

UNIVERSITE DE NANTES
FACULTE DE PHARMACIE

ANNEE 2004

N°63

THESE
pour le
DIPLÔME D'ETAT
DE DOCTEUR EN PHARMACIE

par
Caroline MAINGUY

Présentée et soutenue publiquement le 18 octobre 2004

**MISE EN EVIDENCE ET CARACTERISATION DES
LIPOPROTEINES DANS LES CRYOGLOBULINES DE
PATIENTS ATTEINTS PAR LE VIRUS DE L'HEPATITE C**

Président : Mme Berthe-Marie IMBERT, Professeur de Virologie

Membres du Jury : M. Jean-Marie BARD, Professeur de Biochimie

M. Didier LE CARRER, Praticien Hospitalier Biologiste

**Au Professeur Berthe-Marie IMBERT,
pour avoir accepté de présider ma thèse**

Au Professeur Jean-Marie BARD,
pour m'avoir dirigée dans cette étude, m'avoir initiée à la recherche, pour
son aide, sa disponibilité

Au Docteur Didier LE CARRER,
pour m'avoir proposée ce sujet, m'avoir accueillie dans son laboratoire,
pour sa gentillesse, ses conseils et le temps qu'il m'a souvent accordé

Au Docteur Jérôme GOURNAY, pour son aide précieuse

**A l'ensemble du Service de Biochimie Spécialisée du CHU de Nantes, pour
leur accueil et leur gentillesse**

A Fanny FERRER, pour son aide précieuse et son écoute

A Valérie, Françoise, Maryse et Annabelle, pour leur écoute et leur soutien

A ma famille, pour leur amour, leur écoute et leur confiance

A Romain, pour sa patience, son aide et son amour

SOMMAIRE

LISTE DES TABLEAUX	1
LISTE DES FIGURES.....	1
LISTE DES ABREVIATIONS	2
INTRODUCTION.....	4
1 LES CRYOGLOBULINES	5
1.1 Définition	5
1.2 Physiopathologie des cryoglobulines.....	5
1.3 Classification.....	8
1.4 Manifestations cliniques.....	10
1.4.1 Manifestations cutanées et vasomotrices	11
1.4.2 Manifestations rénales	13
1.4.3 Manifestations articulaires.....	14
1.4.4 Manifestations neurologiques	14
1.4.5 Autres manifestations	15
1.5 Manifestations biologiques	16
1.5.1 Anomalies hématologiques.....	16
1.5.2 Anomalies biochimiques et immunochimiques	17
1.6 Maladies associées.....	18
1.6.1 Hémopathies malignes.....	18
1.6.2 Maladies auto-immunes.....	19
1.6.3 Maladies infectieuses.....	19
1.7 Exploration biologique d'une cryoglobuline.....	22
1.7.1 Conditions de prélèvement	22
1.7.2 Mise en évidence	24
1.7.3 Analyse quantitative	24
1.7.4 Analyse qualitative	26
1.7.4.1 Immunoélectrophorèse	26
1.7.4.2 Immunoempreinte	27
1.7.4.3 Immunofixation.....	27
1.8 Traitement des cryoglobulines	27
1.8.1 Surveillance	28
1.8.2 Traitement.....	28
1.8.2.1 Traitement étiologique	28
1.8.2.2 Traitement symptomatique.....	28
2 L'HEPATITE C	30
2.1 Caractéristiques du virus de l'hépatite C (VHC).....	30
2.1.1 Organisation génomique	30
2.1.2 Variabilité génomique	31
2.2 Epidémiologie	31
2.3 Pathogénèse du VHC	32
2.4 Modes de transmission.....	32
2.5 Manifestations clinico-biologiques	32
2.5.1 Atteinte hépatique.....	32
2.5.2 Atteinte des glandes salivaires.....	34
2.5.3 Atteintes rhumatologiques	34
2.5.4 Atteintes rénales	35
2.5.5 Atteintes cutanées	35
2.5.6 Atteintes endocriniennes.....	36
2.5.7 Atteintes hématologiques.....	36
2.5.8 Cryoglobulines	36
2.5.9 Auto-anticorps sériques	37
2.5.10 Atteintes biologiques	37
2.6 Mise en évidence d'une infection par le VHC.....	37
2.7 Traitement.....	38
2.7.1 Examens à effectuer avant un traitement	39

2.7.1.1	L'enquête clinique.....	39
2.7.1.2	Bilan décisionnel.....	39
2.7.2	Traitement antiviral	40
2.7.2.1	Traitement de référence : IFN PEG + ribavirine en bithérapie.....	40
2.7.2.2	Autres schémas thérapeutiques	40
2.7.3	Transplantation hépatique.....	41
2.7.4	Facteurs influençant la réponse au traitement.....	41
2.7.4.1	L'alcool.....	41
2.7.4.2	L'excès de poids.....	41
2.7.4.3	Le tabac.....	41
2.7.4.4	La vaccination.....	41
2.7.5	Surveillance du traitement	42
2.7.5.1	Suivi biochimique	42
2.7.5.2	Suivi virologique.....	42
2.7.6	Tolérance au traitement	42
3	RELATION ENTRE CRYOGLOBULINE ET HEPATITE C	43
3.1	<i>Infection par le VHC chez des patients porteurs d'une cryoglobuline mixte</i>	43
3.1.1	Définition d'une cryoglobulinémie mixte essentielle (CME).....	43
3.1.2	Prévalence de l'infection par le VHC dans les cryoglobulines mixtes essentielles.....	44
3.2	<i>Fréquence des cryoglobulines chez les patients infectés par le VHC</i>	45
3.3	<i>Facteurs prédisposants à la survenue d'une cryoglobuline au cours d'une infection par le VHC.....</i>	46
3.3.1	Age et sexe	46
3.3.2	Atteinte hépatique.....	46
3.3.3	Génotype	47
3.3.4	Système HLA (Human Leukocyte Antigen).....	48
3.4	<i>Arguments en faveur de l'implication du VHC dans la survenue d'une cryoglobulinémie.....</i>	49
3.4.1	Répartition géographique.....	49
3.4.2	Prévalence élevée des cryoglobulines au cours de l'infection par le VHC et inversement	49
3.4.3	Présence de vascularite chez les patients atteints par le VHC.....	50
3.4.4	Argument thérapeutique	50
3.4.5	Autres arguments	52
3.5	<i>Physiopathologie de la cryoprécipitation chez les patients atteints d'hépatite C.....</i>	52
3.5.1	Composition du cryoprécipité.....	52
3.5.2	Hypothèses physiopathologiques.....	54
3.5.2.1	Stimulation immunitaire.....	54
3.5.2.2	Prolifération pré-néoplasique	55
3.5.2.3	Diminution de la clairance des complexes immuns.....	55
4	LES LIPOPROTEINES	57
4.1	<i>Définition et structure</i>	57
4.2	<i>Les apolipoprotéines</i>	57
4.3	<i>Les différentes lipoprotéines et leur composition.....</i>	59
4.4	<i>Métabolisme des lipoprotéines plasmatiques.....</i>	61
4.4.1	La voie exogène.....	61
4.4.2	La voie endogène.....	62
4.5	<i>Relation entre lipides et infection.....</i>	64
4.5.1	Modification de la concentration des TG.....	64
4.5.1.1	Augmentation de la synthèse des VLDL.....	64
4.5.1.2	La lipolyse des tissus adipeux	65
4.5.1.3	Diminution de la clairance des VLDL.....	66
4.5.2	Modification de la concentration de cholestérol	66
4.5.2.1	Modification de la synthèse hépatique du cholestérol.....	67
4.5.2.2	Modification de la clairance des LDL	67
4.5.2.3	Modification du catabolisme du cholestérol et son excrétion.....	67
4.5.2.4	Modification du métabolisme des HDL et diminution de la voie de retour du cholestérol au foie.....	68
4.5.3	Les effets athérogènes de ces changements lipidiques.....	69
4.5.4	Les effets bénéfiques de ces changements lipidiques	69
4.5.4.1	Lipoprotéines et bactéries.....	70
4.5.4.2	Lipoprotéines et virus.....	70
4.5.4.3	Lipoprotéines et parasites.....	70
5	RECHERCHE ET CARACTERISATION DES LIPOPROTEINES DANS LES CRYOGLOBULINES DE PATIENTS ATTEINTS D'HEPATITE C.....	72
5.1	<i>Patients.....</i>	73
5.2	<i>Méthodes.....</i>	75
5.2.1	Dosage des cryoglobulines	75
5.2.2	Dosage de l'Apo B	75

5.2.2.1	Matériel	75
5.2.2.2	Réacti	75
5.2.2.3	Méthode	75
5.2.3	Dosage des immuns complexes	77
5.3	<i>Résultats</i>	78
5.3.1	Influence de la cirrhose	78
5.3.2	Influence du score Metavir A	79
5.3.3	Influence du score Metavir F	80
5.3.4	Corrélations simples entre les différentes variables	81
5.3.5	Régressions multiples « pas à pas » entre les différentes variables	82
5.4	<i>Discussion</i>	84
5.4.1	Etude des paramètres démographiques et biologiques en fonction de la clinique	84
5.4.2	Présence d'Apo B et d'immuns complexes dans les cryoglobulines et corrélations avec les paramètres démographiques et biologiques	86
CONCLUSION		88
ANNEXE		89
LEXIQUE		93
BIBLIOGRAPHIE		96

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1 : Principales affections associées aux cryoglobulines [Coppo et al, 2000].....	20
Tableau 2 : Classification selon KNOPELL.....	33
Tableau 3 : Classification selon METAVIR.....	34
Tableau 4 : Prévalence de l'infection par le VHC chez des patients ayant une cryoglobulinémie mixte essentielle	44
Tableau 5 : Prévalence des cryoglobulinémies mixtes au cours des infections chroniques par le VHC	45
Tableau 6 : Composition des cryoglobulines dans l'hépatite C [Sasso et al, 2000].....	53
Tableau 7 : Caractéristiques des apolipoprotéines	58
Tableau 8 : Caractéristiques des lipoprotéines sériques [Kamoun et al, 2003].....	60
Tableau 9 : Descriptif des patients inclus dans notre étude	74
Tableau 10 : Comparaison des résultats selon l'existence ou non d'une cirrhose	78
Tableau 11 : Comparaison des résultats en fonction du score Metavir A des patients	79
Tableau 12 : Comparaison des résultats en fonction du score Metavir F des patients	80
Tableau 13 : Corrélations simples de l'Apo B avec les autres variables.....	81
Tableau 14 : Corrélations simples entre l'Apo B-IgG et les autres variables	81
Tableau 15 : Paramètres liés à la quantité de cryoglobuline	82
Tableau 16 : Paramètres liés à la concentration d'Apo B.....	82
Tableau 17 : Paramètres liés à la concentration de l'immun complexe Apo B-IgG.....	83
Tableau 18 : Paramètres liés à la concentration de l'immun complexe Apo B-IgM	83

LISTE DES FIGURES

Figure 1 : Exemple d'une courbe thermique moyenne d'une cryoglobuline [Pechère-Bertschi, 1992a].....	6
Figure 2 : Immunofixations des différents types de cryoglobulines.....	10
Figure 3 : Purpura vasculaire pétéchial au niveau des chevilles	11
Figure 4 : Ulcère de jambe	11
Figure 5 : Glomérulonéphrite membrano-proliférative chez un patient ayant une cryoglobuline de type II	13
Figure 6 : Démarche à suivre pour la recherche et l'exploration biologique d'une cryoglobulinémie au laboratoire [Laplanche, 1992].....	23
Figure 7 : Mise en évidence de la cryoglobuline	24
Figure 8 : Virus de l'hépatite C	30
Figure 9 : Etiologies possibles des désordres relatifs aux cryoglobulines dans l'hépatite C [Ferri,2002]	56
Figure 10 : Schéma d'une lipoprotéine.....	57
Figure 11 : Métabolisme des lipoprotéines.....	63
Figure 12 : Action des cytokines sur le métabolisme des triglycérides.....	65
Figure 13 : Immunofixation d'une cryoglobuline d'un patient VHC.....	72

LISTE DES ABREVIATIONS

AcTH	: Hormone adrénocorticotrophique
ALAT	: Alanine aminotransférase
Apo	: Apolipoprotéine
ASAT	: Aspartate aminotransférase
BMI	: Body mass index
CCMH	: Concentration corpusculaire moyenne en hémoglobine
CE	: Cholestérol estérifié
CETP	: Cholesteryl ester transfer protein
CG	: Cryoglobuline
CI	: Complexes immuns
CIC	: Complexes immuns circulants
CME	: Cryoglobuline mixte essentielle
EIA	: Enzyme immunoassay
Fc	: Fragment cristallisable
FR	: Facteur rhumatoïde
GNMP	: Glomérulonéphrite membrano-proliférative
HDL	: High density lipoproteins
HL	: Lipase hépatique
HLA	: Human leukocyte antigen
HMG-CoA reductase	: HydroxyMethylGlutaryl-Coenzyme A reductase
IDL	: Intermediate density lipoproteins
IFN	: Interféron
Ig	: Immunoglobuline
IL	: Interleukine
LCAT	: Lecithine cholestérol acyltransférase
LDL	: Low density lipoproteins
LNH	: Lymphome non hodgkinien
LPL	: Lipoprotéine lipase
LPS	: Liposaccharides
PCR	: Polymerase chain reaction
PL	: Phospholipide
PLA	: Phospholipase A
PLTP	: Phospholipid transfer protein
PTC	: Porphyrie tardive cutanée
QIP	: Quantité insuffisante pour l'identification

RIBA : Radio immunoblotting assay
rLDL : Récepteur aux LDL
SIDA : Syndrome d'immunodéficience acquise
TD : Tampon de dilution
TG : Triglycéride
TNF : Tumor necrosis factor
TSH : Hormone thyroïdienne
VHB : Virus de l'hépatite B
VHC : Virus de l'hépatite C
VIH : Virus de l'immunodéficience humaine
VLDL : Very low density lipoproteins
VS : Vitesse de sédimentation

INTRODUCTION

Les cryoglobulines sont des immunoglobulines qui précipitent à froid et qui se redissolvent lors du réchauffement. Leur étude immunochimique permet de les classer en trois types : type I (présence d'un composant monoclonal unique), type II (présence d'un composant monoclonal associé à des immunoglobulines polyclonales) et type III (présence exclusive d'immunoglobulines polyclonales).

La recherche de cryoglobulines au laboratoire de Biochimie Spécialisée de Nantes représente 1115 demandes en 2002. Elles étaient positives dans 11.3 % des cas et sur ce nombre, 59 % correspondaient à des patients atteints par le virus de l'hépatite C. Une relation étroite semble donc exister entre hépatite C et cryoglobuline.

L'exploration immunochimique de ces cryoglobulines montre un aspect particulier qui nous laisse supposer la présence de lipoprotéines. Le but de notre travail a consisté à rechercher, par la technique ELISA, dans les cryoglobulines de 21 patients atteints d'hépatite C, la présence de lipoprotéines et à en déterminer la composition exacte.

1 LES CRYOGLOBULINES

Heidelberger et Kendall ont décrit dès 1929 le phénomène de cryoprécipitation lors de la formation de complexes immuns au décours d'une réponse immune aux polysaccharides du pneumocoque [Heidelberger et al, 1929]. En 1933, Wintrobe et Buell ont observé pour la première fois ce phénomène dans le plasma d'un patient souffrant d'un myélome multiple [Wintrobe et al, 1933]. En 1947, Lerner et Watson nommeront ces protéines précipitant à froid des cryoglobulines [Lerner et al, 1947]. Ce n'est qu'en 1966 que Meltzer et Franklin associeront la présence d'une cryoglobuline à la triade purpura, arthralgies et asthénie [Meltzer et al, 1966].

1.1 Définition

Les cryoglobulines (CG) sont des immunoglobulines (Ig) sériques dont la particularité est de précipiter, de se gélifier ou de cristalliser à une température inférieure à + 37°C et de se resolubiliser lors du réchauffement [Brouet,1983]. Les termes de cette définition permettent de distinguer les CG des autres cryoprotéines, tels que les cryofibrinogènes, les agglutinines froides [Hobbs, 1986].

Les CG appartiennent au groupe des thermoprotéines. Ce sont les plus fréquemment rencontrées en pathologie humaine et les plus explorées en biologie clinique [Le Carrer, 1995].

1.2 Physiopathologie des cryoglobulines

La physiopathologie des CG n'est que partiellement élucidée. Les paramètres physico-chimiques favorisant la cryoprécipitation sont mal connus en raison de l'absence de modifications constantes et univoques pouvant expliquer ce phénomène ; seules quelques hypothèses peuvent être envisagées concernant l'influence sur la cryoprécipitation d'un certain nombre de paramètres [Meltzer et al, 1966] [Brouet et al, 1974] [Pechère-Bertschi et al, 1992a] [Le Carrer, 1995] [Coppo et al, 2000] :

- la température : la courbe est très différente d'une CG à une autre, certaines pouvant précipiter dès + 30°C (figure1), ce qui peut expliquer en partie l'apparition d'un purpura puisque la température de la peau est fréquemment à + 28°C ou même moins. La concentration en CG est aussi déterminante : plus elle est élevée, plus la température de cryoprécipitation est haute;

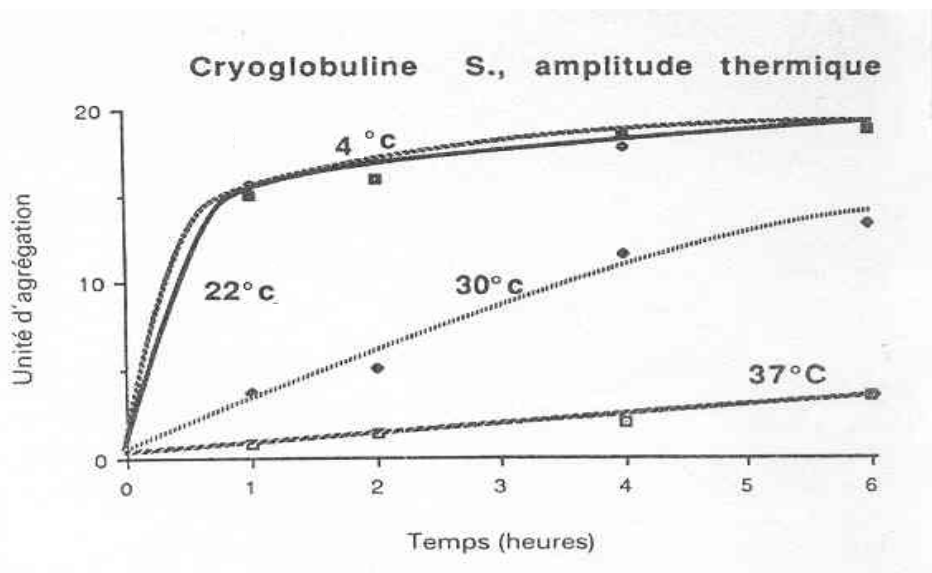


Figure 1 : Exemple d'une courbe thermique moyenne d'une cryoglobuline [Pechère-Bertschi, 1992a]

- le pH et la force ionique : il existe une diminution de la solubilité de la CG parallèle à la diminution de la force ionique des ions (liée notamment aux ions Na⁺), une hyponatrémie vraie pourrait donc représenter un facteur de risque à la précipitation;
- la présence d'autres protéines sériques telle la fibronectine (anciennement appelée "cold insoluble globuline") jouerait également un rôle dans la cryoprécipitation.

L'existence d'une anomalie de structure de la CG a été soulevée, en particulier [Barbouch et al, 1989] :

- une diminution des groupements thiols -SH conduisant à la polymérisation de l'Ig à froid;
- des anomalies portant sur la copule glucidique des Ig : déglycosylation de la CG par la neuraminidase streptococcique avec perte de l'acide sialique évoquée au cours de

l'endocardite d'Osler [Brouet et al, 1974]. La structure quaternaire de la CG monoclonale serait nécessaire pour que se produise le phénomène de cryoprécipitation [Brouet,1983];

- l'effet de modifications sélectives de certains acides aminés (tyrosine, lysine et histidine) [Brouet et al,1974].

Dans les cryoglobulinémies mixtes, il n'y a pas de cryoprécipitation lorsque les IgM sont séparées des IgG [Clauvel, 1993]. La cryoprécipitation survient seulement lorsque les deux constituants immunoglobuliniques sont en présence. Le fragment Fab'2 de l'IgM se combine avec un déterminant antigénique présent sur le fragment Fc d'IgG polyclonales. Cette dernière réaction a toutes les caractéristiques d'une réaction antigène-anticorps. Les conditions physico-chimiques de cryoprécipitation de certains complexes IgM-IgG restent imprécises [Brouet,1983].

Deux mécanismes principaux peuvent être à l'origine des symptômes observés: précipitation intravasculaire d'Ig et/ou dépôt de complexes immuns circulants (CIC). Le dépôt intravasculaire d'Ig s'observe lorsqu'il existe un constituant monoclonal. Ces dépôts ont pu être observés dans les vaisseaux de viscères profonds (ne subissant donc pas de variations thermiques) ; le froid n'est donc pas le seul facteur intervenant dans le dépôt intravasculaire de la CG [Brouet, 1983]. Les phénomènes d'occlusion vasculaire peuvent ainsi expliquer un syndrome vasomoteur d'aggravation rapide ou une nécrose déclenchée par le froid. L'étude en immunofluorescence des lésions cutanées peut montrer des dépôts d'Ig, de fibrinogène et/ ou de complément [Clauvel, 1979].

Les CIC formés physiologiquement se lient à la fraction C3b du complément présente dans le plasma, puis, grâce aux récepteurs du C3b, se fixent sur les érythrocytes ; l'ensemble étant ensuite éliminé par le système monocytaire-macrophagique. Ce phénomène d'épuration évite la précipitation tissulaire des CIC. En présence d'une CG, celle-ci entre en compétition, au niveau du récepteur du C3b, avec les CIC qui ne sont plus éliminés et se déposent sur la paroi des vaisseaux en provoquant des lésions de vascularite [Pawlotsky, 2001]. Le plus souvent, les lésions sont probablement secondaires aux dépôts de CIC. Les arguments en faveur de ce mécanisme sont l'aspect des lésions observées et la démonstration de CIC dans le sérum [Clauvel, 1979].

L'hypocomplémentémie, la formation de facteurs rhumatoïdes (FR) sont également en faveur de la présence de CIC. La CG peut avoir un rôle pathogène et, dans certains cas, l'étude en microscopie électronique montre la même structure dans le cryoprécipité et dans les glomérules rénaux. Certaines CG pourraient être dues à l'interaction de FR polyclonaux avec des molécules anti-IgG dont l'activité anticorps serait liée à un antigène viral ou bactérien [Clauvel, 1979].

Certaines infections chroniques sont à l'origine de la production de CG, liées à des micro-organismes qui persistent longtemps dans l'organisme hôte, permettant une stimulation importante et prolongée du système immunitaire notamment lymphocytaire B: virus d'Epstein-Barr, cytomégalovirus, virus de l'hépatite C (VHC), leishmaniose, plasmodium, etc...[Cacoub et al, 2000a].

1.3 Classification

Depuis 1974, la classification de Brouet et coll. est la plus utilisée et repose sur une analyse immunoélectrophorétique des CG permettant de définir trois types:

- les CG monoclonales de type I composées d'Ig avec seulement une classe ou sous-classe de chaînes lourdes et légères; il s'agit le plus souvent d'une IgM, occasionnellement IgG, rarement IgA ou de chaînes légères monoclonales. La concentration sérique est supérieure à 1 g/l, la fréquence est d'environ 20 % [Pechère-Bertschi et al, 1992a] et le précipité apparaît rapidement au froid. Ce précipité peut être un flocculat. Dans d'autres cas, il apparaît sous la forme d'un gel (cryogelglobuline) ou de cristaux (cryocristalloglobuline) [Kallemuchikkal et al, 1999] [Brouet et al, 1974].
- les CG mixtes de type II avec un constituant monoclonal qui sont composées d'Ig appartenant à deux classes différentes, l'une d'entre elle étant monoclonale. Le plus souvent, il s'agit d'une IgM qui a une activité de type FR (activité anticorps contre les portions Fc des IgG autologues), et qui est donc associée à des IgG polyclonales. Plus rarement, on peut observer des IgG ou des IgA monoclonales à activité anticorps, également associées à des IgG polyclonales. La concentration sérique est en général de moins d' 1 g/l et la fréquence est d'environ 10 % [Brouet et al, 1974].

- les CG mixtes de type III polyclonales qui sont composées d'Ig hétérogènes appartenant habituellement à deux classes (ou plus) différentes. L'association IgM et IgG polyclonales est la combinaison la plus fréquente. C'est dans ce groupe de cryoglobulinémies que l'on peut rencontrer d'autres protéines sériques, notamment certains constituants du complément ou des lipoprotéines. Dans certains cas, le C1q jouerait sans doute un rôle majeur dans la cryoprécipitation, car Stastny et Ziff ont montré que des IgG et la fraction C1q du complément isolés de CG composées d'un complexe IgM-IgG-C1q précipitent à froid en absence d'IgM [Stastny et al, 1969]. La concentration sérique est faible, souvent très inférieure à 1 g/l. C'est la forme la plus fréquente, elle représente environ 70 % des cryoglobulinémies [Brouet et al, 1974].

Mais, cette classification, toujours utilisée par la plupart des auteurs, apparaît aujourd'hui incomplète car elle est basée sur l'analyse par immunoélectrophorèse. En effet, en 1993, Romaszko et al. en utilisant la technique du Western-blot pour analyser les CG, ont pu détecter dans de nombreuses CG, un ensemble de fines bandes oligoclonales (entre 2 et 5), révélées le plus souvent par l'anti-IgM [Romasko et al, 1993]. Ne pouvant les classer ni dans le type II ni dans le type III, ils les ont regroupées dans une classe à part, baptisée provisoirement «CG à profil oligoclonal». Ces CG oligoclonales n'ont pas trouvé une place précise dans la classification immunochimique de CG. Incluses par certains auteurs dans le type III, qualifiées par d'autres de CG mixtes avec micro hétérogénéité, elles ont aussi été individualisées dans un «pré-type II», un «type II oligoclonal», ou encore un «type II-III». D'autres auteurs conservent le type I monoclonal et le type mixte III polyclonal, mais subdivisent le type mixte II en deux sous-groupes: le type IIa monoclonal et polyclonal et le type IIb oligoclonal et polyclonal [Le Carrer, 1998]. En effet, il apparaît logique de classer les CG oligoclonales dans le groupe des cryoglobulinémies mixtes dans la mesure où les Ig oligoclonales sont associées à des Ig polyclonales, et dans un type IIb situé entre le type IIa et le type III car elles constituent un stade immunochimique intermédiaire [Schifferli et al, 1994] (figure 2).

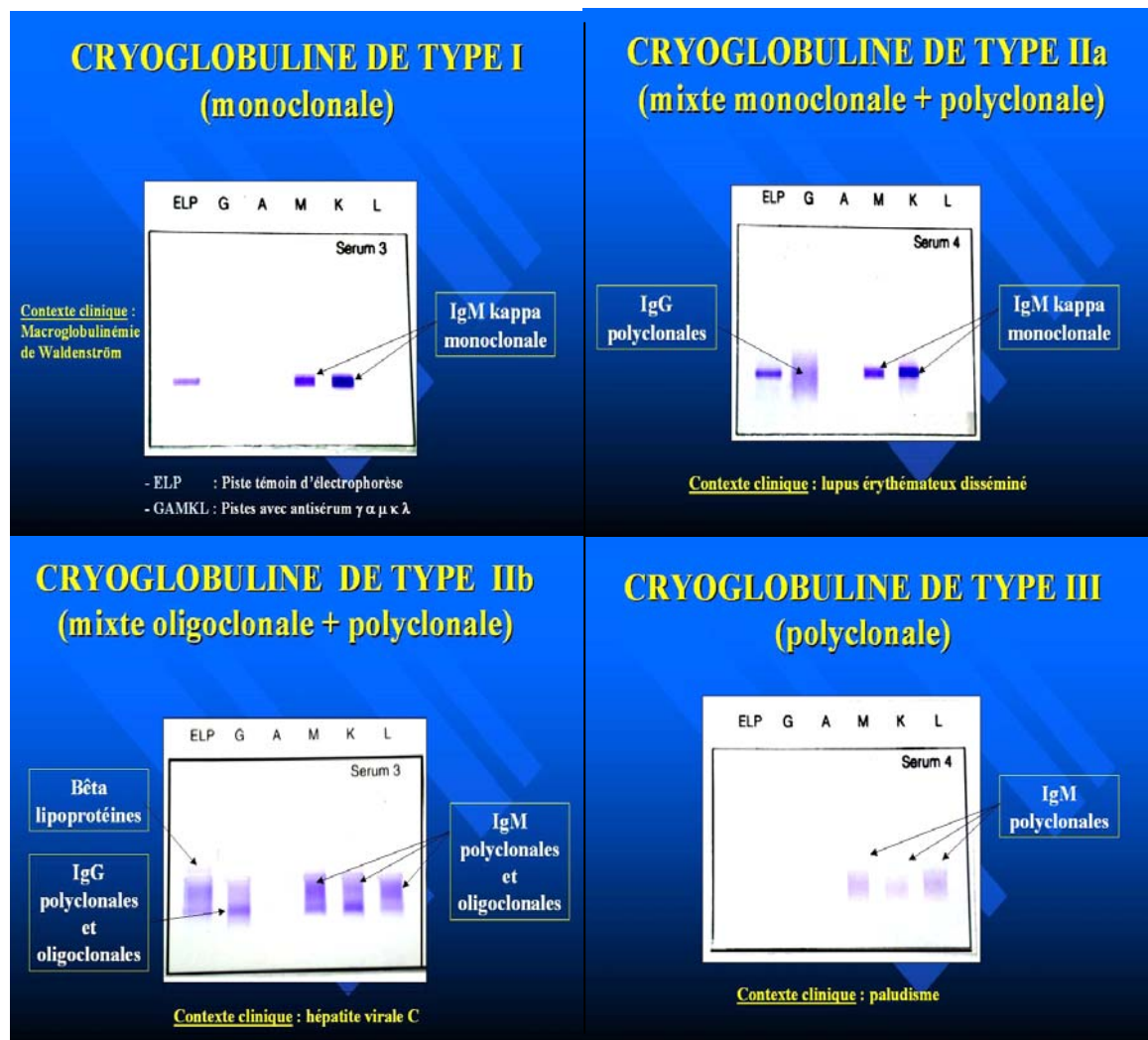


Figure 2 : Immunofixations des différents types de cryoglobulines

De plus, en 2004, Abdi et al ont observé une CG mixte constituée d'une IgA monoclonale de type kappa associée à une IgM biclonale de type kappa et lambda. Cette CG n'appartient donc à aucun type de la classification de Brouet. Il semble donc nécessaire de disposer d'une nouvelle classification immunochimique plus complète des CG [Abdi et al, 2004].

