

**BILAN MINIMUM D'ORIENTATION
DANS LE DIAGNOSTIC IMMUNOLOGIQUE**

M. MALAISE et P. MAHIEU

BILAN MINIMUM D'ORIENTATION DANS LE DIAGNOSTIC IMMUNOLOGIQUE

M. MALAISE⁽¹⁾ et P. MAHIEU⁽²⁾

INTRODUCTION

Le nombre des techniques applicables dans les laboratoires d'immunologie clinique s'est accru dans des proportions considérables ces vingt dernières années. Cette pléthore a engendré inévitablement, d'une part un estompement progressif de la connaissance de leur valeur diagnostique réelle et, d'autre part, un effritement de la logique régissant leur prescription. Dans cet article, nous poursuivrons trois buts principaux :

1) rappeler les principes élémentaires qui sont à la base des méthodes les plus fréquemment employées, seule façon raisonnable de connaître leur précision, leur sensibilité, leur reproductibilité et donc, leurs limites ;

2) établir une échelle de valeurs entre ces différents tests immunologiques en les classant comme :

- a) essentiels au diagnostic ou à la surveillance des patients ;
- b) utiles, mais non indispensables ;
- c) d'intérêt limité à la recherche ;

3) en fonction de cette échelle de valeurs, tenter de définir un bilan minimum permettant de préciser le diagnostic des affections immunes en médecine interne. Si cette « entreprise » apparaît louable, elle n'est cependant pas dépourvue de risques. En effet, toute remise à jour est, par définition, incomplète et toute tentative de classification est sujette à caution,

car elle comporte inévitablement une certaine part de subjectivité. D'emblée, nous prions les confrères omnipraticiens de bien vouloir nous en excuser, en espérant que l'effort entrepris leur permettra de mieux contrôler la valeur des bilans immunologiques qu'ils sont amenés à demander tous les jours.

Les tests permettant de mesurer les différents composants de la réponse immune peuvent être répartis en trois catégories principales :

1) les techniques de dosage des facteurs humoraux, tels que les immunoglobulines, les anticorps, les composants du complément, etc ; leur intérêt est évident et l'interprétation des résultats est actuellement bien codifiée ;

2) les tests cellulaires, plus difficiles à réaliser, à interpréter ; ils sont certes utiles, mais non indispensables, à quelques exceptions près (cf. plus loin) ; leur intérêt est surtout scientifique et leur reproductibilité laisse encore à désirer, malgré les progrès récents accomplis grâce aux anticorps monoclonaux ;

3) les tests *in vivo* qui analysent à la fois les facteurs humoraux et cellulaires ; ils sont d'une certaine valeur dans l'exploration des immunodéficiences et des états d'hypermensibilité, mais sont difficiles à standardiser.

Nous analyserons de manière critique la valeur et les indications des techniques appartenant à chacune de ces catégories.

ÉTUDE DES FACTEURS HUMORAUX

I. Dosage des immunoglobulines et d'autres protéines spécifiques

La technique la plus utilisée jusqu'il y a peu était l'immunoprécipitation. Elle est basée sur la formation d'un immun-précipité lorsque l'antigène et l'anticorps (précipitant) correspondant sont présents en concentrations opti-

⁽¹⁾ Assistant, Université de Liège, Institut de Médecine, Département de Clinique et de Séméiologie médicales (Pr. N.) et Service de Rhumatologie, Médecine Physique et Réadaptation fonctionnelle (Pr. P. Franchimont).

⁽²⁾ Agrégé de Faculté, Université de Liège, Institut de Médecine, Département de Clinique et de Séméiologie médicales (Pr. N.).

males (« équivalence »). La précipitation est obtenue dans un gel d'agar. L'immunodiffusion radiale et l'immunoélectrophorèse en « rocket » représentent deux applications de ce principe : la première est relativement peu sensible (5 mg/ml), très fiable (le coefficient de variation est de l'ordre de 3 %), mais lente (48 h) ; la seconde est plus rapide (la migration de l'antigène est accélérée par la création d'un champ électrique), plus sensible (1 mg/ml), mais ne convient pas tellement pour mesurer les immunoglobulines, puisque ces protéines, faiblement chargées, migrent très peu en électrophorèse.

La néphélométrie tend à remplacer les techniques d'immunodiffusion. Son principe est le suivant : à faibles concentrations, les complexes immuns restent en suspension sous la forme de fines particules qui sont capables de disperser un rayonnement lumineux. Pour une concentration constante en anticorps, la quantité de lumière dispersée est proportionnelle à la concentration de l'antigène. La mesure du rayonnement dispersé permettra de déterminer avec précision la concentration en immun-complexes, à la condition d'éviter que d'autres

particules non-immunes telles que les chylomicrons, ne puissent, par leur effet propre sur la dispersion lumineuse, fausser les résultats. Cette méthode est donc un peu moins spécifique que l'immunoprécipitation, mais elle est plus rapide (2 h environ), aussi sensible, et surtout susceptible d'être automatisée. Elle est dès lors employée lorsque l'on veut analyser un grand nombre d'échantillons.

L'immunodiffusion radiale et la néphélométrie ont permis de mesurer un grand nombre de protéines dans différents liquides biologiques : le sérum, le liquide amniotique, le liquide céphalorachidien, la salive et le liquide gastro-intestinal. Le tableau I reprend quelques exemples de protéines que l'on peut doser par immunoprécipitation. La mesure de la concentration sérique des immunoglobulines (et leur électrophorèse) est *essentielle* chez tous les patients atteints d'infections récurrentes ou sévères et chez ceux présentant une affection lymphoproliférative. Elle est *utile* dans les états d'hypergammaglobulinémie accompagnant, par exemple, les affections hépatiques chroniques et le lupus érythémateux disséminé, mais, dans ces cas, une analyse qualitative des immunoglobulines par immunoelectrophorèse doit être réalisée simultanément, de façon à préciser le caractère polyclonal ou monoclonal de l'hypergammaglobulinémie (cf. plus loin). Le dosage *séquentiel* des immunoglobulines est *utile* pour distinguer une immunodéficience permanente d'une immunodéficience transitoire ; il est *indispensable* lors de la surveillance thérapeutique d'un désordre lymphoprolifératif. La mesure du fibrinogène et des protéines de la phase aiguë est *utile* pour apprécier l'intensité de la réaction inflammatoire, et pour suivre son évolution en cours de traitement. La mise en évidence et le dosage des chaînes légères lambda et kappa dans l'urine devraient toujours être pratiqués lorsque l'on suspecte, ou que l'on traite, une gammopathie monoclonale « maligne » (cf. plus loin). Enfin, dans la mesure où l'albumine n'est pas synthétisée par le tissu nerveux central, la détermination du rapport IgG/albumine dans le liquide céphalorachidien fournit une indication indirecte de la quantité d'IgG synthétisée par les lymphocytes infiltrant ce tissu. En effet, si l'intégrité

