

**REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE
MINISTRE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE
SCIENTIFIQUE
UNIVERSITE DE BLIDA 1**

**FACULTE DES SCIENCE DE LA NATURE ET DE LA VIE
DEPARTEMENT DE BIOLOGIE ET PHYSIOLOGIE CELLULAIRE
OPTION : GENETIQUE ET PHYSIOLOGIE**



Mémoire en vue de l'obtention du diplôme de Master en génétique et physiologie

Dont le **THEME** :

« L'EBV/EBER dans le lymphome de Hodgkin »

Présenté par

BOUYOUCHEF Imène et SERIER Yasmine

Soutenu en Septembre 2016

Devant le jury :

Présidente : Mme. EDDAIKRA Atika : Maitre assistante A

Examinatrice : Mme. BEN AZOUZ Fella : Maitre assistante A

Promotrice : Mme .MEDJBER Nadia : Maitre assistante hospitalo-universitaire

Co-promoteur Mr. MOHAMED SAID Ramdane : Maitre-conférence B

**REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE
MINISTRE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE
SCIENTIFIQUE
UNIVERSITE DE BLIDA 1**

**FACULTE DES SCIENCE DE LA NATURE ET DE LA VIE
DEPARTEMENT DE BIOLOGIE ET PHYSIOLOGIE CELLULAIRE
OPTION : GENETIQUE ET PHYSIOLOGIE**



Mémoire en vue de l'obtention du diplôme de Master en génétique et physiologie

Dont le **THEME** :

« L'EBV/EBER dans le lymphome de Hodgkin »

Présenté par

BOUYOUCHEF Imène et SERIER Yasmine

Soutenu en Septembre 2016

Devant le jury :

Présidente : Mme. EDDAIKRA Atika : Maitre assistante A

Examinatrice : Mme. BEN AZOUZ Fella : Maitre assistante A

Promotrice : Mme .MEDJBER Nadia : Maitre assistante hospitalo-universitaire

Co-promoteur Mr. MOHAMED SAID Ramdane : Maitre–conférence B

DEDICACE

Je dédie ce travail :

A mes parents BOUYOUCEF Abd Almalek et CHEROUATI Samia ; Je vous remercie pour tout le soutien que vous m'avez apporté depuis ma tendre enfance. Merci maman pour ton amour ,tes nombreux sacrifices réalisés pour la réussite de nos études, tu as toujours souhaité le meilleur pour nous. Je prie qu'ALLAH le tout puissant vous donne une santé de fer et une longévité.

A mes grands-parents CHEROUATI Redouane (Sidou) et AKLOUCHE Houria ; merci pour vos prières qui m'accompagne toujours , que dieu vous garde pour nous.

A mon frère Youcef et ma sœur Racha ; merci pour vos soutiens, pour l'amour fraternel et la chaleur que vous me procurez.

A mes oncles CHEROUATI Brahem , Mohamed et BOUYOUCEF Abd Elslem.

A la mémoire de mes grands-parents paternels BOUYOUCEF Ahmed et MIMOUN Baya ET ma deuxième grand-mère paternel BOUGAHGOUH Rbiha.

A la mémoire de mon oncle BOUYOUCEF Abd Alwahab.

A SERJER Yasmine ; pour les souvenirs de tous les moments que nous avons passé ensemble Que ce travail pour lequel nous nous sommes battus soit pour nous le début d'un parfait bonheur et d'une brillante carrière.

A tous mes camarades de promotion.

Enfin, A toutes les personnes qui me sont chères.

BOUYOUCEF Imène

DEDICACE

Je dédie ce mémoire à tous ceux et toutes celles qui m'ont accompagnée et soutenue durant ce travail :

A mes chères parents Mohamed et F/Z pour leur amour inestimable, leur confiance, leur soutien, leurs sacrifices et toutes les valeurs qu'ils ont su m'inculquer.

A mes chers grands parents pour leur douceur, gentillesse et prières.

A ma chère tante pour son précieux encouragement.

A mes petits chers frères Billel, Hamza et Walid .

A ma chère et précieuse amie et binôme Bouyoucef imène pour son amour et sa complicité. Pour tous les bons moments qu'on a vécu ensemble et les mauvais que nous avons pu surmontés . Je souhaite que la vie lui préserve le meilleur.

A mon chère ami Hamaidi Mohammed Chafik pour sa présence, soutien et encouragement. Je le remercie énormément.