1.4 Manifestations cliniques

Les symptômes cliniques liés aux CG sont inconstants. Environ la moitié des CG monoclonales et 15 % des CG mixtes sont symptomatiques. Lorsqu'ils existent, les symptômes révélateurs sont essentiellement cliniques et constitués d'une atteinte cutanée

quasi-constante, fréquemment de troubles vasomoteurs, parfois de lésions neurologiques ou rénales. Ces manifestations sont pratiquement toujours liées aux troubles circulatoires vraisemblablement liés à la précipitation de la CG [Aucouturier et al, 2000].

1.4.1 Manifestations cutanées et vasomotrices

Le purpura vasculaire est le symptôme le plus fréquent, son incidence est de 88 à 100% [Pawlotsky, 2001]. Il survient volontiers au cours des périodes hivernales; il est souvent révélateur, non prurigineux, intermittent [Cacoub et al, 2000a]. Il atteint invariablement les extrémités inférieures, parfois le bas de l'abdomen, plus rarement les extrémités supérieures (figure 3). La face et le tronc sont toujours épargnés [Brouet, 1974]. Les lésions sont pétéchiales ou papulaires, évoluant parfois en livedo, hyperpigmentation et/ou ulcération (figure 4). Il s'agit histologiquement d'une vascularite leucocytoclasique. L'examen à l'immunofluorescence montre des dépôts d'Ig et de complément C3 [Pechère-Bertschi et al, 1992a]. Ce purpura peut s'associer à des macules érythémateuses et à des nodules dermiques pour former le trisymptôme de Gougerot. Les poussées purpuriques successives laissant une hyperpigmentation brunâtre séquellaire, peuvent être déclenchées par l'orthostatisme, les efforts prolongés, parfois par l'exposition au froid, plus rarement par un traumatisme, une infection ORL ou une prise médicamenteuse. Il n'existe aucune corrélation entre la température ambiante et les symptômes cutanés [Brouet et al, 1974] [Tribout et al, 1989] [Cacoub et al, 2000a].



Figure 3 : Purpura vasculaire pétéchial au niveau des chevilles



Figure 4 : Ulcère de jambe

La nécrose cutanée est une symptomatologie moins fréquente, retrouvée surtout dans les CG de type I; elle est distale, touche les régions péri-malléolaires, le nez, les doigts, les oreilles. Elle est en relation avec la vascularite ou parfois simplement rattachée à l'obstruction vasculaire par des masses amorphes de CG [Pechère-Bertschi et al, 1992a].

L'urticaire au froid est une éruption urticarienne systémique, d'évolution chronique, dont les plaques restent fixées au-delà de 24 heures, sans prurit, déclenchée par une baisse relative de la température extérieure et pouvant être reproduite par le test du glaçon sur l'avant-bras [Tribout et al, 1989] [Cacoub et al, 2000a].

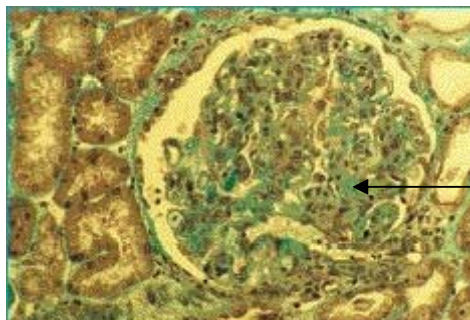
Le syndrome de Raynaud, classiquement bilatéral, et pouvant concerner les quatre membres, s'observe chez 10 à 35 % des patients [Pawlotsky, 2001]. Il est significativement plus fréquent avec les cryoglobulinémies de type I et plus sévère en cas de type I ou II. Il se complique parfois de nécrose douloureuse des extrémités lors de l'exposition au froid (9 %). Une acrocyanose touchant le nez et les oreilles est possible [Coppo et al, 2000].

Ces manifestations cutanées sont significativement plus fréquentes au cours des cryoglobulinémies mixtes associées à une infection par le VHC [Cacoub et al, 2000a]. Le purpura vasculaire et les légers symptômes vasomoteurs sont retrouvés plus souvent chez les patients possédant des cryoglobulinémies mixtes (type II ou III). Par contre, la nécrose cutanée, le purpura nécrotique et les phénomènes de Raynaud sévères sont caractéristiques des patients ayant une CG de type I ou II [Brouet et al, 1974].

D'un point de vue physiopathologique, au niveau des lésions vasculaires, l'accumulation locale de cellules mononucléées, mais également de cellules dendritiques et de lymphocytes T (en particulier CD8) suggèrent la participation de l'immunité cellulaire. L'activation des basophiles, indépendante des IgE, a parfois été suspectée dans les vascularites des CG mixtes. Parmi les facteurs plasmatiques, le C1q, qui se fixe in vitro sur la laminine, pourrait être responsable du dépôt et de la rétention de complexes immuns sur la membrane basale des vaisseaux [Aucouturier et al, 2000].

1.4.2 Manifestations rénales

Ce sont les atteintes vasculaires les plus fréquentes chez environ 25 % des patients [Nocente, 2003], de survenue tardive. Le plus souvent co-existent une protéinurie, une hématurie microscopique et une insuffisance rénale modérée ; parfois il s'agit d'un syndrome néphritique aigu, rarement d'une oligo-anurie. Dans 20 % des observations, il existe un syndrome néphrotique. L'hypertension artérielle est fréquente (85 % des cas), souvent sévère. L'atteinte rénale s'observe préférentiellement chez les patients qui ont une cryoglobulinémie de type II dont l'IgM Kappa est le composant monoclonal. Histologiquement, il s'agit dans 60 à 80 % des cas d'une glomérulonéphrite membrano-proliférative (GNMP) avec typiquement de nombreux dépôts PAS positifs intraluminaux. Il existe souvent une vascularite des vaisseaux de petit et moyen calibre, avec nécrose fibrinoïde de la paroi et infiltration périvasculaire monocytaire ainsi que de volumineux thrombi intraluminaux, amorphes et éosinophiles. En immunofluorescence, on note la présence de dépôts sous-endothéliaux et intraluminaux constitués principalement d'Ig identiques à celles du cryoprécipité, mais aussi du complément C3, C4 et du C1q ; seuls les dépôts sous-endothéliaux contiennent du C3 [Tribout et al, 1989] [Pechère-Bertschi et al, 1992a] [Clauvel, 1993] [Cacoub et al, 2000a] [Nocente et al, 2003] (figure 5).



Biopsie rénale : l'étude en immunofluorescence montre que les glomérules rénaux sont infiltrés de dépôts d'IgG et d'IgM identiques à celles présentes dans la cryoglobuline (en vert sur la photo)

Figure 5 : Glomérulonéphrite membrano-proliférative chez un patient ayant une cryoglobuline de type II

Au niveau des glomérules rénaux, les CI peuvent être piégés selon deux mécanismes distincts: l'accumulation endoluminale de la CG ou l'augmentation de la concentration de la CG par filtration glomérulaire. Dans tous les cas, ces CG fixées localement déclenchent l'accumulation endocapillaire de monocytes activés circulants. Ces cellules se comportent comme des cellules épuratrices mais aussi comme médiateur des lésions locales provoquant la libération d'enzymes lytiques et d'autres facteurs qui induisent la prolifération de cellules

résidentes. Il a également été noté une augmentation de l'activité pro-coagulante, à la fois dans les monocytes circulants et dans les monocytes infiltrant les tissus rénaux au cours des cryoglobulinémies de type II. D'autres hypothèses physiopathologiques ont été évoquées dans le développement des néphrites des cryoglobulinémies. Par exemple, la fibronectine pourrait faciliter la fibrose après transsudation du plasma. Des CI associés à la fibronectine et au C1q sont, en effet, capables d'interagir avec les fibroblastes comme un facteur de croissance et avec la laminine de la membrane basale [Aucouturier et al, 2000].

1.4.3 Manifestations articulaires

L'atteinte articulaire est satellite du purpura et se présente principalement sous forme d'arthralgies, plus rarement d'arthrites localisées dans 45 % des cas au niveau des genoux, des mains et des chevilles souvent oedématisées. Ces atteintes sont retrouvées chez 51 à 90 % des patients, intermittentes et souvent inaugurales [Pechère-Bertschi et al, 1992a] [Coppo et al, 2000] [Cacoub et al, 2000a] [Pawlotsky, 2001].

1.4.4 Manifestations neurologiques

La fréquence de l'atteinte neurologique périphérique varie de 2 à 69 % [Pawlotsky, 2001]. Elle peut réaliser plusieurs tableaux: une polyneuropathie symétrique sensitive ou sensitivo-motrice distale prédominant aux membres inférieurs chez deux tiers des patients, et une mononeuropathie multiple dans un tiers des cas.

L'atteinte commence toujours par des troubles sensitifs superficiels avec douleur et paresthésies asymétriques devenant secondairement symétriques. Une polyneuropathie périphérique sensitive doit inciter à rechercher une cryoglobulinémie, surtout lorsque s'y associe un purpura. Le déficit moteur est inconstant et peut être retardé de quelques mois à quelques années, s'installant progressivement, prédominant sur les loges antéro-externes des membres inférieurs, plutôt asymétrique. L'évolution est prolongée, lentement progressive avec une possibilité de stabilisation sur plusieurs années, parfois émaillée de rémissions ou d'exacerbations, éventuellement favorisées par l'exposition au froid. Une neuropathie asymétrique de survenue brutale et d'évolution subaiguë peut évoquer une multinévrite sévère.

L'atteinte du système nerveux central est exceptionnelle: convulsions, encéphalopathie avec coma, atteinte des nerfs crâniens, voire accident vasculaire cérébral [Cacoub et al, 2000a].

1.4.5 Autres manifestations

Elles sont beaucoup plus rares. L'atteinte hépatique est le plus souvent latente et peut se traduire par une hépatomégalie, une splénomégalie, une circulation veineuse collatérale voire des angiomes stellaires liés à une infection par le VHC.

La survenue d'un lymphome non hodgkinien (LNH) au cours des CG mixtes est connue. Au cours d'une CG mixte liée au VHC, le risque de survenue d'un LNH de type B peut atteindre 35 % à 10 ans de suivi sans qu'il y ait de génotype viral prédominant. Les principales caractéristiques cliniques de ces lymphomes sont une grande fréquence de sites extra-ganglionnaires (foie, parotide, estomac, cerveau, rate), des types histologiques assez variés avec toutefois une prédominance d'immunocytomes, de lymphomes diffus à grandes cellules et de lymphome de type MALT. Dans une étude canadienne, des anomalies de la moelle osseuse sont retrouvées dans 57% des sujets ayant une CG mixte liée au VHC dont 13% avec un véritable lymphome non hodgkinien totalement asymptomatique [Cohen, 1999].

L'atteinte pulmonaire est souvent asymptomatique, mais peut se manifester par une dyspnée d'effort modérée, une toux sèche, des épanchements pleuraux ou des hémoptysies, un syndrome interstitiel [Cacoub et al, 2000a].

L'atteinte cardiaque peut se manifester par une atteinte valvulaire mitrale, une péricardite, un infarctus myocardique par vascularite coronarienne, ou une insuffisance cardiaque congestive [Cacoub et al, 2000a] [Coppo et al, 2000].

La vascularite intestinale est relativement fréquente, responsable de douleurs et/ou d'hémorragies, parfois d'une nécrose intestinale [Clauvel, 1993] [Cacoub et al, 2000a] [Coppo et al, 2000].

L'atteinte oculaire se traduit par un courant granuleux vasculaire des conjonctives et/ou de la rétine. Une thrombose veineuse rétinienne est possible [Coppo et al, 2000].

Lorsque l'Ig monoclonale cryoprécipitante de type I est présente à un taux important, un syndrome d'hyperviscosité peut se développer, marqué essentiellement par des troubles neuro-sensoriels et des hémorragies au niveau des muqueuses [Clauvel, 1993] [Aucouturier et al, 2000] [Cacoub et al, 2000a] [Coppo et al, 2000].

Enfin, une fièvre inexplicée, associée ou non à une altération de l'état général, s'associe fréquemment au tableau de la maladie [Tribout et al, 1989] [Cacoub et al, 2000a].

1.5 Manifestations biologiques

La présence d'une CG peut être suspectée devant un certain nombre d'anomalies biologiques; ces anomalies peuvent s'observer lors de la réalisation de certains examens hématologiques ou biochimiques de routine, en particulier lorsque la température de précipitation de la CG est supérieure ou égale à la température ambiante du laboratoire.

1.5.1 Anomalies hématologiques

La vitesse de sédimentation (VS) est élevée à + 37°C, alors qu'elle est faussement normale à + 20°C si la cryoprécipitation survient dès la température ambiante [Coppo et al, 2000]. Les différences peuvent être très importantes, la VS étant parfois supérieure à 100 mm à la première heure à + 37°C alors qu'elle n'est que de 2 à 4 mm lorsqu'elle est réalisée à la température ambiante. Une pseudo-hyperleucocytose ou une pseudo-thrombocytose peuvent apparaître lors du comptage automatique à + 20°C, température entraînant la cryoprécipitation, alors que la numération globulaire est normale quand le comptage est fait à + 37°C ou lors d'un examen visuel. Cette perturbation de l'hémogramme est un phénomène rare, inconstant, observable avec les trois types de CG; il est détectable grâce à l'aspect particulier des histogrammes de distribution des volumes et à l'examen visuel du frottis sanguin [Zandecki et al, 1989] [Coppo et al, 2000].

Certaines IgM monoclonales entrant dans la composition des CG peuvent avoir une activité anticorps dirigée contre certains antigènes de la membrane des hématies (de type agglutinine froide à activité anti-I des hématies de l'adulte ou anti-i des hématies du fœtus et

du nourrisson par exemple). Les agglutinines froides sont rarement cryoprécipitables, excepté celles ayant une activité anti-I qui possèdent un caractère cryoglobulinique dans environ un tiers des cas [Zandecki et al, 1989].

En présence d'agglutinines froides, une auto-agglutination des globules rouges est notable sur lame, pouvant entraîner de fausses macrocytoses, des taux abaissés en hématies, des chiffres élevés ou impossibles de concentration corpusculaire moyenne en hémoglobine (CCMH) et des difficultés de typage sanguin; ces problèmes techniques sont évités en opérant à + 37°C.

1.5.2 Anomalies biochimiques et immunochimiques

Sur l'électrophorèse des protéines sériques, on peut observer une pseudo-hypoprotidémie avec fausse hypogammaglobulinémie lorsque la température de précipitation de la CG est élevée ou une zone des gammaglobulines faussement normale, avec un pic monoclonal minoré voire même non détecté. Cette anomalie biologique peut poser un problème par exemple, en cas de maladie de Waldenström dont l'IgM monoclonale est exclusivement cryoglobulinique et précipite à température ambiante. Dans ce cas, le pic monoclonal est absent et n'apparaît que si le sérum est analysé à + 37°C [Le Carrer, 1995].

Des anomalies du complément relativement spécifiques sont observées : une diminution des composants précoces (C1q, C2, C4) et du CH50, une concentration normale du C3 (mais en cas d'atteinte rénale une diminution modérée du C3 peut se voir), une augmentation des composants tardifs (C5 et C9) ainsi que du C1 inhibiteur. La précipitation éventuelle de la CG dans le caillot, lors de la coagulation du sang, à température ambiante, suivie de sa centrifugation, pourrait être responsable de la fixation des fractions précoces du complément sur le cryoprécipité [Le Carrer, 1995] [Cacoub et al, 2000a].

Les anomalies biologiques hépatiques sont extrêmement fréquentes au cours des cryoglobulinémies mixtes, avec une élévation des transaminases (alanine-aminotransférase (ALAT) et aspartate-aminotransférase (ASAT)) et des phosphatases alcalines chez 50 à 70 % des patients [Cacoub et al, 2000a].

Une activité FR est souvent liée à la présence, dans certaines cryoglobulinémies, d'une IgM à activité anti-IgG [Cacoub et al, 2000a]. Sa recherche est plus souvent positive par le test au latex que par le test de Waaler-Rose.

De nombreux autres anticorps dirigés contre des auto ou des exo-antigènes peuvent disparaître du sérum en raison de leur participation à la formation d'un complexe immun dans le cadre d'une CG mixte [Winfield, 1983].

1.6 Maladies associées

Les principales maladies associées à la présence d'une cryoglobulinémie sont les hémopathies malignes, les maladies auto-immunes et les maladies infectieuses.

1.6.1 Hémopathies malignes

Les plus fréquentes sont les hémopathies lymphocytaires (macroglobulinémie de Waldenström) et plasmocytaires. Selon les séries, 5 à 10 % des immunoglobulines monoclonales sont cryoprécipitantes. La CG n'est symptomatique que dans la moitié des observations environ. Dans la macroglobulinémie de Waldenström, la CG est monoclonale dans la moitié des cas, sinon elle est mixte (IgM K-IgG) constituant ainsi un modèle d'immunoglobulines monoclonales possédant une activité anticorps démontrée. La fréquence de cette activité anti-IgG des IgM monoclonales est du même ordre que celle de la spécificité anti-I, i (maladie chronique des agglutinines froides) [Brouet,1983].

L'existence d'une CG imprime une symptomatologie et une gravité particulière à l'hémopathie lymphoplasmocytaire. Dans 80 % des cas, ce sont les signes liés à la CG qui révèlent l'affection. Ainsi un purpura vasculaire s'observe dans les macroglobulinémies avec cryoglobulinémie IgM-IgG, mais également dans les myélomes où l'IgG a la même activité anticorps. Les néphropathies qui peuvent être observées, aggravent considérablement le pronostic [Brouet,1983].

D'autres hémopathies s'accompagnent avec une fréquence moindre de cryoglobulinémies monoclonales ou plus souvent mixtes polyclonales : leucémie lymphoïde chronique, sarcomatose, polyglobulie, splénomégalie myéloïde [Clauvel, 1979] [Brouet, 1983].

1.6.2 Maladies auto-immunes

Au cours de ces affections, une CG est fréquente, le plus souvent mixte IgM-IgG où l'IgM est polyclonale dans les 2/3 des cas, et de taux faible. Au cours des lupus érythémateux disséminés, la CG, riche en C1q, s'observe essentiellement lors des phases d'activité de la maladie. Elle peut participer à la néphropathie lupique ainsi que le démontre le dépôt sélectif de certains de ces constituants au niveau des glomérules rénaux. Près de 50 % des lupus avec atteinte glomérulaire, ont une CG de type III (IgM-IgG, IgM-IgG-C1q ou IgG-C1q). Dans le syndrome de Gougerot-Sjögren, une CG de type II est fréquente associée à des symptômes cutanés, des lésions glomérulaires ou neurologiques. Une CG est rare également dans la polyarthrite rhumatoïde [Clauvel, 1979] [Brouet, 1983].

Au cours des anémies hémolytiques auto-immunes, la présence d'une CG est rare, sauf lorsqu'il s'agit d'une maladie chronique des agglutinines froides dans laquelle l'IgM monoclonale a une activité anticorps contre un des antigènes du globule rouge (anti-I) [Clauvel, 1979].

1.6.3 Maladies infectieuses

De nombreuses infections, bactériennes, parasitaires ou virales peuvent s'accompagner de la présence d'une CG, souvent transitoire (tableau 1).

Proliférations lymphoïdes
– myélome – macroglobulinémie de Waldenström – maladie des agglutinines froides – lymphadénopathie angioimmunoblastique – leucémie lymphoïde chronique – lymphomes non hodgkiniens
Affections auto-immunes / maladies systémiques
– lupus érythémateux aigu disséminé – syndrome de Gougerot-Sjögren – polyarthrite rhumatoïde – périartérite noueuse – polymyosite – thyroidite – fibrose pulmonaire – maladie de Behçet
Infections
<i>Virales :</i> – virus d'Epstein-Barr – virus de l'hépatite C – virus de l'hépatite B – cytomégalo virus – VIH
<i>Bactériennes :</i> – endocardite subaiguë – fièvre Q – syphilis – lèpre – néphropathie post-streptococcique – court-circuit intestinal – maladie de Lyme
<i>Parasitaires :</i> – Kala-azar – paludisme – toxoplasmose – schistosomiase – échinococcose
Autres affections
– hépatiques (cirrhose) – néphropathies glomérulaires

Tableau 1 : Principales affections associées aux cryoglobulines [Coppo et al, 2000]

La présence d'une CG est surtout fréquente lors des bactériémies chroniques, et la réponse immunologique peut être associée à des symptômes dus à la présence de CI. Il en est ainsi :

- au cours des endocardites d'Osler à divers germes : la présence d'une CG y est quasi constante [Clauvel, 1979] ;
- lors des surinfections habituellement staphylococciques des shunts implantés pour le traitement des hydrocéphalies [Hurwitz et al, 1975] ;
- chez quelques patients ayant eu un court-circuit intestinal pour obésité : dans trois cas de patients ayant eu une arthrite aiguë existe une CG mixte avec différents composants du complément et dans ces cas, les IgG globulines de la CG ont une activité anticorps anti-*Escherichia coli* et anti-*Bacillus fragilis* [Wands et al, 1976] ;
- au cours d'autres infections chroniques : suppurations profondes avec atteinte glomérulaire, salmonellose chronique [Clauvel, 1979] ;
- et au cours des maladies suivantes : lèpre, syphilis primaire et secondaire, trypanosomiase [Clauvel, 1979].

La survenue d'une CG est souvent transitoire et de faible taux dans la plupart des cas, elle est habituellement durable et de taux significatif dans les infections par le virus de l'hépatite C (VHC). Il faut souligner que l'association d'une CG au virus de l'hépatite B (VHB) [Levo et al, 1977], longtemps surestimée, continue d'être rapportée mais selon une incidence nettement inférieure à celle observée avec le VHC [Galli, 1980] [Popp, 1980] [Garcia-Bragado, 1981] [Cacoub, 1994].

Suivant les techniques utilisées (ELISA de première ou deuxième génération, Polymerase Chain Reaction), 50 à 80 % des CM sont associées à une infection par le VHC. L'atteinte hépatique biologique est inconstante. Les CG de type II comportent le même marqueur du FR, l'idiotype WA. L'association d'acide ribonucléique du VHC avec des cryoglobulinémies «essentiels» de type II et avec des cryoglobulinémies dues à une

macroglobulinémie de Waldenström suggère que l'infection par ce virus puisse être le vecteur déclenchant de la production de FR dans ces deux conditions [Clauvel, 1993].

1.7 Exploration biologique d'une cryoglobuline

La qualité de l'exploration biologique d'une CG est directement liée au respect d'un protocole précis lors du prélèvement de sang ; le non respect de ces modalités peut être responsable de la perte en proportion variable de la CG (par cryoprécipitation dans le matériel de prélèvement et /ou au sein du caillot) ou même d'une recherche faussement négative [Le Carrer, 1995].

1.7.1 Conditions de prélèvement

L'étude correcte d'une cryoprotéine ne peut être envisagée que si l'on dispose d'un échantillon de sang prélevé dans des conditions spéciales ; les cryoprotéines étant susceptibles de précipiter à n'importe quelle température inférieure à + 37°C, il faut donc impérativement éviter cette précipitation tant que le sérum n'est pas décanté, sous peine de perdre le cryoprécipité par adsorption dans le caillot. C'est pour cette raison que le prélèvement doit être maintenu à + 37°C dès l'instant de la ponction veineuse jusqu'à la séparation complète du sérum et du plasma [Le Carrer, 1998].

Le prélèvement de sang (5 ml minimum) est effectué sur le sujet à jeun, les sérums troubles pouvant entraîner des erreurs d'interprétation (recherche faussement positive), dans un tube sans anticoagulant, à + 37°C, conservé à cette température le temps de la coagulation complète, puis centrifugé à + 37°C. Le sérum est alors décanté après centrifugation et placé au réfrigérateur à + 4°C (20). La recherche d'une CG peut être répétée à plusieurs jours d'intervalle dans la mesure où le phénomène de cryoprécipitation est parfois intermittent [Clauvel, 1979] (figure 6).

La recherche d'une CG doit toujours être pratiquée sur le sérum et non sur le plasma afin d'éviter l'interférence d'un éventuel fibrinogène cryoprécipitant [Le Carrer, 1998].

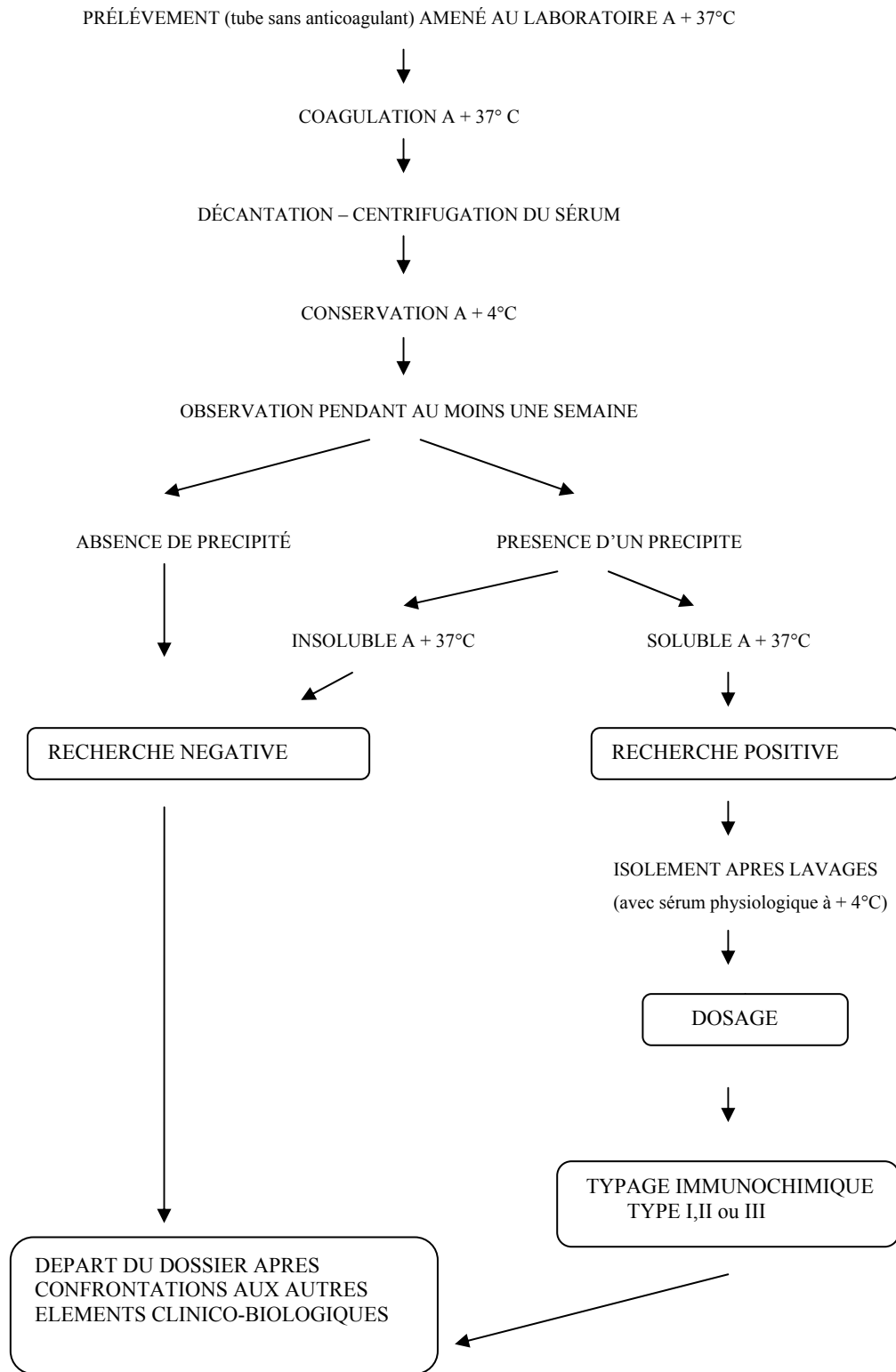


Figure 6 : Démarche à suivre pour la recherche et l'exploration biologique d'une cryoglobulinémie au laboratoire [Laplanche, 1992]

1.7.2 Mise en évidence

L'existence d'une CG se traduit par l'apparition plus ou moins rapide d'un précipité d'abondance et d'aspect variable (en flocons ou en aspect de « mie de pain » tombant au fond du tube ou gélification du sérum ou cristallisation). Le précipité se redissout par réchauffement à $+ 37^{\circ}\text{C}$. Un examen régulier des tubes pendant sept jours est nécessaire en raison de la cinétique parfois longue de la cryoprécipitation (en particulier pour les CG mixtes de type II mais surtout de type III). La redissolution à 37°C caractérise la CG et doit être impérativement vérifié avant d'envisager les étapes ultérieures de purification.

Si aucun précipité n'est apparu au fond du tube après un délai d'une semaine à $+ 4^{\circ}\text{C}$, la recherche de CG est négative.

