire de Chambéry qui utilise un volume de sérum de 10 ml préconise la redissolution du précipité par 100 µl de sérum physiologique. [10]

Dans ce cas, la sensibilité du protocole est multipliée par un facteur 10 par rapport au protocole de base. Bien qu'intéressante pour la grande sensibilité qu'elle apporte, cette pratique n'a pas fait l'objet d'un consensus ; elle constitue toutefois une alternative à considérer lorsqu'une sensibilité maximale est recherchée pour des situations cliniques particulières.

Eventuellement, une dilution au 1/10 dans une solution de chlorure de sodium isotonique est appliquée au cas où le précipité est très abondant ou en cas de dépassement de la limite de linéarité, une situation toutefois rarement rencontrée. Dans ce cas particulier, le résultat du dosage obtenu correspond à la concentration initiale du sérum d'origine.

Cette dernière méthode est celle utilisée dans notre étude en raison de sa disponibilité en routine dans l'hôpital, de son coût faible et de sa meilleure sensibilité pour des taux relativement bas de protéines.

Enfin, l'utilisation d'une technique sensible de dosage des protéines urinaires automatisées et accessible en routine au laboratoire nous paraît là encore, être un gage de qualité du résultat. Si l'emploi d'une technique de dosage spécifiquement dédiée aux cryoglobulines s'impose comme une solution idéale pour un grand laboratoire spécialisé dans l'étude des cryoprotéines [45], cette alternative n'est pas pertinente pour un laboratoire de biologie polyvalent. En effet, il apparaît plus fiable d'utiliser un dosage automatique sensible dont les limites sont parfaitement connues plutôt que de développer une technique spécifiquement dédiée à une application dont la fréquence d'utilisation faible ne permettra pas l'acquisition d'un niveau de maîtrise approprié.

VI. Interprétation de l'immunofixation

De façon générale, les cliniciens n'accordent une signification à la découverte d'une cryoglobuline que pour des concentrations situées dans une fourchette de 0,020 à 0,040 g/l [54]. Aucun consensus n'a été émis par rapport au seuil de démarrage d'un typage.

Dans notre étude le seuil de démarrage est fixé à 0,050g/l. Compte tenu du prix exorbitant de l'IFE, il nous paraît en effet regrettable de mettre en œuvre des techniques relativement coûteuses sans pouvoir engendrer un avantage probant en terme de diagnostic utile au patient . En effet, même si certains laboratoires choisissent un immuno-typage systématique dès positivité de la recherche, selon *Jan Damoiseaux* dans environ 2 à 5 % des cas de recherche positive avec une concentration de cryoglobulines comprise entre 0,010 et 0,030 g/l, l'identification des composants du cryoprécipité se révèle impossible [57]

En outre, plusieurs études ont démontré la présence de cryoglobuline mais en faible quantité chez le sujet sain. En 1972, *Cream* décrivait la présence de cryoglobulines chez 51 % de sujets sains, cette cryoglobuline étant inférieure à 0,080 g/L et généralement de type III [58] Des études plus récentes ont confirmé la présence de cryoglobulines chez le sujet sain mais à des taux plus faibles, inférieurs à 0,015 mg/l pour *Romaszko et al.* [59] inférieurs à 0,030 g/l pour *Maire et al* [60].

Les équipes de la CNBH ont fixé un seuil de démarrage de l'immunotypage de 0.010g/l qui selon eux a une sensibilité de 90% [46].

Il nous semble alors cohérent d'avoir fixé le seuil de démarrage de l'immunofixation à 0,050g/l mais cela nous offre la possibilité de procéder a une immunoidentification pour des concentrations inférieures à 0,050 g/l lors d'une demande éventuellement très ciblée du clinicien dans un contexte clinique bien documenté.

Toutefois, une nouvelle demande de typage de la cryoglobuline peut être tout à fait utile à distance de quelques mois. En effet, une évolution du type de cryoglobuline du type II vers le type III, et inversement, est possible.

Pour la technique d'immunofixation, nous avons utilisée la méthode habituelle du laboratoire appliquée pour les IFE sériques ou urinaires. Durant l'IFE, Le biologiste doit aussi vérifier l'absence de trace d'albumine sur le gel [57]. Cela prouve que le lavage du cryoprécipité a été correctement réalisé, c'est-à-dire qu'il n'y a pas de contamination. L'interprétation peut ainsi être faite sans risque d'interférence par les immunoglobulines non cryoprécipitantes.

S'il existe une précipitation de la cryoglobuline au point de dépôt, il est nécessaire de procéder à un prétraitement de l'échantillon par ajout de 20 µl de bêta mercaptoéthanol avant de refaire l'IFE. Ce réactif est un agent de dépolymérisation efficace pour l'ouverture des ponts disulfures.

VII. Discussion Clinique

Pour le rendu des résultats, le commentaire du biologiste porte sur plusieurs points. En premier lieu l'aspect macroscopique de la cryoglobuline est précisé. En effet, les cryoglobulines se présentent dans 95% des cas sous forme d'un cryoprécipité. Plus rarement cependant elles se manifestent par un gel notamment dans le cas des IgM monoclonales. Dans quelques très rares cas leur précipitation se produit sous forme de cristaux pour certaines IgG monoclonales.

