

République Algérienne Démocratique et Populaire
Ministère de l'enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique
Université de Blida 1
Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie
Département de Biologie et de Physiologie Cellulaire



Mémoire de fin d'étude en vue de l'obtention du diplôme de Master

Domaine : Science de la Nature et de la Vie

Option : Biosignalisation Cellulaire, Moléculaire et Immunologie

Par :

GHERDI Amira Soufila

Contribution à la recherche de l'association entre les
molécules HLA classe I et II et Lymphomes Malins
chez les enfants de la population Algérienne

Soutenue publiquement le 09 octobre 2014 devant le jury :

Mme AISSANI R.	Maitre Assistante (A) à l'USDB	Présidente
Mme RAACHE R.	Maitre de Conférences (A) à l'USTHB	Promotrice
Mme EDDAÏKRA A.	Maitre Assistante (A) à l'USDB	Co-promotrice
Mr BENYAHIA N.	Maitre Assistant (A) à l'USDB	Examinateur
Mme HANNACHI L.	Pr. Au CHU Mustapha Pacha	Examinatrice
Mme GALLEZ A.	Maitre Assistante (B) à l'USTHB	Invitée

Promotion 2013/2014

Remerciements

Je remercie tout d'abord Dieu tout puissant pour m'avoir donné la volonté et le courage d'accomplir ce travail et de m'avoir indiqué la bonne voie.

*Mes sincères remerciements vont à Mme **RAACHE R.**, Maître de Conférences (A) à la Faculté des Sciences Biologiques de l'USTHB, à qui je dois d'avoir pu réaliser ce travail. Après m'avoir aimablement accueillie dans son équipe et de m'avoir proposé ce sujet de recherche. Je la remercie de m'avoir guidé et orienté tout le long de mon mémoire, avec ses encouragements, sa rigueur scientifique, son enthousiasme positif, sa compétence et son esprit critique qui m'ont permis de mener à bien ce travail.*

*Je tiens à remercier Mme **EDDAIKRA A.**, Maître Assistante(A) à l'USDB, pour m'avoir aidé à réaliser ce travail.*

*Je témoigne ma profonde et ma respectueuse gratitude à Melle **GALLEZ A.**, Maître Assistante (B) à la faculté des sciences biologiques de l'USTHB, pour sa bienveillance à mon égard, ses précieux conseils, sa disponibilité ainsi que pour l'attention et l'intérêt qu'elle a porté à mes travaux.*

*Je tiens à remercier Mme **AISSANI R.**, Maître Assistante(A) à l'USDB, pour m'avoir fait l'honneur de présider mon jury.*

*J'exprime mes vifs remerciements à Mme le professeur **HANNACHI L.**, qui m'a fait l'honneur d'évaluer et de juger ce modeste travail.*

*Je remercie Mr **BENYAHIA N.**, Maître Assistant (A) à l'USDB, pour avoir accepté d'examiner ce mémoire.*

Mes sentiments de reconnaissance et mes remerciements vont également à l'encontre de toute personne qui a participé de près ou de loin directement ou indirectement à la réalisation de ce travail.

J'exprime toute ma reconnaissance et ma tendresse à mes chers parents. Je les remercie pour leurs conseils bienveillants, pour leur infatigable dévouement, pour leur disponibilité et leur soutien moral.

Je remercie plus que quiconque mes frères et sœurs, mes amis qui ont su me soutenir et m'encourager durant la réalisation de ce mémoire.

Amira

Dédicaces

Je dédie ce travail :

A mes très chers parents, le plus beau don de Dieu

Qu'ils trouvent ici toute ma gratitude

Pour leur soutien tout au long de

Mes études et grâce à qui

J'en suis arrivée là aujourd'hui

Que Dieu vous garde

A mes chers frères et sœurs

Pour leur écoute et leurs encouragements très précieux

A tous mes amis sans exception

Pour leur présence et leur soutien

A tous ceux que j'aime

Résumé

Le lymphome est le troisième cancer le plus fréquent chez l'enfant et comprend deux types, le Lymphome Non Hodgkinien (NHL) et le Lymphome de Hodgkin (HL). Plusieurs facteurs étiologiques sont impliqués dans la pathogenèse des lymphomes; y compris les infections virales, les déficits immunitaires, les agents environnementaux et les facteurs génétiques. De solides arguments à l'appui de la liaison génétique entre la susceptibilité aux lymphomes et les molécules HLA ont été rapportés. 30 enfants atteints de lymphomes ont été inclus dans cette étude. 15 cas de NHL et 15 d'HL. Les extrêmes étaient de 4 à 18 ans. Le groupe témoin était constitué de 70 sujets sains. Un typage des allèles HLA-A,-B, -DR et -DQ a été réalisé par la technique de PCR-SSP.

Les fréquences des allèles HLA-B*18, HLA-DRB1*03, HLA-DRB1*07 et HLA-QB1*02 étaient significativement plus élevées chez les patients atteints de lymphome par rapport aux témoins; alors que HLA-DRB1*13 et DQB1*03 étaient significativement diminuées par rapport aux témoins. Ces résultats indiquent que HLA-B*18, DRB1*03, DRB1*07 et DQB1*02 sont des marqueurs de susceptibilité aux lymphomes, tandis que HLA-DRB1*13 et DQB1*03 peuvent conférer une protection chez la population Algérienne.

Mots-clés: HLA classe I et classe II, Lymphomes Non Hodgkiniens, les Lymphomes de Hodgkin.

Abstract

Lymphoma is the third most common childhood malignancy and comprises two types, non-Hodgkin lymphoma (NHL) and Hodgkin lymphoma (HL). Multiple etiological factors are involved in lymphoma pathogenesis; including viral infection, immune deficiencies, environmental agents, and genetic factors. Strong arguments supporting genetic linkage between susceptibility to lymphomas and HLA molecules are reported. 30 cases were included in this study. 15 cases of NHL and 15 patients with HL. Their ages ranged from 4 to 18 years. The control group consisted of 70 unrelated healthy subjects. HLA-A, -B, -DR and -DQ alleles were typed by means of PCR-SSP.

The frequencies of HLA-B*18, HLA-DRB1*03, HLA-DRB1*07 and HLA-QB1*02 alleles were significantly increased in patients with lymphomas when compared with control; whereas HLA-DRB1*13 and DQB1*03 were significantly decreased when compared with control. These results indicate that HLA-B*18, DRB1*03, *07 and DQB1*02 may contribute to lymphoma susceptibility, while HLA-DRB1*13 and DQB1*03 may confer protection to lymphoma in the Algerian population.

Keywords: HLA class I and class II, Non Hodgkin's Lymphomas, Hodgkin's Lymphomas.

ملخص

سرطان الغدد الليمفاوية هو ثالث أكثر أنواع السرطان شيوعا عند الأطفال ويتضمن نوعين : سرطان الغدد الليمفاوية غير هودجكين (NHL) وسرطان الغدد الليمفاوية هودجكين (HL). وتساهم العديد من العوامل المسببة في التسبب في سرطان الغدد الليمفاوية، بما في ذلك الالتهابات الفيروسية، واضطرابات المناعة، العوامل البيئية والعوامل الوراثية. وقد تم الإبلاغ عن حجج قوية لدعم الارتباط الوراثي بين التعرض لسرطان الغدد الليمفاوية والجزينات HLA. شملت هذه الدراسة 30 طفلا مع سرطان الغدد الليمفاوية، 15 حالة NHL و 15 HL، متوسط العمر هو من 4-18 سنة. وتألفت مجموعة الشهود من 70 شخصا سليما. أجريت الكتابة لـ HLA-A-B-DR و DQ بواسطة PCR-SSP.

ترددات HLA-B*18، HLA-DRB1*03، HLA-DRB1*07 و HLA-QB1*02 كانت أعلى بكثير عند المرضى الذين يعانون من سرطان الغدد الليمفاوية مقارنة مع مجموعة الشهود. في حين HLA-DRB1*13 DQB1*03 كانت منخفضة بشكل ملحوظ مقارنة بمجموعة الشهود. وتشير هذه النتائج إلى أن HLA-B*18، HLA-DRB1*07 و DRB1*03 و DQB1*02 تساهم في التعرض لورم الغدد الليمفاوية، في حين HLA-DRB1*13 DQB1*03 يمكن أن تمنح الحماية ضد سرطان الغدد الليمفاوية عند الجزائريون .

كلمات البحث: HLA الدرجة الأولى والدرجة الثانية ، سرطان الغدد الليمفاوية غير هودجكين، سرطان الغدد الليمفاوية هودجكين.

TABLE DES MATIÈRES

Abréviations

Glossaire

I- Introduction.....1

DONNEES BIBLIOGRAPHIQUES

II-1- Définition.....2

II-1-2 différenciation des LB normales.....2

II-1-2-1 Modifications morphologiques des LB secondaire à des
stimulations antigéniques.....3

II-2 Différenciation des LT normales.....4

II-3 Origine d'apparition des lymphomes malins.....5

II-3-1 Les Lymphomes Non Hodgkiniens.....5

II-3-2 Les Lymphomes Hodgkiniens.....6

II-3-2-1 Maladie de Hodgkin classique.....6

II-3-2-2 Maladie de Hodgkin nodulaire à
prédominance lymphocytaire.....6

II-4 Epidémiologie des lymphomes malin.....7

II-4-1 Maladie de Hodgkin.....7

II-4-2 Les Lymphomes Non Hodgkiniens.....7

II-5 Etiopathogénie des lymphomes malins.....8

II-6 Localisation anatomique des lymphomes malins.....8

II-6-1 Les lymphomes Non Hodgkiniens.....8

II-6-2 Maladie de Hodgkin.....8

II-7 Critères de classification des lymphomes malins	9
III-7-1 Les Lymphomes Non Hodgkiniens	9
II-7-1-1 Classification morphologique.....	9
II-7-1-2 Classification immunophénotypique.....	9
II-7-1-3 Classification cytogénétique.....	9
II-7-2 Les Lymphomes Non Hodgkiniens de l'enfant	9
II-2.1. Le lymphome de Burkitt.....	10
II-2.2. Le lymphome diffus à grandes cellules B.....	10
II-7-2-3 Le lymphome anaplasique à grandes cellules.....	10
II-2-4 Le lymphome lymphoblastique.....	11
II-7-3 Les lymphomes de Hodgkin	11
II-7-3-1 Classification anatomopathologique de lukes-Rye (1966).....	11
III7-3-2 Classification d'ANN-ARBOR anatomo-clinique.....	11
II-8 Le complexe majeur d'histocompatibilité	12
II-8-1 Définition	12
II-8-2 Organisation génétique du système HLA	12
II-8-3 Molécules et gènes HLA classiques	13
II-8-3-1 HLA classe I.....	13
II-8-3-2 HLA classe II classique.....	14
II-8-4 Fonctions des molécules HLA	15
II-8-4-1 Molécules HLA présentatrices de peptides.....	16
II-8-4-2 Intervention des molécules HLA de classe I dans la lyse.....	16
IV-5 Association HLA et maladies	16
 MATERIELS ET METHODE	
III-1 MATERIELS D'ETUDE	17

III-1-1 Patients étudiés.....	17
III-1-2 Critères de sélection des patients.....	17
III-1-3 La population témoin.....	18
III-1-4 Prélèvement sanguin.....	18
III-2 Etude immunogénétique	18
III-2-1 Extraction d'ADN par la technique SALTING OUT.....	18
Principe.....	18
Mode opératoire.....	18
III-2-2 Dosage et contrôle de la qualité de l'ADN.....	19
III-2-2-1 Dosage de l'ADN.....	19
Principe.....	19
III-2-2-2 Contrôle de la qualité d'ADN par électrophorèse.....	19
Principe.....	19
Mode opératoire.....	19
III-2-3 Typage HLA classe I et classe II par technique PCR-SSP.....	20
Principe.....	20
Mode opératoire.....	21
III-2-4 Révélation des amplicons par migration sur gel.....	22
III-2-5 Interprétation des résultats.....	22
III-2-6 Analyse des résultats.....	23
III-3 Outils et tests statistiques.....	24
III-3-1 Calcul de la fréquence phénotypique.....	24
III-3-2 Calcul de la fréquence allélique.....	24

III-3-3 Calcul de la fréquence génotypique.....	24
---	----

III-3-4 L'Odds Ratio (OR).....	24
--------------------------------	----

RESULTATS ET DISCUSSION

IV-1-1 Répartition des patients selon le sexe.....	25
---	-----------

IV-1-2 Répartition des patients selon les types histologiques de la maladie.....	25
---	-----------

IV-2 Résultats alléliques des polymorphismes HLA.....	26
--	-----------

IV-2-1 Fréquence des différents allèles HLA classe I chez les malades et les témoins.....	26
---	----

IV-2-2 Comparaison des fréquences des allèles HLA classe I chez les témoins et malades.....	27
---	----

IV-3 Fréquence des différents allèles HLA classe II chez les témoins et malades.....	30
--	----

IV-3-1 Comparaison des fréquences des allèles HLA classe II entre témoins et malades.....	30
---	----

IV-4 Comparaison des fréquences des allèles HLA entre patients HL et NHL.....	34
---	----

IV-4-1 Fréquence des allèles HLA classe I chez les patients HL et NHL.....	34
--	----

IV-4-2 Fréquence des allèles HLA classe II chez les patients HL et NHL.....	36
---	----

Discussion.....	40
------------------------	-----------

Conclusion et perspectives

Références bibliographiques

Annexes

Résumé

LISTE DES ABREVIATIONS UTILISÉES DANS LE TEXTE

ADN	Acide Désoxyribonucléique
AID	Activation Induced cytidine Deaminase
ALK	Anaplastic Lymphoma Kinase
BcR	Récepteur de la cellule B
BET	Bromure d'éthidium
CALLA	Common Acute Lymphoblastic Leukemia/Lymphoma Antigen
CD	Cluster de Différenciation
CG	Centre Germinatif
CPA	Cellules Présentatrices d'Antigènes
CRS	Cellules de de Reed-Sternberg
DO	Densité optique
EBV	Virus d'Epstein Barr
EDTA	Acide Ethylène Diamine Tétra acétique
EMA	Epithelial Membran Antigen
HL	Lymphome de Hodgkin
HLA	Antigène leucocytaire humain
IC	Intervalle de Confiance
Ig	Immunoglobuline
IgCyt	Immunoglobuline Cytoplasmique
IgD	Immunoglobuline Delta
IgM	Immunoglobuline Mu
IgS	Immunoglobuline de Surface
Kb	Kilo base
LB	Lymphocyte B
LBGCRT/H	Lymphome A Grandes Cellules B Riche en Lymphocytes T et/ou en Histiocytes
LT	Lymphocyte T
MHC-RL	Maladie de Hodgkin Classique Riche en Lymphocytes
MHNPL	Maladie de Hodgkin Nodulaire à Predominance Lymphocytaire

NHL	Lymphome Non Hodgkinien
NK	Natural Killer
NTP	Nucléotide Tri Phosphate
OMS	Organisation Mondiale de la Santé
PCR-SSP	Polymérase Chain Reaction- Sequence Spécifique Primer
REAL	Revised European American classification of Lymphoïd neoplasm
SDS	Sodium Dodecyl Sulfate
TBE	Tris Acide Borique EDTA
TcR	Récepteur de la cellule T
TdT	La terminal Désoxynucléotidyl Transférase
TNF	Tumor Necrosis Factor
UV	Ultra Violet

GLOSSAIRE

Age médian : Est l'âge qui divise la population d'un pays en deux groupes numériquement égaux, la moitié est plus jeune, l'autre moitié plus âgée.

Age moyen : ou moyenne d'âge, est la moyenne de l'âge des habitants dans une région.

Apoptose : Processus actif d'autodestruction naturellement programmé, par fragmentation de certaines cellules aboutissant à leur phagocytose.

Cellules de Reed Sternberg : Sont des cellules (environ 50 μm) malignes caractéristiques des lymphomes de Hodgkin et infiltrant les ganglions lymphatiques.

Commutation de classe : Est un processus qui lors de la maturation d'un lymphocyte B, permet de changer l'isotype des immunoglobulines produites.

Endémique : Se dit d'une maladie qui est persistante dans une région.

Follicules lymphoïdes : Sont de grosses formations arrondies de consistance dure, constituées d'éléments et de cellules réticulaires entassés appartenant au tissu lymphatique, renfermant des lymphocytes.

Hématopoïèse : Est le processus physiologique permettant la création et le renouvellement des cellules sanguines.

Hypermutationn somatique : Est un phénomène retrouvé dans la génération de la diversité des immunoglobulines produites par les lymphocytes B qui a lieu dans les organes lymphoïdes secondaires.

Médiastin : Est la région de la cage thoracique située entre les deux poumons contenant le cœur, l'œsophage, la trachée et les bronches souches.

Néoplasie : Est un développement anormal des cellules qui prolifèrent sans bénéficier d'une fonction ni d'une structure utile à l'organisme.

Phénotype : Correspond à l'expression du patrimoine génétique dans un environnement donné. C'est l'ensemble des caractères observables chez un individu, résultant de l'interaction entre son génotype et les effets de son environnement.

Polymorphisme : Désigne la coexistence de plusieurs allèles pour un gène ou un locus donnés dans une population.

Sporadique : Se dit d'une maladie qui n'affecte que quelques personnes isolément.

Translocation chromosomique : Est une maturation génétique caractérisée par l'échange réciproque de matériel chromosomique entre les chromosomes non homologues, c'est-à-dire n'appartenant pas à la même paire.

LISTE DES FIGURES

		Page
Figure 1	Différenciation lymphocytaire B et principaux désordres lymphoprolifératifs correspondants.	4
Figure 2	Différenciation lymphocytaire T et principaux désordres lymphoprolifératifs Correspondants	5
Figure 3	Coloration à l'HE du tissu lymphoïde d'un cas de LH montrant les cellules tumorales typiques et l'infiltrat cellulaire correspondant.	7
Figure 4	Localisation anatomique des différents stades de la maladie de Hodgkin	12
Figure 5	Carte génétique du système HLA	13
Figure 6	Structure de la molécule HLA classe I classique	14
Figure 7	Structure de la molécule HLA classe II	15
Figure 8	Principe du typage générique et allélique HLA par PCR-SSP	21
Figure 9	Profil électrophorétique du typage HLA	23
Figure 10	Répartition des patients selon le sexe	25
Figure 11	Répartition des patients NHL selon les types histologiques	26
Figure 12	Fréquences des allèles HLA classe I (HLA-A-B*) chez les malades et témoins	26
Figure 13	Fréquences des allèles HLA classe I (HLA-A*) chez les malades et témoins	28
Figure 14	Fréquences des allèles HLA classe I (HLA-B*) chez les malades et témoins	28
Figure 15	Valeur des OR des allèles HLA classe I (HLA-B*) chez les malades	29
Figure 16	Fréquences des allèles HLA classe II (DRB1* et DQB1*) chez les malades et témoins	30
Figure 17	Fréquences des allèles HLA classe II (DRB1*) chez les malades et témoins	32
Figure 18	Fréquences des allèles HLA classe II (DQB1*) chez les malades et témoins	32
Figure 19	Valeur des OR des allèles HLA classe II (DRB1*) chez les malades	33
Figure 20	Valeur des OR des allèles HLA classe II (DQB1*) chez les malades	33
Figure 21	Fréquences des allèles HLA classe I (HLA-A*) chez les patients HL et NHL	35
Figure 22	Fréquences des allèles HLA classe I (HLA-B*) chez les patients HL et NHL	35

Figure 23	Valeur des OR des allèles HLA classe I (HLA-B*) chez les patients HL et NHL	36
Figure 24	Fréquences des allèles HLA classe II (DRB1*) chez les patients HL et NHL	38
Figure 25	Fréquences des allèles HLA classe II (DQB1*) chez les patients HL et NHL	38
Figure 26	Valeur des OR des allèles HLA classe II (DRB1*) chez les patients HL et NHL	39
Figure 27	Prélèvement sanguin par ponction veineuse	Annexe
Figure 28	Répartition des différentes amorces dans la plaque du typage classe II (DR-DQ).	Annexe

LISTE DES TABLEAUX

		Page
Tableau I	Caractéristiques générales des patients	17
Tableau II	Programme de la PCR One Lambda	22
Tableau III	Interprétation des résultats de l'électrophorèse	23
Tableau IV	Comparaison des allèles HLA-A et -B chez les patients et les témoins	27
Tableau V	Comparaison des allèles HLA-DRB1*, DQB1* chez les malades et témoins	31
Tableau VI	Comparaison des fréquences des allèles HLA classe I chez les patients HL et NHL	34
Tableau VII	Comparaison des fréquences des allèles HLA classe I chez les patients HL et NHL	37
Tableau VIII	Protocole de préparation des solutions réactionnelles pour le typage HLA par PCR-SSP1AB de la classe I	Annexe
Tableau IX	Protocole de préparation des solutions réactionnelles pour le typage HLA par PCR-SSP2L de la classe II	Annexe
Tableau X	Protocole de la micro-SSP	Annexe
Tableau XI	Spécificités et tailles des produits de PCR des 8 primer mixes utilisés pour le typage SSP DQ à faible résolution.	Annexe
Tableau XII	Spécificités et tailles des produits de PCR des 23 primer mixes utilisés pour le typage SSP DR à faible résolution	Annexe

Introduction

Les lymphomes malins constituent un groupe de cancers du tissu lymphoïde, ganglionnaire ou extra-ganglionnaire, lié à la transformation néoplasique d'une cellule lymphocytaire. Cet ensemble constitue le plus grand groupe des hémopathies malignes. On y distingue classiquement la Maladie de Hodgkin et les Lymphomes Non Hodgkiniens (Gisselbretch., 2008).

Le lymphome est le troisième cancer le plus fréquent chez les enfants, ce qui représente environ 15% des cancers diagnostiqués chez les enfants (0-14 ans) (Constance., 1999). Ce type de cancer se développe aux dépens des cellules lymphocytaires B ou T, dont 90% des lymphomes sont du type B. Ces tumeurs ont des caractéristiques biologiques différentes basées sur une combinaison de critères morphologiques, immunophénotypiques, génétiques et cliniques (Allioua., 2011).

Le Lymphome d'Hodgkin se produit plus fréquemment chez les adolescents. Il existe deux formes les plus fréquentes : l'HL classique, qui se caractérise par une infiltration lymphocytaire pléomorphe de cellules géantes, les CRS et la maladie de Hodgkin nodulaire à prédominance lymphocytaire.

Cependant le Lymphome Non Hodgkinien est la forme la plus courante de lymphome diagnostiqué chez les enfants entre 0-5 ans (Howlader., 2011). Chez ces patients jeunes, la distribution indique un glissement en faveur des NHL agressifs, blastiques, souvent immatures, de sorte que les NHL lymphoblastiques, Burkitt, anaplastique et Lymphomes B diffus à grande cellules sont les plus fréquents en pédiatrie (Vogetseder., 2011).