TABLEAU I. *Quelques protéines dosables par immunoprécipitation*

1. Protéines sériques

- Impliquées dans la réponse immune
Immunoglobulines : IgG, IgA, IgM
Composants du complément : C1q, C3, C4, facteur B
Inhibiteur du complément : inhibiteur de la C1 estérase
- Protéines de la phase aiguë
 α_1 -antitrypsine C reactive protein (CRP)
 α_1 -macroglobuline Orosomucoïde
- Protéines de transport
Transferrine Céruloplasmine
Haptoglobine
- Protéines de la coagulation
Fibrinogène
Antithrombine III

2. Urine

Chaînes légères (de types lambda et kappa)

3. Liquide céphalorachidien

IgG - albumine

fonctionnelle de la barrière hémato-encéphalique est altérée, l'albumine et l'IgG du liquide céphalorachidien augmenteront dans les mêmes proportions, alors qu'une élévation préférentielle de la concentration en IgG de ce liquide sera notée si la barrière hémato-encéphalique est intacte et que le tissu nerveux est infiltré par des lymphocytes. Cette mesure est donc *essentielle* dans l'exploration des infections et des processus de démyélinisation touchant le système nerveux central.

En pratique, le dosage quantitatif des immunoglobulines est indispensable au diagnostic et à la surveillance des patients. Il faut cependant se rappeler :

- 1) que ce dosage prend au moins 24 à 48 h, s'il est réalisé par immunoprécipitation ;
- 2) que seuls les laboratoires disposant d'un néphélomètre pourront rendre un résultat en quelques heures ;
- 3) que les chylomicrons peuvent fausser le dosage néphélométrique (la prise de sang doit donc être pratiquée chez un patient à jeûn) ;
- 4) que ces techniques ont un seuil de sensibilité de 1 à 5 mg/ml ;
- 5) qu'elles doivent toujours être combinées à une analyse électrophorétique et/ou immunoelectrophorétique.

II. Analyse qualitative des immunoglobulines

L'électrophorèse des protéines sériques est généralement réalisée sur des membranes en acétate de cellulose. Elle permet de détecter la présence de paraprotéines (bandes monoclonales, M). La bande M peut s'observer *n'importe où* sur le tracé électrophorétique et peut être quantifiée par densitométrie. Des fausses bandes M, ne correspondant pas à des immunoglobulines, peuvent être notées lors de l'électrophorèse : elles correspondent, soit à l'hémoglobine (mais dans ce cas l'échantillon est rose), soit au fibrinogène, soit à des IgG agrégées (lorsque le prélèvement a été conservé dans de mauvaises conditions). Il est donc crucial d'envoyer rapidement le sérum au laboratoire. Lorsqu'une bande M est suspectée en électrophorèse sur acétate de cellulose, sa nature doit être précisée par immunoelectrophorèse. Les protéines séparées par électrophorèse sont in-

cubées avec différents antisérums (dirigés contre les IgG, IgA, les IgM, les chaînes légères kappa ou lambda) et les lignes de précipitation obtenues sont colorées et analysées. Les immunoglobulines polyclonales, normales, donneront naissance à des arcs de précipitation longs et fins, alors que les monoclonales précipiteront sous la forme d'arcs épais, étroits, souvent dédoublés ou empennés. Il faut garder à l'esprit que toutes les gammopathies monoclonales ne sont pas nécessairement associées à une affection maligne. La figure 1 résume les conditions

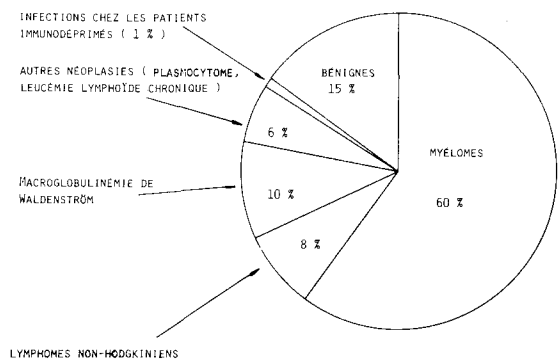


FIG. 1. Les causes d'apparition de paraprotéines dans le sérum.

d'apparition de paraprotéines dans le sérum. Environ 15 % des individus peuvent présenter une gammopathie monoclonale bénigne, surtout lorsqu'ils sont d'un certain âge. La découverte de faibles quantités de paraprotéines dans le sérum d'un sujet asymptotique pose donc un problème diagnostique difficile. Cependant, certains résultats plaident pour le caractère bénin de la gammopathie :

- 1) la concentration de la paraprotéine reste inférieure à 20 g/l de sérum ;
- 2) il n'existe pas de diminution concomitante de la concentration sérique des autres classes d'immunoglobulines ;
- 3) il existe moins de 15 % de plasmocytes dans la moelle osseuse ;
- 4) on ne note pas de chaînes légères dans les urines et de lésions osseuses radiologiques ;

5) la concentration sérique de la paraprotéine n'augmente pas en fonction du temps.

Même si ces critères sont présents, une surveillance biologique régulière du patient est requise, car il ne faut pas perdre de vue que les paraprotéines dites bénignes peuvent n'être que le stade débutant d'un myélome qui deviendra cliniquement apparent 10 ans plus tard seulement. Les analyses immunoélectrophorétiques itératives permettront également de diagnostiquer les paraprotéïnémies bénignes, transitoires, accompagnant parfois un stimulus antigénique intense, tel que celui occasionné par une parasitose persistante ou une infection bactérienne sévère.