L'absence de cryoprécipité au bout de 10 jours est considérée comme recherche négative. Toutefois, une recherche négative ne doit pas exclure une cryoglobulinémie en raison de la possibilité des résultats faux négatifs durant la phase préanalytique mais aussi les concentrations de cryoglobuline peuvent fluctuer, en fonction de leur précipitation in vivo dans des vaisseaux cibles. [60]

Les cryoglobulines dites faibles (inférieures à 0,1 g/l) sont souvent de type mixte rencontrées dans 30 à 40 % des hépatites C ou dans les pathologies infectieuses. Les cryoglobulines moyennes ou importantes sont souvent associées aux maladies à composante auto-immune (connectivites et glomérulonéphrites).

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). Toutefois, il ne semble pas y avoir de parallélisme entre la concentration d'une cryoglobuline et l'importance des signes cliniques observés [45] sauf dans les rares cas de syndrome d'hyperviscosité sanguine impliquant le plus souvent une immunoglobuline de classe IgM monoclonale [46]

Le second point du commentaire porte sur l'isotypie de la cryoglobuline. Des liens forts existent entre le type de cryoglobuline identifiée par le laboratoire et la symptomatologie clinique ou la maladie causale. [5]

La grande majorité des biologistes s'appuie sur la classification de Brouet [10] ou celle de Brouet modifiée par Le Carrer [45]. C'est cette dernière que nous utilisons de préférence. Les commentaires s'y rapportant sont standardisés grâce à des textes prêts à l'emploi. Ces textes peuvent être formalisés dans un thésaurus des textes codés

que chaque équipe de biologistes peut créer dans son système informatique de laboratoire.

Nous avons alors établi une série de tableaux (VIII à XIV) regroupés par axe pour permettre d'homogénéiser les commentaires si nécessaire.

Dans notre pratique, le biologiste saisit ensuite les résultats dans le dossier biologique informatisé en mentionnant en texte libre l'isotypie seulement pour l'échantillon le plus concentré en cryoglobuline.

Tableau VIII : Libellé pour l'axe quantitatif en vue de l'interprétation des cryoglobulines

N°	Libellé	Élément déclenchant (g/L)
1	Cryoglobuline positive mais peu significative	< 0,1
2	Cryoglobuline en faible concentration	Compris entre 0,1 et 0,5
3	Cryoglobuline en concentration moyenne	Compris entre 0,5 et 1
4	Cryoglobuline en concentration importante	Compris entre 1 et 5
5	Cryoglobuline en concentration très importante	>5

Tableau IX : Libellé pour l'axe concernant le type de cryoglobuline

N°	Libellé	Élément déclenchant
1	de type I monoclonal	1 seul isotype monoclonal
2	de type II a mixte	1 isotype monoclonal associé à 1 ou plusieurs isotypes polyclonaux
3	de type II b mixte	1 ou plusieurs isotypes oligoclonaux associés à 1 ou plusieurs isotypes polyclonaux
4	de type III mixte	Association de plusieurs isotypes polyclonaux

Tableau X : Libellé pour l'axe monoclonal concernant les cryoglobulines de type I

N°	Libellé	Élément déclenchant
1	d'isotypie IgM, kappa monoclonale	Bande mince IgM, K
2	d'isotypie IgM, lambda monoclonale	Bande mince IgM, L
3	d'isotypie IgG, kappa monoclonale	Bande mince IgG, K
4	d'isotypie IgG, lambda monoclonale	Bande mince IgG, L
5	d'isotypie IgA, kappa monoclonale	Bande mince IgA, K
6	d'isotypie IgA, lambda monoclonale	Bande mince IgA, L
7	d'isotypie kappa monoclonale	Bande mince, K (très rare)
8	d'isotypie lambda monoclonale	Bande mince, L (très rare)

Tableau XI : Libellé pour l'axe oligoclonal concernant les cryoglobulines de type IIb

N°	Libellé	Elément déclenchant
1	d'isotypie IgM, kappa oligoclonale	Plusieurs bandes minces IgM, K
2	d'isotypie IgM, lambda oligoclonale	Plusieurs bandes minces IgM, L
3	d'isotypie IgG, kappa oligoclonale	Plusieurs bandes minces IgG, K
4	d'isotypie IgG, lambda oligoclonale	Plusieurs bandes minces IgG, L
5	d'isotypie IgA, kappa oligoclonale	Plusieurs bandes minces IgA, K
6	d'isotypie IgA, lambda oligoclonale	Plusieurs bandes minces IgA, L
7	Libelle libre a decrire en cas d'isotypes diff erents responsables de l'oligoclonalité	Plusieurs bandes minces d'isotype IgA et ou IgG , et ou IgM, K et ou L

Tableau XII : Libellé pour l'axe polyclonal concernant les cryoglobulines de type IIa et IIb