L'incidence des lymphomes n'a cessé de s'accroître, En effet, durant les années 70 et 80, l'augmentation de l'incidence était de l'ordre de 3 et 4% par an, elle se stabilise actuellement autour de 10 à 20% tous les 5 ans. Ceci a permis aux lymphomes d'accéder au 6^{ème} rang des cancers les plus répandus (Allioua. 2011).

Nous nous sommes fixés comme objectifs :

- Rechercher une association entre les marqueurs HLA classe I et classe II et les lymphomes malins chez enfants de la population Algérienne
- L'intérêt du typage HLA dans le diagnostic différentiel des lymphomes malins

Pour cela, nous avons effectué:

- Des prélèvements sanguins sur des enfants atteints de lymphome du type B c'est à dire Hodgkinien et Non Hodgkinien et des témoins sains,
- Extraction d'ADN par la technique SALTING OUT,
- Typage HLA par la technique de biologie moléculaire : polymérase chain reaction-Sequence Specific Primers (PCR-SSP).
- Comparaison des fréquences des différents marqueurs entre malades et témoins via des tests statistiques.

Données bibliographiques

II-1-1 Définition

Les lymphomes malins correspondent à un groupement hétérogène d'entités tumorales d'origine lymphoïde. Ils se développent suite à des proliférations cancéreuses monoclonales de cellules des lignées lymphocytaires B et T. Ces proliférations sont responsables du développement de tumeurs localisées aux organes lymphoïdes secondaires, notamment les nœuds lymphatiques, mais aussi aux territoires non lymphoïdes.

Contrairement aux lymphomes malins des adultes, les lymphomes des enfants sont de haut grade de malignité, cependant, avec des chimiothérapies intensives le pronostic des malades est amélioré (Mc Bride *et al.*, 2008).

Les lymphomes peuvent être classés en sous-types en fonction du stade précis du blocage de la différenciation lymphoïde B ou T auquel ils correspondent (Delsol *et al.*, 2001).

La compréhension et la classification de ces lymphomes, nécessite une bonne connaissance du développement et de la différenciation normale des lignées lymphocytaires :

II-1-2 Différenciation des LB normales

Les cellules B proviennent de la moelle osseuse d'où elles dérivent de progéniteurs des cellules B : les cellules pro-B (HLA-DR+). Sous l'action du facteur de transcription PAX5, elles évoluent en cellules pré-B, définies par l'apparition des premiers marqueurs B : molécules CD19 et CD79a/m b-1 (l'un des marqueurs B les plus précoces). Il s'y associe par la suite d'autres marqueurs des cellules B, les antigènes CD22 et CD20. Ultérieurement, les cellules pré-B expriment l'antigène CALLA, dit CD10. L'apparition de chaînes μ cytoplasmiques, sans chaîne légère associée, marque la dernière étape de la différenciation des cellules pré-B dans la moelle hématopoïétique. Les cellules pro-B et pré-B possèdent une enzyme impliquée lors des réarrangements des gènes : la TdT, très utile au diagnostic des tumeurs dérivées de cellules (lymphomes lymphoblastiques).

Les cellules vont assembler un pré-BcR puis un BcR (récepteur pour l'antigène) pour devenir matures. Après leur sortie de la moelle osseuse, les lymphocytes B passent dans le sang pour aller coloniser le tissu lymphoïde périphérique. Dans les ganglions lymphatiques, les cellules B se localisent essentiellement dans les follicules, alors que les lymphocytes T siègent entre les follicules et dans le cortex profond ou zone paracorticale. Dans les follicules lymphoïdes, les LB se disposent soit à la périphérie (zone du manteau), soit au centre des follicules, dans une zone appelée centre germinatif qui n'apparaît qu'après stimulation antigénique. Les lymphocytes du manteau et du centre germinatif ont un phénotype différent. Les premiers, petits « naïfs », non stimulés, possèdent des IgS : IgM, ou IgD, divers antigènes B (CD19, CD20, CD22) et la molécule CD21 (récepteur

pour la fraction C3d du complément et pour le virus d'Epstein-Barr, EBV). Chez l'homme, une sous-population de lymphocytes B ganglionnaires exprime des antigènes normalement associés aux LT : l'antigène CD5. Après une stimulation antigénique, les lymphocytes folliculaires sont activés, prolifèrent et subissent des modifications phénotypiques (figure 1). La différenciation vers la lignée plasmocytaire est marquée par l'apparition d'IgCyt, l'acquisition de nouveaux antigènes (CD38) et la perte de la plupart des antigènes B (CD19, CD20, CD22) (Jaffe *et al.*, 2008).

II-1-2-1 Modifications morphologiques des LB secondaires à des stimulations antigéniques

Après une stimulation antigénique, les petits lymphocytes des follicules subissent une série de transformations morphologiques, les faisant passer par des stades de cellules à noyaux non encochés (centroblastes) et noyaux encochés (centrocytes). Toutes ces cellules aisément reconnaissables dans un centre germinatif normal, peuvent donner naissance à des lymphomes malins, d'architecture folliculaire ou diffuse. L'activation des cellules B folliculaires se ferait grâce à l'intervention des cellules folliculaires dendritiques. Les cellules naïves subissent une commutation de classe des gènes des Ig ainsi que des phénomènes d'hypermutation somatique liés à l'action de l'enzyme AID. Les centroblastes se différencient à leur tour en cellules à noyaux encochés : les grands et petits centrocytes qui formeraient les LB mémoires. Par la suite l'immunoblaste donne naissance aux plasmocytes. Dans la zone marginale des follicules lymphoïdes, il existe une maturation T-indépendante. En revanche, dans les centres germinatifs, la sélection des cellules B est sous la dépendance de cellules T spécialisées, lymphocytes T auxiliaires folliculaires (TFH) (McBride *et al.*, 2008).

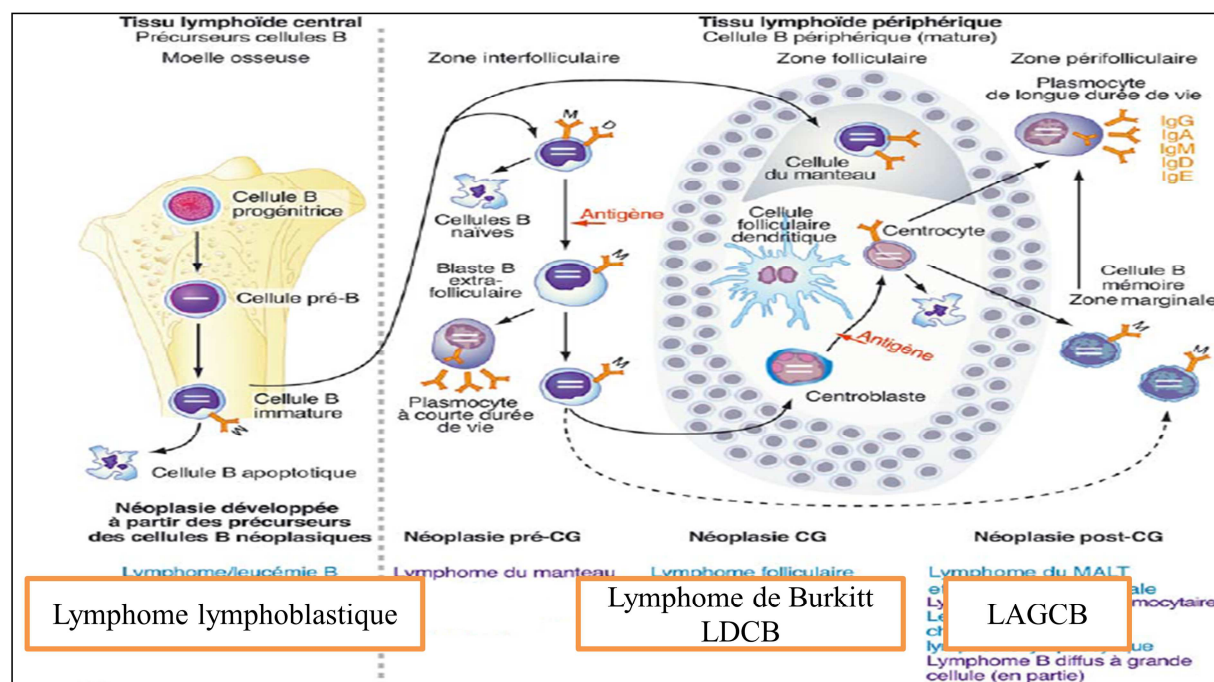


Figure 1: Différenciation lymphocytaire B et principaux désordres lymphoprolifératifs (Russano de Paiva *et al.*, 2009).

La transformation maligne peut survenir à tous les stades de maturation des cellules B. Les précurseurs B situés dans la moelle osseuse peuvent subir une apoptose ou donner des cellules B naïves. Elles se transforment en blastes au contact de l'antigène et peuvent donner les plasmocytes à courte durée de vie ou entrer dans les centres germinatifs. Dans le CG, les centroblastes aboutissent à la formation de centrocytes ou subissent une apoptose.

Les cellules post-CG incluent les plasmocytes de longue durée de vie et les cellules B de la zone marginale et de mémoire.

II-2 Différenciation des LT normales

Les futurs LT, issus des cellules souches de la moelle osseuse, trouvent dans le thymus un microenvironnement favorable à leur différenciation. Dans le thymus, se localisent trois populations différentes de lymphocytes : le prothymocyte (stade I) et les thymocytes intermédiaires (stade II) dans la zone corticale, les thymocytes matures (stade III) dans la zone médullaire. Il est actuellement établi que ces trois populations représentent trois stades de différenciation des LT. Les prothymocytes et les thymocytes intermédiaires possèdent une activité TdT et recombinaise (Rag-1, Rag-2). Dans le cortex thymique, les prothymocytes n'expriment que les antigènes CD2, CD7, CD38 et l'antigène HLA-DR (stade I). Le stade II serait marqué par la migration de la molécule CD3 à la surface des cellules où elle formerait avec le récepteur de la cellule T pour l'antigène

(TcR) le complexe CD3/TcR α/β , qui intervient dans la reconnaissance des antigènes. A ce stade, apparaîtraient également les antigènes CD1a, CD5, CD4 et CD8. La maturation des thymocytes dans la zone médullaire conduirait à la perte de la molécule CD1 et à l'individualisation (stade III) des lymphocytes auxiliaires (CD4+) et cytotoxiques (CD8+) (figure 2). Ces cellules passeraient alors dans le sang pour aller coloniser le tissu lymphoïde périphérique (Jaffe *et al.*, 2008).

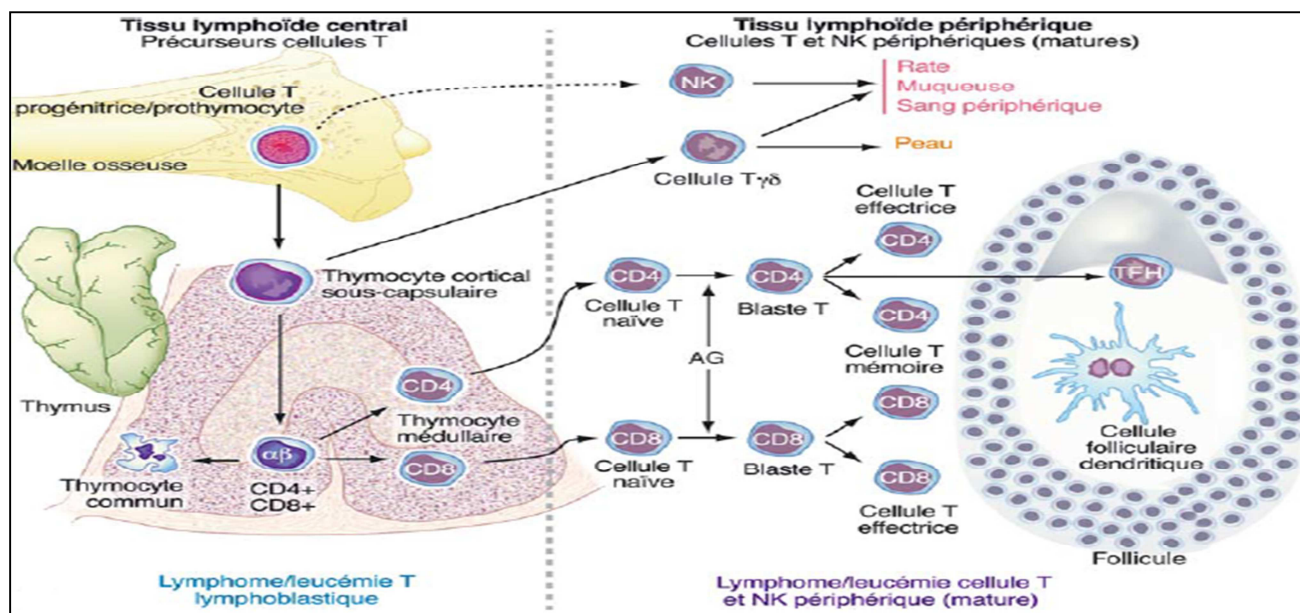


Figure 2: Différenciation lymphocytaire T et principaux désordres lymphoprolifératifs (Russano de Paiva *et al.*, 2009).

II-3 Origine d'apparition des lymphomes malins

II-3-1 Les Lymphomes Non Hodgkiniens

Les lymphomes B peuvent dériver soit de cellules B naïves, n'ayant pas traversé le centre germinatif, donnant, ainsi, le lymphome du manteau, le lymphome folliculaire. La plupart des lymphomes B diffus à grandes cellules et le lymphome de Burkitt peuvent dériver des cellules centro-folliculaires (centroblaste), ou encore de cellules post centre germinatif donnant le lymphome des zones marginales, certains lymphomes B diffus à grandes cellules, le lymphome lymphoplasmocytaire et le plasmocytome (Figure.1).

Tandis que, les lymphomes T et NK (Figure 2) peuvent dériver soit des cellules immatures et donneront des lymphomes T lymphoblastiques ou des cellules T matures donneront des lymphomes T et NK périphériques (Jaffe *et al.*, 2008).

II-3-2 Les Lymphomes Hodgkiniens (Maladie de Hodgkin)

La classification OMS 2008 distingue deux types de lymphomes de Hodgkin :

- ✓ Le lymphome de Hodgkin classique (environ 95 % des cas) ;
- ✓ Le lymphome hodgkinien nodulaire à prédominance lymphocytaire ou paragranulome de Poppema.

II-3-2-1 Maladie de Hodgkin classique

C'est une hémopathie maligne, curable dans un très grand nombre de cas, est caractérisée par la présence de cellules de Reed-Sternberg, évoluant dans une mixture hétérogène de cellules non néoplasiques : lymphocytes, plasmocytes, polynucléaires éosinophiles et histiocytes (figure 3). Cette cellule est à la base du diagnostic du HL, celle-ci est d'origine lymphoïde, elle présente un aspect volumineux à noyau irrégulier bi ou multilobé, à cytoplasme abondant avec un ou plusieurs nucléoles (Liu *et al.*, 2014).

Les CRS expriment des marqueurs lymphoïdes B (CD19, CD20, CD21, CD22) plus fréquemment que des marqueurs T (CD2, CD3, CD4). Des marqueurs d'activation, CD30 en particulier, sont également exprimés. Parmi les marqueurs histiomonocytaires, le CD15 est souvent exprimé. (Haluska *et al.*, 1994). L'origine de la cellule tumorale dans la maladie de Hodgkin a été longuement débattue, mais plusieurs travaux récents indiquent qu'un certain nombre de maladies de Hodgkin se développent à partir de lymphocytes de la lignée B. Le virus EBV peut être détecté dans les CRS, dans une proportion très variable de cas et il n'y a aucune preuve de son rôle dans la survenue de la maladie (Liu *et al.*, 2014).

II-3-2-2 Maladie de Hodgkin nodulaire à prédominance lymphocytaire

La MHNPL, antérieurement appelée paragranulome de Poppema et Lennert, est une entité rare, actuellement reconnue comme distincte du HLC et représente 10-15% des cas. Elle correspond à un lymphome B indolent dérivé d'une cellule B du centre germinatif et peut ressembler morphologiquement et phénotypiquement à la MHC-RL ou au lymphome à grandes cellules B riche en lymphocytes T et/ou en histiocytes (*LBGCRT/H*). La distinction entre ces trois pathologies rares est difficile mais nécessaire car leur traitement et leur pronostic sont différents.

La MHNPL est caractérisée par une prolifération de cellules tumorales de type « pop-corn » (CD20+ CD30- CD15- EMA+ Bcl6+) dispersées sur un fond cellulaire constitué principalement de petits lymphocytes B agencés en nodules (Jaffe *et al.*, 2008).

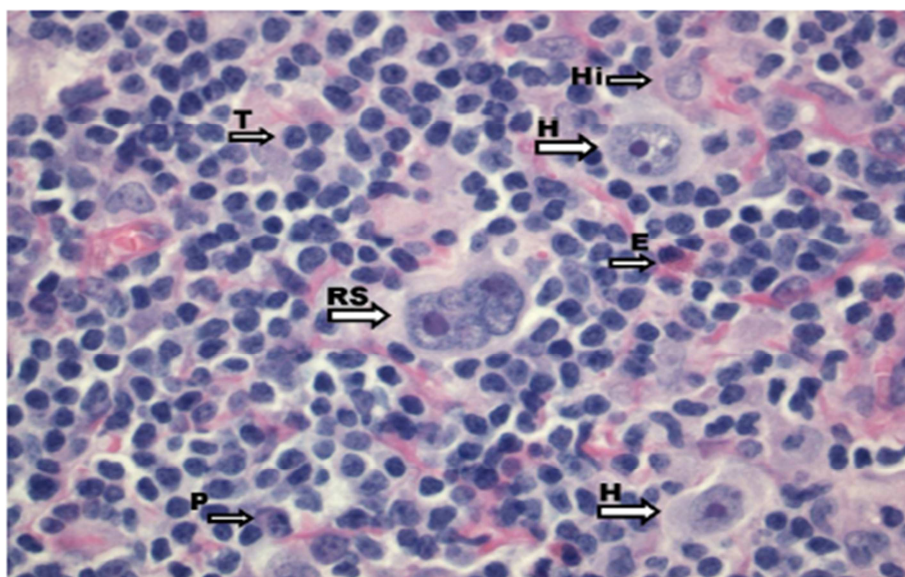


Figure 3 : Coloration à l'hématoxyline-éosine du tissu lymphoïde d'un cas de LH montrant les cellules tumorales typiques et l'infiltrat cellulaire correspondant. (H) : cellules mononucléaires d'Hodgkin, (RS) cellules de Reed-Sternberg, (T) : lymphocytes T, (E) : éosinophiles, (P) : cellules plasmatiques, et (Hi) : histiocytes (Liu *et al.*, 2014).

II-4 Épidémiologie des lymphomes malins

II-4-1 Maladie de Hodgkin

Le taux d'incidence standard en Europe et aux États Unis d'Amérique est estimé à 2-5 cas chez l'homme et 1-2 cas chez la femme pour 100 000 habitants. La prédominance masculine est notée dans toutes les études. La maladie semble plus rare chez l'enfant dans ces pays. Dans les pays en voie de développement le taux d'incidence est mal connu. Il serait faible par comparaison aux pays européens. En Algérie, le taux d'incidence nationale est estimé à 0,734 cas pour 100 000 habitants avec une prédominance masculine pour ce qui est du sexe, et une prédominance des adultes pour ce qui est de l'âge (Hamladji *et al.*, 2009).

II-4-2 Les Lymphomes Non Hodgkiniens

Le taux d'incidence moyenne des NHL en Europe et aux USA est de 12-15 cas / 100.000 habitants. Le sex ratio homme/ femme est de 1,3 à 2. C'est ainsi que les lymphomes de l'enfant sont à nette prédominance masculine.

Les NHL sont 5 fois plus fréquents que la maladie de Hodgkin. La cause des NHL reste inconnue. Cette maladie est en constante progression. En Algérie, l'incidence moyenne nationale est de 5 cas / 100.000 habitants (Hamladji *et al.*, 2009).

II-5 Etiopathogénie des lymphomes malins

L'étiopathogénie des lymphomes malins reste encore mal connue, cependant, de récents travaux rapportent que le développement des lymphomes n'est pas sous la dépendance d'un seul facteur, mais résulte plutôt de l'action globale de plusieurs facteurs : des facteurs de susceptibilité génétique, des facteurs environnementaux, les déficits immunitaires et les infections virales comme l'infection au VIH (Brusamolino *et al.*, 2009).

II-6 Localisation anatomique des lymphomes malins

II-6-1 Les lymphomes Non Hodgkiniens

La localisation anatomique du lymphome est l'un des premiers critères à avoir été utilisé historiquement pour la description et la classification des lymphomes.

Les formes ganglionnaires ou nodales se traduisent cliniquement par une adénopathie simple ou multiple qui peut concerner aussi bien les nœuds lymphatiques superficiels que profonds.

Les formes extra-ganglionnaires ou extra-nodales correspondent à un envahissement tumoral localisé primitivement hors des nœuds lymphatiques, incluant la peau, le système digestif, le foie, la rate, le système nerveux central, etc. Les symptômes sont généralement en rapport avec l'organe atteint. Théoriquement, tous les organes peuvent être le lieu d'une prolifération tumorale lymphoïde primitive. Il est parfois difficile de distinguer la localisation primitive. Par exemple, le foie est rarement le siège d'un lymphome primitif, il s'agit le plus souvent d'une localisation secondaire découverte lors du bilan d'extension (Delarue. 2010).

II-6-2 Maladie de Hodgkin

Cette maladie représente 10% des lymphomes malins diagnostiqués. Plus de la moitié des maladies de Hodgkin ont une localisation médiastinale au moment de leur diagnostic. C'est le plus fréquent des lymphomes médiastinaux. Seul 5% sont limitées au médiastin. La maladie évolue lentement et diffuse par voie lymphatique (extension de proche en proche aux territoires ganglionnaires adjacents) et/ou hématogène (atteinte médullaire, splénique et viscérale).

Les progrès thérapeutiques ont permis d'améliorer le pronostic des malades. Le lymphome de Hodgkin présente une grande sensibilité aux traitements chimio-radiothérapeutiques permettant, le plus souvent, une guérison ; il a été le premier cancer guéri par ces traitements.

Il s'agit de l'un des cancers les plus curables, notamment, pour les formes localisées (Brusamolino *et al.*, 2009).

II-7 Critères de classification des lymphomes malins

II-7-1 Les Lymphomes Non Hodgkiniens

La classification des NHL est basée sur les données immunophénotypiques, cytogénétiques et moléculaires (classification OMS., 2008).