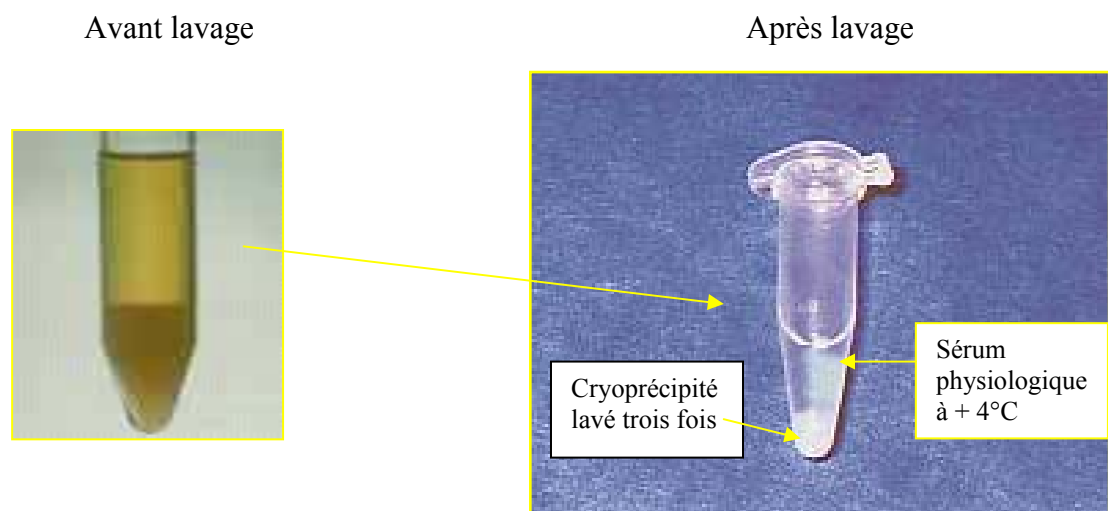


Figure 7 : Mise en évidence de la cryoglobuline

1.7.3 Analyse quantitative

L'analyse quantitative d'une CG consiste à doser les protéines présentes dans le cryoprécipité isolé et lavé. Il faut savoir que chaque lavage s'accompagne d'une perte minime de protéines par le simple fait de la dilution et peut-être aussi de la modification du milieu environnant (perte de facteurs favorisant la précipitation à froid) ; de plus, certaines CG ne se

redissolvent que partiellement après leur séparation du sérum [Le Carrer, 1998] [Kallemuchikkal et al, 1999].

Une étape de purification préalable à l'identification de la CG est nécessaire. Ce contrôle s'effectue par une technique électrophorétique avec une bonne sensibilité. Si la CG est correctement isolée et lavée, seule la zone des gammaglobulines sera colorée, avec une absence de bande d'albumine. En pratique, ce contrôle est fait indirectement en regardant la piste « témoin » de l'immunofixation (absence d'albumine).

Plusieurs méthodes de dosage existent :

- la détermination du cryocrite qui est imprécise pour les faibles concentrations.
- la détermination indirecte du dosage de la CG à partir des dosages différentiels (protides totaux et/ ou Ig). Ils sont effectués sur le sérum à + 37°C et sur le sérum surnageant à + 4°C après précipitation de la CG. Toutefois, ils n'échappent pas aux aléas de la technique mise en œuvre, ce qui est notamment le cas des dosages immunonéphélométriques de sérums contenant des Ig monoclonales et/ ou de complexes immuns circulants.
- le dosage par mesure de l'absorbance des noyaux aromatiques. Une fraction du précipité purifié est dilué dans une solution de soude 0,1M et son absorbance est lue à 280 nm. Les résultats sont exprimés en g/L de sérum, par rapport à une gamme d'étalonnage (préparation de gammaglobulines humaines purifiées). L'inconvénient de cette méthode est l'absence de standardisation (en effet, chaque laboratoire a sa propre méthode de dosage des protéines de la solution permettant d'établir la gamme d'étalonnage) [Laplanche et al, 1992] [Le Carrer, 1998].
- le dosage des protéines en faible concentration par une méthode colorimétrique, dérivée de la méthode du biuret inverse de Matsushita et coll, utilisant une réaction « biuret-like ». Dans cette méthode, la coloration appréciée à 485 nm est inversement proportionnelle à la concentration en protéines ; la variabilité inter-protéines est très faible et il est possible de doser avec précision aussi bien une protéine pure qu'un mélange de protéines comme les

Ig constituant par exemple un cryoprécipité. Cette méthode est simple et sensible [Le Carrer, 1998].

- le dosage par le bleu de Coomassie modifié (Total protein test kit- Biorad) [Macart et al, 1982]. Cette technique est celle utilisée actuellement au laboratoire.

1.7.4 Analyse qualitative

La sensibilité de la technique utilisée, sa praticabilité et la qualité de l'image obtenue sont les critères qui conditionnent le choix d'une méthode d'analyse qualitative des CG. Cette analyse est effectuée sur le cryoprécipité isolé, après plusieurs lavages successifs avec du sérum physiologique à + 4°C (afin d'éliminer l'ensemble des autres protéines sériques), les centrifugations sont réalisées dans une centrifugeuse maintenue à + 4°C. Toutefois, le principal écueil pour cette étape d'identification reste, quelle que soit la méthodologie employée, la précipitation de la CG dans le gel, en raison d'une température de dépôt et/ ou de migration inférieure à + 37°C, de la présence de CIC ou d'une dépolymérisation insuffisante des IgM [Laplanche et al, 1992].

1.7.4.1 Immunoélectrophorèse

Cette technique a été décrite par Grabar et Williams puis modifiée en microméthode par Scheidegger. Cette méthode est peu sensible et mal adaptée à l'analyse des CG en faible concentration et /ou de composition complexe. Elle différencie difficilement le caractère polyclonal ou monoclonal des Ig dans les CG mixtes et ne permet pas la mise en évidence des Ig oligoclonales éventuellement présentes dans un cryoprécipité [Le Carrer, 1998]. La présence de certaines protéines du sérum associées aux CG mixtes entrave l'interprétation des résultats par immunoélectrophorèse. Ces protéines, de haut poids moléculaire ou présentes sous forme complexée, ne sont pas éliminées lors des lavages successifs. Elles migrent à la même distance sur toutes les électrophorèses, sans tenir compte de l'anti-sérum utilisé. Ces protéines seraient la fraction C3 du complément et la fibronectine [Musset et al, 1992].

1.7.4.2 Immunoempreinte

A l'inverse, l'immunoempreinte (Western-blot) est la technique de choix pour le typage des CG après une séparation électrophorétique. Elle utilise un transfert sur membrane de nitrocellulose suivi d'une révélation par des anticorps marqués. Elle apparaît comme étant la technique la plus sensible (20 mg/l environ) et la plus spécifique mais elle est longue, la rendant difficilement applicable en pratique courante [Musset et al, 1992] [Le Carrer, 1998].

1.7.4.3 Immunofixation

Elle a été décrite par Alper et Johnson en 1969 et adaptée à l'étude des Ig par Ritchie et Smith en 1985 [Alper et al, 1969] [Ritchie et al, 1985]. L'immunofixation est la méthode de choix pour avoir une juste appréciation du typage de la CG. Bien que les résultats soient corrélés avec ceux obtenus par immunoélectrophorèse, l'immunofixation est plus rapide et plus facile à interpréter. Sa sensibilité permet la détection de petites quantités de protéines monoclonales dans le sérum et est particulièrement utile pour classer les Ig monoclonales dans les CG de type I ou II [Kallemuchikkal et al, 1999]. En effet, le dépôt des anti-sérums directement sur la plage de migration limite les phénomènes de diffusion. De plus, la présence d'une Ig monoclonale est mieux visualisée sous forme d'une bande étroite révélée, au même niveau de séparation électrophorétique, à la fois avec un anti-sérum anti-chaînes lourdes et légères d'Ig. Dans ces conditions, le seuil de détection d'un constituant monoclonal est de l'ordre de 0,5 g/L [Laplanche et al, 1992]. La détection des Ig oligoclonales est possible en immunofixation et en immunoempreinte mais pas en immunoélectrophorèse (mal adaptée).

1.8 Traitement des cryoglobulines

La surveillance, le pronostic et le traitement des cryoglobulinémies tiennent compte à la fois de la nature et de la fréquence des accidents liés à la CG et d'une éventuelle affection associée.

Chez certains patients, les CG peuvent refléter l'évolutivité de la maladie, alors que présentes chez d'autres (sans être apparemment responsables de la maladie clinique), une surveillance étroite n'est pas nécessaire.

1.8.1 Surveillance

Le suivi du malade dépend de l'affection sous-jacente aussi bien que du type de la CG. Les principaux éléments de surveillance d'une CG sont la détermination régulière de son taux et l'évaluation de la fonction rénale, en raison de la fréquence des maladies néphrologiques associées.

Si le complément est abaissé au moment du diagnostic, sa détermination répétée peut être utilisée pour surveiller l'efficacité du traitement instauré. Enfin, l'administration de médicaments cytotoxiques nécessitera un contrôle régulier de la formule sanguine ainsi que d'un bilan rénal en raison d'éventuels effets secondaires d'origine iatrogène [Le Carrer, 1995].

1.8.2 Traitement

1.8.2.1 Traitement étiologique

Le traitement initial d'une CG dépend de son étiologie, lorsque celle-ci est connue. La diminution du taux ou l'éventuelle disparition de la CG est donc directement liée à l'efficacité de la thérapeutique instaurée lorsqu'il existe une affection néoplasique, lympho-proliférative, infectieuse ou auto-immune sous-jacente [Le Carrer, 1998].

Dans les cryoglobulinémies mixtes associées à l'hépatite C, l'efficacité de l'interféron α est liée à son action anti-virale (en inhibant la réplication virale) et à ses propriétés immunomodulatrices sur les cellules lymphoïdes B et non à une action directe sur la CG [Musset et al, 1996].

1.8.2.2 Traitement symptomatique

Dans les formes mineures, le traitement repose sur l'absence d'exposition au froid, l'éradication des foyers infectieux, le repos en cas de poussée purpurique, les antalgiques voire les anti-inflammatoires non stéroïdiens en cas d'arthralgie ou d'arthrite [Tribout et al, 1989]. Les thérapeutiques vasodilatatrices modernes, en particulier la prostacycline

(Iloprost®), en association avec les antiagrégants plaquettaires ou les anticoagulants, sont utilisées en cas de lésions ischémiques distales [Cacoub et al, 2000a].

Les épisodes aigus de cryoglobulinémie, habituellement dus à des CI, sont traités par corticothérapie. Dans les formes sévères ou invalidantes, les plasmaphérèses ou les échanges plasmatiques en atmosphère chaude à + 37°C, permettent de diminuer le taux des CG circulantes et se révèlent efficaces dès les premières semaines, mais leur efficacité est souvent transitoire ; ils sont souvent associés à une corticothérapie et aux immunosuppresseurs [Clauvel, 1993].

2 L'HEPATITE C

2.1 Caractéristiques du virus de l'hépatite C (VHC)

Le virus de l'hépatite C, principal agent des hépatites non-A, non-B a été identifié en 1989 par Choo et al. Par des techniques de biologie moléculaire [Choo et al, 1989]. Ce virus appartient à la famille des *Flaviviridae*. C'est un virus enveloppé, d'une taille comprise entre 50 et 60 nm, dont le génome est un simple brin d'ARN d'environ 9.5 kb.

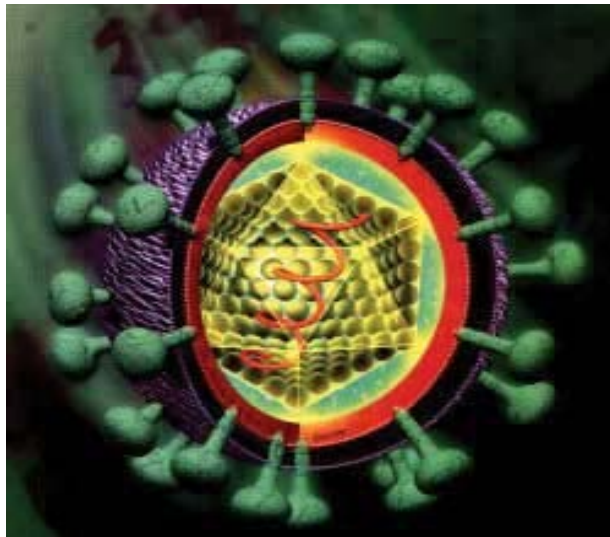


Figure 8 : Virus de l'hépatite C

2.1.1 Organisation génomique

L'organisation génomique du virus comporte des gènes dits structuraux situés dans la région 5' :

- le gène C codant pour la protéine C de la capside
- les gènes E1 et E2/NS1 codant pour les glycoprotéines de l'enveloppe E1 et E2

et des gènes non structuraux :

- le gène NS2 codant pour une protéine inconnue

- le gène NS3 codant pour la protéine NS3 contenant une hélicase, qui interviendrait dans la réplication de l'ARN génomique, et une protéase
- le gène NS4 codant pour une protéine intervenant dans la maturation
- le gène NS5 codant pour une ARN polymérase ARN dépendante [Liang et al, 2000].

2.1.2 Variabilité génomique

Il existerait six génotypes majeurs et plus de quatre-vingts sous-types de virus différents. Les génotypes les plus communs aux Etats-Unis et en Europe de l'Ouest sont les génotypes 1a et 1b. Les génotypes 1b, 2a et 2b sont communs au Japon et à Taiwan ; le génotype 3 est retrouvé en Thaïlande, dans le Nord de l'Europe et en Australie ; le génotype 4 prédomine dans le Moyen-Orient ; le génotype 5 est répandu en Afrique du Sud et le génotype 6 a été rapporté à Hong Kong [Bentolila et al, 1994].

2.2 Epidémiologie

Le VHC a infecté 170 millions de personnes dans le monde essentiellement en Afrique et en Asie du Sud-Est. Dans les pays industrialisés, la prévalence varie entre 0,2 et 2 %. Elle est plus élevée en Europe du Sud et de l'Est qu'en Europe de l'Ouest [Germi et al, 2001]. Aux Etats Unis, les anticorps dirigés contre le VHC sont détectés chez 1,4 % de la population générale. En France, la prévalence est estimée entre 1,1 et 1,2 %. Quatre-vingt pour cent des sujets étant virémiques, il a été estimé que 400 à 500 000 personnes avaient une infection chronique par le VHC en France. De grandes différences peuvent cependant être notées selon les populations étudiées. En France, la prévalence de l'infection par le VHC est de 60 % environ chez les usagers de drogue intraveineuse. Elle serait d'environ 25 % chez les sujets infectés par le virus de l'immunodéficience humaine (VIH), et 25 000 à 30 000 sujets auraient ainsi une co-infection VHC-VIH [Conférence de Consensus, Traitement de l'hépatite C, 2002].

2.3 Pathogénèse du VHC

L'adsorption du virus sur les cellules cibles lui permet ensuite de pénétrer dans la cellule. Cet événement précoce initie l'infection en fixant sur ses récepteurs spécifiques le virus, ce qui aboutit au relargage de son ARN dans le cytoplasme. Cette étape initiale est un déterminant majeur du tropisme cellulaire et un point critique pour la pathogénie virale. L'étude de l'interaction initiale entre les protéines virales et les récepteurs de la cellule hôte est importante pour la mise au point de substances capables de bloquer cette interaction, et de fait pour le développement d'une nouvelle approche thérapeutique anti-VHC [Germi et al, 2001].

2.4 Modes de transmission

Le VHC est essentiellement transmis par voie sanguine. Le risque transfusionnel a presque complètement disparu depuis le début des années 1990 du fait du dépistage systématique des donneurs et des mesures d'inactivation virale. Actuellement, la toxicomanie intraveineuse est la principale source de contamination. Le risque nosocomial au cours des actes chirurgicaux ou d'exploration invasive, d'hémodialyse, de soins divers, d'acupuncture ou de mésothérapie, est maintenant considérablement réduit par les précautions d'hygiène et l'utilisation de matériel à usage unique. La transmission sexuelle est rare. Le risque de transmission mère-enfant est estimé à 6 %. Il augmente si la charge virale maternelle est élevée et en cas de co-infection VHC-VIH. Le risque de transmission par accident d'exposition au sang varie selon les conditions entre 2 et 10 % [Trepo et al, 2001]. La transmission professionnelle est peu fréquente (3 à 5 %).

2.5 Manifestations clinico-biologiques

2.5.1 Atteinte hépatique

Lors de la primo-infection, il est assez rare d'observer une hépatite aiguë ictérique ou sub-ictérique. Dans la majorité des cas, la phase initiale ou aiguë de l'hépatite C est

asymptomatique, mais elle peut s'accompagner de symptômes tels que fatigue, fièvre, courbatures, maux de tête qui sont le résultat de la réaction immunitaire. Une fois la maladie installée, environ un quart des patients guérissent spontanément. Dans la majorité des cas, se développe une infection chronique caractérisée par la persistance de la réplication virale et par une évolution très variable. Plus d'un tiers des sujets ont des lésions hépatiques discrètes sans perturbations fonctionnelles, dont le pronostic est favorable. En revanche, environ 20 % des patients infectés évoluent vers la cirrhose en 10 à 30 ans. Parmi eux, 2 à 4 % présenteront un hépato-carcinome. La consommation d'alcool et la co-infection VHC-VHB (virus de l'hépatite B) augmente le risque de progression vers la cirrhose. Entre ces deux extrêmes, il existe des lésions d'hépatite minime qui n'exigent pas de traitement en général, mais une surveillance régulière [Trepo et al, 2001].

Lors d'une hépatite, on observe une augmentation des transaminases. Une biopsie hépatique est réalisée pour apprécier la sévérité de l'hépatopathie et déterminer les modalités thérapeutiques.

La fibrose s'exprime par des scores : il en existe deux : score KNOPELL et score METAVIR. Le premier est plutôt général, le deuxième est plus spécifique pour la fibrose hépatique en cas de l'hépatite C.

Le score de KNOPELL va de 0 à 22 et plus ce score est élevé, plus la fibrose et l'activité inflammatoire sont importantes [Knodell et al, 1981]. C'est le score qu'on trouve dans la majorité des études publiées sur l'hépatite C.

score	définition de fibrose	score	définition
inflammatoire			
0 à 10	nécrose péri portale	0	absence de fibrose
0 à 4	nécrose localisée et dégénérescence intralobulaire	1	fibrose portale
0 à 4	inflammation portale	3	fibrose septale
		4	cirrhose

Tableau 2 : Classification selon KNOPELL

Le deuxième score utilisé est le score METAVIR. Il est employé pour évaluer la gravité d'une hépatite. Il associe deux chiffres. Le premier repéré par la lettre A (Activité) est échelonné de 0 à 3. Il traduit l'activité de l'hépatite, (inflammation et nécrose) donc son évolutivité. Le second repéré par la lettre F caractérise le retentissement fibreux de l'hépatite (séquelles sur les tissus hépatiques). Il est gradué de 0 (pas de fibrose) à 4 (présence d'une cirrhose).

Activité	définition	fibrose	définition
A0	absence d'activité	F0	absence de fibrose
A1	activité minime	F1	fibrose portale sans septa
A2	activité modérée	F2	fibrose portale avec quelques septas
A3	activité importante	F3	fibrose portale avec nombreux septa sans cirrhose
		F4	cirrhose

Tableau 3 : Classification selon METAVIR

2.5.2 Atteinte des glandes salivaires

L'association d'un syndrome sec oculaire ou buccal est connue au cours des CG mixtes liées ou non au VHC. Sa fréquence varie de 0 à 57 %. La prévalence de l'infection par le VHC chez des sujets atteints du syndrome de Gougerot-Sjögren est de 0 à 47 % [Cohen, 1999].

2.5.3 Atteintes rhumatologiques

La fréquence de ces manifestations articulaires au cours du VHC est évaluée à 6 %. Il s'agit surtout d'arthralgies, de myalgies, d'une mono ou une polyarthrite chronique atypique non déformante. Ces manifestations peuvent être en rapport avec la présence d'une CG. Parfois, il s'agit d'un tableau clinique évoquant une polyarthrite rhumatoïde [Kochbati et al, 2001].

2.5.4 Atteintes rénales

Une glomérulonéphrite a été décrite pour la première fois en 1990 par Pascual chez des patients ayant également une CG [Pascual, 1990]. Elle se présente sous la forme d'une glomérulonéphrite membrano-prolifératrice (GNMP) et se manifeste par une hypertension artérielle, une protéinurie qui peut être très abondante, une hématurie microscopique, rarement une insuffisance rénale. Les fractions C3 et C4 du complément sont abaissées. Pour certains auteurs, la GNMP serait rarement associée au VHC en absence de CG suggérant un rôle essentiel des IgM à activité rhumatoïde [Durand et al, 1997].

Un autre argument en faveur d'une relation entre GNMP et VHC est apporté par l'observation de Brunkhorst et al qui rapporte un cas de récurrence de la glomérulonéphrite après transplantation rénale chez un patient infecté par le VHC [Brunkhorst et al, 1996].

La relation entre VHC et GNMP est certes étroite mais différentes inconnues persistent concernant la nature de l'antigène, la composition des CIC ou dépôts, le rôle de certains génotypes [Kochbati et al, 2001].

2.5.5 Atteintes cutanées

Le lichen plan est une dermatose prurigineuse qui fait intervenir une réaction lymphocytotoxique dirigée contre les cellules basales de l'épiderme. Sa prévalence au cours du VHC varie entre 28 et 38 % selon les études (Italie et Japon). Mais cette association n'a pas été démontrée en Europe du Nord et aux Etats-Unis [Duclos-Vallée, 2002].

La porphyrie tardive cutanée (PTC) est une affection rare liée à un déficit enzymatique en uroporphyrinogène décarboxylase. Les perturbations du bilan hépatique sont très fréquentes au cours des PTC. La fréquence du VHC dans les PTC varie de 10 à 91 % [Cohen, 1999]. Dans la majorité des hépatites C chroniques, c'est une PTC sporadique. Le rôle de l'infection par le VHC dans les PTC est inconnu.

D'autres manifestations cutanées telles qu'urticaire, érythème polymorphe sont rapportées de façon ponctuelle au cours d'une hépatite C.

2.5.6 *Atteintes endocriniennes*

Une prévalence élevée d'anomalies thyroïdiennes (hypothyroïdie, hyperthyroïdie, présence d'auto-anticorps anti-thyroglobuline, anti-thyroperoxydase) a été décrite chez des patients atteints par le VHC. Cette prévalence est toutefois variable entre 5 et 30 % selon les études [Duclos-Vallée, 1992] [Lunel, 1999]. Il est donc nécessaire de faire un bilan thyroïdien avant tout traitement. Le rôle du VHC n'est pas prouvé [Duclos-Vallée, 2002].

2.5.7 *Atteintes hématologiques*

La recherche d'anticorps anti-VHC ou de l'ARN viral par PCR chez des patients atteints d'aplasie médullaire s'est révélée positive chez 36 % des patients [Kochbati et al, 2001].

Le risque de survenue d'un lymphome malin non hodgkinien de type B peut atteindre 35 % à 10 ans de survie. L'association entre LNH et VHC a été rapportée chez des patients avec ou sans CG. Cette association a été essentiellement observée dans des populations à forte endémie d'infection par le VHC (Italie du Sud) ; par contre elle n'est pas établie pour les pays à faible endémie comme la France [Cohen, 1999].

2.5.8 *Cryoglobulines*

Environ 50 % des porteurs symptomatiques d'une CG sont porteurs d'anticorps anti-VHC ; environ 50 % des sujets atteints par le VHC sont porteurs d'une CG. Elle est mixte de type II dans 1/3 des cas et de type III dans les autres cas. Les manifestations cliniques dues à la CG ne se présentent que dans 10 à 25 % des cas avec notamment des manifestations cutanées (purpura, syndrome de Raynaud) et des manifestations rhumatologiques (50 à 80 %). L'insuffisance rénale et les vascularites sont plus rares (17 et 11%) [Kochbati et al, 2001].

2.5.9 Auto-anticorps sériques

La prévalence de certains auto-anticorps sériques est élevée chez les malades atteints d'hépatite chronique C. Les auto-anticorps anti-nucléaires et les auto-anticorps anti-muscle lisse sont détectés dans 5 à 20 % des cas [Lunel, 1994a] [Pawlotsky et al, 1994]. La signification de leur présence n'est pas connue.

2.5.10 Atteintes biologiques

Le taux des transaminases (ALAT et ASAT) fluctue entre des valeurs élevées et normales, ces périodes pouvant être séparées de plusieurs semaines voire plusieurs mois. En cas d'ictère, on note une cholestase biologique avec une augmentation des phosphatases alcalines, de la gammaglutamyltranspeptidase et de la bilirubinémie. Au stade chronique, peut s'associer une hyper gammaglobulinémie et en cas d'insuffisance hépatocellulaire, une diminution du taux de prothrombine, des facteurs de la coagulation et une hypoalbuminémie et du fait de l'hypersplénisme, une neutropénie et une thrombopénie.

2.6 Mise en évidence d'une infection par le VHC

Il existe trois types de méthode de diagnostic de l'infection par le VHC :

- des méthodes sérologiques détectant des anticorps spécifiquement dirigés contre des antigènes du VHC ;
- des méthodes détectant et quantifiant ces antigènes ;
- des méthodes de biologie moléculaire détectant et quantifiant les génomes du VHC et analysant leurs séquences.

La mise en évidence des anticorps dirigés contre le VHC dans le plasma ou le sérum est basée par l'utilisation de EIA (*enzyme immunoassay*). La présence d'anticorps anti-VHC est révélée par des anticorps anti-IgG associés à une enzyme qui catalyse la transformation d'un substrat en un composé coloré dont on mesure la densité optique. La densité optique obtenue est proportionnelle à la quantité présente dans l'échantillon. Les techniques EIA de

seconde génération détectent les anticorps dirigés contre les protéines structurales (capside) ou non structurales du virus (NS3 et NS4). Les techniques EIA de troisième génération détectent les mêmes anticorps avec une meilleure sensibilité, ainsi que les anticorps dirigés contre la protéine NS5. La technique RIBA (*radio immunoblotting assay*) est une technique de confirmation des résultats obtenus par EIA pour éviter des faux positifs. Les anticorps apparaissent 6 à 8 semaines après la contamination et persistent quasi indéfiniment [Pawlotsky, 1999].

La mise en évidence de la réplication virale (détection de l'ARN du virus) s'effectue par la technique de PCR (*polymerase chain reaction*) qualitative. En cas d'infection aiguë, la PCR est positive 2 à 3 semaines après l'infection. La mesure de la charge virale est réalisée par PCR quantitative ou par la technique de l'ADN branché [Bentolila et al, 1994] [Pawlotsky, 1999] [Trepo et al, 2001].

Des EIA ont récemment été développées pour la détection et la quantification des antigènes de l'enveloppe du VHC. Cependant aucun d'entre eux n'est commercialisé dans un format standard [Pawlotsky, 1999].

La méthode de référence pour le génotypage du VHC est l'analyse de la séquence génomique. Deux techniques sont utilisables : technique de biologie moléculaire (génotypage) ou technique sérologique (sérotypage). Le sérotypage est basé sur la détection des anticorps dirigés directement contre les épitopes spécifiques du génotype du VHC [Pawlotsky, 1999].

2.7 Traitement

Le traitement s'adresse aux malades adultes atteints d'une infection chronique par le VHC authentifiée par la présence de l'ARN viral dans le sérum. L'objectif premier du traitement est l'éradication du virus, permettant la guérison de l'infection. L'autre objectif est de prévenir, stabiliser voire faire régresser les lésions hépatiques.

2.7.1 Examens à effectuer avant un traitement

2.7.1.1 L'enquête clinique

Elle recense les informations suivantes : âge, sexe, contexte socio-familial, antécédents personnels, date et mode présumés de contamination, conduite addictive ancienne ou actuelle, traitements en cours, statut vaccinal vis à vis des virus des hépatites A et B. Elle recherche également des signes extra-hépatiques (asthénie, arthralgies, signes cutanés, vascularite, hypothyroïdie, hyperthyroïdie) éventuellement liés à l'infection virale C, des signes de cirrhose (hépatomégalie, insuffisance hépatocellulaire) et des éléments en faveur d'une co-morbidité (index de masse corporelle élevé, signes d'imprégnation alcoolique) [Conférence de consensus, traitement de l'hépatite C, 2002].

2.7.1.2 Bilan décisionnel

Un *bilan biologique* comprenant des tests hépatiques (transaminases, gammaglutamyltranspeptidase, phosphatases alcalines...), une électrophorèse des protéines pour la recherche d'une hypergammaglobulinémie et un hémogramme est effectué.

La *détermination du génotype viral* est indispensable car il conditionne les indications du traitement et la stratégie thérapeutique.

La *charge virale* déterminée par technique moléculaire est prédictive de la réponse au traitement.

La *recherche d'une co-morbidité* doit inclure une sérologie VIH, VHB, un dosage de la TSH (thyroid stimulating hormone), une recherche d'auto-anticorps antithyropéroxydase, une recherche d'auto-anticorps antinucléaires, anti-muscle lisse, anti-LKM1, une créatininémie, une protéinurie, une glycémie et un bilan lipidique, une ferritinémie.

Une *échographie abdominale* est effectuée pour étudier le parenchyme hépatique et rechercher des signes d'hypertension portale.

Une *ponction biopsie hépatique* permet d'établir le bilan lésionnel.

La *recherche de contre-indications à l'interféron (IFN) et à la ribavirine* comprenant la recherche d'une grossesse, un électrocardiogramme en cas de cardiopathie connue, un examen ophtalmique, un avis psychiatrique [Conférence de consensus, traitement de l'hépatite C, 2002].

2.7.2 *Traitement antiviral*

2.7.2.1 **Traitement de référence : IFN PEG + ribavirine en bithérapie**

Il existe deux IFN PEG : α -2a (Pégasys®) et α -2b (ViraféronPeg®). La ribavirine (Rébétol®) est un antiviral à large spectre qui a un effet d'inhibition de l'ARN polymérase virale. Elle aurait aussi une action immunomodulatrice. Les schémas thérapeutiques les plus efficaces par rapport à la bithérapie standard sont :

- IFN PEG α -2b (1.5 μ g/kg/sem) + ribavirine (800 mg/j) ;
- IFN PEG α -2a (180 μ g/sem) + ribavirine (1000 à 1200 mg/j selon le poids).

2.7.2.2 **Autres schémas thérapeutiques**

2.7.2.2.1 **IFN PEG en monothérapie**

La posologie est pour l'IFN PEG α -2a de 180 μ g/sem et pour l'IFN α -2b de 1 μ g/kg/sem. La durée dépend des indications. Ce schéma s'applique en cas de contre-indications à la ribavirine et en tant que traitement d'entretien pour ralentir la progression de la fibrose en cas de non-réponse virologique.

2.7.2.2.2 **IFN standard en monothérapie**

Ce schéma s'applique aux primo-infections par le VHC. La posologie sera alors soit IFN 5 MU/j pendant 4 semaines, puis 5 MU 3 fois par semaine pendant 20 semaines ; soit IFN 10 MU/j jusqu'à la normalisation des transaminases.