N°	Libellé	Elément déclenchant
1	associée à des IgG polyclonales	Zone diffuse d'IgG
2	associée à des IgA polyclonales	Zone diffuse d'IgA
3	associée à des IgM polyclonales	Zone diffuse d'IgM
4	associée à des IgG et IgM polyclonales	Zone diffuse d'IgG et d'IgM
5	associée à des IgG et des IgA polyclonales	Zone diff use d'IgG et d'IgA
6	associée a des IgA et IgM polyclonales	Zone diff use d'IgA et d'IgM

Tableau XIII : Libellés pour l'axe polyclonal des cryoglobulines de type III

N°	Libellé	Élément déclenchant
1	d'isotypie IgG polyclonales	Zone diffuse d'IgG
2	d'isotypie IgA polyclonales	Zone diffuse d'IgA
3	d'isotypie IgM polyclonales	Zone diffuse d'IgM
4	d'isotypie associant IgG et IgM polyclonales	Zone diffuse d'IgG et d'IgM
5	d'isotypie associant IgG et IgA polyclonales	Zone diffuse d'IgG et d'IgA
6	d'isotypie associant IgA et IgM polyclonales	Zone diffuse d'IgA et d'IgM
7	d'isotypie associant IgA, IgG et IgM polyclonales	Zone diffuse d'IgA, IgG et d'IgM

Tableau XIV : Libellé pour les autres commentaires et évolution du taux de cryoglobuline

N°	Libellé	Élément déclenchant
1	La concentration très élevée de cryoglobuline et l'isotype IgM doivent faire rechercher des signes d'hyperviscosité (néphropathie, neuropathie...).	IgM>5 g/L ou signes d'hyperviscosité du sang, néphropathie, neuropathie.
2	La présence d'une cryoglobuline précipitant rapidement a été observée. Ce phénomène peut induire de nombreuses perturbations des dosages biologiques. SVP, pour ce patient, faire parvenir les échantillons de sang a 37°C en signalant ce problème pour une prise en charge optimale.	Perturbation sur la numération, les protéines totales, le phosphore, les dosages des protéines spécifiques du complément et immunoglobulines, les facteurs rhumatoïdes, la sérologie et des techniques d'immunodosages en général.
3	Le taux de cryoglobuline reste stable depuis le précédent examen du jj/mm/aaaa.	Variation < 10 %
4	Le taux de cryoglobuline est en augmentation depuis le précédent examen du jj/mm/aaaa.	Variation >+20 %
5	Le taux de cryoglobuline est en diminution depuis le précédent examen du jj/mm/aaaa.	Variation >-20%

VIII. Protocole finale

Avec les matériels déjà disponibles au laboratoire, on a pu réaliser la recherche et l'analyse des cryoglobulines. La mise en place de cette analyse ne demande aucun investissement car aucun achat de grands appareils n'est plus à prévoir. Ceci devra nous permettre de rendre le prix de la détection accessible pour la majorité de la population Malagasy.

Le protocole ainsi élaboré (figure 18) est applicable par tous les laboratoires disposant du minimum de matériels nécessaires. Et pour faciliter le travail et le rendu des résultats, nous avons établi une fiche de travail sur laquelle seront transcrits les renseignements sur le patient, les signes cliniques en rapport avec la pathologie, les résultats de la détection, du dosage, du typage et le commentaire finale qui sera validée par le biologiste et archivée. (Annexe 1)

L'exploration de la cryoglobuline peut apporter une grande aide dans la prise en charge de certains patients. Le regain d'intérêt de la pratique de ces analyses ces dernières années dans plusieurs pays étrangers est témoin de son importance actuelle en médecine. Ces analyses demeurent cependant négligées, et méconnues à Madagascar. Ainsi, après la mise en place de ces explorations, il nous apparait nécessaire de sensibiliser les médecins praticiens et cliniciens Malagasy sur l'existence de ces analyses et leur importance pour la prise en charge de certains patients. Pour ainsi faire, nous suggérons :

- d'insérer ces explorations dans les fiches de demande d'analyse du laboratoire d'immunologie,
- de mettre une note informant sur la disponibilité actuelle de l'exploration dans le laboratoire sur les résultats rendus auprès des médecins prescrivant des analyses dans le laboratoire,
- d'établir des affiches colorées, bien représentées et attirantes contenant les indications et intérêts du dosage de la cryoglobuline, qui seront exposées dans le laboratoire ou lors des journées scientifiques ...

La forte relation entre la cryoglobulinémie et l'infection au VHC confirme également la nécessité de cette analyse dans notre pays où la prévalence de cette

infection reste encore élevée. Ainsi comme perspective, nous envisageons de faire une étude sur la prévalence de la cryoglobulinémie chez les patients infectés par le VHC et son aspect clinique.

Notre challenge était de faire des mises au point techniques sur ces analyses afin de les adapter aux ressources disponibles au laboratoire et à la situation économique de notre pays. Bien que réussi, nous pensons tout de même que l'obtention d'un dispositif de transport serait un avantage qui permettra ainsi de prélever dans leur lit, les patients non déplaçables.