II-7-1-1 Classification morphologique

La classification morphologique des lymphomes repose sur deux critères fondamentaux, l'histologie et les caractères cytologiques des cellules néoplasiques. L'histologie permet de définir l'architecture de la prolifération tumorale (Gisselbretch.2009).

L'analyse cytologique repose sur un certain nombre de critères comme la taille de la cellule, les caractéristiques du noyau (forme et contours, structure de la chromatine, présence et aspects des nucléoles) ainsi que du cytoplasme (abondance, caractères tinctoriaux) (Brousse *et al.*1997).

II-7-1-2 Classification immunophénotypique

L'immunophénotypage permet de caractériser une population lymphoïde d'après ses marqueurs cellulaires et de différencier les lymphomes des autres proliférations néoplasiques ganglionnaires. Ces marqueurs de différenciation recherchés sont détectés grâce à des anticorps monoclonaux spécifiques mis en contact soit avec une coupe de tissu (l'immunohistochimie), un prélèvement cytologique (l'immunocytochimie) ou alors avec des cellules isolées dans un fluide (la cytométrie de flux) (Brousse *et al.*,1997; Harris, 2001 ; Craig et Foon, 2008).

III-7-1-3 Classification cytogénétique

Cette discipline a été lancée après la mise en évidence d'un réarrangement génétique associé de façon non aléatoire à une hémopathie maligne (Nowell et Hungerford, 1960). Depuis, de nombreuses anomalies ont pu être reliées à des lymphomes, il s'agit pour la plupart de translocation réciproque, mais aussi parfois de gain ou de perte de chromosomes aboutissant à des trisomies ou des monosomies touchant essentiellement des oncogènes et peuvent être mises en évidence soit par la réalisation d'un caryotype ou à l'aide de méthodes relevant de la biologie moléculaire comme l'hybridation *in situ* ou PCR (Delabesse et Macintyre, 1997 ; Bachir Bouiadjra *et al.*, 2009).

II-7-2 Les Lymphomes Non Hodgkiniens de l'enfant

Les lymphomes malins non hodgkiniens représentent la troisième cause du cancer de l'enfant, après les leucémies et les tumeurs cérébrales. Les formes les plus fréquentes sont le lymphome de Burkitt (50-60%), le lymphome lymphoblastique (25-35%), le lymphome diffus à grandes cellules B (10%) et le lymphome anaplasique à grandes cellules.

III-7-2-1 Le lymphome de Burkitt

Le lymphome de Burkitt est issu de cellules B matures et se caractérise par une évolution agressive. Il survient principalement entre l'âge de 5 et 9 ans et se présente sous trois variantes: endémique, sporadique et immunodéficiente. Le lymphome de Burkitt est principalement de type extra-ganglionnaire, typiquement dans la région abdominale, la moelle osseuse et le système nerveux central. Au niveau morphologique, il se caractérise par la présence de blastes monomorphes et de fins nucléoles. L'immunophénotype présente le profil suivant (CD20+, CD10+, Bcl-6+ avec Bcl-2 et TdT négatifs) (Vogetseder et al. 2011).

Ce lymphome est caractérisé, sur le plan cytogénétique, par la présence du réarrangement chromosomique impliquant le *c-myc*. Il s'agit d'une translocation t (8;14) (q24.1;q32), juxtaposant le gène *c-myc* (situé en 8q24) près du gène des chaînes lourdes d'immunoglobulines (situé en 14q32) (Yano et al., 1992 ; Avet-Loiseau et al., 2001 ; Michaux et al., 2004).

II-7-2-2 Le lymphome diffus à grandes cellules B

Les lymphomes primitifs diffus à grandes cellules B sont des tumeurs agressives représentant 40% des lymphomes à cellules B. Bien qu'ils concernent plus souvent les adultes, les lymphomes à grandes cellules peuvent également survenir chez les enfants avec une variance importante. Les patients présentent souvent des masses tumorales uniques ou multiples de croissance rapide au niveau des sites ganglionnaires ou extra-ganglionnaires. Ces tumeurs sont généralement composées d'un mélange de cellules de type centroblastique et immunoblastique qui expriment les marqueurs caractéristiques des cellules B : CD19, CD20 et CD22 et l'immunoglobine de surface (Ferrés et German, 2004). Les translocations chromosomiques les plus récurrentes sont t (3;14), t (8;14) et t (14;18) touchant préférentiellement le gène *Bcl6* (Bastard et al. 1994).

III-7-2-3 Le lymphome anaplasique à grandes cellules

Sur le plan morphologique, L'infiltration des ganglions a un aspect particulier : infiltration des sinus sous-capsulaires. Les cellules tumorales sont volumineuses avec un cytoplasme abondant et clair. Le noyau est irrégulier et clair contenant de volumineux nucléoles.

Il se caractérise par une expression constante de l'antigène CD30 et par des atteintes ganglionnaires périphériques, intra-abdominales et extra ganglionnaires.

Il exprime la protéine ALK conduisant à une prolifération accrue et à une apoptose amoindrie (Vissal, 2002 ; Vogetseder et al., 2011). La translocation chromosomique la plus fréquente, observée dans 75 à 84% des lymphomes anaplasiques à grandes cellules est la t (2;5) (p23;q35), qui soumet le gène ALK au contrôle du gène de la nucléophosmine (*NPM*) (Vogetseder et al., 2011).

II-7-2-4 Le lymphome lymphoblastique

Les lymphomes lymphoblastiques représentent environ 25% des cas, ils sont issus de précurseurs immatures (lymphoblastes) des lignées cellulaires B et T. Ils se présentent sous forme médiastinale, ganglionnaire ou extra-ganglionnaire. La prolifération est caractérisée par une architecture diffuse, des cellules de taille moyenne, un cytoplasme peu abondant et pâle, un noyau convoluté ou non, à la chromatine finement dispersée et contenant un seul petit nucléole, (Vogetseder *et al.*, 2011).

Sur le plan immunophénotypique, il se caractérise par la présence de petits lymphocytes dans les ganglions, les cellules B expriment des antigènes comme CD10, CD19, CD22, et CD79a (Asim *et al.*, 2005). La majorité des lymphomes lymphoblastiques à cellules B (97%) montrent un réarrangement des gènes des immunoglobulines, qui concerne les chaînes lourdes (Igh) (>95%), les chaînes légères kappa (30%) ou lambda (20%). (Vogetseder *et al.*, 2011).

II-7-3 Les lymphomes de Hodgkin

La classification de la maladie de Hodgkin se base sur la localisation anatomique et le stade évolutif (Fermé *et al.*, 1997).

II-7-3-1 Classification anatomopathologique de lukes-Rye (1966)

Cette classification se base sur l'aspect histologique du tissu lymphoïde. Il existe quatre formes de la maladie qui sont, du plus fréquent au plus rare :

La forme classique sclérose nodulaire (60 à 80 %) : avec un épaississement de la capsule, un parenchyme nodulaire, une fibrose ou en bandes épaisses. Les cellules tumorales ont un cytoplasme abondant donnant un aspect lacunaire.

La forme à cellularité mixte (20 à 30 %) : la population cellulaire est abondante, formée de cellules lymphoïdes, de plasmocytes, d'histiocytes, de polynucléaires avec des amas de cellules épithéliales, dont l'ensemble constitue un granulome. La forme riche en lymphocytes (≤ 5 %) : prolifération de petits lymphocytes qui peut être confondue avec le paragrulome de Poppema, mais avec des CRS typiques en immuno-histochimie (Anagnostopoulos *et al.*, 2000).

La forme à déplétion lymphocytaire (< 1 %) : composées d'une variante riche en CRS et d'une forme avec fibrose collagène diffuse et une déplétion de lymphocytes non tumoraux (Stein *et al.*, 2001). Actuellement les types 2 et 3 sont considérés comme des formes typiques les plus fréquentes des maladies de Hodgkin.

III-7-3-2 Classification d'ANN-ARBOR anatomo-clinique :

Cette classification est basée sur le stade évolutif de la maladie (figure.10.).

- ✓ Stade I : Atteinte d'une aire ganglionnaire sus ou sous diaphragmatique

- ✓ Stade II : Atteinte de plusieurs aires ganglionnaires contiguës d'un même coté du diaphragme
- ✓ Stade III : Atteinte de plusieurs aires ganglionnaires de part et d'autre du diaphragme
- ✓ Stade IV : Atteinte d'un ou de plusieurs organes extra-lymphatiques avec ou sans atteinte ganglionnaire.

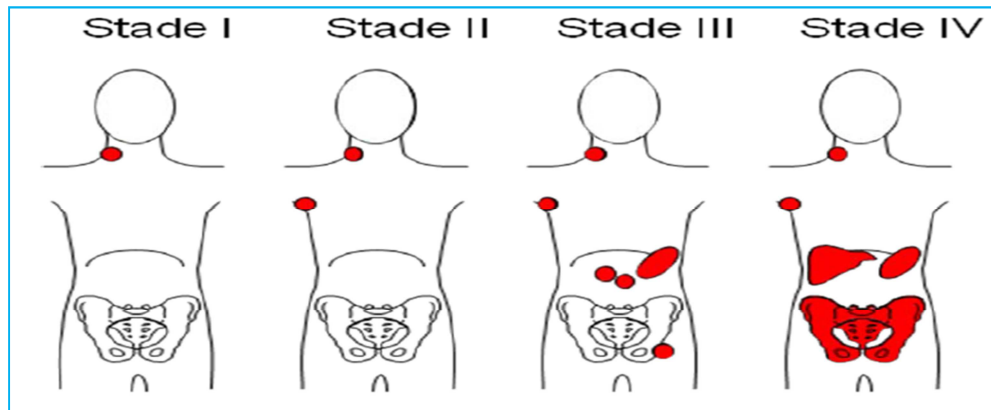


Figure 4 : Localisation anatomique des différents stades de la maladie de Hodgkin

II- 8- Le complexe majeur d'histocompatibilité

II-8-1 Définition

Le complexe majeur d'histocompatibilité comprend plusieurs systèmes génétiques dont le système HLA. La découverte de ce système par le professeur Jean Dausset en 1958, a permis de comprendre les mécanismes de rejet d'une greffe d'organes survenant de façon quasi inévitable entre deux individus non apparentés.

Le système HLA est formé d'une série de gènes étroitement liés et polymorphes qui codent pour des protéines membranaires (molécules HLA) qui fixent et présentent les peptides antigéniques. Ainsi le système HLA a un rôle capital, par le biais de nombreuses molécules, dans la réponse immunitaire physiologique (Eliaou; 2007).

II- 8-2 Organisation génétique du système HLA

Les gènes HLA classiques codent pour des molécules qui assurent la fonction de présentation de l'antigène (Ag) et l'histocompatibilité, ils sont localisés sur le bras court du chromosome 6 (bande 6 p21.3) (Eliaou; 2007). La région HLA s'étend sur une distance d'environ 4000kb, ce qui correspond à 1/1000 du génome humain, elle comporte trois régions :

La région de classe I : comprend 3 gènes fonctionnels dits « classiques » HLA-A, HLA-B, et HLA-C et d'autres gènes non classiques HLA-E, F, G, H et I, elle s'étend sur quelques 2000kb de la région télomérique.

Données Bibliographiques

La région de classe II : comprend 3 paires de gènes HLA de classe II dites « classiques » : HLA-DP, HLA-DQ et HLA-DR sur une longueur d'environ 1000 Kb de la région centromérique.

La région de classe III : contient des gènes qui codent les protéines du système du complément (C2, C4 et facteur B) et pour certaines cytokines (TNF), qui s'étend sur une longueur d'environ 1000kb (Figure.10.). Seuls les gènes de la classe I et de la classe II codent pour les antigènes d'histocompatibilité (Abbes et Lichtman ; 2007).

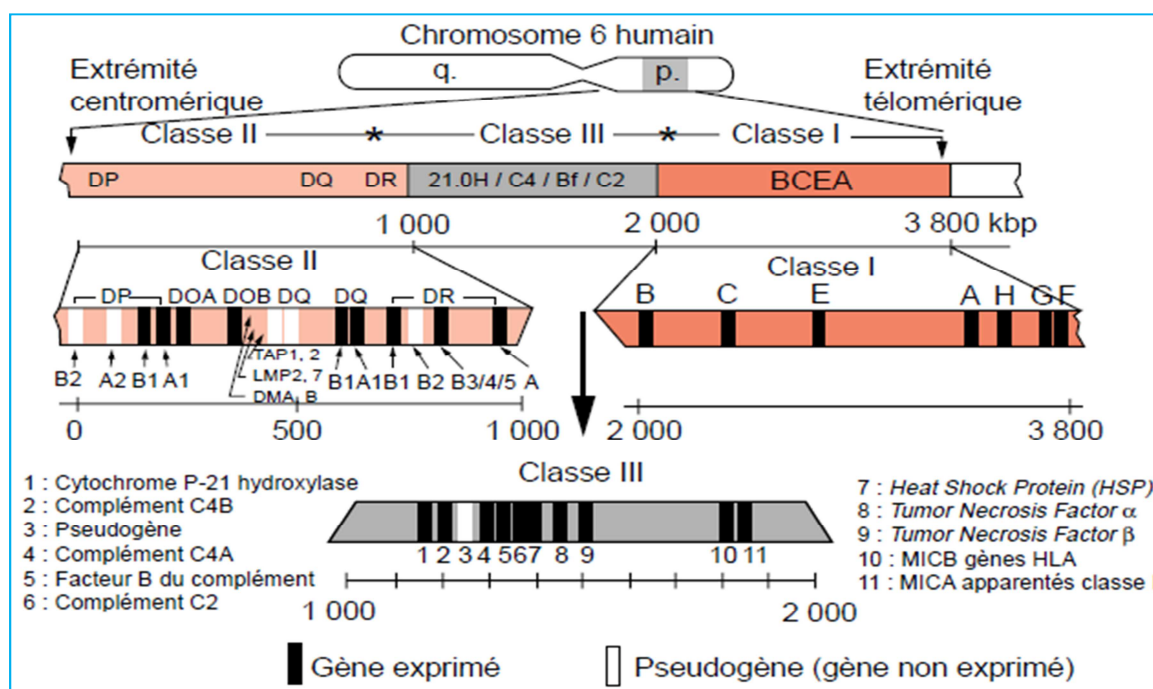


Figure 5 : Carte génétique du système HLA (Rhodes *et al.*, 1999).

II- 8-3 Molécules et gènes HLA classiques

II- 8-3-1 Molécules et gènes HLA de classe I

Les molécules de classe I classiques sont des glycoprotéines transmembranaires exprimées à la surface de la quasi-totalité des cellules nucléées. Néanmoins des variations quantitatives sont notables. Les cellules lymphoïdes, les lymphocytes T et B, les cellules dendritiques, les macrophages sont parmi les plus riches en molécules de classe I, ainsi que les épithéliums et les endothéliums vasculaires (Colombani., 1993).

Chacun des 3 gènes HLA de classe I classique (HLA-A, B et C) code pour une chaîne lourde alpha (de 44 à 47 KD), codée par le CMH et une sous unité de 12 KD non codée par le CMH, qui s'associe de manière non covalente avec une chaîne légère dite « β 2- microglobuline » pour constituer les molécules HLA-A, B ou C respectivement.

La chaîne lourde alpha est formée d'une région extracellulaire hydrophile N-terminale organisée en 3 domaines ($\alpha 1$, $\alpha 2$ et $\alpha 3$) stabilisés par des ponts disulfures, d'une région transmembranaire hydrophobe et d'un court segment hydrophile intra-cytoplasmique C terminal (Figure 6).

Les gènes de classe I classiques se composent de 8 exons séparés par 7 introns. Ils se présentent sous forme de nombreux variants alléliques qui se distinguent par leur séquence nucléotidique et protéique. On dénombre à l'heure actuelle 220 allèles au locus HLA-A, 450 allèles au locus HLA-B et une centaine d'allèles HLA-C (Caillat-Zucman; 2002).

Ce polymorphisme de séquence est concentré dans trois zones, dites « hypervariables », localisées au niveau des exons 2 et 3 qui codent pour les domaines externes $\alpha 1$ et $\alpha 2$ impliqués dans le site de fixation peptidique et dans la région de contact avec le TcR. En revanche le domaine $\alpha 3$ et la $\beta 2m$ sont très conservés (Bigon ; 2000).

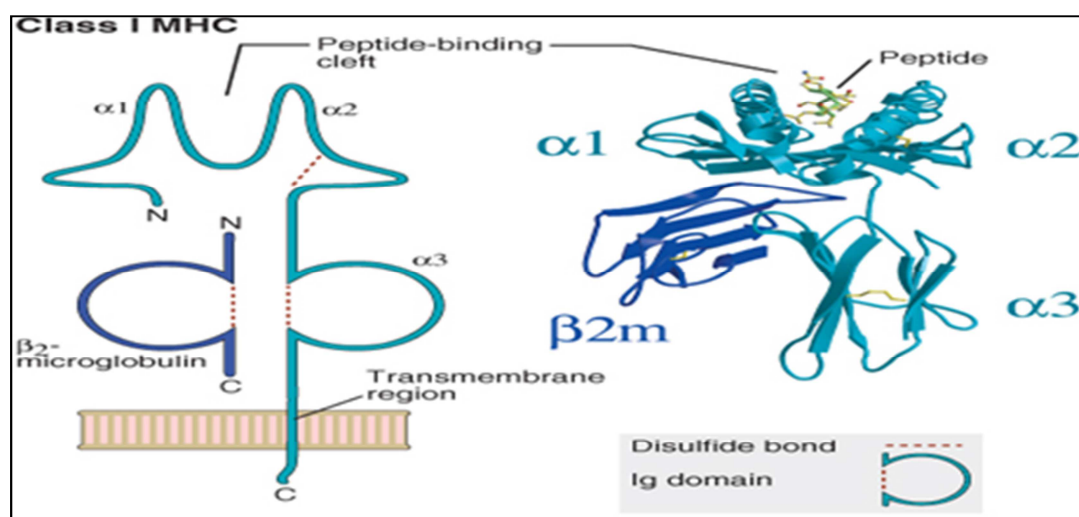


Figure 6: Structure de la molécule HLA classe I classique (Carpentier et al, 1992).

II- 8-3-2 Molécules et gènes HLA classe II classique

Ces molécules sont exprimées de manière plus restreinte que celle de la classe I. elles sont détectables principalement à la surface des lymphocytes B et des cellules monocytaires, macrophagiques et dendritiques qui sont toutes capables de présenter des peptides antigéniques aux lymphocytes T (CPA).

Les molécules HLA classe II classiques appartiennent au trois séries notées HLA-DR, -DQ et -DP. Ainsi, on distingue les molécules DR, DQ et DP constituées de deux chaînes : une chaîne lourde α de 23 à 34 KD et une chaîne légère β de 29 à 32 KD ; codées par les gènes correspondants notés DRA et DRB, DQA et DQB, DPA et DPB, et qui vont s'associer pour former des dimères de classe II (Brown et al., 1993).

Données Bibliographiques

La structure tridimensionnelle d'une molécule HLA classe II est similaire à celle d'une molécule de classe I (figure 7). Au niveau génomique, la réalité est un peu plus complexe car il existe, en raison de duplication génique, de nombreux gènes ne codant pas ou codant des chaînes β supplémentaires dans le cas de certains haplotypes, particulièrement dans la sous région DR. Ainsi, selon les individus, on distingue, au niveau de l'expression membranaire, plusieurs molécules de classe II possibles :

Molécules DR (DRB1, DRB3 ou DRB4 ou DRB5) : elles correspondent à l'expression des gènes DRA (codant une chaîne α quasiment invariable) qui s'associe avec DRB1 (gène très polymorphe), ou bien les gènes DRB3, DRB4 ou DRB5 (moins polymorphes).

Molécules DQ : elles correspondent à l'expression des gènes DQA1 et DQB1 des deux haplotypes.

Molécules DP : elles correspondent à l'expression des gènes DPA1 et DPB1 de deux haplotypes (Charron *et al.*, 1994).

Ces molécules hybrides ajoutent encore plus de diversité HLA et pourraient expliquer la susceptibilité accrue de certains sujets à certaines maladies comme les lymphomes malins (Khalil *et al.*, 1992).

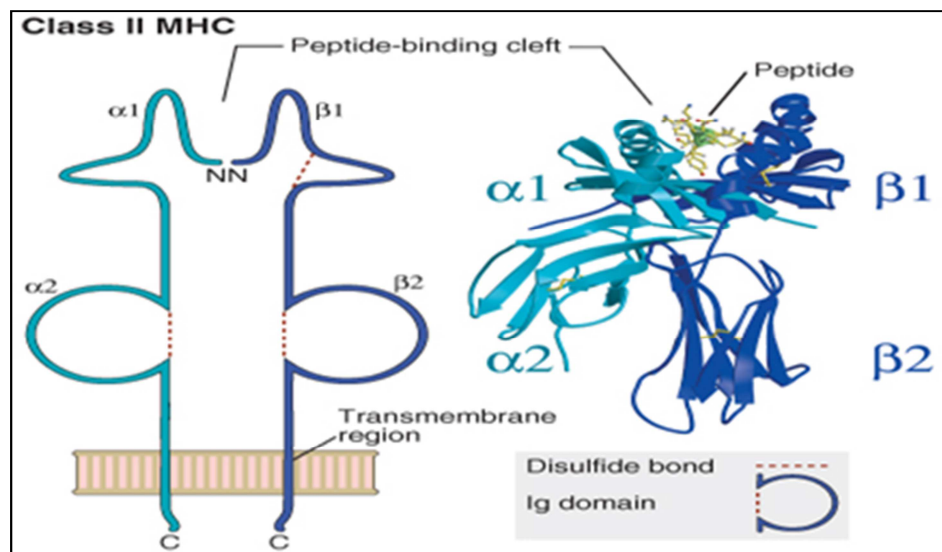


Figure 7: Structure de la molécule HLA classe II (Carpentier et Farge, 1992).

II-8-4 Fonctions des molécules HLA

Le système immunitaire a pour fonction de reconnaître et d'éliminer les structures qui lui sont étrangères. Deux types moléculaires particuliers, les anticorps des lymphocytes B et le récepteur des lymphocytes T (TcR) assurent la fonction de reconnaissance. Ainsi, les lymphocytes T CD4+, une fois activés, coopèrent avec les lymphocytes B responsables de la réponse humorale.

Les molécules HLA de classe I et II sont les initiateurs de la réponse T par leur capacité de présentation des peptides antigéniques aux lymphocytes T qui les reconnaîtront par le TcR spécifique (Davis *et al.*, 1988 ; Germain *et al.*, 1993).