A mes chères amies Touati Loubna, El Ahouel Fatima, Zaoui Fatima , Sidemou Meriem et Ben gella Hadjer pour leurs fidélité et amitié, avec mes souhaits de bonheur et de succès .

A tous mes collègues de ma promotion en particulier El Robrini F/Z et Leradj Imène.

A tous mes enseignants depuis mes premières années d'études en particulier Mr Mohamed Saïd Ramdane .

A tous ceux qui me sens chers et que j'ai omis de citer

A tous ceux qui, par un mot, m'ont donné la force de continuer

SERIER Yasmine

REMERCIEMENTS

On remercie tout d'abord Dieu tout puissant de nous avoir donné le courage, la force et la patience d'achever ce travail

On tient à adresser nos remerciements à Madame le professeur Ouahioune, pour nous avoir accepté de réaliser notre recherche au sein de son service.

On souhaite remercier tous les membres de jury, pour avoir accepté de juger ce travail :

On remercie Madame Medjber Nadia (Maître assistante hospitalo-universitaire) pour avoir dirigé ce travail de recherche .

On remercie vivement Monsieur Mohamed Said Ramdane (Maître de conférence B) pour ses précieux conseils et orientation dans l'élaboration de ce mémoire. On le remercie également pour sa gentillesse et sa disponibilité.

On remercie Madame Eddaikra (Maître Assistante classe A) pour avoir accepté de présider les membres de nos jury.

On remercie Madame Ben Azzouz (Maître Assistante classe A) pour avoir bien voulu examiner ce travail.

Nous tenons à exprimer notre gratitude aux techniciens du laboratoire d'anatomopathologie CHU Blida pour leur aide et pour tout ce qu'ils nous ont appris.

Un grand merci aux malades qui nous ont été d'une grande utilité, nous leurs souhaitons la guérison et la santé.

Enfin, on remercie surtout nos familles pour leur soutien et encouragements depuis le début jusqu'à la fin. Merci encore une fois. Et merci pour toutes les personnes qui ont participé de près ou de loin à la réalisation de ce travail. Merci pour vos conseils et votre soutien.

ملخص

" لِمْؤمَّةُ هودجكين (Hodgkin) " او السرطان الليمفاوي الهودجكيني , هو سرطان غير معروف عند عامة الناس رغم انه واحد من أكثر أنواع السرطان انتشارا. وقد حددت دراسة أجريت حول هذا السرطان الليمفاوي في المستشفى الجامعي بالبيدة " فرانتز فانون" العديد من خصائصه. دراسة وصفية اجريت على ٢٢ شخص مصاب مكنت من تحديد ان هذا السرطان اللمفاوي, يصيب بكثرة المراهقين و البالغين الشباب, و خلال الفترة الممتدة ما بين أكتوبر 2014- يونيو 2016, الجنس الانثوي اكثر منه الذكر. إذا كان سبب هذا السرطان الليمفاوي لا يزال غير معروف , الا ان فيروس " ابشتاين بار(EBV)" لديه نصيب من المسؤولية في التسبب فيه. السوابق العائلية يمكن اعتبارها ايضا عامل خطر محتمل , وفق تحقيق اجري في التاريخ الوراثي لسبعة عائلات.

يستند التشخيص على التحليل البنيوي للبحث عن خلايا ورمية مميزة , خلايا " هود جكين(Hodgkin) " وأنواعها (خلايا ريد- ستيرنبرغ (Reed-Sternberg) , الفجوية (lacunaire)) ملاحظة بتقنية التلوين "الهيماتوكسيلين وايوزين (Héματοxyline et Eosine)", و على دراسة النمط الظاهري المناعي بتقنية " الكيمياء النسيجية المناعية (Immunohistochimie)" للكشف عن المستضدات المتواجدة بكثرة " CD 15 ، CD30 " و بروتين الكمون الغشائي للفيروس "ابشتاين بار (LMP1)" الموجود في معظم الحالات , تليها تأكيد وجود هذا الأخيرة بتقنية " التهجين الموضعي (hybridation in situ)" (الكشف عن الحمض النووي الريبوزي (ARNm) للفيروس "ابشتاين بار" بواسطة المسبار " EBER ")، وهو أمر حاسم لتعزيز التشخيص وتحديد الدعم العلاجي المناسب.

الكلمات المفتاحية : السرطان الليمفاوي الهودجكيني ، ابشتاين- بار، الهيماتوكسيلين و ايوزين, الكيمياء النسيجية المناعية التهجين الموضعي, السوابق العائلية.