Si le sérum est frais, un dépôt important de protéines à l'origine de l'électrophorèse suggère la présence de cryoglobulines. Comme leur nom l'indique, les cryoglobulines sont des immunoglobulines qui forment des précipités, des gels, voire des cristaux, sous l'action du froid. Si l'existence d'une cryoglobulinémie est également suspectée cliniquement (lésions de vasculites avec ulcérations cutanées, phénomènes de Raynaud), leur recherche doit être faite systématiquement sur un échantillon de sang recueilli dans des conditions rigoureuses : le sang doit être prélevé directement dans une seringue préchauffée et délivré, dans un liquide tiède, le plus rapidement possible, au laboratoire le plus proche. Les « arrangements de transport interdépartementaux » en application dans la plupart des hôpitaux sont tout à fait insuffisants. L'idéal serait que le laboratoire réalise lui-même le prélèvement sanguin qui sera placé immédiatement à 37 °C pendant le temps nécessaire à la formation du caillot. Le sérum est alors laissé à 4 °C pendant 48 h minimum, puis le précipité éventuel obtenu par centrifugation (qui contient les cryoglobulines) est redissous par chauffage à 37 °C dans un tampon véronal, juste avant l'analyse immunoélectrophorétique. Si ces conditions ne peuvent pas être remplies, une telle analyse est *sans intérêt*.

Dans des conditions normales, la synthèse des immunoglobulines s'accompagne d'une production proportionnellement plus importante de chaînes légères que de chaînes lourdes. Les chaînes libres « excédentaires », polyclonales, sont excrétées dans l'urine normale en très

faible quantité. Les patients atteints d'affections rénales pourront excréter dans l'urine plus de chaînes légères que normalement, mais elles auront toujours un caractère polyclonal en immunoélectrophorèse. La recherche de chaînes légères monoclonales dans les urines (protéines de Bence-Jones) doit *toujours être réalisée* dans le myélome (et dans n'importe quelle situation où une bande M est mise en évidence lors de l'électrophorèse du sérum), dans les hypogammaglobulinémies de cause indéterminée et dans l'amyloïdose. Les protéines de Bence-Jones ne sont pas dosables par les réactifs couramment employés pour mesurer la protéinurie, ni détectables par les tigettes. Elles précipitent à 56 °C et se redissolvent à l'ébullition. Cependant, cette méthode traditionnelle ne décèle que 40 % des chaînes légères libres dans l'urine. La recherche de la protéine de Bence-Jones doit se faire de la manière suivante :

- 1) concentrer les urines ;
- 2) réaliser une électrophorèse sur acétate de cellulose, de façon à démontrer la présence d'une bande M ;
- 3) pratiquer une immunoélectrophorèse pour confirmer que la bande M est bien constituée, soit de chaînes légères kappa libres, soit de chaînes légères lambda libres.

III. Recherche d'autoanticorps et d'anticorps dirigés contre des antigènes extrinsèques

Les analyses qui précèdent sont réalisées systématiquement, en première intention. Elles permettent de déceler une anomalie dans la production des immunoglobulines et de préciser leur caractère mono- ou polyclonal. Les tests demandés en seconde intention auront pour but de rechercher parmi les immunoglobulines, soit des anticorps dirigés contre des antigènes extrinsèques, microbiens ou non, soit des anticorps dirigés contre des antigènes normalement présents dans les tissus (autoanticorps).

A. Anticorps dirigés contre des agents infectieux

La détection d'anticorps dirigés contre différents micro-organismes est *utile* dans le dia-

gnostic d'une infection. Leur présence démontre que l'hôte a déjà été en contact avec l'antigène testé. Elle n'est pas synonyme d'une infection aiguë. Pour diagnostiquer cette dernière, il faut observer une élévation significative du titre des anticorps (IgG) dans deux échantillons de sérum prélevés chez le même patient à quinze jours d'intervalle. Si l'on souhaite une réponse immédiate formelle, il faut que des anticorps de la classe des IgM (signant une réponse primaire) soit présents, à des titres élevés, dans le sérum du patient.

B. Anticorps dirigés contre des antigènes extrinsèques, non invasifs

Certains anticorps dirigés contre des agents extrinsèques, non invasifs, peuvent induire des réponses immunes anormales (états d'hypersensibilité), qui sont de type I, si la lésion est principalement induite par les IgE, et de type

III, si elle est principalement induite par les IgG ou les IgM.

Dans l'asthme extrinsèque, dans le rhume des foins, les tests cutanés seront *utiles* :

1) pour s'assurer qu'une réaction de type I, dépendant des IgE, est bien impliquée ;

2) pour tenter de déceler l'antigène responsable. Les tests par piqûres (« prick tests ») sont faciles à réaliser, les tests intradermiques sont plus douloureux. La valeur des résultats est principalement liée à la pureté des réactifs utilisés. Leur liste et leurs indications sont résumées dans le tableau II. Les patients atopiques ont fréquemment des tests cutanés positifs en présence de plusieurs antigènes. Des tests de provocation par voie bronchique ou nasale devraient donc être systématiquement réalisés dans ces cas, mais ils seront potentiellement dangereux et ne doivent être pratiqués qu'en milieu hospitalier et sous surveillance médicale.

TABLEAU II. Intérêt des tests cutanés *in vivo*

Type de test	Type de réaction ^(a)	Antigènes	Intérêt diagnostique ^(b)	Indication
Prick test et tests intradermiques (ID)	Immédiate (I) (5-30 min)	• Pollens de graminées	Moyen	Patients atopiques : asthme, rhume des foins, eczéma atopique
		• Poussière de maison, etc.		
		• Antigènes industriels	Bon	Asthme industriel
		• Protéines animales utilisées en thérapeu- tique (insuline, p. ex.)	Bon	Réactions anaphylacti- ques à une substance donnée
Tests ID et prick test	Réaction d'Arthus (III) (6-24 h)	• <i>Aspergillus</i> , ... • Protéines aviaires	Bon	Asthme avec éosinophilie Alvéolites allergiques extrinsèques
Tests ID	Hypersensibilité retardée (IV) (2 à 7 jours)	• Tuberculine (PPD) • Virus des oreillons • Streptokinase	Bon	Tuberculose / Sarcoïdose ou explo- ration des immuno- déficiences d'origine cellulaire
Patch test	Hypersensibilité retardée (IV) (2 à 7 jours)	• Grande variété d'agents sensibilisants (onguents, ions métalliques, ...)	Moyen	Dermatites de contact

(a) Le temps nécessaire à la réaction est indiqué entre parenthèses.

(b) Corrélation entre une réaction positive et l'histoire clinique.

Les patients chez lesquels les tests cutanés sont contre-indiqués (dermatites sévères, patients cortico-dépendants, ...) peuvent être explorés par des tests de laboratoire : la mesure des IgE totales et le RAST (radio-allergo-sorbent test). La première est réalisée par une méthode radio-immunologique (PRIST ou « paper radio-immunosorbent technique ») ; elle permet d'assurer que la réaction immune anormale est induite par des IgE, mais ne précise évidemment pas la nature de l'antigène. La seconde est également basée sur une technique radio-immunologique. Elle est, par définition, spécifique d'un antigène donné. Les résultats des RAST sont très fiables, puisqu'ils corroborent ceux des tests cutanés ; malheureusement, cette technique est onéreuse et difficilement applicable en routine courante.