II- 8-4-1 Molécules HLA présentatrices de peptides

Les molécules HLA classe I présente des peptides endogènes aux lymphocytes T-CD8⁺ : les protéines endogènes sont dégradé dans le protéasome puis sélectivement transportées via des transporteurs vers le réticulum endoplasmique de la cellule, ces peptides peuvent être pris en charge par les molécules HLA classe I pour les exprimer à la surface cellulaire. Les LT-CD8⁺ reconnaissent ce complexe via leur TcR ce qui conduit à la destruction de la cellule (Androlwicz *et al.*, 1994).

Les molécules HLA classe II présente des peptides exogènes aux lymphocytes T-CD4⁺ : les cellules présentatrices d'antigènes captent un antigène étranger qui sera dégradé en peptides dans les lysosomes, en suite, ces derniers seront pris en charge par les molécules HLA de classe II. Une fois ce complexe formé, il sera transféré à la surface de la CPA. Les peptides exogènes présentés sont reconnus par les LT-CD4⁺ (Cresswell *et al.*, 1996).

II- 8-4-2 Rôles des molécules HLA de classe I dans la lyse « NATURAL KILLER »

Les cellules NK se définissent par leur capacité à induire la lyse spontanée de cellules tumorales ou infectées par des virus. C'est de l'intervention de multiples récepteurs inhibiteurs ou activateurs de lyse que dépend leur action (Lanier *et al.*, 1997). Dans des conditions physiologiques normales, la fonction des récepteurs inhibiteurs prédomine, parmi ces récepteurs certains ont pour ligands des molécules HLA classe I non classique. Les KIR (*killer Ig-like receptors*) ont pour ligands des molécules HLA-C_w et HLA-B, les récepteurs de type lectine comme les CD94/NKG2 se lieraient aux molécules HLA-E (Braud *et al.*, 1999). Certains de ces récepteurs fonctionneraient comme des inhibiteurs et d'autres comme des activateurs comme la molécule CD94/NKG2D pourrait se lier aux molécules MICA et induire la lyse par les NK (Garrido *et al.*, 1997).

II- 8-5 Association HLA et maladies

L'existence d'un système immunogénétique très polymorphe et aux fonctions immunitaires primordiales dans l'initiation et le contrôle de la réponse immune a encouragé très tôt des travaux de recherche de susceptibilité à certaines affections, pour rechercher un antigène ou un haplotype en même temps que la maladie, et si sa présence soit le fait du hasard ou non.

Les maladies associées au système HLA comme les lymphomes malins sont le plus souvent le résultat d'interaction de plusieurs gènes avec l'intervention de facteurs environnementaux. Mais il semble bien que les gènes du système HLA jouent aussi un rôle majeur dans ces prédispositions génétiques (Tiwari *et al.*, 1985).

Matériels et méthodes

III-1- MATERIEL D'ETUDE

III-1-1 Patients étudiés

Il s'agit d'une étude portant sur 30 enfants atteints de lymphomes malins dont 15 présentant des Lymphomes Non Hodgkiniens (12 de sexe masculin-03 de sexe féminin) et 15 présentant la Maladie de Hodgkin (10 de sexe masculin-05 de sexe féminin), diagnostiqués au sein du Service de Pédiatrie B du CHU de Benni Messous, Alger. L'étude immunogénétique a été effectuée au niveau du Service d'Immunologie, unité d'Immunogénétique et d'Immunopathogénie de l'Institut Pasteur d'Algérie.

L'âge moyen des patients était de 11 ans, tandis que l'âge médian était entre 4 et 18 ans. L'âge moyen d'apparition de la maladie était de 7ans et l'âge médian allant de 1 à 12 ans. Les prélèvements ont été effectués sur une période de 5 mois (du 19 Mars au 19 Juillet 2014).

III-1-2 Critères de sélection des patients

Les patients, enfants, présentant un lymphome malin sont recrutés selon les critères suivants :

- ✓ Le diagnostic de la maladie est confirmé par cytologie et/ou histologie ;
- ✓ Tous les stades des maladies sont inclus ;
- ✓ Tous les types de NHL ainsi que de la Maladie de Hodgkin sont étudiés.

Tableau I : Caractéristiques générales des patients.

Caractéristiques		Nombre de patients	n (%)
Sexe	Masculin	22	73,33
	Féminin	8	26,67
Stades	I	9	30
	II	10	33,33
	III	11	36,67
	IV	00	00
Types histologiques	Thoracique	06	20
	Abdominal		
	Maxillaire		
	Sclérose nodulaire	10	33,33
	Riche en lymphocytes		
	Cellularité mixte		
	Déplétion lymphocytaire		
	02	6,67	
	03	10	
	00	00	

III-1-3 La population témoin

Elle est composée de 70 sujets sains non apparentés, ne présentant aucune maladie chronique ou auto-immune et sans antécédents personnels et familiaux.

III-1-4 Prélèvement sanguin:

Les prélèvements sanguins sont effectués sur les patients et sur la population témoin par ponction veineuse. Le sang est prélevé sur des tubes de 5-10 ml en présence d'anticoagulant type EDTA pour une extraction d'ADN.

III-2 ETUDE IMMUNOGENETIQUE (Annexe 1)

III-2-1 Extraction d'ADN par la technique « SALTING OUT »

Principe

La technique d'extraction de l'ADN utilisant les solutions salines consiste à réaliser une déprotéinisation à haute force ionique ou « salting out ». Des sels (par exemple du NaCl) sont ajoutés à haute concentration. Ceci entraîne la précipitation des protéines, alors que l'ADN lorsqu'il est soumis à une haute force ionique reste soluble (Miller et *al*, 1988).

Mode opératoire (Annexe 2)

- Dans des tubes Falcon, nous avons appliqué le protocole d'extraction d'ADN suivant :
Après prélèvement de 5 à 10 ml de sang dans un tube contenant l'anticoagulant EDTA, transférer dans un tube falcon de 50 ml.
- Ajouter la solution de lyse des globules rouges (SLR) (TE 10/10), en complétant le volume jusqu'à 50 ml et mélanger délicatement. Mettre Le tube à -20°C tout en agitant toutes les 5 minutes.
- Après Centrifugation à 4000 tours/min pendant 20 minutes, éliminer le surnageant et ajouter encore une fois du SLR afin d'assurer une bonne lyse des globules rouges.
- Réaliser une autre centrifugation à 4000 tours/min pendant 20 minutes, éliminer le surnageant et ajouter 9 ml de solution de lyse des globules blancs (SLB) (TE 10/5), 30µl de protéinase K (200µl/ml) et 600 µl de SDS 10%.
- Homogénéiser le contenu des tubes après une incubation d'une nuit à 37°C sous agitation, ajouter 5 ml de NaCl 6M, agiter (vortex) pour obtenir un aspect laiteux puis centrifuger à 8000 tours/min pendant 15 minutes.
- Récupérer le surnageant contenant la méduse d'ADN dans un tube falcon de 50 ml et ajouter le même volume d'éthanol absolu glacial tout en retournant (ou vortex) le tube pour faire apparaître la méduse.

Matériel et Méthodes

- A l'aide d'une pipette pasteur, récupérer la méduse puis transférer délicatement dans un tube Eppendorf contenant 1 ml d'éthanol 70%. Effectuer trois lavages à l'aide de l'éthanol 70% pour éliminer les sels de la méduse.
 - Sécher les tubes de l'éthanol à l'air libre puis dissoudre l'ADN dans 200 µl ou plus de TE
- 10/1

III-2-2 Dosage et contrôle de la qualité de l'ADN

III-2-2-1 Dosage de l'ADN

Principe

L'évaluation de la concentration et de la pureté de l'ADN est réalisée par Spectrophotométrie; en effet, les bases puriques et pyrimidiques absorbent fortement dans l'UV à 260 nm. Une unité de DO à 260 nm correspond à une concentration d'ADN double brin de 50µg/ml. L'éventuelle contamination protéique peut être appréciée par une seconde lecture de DO à 280 nm dans la mesure où les protéines absorbent à ces deux DO : un ADN pur doit présenter un rapport DO 260/280 compris entre 1,8 et 2,0.

III-2-2-2 Contrôle de la qualité d'ADN par électrophorèse

Principe

L'électrophorèse sur gel d'agarose (pH = 8,3), est une méthode simple et efficace pour la séparation, l'identification et la purification des fragments d'ADN. Elle consiste à faire migrer dans un gel soumis à un champ électrique des molécules chargées négativement. Leur distance de migration dépend principalement de leur poids moléculaire, de la concentration d'agarose et de l'intensité du courant appliqué.

Mode opératoire

- Préparer la cuve d'électrophorèse (12/8 cm) et mettre les peignes (pour préparer les puits).
- Préparer un gel d'agarose à 0,8 %. Mettre le mélange au four micro-onde pendant 1 minute et 30 secondes puis ajouter une goutte de Bromure d'éthidium (BET) (0,5 µg/ml).
- Couler le gel, mettre le support et les peignes, puis laisser polymériser pendant 15 minutes.

Les échantillons sont préparés (5 µl d'ADN génomique et 5 µl de bleu de dépôt (0,05 % bleu de bromophénol, 60% glycérol).

- Déposer 10 µl du mélange préparé des différents échantillons dans les différents puits du gel et faire migrer le gel dans le tampon TBE pendant 30 minutes à 100 V.
- Révéler l'ADN par exposition du gel aux rayons UV.

III-2-3 Typage HLA classe I et classe II par la technique PCR-SSP

Principe

La technique du typage HLA par PCR-SSP est basée sur la spécificité de l'extension des amorces au cours de la PCR plutôt que sur l'hybridation d'oligonucléotides. Dans des conditions très précises de PCR, le couple d'amorces spécifiques permet l'amplification des séquences cibles (résultat positif), tandis que les couples d'amorces non complémentaires ne donnent pas d'amplification (résultat négatif). Cette spécificité repose sur le fait que le dernier nucléotide en 3' de l'amorce doit obligatoirement s'hybrider sur le brin d'ADN complémentaire pour que l'amplification soit positive (figure 8).

Le typage est déterminé, par conséquent, par la présence ou l'absence du produit de PCR visualisé sur gel d'agarose avec du BET sous UV. Pour vérifier l'intégrité de la réaction PCR, un couple d'amorces de contrôle interne est intégré dans chaque réaction (Olerup et Zetterquist, 1992).

Il existe deux niveaux de typage : typage HLA de niveau générique (faible résolution) et typage HLA de niveau allélique (haute résolution).

Le typage de niveau générique ou de faible résolution donne l'équivalent du résultat obtenu par sérologie. Les amorces utilisées reconnaissent des séquences d'ADN qui codent pour des épitopes sérologiques et qui sont spécifiques d'un antigène donné, et ceci en utilisant des paires de primer spécifiques (Annexe 5).

Alors que le typage de niveau allélique ou de haute résolution, donne l'allèle exact présent sur le chromosome de la personne à typer. Les amorces utilisées reconnaissent des séquences d'ADN spécifiques d'un allèle donné.

Sur le plan de la nomenclature, un allèle au niveau génomique est défini comme suit :

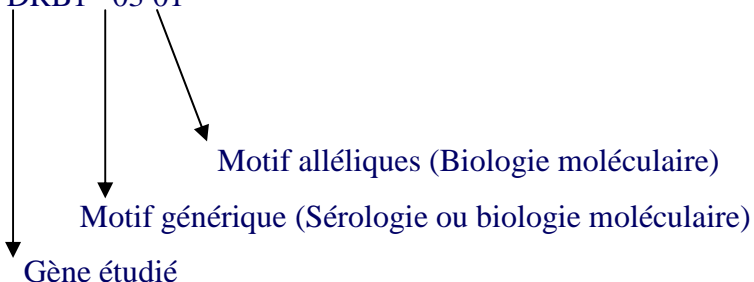
Gène étudié suivi d'un * puis de 4 à 5 chiffres indiquant la spécificité HLA

Ou

Motif générique suivi du motif allélique

Exemple :

HLA-DRB1*0301



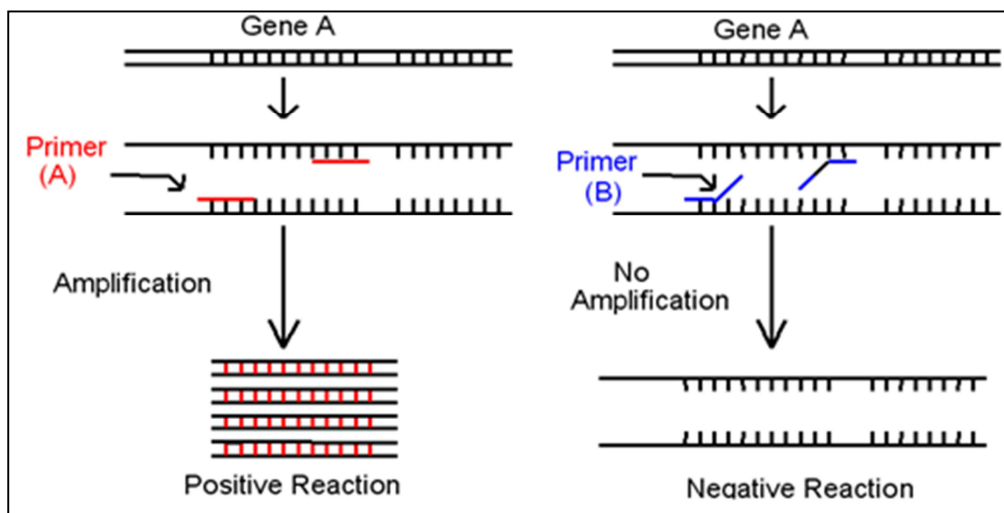


Figure 8 : Principe du typage générique et allèlique HLA par PCR-SSP

(Olerup et Zetterquist, 1992).

Mode opératoire (Annexe 3 et 4)

- Pour réaliser le typage HLA classe I, la plaque PCR n'est utilisée que pour typer un seul patient, elle contient 96 puits, chaque puits contient des amorces spécifiques des allèles de HLA classe I (kit ONE LAMBDA).
- La plaque PCR spécifique pour HLA classe II est utilisée pour typer trois patients, elle contient 96 puits, donc 32 puits pour chaque patient.
- Agiter les ADN par vortex puis retirer les plaques PCR,
- Mélanger dans le tube 1 ml de D-mix et 5,6 μ l de taq polymérase. Déposer 1 μ l d'eau distillée dans le puits contrôle négatif de la plaque et ajouter 9 μ l du mélange au puits.
- Ajouter 111 μ l l'ADN (80-100 ng/ μ l) dans le mélange D-mix et agiter sur vortex.
- Distribuer 10 μ l du mélange dans chaque puits à l'exception du puits de contrôle négatif.
- Couvrir la plaque PCR avec la feuille adhésive, celle-ci doit être parfaitement recouverte pour éviter l'évaporation. Placer la plaque dans le thermocycleur.

Une amorce spécifique du gène d'hémoglobine humaine ou des gènes des facteurs de croissances est présente dans le puits du contrôle interne pour le typage HLA-A, HLA-B HLA- DR et HLA-DQ.

L'amplification est réalisée dans le thermocycleur. Le programme OL-9600 est sélectionné pour cette amplification. Le programme de la PCR est le suivant :

Matériel et Méthodes

Tableau II : Programme de la PCR One Lambda.

Nombres de cycles	Etape	Température (C°)	Durée (sec.)
1	1 ^{ère} Dénaturation	96	130
	Hybridation	63	60
9	Dénaturation	96	10
	Hybridation	63	60
20	Dénaturation	96	10
	Hybridation	59	50
	Elongation	72	30
Fin		4	---

III-2-4 Révélation des amplicons par migration sur gel

Le contrôle de l'amplification est déterminé par une électrophorèse sur gel d'agarose. Le protocole de la préparation du gel est le même utilisé pour contrôler la qualité de l'ADN, la différence réside dans la concentration de l'agarose qui est à 2%. Ce gel est préparé dans un tampon TBE 0,5 M (Tris Acide Borique et EDTA 0,5 M) en présence du BET (10mg/ml).

La distance de migration est liée à la taille des fragments amplifiés qui sont visualisés par le BET sous lumière UV.

III-2-5 Interprétation des résultats

Il s'agit de repérer les réactions positives qui présentent des bandes de taille attendue. L'amplification positive montre la présence de 2 bandes. Une bande contrôle correspondant à l'allèle du gène de contrôle interne et une bande de l'allèle HLA classe I ou classe II amplifié.

- ✓ L'amplification négative montre la présence uniquement d'une seule bande du contrôle interne.
- ✓ Les réactions positives sont comparées avec le tableau d'interprétation (Tableau III).

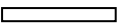
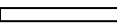
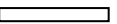




Un résultat positif dans une réaction indique la présence d'au moins un des allèles répertoriés.

Tout allèle donné peut être amplifié dans plusieurs tubes.

Si l'allèle est présent, une réaction positive devrait avoir lieu dans toutes les réactions qui lui sont spécifiques.

Matériel et Méthodes

Tableau III : Interprétation des résultats de l'électrophorèse.

	Réaction positive	Réaction Négative	Indéterminé
Puits			
Contrôle Interne			
Contrôle Spécifique			

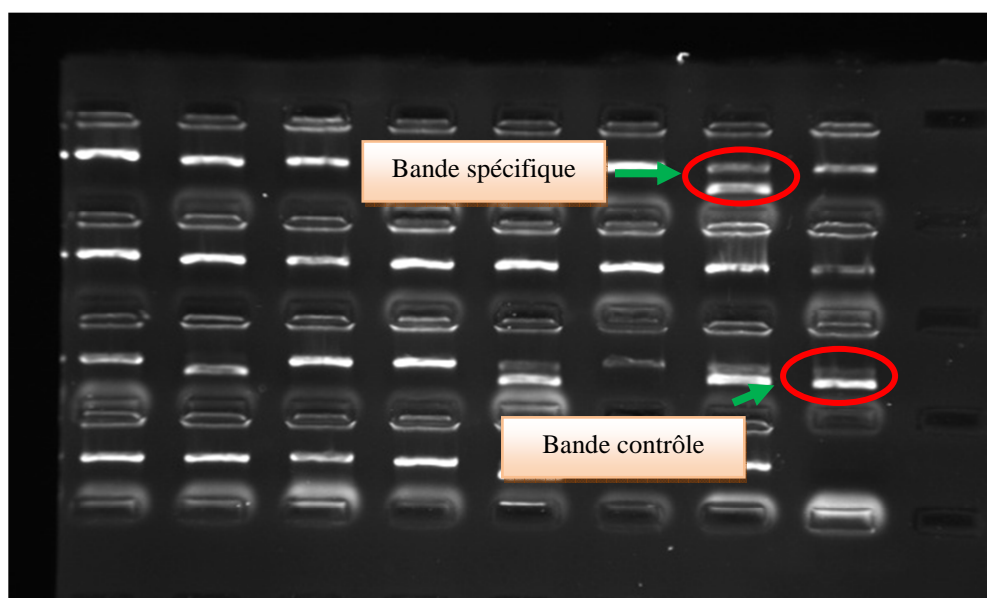


Figure 9 : Profil électrophorétique du typage HLA classe II

III-2-6 Analyse des résultats

L'analyse des résultats est déterminée par l'utilisation d'un logiciel ONE LAMBDA et DYNAL (FUSION).

III-3 Outils et tests statistiques

III-3-1 Calcul de la fréquence phénotypique :

Le calcul de la fréquence phénotypique des allèles est déterminé par rapport aux allèles exprimés par l'ensemble des individus composant l'échantillon. Cela revient à donner en pourcentage le nombre de fois où l'allèle est apparu dans l'échantillon selon la formule suivante :

$$F = \text{Nombre d'allèle (n)} / \text{L'effectif (N)}$$

III-3-2 Calcul de la fréquence allélique

La transmission des allèles HLA suit le mode autosomique codominant. La fréquence allélique est déterminée par comptage des sujets portant un phénotype donné en tenant compte des homozygotes qui sont comptabilisés deux fois. On utilise par exemple les indices W et S pour les allèles correspondant, et WW, WS, SS pour les génotypes, on a :

$$\text{Fréquence de l'allèle W} \quad F_w = n_w / 2N = 2n_{ww} + n_{ws} / 2N$$

$$\text{Fréquence de l'allèle S} : \quad F_s = n_s / 2N = 2n_{ss} + n_{ws} / 2N$$

III-3-3 Calcul de la fréquence génotypique

C'est la comptabilisation des individus portant le génotype en question divisé par l'effectif :

$$\text{Fréquence du génotype SW est} : \quad F_{ws} = n_{ws} / N$$

$$\text{Fréquence du génotype SS est} : \quad F_{ss} = n_{ss} / N$$

III-3-4 L'Odds Ratio (OR)

L'Odds Ratio (OR) est utilisé dans les enquêtes de type cas/témoins marquées par l'impossibilité de mesurer les risques de la maladie chez les sujets exposés et les non-exposés. Dans ces situations, l'Odds Ratio va permettre d'estimer le risque relatif en utilisant le logiciel Compare 2 software, version 1.02 (Chicago, IL).

L'Odds Ratio (OR) est toujours supérieur au Risque Relatif (RR), sauf si la maladie étudiée est rare et le Risque Relatif n'est pas très élevé. Par conséquent, l'OR et le RR sont très voisins. L'OR est une meilleure approximation du Risque Relatif lorsque le Risque, dans l'un des groupes, est faible (< 10%).

III-3-5 Le test du chi-carré

Le chi² (également noté Khi² ou X²) est un test d'inférence statistique permettant d'évaluer s'il existe une relation statistiquement significative entre deux variables, ou si à l'inverse, celles-ci sont indépendantes.

On le met en œuvre pour savoir si une relation découverte au sein de l'échantillon étudié est valable à l'échelle de la population totale dont est tiré cet échantillon. Autrement dit, le chi² nous aide à déterminer si une relation observée dans un échantillon est généralisable à l'ensemble de la population.

Dans notre étude, ce test a été utilisé pour calculer les différences de fréquence pour chaque facteur de risque.

$$X^2 = N \frac{(O_i - C_i)^2}{C_i}$$

Avec :

C_i

N : Effectif global

i : La classe i

O_i : Effectif observé

C_i : Effectif calculé

Résultats et Discussion

Résultats et Discussion

Notre travail a porté sur un effectif de 30 patients atteints de lymphomes, reçu au Service de Pédiatrie B du CHU de Benni Messous, dont les échantillons de sang ont été analysés au sein du Service d'Immunologie, unité d'Immunogénétique et Immunopathogénie, Institut Pasteur d'Algérie, entre le 19 Mars et 19 juillet 2014, dont l'âge varie entre 4 et 18 ans. 70 témoins ont également été inclus dans notre étude.