CONCLUSION

CONCLUSION

La recherche et l'analyse des cryoglobulines sont des explorations réalisables par tous les laboratoires, même dans les pays en voie de développement. Cette étude a montré qu'avec les matériels déjà disponibles au laboratoire, on a pu établir un protocole simple et efficace pour la détection, le dosage et l'identification des cryoglobulines. Sa mise en place va contribuer à un grand progrès pour la médecine à Madagascar notamment pour la prise en charge des patients et du point de vue scientifique.

Cependant, une grande rigueur s'impose sur la réalisation de ces analyses car elles nécessitent un respect strict du protocole de prélèvement, de lavage, de dosage et de caractérisation afin d'assurer la fiabilité des résultats.

Le plus grand risque est de manquer la détection des cryoglobulines par précipitation précoces de ces dernières avant même le traitement des sérums. Il est alors de mise de bien respecter le maintien de la température afin de ne pas rendre des résultats faussement négatifs.

Cet examen ne bénéficie toutefois d'aucune possibilité de contrôle de qualité et la seule garantie de sa qualité se trouve donc intimement liée à une bonne maîtrise technique. L'intérêt clinique associé au résultat de la recherche d'une cryoglobuline, à son dosage et à sa caractérisation rendent, de fait cette qualité indispensable.

Enfin, la sensibilisation des médecins Malagasy nous semble nécessaire afin de les informer sur la disponibilité actuelle de l'analyse et de leurs indications.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- 1- Meltezer M, Franklin EC. Cryoglobulinemia: a study of twenty-nine patients. *Am J Med.* 1966; 40: 828-36.
- 2- Cacoub P, Sène D, Saadoun D. Cryoglobulinémie. *Rev Med Int.* 2008; 29: 200–8.
- 3- Chevailler A. Place et exploration de la réponse immunitaire adaptative humorale dans les mécanismes de défense anti-infectieux. *Rev Fr Lab.* 2004 ; 366 : 23-35.
- 4- Beauvillaina C, Renierb G, Jeannina P, Ifrahc N, Chevaillera A. Les immunoglobulines. *Rev Fr Lab.* 2008 Juillet-Août ; 404 : 86-9.
- 5- Aucouturier P, Alyanakian MA, Richard S, Moreau P. Cryoglobulinémies. *Option Bio.* 2000;sup 243/244:18–20.
- 6- Intrador L, Pham BN. Cryoglobulines : méthode de détection et interprétation. *Cah Form Bioforma.* 2003; 28 : 85–103.
- 7- Le Carrer D. Les Cryoglobulinémies : exploration biologique et significations cliniques. *Rev Fr Lab.* 1995;279 : 43–51.
- 8- Cacoub P, Musset L. Cryoglobulinémies mixtes. *RDP.* 2000 ; 50 : 276-80.
- 9- Blain H, Cacoub P, Musset I, Costedoat-Chalumeau N, Silberstein C, Chosidow O *et al* . Cryofibrinogenaemia : a study of 49 patients. *Clin Exp Immunol.* 2000; 120: 253-69.

- 10- Szymanowicz A, Neyron M-J. Analyse statistique sur 20 mois des types de cryoglobulines et de 'isotypie des cryoglobulines impliquées. *Immuno-ann Biol Spéc.* 2010 ; 25. 179-84.
- 11- Kolopp- Sardaa MN, Chapuis- Celliera C, Dimeta I, Lombarda C. Protéines précipitantes en pathologie : cryoglobuline et cryofibrinogène. *Rev Franco Lab.* 2014 juillet- Août ; 444 : 102-18.
- 12- Brouet JC, Clauvel JP, Danon F. Biologic and clinical significance of cryoglobulins: a report of 86 cases. *Am J Med.* 1974; 57: 775–88.
- 13- Oliver M, Coton T, Ragot C, Delpy R, Moalic J.-L, Debonne J.-M. Cryoglobulinémies : revue générale. *Ann Biol Clin.* 2004 ; 62 : 521-8.
- 14- Le Carrer D. Cryoglobulinémies : proposition d'un protocole d'exploration biologique. Actualisation de leur classification. *Feuil Biol.* 1998 ; 221 : 55-65.
- 15- Shimon T. Cryoglobulinemia : review. *Molecular medicine reports.* 2012; 6: 3-8.
- 16- Smith SB, Arkin C: Cryofibrinogenemia : incidence, clinical correlations, and a review of the literature. *Am J Clin Pathol.* 1972; 58: 524-30.
- 17- Coppo P, Lassoued K. Cryoglobulinémies : diagnostic, étiologies. *Méd Therap.* 2000 ; 6 : 48-53.
- 18- Pechère-Bertschi A, Schifferli J. Cryoglobulinémie. *Med Hyg.* 1992 ; 50 : 1318-22.