S'il apparaît que les IgE ne sont pas impliquées, il convient de rechercher l'existence éventuelle d'anticorps précipitants, qui sont généralement des IgG ou des IgM. Cette analyse est *essentielle* dans l'exploration des alvéolites allergiques extrinsèques. Elle est réalisée par immunodiffusion radiale, le sérum du patient étant incubé avec différents extraits antigéniques (*aspergillus fumigatus*, *candida albicans*, *microspora faeni*, albumine aviaire, etc.).

C. Mise en évidence d'autoanticorps dans le sérum

La détection d'autoanticorps circulants se fait par trois techniques principales : l'immunofluorescence, l'hémagglutination, et le dosage radio-immunologique. Chacune de ces techniques a ses avantages et ses inconvénients : l'immunofluorescence est la moins sensible et son interprétation est teintée de subjectivité, même si l'observateur est expérimenté ; l'hémagglutination est plus sensible, mais laborieuse ; les dosages radio-immunologiques sont très sensibles, quantitatifs, mais ils nécessitent une infrastructure assez importante (compteurs β et δ , locaux pour déchets radioactifs, ...), et des réactifs onéreux.

1. *Immunofluorescence indirecte*. — Le sérum du patient est incubé avec le tissu pendant 30 min à la température du laboratoire. Les immunoglobulines non fixées sont éliminées par lavage, puis un second anticorps, porteur d'un marqueur (généralement la fluorescéine), est ajouté. Celui-ci réagira avec les immunoglobulines du patient qui

se sont fixées sur les antigènes du tissu. La fixation de l'anticorps fluorescent et sa topographie peuvent alors être visualisées au moyen d'un microscope à lumière UV. La plupart des laboratoires utilisent, comme conjugué fluorescent, un anticorps dirigé contre les IgG. En effet, seuls les anticorps de la classe des IgG présentent un intérêt diagnostique, à l'exception des anticorps antinucléaires qui peuvent être également des IgM. Le tableau III résume les anticorps mis en évidence par immunofluorescence indirecte, et leur signification clinique. L'interprétation des résultats dépend du titre des anticorps, de l'âge et du sexe du patient. Ainsi les personnes âgées, du sexe féminin, présentent fréquemment des autoanticorps à des titres peu élevés, en l'absence de toute manifestation clinique d'affection auto-immune. Par contre, des titres élevés d'autoanticorps chez une personne jeune seront beaucoup plus suggestifs d'un désordre immunitaire même en l'absence de signes cliniques majeurs. De toute manière, la confrontation entre les données cliniques et les résultats de l'immunofluorescence est fondamentale si l'on veut éviter des « étiquetages » erronés. Les demandes « d'anticorps antitissu(s) » dans un but de dépistage systématique sont *sans intérêt* et doivent être *découragées*, voire désapprouvées. La valeur diagnostique de la présence d'anticorps antinucléaires est précisée par le tableau IV ; l'intérêt de définir leur topographie de fixation est souligné dans le tableau V. L'aspect en flammèche ou en anneau des anticorps antinucléaires est très suggestif d'un lupus érythémateux disséminé. Il ne permet cependant pas un diagnostic formel.

2. *Hémagglutination*. — Les globules rouges sont utilisés comme indicateurs cellulaires en raison de leur propriété de former des agglutinats bien visibles lorsqu'un anticorps forme des ponts entre des antigènes situés à la surface de globules rouges voisins. Ces antigènes sont, soit présents naturellement (tests de Coombs direct ou indirect), soit fixés par l'intermédiaire de différents agents couplants. Le facteur rhumatoïde (le plus souvent une IgM réagissant avec les IgG) est recherché par cette technique. Dans le test de Waaler-Rose, des hématies de mouton sont recouvertes d'IgG de lapin par incubation préalable avec une concentration subagglutinante d'anticorps de lapin anti-

TABLEAU III. Autoanticorps non spécifiques d'organe décelés par immunofluorescence indirecte

Autoanticorps	Tissus testés	Localisation des dépôts	Diagnostics cliniques possibles
Antinucléaire	Foie de rat	Tous les noyaux	Lupus érythémateux disséminé (tableau V)
Antimuscle lisse	Estomac de rat	Muscularis mucosa, media des vaisseaux, ...	Hépatite chronique active, lésions hépatiques non spécifiques, infections virales
Antimitochondries	Rein et foie de rat	Mitochondries des tubes rénaux, distaux Mitochondries des cellules hépatiques	Cirrhose biliaire primitive, hépatite chronique active (rarement) Lupus érythémateux disséminé (rarement)
Antiréticuline	Rein et foie de rat	Tubulo-interstitielle rénale ; péri-portale	Maladie cœliaque, dermatite herpétiforme Polyarthrite rhumatoïde (rarement)
Antiacide déoxyribonucléique	Crithidia luciliae	Kinétoplaste de cet organisme	Lupus érythémateux disséminé (en poussée)
Anticellules gastriques pariétales	Estomac de rat	Cellules pariétales uniquement	Anémie pernicieuse
Antimicrosomaux	Thyroïde humaine	Microsomes des cellules épithéliales	Maladies thyroïdiennes auto-immunes
Antisurrénalien	Surrénales humaines	Cellules corticales	Maladie d'Addison idiopathique
Anti-ilôts de pancréas	Pancréas humain	Toutes les cellules de l'ilôt	Diabète juvénile de type I
Antiglande salivaire	Glande sous-maxillaire humaine	Mitochondries des cellules canaliculaires	Syndrome de Sjögren
Antimuscle squelettique	Diaphragme de rat ou muscle squelettique humain	Bandes A des myofibrilles	Myasthénie - Myosites
Antimuscle cardiaque	Muscle cardiaque humain	Sarcoplasme des fibres musculaires	Syndrome de Dressler
Dirigés contre la peau	Peau humaine	Substance intercellulaire intra-épidermique Membrane basale épidermique	Pemphigus vulgaire Pemphigus vulgaire