2.7.2.2.3 **Autres schémas**

D'autres schémas tels que la ribavirine en monothérapie peuvent être discutés s'il existe une intolérance à l'IFN ou des associations de ribavirine, d'amantadine et du mycophénolate à l'IFN PEG dans le cas des patients non-répondeurs ou rechuteurs.

2.7.3 Transplantation hépatique

Elle est indiquée soit en cas de cirrhose décompensée, soit en cas de carcinome hépatocellulaire. Une ré-infection du greffon survient dans la quasi-totalité des cas [Conférence de consensus, traitement de l'hépatite C, 2002].

2.7.4 Facteurs influençant la réponse au traitement

2.7.4.1 L'alcool

L'alcool agit à différents niveaux : sur la réplication virale, le risque de lésions hépatocellulaires, le développement de complications, en particulier la fibrose et la cirrhose et les traitements antiviraux. L'efficacité du traitement, son observance et sa tolérance sont diminuées. Il est donc conseillé de réduire ou d'arrêter sa consommation [Larrey, 2002].

2.7.4.2 L'excès de poids

L'obésité est souvent associée à une stéatose et moins fréquemment à une stéatohépatite non alcoolique pouvant évoluer vers une fibrose et une cirrhose. L'hépatite C est elle-même associée à une stéatose. L'obésité constitue donc un facteur négatif sur la réponse thérapeutique pour la bithérapie IFN-ribavirine. Il est donc important de diminuer son poids avant le traitement [Larrey, 2002].

2.7.4.3 Le tabac

Il augmenterait la mortalité à 5 ans chez les malades atteints de cirrhose alcoolique. Il est conseillé un arrêt du tabac compte tenu du bénéfice de l'arrêt du tabac sur la santé [Larrey, 2002].

2.7.4.4 La vaccination

La vaccination contre le VHB est recommandée en raison du risque de co-infection avec le VHC [Larrey, 2002].

2.7.5 Surveillance du traitement

2.7.5.1 Suivi biochimique

Un dosage des transaminases est effectué tous les mois en cours de traitement puis tous les deux mois au cours des 6 mois qui suivent son arrêt [Larrey, 2002].

2.7.5.2 Suivi virologique

La réponse virologique doit être évaluée à la fin du traitement et 6 mois après par une technique qualitative (PCR). L'absence d'ARN viral détectable après arrêt du traitement caractérise dans la majorité des cas une guérison définitive [Larrey, 2002].

2.7.6 Tolérance au traitement

Les effets indésirables des traitements antiviraux sont dose-dépendants et souvent réversibles. Ils peuvent conduire à une réduction de dose ou à un arrêt prématuré du médicament en cause.

3 RELATION ENTRE CRYOGLOBULINE ET HEPATITE C

3.1 Infection par le VHC chez des patients porteurs d'une cryoglobuline mixte

3.1.1 Définition d'une cryoglobulinémie mixte essentielle (CME)

Une CG mixte peut être observée au cours de maladies très diverses : syndromes lymphoprolifératifs, maladies auto-immunes et systémiques, maladies infectieuses aiguës ou chroniques, glomérulonéphrites primitives, affections chroniques du foie. Ces CG sont dites *secondaires* par opposition aux CG mixtes *essentiels* (CME) pour lesquelles aucune maladie sous-jacente n'est mise en évidence.

Cette notion de CME avait été proposée initialement par Meltzer et Franklin en 1966 [Meltzer et al, 1966]. Ces auteurs décrivaient un syndrome particulier associant purpura vasculaire, arthralgies et asthénie. Dans cette étude, on retrouvait des anomalies hépatiques biologiques et cliniques dans un tiers des cas. Pour certains auteurs, les maladies hépatiques, quelle qu'en soit l'origine, seraient l'une des principales causes des cryoglobulinémies mixtes. Pour d'autres, le syndrome des CME initialement décrit par Meltzer et Franklin, serait une vascularite nécrosante dont l'agent étiologique (non identifié) serait également responsable des lésions hépatiques.

L'idée qu'un virus, et notamment celui du VHB puisse être à l'origine de ces observations a été avancée [Levo et al, 1977]. Ultérieurement, des études revendiquaient la forte prévalence de marqueurs de surface du VHB dans le sérum et le cryoprécipité des patients ayant une CME. Cependant, les antigènes VHB sont rarement retrouvés et le taux d'anticorps anti-VHB varie énormément parmi différentes populations de patients avec une CG mixte [Levo et al, 1977] [Galli et al, 1980] [Popp et al, 1980] [Garcia-Bragado et al, 1981] [Cacoub et al, 1994]. Dans une étude [Cacoub et al, 1994], l'antigène HBS n'est présent que dans 17 % des 33 patients avec une CME et aucun patient ne possède d'ADN du VHB dans son sérum et son cryoprécipité, indiquant la probable non-implication du VHB dans les anomalies hépatiques et/ou des CG mixtes de ces patients.

3.1.2 Prévalence de l'infection par le VHC dans les cryoglobulines mixtes essentielles

Après la découverte du virus de l'hépatite C [Choo et al, 1989], un grand nombre d'études ont suggéré le rôle important du VHC dans la pathogenèse des CG. La proportion des CME qui représentait, jusqu'en 1990, environ 30 % de l'ensemble des CG mixtes diagnostiquées, a diminué. Cette observation résulte de deux faits principaux : l'amélioration des moyens d'investigation clinique et biologique et les progrès de la biologie moléculaire permettant le diagnostic des infections par le VHC. En effet, les premières observations d'infections chroniques par le VHC au cours des CME ont été rapportées en 1990 par Pascual et al, à propos de 10 cas [Pascual et al, 1990]. Depuis, de nombreuses études ont analysé la prévalence des anticorps anti-VHC et ARN du VHC dans le sérum de patients atteints par une CG mixte essentielle.

Auteurs	nombre de patients	Anticorps anti-VHC(%)		VHC-ARN(%)	
		ELISA	RIBA	sérum	cryoprécipité
Pascual et al, 1990	10	30%			
Taillan et al, 1992	13	100%			
Pechère-Bertschi et al, 1992b	15	87%	87%	71%	
Bichard et al, 1994	15	80%	67%	60%	93%
Agnello et al, 1992	19	42%	42%	84%	100%
Mazzaro et al, 1996	20	95%	95%	100%	
Dammacco et al, 1992	26	50%	43%		
Ferri et al, 1993a	26	96%	97%	91%	
Casato et al, 1991a	29	48%	48%		
Disdier et al, 1991	30	70%	70%		
Ferri et al, 1992a	42	97%	97%	86%	
Misiani et al, 1992	51	98%	66%	81%	
Ferri et al, 1991	52	54%	54%		
Cacoub et al, 1994	63	52%	47%	64%	79%
Misiani et al, 1993	75	96%	64%	93%	96%
Ferri et al, 1994	88	94%	94%	88%	86%
Ferri et al, 1992b	105	90%	90%	86%	
Galli et al, 1992	161	80%	88%		
Ferri et al, 2004	168	92%	92%	98%	

Tableau 4 : Prévalence de l'infection par le VHC chez des patients ayant une cryoglobulinémie mixte essentielle

3.2 Fréquence des cryoglobulines chez les patients infectés par le VHC

Auteurs	Nombre de patients infectés par le VHC	Pourcentage de patients avec une cryoglobuline
Clifford et al, 1995	68	13%
Levey et al, 1994	75	13%
Wong et al, 1996	113	19%
Polzien et al, 1997	59	23%
Yacoub Jemni et al, 1997	33	24%
Weiner et al, 1998	132	28%
Richou et al, 2000	234	31%
Van Thiel et al, 1995	214	35%
Congia et al, 1996	314	35%
Pawlotsky et al, 1994	61	36%
Kerr et al, 1997	69	42%
Akriviadis et al, 1997	81	45.7%
Adinolfi et al, 1996	303	46%
Cacoub et al, 2002b	431	46%
Schmidt et al, 2000	115	47%
Cicardi et al, 2000	360	47%
Zaltron et al, 1996	442	47%
Tridon et al, 1997	149	49%
Hartmann et al, 1995	55	51%
Frangueul et al, 1996	118	51%
Cacoub et al, 1994	115	52%
Lunel et al, 1994b	127	54%
Cacoub et al, 2000b	196	56%
Okuse et al, 2003	232	70.7%

Tableau 5 : Prévalence des cryoglobulinémies mixtes au cours des infections chroniques par le VHC

Chez les malades ayant une hépatite chronique C, une cryoglobulinémie est détectable dans 13 à 70.7 % des cas, selon la sensibilité de la technique de détection utilisée, ainsi que l'origine géographique des patients. Il s'agit dans 20 à 30 % des cas d'une CG mixte de type II et dans 70 à 80 % des cas d'une CG mixte de type III [Kochbati et al, 2001]. La CG est toutefois peu abondante chez la plupart de ces malades et un cryocrite supérieur ou égal à 3 % n'est trouvé que chez 4 à 13 % des porteurs chroniques du VHC [Pawlotsky, 2001].

Dans une étude prospective, les auteurs décrivent des CG chez plus de la moitié des patients souffrant d'une hépatite chronique [Musset et al, 1996]. Ils suggèrent que l'évolution sur plus d'une décennie se fait d'abord vers une CG de type III (polyclonale) puis II (apparition d'un clone monoclonal) avec une augmentation de la concentration en CG. Une petite série de patients [Werner et al, 1993] va dans le même sens, bien que l'incidence de CG soit inférieure. Une analyse rétrospective a montré une fréquence élevée de CG intermédiaires (II-III) chez des patients souffrant d'hépatite C, suggérant aussi une transition entre une stimulation polyclonale des lymphocytes B qui synthétisent les FR IgM, vers l'émergence d'un nombre limité de clones, puis d'un clone prépondérant [Schifferli et al, 1994].

3.3 Facteurs prédisposants à la survenue d'une cryoglobuline au cours d'une infection par le VHC

3.3.1 Age et sexe

Dans une méta-analyse portant sur 19 études publiées entre 1994 et 2001 [Kayali et al, 2002], les auteurs ont montré que les patients avec une CG étaient significativement plus âgés dans 6 des 17 études pour lesquelles l'âge moyen et l'écart des âges étaient rapportés.

Sur 17 études rapportant le sexe des patients, 13 notaient une plus grande incidence de patients masculins chez les patients sans CG. 9 études ont comparé la durée de la maladie dans les deux populations de patients (ceux ayant une CG et ceux sans CG), elle était significativement plus longue chez les patients ayant une CG dans 7 des 9 études [Kayali et al, 2002].

3.3.2 Atteinte hépatique

La méta-analyse a aussi montré que, dans 12 études, la cirrhose était deux fois plus fréquente chez les patients ayant une CG (44 %) que chez ceux sans CG (17 %). Par contre, quand l'odds ratio combiné était ajusté systématiquement pour l'âge, le sexe et la durée d'évolution de la maladie, l'association entre CG et cirrhose s'améliore progressivement, ce

qui suggère une véritable relation entre la présence de CG et l'incidence de la cirrhose. 11 études ont déterminé le type de CG dans les sérums des patients. L'incidence des CG de type III est supérieure (dans 7 études) par rapport à celle de type II (4 études). Les études ayant un pourcentage plus important de CG de type II montrent également une incidence plus importante de la cirrhose [Kayali et al, 2002].

La présence d'une CG semble liée à la sévérité de l'atteinte hépatique et à la durée d'évolution de la maladie virale [Lunel et al, 1994b] [Zignego et al, 1996]. Il est, à priori, très difficile de déterminer quel facteur est le plus directement impliqué puisque ce sont les patients dont la durée d'évolution de l'hépatite est la plus longue, qui ont également les atteintes les plus sévères et notamment une cirrhose. Cependant, l'atteinte hépatique, à elle seule, ne peut rendre compte de la CG dans tous les cas. En effet, une CG est détectée chez 30 % des patients infectés par le VHC en l'absence de cirrhose ou avec une histologie du foie normale. L'atteinte hépatique, appréciée à partir du score de Knodell, ne montre pas de différence significative chez les patients qu'ils aient ou non une CG. Le taux de CG et la sévérité des manifestations cliniques pouvant être liées à la CG ne sont pas différents chez les patients cirrhotiques et non cirrhotiques [Musset et al, 1996]. Cela suggère que la cirrhose et la sévérité de l'atteinte hépatique ne sont pas les seuls facteurs impliqués dans la production excessive de CG, particulièrement chez les patients atteints d'une hépatite C chronique [Lunel et al, 1994b].

3.3.3 *Génotype*

Le rôle particulier des différents génotypes du VHC dans la production des CG a été évoqué. Mais à l'heure actuelle, aucune preuve n'est faite. Pour certains auteurs [Frangueul et al, 1996] [Schmidt et al, 2000], il y aurait une prévalence significativement inférieure du génotype 1a chez les patients ayant une CG. D'autres [Zignego et al, 1996] suggèrent que le génotype 2a/III prédispose à la survenue d'une CG puisque ce génotype est trouvé dans 41 % des cas dans le groupe des CG associées au VHC, contre 15 % dans la population contrôle d'hépatite C sans CG. Pour d'autres [Pawlotsky et al, 1995] [Polzien et al, 1997] [Weiner et al, 1998], [Horcajada, 1999], [Cacoub et al, 2000b], il n'y a pas de différence significative du génotype du VHC entre la population de patients VHC positif avec une CG et celle de patients VHC positif sans CG. De plus, il n'y aurait pas de différence significative dans la

distribution du génotype entre les patients avec une CG symptomatique et ceux ayant une CG asymptomatique [Durand et al, 1997].

3.3.4 Système HLA (*Human Leukocyte Antigen*)

Les maladies immunologiques sont associées aux phénotypes HLA et particulièrement ceux codés par la région DR. La reconnaissance des antigènes viraux se fait par leur présentation par les molécules HLA à la surface des cellules infectées de l'hôte. Chez certains individus infectés par le VHC, présentant un défaut ou une sur-expression de certaines molécules du système HLA de type II (DR2, DR5), l'habilité à reconnaître les peptides du VHC pourrait être défectueuse et induire la persistance du virus, des atteintes plus sévères et /ou une CG [Lunel et al, 1998].

Les études effectuées sur des populations variées suggèrent que les gènes du système HLA ne régulent pas uniquement la résistance aux agents infectieux comme dans le cas de la malaria ou de l'infection par le VIH, mais détermine aussi l'issue des maladies infectieuses comme la lèpre, le sida.

L'influence des allèles du système HLA sur la présence de CG associées aux VHC est très controversée. Dans une petite série de patients italiens (n = 25) [Lenzi et al, 1998], une fréquence importante de l'haplotype B8 ;DR3 a été observé mais cela n'a pas été confirmé par d'autres études. Congia et al ont rapporté une augmentation de la fréquence de l'haplotype DRB1*11 ;DQB1*0301 dans une cohorte de 116 patients VHC positif associée à une thalassémie avec une CG mixte, mais l'association n'était pas statistiquement significative [Congia et al, 1996]. Dans une autre étude [Amoroso et al, 1998], la fréquence du DRB1*11, mais pas du DQB1*0301, est significativement augmentée dans un groupe de 46 patients VHC positif ayant une CG mixte. Cacoub et al ont montré que l'haplotype DRB1*11 était plus fréquent chez les patients avec une CG mixte que chez ceux sans CG mixte (35,5 % versus 17,1 %) et plus particulièrement chez ceux ayant une CG de type II [Cacoub et al, 2001]. Il semble que l'haplotype HLA-DR11 soit le seul facteur positif prospectif pour la présence de CG mixte et dans les vascularites dues à des CG mixtes associées au VHC.

Cacoub et al ont aussi montré que le HLA-DRB1*07 (DR7) était moins fréquent chez les patients avec une CG mixte que ceux sans CG mixte (13,2 % versus 30,5 %) et notamment chez ceux ayant une CG mixte de type II. Le HLA-DR7 apparaît comme protecteur contre la production de CG mixtes de type II.

Ces résultats suggèrent que les gènes codant pour la réponse immunitaire de l'hôte jouent un rôle dans la pathogenèse des CG mixtes associées au VHC [Cacoub et al, 2001] [Cacoub et al, 2002a].

3.4 Arguments en faveur de l'implication du VHC dans la survenue d'une cryoglobulinémie

3.4.1 Répartition géographique

L'association entre hépatite chronique à virus C et CG mixtes a été suggérée par la similitude de la répartition géographique de ces deux pathologies. Elles sont, en effet, peu fréquentes en Europe du Nord et en Amérique du Nord, tandis qu'elles sont prépondérantes en Europe du Sud, en particulier en Italie et en France [Durand et al, 1997].

3.4.2 Prévalence élevée des cryoglobulines au cours de l'infection par le VHC et inversement

Une forte prévalence des CG mixtes est observée au cours des infections par le VHC, et inversement, une forte prévalence d'une infection par le VHC est rapportée au cours des CME (tableaux 4 et 5). Certains auteurs ont pu mettre en évidence que l'ARN du VHC et les anticorps anti-VHC étaient plus concentrés dans le cryoprécipité que dans le sérum. Le rapport était de 10 pour les anticorps et de 1000 pour l'ARN viral [Agnello et al, 1992]. Lunel et al ont également mis en évidence une activité anticorps spécifique anti-VHC ainsi que des protéines de la capside du virus dans le cryoprécipité chez des sujets atteints d'hépatite chronique C, alors qu'elles sont absentes en cas de cryoglobulinémie mixte d'origine non-virale [Lunel et al, 1994a]. Cacoub retrouve une concentration de l'ARN du VHC de 20 à 100

fois plus importante dans le cryoprécipité [Cacoub et al, 1994]. Ceci suggère la présence d'ARN encapsidé et de particules virales entières dans le cryoprécipité [Durand et al, 1997] [Cacoub et al, 2002a].

3.4.3 Présence de vascularite chez les patients atteints par le VHC

Seulement 10 % des patients affectés par le VHC et possédant une CME ont des symptômes cliniques de vascularite tels que purpura, fatigue, phénomène de Raynaud et manifestation rénale. L'hypothèse que le VHC soit l'agent étiologique des CME est soutenue par les neuropathies périphériques et /ou les arthrites. Plusieurs études ont établi un lien entre VHC et CME à cause de la déposition de CIC dans les petits et moyens vaisseaux. Le diagnostic est basé sur la présence d'Ig (IgG ou IgM) qui ont tendance à précipiter à faible température. Les neuropathies périphériques sont fréquentes chez les patients avec une CG mixte. Elles ont été rapportées dans 67 % des patients infectés par le VHC et ayant une CME. Mais dans seulement 37 % des cas d'infection par le VHC associée à une CG, il y a une évidence électro-physiologique de neuropathie périphérique avec fatigue, manifestations cutanées et articulaires, douleur et paresthésie [Nocente et al, 2003].

3.4.4 Argument thérapeutique

L'hypothèse que le VHC puisse jouer un rôle étiologique important dans la pathogenèse des cryoglobulinémies est également étayée par le fait qu'un traitement antiviral avec l'INF peut être efficace dans cette situation [Durand et al, 1997]. La première étude [Bonomo et al, 1987], dans laquelle 7 patients ayant une CG mixte idiopathique de type II traités par l'INF alpha recombinant, a montré une amélioration clinique remarquable et une réduction de la CG circulante dans tous les cas. Depuis, d'autres auteurs ont étudié l'effet de l'INF sur les CG.

Casato et al ont rapporté un taux de réponse de 77 % et de 62 % chez les patients avec une CG symptomatique traités par l'INF, mais une rémission à long terme n'est observée que dans 10 % des cas [Casato et al, 1991b] [Casato et al, 1997]. Ferri et al ont traité 26 patients ayant une CG mixte associée au VHC. Ils ont obtenu une amélioration des manifestations

relatives aux CG et des taux de CG chez 73 % des patients, mais l'ARN du VHC devenait indétectable chez seulement 15 % des patients et tous rechutaient quand le traitement par l'INF fut stoppé [Ferri et al, 1993a]. Misiani et al ont étudié 53 patients ayant une CG mixte de type II symptomatique et une infection par le VHC. Parmi ceux traités par l'INF, l'ARN du VHC était indétectable chez 60 % d'entre eux après 6 mois de traitement tandis que ceux n'ayant pas été traités, avaient une virémie persistante. Les manifestations cliniques et immunologiques liées à la CG avaient disparu ou s'étaient améliorées seulement chez les patients devenus non virémiques. En revanche, les auteurs notaient une réapparition de la virémie et des manifestations cliniques de la CG à l'arrêt du traitement, mais une nouvelle rémission était induite par la reprise de l'INF [Misiani et al, 1994].

Lunel et al ont constaté la disparition de la CG en cours de traitement par l'INF chez 57 % des patients répondeurs, contre seulement 33 % chez les non-répondeurs en même temps que les manifestations extra hépatiques disparaissent ou s'atténuent dans 44 % des cas. Lors des rechutes après arrêt de l'INF, la CG réapparaissait dans 72 % des cas, alors qu'elle restait absente après traitement en cas de réponse prolongée parallèlement à la négativité de l'ARN viral [Lunel et al, 1994b]. Dammaco et al ont observé une rémission complète chez 53 % des patients recevant de l'INF seul ou associé à une corticothérapie contre 16,7 % dans le groupe corticothérapie seule et 6,7 % dans le groupe contrôle sans traitement [Dammacco et al, 1994]. Cresta et al ont constaté que la CG disparaissait ou que son taux diminuait chez 60 % des patients, accompagné de la disparition de l'ARN du VHC dans 54 % des cas [Cresta et al, 1999]. Cacoub et al ont trouvé un impact significatif de la thérapie virale sur la CG après 18 mois de suivi. En effet, les CG étaient détectables chez 6 % seulement des répondeurs contre 33 % des patients encore virémiques après le traitement [Cacoub et al, 2002b].

Toutes ces observations confortent l'hypothèse du rôle de l'infection par le VHC dans l'apparition ou la persistance des CG, et l'intérêt du traitement des CG associées au VHC par l'INF. La CG disparaît le plus souvent chez les patients répondeurs à l'INF. Cependant chez quelques patients, on peut observer la disparition de la CG sous INF malgré la persistance de la cytolysé et de la virémie [Durand et al, 1997]. Il est cependant difficile d'expliquer les mécanismes exacts de l'action de l'INF sur les CG ; les effets anti-prolifératifs, immuno-régulateurs et antiviraux de ce médicament peuvent agir de façon indépendante ou combinée [Ferri et al, 1993a].

3.4.5 *Autres arguments*

Un autre argument en faveur de l'implication du VHC dans la pathogenèse des CG est fourni par Gournay et al qui rapportent 3 observations de transplantations hépatiques dans lesquelles l'évolution de la CG est parallèle à la ré-infection du greffon par le VHC [Gournay et al, 1996].

Une autre explication du rôle potentiel du VHC dans la pathogenèse des CG pourrait être une réaction antigénique croisée entre le VHC et le foie et notamment le foie malade, et entre le VHC et un antigène codé par le génome de l'hôte [Lunel et al, 1998].

Plusieurs arguments plaident donc en faveur du rôle du virus lui-même dans la pathogénie des CG : la concentration élevée en ARN viral et la présence de protéines virales spécifiques du virus dans le cryoprécipité, ainsi que la réponse parallèle sous IFN entre le taux de virémie et de CG. Une recherche des marqueurs du VHC doit donc être effectuée devant la constatation d'une CG et un traitement par l'IFN doit être proposé dans les formes symptomatiques [Durand et al, 1997].

3.5 Physiopathologie de la cryoprécipitation chez les patients atteints d'hépatite C

3.5.1 *Composition du cryoprécipité*

L'analyse de la composition des CG montre qu'elles contiennent des anticorps, des quantités significatives d'ARN du VHC et des antigènes viraux [Agnello et al, 1992] [Schmidt et al, 2000]. L'ARN du VHC est plus concentré dans le cryoprécipité par rapport au sérum [Agnello et al, 1992]. Lunel et al ont trouvé des protéines de la capsid du VHC dans le cryoprécipité suggérant la présence d'ARN encapsidé et donc la présence de particules virales entières dans ce cryoprécipité et leur possible participation dans la formation de complexes [Lunel et al, 1994a] [Cacoub et al, 2002a].

Les IgG sont des anticorps réagissant avec les protéines du VHC et des IgM monoclonales avec une activité facteur rhumatoïde. La caractérisation des IgG a montré que

les sous-classes IgG1 et IgG3 étaient les plus rencontrées [Wong et al, 1996]. Les IgG1 sont des anticorps réagissant contre les différents antigènes du VHC, les IgG3 sont dirigés contre le peptide de capsid C22. Ce sont les antigènes du FR. En effet, les FR sont des anticorps dirigés contre le fragment cristallisable (Fc) des IgG [Schott et al, 1998].

La majorité des IgM-FR trouvées dans les CG de type II portent (dans 65 à 87 % des cas) le même idiotype WA Xid cross réactif codé par le gène 51p11gVH [Agnello et al, 1995]. Schott et al ont montré que les IgM des CG ne réagissaient pas avec les protéines recombinantes du VHC et précipitaient avec des IgG provenant du cryoprécipité mais aussi avec des IgG non spécifiques (IgG de patients sans CG, non atteints par le VHC). Les IgG isolées à partir du cryoprécipité ne précipitaient pas en présence d'IgM sériques. Le FR est donc un constituant nécessaire à la formation des CG, les IgG servant d'antigènes et les IgM servant d'anticorps [Schott et al, 1998].

<i>Constituant</i>	<i>Rôle dans la formation des cryoglobulines</i>	<i>Caractéristiques</i>
IgM-FR	Se lie au fragment Fc des IgG	Cryoprécipitabilité Utilisation préférentielle des gènes kv325/51p. Idiotype WA
IgG	Se lie aux virions du VHC Se lie aux IgM FR	Souvent polyclonales IgG1 anti VHC core, anti E2/HVR, anti NS3, anti NS4, anti NS5 IgG3 anti VHC core Quelques IgG monoclonales (IgG3)
VHC	Se lie aux IgG anti-VHC en formant des complexes immuns	ARN viral et antigènes viraux
IgA	?	Composant minoritaire des cryoglobulines
C1q	Se lie au fragment Fc dans les complexes immuns	Dans 58% des cryoglobulines de type II

Tableau 6 : Composition des cryoglobulines dans l'hépatite C [Sasso et al, 2000]

3.5.2 *Hypothèses physiopathologiques*

Il existe plusieurs hypothèses sur l'étiologie des CG : soit la production de FR par stimulation immunitaire, soit un désordre lymphoprolifératif malin de faible grade, soit une baisse de la clairance des CI.

3.5.2.1 **Stimulation immunitaire**

Les CG sont des complexes IgM FR-IgG-VHC qui précipitent à une température inférieure à + 37°C. Des études chez l'homme et la souris ont montré que la production de FR serait stimulée par des CI et par une activation polyclonale des lymphocytes B.

Il est probable que le phénomène immunologique soit le résultat de deux étapes, la première correspondant à la formation de complexes antigène-anticorps contenant le virus ou d'autres antigènes, la seconde correspondant à l'interaction avec les IgM à activité FR, l'ensemble pouvant contribuer in vivo à piéger et à éliminer le virus [Durand et al, 1997]. Il semble qu'aucun génotype du VHC ne puisse être l'agent causal de la production de FR [Agnello, 1997a]. Chez les malades VHC +, ayant une CG II, des lipoprotéines sériques, en particulier des VLDL (Very Low Density Lipoproteins) ont été retrouvées concentrées avec le VHC et le FR WA [Thomssen, 1993]. Il semble que les complexes entre les VLDL et les antigènes du VHC pourraient stimuler des populations de lymphocytes B productrices de FR [Agnello et al, 1997b]. Dans l'infection par le VHC, des concentrations abondantes de CI peuvent être présentes parce que l'infection peut être chronique et que la variabilité du virus est grande. La découverte récente de l'interaction entre la protéine de l'enveloppe E2 du VHC et le récepteur CD81 situé à la surface des lymphocytes et des hépatocytes pourrait expliquer la stimulation continue des lymphocytes B [Pileri, 1998]. La fixation de E2 sur les molécules de CD81 serait aussi à l'origine d'une stimulation des cellules T qui pourrait être, au moins en partie, la cause de lésions hépatiques observées dans les hépatites C chroniques [Germi, 2001]

La stimulation continue des cellules B produisant des IgM-FR par de tels CI peut accroître le risque de transformation monoclonale. Musset et al ont observé, au cours de l'évolution de la maladie virale, une transformation d'une CG mixte initialement peu abondante et de type III en une CG mixte de type II quantitativement plus abondante avec une

mise en évidence parallèlement d'une activité FR sérique initialement non détectable [Musset et al, 1996].

3.5.2.2 Prolifération pré-néoplasique

La CG mixte étant caractérisée par une prolifération clonale des lymphocytes B, elle peut être considérée, pour certains auteurs, comme l'expression d'un lymphome de bas grade évoluant vers un lymphome de haut grade chez certains patients [Agnello et al, 1992] [Pozzato et al, 1994] [Lunel et al, 1998]. Dans ce contexte, un mécanisme possible de la transformation maligne semble impliquer la prolifération clonale des lymphocytes B induite par le virus, l'inhibition de l'apoptose des lymphocytes infectés par la production de la protéine bcl2 [Zuckerman et al, 2001]. Zignego et al ont trouvé une prévalence de la translocation t (14 ;18) dans les lymphocytes B circulants chez 71.4 % des patients atteints par le VHC ayant une CG [Zignego et al, 2000]. D'autres études ont trouvé des prévalences semblables : Kita-Cohen et al ont trouvé une prévalence de 86 % et Zignego et al dans une autre étude, une prévalence de 75.7 % [Kita-Cohen et al, 2000] [Zignego et al, 2002]. Cette translocation n'est retrouvée que chez 4 % des patients ayant une hépatite non C [Kita-Cohen et al, 2000]. Cette translocation a pour conséquence une hyper-expression de la protéine bcl2 anti-apoptose conduisant à la survie prolongée des lymphocytes B [Ferri et al, 2004]. Durant cette survie prolongée, ces cellules peuvent subir d'autres changements génétiques qui induirait une transformation en un LNH [Kita-Cohen et al, 2000]. Une prévalence élevée de LNH chez des patients atteints du VHC avec une CG, a été rapportée dans des études italiennes mais n'a pas été confirmée par d'autres études [Pozzato et al, 1994] [Lunel et al, 1998].