- 19- Schifferli J, Frensil L, Tissot J. Infection par le virus de l'hépatite C, cryoglobulinémie et glomérulonéphrite. Paris : Flam Méd-Scien ; 1994; 1 : 07-12.
- 20- Stouran H. Les cryoglobulines : aspect clinique et biologique [thèse]. Pharmacie : Rabat ; 2015. 147p.
- 21- Laplanche S, Musset L. Recherche et caractérisation des cryoglobulines au laboratoire. Les feuillets de biologie. 1992; 188: 29-33.
- 22- Iorri GP, Buonnano G. Chronic hepatitis and cirrhosis of the liver in cryoglobulinemia. Gut. 1972; 13: 610-3.
- 23- Popp JW, Dienstag JL, Wangs JR, Bloch KJ. Essential mixed cryoglobulinemia without evidence for hepatitis B virus infection. Ann Intern Med. 1980; 92: 379-83.
- 24- Scotto G, Cibelli DC, Saracino A. Cryoglobulinemia in subjects with HCV infection alone, HIV infection and CHV/HIV coinfection. J Infect 2006; 52 : 294-9.
- 25- Dimmitrakopolous AN, Kordossis T, Hatzakisa, Moutsopoulos HM. Mixed cryoglobulinemia in HIV- 1 infection : the role of HIV-1 infection. Ann Intern Med. 1999; 130: 226-30.
- 26- Pagnoux C, Cohen P, Guillevin L. Vasculitides secondary to infections. Clin Exp Rheumatol. 2006; 24: 34-42.

- 27- Dispenzieri A, Gorevic P. Cryoglobulinemia. *Hematol Oncol Clin.* 1999; 13: 1315-9.
- 28- Dupin N, Chosidow O, Lunel F, Cacoub P, Musset L, Cresta P et al. Essential mixed cryoglobulinemia. A comparative study of dermatologic manifestations in patients infected or non infected with hepatitis C virus. *Arch Dermatol.* 1995; 131 : 1124–7.
- 29- Sène D, Ghillani-Dalbin P, Thibault V, Guis L, Musset L, Duhaut P, et al. Longterm course of mixed cryoglobulinemia in patients infected with hepatitis C virus. *J Rheumatol.* 2004; 31:2199–206.
- 30- Leone N, Pellicano R, Ariata Maiocco I, Modena V, Marietti G, Rizzetto M, et al. Mixed cryoglobulinaemia and chronic hepatitis C virus infection: the rheumatic manifestations. *J Med Virol.* 2002; 66: 200–3.
- 31- Cacoub P, Ratziu V, Myers RP, Ghillani P, Piette JC, Moussalli J et al. Impact of treatment on extra hepatic manifestations in patients with chronic hepatitis C. *J Hepatol.* 2002; 36:812–8.
- 32- Pawlotsky J-M. Virus de l'hépatite C et réponse immunitaire. *Gastroenter Clin Biol.* 2001, 25 : 123-33.
- 33- Apartis E, Leger JM, Musset L, Gugenheim M, Cacoub P, Lyon-Caen O et al. Peripheral neuropathy associated with essential mixed cryoglobulinaemia: a role for hepatitis C virus infection? *J Neurol Neurosurg Psych.* 1996;60: 661–6.

- 34- Nemni R, Sanvito L, Quattrini A, Santuccio G, Camerlingo M, Canal N. Peripheral neuropathy in hepatitis C virus infection with and without cryoglobulinaemia. *J Neurol Neurosurg Psychiatr.* 2003; 74:1267–71.
- 35- Kawtar N, Saadia J, Wafae R, Ouafaa Mkinsi. Vascularite cérébrale au cours d'une cryoglobulinémie mixte. *Rev Mar Rhum.* 2013; 26: 38-41.
- 36- Ballouch, A. Hommadi, A. Karouach, Y. Bamou1. Cryoglobulinémie de type I engendrant un accident vasculaire cérébral ischémique. *Ann Biol Clin.* 2007 ; 65 : 563-8.
- 37- Nocente R, Ceccanti M, Bertazzonig , Cammarato G, Silveri N, Gabarrini G. HCV infection and extrahepatic manifestations. *HGE.* 2003, 50: 1149-54.
- 38- 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. *Q J Med.* 1995; 88: 115–26.
- 39- Beddhu S, Bastacky S, Johnson JP. The clinical and morphologic spectrum of renal cryoglobulinemia. *Medic Balt.* 2002; 81: 398–409.
- 40- Fabrizi F, Colucci P, Ponticelli C, Locatelli F. Kidney and liver involvement in cryoglobulinemia. *Semin Nephrol* 2002 ; 22 : 309–18.
- 41- Henry Hambley and John M. Veters. Artefacts associated with a cryoglobulin. *Postgrad Med J.* 1989; 65: 241 – 3.

- 42- Kallemuchikkal U, Gorevic PD. Evaluation of cryoglobulins. Arch Pathol Lab Med. 1999; 123: 119 –25.
- 43- Foerster J. Cryoglobulins and cryoglobulinemia. 10Th ed Wintrobe's clin hematol. . 2000; 2725–37.
- 44- Dammacco F, Sansonno D, Piccoli C. The cryoglobulins: an overview. Eur J Clin Invest. 2001; 31: 628 –38.
- 45- Oliver M, Coton T, Ragot C, Chianéa Z, Moalic J.L, Debonne JM.. Cryoglobuline recherche, typage et quantification. Étude chez le sujet sain et chez des patients atteints d'une hépatite C chronique. Ann Biol Clin. 2005 ; 63 : 59-65.
- 46- Szymanowicz A, Doche C, Coulhon MP et al. Détection, caractérisation et interprétation des cryoglobulines, recommandations du groupe de travail « Cryoglobulines » du Collège National de Biochimie des Hôpitaux. Spect bio. 2007 ; 161 : 47 – 58.
- 47- Brouet JC, Dubertret L, Aractingi S, Bachelez H, Bodemer C, Chosidow O et al. Cryoglobulinémie, In Thérap Dermat. 2001. Disponible en ligne www.therapeutique-dermatologique.org.
- 48- Letendre L, Kyle R. Monoclonal cryoglobulinemia with high thermal insolubility. Mayo Clin Proc. 1982; 57: 629 –33.