IV-1-1 Répartition des patients selon le sexe

Cette répartition montre une nette prédominance masculine 73% (22/30cas), versus 27% (8/30 cas) (Figure 10). Nos résultats sont en corrélation avec les données de la littérature. En effet les mêmes constatations ont été trouvées dans l'étude d'Erin *et al* (2013) qui ont rapporté dans leurs études chez 478 sujets atteints de lymphomes 64% étaient de sexe masculin et 49% étaient de sexe féminin.

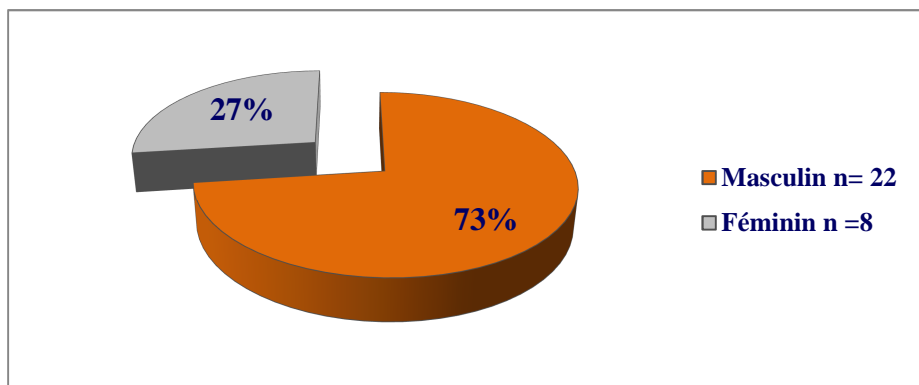


Figure 10 : Répartition des patients selon le sexe.

IV-1-2 Répartition des patients selon les types histologiques de la maladie

Les types histologiques les plus fréquents chez les patients NHL sont :

- ✓ Thoraciques (40%), Abdominal (47%) et Maxillaire (13%) (Figure 11).

Cependant les types histologiques les plus fréquents chez les patients HL sont :

- ✓ Sclérose nodulaire (67%), Riche en lymphocytes (13%) et Cellularité mixte (20%) (Figure 11).

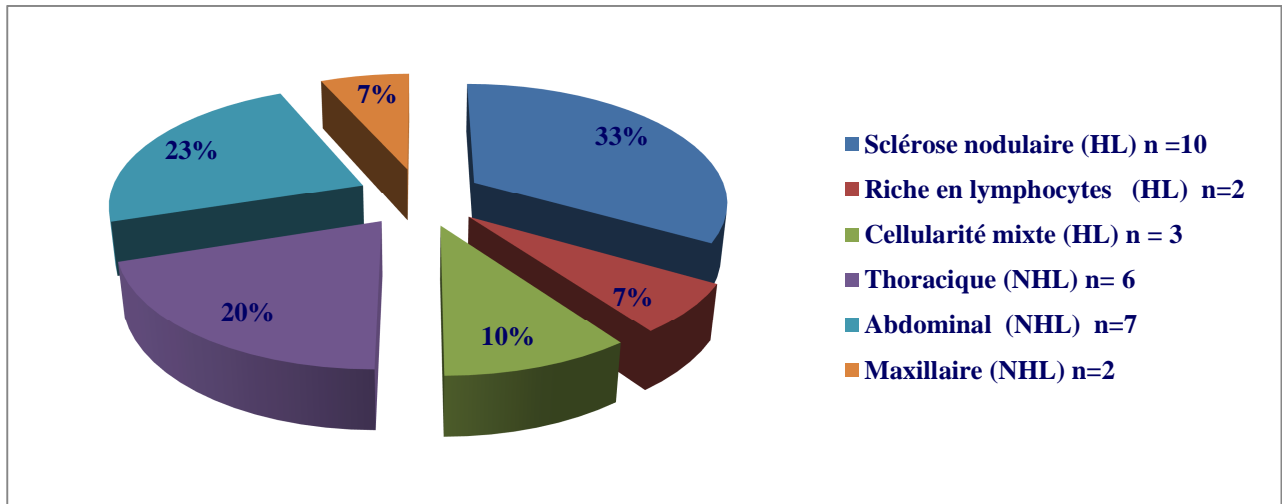


Figure 11 : Répartition des patients (HL et NHL) selon les types histologiques.

IV-2- Résultats alléliques des polymorphismes HLA

IV-2-1 Fréquence des différents allèles HLA classe I chez les malades et les témoins

L'analyse de la distribution des allèles HLA-A et-B réalisée par PCR-SSP chez les malades présentant un lymphome malin révèle que les fréquences alléliques étaient similaires à celles du groupe de contrôle avec des valeurs $\geq 5\%$.

Toutefois, seule la fréquence de l'allèle HLA-B*18 était significativement plus élevée chez les patients atteints de lymphome avec comme valeurs : (11,67% vs 2,86%, $OR= 4,49$, $p = 0,03$, $IC (95\%) = 1,08-21,611$) (Figure 12).

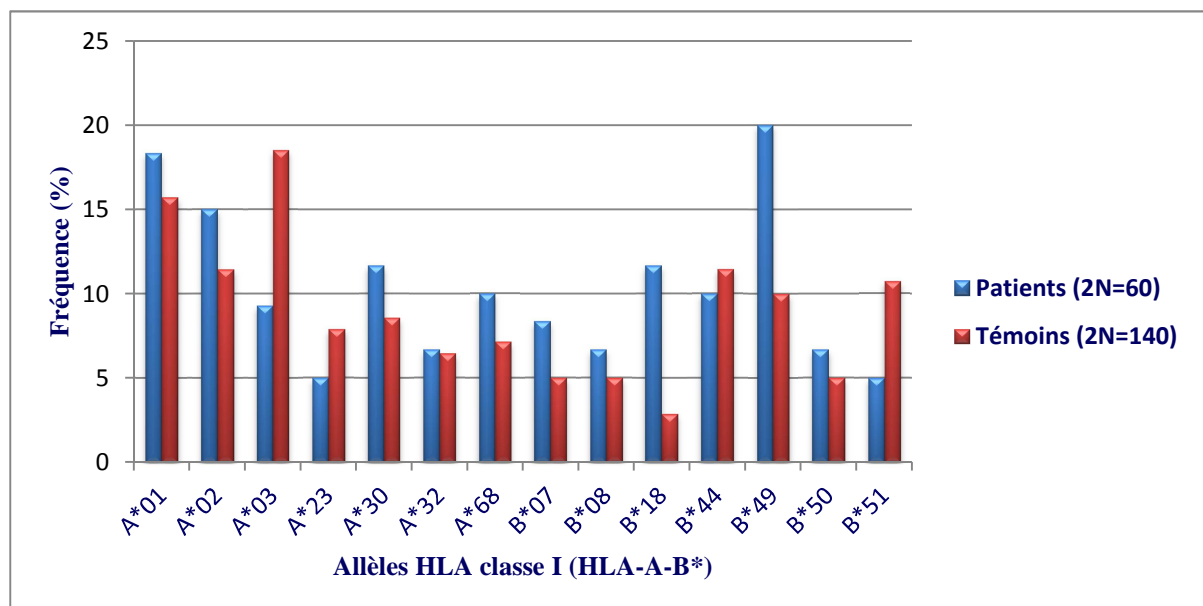


Figure 12 : Fréquences des allèles HLA classe I (HLA-A-B*) chez les malades et témoins.

Résultats et Discussion

IV-2-2 Comparaison des fréquences des allèles HLA classe I chez les témoins et malades

La comparaison des fréquences du marqueur HLA-B18* chez les enfants atteints de lymphomes par rapport à celles des témoins montre une différence significative avec comme valeurs respectives : (11,67% vs. 2,86%, $OR= 4,49$, $p= 0,03$, $IC (95\%) = 1,08-21,611$) (Tableau IV) (Figure 13 et 14).

Tableau IV : Comparaison des allèles HLA-A et -B chez les patients et les témoins.

Allèles	Patients (2N=60)				Témoins (2N=140)
	<i>n</i> (%)	<i>p_c</i>	<i>OR</i>	<i>I.C (95%)</i>	<i>n</i> (%)
A*01	11(18,33)	0,803	1,2	0,488-2,826	22(15,71)
A*02	9(15)	0,641	1,37	0,498-3,537	16(11,43)
A*03	13(9,29)	0,546	1,5	0,507-4,178	17(8,5)
A*23	3(5)	0,672	0,62	0,107-2,464	11(7,86)
A*30	7(11,67)	0,647	1,41	0,443-4,130	12(8,57)
A*32	4(6,67)	1	1,04	0,224-3,918	9(6,43)
A*68	6(10)	0,691	1,44	0,409-4,638	10(7,14)
B*07	5(8,33)	0,559	1,73	0,412-6,617	7(5,00)
B*08	4(6,67)	0,892	1,36	0,280-5,582	7(5)
B*18	7(11,67)	0,03	4,49	1,08-21,611	4(2,86)
B*44	6(10)	0,961	0,86	0,262-2,479	16(11,43)
B*49	12(20)	0,09	2,25	0,878-5,646	14(10)
B*50	4(6,67)	0,892	1,36	0,280-5,582	7(5)
B*51	3(5)	0,306	0,44	0,079-1,644	15(10,71)

Résultats et Discussion

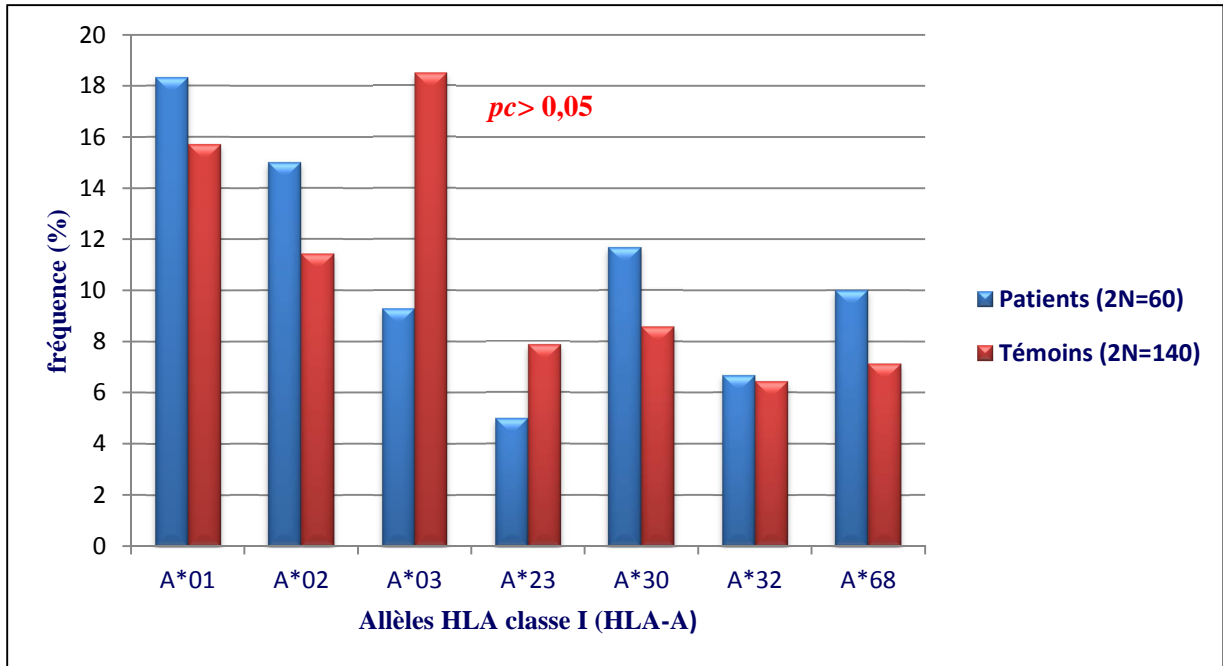


Figure 13 : Fréquences des allèles HLA classe I (HLA-A*) chez les malades et témoins.

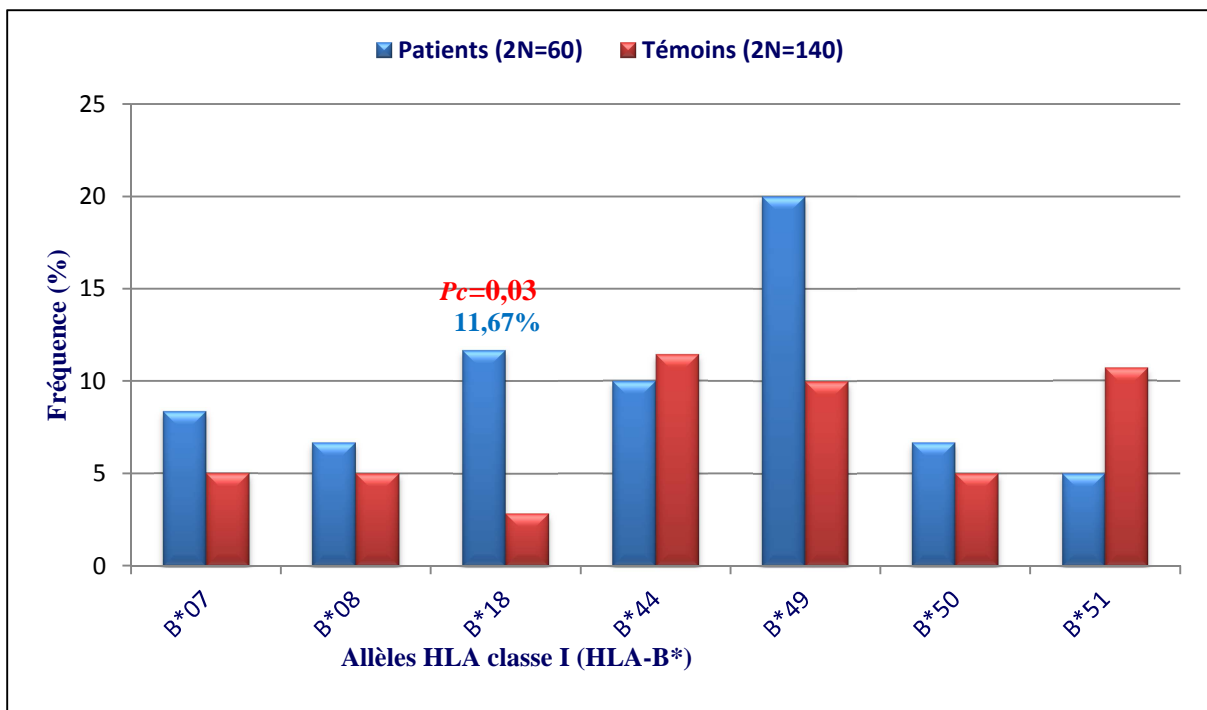


Figure 14 : Fréquences des allèles HLA classe I (HLA-B*) chez les malades et témoins.

Résultats et Discussion

L'odds ratio (rapport des cotes) permet de mettre en évidence et de mesurer la force d'association des allèles HLA aux lymphomes malins. Nos résultats montrent qu'il existe une différence significative du marqueur HLA-B*18 chez les malades par rapport aux témoins avec comme valeurs : $OR=4,49$ et $Pc=0,03$ (Figure 15). Cependant, il n'existe aucune différence significative pour le reste des marqueurs HLA classe I, analysés au cours de notre étude, entre témoins et malades.

Ceci nous a permis de dire que le marqueur HLA-B*18 était probablement un marqueur de susceptibilité aux lymphomes malins.

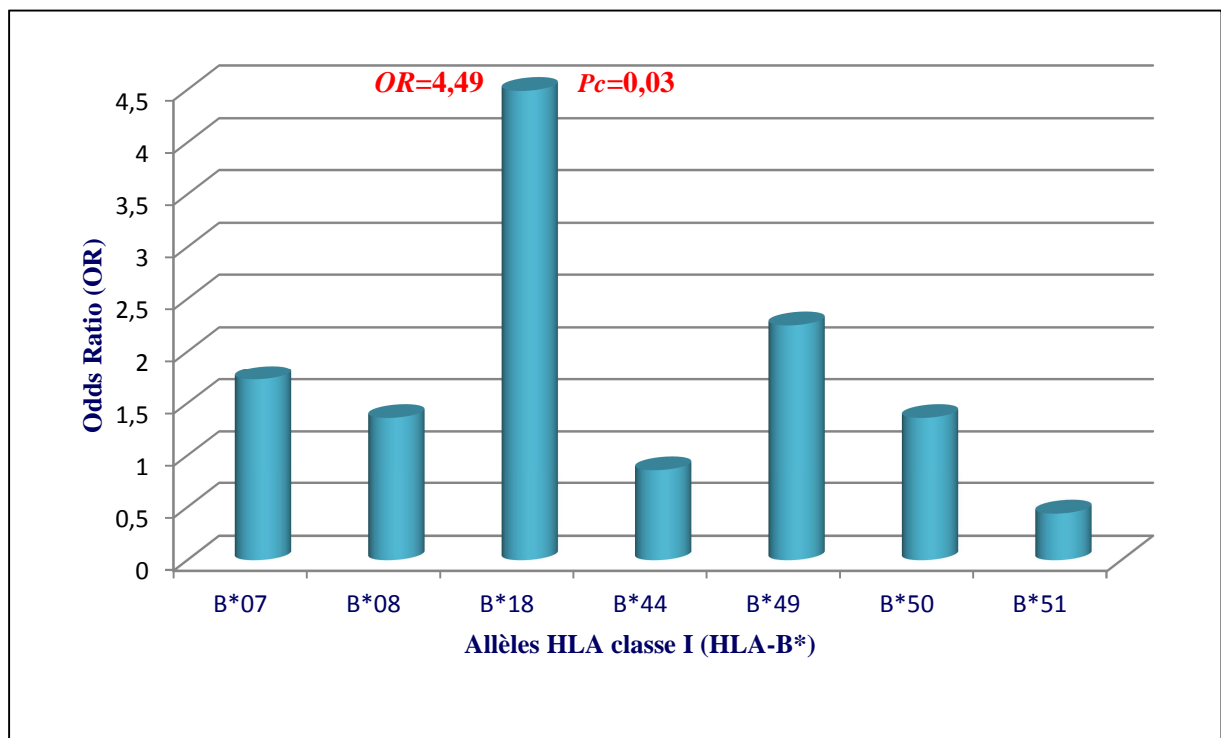


Figure 15 : Valeur des OR des allèles HLA classe I (HLA-B*) chez les malades.

Résultats et Discussion

IV-3 Fréquence des différents allèles HLA classe II chez les témoins et malades

L'analyse de la distribution des allèles HLA classe II chez les témoins révèle que les fréquences les plus élevées sont celles des marqueurs : DRB1*13 et DQB1*03 avec les fréquences respectives : 21,43%, 47,86%.

La distribution des allèles HLA classe II chez les malades révèle que les fréquences les plus élevées sont celles des marqueurs : DRB1*03, DRB1*07 et DQB1 *02 avec les fréquences respectives : 26,67%, 20%, 31,67% (Figure 16).

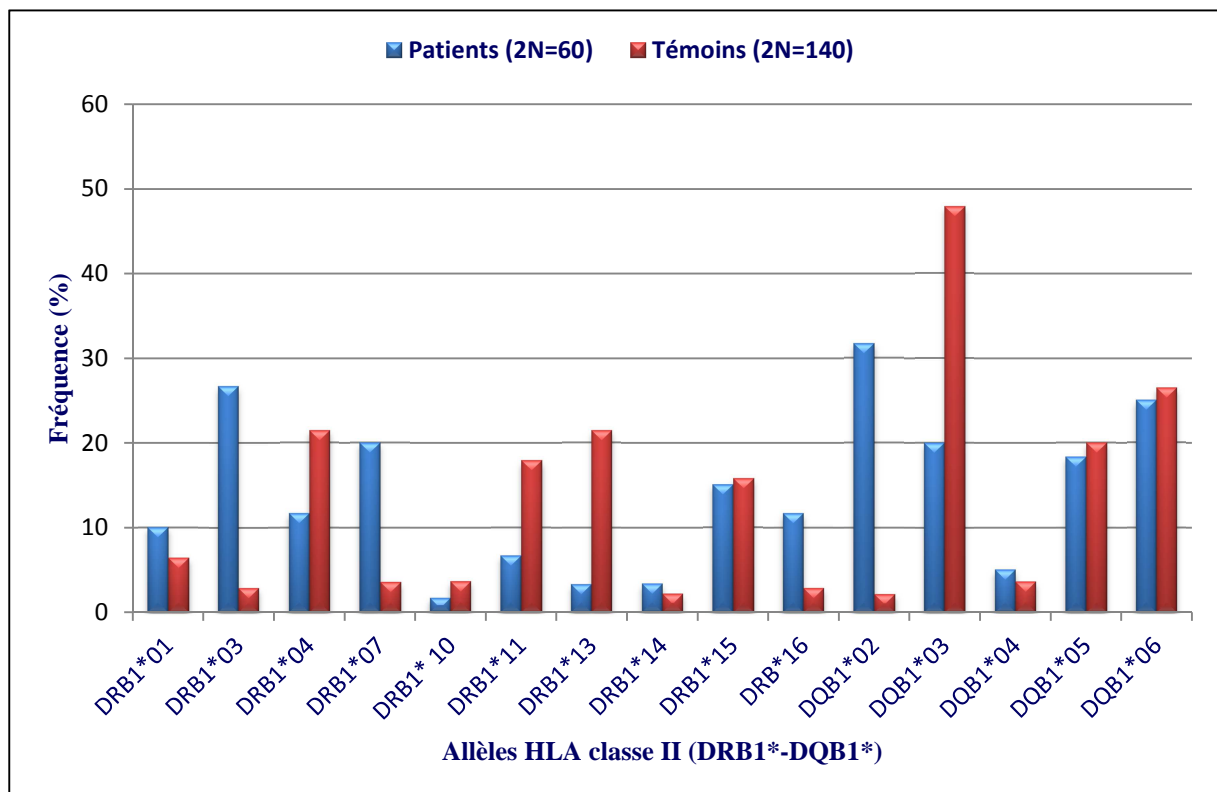


Figure 16 : Fréquences des allèles HLA classe II (DRB1* et DQB1*) chez les malades et témoins.

IV-3-1 Comparaison des fréquences des allèles HLA classe II entre témoins et malades

La comparaison des fréquences des allèles DRB1*03, DRB1*07 et DQB1 *02 indique quelles sont significativement plus élevées chez les patients par rapport aux témoins avec respectivement : DRB1*03 (26,67% vs. 2,86%, $OR= 12,36$, $p = 1,0 \cdot 10^{-6}$, IC (95%) = 3,674-52,708); DRB1*07 (20% vs. 5%, $OR=6,75$, $p =4,0 \cdot 10^{-4}$, IC (95%) =2,058-25,479,), DQB1*02 (31,67% vs. 2,14%, $OR= 21,16$, $p =4,4 \cdot 10^{-9}$, IC (95%) =5,712-115,018).