3.5.2.3 Diminution de la clairance des complexes immuns

Le système réticulo-endothélial (cellules de Küpffer) a un rôle important dans l'épuration des CIC. Il a été suggéré que les CIC présents chez la plupart des patients ayant une CG, pouvaient entraîner des lésions hépatiques par l'activation des cellules de Küpffer, ou qu'inversement les modifications des cellules de Küpffer décrites au cours des hépatites chroniques pouvaient diminuer la clairance des CG produites naturellement au cours des hépatites chroniques virales. L'ARN du VHC a été retrouvé dans la plupart des cellules phagocytaires. Il semble qu'il altère la fonction épuratrice du système réticulo-endothélial et

favoriserait ainsi la persistance de CIC et donc d'une CG. D'autres auteurs ont suggéré que les altérations histologiques hépatiques, en particulier la cirrhose, pourraient être impliquées dans la production de CG mixtes par les modifications immunologiques locales et générales induites par un dysfonctionnement hépatique [Ferri et al, 1993b] [Lunel et al, 1998] [Cacoub et al, 2000c].

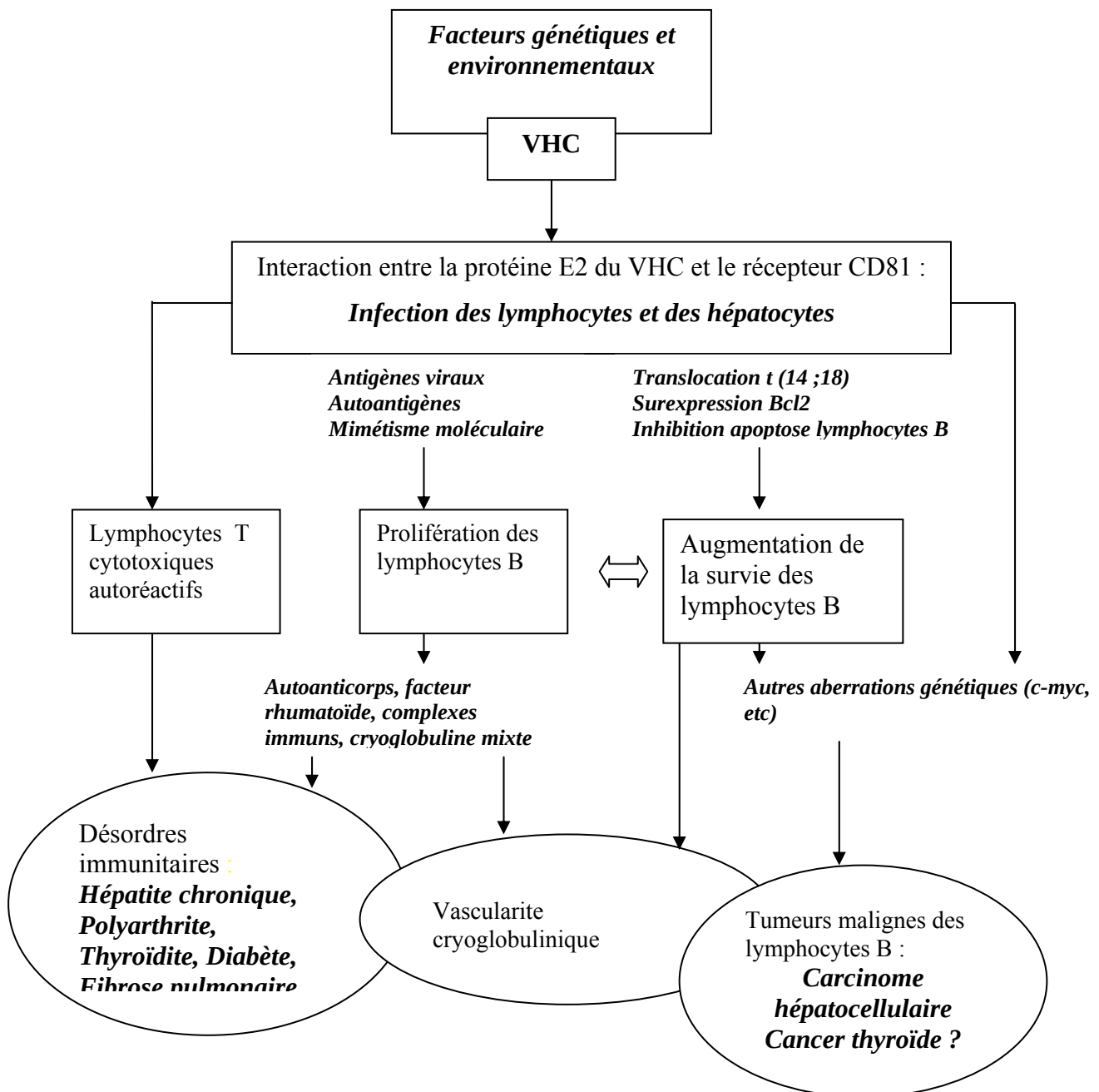


Figure 9 : Etiologies possibles des désordres relatifs aux cryoglobulines dans l'hépatite C [Ferri,2002]

4 LES LIPOPROTEINES

4.1 Définition et structure

Les lipides, qu'il s'agisse des acides gras, des triglycérides (TG), du cholestérol ou des phospholipides (PL), sont caractérisés par leur caractère hydrophobe. Le transport des lipides est donc effectué sous forme de structures micellaires résultant de l'association de lipides et de protéines, structures miscibles à l'eau appelées lipoprotéines. Ces molécules possèdent un noyau central apolaire, composé de TG et de cholestérol estérifié (CE), qui est entouré d'une enveloppe amphipathique ; celle-ci est formée par l'assemblage de protéines appelées apolipoprotéines et de lipides plus hydrophiles, des PL (phosphatidylcholine ou lécithines) et de cholestérol libre dont les parties polaires sont orientées vers le milieu extérieur (figure 10).

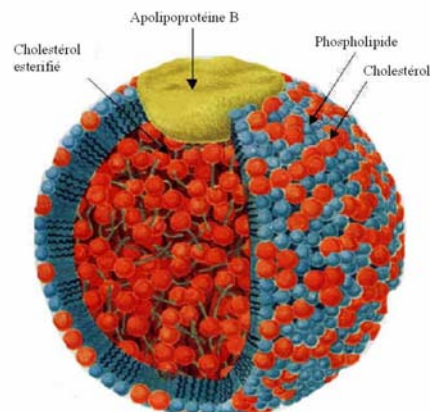


Figure 10 : Schéma d'une lipoprotéine

4.2 Les apolipoprotéines

Les apolipoprotéines (apo) jouent un rôle structural contribuant à la cohésion et à la solubilité des lipoprotéines : elles peuvent être totalement intégrées à l'enveloppe amphipathique comme les apo B ou se trouver sur le versant externe de la micelle ; dans ce dernier cas, elles se fixent soit par des liaisons ioniques avec les phospholipides (apo A, apo C, apo E), soit par des ponts disulfures entre apolipoprotéines (liaison de l'apo (a) avec l'apo B100). Les plus petites peuvent être facilement transférées d'une lipoprotéine à une autre.

Il existe plusieurs classes d'apolipoprotéines parmi lesquelles on peut distinguer les apo A (AI, AII, AIV), les apo B (B48, B100), apo C (CI, CII, CIII), apo E et l'apo (a). Elles se différencient par leur masse moléculaire : de 6 500 daltons pour l'apo CI à 550 000 pour l'apo B100.

Les apolipoprotéines, par leurs points isoélectriques variés, donnent aux lipoprotéines des mobilités différentes en électrophorèse :

- les HDL (*High Density Lipoproteins*) riches en apo A migrent parmi les α -globulines, on les appelle α -lipoprotéines,
- les LDL (*Low Density Lipoproteins*) au contraire, migrent parmi les β -globulines et sont appelées β -lipoprotéines,
- les VLDL (*Very Low Density Lipoproteins*) migrent entre les α -lipoprotéines et les β -lipoprotéines : on les désigne par α_2 -lipoprotéines ou pré- β -lipoprotéines.

Apolipoprotéine	Concentration plasmatique mg/l	Lieu de synthèse	Fonction	Association aux lipoprotéines
Apo AI	1200	foie, intestin	Activateur de la LCAT, efflux de cholestérol	HDL, chylomicrons
Apo AII	400	foie, intestin	Transport... ?	HDL, chylomicrons
Apo AIV	160	intestin	Efflux de cholestérol	HDL, chylomicrons
Apo B48	0	intestin	Sécrétion de chylomicrons	chylomicrons
Apo B100	900	foie	Sécrétion de VLDL Ligand du récepteur LDL	VLDL, IDL, LDL
Apo CI	50	foie	Activateur de la LCAT (in vitro)	HDL, VLDL, chylomicrons
Apo CII	50	foie	Activateur LPL	HDL, VLDL, chylomicrons
Apo CIII	130	foie	Inhibiteur LPL	HDL, VLDL, chylomicrons
Apo D	70	foie	Transport de cholestérol	HDL, chylomicrons
ApoE	50	Foie, intestin, surrénale, macrophages	Ligand du récepteur LDL et du récepteur des chylomicrons résiduels	IDL, chylomicrons, VLDL, HDL
Apo (a)	<10	foie	Transport	Lp(a)

Tableau 7 : Caractéristiques des apolipoprotéines

Les apolipoprotéines hormis leur rôle structural, possèdent d'autres fonctions :

- un rôle d'activation des enzymes du métabolisme des lipoprotéines : les apo A modulent l'activité de la lécithine cholestérol acyl-transférase (LCAT) : les apo AI et AIV sont des activateurs de cet enzyme. Les apo A, en plus de leur rôle d'activateur de la LCAT, sont nécessaires à la fixation des protéines de transfert, qu'il s'agisse de la CETP (Cholesteryl Ester Transfer Protein) ou de la PLTP (Phospholipid Transfer Protein). Les apo C modulent l'activité de la lipoprotéine lipase (LPL) : l'apo CII est un activateur de cet enzyme en s'y fixant par son extrémité C-terminale. A l'opposé, l'apo CIII entraîne une inhibition de cette activité par déplacement de l'apo CII. L'apo CI jouerait un rôle d'activateur de la LCAT mais cette action n'a été démontrée qu'in vitro.
- un rôle de reconnaissance des lipoprotéines par les récepteurs cellulaires : le récepteur aux LDL (rLDL) est nécessaire à l'apport de cholestérol aux tissus périphériques et à l'élimination hépatique des LDL non captées. L'apo B100 joue un rôle majeur dans cette reconnaissance en association avec l'apo E, d'où le nom de récepteur apo B/ apo E que l'on utilise généralement pour désigner le rLDL. La deuxième famille de récepteurs correspond aux récepteurs des résidus de chylomicrons et des résidus de VLDL nécessaires pour leur élimination hépatique ; l'apo E joue un rôle majeur dans cette reconnaissance et ces récepteurs sont appelés récepteurs LRP (LDL-receptor related protein). L'ensemble de ces récepteurs permet l'internalisation des lipoprotéines concernées [Kamoun et al, 2003].

4.3 Les différentes lipoprotéines et leur composition

Les lipoprotéines se distinguent les unes des autres par leur composition en protéines et en lipides. Dans un sérum normal à jeun, les lipoprotéines se répartissent dans un gradient de concentration saline en trois principales zones de densité :

- les VLDL : moins de 15 % des lipoprotéines du plasma à jeun,
- les LDL : 55 % des lipoprotéines du plasma à jeun,
- les HDL : 30 % des lipoprotéines du plasma à jeun.

Les HDL sont subdivisés en trois zones d'inégale importance :

- les HDL1 les plus légères représentent une fraction mineure contenant une entité protéinique appelée Lp(a)
- les HDL2 plus denses ont une concentration variable. Cette fraction est beaucoup plus importante chez l'enfant et la femme que chez l'homme.
- les HDL3 représentent la fraction la plus dense et quantitativement la plus importante des HDL, de concentration à peu près identique dans les deux sexes.

Une zone de faible amplitude appelée IDL (Intermediate Density Lipoproteins) représente une sous-fraction de densité intermédiaire entre celle des LDL et des VLDL, quantitativement mineure à jeun.

Ces lipoprotéines se différencient également par le pourcentage des différentes classes de lipides entrant dans leur composition. Les lipoprotéines les plus légères (chylomicrons et VLDL) servent au transport des acides gras et des TG, les plus denses (LDL, HDL) à celui du cholestérol. La taille des lipoprotéines est variable avec des valeurs allant de 1000 nm pour les chylomicrons à 10 nm pour les HDL.

Lipoprotéine	Densité	Taille (nm)	Contenu moyen		Composition moyenne en lipides (% des lipides totaux)			
			Protéines	Lipides	Noyau		Surface	
					TG	CE	CL	PL
Chylomicrons	<0,94	75-1200	2	98	88	3	1	8
VLDL	0,94-1,006	30-80	7	93	57	15	8	20
IDL	1,006-1,019	25-35	18	82	30	34	9	27
LDL	1,019-1,063	18-25	23	77	14	48	10	28
Lp(a)	1,07	27-30	29	71	14	48	10	22
HDL 2	1,063-1,125	9-12	42	58	16	31	10	43
HDL 3	1,125-1,21	5-9	53	47	14	29	7	50

TG : triglycérides

CL : cholestérol

CE : cholestérol estérifié

PL : phospholipides

Tableau 8 : Caractéristiques des lipoprotéines sériques [Kamoun et al, 2003]

Les lipoprotéines assurent trois fonctions :

- l'apport des acides gras au tissu adipeux et aux muscles sous forme de TG grâce aux chylomicrons et aux VLDL qui sont synthétisés au cours d'un repas ;
- l'apport de cholestérol libre aux cellules périphériques grâce aux LDL qui proviennent du catabolisme des VLDL ;
- le retour du cholestérol non utilisé par ces cellules vers le foie grâce aux HDL.

Les fonctions des différentes lipoprotéines circulantes sont conditionnées par leur métabolisme. Il faut souligner que le foie joue un rôle central dans le métabolisme du cholestérol mais également dans l'élimination des résidus de chylomicrons et des résidus de VLDL. Pour assurer ces fonctions, les apolipoprotéines jouent un rôle clef du fait de leur interaction avec les protéines impliquées dans le métabolisme des lipoprotéines [Kamoun et al, 2003].

4.4 Métabolisme des lipoprotéines plasmatiques

Les lipides circulent dans le sang sous forme de lipoprotéines ; pour ce faire, ils empruntent deux voies métaboliques : la voie exogène et la voie endogène. Le métabolisme est dépendant de l'interaction des apoprotéines, des enzymes et des récepteurs. Le métabolisme intravasculaire des lipoprotéines permet non seulement une modification de la structure des lipides qu'elles contiennent sous l'action de protéines enzymatiques mais également un transfert de lipides d'une lipoprotéine à une autre sous l'action de protéines de transfert. Trois enzymes et deux protéines de transfert sont impliquées : il s'agit de la LPL, de la lipase hépatique (LH) et de la LCAT, de la CETP et de la PLTP.

4.4.1 La voie exogène

Une fois ingérés, les lipides alimentaires sont d'abord hydrolysés et absorbés par la muqueuse intestinale, puis re-estérifiés et mis en circulation sous forme de chylomicrons. Les chylomicrons transportent surtout des TG. Ces derniers sont hydrolysés par la LPL. Plusieurs facteurs modulent l'activité de cette enzyme : alimentation, hormones, médicaments, facteurs

génétiques. Les acides gras libérés sont captés par la cellule adipeuse où ils sont reconstitués en TG. Les muscles peuvent aussi les utiliser comme source d'énergie.

Après cette hydrolyse, les constituants en surplus à la surface des chylomicrons (PL, cholestérol libre, apo A, apo C) sont transférés aux HDL. La lipoprotéine résiduelle est captée par un récepteur membranaire de la cellule hépatique apparenté à celui des LDL et reconnaît l'apo E. Elle est ensuite dégradée par des enzymes lysosomiales.

Les chylomicrons transportent donc les triglycérides alimentaires au tissu adipeux, ainsi que le cholestérol alimentaire au foie.

4.4.2 *La voie endogène*

A partir du glycérol et des acides gras libérés par le tissu adipeux ou produits sur place, le foie fabrique des TG, mis en circulation sous forme de VLDL qui contiennent aussi du cholestérol. Le rapport TG/cholestérol des VLDL est d'environ 4 et chacune des particules est dotée d'une molécule d'apo B100. D'autres apolipoprotéines, les apo C et apo E, s'ajoutent lors de la circulation des lipoprotéines dans le plasma.

Comme les TG des chylomicrons, les TG des VLDL sont hydrolysés par la LPL. Les acides gras ainsi libérés sont distribués aux tissus. Le résidu de VLDL, une lipoprotéine de densité intermédiaire IDL se retrouve relativement enrichie en CE.

Une partie des VLDL et des IDL est catabolisée par le récepteur des VLDL, surtout présent dans les muscles et le tissu adipeux. Le rôle de ce récepteur serait de livrer les TG endogènes aux sites du métabolisme des acides gras.

Une certaine proportion des IDL est éliminée de la circulation et métabolisée par le foie par le biais d'un récepteur spécifique. La LH hydrolyse les TG des IDL qui restent en circulation. La diminution du contenu en TG conduit à la formation des LDL. Celles-ci, dont le cholestérol constitue environ 70 % de la cholestérolémie totale, sont spécifiquement reconnues par des récepteurs cellulaires aux apo B ou E. L'endocytose permet au complexe récepteur-LDL de pénétrer dans la cellule où il est dissocié. L'apo B et le CE sont hydrolysés

dans les lysosomes. Dans le cytoplasme, la LCAT re-estérifie le cholestérol libre. Le rLDL permet donc à la cellule de recevoir du cholestérol libre qui servira à la synthèse de membranes et à d'autres fonctions cellulaires ; il permet aussi de réguler les taux de LDL circulantes.

Lorsque les LDL ne sont pas captées par leurs récepteurs, elles peuvent être internalisées par des récepteurs non spécifiques ou éliminées par des macrophages tissulaires qui agissent comme éboueurs. C'est alors que l'enclenchement du processus de formation de l'athérome devient possible [Kamoun et al, 2003].

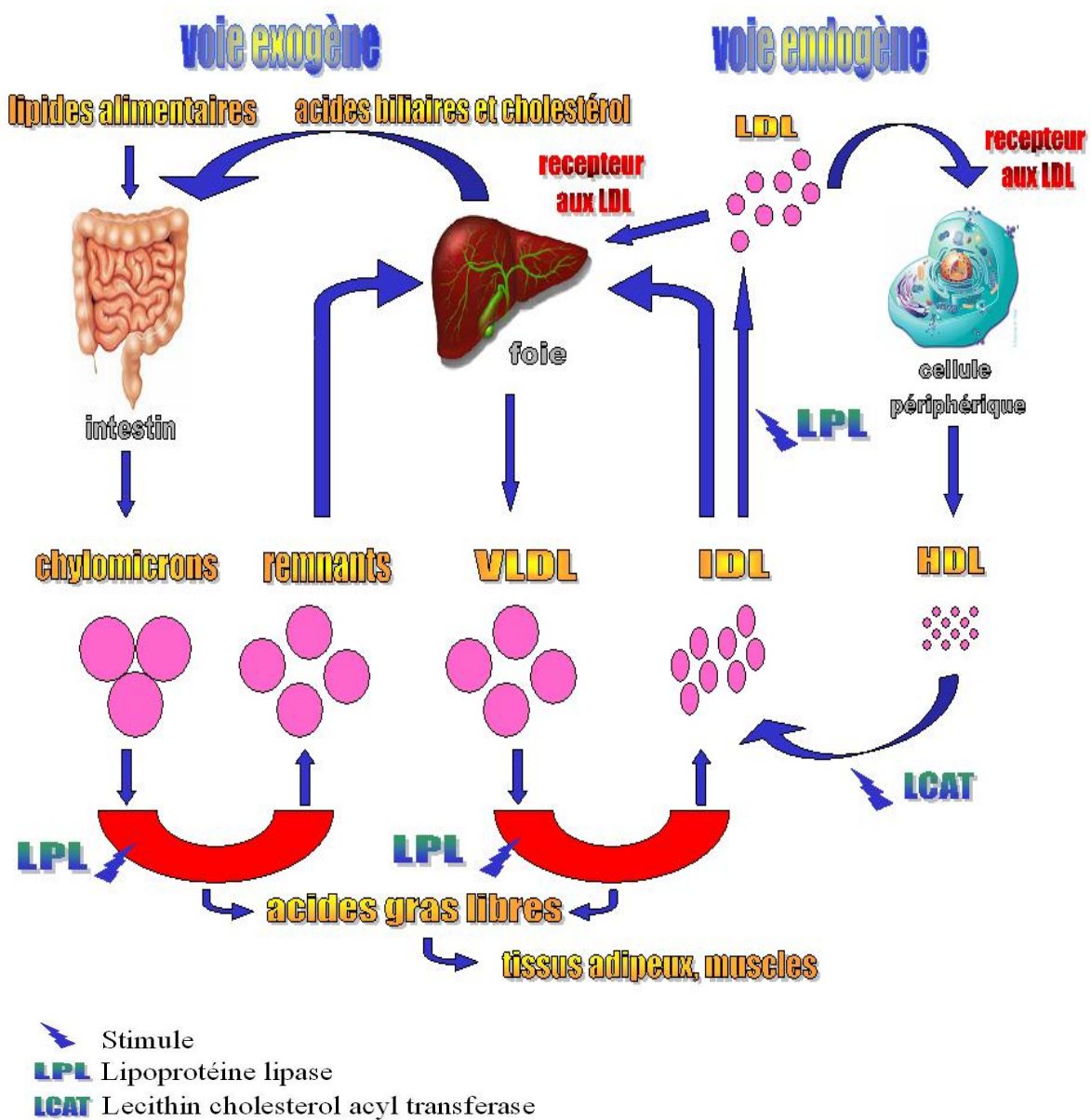


Figure 11 : Métabolisme des lipoprotéines

4.5 Relation entre lipides et infection

L'existence d'anomalies lipidiques au cours des infections bactériennes, virales et parasitaires constitue un phénomène bien connu [Gallin et al, 1969] [Lees et al, 1972]. Chez l'homme, ces perturbations consistent le plus souvent en une diminution du cholestérol total et une augmentation des TG [Alvarez et al, 1986] [Beisel et al, 1970] [Baptista et al, 1996]. Toutes ces perturbations disparaissent avec la guérison complète des sujets [Sammalkorpi et al, 1988]. Chronologiquement, la chute du cholestérol total et des HDL précède la survenue de l'hypertriglycémie. Les mécanismes impliqués dans ces deux dyslipoprotéinémies seraient distincts.

4.5.1 *Modification de la concentration des TG*

L'étude des différentes lipoprotéines sériques a permis de mieux caractériser l'hypertriglycémie. Elle serait due à une augmentation des VLDL, de composition lipidique et protéique normale mais dont la demi-vie est augmentée [Grunfeld et al, 1992]. Plusieurs mécanismes sont envisageables pour expliquer l'hypertriglycémie :

- l'augmentation de la synthèse des VLDL ;
- la lipolyse des tissus adipeux ;
- une diminution de leur catabolisme par inhibition des lipoprotéines lipases périphériques [Grunfeld et al, 1992] [Kereveur et al, 1996] [Phetteplace et al, 2000] [Ducobu et al, 2000].

4.5.1.1 **Augmentation de la synthèse des VLDL**

Diverses cytokines (IFN α , interleukine 1 (IL-1), interleukine 6 (IL-6), TNF α (tumor necrosis factor)) ont des effets sur les paramètres lipidiques. Ces cytokines sont produites par les monocytes et les cellules endothéliales. Elles sont connues pour modifier l'activité des enzymes de la lipogenèse et de la lipolyse, et peuvent être impliquées dans chacune des étapes conduisant à l'hypertriglycémie [Kereveur et al, 1996] :

	TNF	IFN	IL-1	IL-6
Réplication virale	+	-	+	+
Synthèse hépatique des acides gras	+	+	+	+
Lipolyse périphérique	+ ?	ND	0	ND
Lipoprotéine lipase post-héparine	- ?	ND	-	-
Re-esterification des acides gras	+	ND	ND	ND
Synthèse des VLDL				
Catabolisme des VLDL	0	- ?	0	ND
+ : activation ; - : diminution ; 0 : pas d'action ; ? : action discutée ; ND : non documentée				

Figure 12 : Action des cytokines sur le métabolisme des triglycérides

L'action du TNF, *in vivo*, a été étudiée par Grunfeld et al. Ils ont constaté, après l'injection de TNF chez des rats, une élévation prolongée des triglycérides sériques et des VLDL, une augmentation parallèle des taux d'acides gras libres sériques et de glycérol indiquant une lipolyse et une induction de la synthèse hépatique des acides gras. Cette synthèse serait liée à l'augmentation de la concentration hépatique de citrate, activateur de l'acétyl coenzyme A carboxylase, enzyme clé de la lipogenèse [Grunfeld et al, 1992].

D'autres cytokines interviennent dans l'hypertriglycémie. *In vivo*, l'administration conjointe d'IL-1, d'IL-6 et d'IFN α chez les souris, produit une augmentation rapide de la synthèse hépatique *de novo* d'acides gras. L'IL-1 et l'IL-6 augmentent par ailleurs le taux de citrate contrairement à l'IFN suggérant un mécanisme différent. Par contre, l'interleukine 4 (IL-4) est une cytokine qui bloque la capacité de l'IL-1, l'IL-6 et le TNF à stimuler la lipogenèse en agissant sur le taux de citrate. Ainsi il y a une régulation de la réponse immunitaire par les cytokines [Feingold et al, 1992].

4.5.1.2 La lipolyse des tissus adipeux

La lipolyse des tissus adipeux fournit des acides gras permettant la synthèse hépatique accrue de TG. Les acides gras libérés arrivent au foie et au lieu d'être oxydés, ils sont estérifiés de façon à former des TG qui sont sécrétés sous forme de VLDL dans la circulation. L'IL-1 ne stimule pas la lipolyse contrairement à l'IL-6. L'IFN stimule la lipolyse mais les acides gras libérés sont oxydés et forment les corps cétoniques [Khovidhunkit et al, 2004].

4.5.1.3 Diminution de la clairance des VLDL

Il a été montré qu'*in vivo*, le TNF diminue l'action de la LPL dans le tissu épидидymal des rats. Cette diminution d'activité produirait une hypertriglycémie par diminution de la clairance des lipoprotéines riches en TG. Mais, cette diminution nécessite des heures alors que l'augmentation des TG est très rapide. De plus, cette action sur la LPL n'est pas retrouvée dans les autres tissus adipeux et dans les muscles et l'administration de TNF ne modifie pas la clairance des VLDL et des chylomicrons venant de la circulation. En fait, le TNF stimulerait la synthèse *de novo* des acides gras et permettrait la re-estérification des acides gras libres provenant de la lipolyse et ainsi induirait l'hypertriglycémie [Grunfeld et al, 1992].

Il doit y avoir une autre explication à cette baisse de clairance. Chez les rats, des faibles doses de LPS (liposaccharides, constituant majeur de la paroi des bactéries Gram négatif) accroissent la sécrétion des VLDL et augmentent les TG sans en affecter la clairance. Au contraire, des doses élevées inhibent l'élimination des TG en diminuant l'activité de la LPL plasmatique post héparine et l'activité de la LPL dans les tissus adipeux et les muscles [Khovidhunkit et al, 2004].

Les LPS et les cytokines diminuent l'ARNm de l'apo E dans de nombreux tissus incluant le foie et les VLDL des sujets infectés présentent une quantité moindre d'apo E. L'apo E étant nécessaire pour l'élimination des lipoprotéines riches en TG, une diminution de sa concentration contribue à ralentir la clairance observée chez les rats lors de bactériémies [Khovidhunkit et al, 2004].

4.5.2 Modification de la concentration de cholestérol

Des altérations importantes du métabolisme du cholestérol apparaissent lors des infections. Chez les rongeurs, on observe une augmentation du cholestérol par stimulation de la synthèse de cholestérol *de novo*, diminution de la clairance des lipoprotéines et diminution de la conversion du cholestérol en acides biliaires. Par contre, chez l'homme, on observe, une hypocholestérolémie. Cette dernière correspond à une diminution simultanée des HDL et des LDL ainsi que des apolipoprotéines constituant ces lipoprotéines, respectivement l'apo AI et l'apo B100 [Laurila et al, 1999].

4.5.2.1 Modification de la synthèse hépatique du cholestérol

Chez les rongeurs, les LPS stimulent l'activité de l'HydroxyMéthylGlutaryl Coenzyme A reductase (HMG CoA reductase), l'enzyme limitant de la synthèse du cholestérol. L'IL-1, le TNF, l'IL-6 produisent une augmentation retardée du cholestérol. L'IL-1 et le TNF associés stimulent la synthèse *de novo* de cholestérol hépatique en agissant sur l'HMG CoA reductase [Khovidhunkit et al, 2004].

Les mécanismes par lesquels les infections diminuent le cholestérol chez l'homme n'ont pas été étudiés *in vivo*. Des études ont été réalisées *in vitro* sur des cellules humaines d'hépatomes HepG2. L'IL-1 inhibe la synthèse du cholestérol et diminue sa sécrétion et celle de l'apo B. Par contre, l'IL-6 augmente la synthèse du cholestérol mais ne modifie pas sa sécrétion. L'IFN diminue la synthèse de l'apo B [Khovidhunkit et al, 2004].

4.5.2.2 Modification de la clairance des LDL

Chez les rats, les LPS inhibent l'élimination des LDL et augmentent leur concentration plasmatique en diminuant l'expression de la protéine des rLDL hépatiques. Chez les cellules HepG2, l'IL-1, l'IFN β et l'IFN γ mais pas l'IFN α , augmentent l'expression des rLDL permettant l'absorption accrue des LDL par le foie et contribuant à diminuer les LDL circulantes [Kereveur et al, 1996] [Ducobu et al, 2000] [Khovidhunkit et al, 2004].