- 49- Vermeersch P, Gijbels K, Godelieve M, Rod L, Egner W, White P et al. A Critical Appraisal of Current Practice in the Detection, Analysis, and Reporting of Cryoglobulins. *Clin Chemi.* 2008 ; 54:139–43.
- 50- Bakker AJ, Slomp J, de Vries T, Boymans DA, Veldhus B, Halma K, Joosten P. Adequate sampling in cryoglobulinaemia: recommended warmly. *Clin Chem Lab Med.* 2003; 41: 85–9.
- 51- Cacoub P, Lunel Fabiani F, Musset L, Opolon P, Piette JC. Hepatitis C virus and mixed cryoglobulinemias, *N Engl J Med.* 1993; 328: 1121-4
- 52- Ramos-Casals M, Stone J H, Cid M C. The cryoglobulinemias. *Lancet.* 2012; 379: 348–60.
- 53- Le Carrer D. Les Cryoglobulinémies : exploration biologique et signification cliniques. *Revue francophone des laboratoires.* 1995 ; 279 : 43-51.
- 54- Zak K. Shihabi. Cryoglobulins: An Important but Neglected Clinical Test. *Ann Clin & Lab Scien.* 2006; 36 disponible en ligne sur www.annclinlabsci.org.
- 55- Kllmuckhikkal U, Gorevic PD. Evaluation of cryoglobulins. *Arch Pathol Lab Med.* 1999; 123 : 119-25.
- 56- Fernand JP. Méthode de dosage des cryoglobulines et interprétation. *Cah forma Immunoglob monocl.* 2003 ; 5 : 123-6.
- 57- Damoiseaux J. The diagnosis and classification of the cryoglobulinemic syndrome. *Autoimm Rev.* 2014; 13: 359–362.

- 58- Cream JJ. Cryoglobulins in vasculitis. Clin Exp Immunol. 1972; 10: 117-26.
- 59- Romaszko JP, Tridon A, Jouanel P, Subtil E, Dibet P, Betail G. Détection et analyse des cryoglobulines : étude comparative d'une population de malade et d'une population de témoins sains. Pathol Biol. 1993 ; 41 : 525-9.
- 60- Maire MA, Mittey M, Lambert PH. The presence of cryoprecipitable immunoglobulin may reflect specific molecular interaction. Autoimmunity. 1989; 2 : 155-64.

ANNEXE 1 : Fiche de travail

Nom :	Prénom :	Né(e) le : /_/_/ _/_/ _/_/_/_/
Service :	N° travail : /_/_/_/_/	
Date de la demande : /_/_/ _/_/ _/_/_/_/	Date de rendu de l'examen : /_/_/ _/_/ _/_/_/_/	

Renseignements cliniques :			
<input type="checkbox"/> Syndrome de Raynaud	<input type="checkbox"/> Acrocyanose des extrémités	<input type="checkbox"/> Livedo réticularis	<input type="checkbox"/> Nécroses cutanées
<input type="checkbox"/> Glomérulonéphrite MP	<input type="checkbox"/> Arthralgies inflammatoires	<input type="checkbox"/> Arthrites	
<input type="checkbox"/> Polynévrites	<input type="checkbox"/> Neuropathies périphériques	<input type="checkbox"/> Hyperviscosité sanguine	
Diagnostic principal :			
<input type="checkbox"/> Hépatite virale	<input type="checkbox"/> Maladie autoimmune	<input type="checkbox"/> Infection bactérienne	<input type="checkbox"/> Hémopathie
Autre :			

Interprétation quantitative	Cryoglobuline : /_/_/_/_/ g/L	
<input type="checkbox"/> Peu significative (< 0,1 g/L)	<input type="checkbox"/> Faible (0,1 à 0,5 g/L)	<input type="checkbox"/> Moyenne (0,5 à 1 g/L)
<input type="checkbox"/> Importante (1 à 5 g/L)	<input type="checkbox"/> Très importante (> à 5 g/L)	