hématies de mouton. Les IgG de lapin portant des déterminants antigéniques communs aux IgG humaines, le facteur rhumatoïde éventuellement présent dans le sérum agglutinera les hématies de mouton sensibilisées. Les titres hémagglutinants cliniquement significatifs sont de 1/32 au moins. Le test de Waaler-Rose doit toujours être pratiqué devant une arthropathie inflammatoire. Il est assez spécifique de la polyarthrite rhumatoïde, mais il ne faut pas oublier que 20 % environ des polyarthrites rhumatoïdes sont séronégatives. Le caractère pathogène du facteur rhumatoïde est peu vraisemblable et il n'existe d'ailleurs pas de corrélation entre les titres hémagglutinants et l'évolution de la maladie. La mesure séquentielle de

ces titres en cours de traitement a donc un intérêt *très limité*. Pour terminer, il faut signaler que le test de Waaler-Rose est plus spécifique que le test au latex, réalisé dans le même but, et dans lequel des particules de latex sont recouvertes d'IgG humaines agrégées par la chaleur. Dans cette dernière technique, dont la sensibilité est supérieure à celle du Waaler-Rose, le nombre de faux résultats positifs est loin d'être négligeable.

L'hémagglutination passive a également été employée pour rechercher des anticorps anti-thyroglobuline et des anticorps dirigés contre des antigènes microsomaux dans les affections thyroïdiennes. Si leur intérêt dans le diagnostic des thyroïdites est indiscutable, leur signification

TABLEAU IV. Valeur diagnostique des anticorps antinucléaires (AAN) en fonction de leur classe

Classe des anticorps	Fréquence de positivité (%)
<i>AAN de la classe des IgM</i>	
Lupus érythémateux disséminé (LED) diagnostiqué précocement	> 95
Polyarthrite rhumatoïde	40
Néoplasies	0 - 10
Lésions tissulaires chroniques	> 30
Sujets âgés	> 40
	(titres peu élevés)
<i>AAN de la classe des IgG</i>	
LED	95
	(titres élevés)
LED induit par des médicaments	100
Syndrome de Sjögren	60
Hépatite chronique active	70
Cirrhose biliaire primitive	25
Connectivités mixtes	100
Sclérodermie	60
Périartérite noueuse	< 30
	(titres peu élevés)
Arthrites chroniques juvéniles	10 - 20

pathogénique, de même d'ailleurs que celle de la plupart des autres autoanticorps spécifiques d'organe, reste controversée. Leur recherche séquentielle est donc *utile*, mais *non indispensable*.

ble. Leur présence n'influencera d'ailleurs que peu (ou pas du tout) le choix thérapeutique.

3. *Radioimmunoassay (RIA)*. — Les méthodes radio-immunologiques sont certainement les plus sensibles (elles détectent de très faibles concentrations d'autoanticorps circulants), et sont très spécifiques. La liste des autoanticorps décelés par RIA est donnée dans le tableau VI. Ces RIA sont *utiles* au diagnostic et à la surveillance thérapeutique. Des enzymes pourront bientôt remplacer les marquages au moyen de radio-isotopes. Les ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay) sont au moins aussi sensibles et spécifiques que les RIA ; ils ont en outre l'avantage d'éviter les manipulations d'isotopes et les risques potentiels de contamination (lors du marquage, de l'élimination des déchets radioactifs, ...).

D. Mise en évidence d'autoanticorps dans les prélèvements biopsiques

Des prélèvements de peau, de reins et de moelle osseuse devront *toujours* être pratiqués, chaque fois qu'il n'existe pas de contre-indication, dans le but de déterminer la présence d'immunoglobulines, de complément et, beaucoup plus rarement, d'antigènes extrinsèques au sein des tissus. Les échantillons ne doivent pas être fixés, mais simplement placés dans du liquide physiologique ; ils seront directement conduits au laboratoire qui les congèlera

TABLEAU V. Aspects topographiques des anticorps antinucléaires






Topographie	Aspect sous le microscope	Affection sous-jacente	Antigène
Homogène (diffuse)		Aucune particulièrement	Désoxyribonucléoprotéine
Annulaire, périphérique		Lupus érythémateux disséminé (LED)	DNA en double brin
En flammèche		LED	DNA en double brin (?)
Nucléolaire		Sclérodermie, LED	Nucléole
Mouchetée		LED Syndrome de Sjögren Connectivites mixtes	Antigènes nucléaires extractibles

TABLEAU VI. Autoanticorps décelables par radioimmunoassay

Anticorps	Méthode	Résultat	Intérêt clinique
Antifacteur intrinsèque	Inhibition de la liaison de la vitamine B12	+ ou -	Anémie pernicieuse
Anti-DNA en double brin	Liaison directe du DNA marqué au ¹²⁵ I ou au ¹⁴ C	% de liaison spécifique ou unités/ml	Lupus érythémateux systémique Hépatite chronique active
Antimembrane basale glomérulaire	Liaison directe de l'antigène membranaire marqué au ¹²⁵ I	Titre ou % de liaison spécifique	Syndrome de Goodpasture Néphrites par anticorps anti-membrane basale
Antirécepteur de l'acétylcholine	Liaison directe de l' α bungarotoxine marquée au ¹²⁵ I et complexée à un extrait musculaire humain	% de liaison spécifique ou mmol/l d'anticorps spécifiques	Myasthénie grave
Antiplaquettes	Tests directs ou indirects utilisant un anticorps anti-IgG humaine marqué au ¹²⁵ I ^(a)	+ ou -	Thrombocytopénie idiopathique Thrombocytopénie néonatale Lupus érythémateux systémique

(a) Ces tests sont en outre importants pour distinguer les autoanticorps des alloanticorps.

dans de l'azote liquide et réalisera les coupes dans un cryostat. Les examens en immunofluorescence directe sont effectués au moyen d'antisérums conjugués à la fluorescéine et dirigés contre les immunoglobulines ou différentes fractions du complément. La présence d'immunoglobulines et de complément, sous forme granuleuse, suggère l'existence de complexes immuns. La topographie linéaire des immunoglobulines, le long des membranes basales, est très suggestive de l'existence d'anticorps dirigés contre ces glycoprotéines de structure.

IV. Etude du système du complément et recherche de complexes immuns circulants

A. Complément

L'analyse du complément sérique se fait par un test fonctionnel global, qui détermine son activité hémolytante, et par des dosages de ses composants au moyen d'antisérums spécifiques; l'immunodiffusion radiale et la néphélogométrie sont les techniques les plus fréquemment employées pour réaliser ces dosages.