4.5.2.3 Modification du catabolisme du cholestérol et son excrétion

Chez les rongeurs, le cholestérol retournant au foie est essentiellement métabolisé en acides biliaires représentant la voie principale d'élimination. Les LPS et les cytokines diminuent le catabolisme et l'excrétion du cholestérol en agissant sur les enzymes des différentes voies de synthèse des acides biliaires. Il existe une inhibition de certains enzymes permettant de limiter l'élimination du cholestérol. Une diminution du catabolisme du cholestérol rend le cholestérol plus disponible pour la production de lipoprotéines hépatiques [Khovidhunkit et al, 2004].

4.5.2.4 Modification du métabolisme des HDL et diminution de la voie de retour du cholestérol au foie.

Durant une infection, il y a une diminution marquée des concentrations de HDL et d'apo AI. La composition des HDL semble altérée. L'apo AI est remplacée par l'apo SAA, serum amyloid protein, qui devient alors le composant protéique majeur des HDL3 lors de la phase aiguë de l'infection. Par conséquent, la quantité totale de HDL ne change pas durant les infections sévères mais sa composition en apoprotéines et en cholestérol est modifiée [Van Leeuwen et al, 2003]. Les HDL sont appauvries en CE mais enrichies en cholestérol, TG et acides gras libres. La teneur en apo AII et apo C est diminuée tandis que la teneur en apo E est variable selon les études. La LCAT, la CETP, la HL sont abaissées [Khovidhunkit et al, 2004]. La diminution de la LCAT diminue les HDL en diminuant l'estérification du cholestérol. Les particules de HDL contenant l'apo SAA sont rapidement éliminées de la circulation car elles se lient plus facilement aux neutrophiles et donc jouent un rôle épurateur des endotoxines bactériennes pouvant ainsi expliquer la diminution de la fraction HDL du cholestérol plasmatique [Willemin et al, 1990] [Bentz et al, 1998].

La PLA2 (phospholipase A2 humaine), une protéine sécrétée lors de la phase aiguë, utilise les lipoprotéines comme substrat. Elle diminue la concentration en cholestérol des HDL mais ne modifie pas la concentration en apoprotéines des HDL, ni celles des apoprotéines et du cholestérol des LDL. Il faut noter par ailleurs que la SAA augmente l'activité lipolytique de la PLA2. Ce mécanisme pourrait expliquer la diminution du cholestérol des HDL mais pas celle des LDL [Van Leeuwen et al, 2003].

La lipase endothéliale synthétisée par les cellules endothéliales possède une activité PLA1 (Phospholipase A1). Sa sur-expression abaisse la concentration des HDL. Le traitement des cellules endothéliales par du TNF associé à l'IL-1 montre une augmentation de la lipase induisant donc une diminution des HDL. Si *in vivo* un tel effet se produit, cela pourrait représenter un autre mécanisme de l'abaissement des HDL [Khovidhunkit et al, 2004].

De plus, l'IL-1, l'IL-6 et le TNF entraînent de façon dose dépendante une production d'AcTH (hormone corticotrope) et donc de glucocorticoïdes, utilisant le cholestérol [Willemin et al, 1990] [Bentz et al, 1998].

4.5.3 Les effets athérogènes de ces changements lipidiques

Beaucoup de modifications observées lors des infections sont similaires à celles induisant l'athérogenèse. Quelques études ont suggéré que des agents infectieux comme *Chlamydia pneumoniae* et le cytomégalo virus joueraient un rôle direct dans la formation de lésions athérogènes dans la paroi des vaisseaux. Les changements des lipoprotéines associés à la phase aiguë des infections pourraient être un des liens entre infection/ inflammation et athérosclérose. L'accumulation des VLDL est pro-athérogène. Les VLDL des individus ayant une hypertriglycéridémie, sont toxiques pour les cellules endothéliales. Ils interagissent avec les rLDL et les récepteurs de l'apo B48 des monocytes et des macrophages. Chez les patients atteints par le SIDA (Syndrome d'immunodéficience acquise), les LDL sont plus petites et ont une affinité abaissée pour les rLDL conduisant à une diminution de la clairance et augmentant les LDL circulantes. Ces LDL sont alors oxydées et reconnues par un autre récepteur (scavenger ou éboueur) situé sur la membrane des macrophages. Ces LDL oxydées pénètrent dans les macrophages et subissent une série de réactions aboutissant à un dépôt intracellulaire de CE et transforment les macrophages en cellules spumeuses à l'origine de la strie lipidique [Khovidhunkit et al, 2004].

Les HDL protègent normalement les LDL de l'oxydation. Lors des infections, ils perdent leur fonction anti-oxydante contribuant à la formation de l'athérome [Khovidhunkit et al, 2004].

Il y a aussi des effets directs de l'infection sur les macrophages accroissant les risques d'athérosclérose. Le TNF et l'IL-1 favorisent l'accumulation des lipides dans les macrophages [Khovidhunkit et al, 2004].

4.5.4 Les effets bénéfiques de ces changements lipidiques

Malgré l'augmentation des risques athérogènes, ces changements ont un côté bénéfique puisque les lipoprotéines améliorent la défense de l'hôte contre l'invasion microbiologique.

4.5.4.1 Lipoprotéines et bactéries

Les lipoprotéines incluant les HDL, chylomicrons, VLDL, LDL et Lp(a) ont la capacité *in vitro* de se lier et de neutraliser les LPS des bactéries Gram négatif. Les LPS se lient de façon préférentielle aux HDL mais lors des infections, comme il y a une diminution des HDL, les LPS se lient alors aux VLDL. Cette liaison diminue l'assimilation des LPS par les macrophages hépatiques mais augmente leur capture par les hépatocytes et il en résulte une rapide sécrétion des LPS dans la bile [Khovidhunkit et al, 2004].

L'apo E semble être un composant vital de la protection contre les LPS. En effet, des souris dépourvues d'apo E sont plus susceptibles aux infections par des endotoxines et aux infections par des bactéries Gram négatif. L'apo E possède la propriété de se lier aux endotoxines et de les rediriger vers le foie pour permettre leur élimination [Harris, 2001] [Khovidhunkit et al, 2004].

4.5.4.2 Lipoprotéines et virus

Les lipoprotéines peuvent se lier et neutraliser une grande variété de virus tels que le virus de la rubéole, le virus Epstein-Barr, le VIH, les herpes virus... Les LDL et les VLDL sont particulièrement actives contre certains virus tels que les togavirus (virus de la rubéole) et les rhabdovirus alors que les HDL présentent une activité anti-virale plus large. Les lipoprotéines se lient aux virus grâce à leurs apoprotéines. L'apoAI neutralise plusieurs virus en inhibant la fusion intracellulaire et l'entrée des virus dans les cellules [Khovidhunkit et al, 2004].

Certains virus tels que le virus de l'hépatite C [Seipp, 1997] et les rhinovirus pénètrent dans les cellules par l'intermédiaire du rLDL. L'augmentation des VLDL et des LDL observée chez les rongeurs, semble rivaliser avec ces virus pour leur entrée dans les cellules et protéger ainsi l'hôte contre les infections virales [Khovidhunkit et al, 2004].

4.5.4.3 Lipoprotéines et parasites

Les trypanosomes ne provoquent pas d'infection chez l'homme car ces parasites sont détruits par des facteurs de lyse des trypanosomes. Ces facteurs sont un sous-ensemble des

lipides riches en HDL contenant de l'apo AI en majorité et l'haptoglobin-related protein avec des traces d'apo AII [Feingold et al ,1992] [Khovidhunkit et al, 2004].

La schistosomiase est une infection parasitaire touchant le système portal hépatique. Une résistance à cette infection semble être induite par les lipoprotéines. Les LDL et les LDL oxydés se lient à la surface des schistosomes et après oxydation, ils sont captés par les macrophages par les récepteurs scavengers conduisant à la destruction des parasites [Khovidhunkit et al, 2004].

5 RECHERCHE ET CARACTERISATION DES LIPOPROTEINES DANS LES CRYOGLOBULINES DE PATIENTS ATTEINTS D'HEPATITE C

Lors de l'immunofixation des CG, il a été remarqué que certains patients présentaient, au niveau de la piste témoin ELP, une bande anormale située dans la zone des bêta au dessus du dépôt des CG. Cette bande présente un aspect en « moustache ». La piste ELP est la piste témoin qui représente l'ensemble des protéines présentes dans le cryoprécipité. Les pistes G, A, M sont des pistes immunologiques dans lesquelles il y a un dépôt d'immun-sérums mono-spécifiques anti-chaînes lourdes gamma (G), alpha (A) et mu (M) et anti-chaînes légères libres et liées kappa (K) et lambda (L).

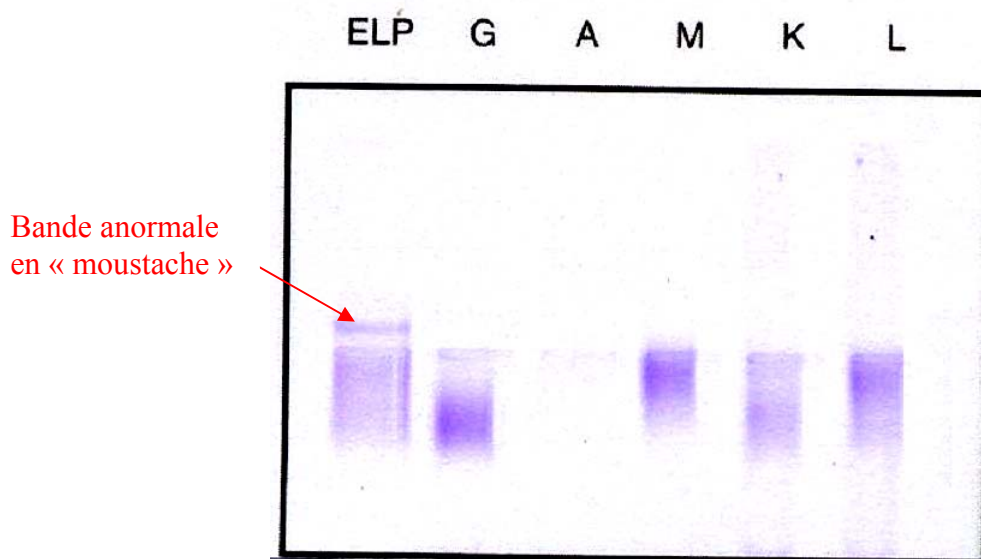


Figure 13 : Immunofixation d'une cryoglobuline d'un patient VHC

Après la prise de renseignements cliniques sur les patients dont la CG présentait cette particularité, il semble que ces derniers soient tous atteints d'hépatite. En effet, cette bande n'est pas retrouvée sur l'immunofixation (support Hydragel IF Sebia) des CG d'autres étiologies (hémopathies malignes, maladies auto-immunes, pathologies infectieuses autres que le VHC) analysées au laboratoire. Sa simple présence sur l'IF d'une CG permet même au laboratoire d'envisager un contexte d'hépatite C, même si le service d'hospitalisation du patient n'est pas l'hépto-gastro-entérologie. Jusqu'à présent, cela a toujours été vérifié. Par contre, pour des CG de faible concentration (< 0.10 g/L) de patients VHC +, cette bande n'est

pas toujours visible, mais c'est alors un problème de sensibilité de la technique d'immunofixation utilisée.

Une étude cherchant à identifier la nature de cette bande et à vérifier si sa présence est bien liée à l'hépatite C a été menée au sein du service de Biochimie du CHU de Nantes par R. Phillipot, D. Le Carrer et J-M. Bard. Ils ont émis l'hypothèse que cette bande correspondait à des lipoprotéines à cause de sa distance de migration correspondant à celle des LDL. En effet, cet aspect est identique et de même localisation que la bande observée sur les électrophorèses des protéines du sérum en gel d'agarose Hydragel déjà identifiée comme étant une bande de lipoprotéines.

Pour cela, une électrophorèse du cryoprécipité de 9 patients atteints de CG dont 6 atteints par le VHC sur Hydragel Lipo + Lp(a) (SEBIA, France) a été réalisée, puis colorée au Noir Soudan (colorant utilisé pour l'identification des lipoprotéines). Des bandes de migration correspondant aux VLDL et LDL ont été mises en évidence uniquement chez les patients atteints par le VHC.

Chez 10 autres patients atteints de CG dont 6 atteints par le VHC, l'électrophorèse a été suivie d'un touch blot afin d'identifier la composition en apolipoprotéines. Chez les 6 patients atteints par le VHC, cette technique a mis en évidence des lipoprotéines essentiellement composées d'Apo B. Chez les 4 autres (non atteints par le VHC), aucune lipoprotéine n'a été mise en évidence.

Il a donc été décidé de réaliser une analyse plus précise des CG des patients infectés par le VHC, incluant un dosage d'Apo B et la recherche d'immuns complexes Apo B-IgG et Apo B-IgM.

5.1 Patients

Nous avons inclus dans notre étude, vingt et un patients atteints d'hépatite C suivis dans le service d'Hépatogastroentérologie du CHU de Nantes. Les renseignements cliniques, biologiques et démographiques concernant ces patients ont été obtenus grâce à la banque de données sur les patients VHC + du Service d'Hépatogastroentérologie du CHU de Nantes.

Sexe M/F	Age (ans)	Ancienneté de la contamination (ans)	BMI	type cryoglobuline	Génotype VHC
M	71	24	22,49	2b	1b
M	38	19	26,85	QIP	4
M	45	22	22,09	QIP	1b
M	49	19	26,4	2b	1a
F	74	17	30,47	2a	2k
M	60	18	23,32	QIP	2c
M	43	25	32,98	2b	1a
F	45	25	22,39	IgG1 + IgM1	1a
M	67	31	28,41	3	1b
M	42	18	22,79	2a	4
M	38	18	19,61	2a	1a
M	45	25	28,33	2b/3	3a
M	46	27	20,83	3	1a
M	56	21	24,21	3	1b
F	60		27,55	2a	1b
F	65	29	26,22	2a	1b
M	84	19	28,13	3	2a
M	39	22	21,51	3	1a
M	46	28	24,22	3	3a
F	68		27,55	QIP	2b
M	55	36	26,23	2a	1b

BMI =Body Mass Index. Il est calculé en divisant le poids en kg par la taille en m au carré.

QIP = Quantité Insuffisante pour l'identification.

Tableau 9 : Descriptif des patients inclus dans notre étude

Parmi ces 21 patients, 76 % sont des hommes et 24 % des femmes. L'âge moyen est de $54,1 \pm 13,3$ ans. L'âge moyen à la date de la contamination est de $29,7 \pm 14,3$ ans. Le BMI moyen est de $25,36 \pm 3,41$. La quantité moyenne de CG est de $0,19 \pm 0,3$ g/l.

La distribution du génotype viral est : 1a (28,57 %), 1b (33,33 %), 2a (4,76 %), 2b (4,76 %), 2c (4,76 %), 2k (4,76 %), 3a (9,52 %), 4 (9,52 %).

5.2

Méthodes

Les sérums des patients étaient envoyés au service de Biochimie Spécialisée du CHU de Nantes pour la détection et le typage des CG. Une fois la mise en évidence de la CG et le typage faits, ces échantillons étaient congelés soit tels quels, soit après avoir été concentrés.

5.2.1 Dosage des cryoglobulines

Le dosage des cryoglobulines est un dosage de protéines. La technique utilisée est une technique colorimétrique au Bleu de Coomassie (Total Protein Test Kit Bio-Rad) [Macart et al, 1982]. Le dosage se fait sur le cryoprécipité isolé et lavé. Les molécules protéiques se lient au réactif. La coloration obtenue est proportionnelle au taux de protéines en solution. La lecture se fait au spectrophotomètre Beckman DU® 7500 à une longueur d'onde de 595 nm. L'intervalle de détection est compris entre 0,05 et 20g/l.

5.2.2 Dosage de l'Apo B

5.2.2.1 Matériel

- Plaque de microtitration à 8 puits, nunc, (Polylabo)
- Support pour barrettes (Polylabo)
- Spectrophotomètre : Spectra Max Pro 190 (Molecular Devices)

5.2.2.2 Réacti

- PBS 0.1 M pH 7.4 (Life technologies)
- BSA sans acides gras libres (A6003, Sigma)
- Tampon de dilution (TD) : 1g/L de BSA dans du PBS 0.1 M pH 7.4
- ABTS (tampon 1112597, tablettes 50mg 1112422, roche Diagnostics)
- Préparations biologiques :
- Anti-apolipoprotéine B (Annexe)
- Standard SEBIA : lot 14020

Apo B : 0.81g/l

5.2.2.3 Méthode

5.2.2.3.1 Sensibilisation des plaques

Les anticorps anti-ApoB sont déposés dans les puits de la plaque de microtitration à raison de 100µl par puits à la concentration de 20µg/ml. Les plaques sont incubées une nuit à 4°C.

5.2.2.3.2 Saturation des sites de fixation

Les plaques sont lavées 4 fois avec 200µl de PBS. Puis, on dépose 200µl de tampon de dilution par puits, afin de saturer les puits et d'éviter les fixations non spécifiques. On incube les plaques 2 heures à 37°C, puis les plaques sont lavées 4 fois avec du PBS 0.01M.

5.2.2.3.3 Dilution et dépôts des échantillons

On effectue les dilutions de la gamme. Le standard est dilué de 1/250 à 1/32 000 dans du TD. Les échantillons sont dilués de 1/10 à 1/100 dans du TD. La gamme est déposée en double et les cryoglobulines en triple, dans les puits sensibilisés avec les anti-ApoB à raison de 100µl. Un contrôle est lui aussi déposé en triple et dans quelques puits sont déposés 100µl de TD, ces puits servant de blancs. L'incubation est de 2 heures à 37°C, puis les plaques sont lavées 4 fois avec 200µl de PBS 0.01M.

5.2.2.3.4 Dépôt du deuxième anticorps marqué

Les anticorps anti-ApoB marqués à la peroxydase sont dilués au 1/1 200^e dans du TD. L'anticorps est déposé à raison de 100µl dans tous les puits de la plaque et les plaques sont incubées à 37°C pendant 2 heures puis lavées à nouveau 4 fois avec 200µl de PBS 0.01M

5.2.2.3.5 Révélation et lecture

Le révélateur ABTS est obtenu en dissolvant une tablette de 50mg dans 50 ml de tampon. On dépose 200µl d'ABTS® dans chaque puits. On incube les plaques 30 minutes à 37°C à l'obscurité. La lecture se fait au spectrophotomètre à 405 nm après 30 minutes.

5.2.2.3.6 Expression des résultats (logiciel soft max pro du spectrophotomètre)

On rentre la température et la longueur d'onde utilisées ainsi que la disposition et les concentrations de la gamme standard, la disposition et les dilutions du contrôle et des échantillons.

Après avoir choisi la courbe de régression appropriée (ici 4 paramètres), et après lecture, les résultats sont obtenus directement.

5.2.3 *Dosage des immuns complexes*

La technique de dosage de l'Apo B a été validée [Ferrer F, 2002]. En se basant sur le même principe, nous avons réalisé le dosage d'immuns complexes Apo B-IgG et Apo B-IgM. Pour cela, nous avons utilisé des anticorps anti-IgG marqués à la peroxydase dilués au 1/30 000 dans du TD et des anticorps anti-IgM marqués à la peroxydase dilués au 1/25 000 dans du TD pour révéler les immuns complexes préalablement retenus sur la plaque de microtitration sensibilisée par l'anticorps anti-Apo B.

Pour le dosage Apo B-IgG, le standard était dilué de 1/2 à 1/150 dans du TD. Les échantillons étaient dilués de 1/10 à 1/80 dans du TD.

Pour le dosage Apo B-IgM, le standard était dilué de 1/10 à 1/3 000 dans du TD. Les échantillons étaient dilués de 1/80 à 1/160 dans du TD.

Nous avons choisi ces dilutions parce qu'elles permettaient d'obtenir une courbe linéaire sur une plage suffisamment large et la plupart des échantillons donnaient une densité optique dans cette zone linéaire.

Du fait de la faible quantité de CG à notre disposition, nous n'avons pas pu valider ces méthodes en terme de reproductibilité / répétitivité et n'avons pu obtenir un standard permettant l'expression des résultats en concentrations. Nous donnerons donc des résultats en valeurs arbitraires.

5.3 Résultats

5.3.1 Influence de la cirrhose

Nous avons comparé deux groupes de patients par un test t de Student : ceux ayant une cirrhose et ceux sans cirrhose. Deux patients ont été exclus de cette étude car nous n'avions pas ce renseignement clinique.

	Cirrhose = 0	cirrhose = 1	p
	moyenne +/- écart-type	moyenne +/- écart-type	
Age (ans)	50,8 +/- 13,8	55,0 +/- 10,1	0,3639*
Age à la date de la contamination (ans)	28,3 +/- 13,8	28,2 +/- 11,0	0,9080*
Ancienneté de la contamination (ans)	21,4 +/- 4,7	25,3 +/- 5,5	0,1346
Ancienneté du diagnostic à la date de l'examen (ans)	7,2 +/- 2,9	6,0 +/- 4,5	0,5112
Consommation d'alcool (g/j)	19,9 +/- 26,6	40,1 +/- 74,9	0,9916*
BMI (kg/m ²)	26,0 +/- 4,4	24,8 +/- 2,5	0,4407
ALAT	1,8 +/- 1,3	3,1 +/- 2,6	0,1811*
ASAT	1,6 +/- 1,1	2,9 +/- 1,7	0,0840*
IgG (g/l)	14,2 +/- 3,9	21,5 +/- 11,5	0,0863
IgA (g/l)	2,2 +/- 1,2	2,8 +/- 1,0	0,3101
IgM (g/l)	1,6 +/- 1,3	2,7 +/- 1,1	0,0723
Cryoglobuline (g/l)	0,3 +/- 0,4	0,1 +/- 0,1	0,4156*
Apo B (mg/ml)	1,4 +/- 2,3	1,1 +/- 0,7	0,4045*
Apo B-IgG (UA)	1,1 +/- 1,9	0,5 +/- 0,8	0,8123*
Apo B-IgM (UA)	9,0 +/- 7,2	3,2 +/- 2,3	0,7184*

* : probabilité obtenue en utilisant le logarithme de la variable ; ALAT : expression des ALAT en nombre de fois la limite supérieure de la normale des transaminases ALAT ; ASAT : expression des ASAT en nombre de fois la limite supérieure de la normale des transaminases ASAT

Apo B-IgG et Apo B-IgM sont données en valeurs arbitraires

Tableau 10 : Comparaison des résultats selon l'existence ou non d'une cirrhose

Les deux groupes sont comparables en âge, ancienneté de contamination, consommation d'alcool, BMI et au niveau des paramètres biologiques mesurés.

5.3.2 Influence du score Metavir A

Nous avons comparé les patients en fonction de leur score Metavir A (activité inflammatoire) par un test t de Student. Nous avons regroupé le Metavir A = 0 et le Metavir A = 1 contre Metavir A = 2 ou 3. Deux patients ont été exclus de cette étude par manque de données.

	Metavir A = 0 ou 1	Metavir A = 2 ou 3	p
	moyenne +/- écart-type	moyenne +/- écart-type	
Age (ans)	40,2 +/- 3,9	56,4 +/- 11,0	0,0059*
Age à la date de la contamination (ans)	18,5 +/- 1,3	31,2 +/- 12,3	0,0351*
Ancienneté de la contamination (ans)	21,8 +/- 4,5	24 +/- 5,7	0,4829
Ancienneté du diagnostic à la date de l'examen (ans)	7,0 +/- 3,4	6,5 +/- 3,9	0,8341
Consommation d'alcool (g/j)	73,5 +/- 112,2	19,1 +/- 28,0	0,3560*
BMI (kg/m ²)	23,0 +/- 3,2	26 +/- 3,4	0,1361
ALAT	1,9 +/- 1,1	2,6 +/- 2,3	0,8587*
ASAT	1,8 +/- 1,2	2,4 +/- 1,7	0,6304*
IgG (g/l)	12,0 +/- 1,0	19,6 +/- 10,0	0,1534
IgA (g/l)	2,2 +/- 0,8	2,6 +/- 1,2	0,4343
IgM (g/l)	2,1 +/- 1,6	2,1 +/- 1,3	0,8939
Cryoglobuline (g/l)	0,1 +/- 0,1	0,2 +/- 0,3	0,1971*
Apo B (mg/ml)	0,8 +/- 0,7	1,4 +/- 1,8	0,6921*
Apo B-IgG (UA)	1,6 +/- 2,3	0,4 +/- 0,7	0,7153*
Apo B-IgM (UA)	5,8 +/- 7,0	6,2 +/- 6,0	0,2115*

* : probabilité obtenue en utilisant le logarithme de la variable ; ALAT : expression des ALAT en nombre de fois la limite supérieure de la normale des transaminases ALAT ; ASAT : expression des ASAT en nombre de fois la limite supérieure de la normale des transaminases ASAT

Apo B-IgG et Apo B-IgM sont données en valeurs arbitraires

Tableau 11 : Comparaison des résultats en fonction du score Metavir A des patients

On constate que les patients ayant un score Metavir A élevé (=2 ou 3) sont plus âgés que ceux ayant un score Metavir A = 0 ou 1. Ils sont aussi en moyenne plus âgés à la date de la contamination par rapport à ceux ayant un score Metavir A = 0 ou 1. Par contre, on n'observe pas de différence concernant les paramètres biologiques que nous avons évalués.

5.3.3 Influence du score Metavir F

Nous avons comparé les patients en fonction de leur score Metavir F (fibrose) par un test t de Student. Nous avons regroupé les scores Metavir F = 0,1 ou 2 contre Metavir F = 3 ou 4. Deux patients ont été exclus de cette étude par manque de données.

	Metavir F = 0 ou 1 ou 2	Metavir F = 3 ou 4	p
	moyenne +/- écart-type	moyenne +/- écart-type	
Age (ans)	53,1 +/- 15,0	52,9 +/- 10,5	0,9032*
Age à la date de la contamination (ans)	30,7 +/- 15,3	26,9 +/- 10,4	0,6494*
Ancienneté de la contamination (ans)	21,3 +/- 5,1	24,6 +/- 5,4	0,2387
Ancienneté du diagnostic à la date de l'examen (ans)	7,6 +/- 3,2	6,0 +/- 4,0	0,4028
Consommation d'alcool (g/j)	17,7 +/- 27,4	38,0 +/- 68,6	0,6965*
BMI (kg/m ²)	25,5 +/- 3,9	25,3 +/- 3,0	0,8948
ALAT	1,8 +/- 1,2	2,9 +/- 2,5	0,6776*
ASAT	1,4 +/- 0,7	2,8 +/- 1,7	0,2045*
IgG (g/l)	12,6 +/- 1,6	21,2 +/- 10,6	0,0506
IgA (g/l)	2,0 +/- 0,7	2,8 +/- 1,2	0,1356
IgM (g/l)	1,6 +/- 1,5	2,5 +/- 1,1	0,1406
Cryoglobuline (g/l)	0,3 +/- 0,5	1,2 +/- 0,2	0,9351*
Apo B (mg/ml)	1,6 +/- 2,6	1,1 +/- 0,7	0,4322*
Apo B-IgG (UA)	1,6 +/- 2,3	0,4 +/- 0,7	0,7153*
Apo B-IgM (UA)	6,5 +/- 5,0	5,9 +/- 6,7	0,6262*

* : probabilité obtenue en utilisant le logarithme de la variable ; ALAT : expression des ALAT en nombre de fois la limite supérieure de la normale des transaminases ALAT ; ASAT : expression des ASAT en nombre de fois la limite supérieure de la normale des transaminases ASAT

Apo B-IgG et Apo B-IgM sont données en valeurs arbitraires

Tableau 12 : Comparaison des résultats en fonction du score Metavir F des patients

On constate que contrairement au score Metavir A, pour le score Metavir F, il n'y a pas de différence d'âge. Il semble par contre que le taux d'IgG soit significativement plus élevé chez les patients ayant un score Metavir F élevé (21,2+/-10,6 vs 12,6+/-1,6, $p = 0.0506$). Les paramètres justifiant notre étude ne diffèrent pas selon le score Metavir F.

5.3.4 Corrélations simples entre les différentes variables

Nous avons utilisé le logarithme népérien pour les variables dont la distribution n'est pas normale. Nous présentons uniquement les corrélations significatives ($p < 0.05$) ou proches de la signification ($p < 0.10$).

	Coefficient	p
Ancienneté du diagnostic lors de l'étude	0.44757	0.0625
Quantité de cryoglobuline	0.49382	0.0269
Consommation d'alcool	0.68303	0.0205

Tableau 13 : Corrélations simples de l'Apo B avec les autres variables

Trois paramètres semblent corrélérer avec la concentration d'Apo B : l'ancienneté du diagnostic lors de l'étude, la quantité de cryoglobuline et la consommation d'alcool.

	Coefficient	p
Ancienneté du diagnostic lors de l'étude	0,80795	0,0518
BMI	-0,88991	0,0175

Tableau 14 : Corrélations simples entre l'Apo B-IgG et les autres variables

Deux paramètres semblent corrélérer avec la concentration d'Apo B-IgG : l'ancienneté du diagnostic lors de l'étude et le BMI. Cette liaison est négative concernant le BMI.

En ce qui concerne les complexes immuns Apo B-IgM, nous n'avons pas trouvé de corrélations simples avec les différents variables étudiées.

5.3.5 Régressions multiples « pas à pas » entre les différentes variables

Afin de déterminer quels étaient les paramètres qui influençaient indépendamment les variables auxquelles nous nous sommes intéressés, nous avons réalisé une régression multiple pas à pas entre l'une des variables d'intérêt (Apo B, Apo B-IgG, Apo B-IgM) et les autres variables.

Nous avons utilisé le logarithme népérien pour les variables dont la distribution n'est pas normale. Nous présentons uniquement les corrélations significatives ($p < 0.05$) ou proches de la signification ($p < 0.10$)

	β	p	R ² partiel
Apo B (mg/ml)	5,18938	0,0827	0,6872
Ancienneté de la contamination (ans)	-0,20399	0,0187	0,3013

Tableau 15 : Paramètres liés à la quantité de cryoglobuline

La concentration d'Apo B dans la cryoglobuline explique fortement la concentration totale de celle-ci, mais à concentration d'Apo B égale, la cryoglobuline semble diminuer avec l'ancienneté de la contamination.