<p>Interprétation qualitative</p> <p>Type :</p> <p><input type="checkbox"/> I : monoclonale</p> <p><input type="checkbox"/> II a : mixte monoclonale</p> <p><input type="checkbox"/> II b : mixte oligoclonale</p> <p><input type="checkbox"/> III : mixte polyclonale</p> <p>Isotypie monoclonale :</p> <table style="width: 100%;"> <tr> <td><input type="checkbox"/> IgG Kappa</td> <td><input type="checkbox"/> IgG Lambd</td> </tr> <tr> <td><input type="checkbox"/> IgA Kappa</td> <td><input type="checkbox"/> IgA Lambda</td> </tr> <tr> <td><input type="checkbox"/> IgM Kappa</td> <td><input type="checkbox"/> IgM Lambda</td> </tr> <tr> <td><input type="checkbox"/> Kappa</td> <td><input type="checkbox"/> Lambda</td> </tr> </table> <p>Isotypie oligoclonale :</p> <table style="width: 100%;"> <tr> <td><input type="checkbox"/> IgG Kappa</td> <td><input type="checkbox"/> IgG Lambda</td> </tr> <tr> <td><input type="checkbox"/> IgA Kappa</td> <td><input type="checkbox"/> IgA Lambda</td> </tr> <tr> <td><input type="checkbox"/> IgM Kappa</td> <td><input type="checkbox"/> IgM Lambda</td> </tr> <tr> <td><input type="checkbox"/> Kappa</td> <td><input type="checkbox"/> Lambda</td> </tr> </table> <p>Isotypie polyclonale :</p> <table style="width: 100%;"> <tr> <td><input type="checkbox"/> IgG Kappa</td> <td><input type="checkbox"/> IgG Lambda</td> </tr> <tr> <td><input type="checkbox"/> IgA Kappa</td> <td><input type="checkbox"/> IgA Lambda</td> </tr> <tr> <td><input type="checkbox"/> IgM Kappa</td> <td><input type="checkbox"/> IgM Lambda</td> </tr> </table> <p>Autres et évolution :</p>	<input type="checkbox"/> IgG Kappa	<input type="checkbox"/> IgG Lambd	<input type="checkbox"/> IgA Kappa	<input type="checkbox"/> IgA Lambda	<input type="checkbox"/> IgM Kappa	<input type="checkbox"/> IgM Lambda	<input type="checkbox"/> Kappa	<input type="checkbox"/> Lambda	<input type="checkbox"/> IgG Kappa	<input type="checkbox"/> IgG Lambda	<input type="checkbox"/> IgA Kappa	<input type="checkbox"/> IgA Lambda	<input type="checkbox"/> IgM Kappa	<input type="checkbox"/> IgM Lambda	<input type="checkbox"/> Kappa	<input type="checkbox"/> Lambda	<input type="checkbox"/> IgG Kappa	<input type="checkbox"/> IgG Lambda	<input type="checkbox"/> IgA Kappa	<input type="checkbox"/> IgA Lambda	<input type="checkbox"/> IgM Kappa	<input type="checkbox"/> IgM Lambda	<p>Immuno-fixation</p> <table style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <thead> <tr> <th style="text-align: left;">Profil</th> <th style="text-align: center;">IgG</th> <th style="text-align: center;">IgA</th> <th style="text-align: center;">IgM</th> <th style="text-align: center;">K</th> <th style="text-align: center;">L</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td style="height: 100px;"> </td> <td> </td> <td> </td> <td> </td> <td> </td> <td> </td> </tr> </tbody> </table>	Profil	IgG	IgA	IgM	K	L						
<input type="checkbox"/> IgG Kappa	<input type="checkbox"/> IgG Lambd																																		
<input type="checkbox"/> IgA Kappa	<input type="checkbox"/> IgA Lambda																																		
<input type="checkbox"/> IgM Kappa	<input type="checkbox"/> IgM Lambda																																		
<input type="checkbox"/> Kappa	<input type="checkbox"/> Lambda																																		
<input type="checkbox"/> IgG Kappa	<input type="checkbox"/> IgG Lambda																																		
<input type="checkbox"/> IgA Kappa	<input type="checkbox"/> IgA Lambda																																		
<input type="checkbox"/> IgM Kappa	<input type="checkbox"/> IgM Lambda																																		
<input type="checkbox"/> Kappa	<input type="checkbox"/> Lambda																																		
<input type="checkbox"/> IgG Kappa	<input type="checkbox"/> IgG Lambda																																		
<input type="checkbox"/> IgA Kappa	<input type="checkbox"/> IgA Lambda																																		
<input type="checkbox"/> IgM Kappa	<input type="checkbox"/> IgM Lambda																																		
Profil	IgG	IgA	IgM	K	L																														

<p>Commentaire :</p>

PERMIS D'IMPRIMER

LU ET APPROUVE

Le Directeur de Thèse

Signé : Professeur RASAMINDRAKOTROKA Andry

VU ET PERMIS

Le Doyen de la Faculté de Médecine d'Antananarivo

Signé : Professeur SAMISON Luc Hervé

VELIRANO

Eto anatrehan'Andriamanitra Andriananahary, eto anoloan'ireo mpampianatra ahy, sy ireo mpiara-mianatra tamiko eto amin'ity toeram-pianarana ity, ary eto anoloanny sarin'i HIPPOCRATE.

Dia manome toky sy mianiana aho, fa hanaja lalandava ny fitsipika hitandrovana ny voninahitra sy ny fahamarinana eo am-panatontosana ny raharaham-pitsaboana.

Hotsaboiko maimaimpoana ireo ory ary tsy hitaky saran'asa mihoatra noho ny rariny aho, tsy hiray tetika maizina na oviana na oviana ary na amin'iza na amin'iza aho mba hahazoana mizara ny karama mety ho azo.