Résultats et Discussion

Cependant la fréquence des allèles DRB1*13 et DQB1*03 est significativement plus élevée chez les témoins par rapport aux patients DRB1*13

(3,33% vs. 21,43%, $OR=0,13$, $p =2,8 \cdot 10^{-3}$, IC (95%) =0,014-0,532), DQB1*03 (20% vs. 47,86%, $OR=0,27$, $p =4,1 \cdot 10^{-4}$, IC (95%)= 0,122-0,579) (Tableau V) (Figure 17 et 18).

Tableau V : Comparaison des allèles HLA-DRB1*, DQB1* chez les malades et témoins.

Allèles	Patients (2N=60)				Témoins (2N=140)
	<i>n</i> (%)	<i>p_c</i>	<i>OR</i>	<i>I.C</i> (95%)	<i>n</i> (%)
DRB1*01	6(10)	0,558	1,62	0,449-5,365	09(6,43)
DRB1*03	16(26,67)	1,0 10^{-6}	12,36	3,674-52,708	04(2,86)
DRB1*04	7(11,67)	0,153	0,48	0,196-1,225	30(21,43)
DRB1*07	12(20)	4,0 10^{-4}	6,75	2,058-25,479	05(3,57)
DRB1* 10	1(1,67)	0,786	0,46	0,010-4,232	05(3,57)
DRB1*11	4(6,67)	0,06	0,33	0,080-1,022	25(17,86)
DRB1*13	02(3,33)	2,8 10^{-3}	0,13	0,014-0,532	30(21,43)
DRB1*14	2(3,33)	1	1,57	0,128-14,090	3(2,14)
DRB1*15	9(15)	1	0,95	0,358-2,323	22(15,71)
DRB*16	1(1,67)	1	0,58	0,012-6,001	4(2,86)
DQB1*02	19(31,67)	4,4 10^{-9}	21,16	5,712-115,018	3(2,14)
DQB1*03	12(20)	4,1 10^{-4}	0,27	0,122-0,579	67(47,86)
DQB1*04	3(05)	0,937	1,42	0,213-7,572	5(3,57)
DQB1*05	11(18,33)	0,938	0,9	0,373-2,045	28(20)
DQB1*06	15(25)	0,972	0,93	0,428-1,942	37(26,43)

Résultats et Discussion

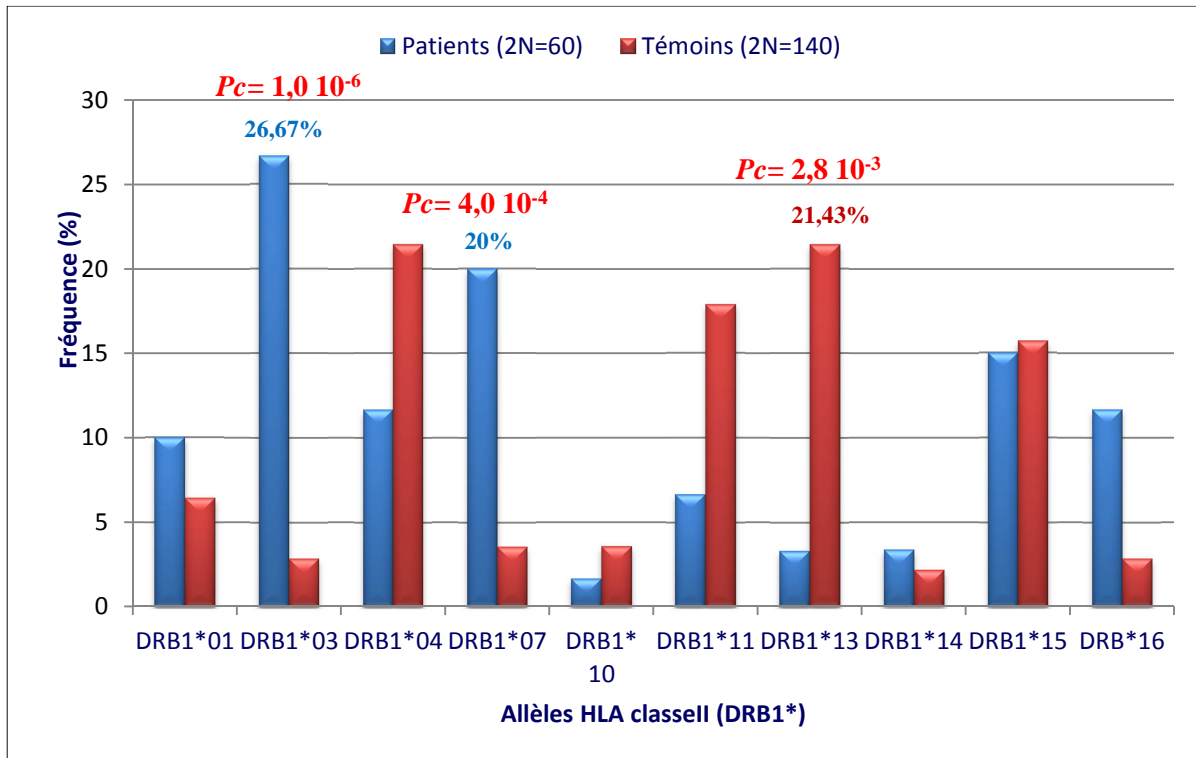


Figure 17 : Fréquences des allèles HLA classe II (DRB1*) chez les malades et témoins.

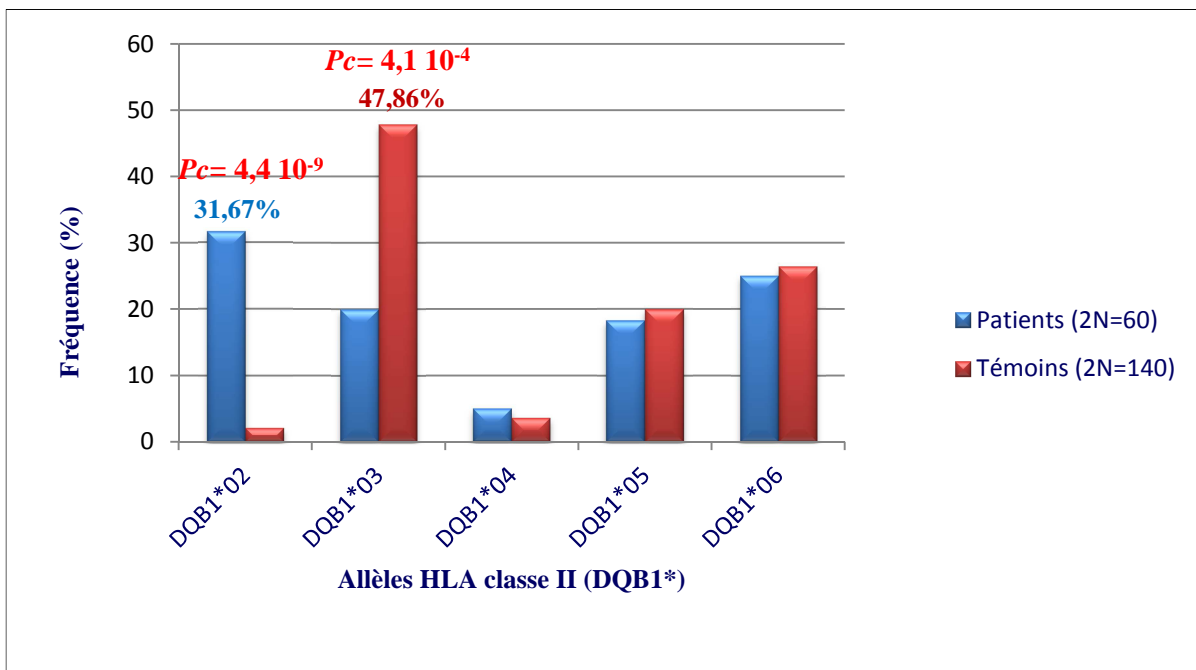


Figure 18 : Fréquences des allèles HLA classe II (DQB1*) chez les malades et témoins.

Résultats et Discussion

Pour l'odds ratio, nos résultats montrent qu'il existe une différence significative des marqueurs DRB1*03, DRB1*07, DQB1*02 chez les malades par rapport aux témoins (Figures 19 et 20) avec les valeurs respectives :

- ✓ DRB1*03: ($OR=12,36$, $P_c=1,0 \cdot 10^{-6}$)
- ✓ DRB1*07: ($OR=6,75$, $P_c=4,0 \cdot 10^{-4}$)
- ✓ DQB1*02 : ($OR=21,16$, $P_c=4,4 \cdot 10^{-9}$).

D'après ces valeurs, nous avons constaté que les marqueurs DRB1*03, DRB1*07, DQB1*02 sont probablement des marqueurs qui augmenteraient le risque aux lymphomes malins, alors que les marqueurs DRB1*13 et DQB1*03 confèreraient une protection.

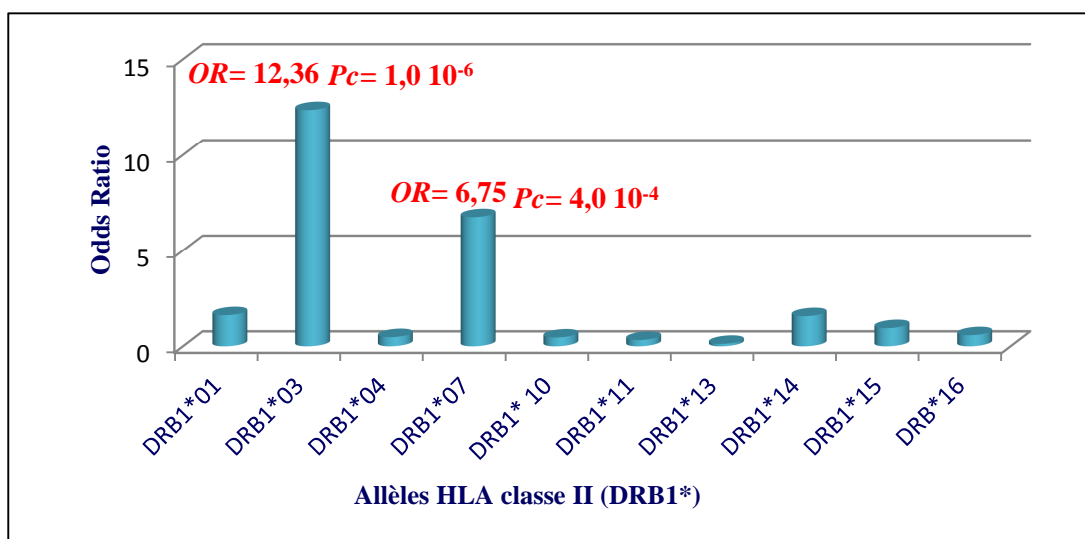


Figure 19 : Valeur des OR des allèles HLA classe II (DRB1*) chez les malades.

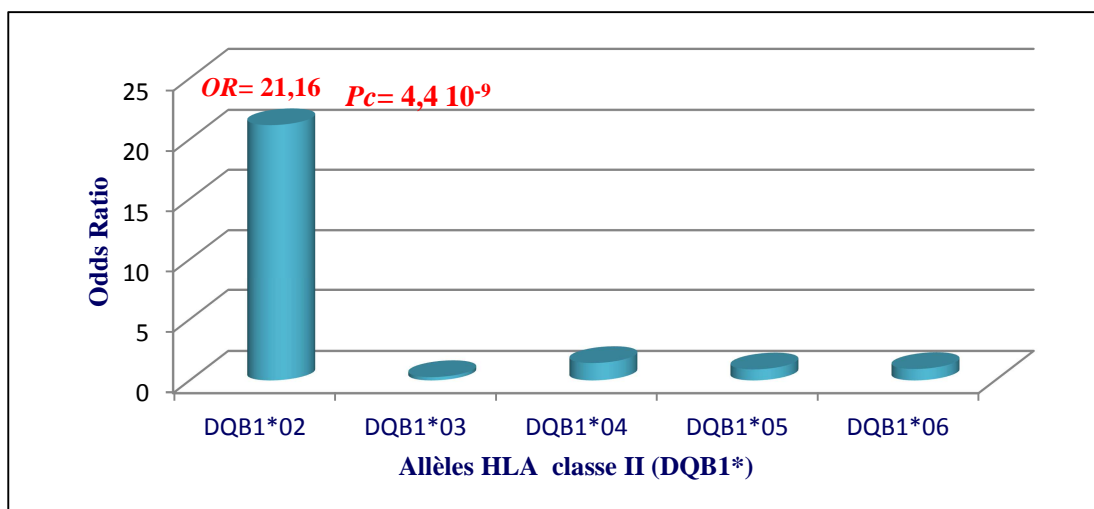


Figure 20 : Valeur des OR des allèles HLA classe II (DQB1*) chez les malades.

Résultats et Discussion

IV-4 Comparaison des fréquences des allèles HLA entre patients HL et NHL

IV-4-1 Fréquence des allèles HLA classe I chez les patients HL et NHL

La comparaison des fréquences des allèles HLA-A et B* montre que l'allèle HLA-B*18 est significativement plus élevée chez les patients avec un HL par rapport aux patients avec NHL (20% vs. 3,33%, $p = 0,04$, $OR = 7,25$, $IC = 0,773-344,713$) (Tableau VI) (Figure 21 et 22).

Toutefois, la comparaison du reste des marqueurs HLA-A et B* ne montre aucune différence significative entre les deux groupes de patients.

Tableau VI : Comparaison des fréquences des allèles HLA classe I chez les patients HL et NHL

Allèles	HL (2N=30)	NHL (2N=30)			
HLA-A-B*	<i>n</i> %	<i>n</i> %	<i>Pc</i>	<i>OR</i>	<i>I.C</i> %
A*01	06(20)	05(16,67)	0,739	1,25	0,275-5,904
A*02	05(16,67)	04(13,33)	0,718	1,3	0,247-7,319
A*03	04(13,33)	03(10)	0,688	1,38	0,210-10,328
A*68	04(13,33)	02(6,67)	0,389	2,15	0,278-25,380
B*07	03(10)	02(6,67)	0,559	1,73	0,412-6,617
B*18	06(20)	01(3,33)	0,04	7,25	0,773-344,713
B*44	03(10)	03(10)	1	1	0,123-8,150
B*49	07(23,33)	05(16,67)	0,519	1,52	0,355-6,952

Résultats et Discussion

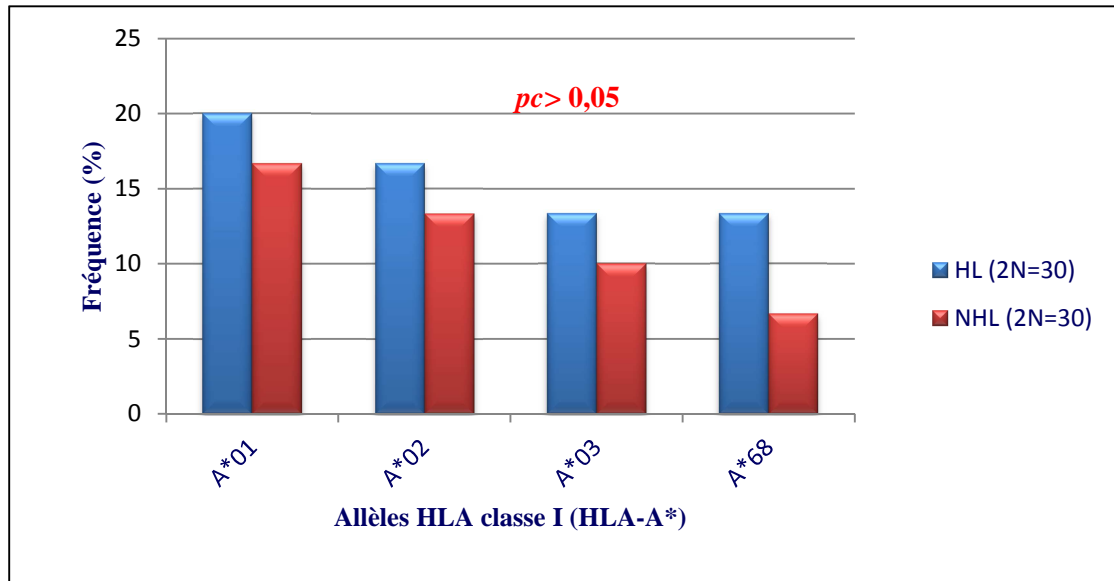


Figure 21 : Fréquences des allèles HLA classe I (HLA-A*) chez les patients HL et NHL.

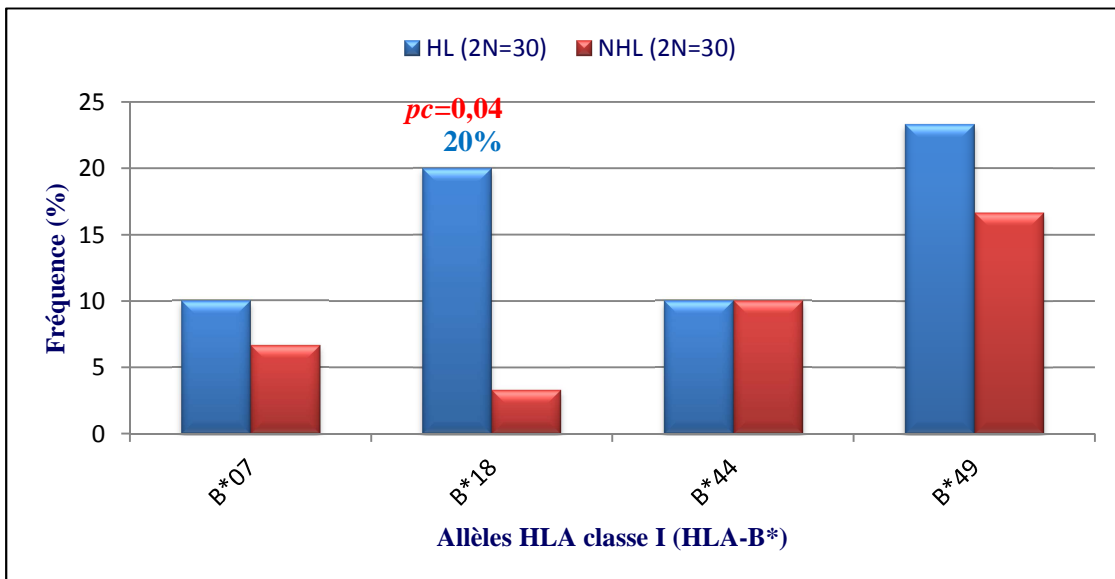


Figure 22 : Fréquences des allèles HLA classe I (HLA-B*) chez les patients HL et NHL.

Résultats et Discussion

Les résultats de l'odds ratio montrent qu'il existe une différence significative entre patients HL et NHL pour l'allèle HLA-B18* avec comme valeurs, $OR = 7,25$, $p = 0,04$, $IC = 0,773-344,713$ (Figure 23).

Ces valeurs nous ont permis d'associer l'allèle HLA-B18* à la susceptibilité aux HL.

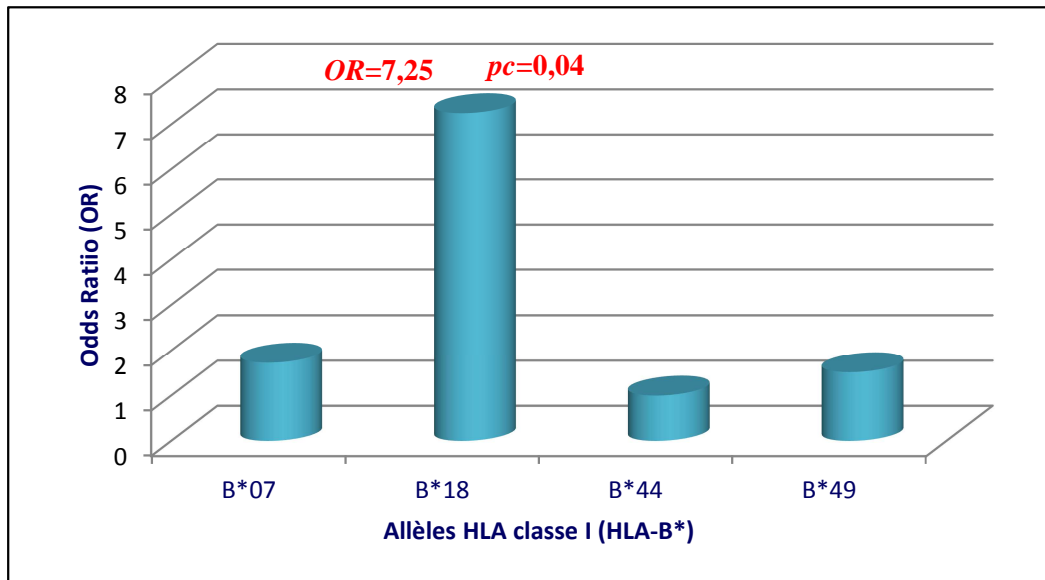


Figure 23 : Valeur des OR des allèles HLA classe I (HLA-B*) chez les patients HL et NHL.

IV-4-2 Fréquence des allèles HLA classe II chez les patients HL et NHL

L'analyse de la distribution des fréquences des allèles DRB1*03 et *07 montre quelles sont significativement plus élevées chez les patients avec NHL par rapport aux patients HL : (40% vs. 13,33%, $OR = 4,33$, $p = 0,02$, $IC = 0,048-0,942$) (33,33% vs. 6,67%, $OR = 7$, $p = 0,02$, $IC = 1,249-70,340$) respectivement (Tableau V) (Figure 24 et 25).