La mesure du complément hémolytique (CH) estime la quantité de sérum requise pour hémolyser à 50 % (CH₅₀) une quantité bien

standardisée d'hématies sensibilisées. Le sérum du patient sera toujours titré par comparaison avec un sérum de référence. Cette analyse est *essentielle* lorsque l'on suspecte une anomalie génétique du système du complément, par exemple, chez de jeunes patients atteints d'infections récidivantes ou d'un lupus érythémateux systémique familial.

Pour comprendre les modifications observées dans les concentrations sériques des composants du complément, il est raisonnable de les diviser en 3 groupes :

1) les composants précoces de la voie classique (C1, C4 et C2), voie activée par les complexes immuns;

2) les composants précoces de la voie alterne (facteur B ou C3 proactivateur, properdine), voie activée par l'endotoxine (bactéries Gram négatives);

3) les composants tardifs, communs à ces deux voies d'activation (C3 à C9).

Des concentrations sériques abaissées de C4 et de C3, et normales de facteur B, suggèrent une activation par la voie classique; si le C4, le C3 et le facteur B sont diminués, une activation concomitante de la

voie alterne est hautement probable, soit par deux mécanismes simultanés (immun-complexes plus endotoxine, par exemple), soit par le système d'amplification rétrograde. Enfin, si le C4 est normal, alors que le C3 et le facteur B sont bas, il existe vraisemblablement une activation de la voie alterne uniquement (tableau VII). En pratique, la mesure séquentielle du C3 et du C4 est *utile* pour apprécier le degré d'évolutivité de certaines formes de glomérulonéphrites et de vasculites. Si les taux sériques sont diminués, ils tendront à se normaliser lors des rémissions. Par contre, ces dosages sont *de peu d'intérêt* dans la plupart des maladies inflammatoires aiguës ou chroniques. En effet, il faut se rappeler que la synthèse de ces composants est stimulée lors de n'importe quelle réaction inflammatoire, au même titre que les protéines de la phase aiguë (orosomucoïde, α_2 -macroglobuline, ...). Cette augmentation de synthèse peut donc masquer une consommation, le bilan global étant un taux sérique apparemment normal. Dans ces cas, seule une détermination précise des concentrations sériques des produits de dégradation du C3 (C3c ou C3d) serait d'une *certaine utilité*, une élévation reflétant une accélération du « turnover ». Si ce dosage n'est pas réalisé dans le laboratoire concerné, il est préférable de demander simplement un dosage des protéines de la phase aiguë. Une activation de la voie alterne (C3 bas, C4

normal) chez certains patients atteints de glomérulonéphrite (ou d'infections récidivantes) doit faire rechercher un autoanticorps dirigé contre le C3 activé, et appelé facteur néphritique du C3. Cet autoanticorps diminue l'action stabilisante du C3 activé vis-à-vis de la C3 convertase de la voie alterne et entretient donc le clivage du C3. Il est décelé par incubation préalable du sérum du patient avec un sérum normal et par analyse immuno-électrophorétique subséquente en présence d'un antiserum dirigé contre le C3c. L'apparition d'un arc de précipitation suggère fortement l'existence de cet autoanticorps.

La mesure des autres composants du complément n'a qu'un intérêt *scientifique* à l'heure actuelle, hormis peut-être chez les patients suspects de déficits génétiques. L'œdème angioneurotique héréditaire, causé par un déficit (ou une déficience fonctionnelle) en inhibiteur de la C1 estérase, en est un exemple. Ces patients souffrent d'épisodes récidivants d'œdèmes cutanés, laryngés et intestinaux. Contrairement aux urticaires, les œdèmes cutanés, qui peuvent toucher la face, les membres et/ou le tronc, ne sont ni douloureux, ni prurigineux. Lorsqu'ils atteignent le tractus gastro-intestinal, ils sont responsables de douleurs abdominales, de vomissements et de diarrhée aqueuse. L'œdème laryngé menace la vie du patient. Les poussées aiguës sont favorisées par

TABLEAU VII. *Interprétation des modifications de concentrations sériques du C3, du C4 et du facteur B en pathologie*

Taux sérique			Voie d'activation / Cause métabolique	Origine	Exemple en clinique
C3	C4	Facteur B			
↓	↓	Normal	Classique	Complexes immuns	LED ; vasculites
↓	↓	↓	Classique et alterne	Complexes immuns-Bactéries	LED ; septicémie à germes Gram négatifs
↓	N	↓	Déficit de synthèse	Insuffisance hépatique	Nécrose hépatique aiguë
↓	↓	↓	Alterne	Autoanticorps dirigé contre le C3 activé	Glomérulonéphrite membrano-proliférative de type II
N	↓	N	Voie classique jusqu'au C4 et au C2 seulement	Déficit en inhibiteur de la C1 estérase	Œdème angioneurotique héréditaire
↑	↑	↑	Augmentation de synthèse	Réponses aiguës	Inflammations aiguës et chroniques

le stress, les infections intercurrentes, les traumatismes, les menstruations. Le déficit est héréditaire et se transmet selon un mode autosomique dominant. Le diagnostic est *posé* par la découverte de concentrations sériques abaissées d'inhibiteur de la C1 estérase, induisant, lors des poussées aiguës, une consommation accrue de C4 et de C2, le C3 restant le plus souvent normal. Un taux *normal* de C4 durant une poussée aiguë *exclut* le diagnostic. Le traitement des phases aiguës implique la perfusion de plasma frais, dans le but d'augmenter les concentrations sériques de l'inhibiteur.

B. Complexes immuns

Il existe de nombreux arguments démontrant que les complexes immuns jouent un rôle majeur dans la pathogénie de nombreuses affections humaines. Leur contribution au développement des réactions inflammatoires est étudiée de deux manières en clinique :

1. l'analyse en immunofluorescence de fragments tissulaires ;
2. la mise en évidence de complexes immuns dans le sérum et/ou d'autres liquides biologiques.

Ces dernières années, on a assisté à une prolifération des méthodes de détection des complexes immuns circulants ; elles ont toutes leurs chauds partisans et leurs détracteurs. Sur la base de notre expérience et des données de la littérature, nous aimerions souligner que :

- 1) toutes ces techniques peuvent déceler des immunoglobulines *agrégées*, et pas nécessairement des complexes immuns, surtout lorsque le sérum a été mal conservé, et qu'il a « subi » plusieurs congélations et décongélations successives ;
- 2) que la plupart d'entre elles sont également influencées par la présence dans le sérum de substances qui n'ont rien à voir avec des complexes immuns ;
- 3) que trois méthodes reposant sur des principes différents sont dès lors requises si l'on souhaite atteindre une fiabilité raisonnable (mais non absolue) ;
- 4) que la détection de complexes immuns circulants *n'est essentielle dans aucune condition clinique*, puisque leur présence dans le sérum n'est spécifique d'aucune affection particulière ;

5) que des lésions tissulaires peuvent être provoquées par des complexes immuns alors qu'il n'existe pas de complexes immuns décelables dans le sérum (complexes immuns formés localement, par exemple) ;

6) qu'à l'inverse, il est (heureusement) possible de déceler des complexes immuns dans le sérum de sujets en parfaite santé.