	B	p	R ² partiel
Cryoglobuline (g/l)	0,19018	0,0827	0,6872
Ancienneté de la contamination (ans)	0,039	0,02	0,3005

Tableau 16 : Paramètres liés à la concentration d'Apo B

Une très forte relation existe entre la quantité de cryoglobuline observée et la concentration d'Apo B dans cette cryoglobuline mais l'ancienneté de la contamination influence positivement la concentration d'Apo B dans la cryoglobuline, à quantité de cryoglobuline égale.

	B	p	R ² partiel
ApoB-IgM	-0,74652	0,001	0,9823
BMI	-0,34233	0,088	0,0147
Apo B (mg/ml)	-0,84756	0,0581	0,0029

Tableau 17 : Paramètres liés à la concentration de l'immun complexe Apo B-IgG

Trois paramètres semblent être liés à la concentration d'Apo B-IgG indépendamment les uns des autres : la concentration des complexes Apo B-IgM, la concentration d'Apo B et le BMI. Cette liaison est négative.

	B	p	R ² partiel
ApoB-IgG	-1,03735	0,001	0,9823
Metavir A	1,06344	0,0995	0,0143
Age lors de la contamination (ans)	-1,04937	0,043	0,0033

Tableau 18 : Paramètres liés à la concentration de l'immun complexe Apo B-IgM

La concentration de l'immun complexe Apo B-IgM est influencée négativement par la concentration d'Apo B-IgG et par l'âge lors de la contamination. Par contre, le score Metavir A influence positivement cette concentration indépendamment des autres paramètres.

5.4 Discussion

La première partie de notre travail repose sur l'étude des différents paramètres démographiques et biologiques des patients en fonction de la clinique.

La deuxième partie a permis de déterminer si dans les CG, on retrouve la présence d'Apo B et de complexes immuns Apo B-IgG et Apo B-IgM et de savoir si leur quantité est corrélée aux paramètres démographiques et biologiques.

Notre étude présente de nombreux biais et donc représente une première étape dans l'exploration des CG. Premièrement, notre étude a été réalisée sur 21 patients, ce qui représente un faible échantillon. Un deuxième biais consiste en l'absence de données pour tous les patients. Par ailleurs, nous avons effectué nos mesures sur des échantillons qui, pour certains, ont pu être concentrés, ce qui engendre des concentrations fausses en valeur absolue. De plus, la qualité des méthodes de dosage des immuns complexes n'a pu être déterminée complètement, faute de quantité d'échantillon. De ce fait, nous avons utilisé des valeurs arbitraires pour l'expression des immuns complexes.

5.4.1 *Etude des paramètres démographiques et biologiques en fonction de la clinique*

Tous les génotypes du VHC sont retrouvés avec des proportions différentes. Les génotypes 1a et 1b sont les plus représentés. En effet, ces deux génotypes sont les plus communs en Europe de l'ouest [Bentolila et al, 1994]. Mais notre étude concerne 21 patients ce qui représente un faible échantillon et donc on ne peut conclure sur le rôle particulier de ces 2 génotypes dans la production de CG. De plus, de nombreuses études montrent une absence de corrélation entre un génotype particulier et la présence de CG [Pawlotsky et al, 1995] [Polzien et al, 1997] [Weiner et al, 1998], [Horcajada, 1999], [Cacoub et al, 2000b].

Aucune différence significative n'a été trouvée entre le groupe ayant une cirrhose et celui sans, en ce qui concerne l'âge, l'ancienneté de la contamination, le BMI et les paramètres biologiques suivants : ALAT, ASAT, IgG, IgM, IgA, cryoglobuline et les dosages d'Apo B et de complexes immuns dans les CG. Ceci est en accord avec les études de Schmidt

et de Kayali pour lesquels la CG est significativement associée à la cirrhose indépendamment de l'âge, du sexe et de la durée de l'infection [Schmidt et al, 2000] [Kayali, 2002]. De même, d'autres études ont montré que le taux de CG et la sévérité des manifestations cliniques pouvant être liées à la CG ne sont pas différentes chez les patients cirrhotiques et les non cirrhotiques [Lunel et al, 1994b] [Musset et al, 1996].

Chez les patients ayant un score Metavir A élevé (Metavir A = 2 ou 3), c'est à dire ayant une fibrose avec une activité nécro-inflammatoire importante, on a constaté qu'ils étaient plus âgés au moment de l'étude mais aussi au moment de leur contamination. Cette activité nécro-inflammatoire semble indépendante de l'ancienneté de la contamination, de la consommation d'alcool et des différents paramètres biologiques.

Le score Metavir F indique le degré de la fibrose. Dans notre étude, le groupe de patients ayant un score Metavir F élevé (Metavir F = 3 ou 4) semble être identique à celui ayant un score faible sauf pour le dosage d'IgG. Le dosage d'IgG est plus élevé chez les personnes ayant un score Metavir F élevé (21,2 +/- 10,6 vs 12,6 +/- 1,6, $p = 0.0506$). Ce constat est en accord avec l'étude de Watt et al qui ont montré une corrélation entre le dosage d'IgG et le stade de fibrose [Watt et al, 2004]. Par contre, ils trouvaient une corrélation entre le stade de fibrose et le dosage des IgA, ce qui n'est pas notre cas. Cela est peut être du au faible échantillon de patients que nous avons observé.

Dans l'hépatite chronique C, l'évolution de la fibrose et sa vitesse de progression sont très variables selon les individus. Des facteurs liés au virus, à l'environnement et à l'hôte sont associés à la progression de la fibrose. Il s'agit du sexe masculin [Poynard et al, 1997] [Poynard et al, 2001] [Bedossa, et al 2002] [Cholet et al, 2004], de l'âge lors de la contamination [Poynard et al, 1997] [Poynard et al, 2001] [Ortiz et al, 2002], un BMI>25 [Ortiz, et al 2002] [Cholet et al, 2004], une consommation d'alcool >50g/j [Poynard et al, 1997] [Poynard, et al 2001] [Cholet et al, 2004], la durée de l'infection [Cholet, 2004], la co-infection VHC-VIH [Bedossa, 2002] [Marcellin, 2002]. Par contre, le génotype du VHC [Poynard et al, 1997] [Poynard et al, 2001] [Marcellin et al, 2002], la virémie [Hourigan et al, 1999] [Poynard et al, 2001] [Marcellin et al, 2002], le mode d'infection [Poynard et al, 2001] [Cholet et al, 2004] ne semblent pas liés à la progression de la fibrose. Dans notre étude, nous n'avons pas pu retrouver ces résultats probablement à cause de la faiblesse de l'effectif.

5.4.2 Présence d'Apo B et d'immuns complexes dans les cryoglobulines et corrélations avec les paramètres démographiques et biologiques

L'étude réalisée au Service de Biochimie Spécialisée du CHU de Nantes par Rozenn Phillipot, Didier Le Carrer et Jean-Marie Bard a montré la présence de VLDL et LDL dans les CG par électrophorèse et la présence de lipoprotéines composées d'Apo B.

La présence de lipoprotéines dans les CG a déjà été mentionnée dans 2 études [Linscott et al, 1975] [Kodama,1977] mais dans les deux cas, c'était chez 1 patient atteint d'un xanthome plan. Elle n'a jamais été mentionnée dans les CG de patients atteints d'hépatite C.

Notre recherche d'Apo B par la technique ELISA a montré qu'elle était présente dans toutes les CG étudiées. Cela confirme donc l'étude réalisée précédemment.

Les études de régression multiple montrent une très forte liaison entre la quantité de cryoglobuline et la concentration d'Apo B, cette dernière contribuant à 68.7 % de la variance de la quantité de la cryoglobuline. Cela suggère que l'Apo B serait le principal constituant de la cryoglobuline. Par ailleurs, l'Apo B augmente avec l'ancienneté de la contamination à quantité de cryoglobuline égale, tandis que la quantité de cryoglobuline diminue avec l'ancienneté de la contamination à concentration d'Apo B égale. Cela pourrait s'expliquer par le fait que plus l'ancienneté de la contamination est importante, plus l'Apo B représente le composant principal de la cryoglobuline. Cependant ces résultats sont à prendre avec réserve, compte tenu de la faiblesse de l'effectif.

Dans un deuxième temps, nous avons aussi montré que des complexes immuns Apo B-IgG et Apo B-IgM se trouvaient dans les CG.

Le fait que le BMI contribue négativement à la concentration du complexe immunitaire Apo B-IgG pourrait refléter une relation inverse entre la présence de cet immun complexe et l'état de santé général du sujet. On peut, en effet, penser qu'un relatif bon état de santé, associé à un poids plus élevé, est rarement observé chez les sujets présentant une forte concentration de complexe immunitaire Apo B-IgG.

La liaison négative observée entre l'Apo B-IgG et l'Apo B-IgM en régression multiple suggère, par ailleurs, que ces immuns complexes seraient exclusifs l'un de l'autre. La cryoglobuline serait constituée en majorité soit de complexes Apo B-IgG, soit de complexes Apo B-IgM.

Enfin, la relation entre le score Metavir A et la concentration de complexes Apo B-IgM suggère qu'en cas d'activité inflammatoire importante, c'est plutôt de complexes immuns Apo B-IgM qu'est constituée la cryoglobuline.

CONCLUSION

Chez les patients atteints par le virus de l'hépatite C, il apparaît qu'un score élevé de Métavir A soit associé à un âge plus avancé lors de l'étude, mais également lors de la contamination. De plus, un score élevé de Métavir F semble lié à une concentration plus importante en IgG.

Notre étude a montré que des lipoprotéines étaient présentes dans les cryoglobulines. L'Apo B serait même le principal composant de ces dernières lorsque la contamination est ancienne.

Les cryoglobulines seraient constituées soit de complexes immuns Apo B-IgM notamment lorsque l'activité inflammatoire est importante, soit de complexes immuns Apo B-IgG. Un relatif « bon état de santé » associé à un poids plus élevé est rarement observé avec une concentration d'Apo B-IgG élevée.

Nous avons ainsi mis en place une méthode d'étude des cryoglobulines qui pourrait représenter un intérêt dans l'exploration des sujets porteurs du virus de l'hépatite C. Nos résultats doivent être considérés avec réserve, compte tenu de la faiblesse de l'effectif évalué, mais ils apportent des arguments en faveur d'une mise au point complète et d'une amélioration des qualités de la méthode en raison des informations qu'elle pourrait apporter au biologiste et au clinicien confrontés à cette pathologie.

ANNEXE

Production de l'anti-apolipoprotéine B

PRINCIPES :

Les anticorps anti-apo B purifiés sont obtenus en 3 grandes étapes :

-Préparation des LDL : L'apolipoprotéine B est isolée à partir des LDL plasmatiques humaines provenant de sérums dépourvus de Lp(a).

-Production des anticorps : Ces LDL sont injectées en intramusculaire à des poules pondeuses ; celles-ci vont alors produire des anticorps anti-apo B humaine.

-Purification des anticorps : Ces anticorps sont extraits des jaunes d'œufs puis sont purifiés par chromatographie d'affinité sur colonne-LDL.

REFERENCES :

-FIEVET C. *et al.*- Non competitive enzyme-linked immunoassay for apolipoprotein B in serum – *Clinical Chemistry*, 1984, **30** : 98-100.

-LARSSON A. – Chicken antibodies : a tool to avoid false positive results by rheumatoid factor in latex fixation tests – *Journal of Immunological Methods*, 1988, **108** : 205-208.

-POLSON A.- Isolation of IgY from the yolks eggs by chloroform polyethylene glycol procedure – *Immunological Investigations*, 1990, **19** : 253-258.

SOLUTIONS ET PRODUITS :

-Préparation des LDL :

Solution de KBr de densité 1.040 et 1.053 .

Ammonium bicarbonate (Sigma).

-Production des anticorps anti-apo B :

Adjuvant complet de Freund (Sigma) .

Adjuvant incomplet de Freund (Sigma).

-Purification des anticorps :

PBS 0.01 M pH 7.4 (Life Technologies).

Solution de PEG 6000 (Fisher Scientific) à 30% (P/V dans de l'eau distillée, conservation à 4°C).

Chloroforme pour analyses(Prolabo).

Tampon phosphate 0.05 M KH_2PO_4 –Panréac et K_2HPO_4 -Prolabo), NaCl 0.1 M (Fluka), pH 7.4.

Tampon glycine 0.2 M (sigma), pH 2.5 ajusté avec de l'acide chlorhydrique.

Tampon phosphate 0.05 M, NaCl 0.1 M, NaN_3 0.01% (sigma) (P/V).

MATERIEL :

-Préparation des LDL :

Ultracentrifugeuse : Centrikon T2060 (Kontron instruments).

Rotor : RP55T (Hitachi) fixe.

-Purification des anticorps anti-apo B humains :

Centrifugeuse : BH 100D (Bitzer Hermeta).

Centrifugeuse : GS-15R (Beckman) .

Tubes : tubes coniques en polyallomer de 50 ml (Fisher Scientific).

Appareil : système BioLogic LP chromatography (BioRad).

Colonne : CNBr-activated Sépharose 4B (Pharmacia) couplée avec des LDL purifiées de densité 1.040 à 1.053.

METHODE :

-Préparation des LDL :

Isoler les LDL par ultracentrifugation .

Dialyser les LDL obtenues contre de l'ammonium bicarbonate 5mM.

Vérifier la pureté des LDL par électrophorèse sur gel de polyacrylamide suivie d'un immunoblot.

-Production des anticorps anti-apo B :

Injecter en intramusculaire tous les 15 jours des LDL à des poules pondeuses :

500µg de LDL dans de l'adjuvant complet de Freund : 1^{ère} injection.

250µg de LDL dans de adjuvant incomplet de Freund : 2^{ème} injection.

100µg de LDL dans de l'adjuvant incomplet de Freund, 4 fois : 3^{ème} injection.

Récupérer les œufs 7 jours après la première injection, noter dessus la date de ponte et les conserver à 4°C avant extraction des anticorps.

-Purification des anti-apo B humains :

Récupérer le jaune d'œuf , le laver à l'eau déminéralisée pour éliminer l'albumine.

Diluer le jaune dans 2 volumes de PBS pH 7.4, mélanger.

Ajouter un volume de chloroforme, agiter jusqu'à émulsion.

Centrifuger à 1000g, 30 min à température ambiante.

Récupérer le surnageant et le porter à 12 % (P/V) de PEG avec une solution de PEG à 30 % (volume de PEG à ajouter = ((vol de surnageant récupéré x 12)/18)).

Mélanger et centrifuger à 3000g, 30 min à température ambiante.

Récupérer le culot contenant les immunoglobulines totales (IgY) dans ca 4 ml de PBS à pH7.6.

Doser ces IgY par la méthode de Folin-Lowry.

Les congeler à -20°C avant purification des anti-apo B.

La colonne de LDL est réalisée selon les instructions de Pharmacia bioTech (couplage de LDL purifiées au bromure de cyanogène immobilisée sur des billes d'agarose).

Equilibrer la colonne avec du tampon phosphate jusqu'à stabilisation de la ligne de base.

Décongeler environ 10 ml d'immunoglobulines totales contenant entre 1 et 5 % d'anticorps anti-apo B.

Les injecter.

Rincer la colonne avec du tampon phosphate pour éliminer la fraction non retenue jusqu'au retour à la ligne de base.

Eluer les anticorps anti-apo B avec du tampon glycine.

Collecter les anticorps.

Les neutraliser par du phosphate et les conserver à 4°C.

Dialyser de façon extensive contre du PBS .

Faire un dosage de protéines au rouge de pyrogallol et concentrer les anticorps dans du PEG jusqu'à ca 4mg/ml.

Dialyser contre du PBS.

Vérifier la pureté des anticorps par électrophorèse sur gel de polyacrylamide suivie d'un immunoblot.

Doser à nouveau les anticorps et conserver à -20°C jusqu'à utilisation.

En parallèle, équilibrer la colonne à pH 7 avec du tampon phosphate

LEXIQUE

Acrocyanose : Cyanose (coloration bleue de la peau due à un trouble circulatoire, à une altération de l'oxyhémoglobine ou à un trouble de l'hématose) des extrémités

Agglutinine : Anticorps ayant la propriété de provoquer l'agglutination de bactéries ou d'hématies auxquelles il correspond spécifiquement

Angiome : Malformation constituée par une prolifération de vaisseaux sanguins. Production pathologique circonscrite constituée par une agglomération de vaisseaux sanguins (hémangiome) ou lymphatiques (lymphangiome) de nouvelle formation hyperplasiés et ectasiés. Ce n'est pas une tumeur, mais une malformation du système vasculaire

Apoptose : Processus actif d'autodestruction par fragmentation de certaines cellules (lymphocytes) aboutissant à leur phagocytose

Capside : Assemblage de protéines (capsomères) destiné à enfermer et protéger l'acide nucléique d'un virus et responsable de l'antigénicité de ce dernier

Cholestase : Ensemble des manifestations liées à la diminution ou à l'arrêt de la sécrétion biliaire

Cirrhose : Toute affection hépatique diffuse chronique caractérisée, quelle qu'en soit la cause (ce n'est cependant que dans la cirrhose alcoolique que le foie présente un aspect roussâtre caractéristique) et l'expression clinique, par l'association d'une fibrose annulaire, d'altérations passées ou présentes des hépatocytes, et d'un remaniement de l'architecture hépatique subsistant aux lobules de la glande normale des nodules de régénération

Complexe immun : Complexe soluble ou insoluble macromoléculaire composé d'antigènes et d'anticorps réunis de façon spécifique

Cryocrite : Volume occupé par la cryoglobuline après centrifugation à froid du sérum dans un tube à hématocrite

Fibrose : Transformation fibreuse de certaines formations pathologiques

Haplotype : Type immunogénétique simple

Hémoptysie : Crachement d'une certaine quantité de sang provenant des voies respiratoires

Idiotype : Déterminant antigénique d'une immunoglobuline porté par la partie variable et lié à la spécificité de l'anticorps pour l'antigène

Immunocytome : Lymphome malin qui se caractérise par la présence d'immunoblastes dont les noyaux sont uniformément rond à ovales, avec une ou deux nucléoles plus proéminentes et de nombreux cytoplasmes

Livedo : Traces violacées surtout présentes sur les membres inférieurs, et témoignant de troubles circulatoires liés à une vascularite des petits vaisseaux (livedo reticularis car aspect réticulaire caractéristique)

Macule : Lésion élémentaire de la peau, consistant en une tache rouge de dimensions variables, ne faisant pas de saillie notable, à la surface des téguments et qui disparaît momentanément par la pression du doigt

Nodule : Lésion cutanée ou muqueuse, grossièrement arrondie, circonscrite, palpable, parfois saillante, superficielle (siégeant dans le derme et l'hypoderme) ou profonde (siégeant uniquement dans l'hypoderme)

Nécrose : Processus de dégénérescence aboutissant à la mortification d'une cellule ou d'un tissu

Odds ratio : Rapport qui exprime l'éventualité d'une liaison entre deux événements.

Paresthésie : Trouble de la sensibilité qui se manifeste par des sensations anormales, non douloureuses (fourmillements, picotements, brûlures, engourdissements, piquûres, etc.), le plus

souvent ressenties de façon spontanée, mais pouvant aussi être provoquées lors d'une exploration objective

Purpura : Lésion élémentaire de la peau caractérisée par l'issue des globules rouges hors des vaisseaux ; c'est une hémorragie cutanée

Sarcomatose : Nom donné à la maladie caractérisée par la formation de sarcomes. Le sarcome est une tumeur qui se développe aux dépens du tissu conjonctif et dont les cellules sont en prolifération très active, mais ne donnent naissance qu'à des produits (fibrilles, os, cartilage) incomplètement développés (tissu embryonnaire). Tous les sarcomes sont malins et ont tendance à se généraliser et à récidiver

Shunt : Communication anormale de deux parties de l'appareil cardiovasculaire où règnent des pressions différentes. Cette communication peut être naturelle (communication entre aorte et artère pulmonaire, entre la veine porte et la veine cave) mais elle est parfois anormale ou est créée chirurgicalement pour contourner un obstacle ou pour améliorer l'hématose (c'est-à-dire la transformation du sang veineux en sang artériel au niveau des poumons)

Transsudation : Passage de liquide séreux du plasma à travers les parois vasculaires intactes à la suite d'une stase sanguine ou d'une modification de la pression osmotique du plasma

Vascularite : Inflammation des parois des vaisseaux sanguins, ayant pour conséquences des lésions vasculaires, des hémorragies ou des infarctus secondaires. Des facteurs circulants peuvent initier l'inflammation, tels les complexes immuns ou les cryoglobulines

Virion : Particule virale arrivée à maturité

Western blot : Technique d'identification des protéines qui fait appel à la séparation par électrophorèse sur gel

BIBLIOGRAPHIE

A

ABDI S., BAHJI M., ASSAADOUNI L., BENKIRANE AGOUMI N., ADNABOUI M., MEZALEK TAZI. Z., MAAOUNI A. – Cryoglobuline mixte à Ig A monoclonale et Ig M biclonale au cours d'une hépatite C - *Ann Biol Clin*, 2004, **62** : 334-337.

ADINOLFI L.E., UTILI R., ATTANASIO V., ZAMPINO R., RAGONE E., TRIPODI M-F., RUGGIERO G. – Epidemiology, clinical spectrum and pronostic value of cryoglobulinemia in hepatitis C virus patients : a prospective study – *Italian J Gastroenterology*, 1996, **28** : 1-9.

AGNELLO V., CHUNG R., KAPLAN L.M. – A role for hepatitis C virus infection in type II cryoglobulinemia – *N Engl J Med*, 1992, **327** (21) : 1490-1495.

AGNELLO V., ZHANG Q-X., ABEL G., KNIGHT G.B. – The association of hepatitis C virus infection with monoclonal rheumatoid factors bearing the WA cross-idiotype : implications for the etiopathogenesis and therapy of mixed cryoglobulinemia – *Clin Exp Rheumatol*, 1995, **13** (suppl 13), S101-S104.

AGNELLO V. – Hepatitis C virus infection and type II cryoglobulinemia : an immunological perspective – *Hepatology*, 1997a, **26** (6) : 1375-1379.

AGNELLO V.- The etiology and physiopathology of mixed cryoglobulinemia secondary to hepatitis C virus infection – *Springer Semin Immunopathol*, 1997b, **19** : 111-129.

AKRIVIADIS E.A., XANTHAKIS I., NAVROZIDOU C., PAPADOPOULOS A. – Prevalence of cryoglobulinemia in chronic hepatitis C virus infection and response to treatment with interferon alpha – *J Clin Gastroenterology*, 1997, **25** (4) : 612-618.

ALPER C.A., JOHNSON A.M. – Immunofixation electrophoresis : a technique for the study of protein polymorphism – *Vox Sang.*, 1969, **17** (5) : 445-452.

ALVAREZ C., RAMOS A. – Lipids, lipoproteins, and apoproteins in serum during infection – *Clin chem*, 1986, **32** : 142-145.

AMOROSO A., BERRINO M., CANALE M., GUARRERA S., MAZZOLA G., SAVOLDI S., SCOLARI F., SALLBERG M., CLEMENTI M., GABRIELLI A. – Are HLA class II and immunoglobulin constant region genes involved in the pathogenesis of mixed cryoglobulinemia type II after hepatitis C virus infection? – *Journal of Hepatology*, 1998, **29** : 36-44.

AUCOUTURIER P., ALYANAKIAN M-A., RICHARD S., MOREAU P. – Cryoglobulinémies – *Option Bio*, 2000, **supplément au n°243/244** : 18-20.

B

BAPTISTA J.L., VERVOORT T., VAN DER STUYFT P., WERY M. – Changes in plasma lipid levels as a function of Plasmodium falciparum infection in Sao Tome- *Parasite*, 1996, **3** (4) :335-40.

BARBOUCH M.R., MAKNI S., AYED K., HADDAD S., BEN AYED H. – Les cryoglobulinémies : signification clinique et biologique, à propos de 60 cas – *Sem Hop Paris*, 1989, **65** (7) : 329-332.

BEDOSSA P. – Fibrosis in chronic hepatitis C infection : mechanisms and cofactors- *Gastro clin biol*, 2002, **26** (sp 2) : B163-167.

BEISEL W.R., FISER R.H. – Lipid metabolism during infectious illness – *Am J Clin Nutr*, 1970, **23** : 1069-1079.

BENTOLILA S., MYARA I. – Cryoglobulinémie et virus de l'hépatite C – *Ann Biol Clin*, 1994, **52** : 689-694.

BENTZ MH., MAGNETTE J. – Hypocholesterolemia during the acute phase of an inflammatory reaction of infectious origin – *Rev Med Interne*, 1998, **19** (3) : 168-172.

BICHARD P., OUNANIAN A., GIRARD M., BCCARD C., ROLACHON A., RENVERSEZ J-C., CORDONNIER D., SEIGNEURIN J-M., DEBRU J-L., ZARSKI J-P. – High prevalence of hepatitis C virus RNA in the supernatant and the cryoprecipitate of patients with essential and secondary type II mixed cryoglobulinemia – *Journal of Hepatology*, 1994, **21** : 58-63.

BONOMO L., CASATO M., AFELTRA A., CACCAVO D. – Treatment of idiopathic mixed cryoglobulinemia with alpha interferon – *Am J Med*, 1987, **83** : 726-730.

BROUET J-C., CLAUVEL J-P., DANON F., KLEIN M., SELIGMANN M. – Biologic and clinical significance of cryoglobulins – *Am J Med*, 1974, **57** : 775-788.

BROUET J-C. – Les cryoglobulinémies – *Presse Méd.*, 1983, **12** (47) : 2991-2996.

BRUNKHORST R., KLIEM V., KOCH K.M. – Recurrence of membranoproliferative glomerulonephritis after renal transplantation in a patient with chronic hepatitis C – *Nephron*, 1996, **72** : 465-467.

C

CACOUB P., FABIANI F., MUSSET L., PERRIN M., FRANGUEUL L., LEGER J-M., HURAUX J-M., PIETTE J-C., GODEAU P. – Mixed cryoglobulinemia and hepatitis C virus – *The Am J Med*, 1994, **96** : 124-132.

CACOUB P., MUSSET L. – Cryoglobulinémies mixtes – *La Revue du Praticien*, 2000a, **50** : 276-280.

CACOUB P., RENOU C., ROSENTHAL E., COHEN P., LOURY I., LOUSTAUD-RATTI V., YAMAMOTO A.-M., CAMPROUX A.-C., HAUSFATER P., MUSSET L., VEYSSIER P., RAGUIN G., PIETTE J.-P. – Extrahepatic manifestations associated with hepatitis C virus infection – *Medecine*, 2000b, **79** (1) : 47-56.

CACOUB P., HAUSFATER P., MUSSET L., PIETTE J-C., GERMIVIC – Mixed cryoglobulinemia in hepatitis C patients – *Ann Med Interne*, 2000c, **151** (1) : 20-29.

CACOUB P., RENOU C., KERR G., HUE S., ROSENTHAL E., COHEN P., KAPLANSKI G., CHARLOTTE F., THIBAUT V., GHILLANI P., PIETTE J-C., CAILLAT-ZUCMAN S. – Influence of HLA –DR phenotype on the risk of hepatitis C virus- associated mixed cryoglobulinemia – *Arthritis and Rheumatism*, 2001, **44** (9) : 2118-2124.

CACOUB P., COSTEDOAT-CHALUMEAU N., LIDOVE O., ALRIC L. – Cryoglobulinemia vasculitis – *Rheumatology*, 2002a, **14** : 29-35.

CACOUB P., RATZIU V., MYERS R.P., GHILLANI P., PIETTE J.C., MOUSSALLI J., POYNARD T., MULTIVIRIC GROUP – Impact of treatment on extra hepatic manifestations in patients with chronic hepatitis C – *Journal of Hepatology*, 2002b, **36** : 812-818.

CASATO M., TALIANI G., PUCILLO L. P., GOFFREDO F., LAGANA B., BONOMO L. – Cryoglobulinemia and hepatitis C virus – *Lancet*, 1991a, **337** : 1047-1048.

CASATO M., LAGANA B., ANTONELLI G., DIANZAN F., BONOMO L. – Long-term results of therapy with interferon alpha for type II essential mixed cryoglobulinemia – *Blood*, 1991b, **78** (12) : 3142-3147.

CASATO M., AGNELLO A., PUCILLO L.P., KNIGHT G.B., LEONI M., DEL VECCHIO S., MAZZILLI C., ANTONELLI G., BONOMO L. – Predictors of long-term response to high-dose interferon therapy in type II cryoglobulinemia associated with hepatitis C virus infection – *Blood*, 1997, **90** (10) : 3865-3873.

CHOLET F., NOUSBAUM J-B., RICHECOEUR M., OGER E., CAUVIN J-M., LAGARDE N., ROBASZIEWICZ M., GOUEROU H. – Factors associated with liver steatosis and fibrosis in chronic hepatitis C patients – *Gastro clin biol*, 2004, **28** (3) : 272-278.

CHOO Q-L, KUO G., WEINER A.J., OVERBY L.R., BRADLEY D.W., HOUGHTON M. – Isolation of a CDNA clone derived from a blood borne non-A, non-B viral hepatitis genome – *Science*, 1989, **244** : 359-362.

CICARDI M., CESANA B., DEL NINNO E., PAPPALARDO E., SILINI E., AGOSTONI A., COLOMBO M. – Prevalence and risks factors for the presence of serum cryoglobulins in patients with chronic hepatitis C – *J Viral Hepat*, 2000, **7** : 138-143.

CLAUVEL J-P. – Cryoglobulinémie – *Concours Médical*, 1979, **101** (3) : 315-323.

CLAUVEL J-P. – Cryoglobulinémies – *La Revue du Praticien*, 1993, **43** (3) : 302-305.

CLIFFORD B.D., DONAHUE D., SMITH L., CABLE E., LUTTIG B., MANNS M., BONKOVSKY H.L. – High prevalence of serological markers of autoimmunity in patients with chronic hepatitis C – *Hepatology*, 1995, **21** : 613-619.

COHEN P. – Manifestations extra-hépatiques du virus de l'hépatite C – *La Presse Médicale*, 1999, **29** (4) : 209-214.

CONFERENCE DE CONSENSUS – TRAITEMENT DE L'HEPATITE C : Conférence (27-28 février 2002, Paris) : *Gastro clin biol*, 2002, **26**, hors-série n°2, 320p.