Résultats et Discussion

Tableau V : Comparaison des allèles HLA-DRB1*, DQB1* chez les patients HL et NHL

Allèles	HL (2N=30)	NHL (2N=30)			
DRB1*et DQB1*	n%	n%	Pc	OR	I.C (95%)
DRB1*01	1(3,33)	05(16,67)	0,08	0,7	0,004-1,733
DRB1*03	4(13,33)	12(40)	0,02	4,33	0,048-0,942
DRB1*04	05(16,67)	02(6,67)	0,228	2,8	0,406-31,358
DRB1*07	2(6,67)	10(33,33)	0,02	7	1,249-70,340
DRB1*11	3(10)	01(3,33)	0,301	3,22	0,273-174,879
DRB1*13	01(3,33)	01(3,33)	1	1	0,012-81,170
DRB1*14	01(3,33)	01(3,33)	1	1	0,012-81,170
DRB1*15	03(10)	06(20)	0,278	0,44	0,066-2,389
DQB1*02	08(26,67)	11(36,67)	0,405	0,63	0,179-2,149
DQB1*03	07(23,33)	09(30)	0,559	0,71	0,189-2,602
DQB1*04	01(3,33)	2(6,67)	0,554	0,48	0,008-9,877
DQB1*05	04(13,33)	07(23,33)	0,317	0,51	0,097-2,322
DQB1*06	06(20)	09(30)	0,371	0,58	0,146-2,218

Résultats et Discussion

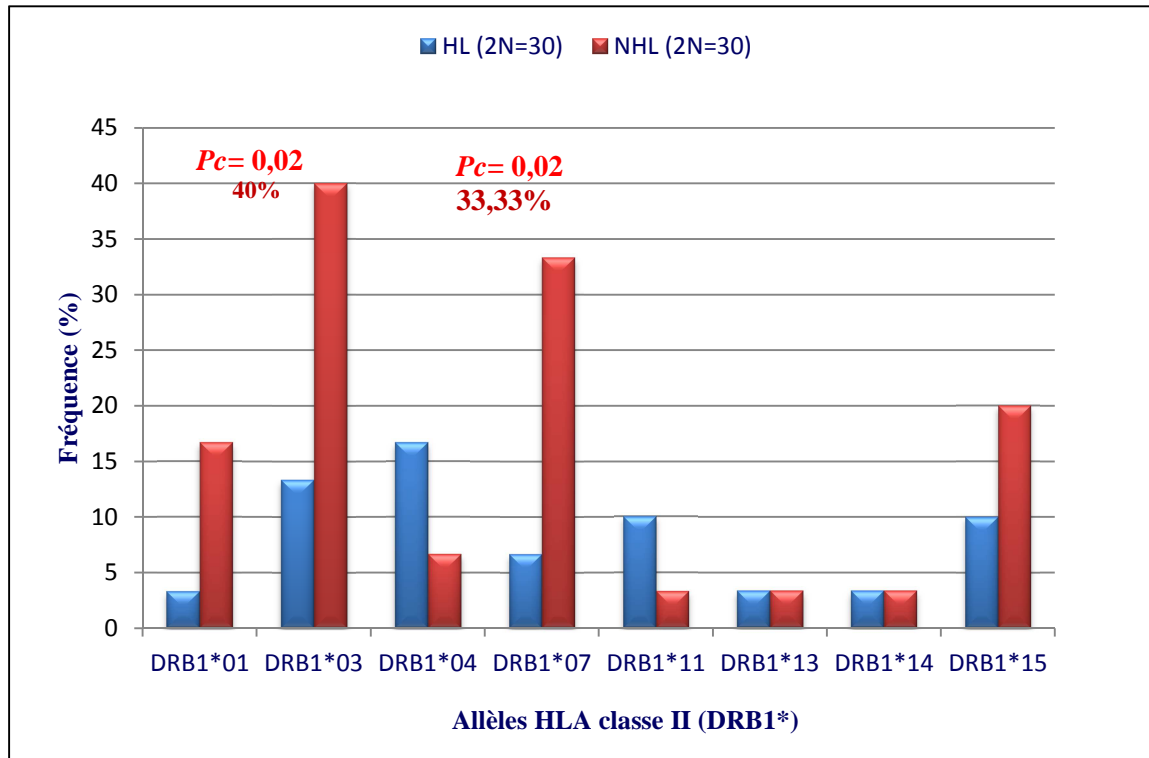


Figure 24 : Fréquences des allèles HLA classe II (DRB1*) chez les patients HL et NHL.

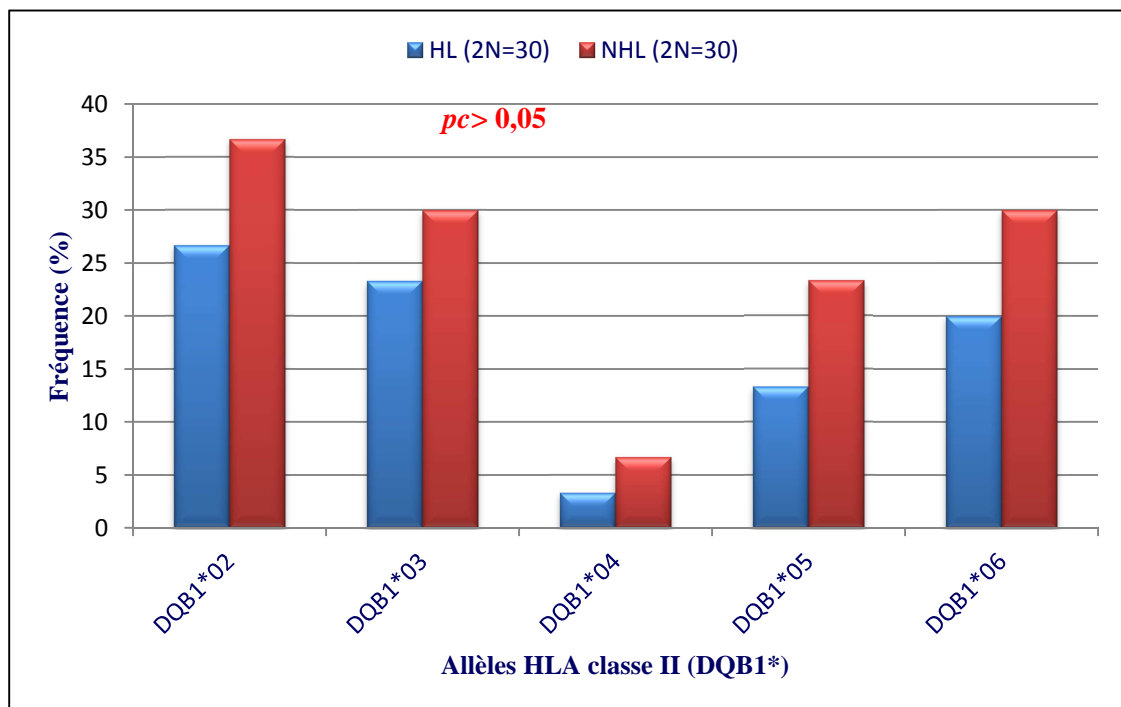


Figure 25 : Fréquences des allèles HLA classe II (DQB1*) chez les patients HL et NHL.

Résultats et Discussion

Les résultats de l'odds ratio montrent qu'il existe une différence significative entre patients HL et NHL pour allèles DRB1*03 et DRB1*07 avec comme valeurs : $OR = 4,33$, $p = 0,02$, $IC = 0,048-0,942$, $OR=7$, $p=0,02$, $IC= 1,249-70,340$ respectivement (Figure 26).

Aucune différence significative n'a été observée pour le reste des marqueurs HLA DRB1* et DQB1* analysés au cours de nos travaux.

De ce fait, nous avons constaté que les allèles DRB1*03 et DRB1*07 seraient des marqueurs qui augmenteraient la susceptibilité aux NHL.

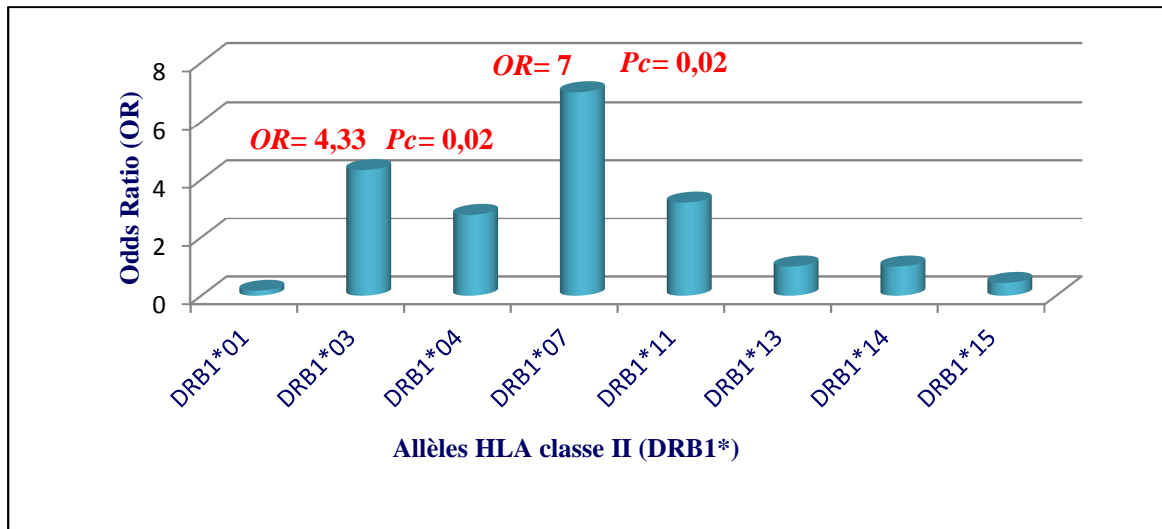


Figure 26 : Valeur des OR des allèles HLA classe II (HLA-DRB1*) chez les patients HL et NHL.

Résultats et Discussion

Les lymphomes correspondent à un groupement hétérogène d'entités tumorales d'origine lymphoïde et entraînent une hétérogénéité considérable en ce qui concerne les caractéristiques morphologiques et moléculaires ainsi que l'évolution clinique de la maladie. Plusieurs facteurs étiologiques sont impliqués dans la pathogenèse des lymphomes (Lien et Donaldson, 1999). En raison de l'extrême polymorphisme du système HLA, il reste l'un des meilleurs marqueurs génétiques. En effet, une association entre les antigènes HLA et le lymphome a été initialement démontrée pour des antigènes de classe I. Plus tard, des conclusions de la liaison génétique entre une susceptibilité à un lymphome et HLA classe II ou une protection contre la maladie ont été rapportés (Fogdell *et al.*, 1998).

La présente étude est la première à déterminer les fréquences de l'antigène leucocytaire humain chez les enfants Algériens atteints de lymphome. Nous avons examiné 30 patients pour des allèles HLA classe I et classe II en utilisant la PCR-SSP. Pour les allèles de classe I, les fréquences de HLA-B*18 chez les patients HL étaient élevées par rapport au groupe contrôle. Cependant, aucune association significative n'a été observée pour les autres allèles et les lymphomes malins.

Pour les allèles de classe II, les associations les plus notables de HLA sont DRB1*03 et DRB1*07, liés à la susceptibilité aux lymphomes malins, et la diminution du risque observé pour l'allèle DRB1*13. De même la présence de l'allèle DQB1*02 a été associé à une augmentation de la susceptibilité aux lymphomes et DQB1*03 a été associé à une diminution du risque aux lymphomes.

Ces résultats suggèrent que les allèles DRB1*03, DRB1*07 et DQB1*02 peuvent contribuer à la susceptibilité aux lymphomes chez les enfants de la population Algérienne, tandis que les allèles DRB1*13 et DQB1*03 peuvent conférer une protection.

Ces résultats sont plausibles car les molécules HLA classe II sont essentiels à la réponse immunitaire pour externaliser les pathogènes et sont impliquées dans le phénomène de l'auto-immunité, qui sont des facteurs de risque bien connus pour les lymphomes malins (Wang et Hartge, 2010).

En effet, l'implication des allèles HLA a été auparavant lié aux maladies auto-immunes, et il a été établi ou supposé que plusieurs de ces allèles seraient également des facteurs de risque pour les lymphomes, y compris les maladies cœliaques (DRB1*0301, DQB1*02), le diabète de type 1 (DRB1*03 et DRB1*04), le lupus érythémateux disséminé (DRB1*0301, HLA-B*0801) et le syndrome de Sjögren (DRB1*03, HLA-B*0801) (De Bakker *et al.*, 2006).

Nos résultats corroborent avec plusieurs études sur des patients atteints de lymphomes qui ont révélé une augmentation des fréquences de l'allèle HLA-B*18, tels que chez les patients Suédois (20% vs 5%, $OR = 4,76$, $p < 0,001$) (Svejgaard *et al.*, 1975, Hornmark-Stenstam *et al.*, 1978) et

Résultats et Discussion

DRB1*07 dans la population du Ghana (33% vs 13%, $OR = 3,17$, $p = 0,0078$) (Jones *et al.*, 1980). Des études similaires ont noté que les fréquences de l'allèle DRB1*03 étaient élevées chez les patients de race blanche atteints de lymphome par rapport aux témoins (21% vs 15% $OR = 1,5$, $p = 0,01$) (Abdou *et al.*, 2010). De plus, l'allèle DQB1*02 était le plus fréquent chez les patients Egyptiens présentant un lymphome (36,8% vs 8,5% $OR = 6,3$, $p = 0,006$) (Al-Tonbary *et al.*, 2005).

Nos résultats corroborent avec les conclusions antérieures en ce qui concerne la diminution de la fréquence et le rôle de protection de l'antigène DR13 dans les lymphomes malins. En effet, l'association entre la diminution du risque et l'allèle HLA-DRB1*13 a été rapporté chez les patients Français atteints de lymphome (21% vs 32%, $OR = 0,58$, $p = 0,047$) (Nowak *et al.*, 2007), chez les patients Egyptiens (0% vs 15%, $OR = 0,14$, $p = 0,05$) (al-Tonbary *et al.*, 2004) et chez les patients Américains (17% vs 23% $OR = 0,71$, $p = 0,03$) (Wang *et al.*, 2010). En outre, une diminution de la fréquence a été signalée dans plusieurs autres maladies, y compris les maladies auto-immunes (polyarthrite rhumatoïde (van der Woude *et al.*, 2010), la sclérose en plaques (Laaksonen *et al.*, 2002) et des maladies infectieuses (l'hépatite B (Ramezani *et al.*, 2008, Kummee *et al.*, 2007, Hohler *et al.*, 1997) l'hépatite C (Kuzushita *et al.*, 1998) et le papillomavirus humain (Wang et Hildesheim., 2003).

D'autres résultats ne corroborent pas avec les nôtres, en effet, l'allèle DQB1*03 était élevé chez les populations Caucasiennes, suggérant qu'il provoquait une susceptibilité, tandis que DRB1*04 était diminué, suscitant qu'il conférait une protection. La distribution des allèles HLA-DRB1 et DQB1 chez les patients Thaïlandais atteints d'un lymphome a montré que les fréquences de HLA-DRB1*15 et DRB1*09 étaient élevées, tandis que celles de DRB1*04, DRB1*08 et DRB*11 étaient réduites. D'autre part, l'incidence des allèles HLA-DQB1 était similaire à celle de la population normale (Nathalang *et al.*, 1999).

Les différences observées dans l'association de l'antigène HLA de classe II dans les différentes études peuvent être liées aux différents groupes ethniques, aux types de lymphomes de chaque étude ou aux méthodes d'analyse. Enfin, nos résultats confirment le rôle des molécules HLA dans l'étiologie des lymphomes malins, et sont cohérents, avec une nécessité d'une évaluation complète des variations génétiques dans la région chromosomique 6p21 dans l'étiologie des lymphomes (Skibola *et al.*, 2009). Cette association peut être expliquée par le fait que ces gènes soient situés à proximité du locus du CMH, et sont ainsi transmis en bloc en même temps que n'importe quel haplotype HLA chez une famille. En outre, par le fait que la régulation négative de l'expression de HLA classe I par cellule néoplasique survienne durant le développement de nombreuses autres tumeurs humaines, y compris le lymphome (Hafez *et al.*, 1985).

Conclusion et Perspectives

Nos résultats rapportent une association entre les gènes HLA classe I et classe II et les lymphomes malins chez les enfants Algériens. En effet les allèles HLA-B*18, DRB1*03, DRB1*07 et DQB1*02 confèrent une forte sensibilité aux lymphomes malins (HL et NHL). Le génotype associé aux lymphomes malins chez les Caucasiens et les populations africaines, est également significativement élevé chez les patients Algériens. La différence des fréquences peut être due à plusieurs facteurs : différences ethniques, mode de vie ou l'environnement.

En même temps, il a été démontré que les allèles DRB1*13 et DQB1*03 ont une association négative dans les lymphomes chez la population Algérienne avec un effet protecteur.

En perspectives, d'autres études sont nécessaires sur un grand nombre de patients atteints de lymphomes pour confirmer nos conclusions, car notre travail n'est en fait qu'une première exploration chez la population Algérienne. De plus, une meilleure connaissance de l'implication des allèles HLA dans le mécanisme physiopathologique des lymphomes malins pourrait servir pour le diagnostic de la maladie, et permettrait d'améliorer le pronostic des malades en modifiant les traitements actuels.

1. **Abbas A.K., Lichtman A.L.** (2007).
Cellular and molecular immunology.
Elviser 5th Ed., 71-78.
2. **Abdou A.M., Gao X., Cozen W., et al.** (2010).
Human leukocyte antigen (HLA) A1-B8-DR3 (8.1) haplotype, tumor necrosis factor (TNF) G-308A, and risk of non-Hodgkin lymphoma. *Leukemia*; **24**(5): 1055-1058.
3. **Allioua E.** (2011).
International classification of childhood cancer, third edition. *Cancer*; **103**(7):1457–67
[Epub 2011/2/16].
4. **Al-Tonbary Y., Abdel-Razek N., Zaghoul H., Metwaly S., El-Deek B., El-Shawaf R.**
(2004).
HLA class II polymorphism in Egyptian children with lymphomas. *Hematology*; **9**(2): 139-45.
5. **Anagnostopoulos I., Hansmann M.L., Franssila K., Harris M., Harris N.L., Jaffe E.S., et al.** (2000).
European task force on lymphoma project on lymphocyte predominance Hodgkin disease: histologic and immunohistologic analysis of submitted cases reveals 2 types of Hodgkin disease with nodular pattern and abundant lymphocytes. *Blood* **96**: 1889-99
6. **Androlewicz M.J., Orthmann B.N., Van Endert P.M., Spies T., Cresswell P.** (1994).
Characteristics of peptides and major histocompatibility complex classe I/β2 microglobuline to the transporters associated with antigen processing (TAP1 and TAP2). *Proc Natl Acad Sci USA*; **91**: 12716-12720.
7. **Asim F., Belgauml M.D., El-Kofide A.M.D., Rajah Sabbah M.D., and Lobna Shalaby M.D.**
(2005).
Precursor B-cell Lymphoblastic Lymphoma (PBL) in Children: Pattern of Presentation and Outcome. *Journal of the Egyptian nat. cancer inst.* Vol 17, n°1, march: 15-19.
8. **Avet-Loiseau C., Reiter A., Schrappe M., Ludwig W.D., et al.** (2001).
Favorable outcome of B-cell acute lymphoblastic leukemia in childhood: a report of three consecutive studies of the BFM group. *Blood*; **80**: 2471-2478.
9. **Bastard T., Bergeron C., Patte C., Caillaud J.M., et al.** (1994).
Cytogénétique des lymphomes malins et du myélome multiple. *Pathologie Biologie*. **51** (6): 375-381.
10. **Bigon I.D.** (2000).
DNA RFLP analysis: HLA-DR beta *Workshop Report*. In Dupont B ed. Immunology of HLA. New York; Springer-Verlag: 851-860.
11. **Bouiadjra S.B., Moulessehoul S., Sebaa A., Snouci A., Benali M., Zouaoui Z.** (2009).
Apport de la cytogénétique moléculaire à l'étude des hémopathies malignes chez les patients hospitalisés à l'hôpital de sidi bel-abbès (Algérie). *J.Afr. Cancer*. **1**: 188-192.
12. **Braud V.M., Allan D.S., Mc Michael A.J.** (1999).

Functions of non classical MHC and non-MHC-encoded class I molecules. *Curr Opin Immunol*; **11**: 100-108.

13. Brousse N., Gaulard P., Peuchmaur M., (1997).

Méthodes histologiques et immunohistochimiques d'étude des lymphomes. *Paris : Frison-Roche*. 90-111 p.

14. Brown J.H., Jardtzy T.S., Gorga J.C., Stern L.G., Urban R.G., Strommiger J.L et al. (1993).

Three dimensional structure of the human class II histocompatibility antigen HLA-DR1. *Nature*; **364**: 33-39.

15. Brusamolino E., Bacigalupo A., Barosi G., Biti G., Gobbi P.G., Levis A., et al. (2009).

Classical Hodgkin's lymphoma in adults: guidelines of the Italian Society of Hematology, the Italian Society of Experimental Hematology, and the Italian Group for Bone Marrow Transplantation on initial work-up, management, and follow-up. *Haematologica*; **94**:550-65.

16. Caillat-Zucman S. (2002).

Génétique du système HLA. *Médecine Thérapeutique/ Pédiatrie*, **5** (1) : 54-8.

17. Carpentier G., Farge Y. (1992).

Contribution à l'étude du polymorphisme des gènes HLA en biologie moléculaire. [Thèse], Université de Nantes : 1-130.

18. Charron D., Lotteau V., Turnel P. (1994).

Hybrid HLA-DC antigens provide molecular evidence for gene trans-complementation. *Nature*; **312**: 157-159.

19. Colombani J. (1993).

Fonctions immunitaires et applications médicales. Paris : John Libbey Eurotext : 23-30-39-47, 69-77.

20. Constance L, Percy MAS, Linet M, Gloeckler Ries LA, Friedman F D.L. In: Ries LAG, Gurney JG, Linet M, Tamra T, Young JL, Bunin GR, eds. (1999).

SEER pediatric monograph: lymphomas and reticuloendothelial neoplasms. Bethesda, MD: National Cancer Institute: SEER Program.

21. Craig R., Foon S. (2008).

Etiology and epidemiology of non-Hodgkin lymphoma. In: Mauch PM, Armitage JO, Harris NL, Coiffier B, Dalla-Favera R, eds. *Non-Hodgkin Lymphoma*. Baltimore, MD: Lippincott, Williams and Wilkens.

22. Cresswell p. (1996).

Invariant chain structure and MHC class II function. *Cell*; **84**:505-507.

23. Davis M.M., Bjorkman P.J. (1988).

T-cell antigen receptor genes and T-cell recognition. *Nature*; **334**: 395-401.

24. De Bakker PI., McVean G., Sabeti PC., et al. (2006).

A high-resolution HLA and SNP haplotype map for disease association studies in the extended human MHC. *Nat Genet.* 2006; **38**(10):1166-1172.

25. Delabesse P., Macintyre N. (1997).

Influence of HLA haplotypes on the clinical courses of individuals infected with hepatitis C virus. *Hepatology.* **27**(1):240-244.

26. Delarue R. (2010).

Devant quel tableau clinique suspecter un lymphome et comment orienter sa prise en charge.
Rev Prat. **60**: 29-48 p.