Sur la base de ces arguments, nous pensons que dans toutes les situations cliniques où l'on subodore une affection induite par des complexes immuns, une analyse directe de prélèvements biopsiques doit être pratiquée ; les renseignements fournis par l'examen en immunofluorescence des fragments tissulaires sont sans commune mesure avec ceux « prodigués » par les tests de laboratoire.

La recherche de complexes immuns circulants ne sera donc qu'un pis-aller, et ne sera demandée que dans les conditions suivantes :

- 1) il n'est pas possible de réaliser une biopsie ;
- 2) trois techniques seront effectuées, systématiquement ;
- 3) l'analyse sera réalisée, non pas pour *démontrer* une affection à complexes immuns, mais dans le but de *surveiller* l'évolution (et l'évolutivité) de la maladie (dans le décours du traitement d'une leucose, par exemple).

Si un autre objectif est poursuivi, l'analyse doit être demandée pour une raison *scientifique* uniquement.

ÉTUDE DES LYMPHOCYTES ET DES CELLULES PHAGOCYTAIRES

Trois types de tests sont utilisés à cette fin :

- 1) la quantification des différentes cellules ;
- 2) les tests *in vivo* ;
- 3) les tests fonctionnels *in vitro*.

I. Lymphocytes

A. Quantification des cellules lymphocytaires T et B

Une lymphocytopenie majeure est facilement démontrée par le comptage des globules blancs et la détermination de la formule hémoleucocytaire. Septante-cinq pour cent des lymphocytes circulants sont des lymphocytes T,

dans des conditions normales. L'étude des sous-populations lymphocytaires a été rendue possible grâce aux anticorps monoclonaux, qui reconnaissent des marqueurs spécifiques de surface. La quantification des lymphocytes T et B est *particulièrement importante* dans l'exploration des immunodéficiences, des maladies lymphoprolifératives et, en particulier, des leucémies. Toutes ces analyses ne devraient cependant être réalisées qu'après consultation du responsable du laboratoire, car la procédure est lourde, même lorsque l'on dispose d'un FACS (fluorescent activated cell sorter) permettant le comptage rapide d'un très grand nombre de cellules. Les anticorps monoclonaux peuvent également être *utiles* pour quantifier les lymphocytes T « helper » et les lymphocytes T « suppresseurs » (ou cytotoxiques) : les premiers sont identifiés par les anticorps anti-OKT₄ et les seconds par les anticorps anti-OKT₈. Il est cependant peu vraisemblable que la *seule* recherche des cellules OKT₄- et OKT₈-positives dans le sang périphérique soit *d'une quelconque utilité en clinique*, hormis dans des situations très particulières, où des déterminations séquentielles peuvent être pratiquées (comme après transplantation d'organe, par exemple). Dans toute autre circonstance, la détermination du rapport OKT₄/OKT₈ *n'a qu'un intérêt scientifique*.

B. Tests cutanés *in vivo*

La valeur diagnostique de ces tests a déjà été discutée; nous n'y reviendrons pas (cf. ci-dessus).

C. Tests fonctionnels *in vitro*

Les tests fonctionnels *in vitro* doivent être pratiqués uniquement lorsque les tests cutanés

suggèrent une anomalie de l'immunité cellulaire. Ils ne sont dès lors *essentiels* que dans l'exploration des *immuno-déficiences*; ils pourraient également s'avérer *utiles*, à l'avenir, dans la surveillance des patients recevant des immunomodulateurs.

Lorsque des lymphocytes sont exposés à différentes substances, un certain nombre d'entre eux subissent une *transformation blastique*, en quelques jours. Cette réponse proliférative est mesurée par l'incorporation de thymidine tritiée dans le DNA. Les agents induisant une telle réponse sont repris dans le tableau VIII. Le test d'*inhibition de la migration des leucocytes* interroge également l'immunité cellulaire. Il est plus aisé que le test de transformation blastique, mais il est peu quantitatif et fastidieux. Ces analyses ne doivent être demandées qu'après consultation d'un spécialiste.

II. Neutrophiles et monocytes

A. Quantification

Le nombre absolu de ces cellules dans le sang périphérique peut être calculé facilement à partir du comptage des globules blancs totaux et de la détermination de la formule hémoleucocytaire.

B. Tests fonctionnels *in vitro*

Les neutrophiles peuvent être séparés du sang total par sédimentation sur dextran suivie d'une lyse des globules rouges contaminants. Les monocytes et les lymphocytes sont purifiés par centrifugation différentielle sur un gradient de Ficoll-Hypaque. Les monocytes sont séparés des lymphocytes par adhérence préférentielle sur des surfaces planes en plastique ou en verre,

TABLEAU VIII. Agents responsables de la transformation blastique des cellules T

Agent stimulant	Exemple	Spécificité de la réponse	Nécessité d'un contact préalable
Antigène	Protéine purifiée du <i>Mycobacterium hominis</i> (PPD)	Oui	Oui
Mitogène	Phytohémagglutinine	Aucune	Non
Lymphocytes allogéniques	Culture mixte de lymphocytes	Oui	Non

les lymphocytes étant éliminés par aspiration et lavage. Différents tests peuvent alors être pratiqués (tableau IX) ; ils étudient différentes propriétés fondamentales de ces cellules : la chimotaxie, la phagocytose, la production d'anions superoxydes et la capacité de détruire les bactéries phagocytées. Ces tests ne seront demandés que sur avis d'un spécialiste.