CONGIA M., GRAZIA CLEMENTE M., DESSI C., CUCCA F., MAZZOLENI A.P., FRAU F., LAMPIS R., CAO A., LAI M.E, DE VIRGILIIS S. – HLA class II genes in chronic hepatitis C virus-infection and associated immunological disorders – *Hepatology*, 1996, **24** : 1338-1341.

COPPO P., LASSOUED K. – Cryoglobulinémies : diagnostic, étiologies – *Médecine Thérapeutique*, 2000, **6** (1) : 48-53.

CRESTA P., MUSSET L., CACOUB P., FRANGUEUL L., VITOUR D., POYNARD T., OPOLON P., NGUYEN D-T, GOLLIOT F., PIETTE J-C., HURAUX J-M., LUNEL F. – Response to interferon alpha treatment and disappearance of cryoglobulinemia in patients infected by hepatitis C virus – *Gut*, 1999, **45** : 122-128.

D

DAMMACCO F., SANSONNO D. – Antibodies to hepatitis C virus in essential mixed cryoglobulinemia – *Clin Exp Immunol*, 1992, **87** : 352-356.

DAMMACCO F., SANSONNO D., HAN J.H., SHYAMALA V., CORNACCHIULO V., IACOBELLI A.R., LAULETTA G., RIZZI R. – Natural interferon-alpha its combination with 6-méthyl-prednisolone in the therapy of type II mixed cryoglobulinemia : a long-term, randomized, controlled study – *Blood*, 1994, **84** (10) : 3336-3343.

DISDIER P., HARLE J.R., WEILLER P.J. – Cryoglobulinemia and hepatitis C infection – *Lancet*, 1991, **338** : 1151-1152.

DUCLOS-VALLEE J-C. – Traitement des manifestations extrahépatiques associées à l'injection par le virus de l'hépatite C – *Gastroenterol Clin Biol*, 2002, **26** : B76-B81.

DUCOBU J., PAYEN MC.- Lipids and AIDS – *Rev Med Brux*, 2000, **21** (1) :11-7.

DURAND J.M. – Affections extra-hépatiques certainement liées au virus de l'hépatite C – *La Presse Médicale*, 1997, **26** (21) : 1014-1023.

F

FEINGOLD K.R., GRUNFELD C. – Role of cytokines in inducing hyperlipidemia – *Diabetes*, 1992, **41** suppl 2 : 97-101.

FERRER F., BIGOT-CORBEL E., N'GUYEN P., KREMPF M., BARD J-M. – Quantitative measurement of lipoprotein particles containing both apolipoprotein AIV and apolipoprotein B in human plasma by a noncompetitive ELISA – *Clinical chemistry*, 2002, **48** (6) : 884-890.

FERRI C., GRECO F., LONGOMBARDO G., PALLA P., MORETTI A., MARZO E., FOSELLA P.V., PASERO G., BOMBARDIERI S. – Antibodies to hepatitis C virus in patients with mixed cryoglobulinemia – *Arthritis and Rheumatism*, 1991, **34** (12) : 1606-1610.

FERRI C., LONGOMBARDO G., LA CIVITA L., BOMBARDIERI S., GRECO F., HIGHFIELD P., CORBISHLEY T. – Hepatitis C virus, autoimmune liver disease and cryoglobulinemic hepatitis – *Journal of Hepatology*, 1992a, **16** (1-2) : 242-243.

FERRI C., GRECO F., LONGOMBARDO G. – Hepatitis C virus and cryoglobulinemia : unthawing the association – *Gastroenterology*, 1992b, **103** (3) : 1108-1110.

FERRI C., MARZO E., LONGOMBARDO G., LOMBARDINI F., LA CIVITA L., VANACORE R., LIBERATI A.M., GERLI R., GRECO F., MORETTI A., MONTI M., GENTILINI P., BOMBARDIERI S., ZIGNEGO A.L. – Interferon alpha in mixed cryoglobulinemia patients : a randomised, crossover-controlled trial – *Blood*, 1993a, **81** (5) : 1132-1136.

FERRI C., LA CIVITA L., LONGOMBARDO G., GRECO F., BOMBARDIERI S. – Hepatitis C virus and mixed cryoglobulinemia – *European J Clin Invest*, 1993b, **23** : 399-405.

FERRI C., LONGOMBARDO G., LA CIVITA L., GRECO F., LOMBARDINI F., CECCHETTI R., CAGIANELLI M.A., MARCHI S., MONTI M., ZIGNEGO A.L., MANNS M.P. – Hepatitis C virus chronic infection as a common cause of mixed cryoglobulinemia and autoimmune liver disease – *J Intern Med*, 1994, **236** : 31-36.

FERRI C., ZIGNEGO A.L., PILERI S.A. – Cryoglobulins – *Journal Clin. Pathol.*, 2002, **55** : 4-13.

FERRIC., SEBASTIANI M., GIUGGIOLI D., CAZZATO M., LONGOMBARDO G., ANTONELLI A., PUCCINI R., MICHELASSI C., ZIGNEGO A.L. – Mixed cryoglobulinemia : demographic, clinical, and serologic feature and survival in 231 patients – *Semin Arthritis Rheum*, 2004, **33** : 355-374.

FRANGUEUL L., MUSSET L., CRESTA P., CACOUB P., HURAUX J-M., LUNEL F. – Hepatitis C virus genotypes and subtypes in patients with hepatitis C, with or without cryoglobulinemia – *Journal of Hepatology*, 1996, **25** : 427-432.

G

GALLI M., CAREDDU F., D'ARMINO A., MONTI G., MESSINA K., INVERNIZZI F. - Hepatitis B virus and essential mixed cryoglobulinemia – *Lancet*, 1980, **17** (1) : 1093.

GARCIA-BRAGADO F., VILARDELL M., FONOLLOSA V., RUIBAL A., GALLART T., CUXART A.- Cryoglobulinémie mixte essentielle : relations avec le virus de l'hépatite B – *La Nouvelle Presse Médicale*, 1981, **10** (36) : 2955-2957.

GALLIN J.E., KAY D., O'LEARY W.M. – Serum lipids in infection – *N Engl J Med*, 1969, **281** : 1081-1086.

GERMI R., CRANCE J-M., GARIN D., ZARSKI J-P., DROUET E. – Les récepteurs du virus de l'hépatite C : données actuelles – *Gastroentérologie clinique et biologique*, 2001, **25** (11) : 1011-1015.

GOURNAY J., FERRAL L., ROBERTS J., ASCHER N., WRIGHT T., LAKE J. – Cryoglobulinemia presenting after liver transplantation – *Gastroenterology*, 1996, **110** : 265-270.

GRUNFELD C., PANG M., DOERRLER W., SHIGENAGA JK., JENSEN P., FEINGOLD K.R. – Lipids, lipoproteins, triglyceride clearance, and cytokines in human immunodeficiency virus infection and the acquired immunodeficiency syndrome – *J Clin Endocrinol Metab*, 1992, **74** (5) : 1045-52.

H

HARTMANN H., SCHOTT P., POLZIEN F., MIHM S., UY A., KABOTH U., PARDOWITZ I., RAMADORI G. – Cryoglobulinemia in chronic hepatitis C virus infection : prevalence, clinical manifestations, response to interferon treatment and analysis of cryoprecipitates – *Z gastroenterologie*, 1995, **33** : 643-650.

HEIDELBERGER M., KENDALL F.E. – A quantitative study of the precipitin reaction between type III pneumococcus polysaccharide and purified homologous antibody – *J Exp Med*, 1929, **50** : 819.

HOBBS J.R. – Cryoproteins – *Ann Med Interne*, 1986, **137** (3) : 254-259.

HORCAJADA JP., GARCIA-BENGOECHEA M., CILLA G., ETXANIZ P., CUADRADO E., ARENAS JI.- Mixed cryoglobulinaemia in patients with chronic hepatitis C infection : prevalence, significance and relationship with different viral genotypes.- *Ann Med*, 1999, **31**(5) : 352-8.

HOIRIGAN L-F., McDONALD G., PURDIE D., WHITEHALL V., SHORTHOUSE C., CLOUSTON A., POWELL E.- Fibrosis in chronic hepatitis C correlates significantly with body mass index and steatosis – *Hepatology*, 1999, **29** (4) : 1215-1219.

HURWITZ D., QUISMARIA F.-P., FRIOU G.J. – Cryoglobulinaemia in patients with infections endocarditis – *Clin Exp Immunol*, 1975, **19** : 131.

K

KALLEMUCHIKKAL U., GOREVIC P. – Evaluation of cryoglobulins – *Archives Pathol Lab Med*, 1999, **123** : 119-125.

KAMOUN P., LAVOINNE A., DE VERNEUIL H. – *Biochimie et biologie moléculaire*, Paris, Flammarion, 2003, 480p.

KAYALI Z., BUCKWOLD V.E., ZIMMERMANN B., SCHMIDT W.N. – Hepatitis C, cryoglobulinemia, and cirrhosis : a meta-analysis – *Hepatology*, 2002, **36** : 978-985.

KEREVEUR A., CAMILLAU M., MOATTI N.-Lipoprotein anomalies in HIV infections – *Ann Med Interne*, 1996, **147** (5) : 333-43.

KERR G. S., ROFAIL M., LEWIS J.H., KUMAR P., SEEFFL.B. – Prevalence of hepatitis C virus associated cryoglobulinemia at a veterans hospital – *The Journal of Rheumatology*, 1997, **24** (11) : 2134-2138.

KHOVIDHUNKIT W., KIM M.S., MEMON R.A., SHIGENAGA J.K., MOSER A.H., FEINGOLD K.R., GRUNFELD C – Effects of infection and inflammation on lipid and lipoprotein metabolism : mechanisms and consequences to the host – *J Lipid Res*, 2004, **45** (7) : 1169-1696.

KITAY-COHEN Y., AMIEL A., HILZENRAT N., BUSKILA D., FEJGIN M., GABER E., SAFADI R., TUR-KASPA R., LISHNER M – Bcl2 rearrangement in patients with chronic hepatitis C associated with essential mixed cryoglobulinemia type II – *Blood*, 2000, **96** (8) : 2910-2912.

KNODELL R.G., ISHAK K.G., BLACK W.C., CHEN T.S., CRAIG R., KAPLOWITZ N., KIERNAN T.W., WOLLMAN J. – Formulation and application of a numerical scoring system for assessing histological activity in asymptomatic chronic active hepatitis – *Hepatology*, 1981, **1** (5) : 431-5.

KOCHBATI S., BOUSSEMA F., KILIANI A., BAN AMOR G., BEN DAHMEN F., KHAMASSI N., BEN RHOUMA S., CHERIF O., KCHIR M.M., ROKBANI L. – Les manifestations systémiques des hépatites virales C chroniques – *La Tunisie Médicale*, 2001 , **79** (12) : 655-661.

KODAMA H. – Determination of cryoglobulins as lipoprotein-autoantibody immune complexes and antigenic determinants against antilipoprotein autoantibody – *Clin Exp Immunol*, 1977, **28** (3) : 437-44.

L

LAPLANCHE S., MUSSET L. – Recherche et caractérisation des cryoglobulines au laboratoire – *Feuillets de Biologie*, 1992, **33** (188) : 29-33.

LARREY D. – Hépatite C chronique : quelles sont les recommandations en dehors du traitement antiviral ? – *Gastroenterol Clin Biol*, 2002 , **26** : B283- B290.

LAURILA A., BLOIGU A., NAYHA S., HASSI J., LEINONEN M., SAIKKU P.- Association of *Helicobacter pylori* infection with elevated serum lipids – *Atherosclerosis*, 1999, **142** (1) : 207-10.

LE CARRER D. – Les cryoglobulinémies : exploration biologique et signification clinique – *Revue française des laboratoires*, 1995, **279** : 43-51.

LE CARRER D.- Cryoglobulinémies : Proposition d'un protocole d'exploration biologique. Actualisation de leur classification – *Feuillets de biologie*, 1998, **39** (221) : 55-65.

LEES R.S., FISER R.H., BEISEL W.R., BARTELLONI P.J.- Effects of an experimental viral infection on plasma lipid and lipoprotein metabolism – *Metabolism*, 1972, **21** (9) : 825-833.

LENZI M., FRISONI M., MANTOVANI V., RICCI P., MURATORI L., FRANCESCONI R., CUCCI M., FERRI S., BIANCHI F. – Haplotype HLA-B8-DR3 confers susceptibility to hepatitis C virus-related mixed cryoglobulinemia – *Blood*, 1998, **91** (6) : 2062-2066.

LERNER A.B., WATSON C.J. – Studies of cryoglobulins : unusual purpura associated with the presence of a high concentration of cryoglobulin – *Am J Med Sci*, 1947, **214** : 410.

LEVEY J.M., BJORNSSON B., BANNER B., KUHNS M., MALHOTRA R., WHITMAN N., ROMAIN P.L. CROPLEY T.G., BONKOVSKY H.L. – Mixed cryoglobulinemia in chronic hepatitis C infection – *Medecine*, 1994, **73** (1) : 53-67.

LEVO Y., GOREVIC P.D., KASSAB H.J., ZUCKER-FRANKLIN D., FRANFLIN E.C. – Association between hepatitis B virus and essential mixed cryoglobulinemia – *N Engl J Med*, 1977, **296** (26) : 1501-1504.

LIANG T.J., REHERMANN B., SEEFF L.B., HOFFNAGLE J.H. – Pathogenesis, natural history, treatment, and prevention of hepatitis C – *Ann Intern Med*, 2000, **132** : 296-305.

LINSCOTT WD., KANE JP. – The complement system in cryoglobulinaemia. Interaction with immunoglobulins and lipoproteins – *Clin Exp Immunol*, 1975, **21** (3) : 510-9.

LUNEL F. – Hépatite C et anomalies immunologiques – *Gastroentérologie clinique et biologique*, 1994a, **18** : 829-838.

LUNEL F., MUSSET L., CACOUB P., FRANGUEUL L., CRESTA P., PERRIN M., GRIPPON P., PIETTE J-C., HURAUX J-M., OPOLON P. – Cryoglobulinemia in chronic liver diseases: role of hepatitis C virus and liver damage – *Gastroenterology*, 1994b, **106** : 1291-1300.

LUNEL F., MUSSET L. – Hepatitis C virus infection and cryoglobulinemia – *Journal of Hepatology*, 1998, **29** : 848-855.

M

MACART M., GERBAUT L. – Evaluation of an improvement of the Coomassie Blue dye binding method allowing an equal sensitivity to various proteins : application to cerebrospinal fluid – *Clinica chimica acta*, 1982, **122** : 93.

MARCELLIN P., ASSELAH T., BOYER N.- Fibrosis and disease progression in hepatitis C – *Hepatology*, 2002, **36** (5 suppl 1) : S47-S56.

MAZZARO C., FRANZIN F., TULISSI P., PUSSINI E., CROVATTO M., CARNIELLO G., EFREMOV D., BURRONE O., SANTINI G., POZZATO G. – Regression of monoclonal B cell expansion patients affected by mixed cryoglobulinemia responsive to α - interferon therapy – *Cancer*, 1996, **77** : 2604-2613.

MELTZER M., FRANKLIN E.C. – Cryoglobulinemia –a study of twenty nine patients – *Am J Med*, 1966, **40** : 828-836.

MISIANI R., BELLAVITA P., FENILI D., VICARI O., MARCHESI D., SIRONI P.L., ZILIO P., VERNOCCHI A., MASSAZZA M., VENDRAMIN G., TANZI E., ZANETTI A. – Interferon alpha-2a therapy in cryoglobulinemia associated with hepatitis C virus – *N Engl J Med*, 1994, **330** (11) : 751-756.

MUSSET L., DIEMERT M.C., TAIBI F., THI HUONG DU L., CACOUB P., LEGER J.M., BOISSY G., GAILLARD O., GALLI J. – Characterization of cryoglobulins by immunoblotting – *Clin Chem*, 1992, **38** (6) : 798-802.

MUSSET L., LUNEL F., CACOUB P., OPOLON P. – Cryoglobulinémies mixtes lors de l'infection par le virus de l'hépatite C – *La Presse Médicale*, 1996, **25** : 595-8.

N

NOCENTE R., CECCANTI M., BERTAZZONIG., CAMMARATO G., SILVERI N. G., GABARRINI G. – HCV infection and extrahepatic manifestations – *Hepatogastroenterology*, 2003, **50** : 1149-1154.

O

OKUSE C., YOTSUYANAGI H., OKAZAKI T., YASUDA K., FUJIIOKA T., TOMOE M., HASHIZUME K., HAYASHI T., SUZUKI M., IWABUCHI S., NAGAI T., IINO S.- Detection, using a novel method, of a high prevalence cryoglobulinemia in persistent hepatitis C virus infection – *Hepatology Research*, 2003, **27** : 18-22.

ORTIZ V., BERENGUER M., RAYON J-M., CARRASCO D., BERENGUER J. – Contribution of obesity to hepatitis C-related fibrosis progression – *Am J Gastroenterol*, 2002, **97** (9) : 2408-2414.

P

PASCUAL M., PERRIN L., GIOSTRA E., SCHIFFERLI J. – Hepatitis C virus in patients with cryoglobulinemia type II – *The Journal of infectious diseases*, 1990, **162** (2) : 569-570.

PAWLOTSKY J-M., BEN YAHIA M., ANDRE C., VOISIN M.C., INTRATOR L., ROUDOT-THORAVAL F., DEFORGES L., DUVOUX C., ZAFRANI E.S., DUVAL J., DHUMEAUX D. – Immunological disorders in C virus chronic active hepatitis : a prospective case control study - *Hepatology*, 1994, **19** : 841-848.

PAWLOTSKY J-M. – Extrahepatic immunologic manifestations in chronic hepatitis C and hepatitis C virus serotypes – *Ann Intern Med*, 1995, **122** (3) : 169-173.

PAWLOTSKY J-M. – Diagnostic tests for hepatitis C – *J hepatol*, 1999, **31** (suppl) : 71-79.

PAWLOTSKY J-M. – Virus de l'hépatite C et réponse immunitaire – *Gastroentérologie clinique et biologique*, 2001, **25** : 123-133.

PECHERE-BERTSCHI A., SCHIFFERLI J. – Cryoglobulinémie – *Médecine et Hygiène*, 1992a, **50** : 1318-1322.

PECHERE-BERTSCHI A., PERRIN L., DE SAUSSURE P., WIDMANN J.J., GIOSTRA E., SCHIFFERLI J.A. – Hepatitis C : a possible etiology for cryoglobulinemia type II – *Clin Exp Immunol*, 1992b, **89** : 419-422.

PHETTEPLACE H.W., SEDKOVA N., HIRANO K.I., DAVIDSON N.O., LANZ – JACOB S.P.- Escherichia coli sepsis increases hepatic apolipoprotein B secretion by inhibiting degradation – *Lipids*, 2000, **35** (10) : 1079-85.

PILERI P., VEMATSU Y., CAMPAGNOLI S., GALLI G., FALUGI F., PETRACCA R., WEINER A.J., HOUGHTON M., ROSA D., GRANDI G., ABRIGNANI S. - Binding of hepatitis C virus to CD81 – *Science*, 1998, **282** : 938-941.

POLZIEN F., SCHOTT P., MIHM S., RAMADORI G., HARTMANN H. – Interferon alpha treatment of hepatitis C virus-associated mixed cryoglobulinemia – *J Hepatol*, 1997, **27** : 63-71.

POPP J., DIENSTAG J., WANDS J., BLOCH K. – Essential mixed cryoglobulinemia without evidence for hepatitis B virus infection – *Ann Intern Med*, 1980, **92** : 379-383.

POYNARD T., BEDOSSA P., OPOLON P. for the OBSVIRIC, METAVIR, CLINIVIR and DOSVIRC groups – Natural history of liver fibrosis progression in patients with chronic hepatitis C – *Lancet*, 1997, **349** : 825-832.

POYNARD T., RATZIU V., CHARLOTTE F., GOODMAN Z., McHUTCHISON J., ALBRECHT J. – Rates and risk factors of liver fibrosis progression in patients with chronic hepatitis C – *J Hepatol*, 2001, **34** (5) : 764-767.

POZZATO G., MAZZARO C., CROVATTO M., MODOLO M.L., CESELLI S., MAZZI G., SULFARO S., FRANZIN F., TULISSI P., MORETTI M., SANTINI G. F. – Low-grade malignant lymphoma, hepatitis C virus infection and mixed cryoglobulinemia – *Blood*, 1994, **84** (9) : 3047-3053.

R

RICHOU C. – Cryoglobulinémie au cours de l'hépatite chronique C: étude prospective cas-témoins – Th : Méd. : Nantes : 2000, 72p.

RITCHIE R.F., SMITH R. – Immunofixation III. Application to the study of monoclonal proteins – *Clin Chem*, 1976, **22** (12) : 1982-5.

ROMASZKO J.P, TRIDON A., JOUANEL P., SUBTIL E., DIBET P., BETAÏL G. –Détection et analyse des cryoglobulines : étude comparative d'une population de malades et d'une population de témoins sains – *Path Biol*, 1993, **41** (6) : 525-529.

S

SAMMALKORPI K., VALTONEN V., KERTTULA Y., NIKKILA E., TASKINEN M.R. – Changes in serum lipoprotein pattern induced by acute infections – *Metabolism*, 1988, **37** : 859-865.

SASSO E. H. – The rheumatoid factor response in the etiology of mixed cryoglobulins associated with hepatitis C virus infection – *Ann Med Interne*, 2000, **151** : 30-40.

SCHIFFERLI J.A., FRENCH L., TISSOT J-D. – Infection par le virus de l'hépatite C, cryoglobulinémie et glomérulonéphrite – *Flammarion Médecine-Sciences, Actualités néphrologiques*, 1994 : 107-128.

SCHMIDT W.N., STAPLETON J.T., LABRECQUE D.R., MITROS F.A., KIBBY P.A., PERINO PHILLIPS M.J., BRASHEAR D.L. – Hepatitis C virus infection and cryoglobulinemia : analysis of whole blood and plasma HCV-RNA concentrations and correlation with liver histology – *Hepatology*, 2000, **31** : 737-744.

SCHOTT P., POLZIEN F., MULLER-ISSBERNER A., RAMADORI G., HARTMANN H. – Reactivity of cryoglobulin IgM and IgG in hepatitis C virus-associated mixed cryoglobulinemia – *J Hepatol*, 1998, **28** : 17-26.

STASTNY P., ZIFF M. – Cold-insoluble complexes and complement levels in systemic lupus erythematosus – *N Engl J Med*, 1969, **280** (25) : 1376-1381.

T

TAILLAN B., FERRARI P., FUZIBET J-G., PESCE A., QUARANTA J-F., DUJARDIN P. – Cryoglobulinemia associated with hepatitis C virus infection: a report of 13 cases – *J Intern Med*, 1992, **232** : 372-373.

THOMSEN R., BONK S., THIELE A – Density heterogeneities of hepatitis C virus in human sera due to the binding of β -lipoproteins and immunoglobulins – *Med Microbiol Immunol*, 1993, **182** : 329-334.

TRENDELENBURG M., SCHIFFERLI A. – Cryoglobulins in chronic hepatitis C virus infection – *Clin Exp Immunol*, 2003, **133** : 153-155.

TREPO C., DENOYEL G. A. – L'hépatite C – *La Lettre du laboratoire Merieux*, 2001, **12**.

TRIBOUT B., DELOBEL J., WESTEEL P-F., BOVE N., FOURNIER A. – Les cryoglobulinémies mixtes – *Rev Prat*, 1989, **39** (23) : 2051-56.

TRIDON A., ABERGEL A., KUDER P., HENQUELL C., MALAURE H., DIBET P., GHRIB J., BOMMELAER G., BETAÏL G. – Cryoglobulines mixtes et auto-immunité au cours de l'hépatite C – *Pathologie Biologique*, 1997, **45** (4) : 291-297.

V

VAN LEEUWEN H.J., HEEZIUS E.C., DALLINGA G.M., VAN STRIJP J.A., VERHOEF J., VAN KESSEL K.P.- Lipoprotein metabolism in patients with severe sepsis – *Crit Care Med.*, 2003 , **31** (5) : 1359-66.

VAN THIEL D.H., FAGIUOLI S., CARACENI P., WRIGHT H.I., NADIR A., GAVALER J.S., ZUHDI N. – Cryoglobulinemia : a cause for false negative polymerase chain reaction results in patients with hepatitis C virus positive chronic liver disease – *J Hepatol*, 1995, **22** : 464-467.

W

WANDS J.-R., LA MONT J.-T., MANN E., ISSELBACHER K.-J. – Arthritis associated with intestinal-bypass procedure for morbid obesity. Complement activation and characterization of circulating cryoproteins – *N Engl J Med*, 1976, **294** : 121.

WATT K., UHANOVA J., GONG Y., KAITA K., DOUCETTE K., PETTIGREW N., MINUK GY.- Serum immunoglobulins predict the extent of hepatic fibrosis in patients with chronic hepatitis C virus infection – *J Viral Hepat*, 2004, **11**(3) : 251-6.

WEINER S.M., BERG T., BERTHOLD H., WEBER S., PETERS T., BLUM H.E., HOPF U., PETER H.H. – A clinical and virological study of hepatitis C virus-related cryoglobulinemia in Germany – *J Hepatol*, 1998, **29** : 375-384.

WERNER C., JOLLER J.H.I., FONTANA A. – Hepatitis C virus and cryoglobulinemia – *N Engl J Med*, 1993, **328** : 1122-1123.

WILLEMIN B., BLICKLE J.F., BROGARD J.M., DUCHENE R. – Exploration de la réaction inflammatoire – *Ann Med Interne*, 1990, **141** (4) : 333-339.

WINFIELD J.B. – Cryoglobulinemia – *Hum.Pathol.*, 1983, **4** : 350-354.

WINTROBE J.T., BUELL M.V. – Hyperproteinemia associated with multiple myeloma, with a case in which an extraordinary hyperproteinemia was associated with thrombosis of the retinal veins and symptoms suggesting Raynaud's disease – *Bull Johns Hopkins Hosp* , 1933, **55** : 156.

WONG V.S., EGNER W., ELSEY T., BROWN D., ALEXANDER G.J.M. - Incidence, character and clinical relevance of mixed cryoglobulinemia in patients with chronic hepatitis C virus infection - *Clin Exp Immunol*, 1996, **104** : 25-31.

Y

YACCOUB JEMNI S., GHEDIRA I., HASSINE M., HOUISSA B., KORTAS M., YAHAOUI M.L., MHJOUB T., GHACHEM L., BOUKEF K. – Cryoglobulinémie et séropositivité anti VHC – *La Tunisie Médicale*, 1997, **75** (10) : 798-800.

Z

ZALTRON S., PUOTI M., QUINZANINI M., MANNI M., EL HAMAD I., CASTELNUOVO F., PUTZOLU V., GHEZZI A., TURANO A., CAROSI G. - Is cryoglobulinemia a non syndromic epiphenomenon in patients with chronic HCV infection? – *Hepatology*, 1996, **24** (4) : 382A.

ZANDECKI M., DUPRIEZ B., DEMORY J.L., HAFFREINGUE H., COSSON A. – Numérations leucocytaire et plaquettaire artificiellement augmentées, révélatrices d'une cryoglobulinémie mixte de type II – *Presse Med.*, 1989, **35** : 1756.

ZIGNEGO A. L., FERRI C., GIANNINI C., MONTI M., LA CIVITA L., CARECCIA G., LONGOMBARDO G., LOMBARDINI F., BOMBARDIERI S., GENTILINI P. – Hepatitis C virus genotype analysis in patients with type II mixed cryoglobulinemia – *Ann Int Med*, 1996, **124** (1 pt 1) : 31-34.

ZIGNEGO A. L., GIANNELLI F., MARROCCHI M.E., MAZZOCCA A., FERRI C., GIANNINI C., MONTI M., CAINI P., LA VILLA G., LAFFI G., GENTILINI P.- T (14 ;18) translocation in chronic hepatitis C virus infection- *Hepatology*, 2000, **31** (2) : 474-479.

ZIGNEGO A. L., FERRI C., GIANNELLI F., GIANNINI C., CAINI P., MONTI M., MARROCCHI M.E., DI PIETRO E., LA VILLA G., LAFFI G., GENTILINI P. – Prevalence of bcl2 rearrangement in patients with hepatitis C virus-related cryoglobulinemia with or without B cell lymphomas – *Ann Intern Med*, 2002, **137** (7) : 571-580.

ZUCKERMAN E., ZUCKERMAN T., SAHAR D., STREICHMAN S., ATTIAS D., SABO E., YESHURUN D., ROWE J.M. – The effect of antiviral therapy on t (14 ;18) translocation and immunoglobulin gene rearrangement in patients with chronic hepatitis C virus infection- *Blood*, 2001, **97** (6) : 1555-1559.

Vu, Le Président de Jury

Vu, Le Directeur de Thèse

Vu , Le Directeur de L' U.E.R

Nom – Prénom : MAINGUY Caroline

**Titre de la thèse : MISE EN EVIDENCE ET CARACTERISATION DES
LIPOPROTEINES DANS LES CRYOGLOBULINES DE PATIENTS ATTEINTS PAR
LE VIRUS DE L'HEPATITE C**

Résumé :

Les cryoglobulines sont la manifestation extra-hépatique la plus souvent retrouvée dans l'hépatite C. Leur typage par immunofixation montre un aspect particulier. Nous apportons les résultats d'une étude réalisée sur 21 patients atteints d'hépatite C chronique et présentant une cryoglobulinémie. L'analyse de leur cryoglobuline, par technique ELISA, a montré la présence de lipoprotéines sous forme de complexes immuns Apo B-IgG ou Apo B-IgM. Il semble que l'ApoB soit le principal constituant des cryoglobulines lorsque la contamination est ancienne.

MOTS CLES : Cryoglobuline – Hépatite C – Lipoprotéines – Complexes immuns – ELISA

JURY

**PRESIDENT : Mme Berthe-Marie IMBERT, Professeur de Virologie
Faculté de Pharmacie de Nantes**

**ASSESEURS : M. Jean-Marie BARD, Professeur de Biochimie
Faculté de Pharmacie de Nantes
M. Didier LE CARRER, Praticien Hospitalier Biologiste
Laboratoire de Biochimie Spécialisée, CHU de NANTES**

**Adresse de l'auteur : Faculté de Pharmacie
Laboratoire de Biochimie
1 rue Gaston Veil – 44035 NANTES CEDEX**