- 27. Delsol G., Ralfkiar., Stein H., Wright D., Jaffe E.S.,** (2001).
Anaplastic large cell lymphoma. In Jaffe E.S., Harris N.L., Stein H., Vardiman J.W., *World Health Organization Classification of tumours. Pathology and genetics of tumours of hematopoietic and lymphoid tissues.* IARC. Press: lyon. 230-235 p.
- 28. Eliou J.F.** (2007).
Immunité adaptative: structure reconnues (CMH et antigène). Faculté de médecine Montpellier-Nîmes.
Erin L., Marcotte , Ritz B., Cockburn M., Christina A. Clarke., Julia E. Hecke (2013)
Department of Epidemiology, Fielding School of Public Health, University of California, Los Angeles, Box 951772, 650 Charles E. Young Drive, Los Angeles, CA 90095-1772, USA.
- 29. Fermé C., Bastion Y., Lepage E., Berger F., Brice P., Morel P., et al.** (1997)
The MINE regimen as intensive salvage chemotherapy for relapse and refractory Hodgkin's disease. *Ann Oncol*; **6**: 543-549.
- 30. Ferrés H., German R.** (2004).
Non-Hodgkin's lymphomas of childhood and adolescence: results of a treatment stratified for biologic subtypes and stage A report of the Berlin-Frankfurt-Munster Group. *J Clin Oncol* ; **13**: 359-372
- 31. Fogdell, A., Hillert, J. and Sachs, S.** (1998).
The multiple sclerosis and macrolepsy associated HLA class II haplotype", *Tissue Antigens* **46**, 333.
- 32. Garrido F., Ruiz-Cabello F., Cabrera T., Pérez-Villar J.J., Lopez-Botet M., Duggan-Keen M et al.** (1997).
Implications for immuno-surveillance of altered HLA-class I phenotypes in human tumors. *Immunol Today*; **18**: 89-95.
- 33. Germain R.N., Margulies D.H.** (1993).
The biochemistry and cell biology of antigen processing and presentation. *Annu rev immunol*; **11**: 403-450.
- 34. Gisselbretch, C.** (2008).
Les lymphomes malins non hodgkiniens. John Libby Eurotext. 1^{ère} édition. 143p.
- 35. Hafez, M., El-Tahan, H., El-Morsy, Z., et al.** (1985).
Genetic susceptibility in Hodgkin's lymphoma", In Muller, Weber, ed, *Familial Cancer first Int. Res. Conf.*, Basel, p. 175.
- 36. Haluska FG., Brufsky AM.** (1994).
Canellos GP The cellular biology of Reed-Sternberg cell. *Blood*; **84**: 1005-1019.
- 37. Hamladji R.M.,Belhani M., Ardjoun F.Z.,Abad M.T., Touhami H., et al.** (2009).
Société Algérienne d'Hématologie et de Transfusion Sanguine. Approche épidémiologique des lymphomes malins non-hodgkiniens ganglionnaires. *Revue Algérienne d'Hématologie*, N°00, Mars : 6-13 p.
- 38. Hamladji R.M.,Belhani M., Ardjoun F.Z.,Abad M.T., Touhami H., et al.** (2009).

Société Algérienne d'Hématologie et de Transfusion Sanguine. Epidemiologie de la maladie de Hodgkin en Algérie. Revue Algérienne d'Hématologie, N°01, Septembre: 8-10 p.

- 39. Hohler T., Gerken G., Notghi A., et al.** (1997).
HLADRB1* 1301 and *1302 protect against chronic hepatitis B. *J Hepatol.*; **26**(3):503-507.
- 40. Hornmark-Stenstam F., De Moor P., Louwagie A.** (1978).
Association of aberrant transcortin levels with HLA antigens of the B and C loci: high transcortin levels are frequently found in patients with lymphatic leukemia, hairy cell leukemia, or non-Hodgkin lymphoma. *J Clin Endocrinol Metab*; **51**(4): 868-72.
- 41. Howlader NNA, Krapcho M, Neyman N, Aminou R, Waldron W, Altekruse SF, Kosary CL, Ruhl J, Tatalovich Z, Cho H, Mariotto A, Eisner MP, Lewis DR, Chen HS, Feuer EJ, Cronin KA, Edwards BK, eds.** (2011).
SEER cancer statistics review, 1975– 2008. Bethesda, MD: National Cancer Institute.
- 42. Jaffe E.S., Harris N.L., Stein H., Isaacson P.G.** (2008).
Classification of neoplasms: the microscope as a tool for disease discovery. *Blood*. 112: 4384-4399.
- 43. Jones E.H., Biggar R.J., Nkrumah F.K., Lawler S.D.** (1980).
Study of the HLA system in Burkitt's lymphoma. *Hum Immunol*; **3**: 207-10.
- 44. Khalil L., Deschamps L., Lepage V., Al-Daccak R., Degos L., Hors J.** (1992).
Dose effect of cis and trans-encoded HLA-DQ β b hetetodimers in iddm susceptibility. *Diabetes*; **41**: 378-384.
- 45. Kummee P., Tangkijvanich P., Poovorawan Y., Hirankarn N.** (2007).
Association of HLA-DRB1*13 and TNF-alpha gene polymorphisms with clearance of chronic hepatitis B infection and risk of hepatocellular carcinoma in Thai population. *J Viral Hepat.*; **14**(12):841-848.
- 46. Kuzushita N., Hayashi N., Moribe T., et al.** (1998).
Influence of HLA haplotypes on the clinical courses of individuals infected with hepatitis C virus. *Hepatology*; **27**(1):240-244. **Laaksonen M., Pastinen T., Sjoroos M., et al.** (2002).
HLA class II associated risk and protection against multiple sclerosis—a Finnish family study. *J Neuroimmunol*; **122**(1-2):140-145.
- 47. Lanier L.L., Corliss B., Philipps J.H.** (1997).
Arousal and inhibition of human NK cells. *Immunol Rev*; **155**: 1445-154.
- 48. Link, M.P. and Donaldson S.S.** (1999).
The lymphomas and lymphadenopathy”, In: Nathan, D.G. and Orkin, S.H., eds, Hematology of Infancy and Childhood, 5th ed. (WB Saunders, Philadelphia), p 1324.
- 49. Liu Y., Sattarzadeh A., Diepstra A., Visser L., Berg A.** (2013).
Department of Pathology & Medical Biology, University of Groningen, University Medical Center Groningen, Netherlands. *Seminars in Cancer Biology* **24**: 15– 22.
- 50. Mc Bride KM., Gazumyan A., Woo EM., Schwikert TA., Chait BT., Nussenzweig MC.** (2008).
Regulation of class switch recombination and somatic mutation by AID phosphorylation. *J Exp Med*; **205**: 2585-94.
- 51. Michaux G., Patte C., Rodary C., Sarrazin D., Bernard A., Lemerle J.** (2004).
Résultats du traitement de 178 lymphomes malins non hodgkiniens de l'enfant de 1996 à 2001. *Arch Fr Pediatr* ; **38**: 321-327.

- 52. Miller S.A., Dykes D., Polesky H.F.** (1988).
A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acid Research*; **16**: 1215-1218.
- 53. Nathalang, O., Tatsumi, N., Hino, M., et al.** (1999).
HLA-class II polymorphism in Thai patients with non-Hodgkin's lymphoma", *Eur. J. Immunogenet.* 26, 389.
- 54. Nowak J., Kalinka E., Juszczynski P., et al.** (2007).
Association of HLA ancestral haplotype 8.1 with adverse outcome of non-Hodgkin lymphoma. *Genes Chromosomes Cancer*; **46**(5): 500-7.
- 55. Nowell P.C., Hungerford D.A.** (1960).
The minute chromosome in human granulocytic leukemia. *Science.* 132: 1497 p.
- 56. Olerup O., Zetterquist H.** (1992).
HLA-DR typing by pcr amplification with sequence specific primers (PCR-SSP) in 2 hours: an alternative to serological DR typing in clinical practice including donor-recipient matching in cadaveric transplantation. *Tissue antigens*; **39**(5): 225-235.
- 57. Ramezani A., Hasanjani Roshan MR., Kalantar E., et al.** (2008).
Association of human leukocyte antigen polymorphism with outcomes of hepatitis B virus infection. *J Gastroenterol Hepatol.*; **23**(11): 1716-1721.
- 58. Rhodes D.A., Trowsdale J.** (1999).
Genetics and molecular genetics of MHC. *Rev Immunogenet*; **1**: 21-31.
- 59. Russano de Paiva G., Laurent C., Lamant L., Delsol G., Brousset P.** (2009).
Classification histopathologique, immunologique, cytogénétique et moléculaires des lymphomes non hodgkiniens. EMC (Elsevier Masson SAS, Paris), Hématologie, 13-013-A-20.
- 60. Skibola C.F., Bracci P.M., Halperin E., et al.** (2009).
Genetic variants at 6p21.33 are associated with susceptibility to follicular lymphoma. *Nat Genet*; **41**(8):873-875.
- 61. Stein H., Marafioti T., Foss H.D., Laumen H., Hummel M., Anagnostopoulos I., et al.** (2001).
Down regulation of BOB.1/OBF.1 and Oct2 in classical Hodgkin disease but not in lymphocyte predominant Hodgkin disease correlates with immunoglobulin transcription. *Blood*; **97**: 496-501.
- 62. Svejgaard A., Platz P., Ryder L.P., Nielsen L.S. and Thomsen M.** (1975).
HL-A and Disease Associations - A Survey. *Transplant. Rev.* **22**(1):3-43.
- 63. Tiwari J.L., Terasaki P.I.** (1985).
HLA and disease associations. New York: Springer-Verlag.
- 64. Van Der Woude D., Lie B.A., Lundström E., et al.** (2010).
Protection against anti-citrullinated protein antibody-positive rheumatoid arthritis is predominantly associated with HLA-DRB1*1301: a metaanalysis of HLA-DRB1 associations with anti-citrullinated protein antibody-positive and anticitrullinated protein antibody-negative rheumatoid arthritis in four European populations. *Arthritis Rheum*; **62**(5):1236-1245.
- 65. Vissal L., Coppes MJ, Patte C, Couanet D , et al.** (2002).
National Cancer Institute sponsored study of classification of non-Hodgkin's lymphomas: summary and description of a working formulation for clinical usage. *Cancer*; **49**: 2112-2135.
- 66. Vogetseder A., Carole G., Tanja R., Marianne T.** (2011).

Diagnostic du lymphoma en pédiatrie. Institut für klinische pathologie, UniversitätsSpital Zürich. *Forum Med Suisse* ; (5) :73-8.

67. Wang SS., Hartge P. (2010).

Etiology and epidemiology of non-Hodgkin lymphoma. In: Mauch PM, Armitage JO, Harris NL, Coiffier B, Dalla-Favera R, eds. *Non-Hodgkin Lymphoma*. Baltimore, MD: Lippincott, Williams and Wilkens.

68. Wang S.S., Hildesheim A. (2003).

Chapter 5: viral and host factors in human papillomavirus persistence and progression. *J Natl Cancer Inst Monogr*; (31):35-40.

69. Yano N., Anderson J.R., Jenkin R.D., Wilson J.F., et al. (1992).

Long-term follow-up of patients treated with COMP or LSA2L2 therapy for childhood non-hodgkin's lymphoma: a report of CCG-551 from the children cancer group. *J Clin Oncol* ; 11 : 1024-1032.

Annexe 1 :



Figure 27 : Prélèvement sanguin par ponction veineuse.

Solutions pour les techniques de biologie moléculaire :

Réactifs biologiques :

- Protéinase K (PK) : enzyme sérine protéase d'origine bactérienne (*Tritirachium album*). (10mg/ml).
- Contrôle positif (ADN humain) (**Dynal**).
- Taq polymérase 5U/ μ l (**Sigma**).
- Désoxynucléotides triphosphate (dNTP) (0,4mM) (**Dynal**).
- Couple d'amorce spécifique DRB1*03 (**Dynal**).
- Couple d'amorce spécifique DRB1*04 (**Dynal**).
- Contrôle interne : amorce du gène de l'hémoglobine humaine (**Dynal**).
- Contrôle interne : amorce des gènes des facteurs de croissances (**Dynal**).
- dNTP 25 mM
- Marqueurs de poids moléculaire (PM) 100-1000 kDa (**Dynal et ONE lambda**).

Autres réactifs :

- Agarose (**Sigma**).
- Bromure d'éthidium (**ONE lambda**).

Annexe 2 :

Solutions nécessaire au typage HLA par PCR-SSP
Solutions d'extraction d'ADN :
Solution de lyse des globules rouges (SLR, TE10/10) :
▪ Tris 1M pH= 7,6 10ml
▪ EDTA 0,5M 20 ml
▪ H ₂ O 1000 ml
Solution de lyse des globules blancs (SLB, TE 10/5) :
▪ Tris 1M pH= 7,6 10ml
▪ EDTA 0,5M 10 ml
▪ H ₂ O 1000 ml
TE 10/1 :
▪ Tris 1M pH=8 10 ml
▪ EDTA 0,5M 2 ml
▪ H ₂ O 1000 ml
Tris-HCl 1M pH=8 :
▪ Tris HCl 157,6g (39,4g)
▪ H ₂ O 1000 ml (250 ml)
Tris base 1M pH=8 :
▪ Tris base 121,4g (30,28g)
▪ H ₂ O 1000 ml (250 ml)
EDTA 0,5M pH=8 :
▪ EDTA 372,24g (46,533g)
▪ H ₂ O 2000 ml (250 ml)
Ajuster le pH à 8 avec du NaOH
NaCl 6M :

▪ NaCl 360,64g (87,66g)
▪ H ₂ O 1000 ml (250 ml)

TBE 10X :

- Tris base 107,8g
- Acide borique 55g
- EDTA disodique 5,8g
- H₂O 1000 ml

TBE 1X :

- TBE 10X 50 ml
- H₂O 450 ml

5 ml BET 1X :

- BET 10X 321,5 µl
- H₂O 4678,5 µl

100 ml Ethanol 70% :

- Ethanol 52,25 ml
- H₂O 47,75 ml

Tris-EDTA : (TE 10/1) :

- 10 mM Tris pH=7,6
- 1 mM EDTA pH=8.

Tris acide borique et EDTA (TBE) :

- Tris. 1M
- Acide borique 1M
- EDTA 0,5M

Tris Acétate-EDTA (TAE) :

- Tris. 1M
- 200 mM Acétate

▪ 50 mM EDTA pH=8
SDS 10% 10% :
▪ SDS 10g
▪ H ₂ O 100 ml
Bleu de dépôt :
▪ Bleu de bromophénol 0,05%
▪ Glycérol 60%

Annexe 3 :

Préparation de l'ADN pour l'amplification:

- Préparer des dilutions d'ADN : $C_i V_i = C_f V_f$ avec :
 - C_i : concentration d'ADN initiale donné par le spectrophomètre.
 - V_i : volume inconnu.
 - C_f : concentration finale.
 - V_f : volume final 114 μ l d'eau distillée.
 - V_i : 11.400/concentration finale.
- Mettre un volume d'eau distillée dans un tube eppendorf. Ce volume= 114- V_i , ensuite rajouter V_i ADN, puis vortexer. Et enfin, préparer le mélange réactionnel.
- **Préparation du mélange réactionnel :**
- Les tableaux ci-deessous montrent les différents volumes utilisés pour le mélange réactionnel :

Tableau VIII : Protocole de préparation des solutions réactionnelles pour le typage HLA par PCR-SSP1AB de la classe I.

dNTP mix	ADN	Taq polymérase
1000 μ l	111 μ l	5,6 μ l

Tableau IX : Protocole de préparation des solutions réactionnelles pour le typage HLA par PCR-SSP2L de la classe II.

dNTP mix	ADN	Taq polymérase
360 μ l	39 μ l	2 μ l

Annexe 4 :

Matériel des techniques d'analyse

Appareillage

Notre pratique a nécessité l'utilisation de :

- Centrifugeuse de type presvac.
- Spectrophotomètre (DAMON IEC/Divisio).
- Bain marie thermo staté à 37°C de type mlw W10.
- Thermocycleur (Eppendorf Master cycler).
- Cuve d'électrophorèse
- Balance de type *Extroversion IMETEC*.

Matériel d'analyse

- Tubes falcon de 25 et 50 ml.
- Micropipettes à volumes variable (10, 50, 100, 500, 1000) µl.
- Pipette pasteur.
- Portoirs.
- Embouts jaunes et bleus.
- Plaques PCR de polycarbonate de 96 puits contenant 5µl/puits d'une solution d'amorce (amorce spécifique et interne) recouverte d'huile, conservées à -20°C.

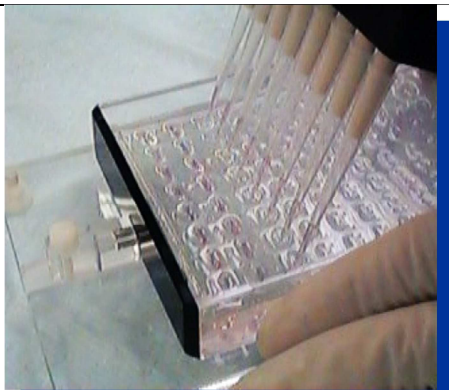
Tableau X : Protocole de la micro-SSP



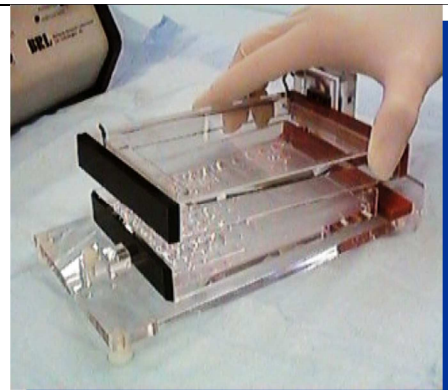
(1) Ajout de la Taq polymérase et de l'ADN au D-mix



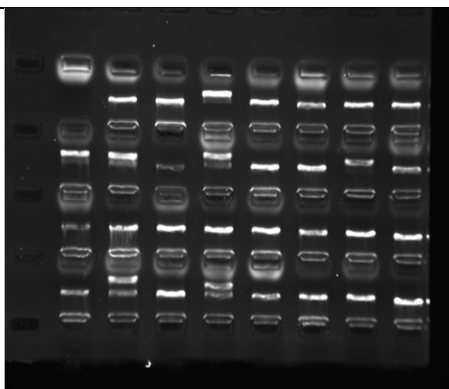
(2) PCR



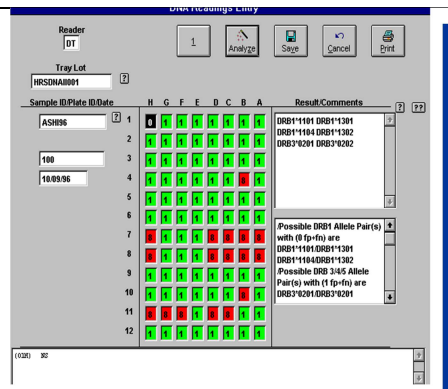
(3) Dépôt sur gel d'agarose



(4) Electrophorèse



(5) Révélation des amplicons sous UV



(6) Analyse des résultats

Annexe 5 :

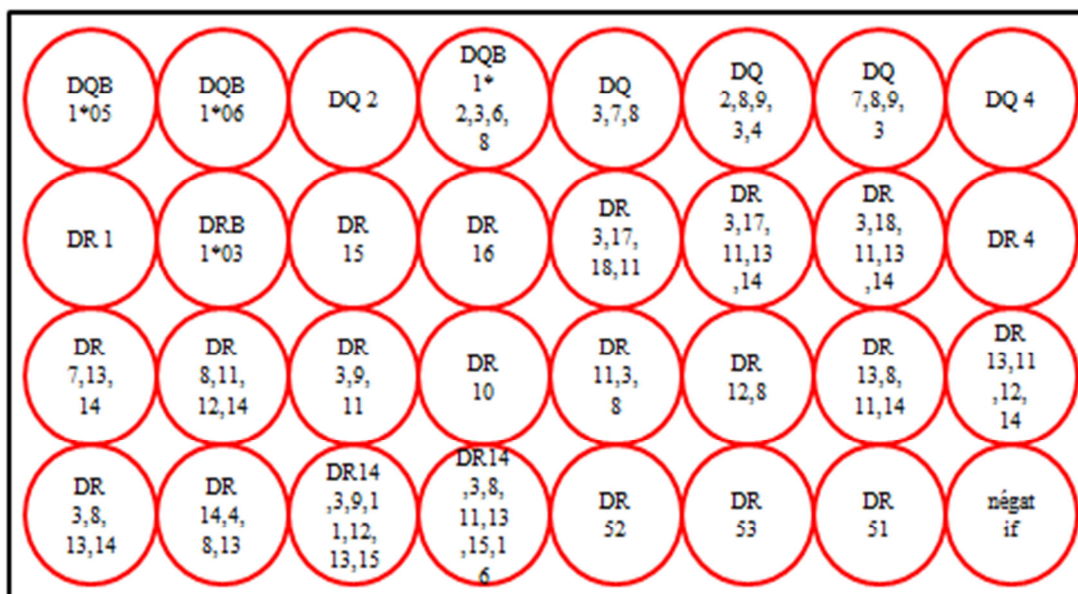


Figure 28 : Répartition des différentes amorces dans la plaque du typage HLA classe II (DR-DQ).

Tableau XI : Spécificités et tailles des produits de PCR des 8 primer mixes utilisés pour le typage SSP DQ à faible résolution.

Primer Mix	Size of spec.PCR product	Size of control band	DQ serology
1	220 pb	515 pb	5
2	220,270 pb	430 pb	6
3	205 pb	430 pb	2
4	130,145 pb	515 pb	2, 3, 6, 8
5	220 pb	515 pb	3, 7, 8
6	220 pb	515 pb	2, 8, 9,3, 4
7	135 pb	515 pb	7, 8, 9,3
8	210 pb	430 pb	4

Tableau XII: Spécificités et tailles des produits de PCR des 23 primer mixes utilisés pour le typage SSP DR à faible résolution.

Primer Mix	Size of spec.PCR product	Size of control band	DQ serology
9	205 pb	515 pb	1
10	195 pb	430 pb	103
11	215 ,260 pb	430 pb	15
12	210 pb	430 pb	16
13	220 pb	430 pb	3,17, 18,11
14	80,210 pb	430 pb	3, 17,11, 13,14
15	80,210 pb	430 pb	3,18, 11, 13,14
16	100,175 pb	430 pb	4
17	205,230 pb	430 pb	7,13, 14
18	165,215 ,250 pb	515 pb	8,11, 12, 14
19	85,130,180 pb	430 pb	3,9, 11
20	205 pb	430 pb	10
21	100,170 pb	430 pb	11,3, 8
22	85,105 pb	430 pb	12,8
23	210 pb	430 pb	13,8, 11, 14
24	195,210 pb	430 pb	13,8, 11, 14
25	175 pb	430 pb	3,8, 13, 14
26	100,140 pb	430 pb	14, 4, 8, 13
27	110, 135,170 pb	515 pb	14, 3, 9,11, 12, 13,15
28	110, 175,225 pb	430 pb	14, 3, 8, 11, 13, 15,16
29	230 pb	430 pb	52
30	215 pb	430 pb	53
31	175 pb	430 pb	51