TYPAGE TISSULAIRE

Les antigènes HLA (human leucocyte antigen) représentent les antigènes d'histocompatibilité (de transplantation) les plus importants trouvés à la surface des leucocytes humains. Ces antigènes sont présents sur toutes les cellules, mais leur concentration élevée sur les cellules lymphocytaires permet de réaliser un typage tissulaire précis à partir de ces cellules uniquement. Contrairement au système ABO des globules rouges, il n'existe pas d'anticorps naturels anti-HLA. Les anticorps anti-HLA utilisés pour le typage proviennent donc du sérum de sujets immunisés à la suite de transfusions ou de grossesses répétées. La technique la plus fréquemment employée est le *test de lymphocytotoxicité*. Les lymphocytes sont séparés par centrifugation sur gradient de Ficoll-Hypaque. Ils sont alors incubés à 37 °C avec différents antisérums de spécificité connue en présence de

complément. Les cellules reconnues par l'anticorps sont lysées ou décelées par leur incapacité d'exclure un colorant vital. Si plus de 90 % des cellules lymphocytaires sont tuées par un antisérum donné, elles portent les antigènes HLA correspondants.

Le test de lymphocytotoxicité doit être réalisé dans des centres spécialisés, il est *indispensable* avant toute transplantation d'organes. Il est onéreux, fastidieux, et nécessite un soin et une expérience considérables pour interpréter les résultats.

Un certain nombre de maladies sont associées à des antigènes HLA particuliers. Ainsi, plus de 90 % des patients atteints de spondylarthrite ankylosante sont porteurs de l'antigène HLA-B27, cette incidence contrastant vivement avec l'incidence de cet antigène dans une population générale (8 %). Cette maladie est la seule où le typage tissulaire peut être considéré comme *utile* pour le diagnostic. Dans toutes les autres affections, l'association rapportée est beaucoup plus faible, et, dès lors, *non prédictive*.

BILAN MINIMUM D'ORIENTATION DANS LE DIAGNOSTIC IMMUNOLOGIQUE

Sur la base des critères de sélection repris ci-dessus, il apparaît logique de demander les

TABLEAU IX. Principaux tests fonctionnels des cellules phagocytaires

Fonction testée	Nom du test	Cellules étudiées	Commentaires
• Chimotaxie	Etude de la mobilité et de la chimotaxie	Neutrophiles	Déficit primaire très rare Déficits secondaires transitoires chez les brûlés et les traumatisés graves
• Attachement et phagocytose de particules inertes, de bactéries ou de globules rouges opsonisés	Phagocytose et opsonisation	Neutrophiles Monocytes	La plupart de ces tests sont non quantitatifs. Les déficits sont essentiellement sériques
• Activité bactéricide	Destruction intracellulaire	Neutrophiles	Déficit primaire très rare (maladies granulomateuses ?)
• Phagocytose et activité métabolique associée en réponse au stimulus	Test au NBT (Nitroblue tetrazolium test)	Neutrophiles	Déficits secondaires possibles dans les infections sévères et chez les brûlés, les traumatisés
	Production d'anions superoxydes	Neutrophiles	

tests immunologiques dans l'ordre suivant, en gardant à l'esprit que les symptômes cliniques restent *primordiaux*.

A. En première intention

a) Le dosage des immunoglobulines et des protéines de la phase aiguë, en même temps que la détermination de la VS, du fibrinogène, du sang complet et du nombre de plaquettes circulantes.

b) L'analyse qualitative des immunoglobulines par électrophorèse et par immunoélectrophorèse.

c) Le dosage du C3, du C4 et du C3c (ou du C3d).

Ces analyses permettront de suspecter l'existence d'immunodéficiences primaires ou secondaires, d'un désordre lymphoprolifératif réactionnel, « bénin » (infections, maladies auto-immunes), ou d'un désordre lymphoprolifératif « malin » (leucémie, lymphomes, myélome).

B. En seconde intention

a) La recherche d'anticorps dirigés contre des agents infectieux. Elle précisera l'étiologie de l'agent responsable (virale, bactérienne, mycotique ou parasitaire).

b) La recherche d'anticorps dirigés contre des agents non invasifs. Elle sera particulièrement indiquée dans l'asthme, le rhume des foins, les réactions anaphylactiques.

c) La recherche d'autoanticorps. Plus que tout autre, cette analyse doit être orientée en fonction des données de la clinique (cf. tableaux III à VI), de façon à éviter une « surconsommation ». Ainsi, à titre d'exemple, les autoanticorps dirigés contre les membranes basales épidermiques seront demandés en cas d'affections cutanées bulleuses, contre les membranes basales glomérulaires lorsqu'on suspecte une glomérulonéphrite, contre le DNA lorsqu'on craint un LED, contre les IgG en présence d'une arthropathie inflammatoire, etc.

d) La recherche de complexes immuns circulants par le test au C1q, par le test à la conglutinine et par le test à la protéine A. Comme dans le cas des autoanticorps, elle ne sera effectuée que dans les situations cliniques où l'analyse directe de prélèvements biopsiques (peau, rein, moelle osseuse, ...) ne peut être obtenue.

Les résultats seront toujours analysés avec la plus grande circonspection et confrontés avec ceux des dosages du C3, du C4 et du C3c.

C. En seconde intention et après un avis autorisé

Entrent dans cette rubrique l'étude des sous-populations lymphocytaires par les anticorps monoclonaux, les tests cutanés in vivo, les tests de provocation, les tests fonctionnels in vitro et le typage tissulaire.

CONCLUSION

L'immunologie est maintenant une science à part entière qui a ses fondements physiologiques et physiopathologiques. L'application de ses connaissances à la pathologie humaine a accusé un certain retard par rapport aux découvertes fondamentales. Les immunologistes ne sont-ils pas accusés (souvent à tort) de pratiquer une discipline qui n'a aucun intérêt pratique, clinique ? Nous espérons que cette revue permettra aux étudiants en médecine et à nos confrères omnipraticiens de comprendre que l'immunologie clinique est un domaine en plein essor, qui permet le diagnostic d'un grand nombre d'affections, à la condition de prescrire les tests de laboratoire dans un ordre logique et d'en connaître leurs interprétations et leurs limites.

BIBLIOGRAPHIE

Nous conseillons aux lecteurs qui souhaitent élargir leurs connaissances dans ce domaine la lecture des ouvrages et de l'article suivants :

CHAPEL H. et HAENEY M. — *Essentials of clinical immunology*. Blackwell Scientific Publications, Oxford, 1984.

THOMPSON R.A. — *Techniques in clinical immunology*. 2nd Edition, Blackwell Scientific Publications, Oxford, 1981.

WHO Report. — Use and abuse of laboratory tests in clinical immunology. *Clin. Exp. Immunol.*, 1981, **46**, 662-674.

*
**

Les demandes de tirés à part doivent être adressées au D^r M. Malaise, Institut de Médecine, Hôpital de Bavière, 4020 Liège.