Raha tafiditra an-tranon'olona aho dia tsy hahita izay zava-miseho ao ny masoko, ka tanako ho ahy samy irery ny tsiambaratelo haboraka amiko ary ny asako tsy avelako hatao fitaovana hanatontosana zavatra mamofady na hanamorana famitankeloka.

Tsy ekeko ho efitra hanelanelana ny adidiko amin'ny olona tsaboiko ny anton-javatra ara-pinoana, ara-pirenena, ara-pirazanana, ara-pirehana ary ara-tsaranga.

Hajaiko tanteraka ny ain'olombelona na dia vao notorontoronina aza, ary tsy hahazo mampiasa ny fahalalako ho enti-manohitra ny lalàn'ny maha olona aho na dia vozonana aza.

Manaja sy mankasitraka ireo mpampianatra ahy aho, ka hampita amin'ny taranany ny fahaizana noraisiko tamin'izy ireo.

Ho toavin'ny mpiara-belona amiko anie aho raha mahatanteraka ny velirano nataoko.

Ho rakotry ny henatra sy horabirabian'ireo mpitsabo namako kosa aho raha mivadika amin'izany.

Name and first names : RAKOTOARISOA Aina Vololona
Title of the thesis : CRYOGLOBULINS DETECTION AND ANALYSIS :
TECHNICAL TESTING AND PROTOCOL
DEVELOPMENT
Category: BIOLOGY
Number of pages : 57 **Number of tables** : 14
Number of annexes : 01 **Number of figures** : 20
Number of bibliographical references : 60

SUMMARY

Introduction: Cryoglobulins are immunoglobulins or immune complexes reversibly precipitating at a temperature below 37 ° C and redissolving on rewarming. Information provided by cryoglobulins determination and typing is important for correct diagnosis and treatment of associated diseases. The aim of this study is to establish a cryoglobulins detection and analysis protocol

Methods: Based on referential articles, we adapted the assays to available technical facilities in the lab and to our financial situation. Two patients already undergone with previous exploration of the cryoglobulin BIOREUNION laboratory were taken as positive and negative controls. Tests were performed on 10 patients with multiple myeloma followed within the Hematology UPFR CHUJRA.

Results: Results of our assays are similar to those of previous exploration for controls; then for testing, we found one positive patient on the third day, with a rate of 0,77mg / L typed IgG lambda. The final protocol is described in our book.

Conclusion: This protocol based on the references articles takes into account of preanalytical precautions, technical and the principles of interpretation without forgetting the poor economic situation in our country.

Keywords: cryoglobulin, diagnosis, immunoglobulin, Madagascar, myeloma

Director of the thesis : Professor RASAMINDRAKOTROKA Andry

Reporter of the thesis : Doctor RANDRIAMAHAZO Rakotomalala Toky

Author's address : I C 186 Andrefan' Ilafy

Nom et Prénoms : RAKOTOARISOA Aina Vololona
Titre de la thèse : DETECTION ET ANALYSE DES CRYOGLOBULINES :
ESSAI TECHNIQUE ET ETABLISSEMENT D'UN
PROTOCOLE
Rubrique : BIOLOGIE
Nombre de pages : 57 **Nombre de tableaux** : 14
Nombre d'annexes : 01 **Nombre de figures** : 20
Nombre de références bibliographiques : 60

RESUME

Introduction : Les cryoglobulines sont des immunoglobulines ou des complexes immuns qui précipitent à une température inférieure à +37 °C et se redissolvent au réchauffement. Les informations apportées par le dosage de la cryoglobulines aident au diagnostic et à la prise en charge de certaines maladies. Notre objectif est d'établir un protocole pour la détection et l'analyse des cryoglobulines.

Méthode : Nous basant sur les articles de référence, nous avons apporté des mises au point en adaptant l'analyse au plateau technique disponible au laboratoire et à la situation économique de notre pays. Pour validation, deux patients qui ont déjà fait l'objet d'une exploration antérieure de la cryoglobuline ont été pris comme témoins de la technique. Les essais ont été réalisés sur 10 patients atteints de myélome multiple suivis à l'UPFR hématologie CHUJRA

Résultats : A partir de notre technique, nous avons pu avoir les résultats suivants : nous avons trouvé une similitude entre les résultats obtenus à partir de notre technique et ceux des dosages antérieurs pour les témoins. Pour les essais, nous avons pu retrouver un patient positif au troisième jour lors de la détection, avec un taux de 0,77mg/L au dosage dont le type est IgG lambda.

Conclusion : L'exploration de la cryoglobuline est à la portée de tous les laboratoires même dans les pays en voie de développement à condition de respecter les points clés de l'analyse.

Mots clés : cryoglobuline, cryoprécipité, diagnostic, immunoglobuline, Madagascar.

Directeur de thèse : Professeur RASAMINDRAKOTROKA Andry

Rapporteur de thèse : Docteur RANDRIAMAHAZO Rakotomalala Toky

Adresse de l'auteur : I C 186 Andrefan'Ilafy