RESUME

Le lymphome de Hodgkin est un cancer méconnu du grand public et qui fait pourtant partie des cancers les plus fréquents. L'étude de ce lymphome réalisée au CHU de Frantz Fanon Blida a permis de déterminer plusieurs de ses caractéristiques. Une étude descriptive faite sur 66 sujets a permis de déterminer que ce lymphome touche fréquemment les adolescents et les adultes jeunes. Durant la période comprise entre Octobre 2014- juin 2016 ,ce lymphome touche beaucoup plus le sexe féminin que le masculin .Si la cause de ce lymphome demeure encore inconnue, le virus d'Epstein-Barr aurait une part de responsabilité dans la survenue du lymphome de Hodgkin. Les antécédents familiaux peuvent constituer également un facteur de risque possible, selon une enquête génétique faite aux sein de 7 familles.

Le diagnostic repose en premier lieu sur l'analyse morphologique pour la recherche des cellules tumorales caractéristiques, la cellules de Hodgkin et ses variantes (cellules de Reed-Sternberg ,lacunaires) observées par la technique de coloration Hématoxyline et Eosine . Aussi en second lieu sur l'étude immunophénotypique par la technique d'Immunohistochimie pour la détection des antigènes CD 15,CD30 qui sont très présents et la protéine de latence du virus d'Epstein-Barr LMP1 présent dans la plupart des cas et le suivi d'une confirmation de ce dernier par hybridation in situ (la détection des ARNm d'EBV par la sonde EBER).Cette dernière est cruciale pour renforcer le diagnostic et pour déterminer une prise en charge thérapeutique appropriée.

Mots clés : lymphome de Hodgkin – Epstein Barr - Hématoxyline et Eosine
L'immunohistochimie - hybridation in situ- antécédents familiaux.

ABSTRAT

Hodgkin lymphoma is an unknown cancer in the general public although is one of the most common cancers. The study of this lymphoma at the University Hospital of Blida « Frantz Fanon » conducted to identify several features. A descriptive study of 66 subjects helped to determine that lymphoma affects adolescents and young adults profusely. During the period ranging between October 2014-2016, this lymphoma touches much more the female sex than the masculine. If the cause of this lymphoma is still unknown, the Epstein-Barr virus has a responsibility of its development. Family history can also be a potential risk factor, according to a genetic investigation done within 7 families.

The diagnosis is based on morphological analysis for the detection of tumor cell characteristics, the Hodgkin cells and its variants (Reed-Sternberg cells, lacunar) observed by hematoxylin and eosin staining technique, and the immunophenotypic study by immunohistochemistry technique for detection of antigens « CD 15, CD30 » which are highly present and latency protein of Epstein-Barr virus LMP1 which is present in most cases followed by confirmation of this last by in situ hybridization (detection of EBV mRNA with EBER's probe), which is crucial to strengthen the diagnosis and to determine an adequate therapeutic load.

Key words: Hodgkin lymphoma - Epstein Barr - hematoxylin and eosin - Immunohistochemistry - hybridization in situ- family history.

TABLE DES MATIERES

Dédicaces.....	I
Remerciements.....	III
Résumé.....	IV
Abréviations	VII
Glossaire.....	IX
Liste des figures	XI
Liste des tableaux.....	XIV
INTRODUCTION.....	1
CHAPITRE I : RECHERCHE BIBLIOGRAPHIQUE	
I-Les lymphomes Hodgkinien.....	3
I-1- Historique.....	3
I-2- Epidémiologie.....	3
I-3 – Etiopathogénie/facteurs incriminés.....	4
I-4- physiopathologie.....	4
I-4-1- La cellule de Hodgkin-Reed-Sternberg.....	4
I-4-2-Origine de la cellule de RS.....	5
I-4-3- Le Rôle de micro-environnement dans la survie de la cellule tumorale RS.....	6
I-5- Anomalies génétiques dans le LHC.....	8
I-6-Classification de LH.....	8
II-Le virus Epstein –Barr (EBV)	9
II-1-Historique.....	9
II-2-Propriétés du virus.....	10
II-2-1-Classification et structure.....	10
II-2-2-Le génome de l’EBV.....	11

II-2-3-Gènes et protéines de l'EBV.....	12
II-2-3-1- Expression des gènes du cycle de latence.....	13
II-2-3-2-Protéines des cycles réplcatif et productif lytique.....	14
II-2-4-Tropisme de l'EBV.....	15
III-Implication de l'EBV dans la pathogénie de LH.....	16
III-1- Le rôle des protéines de latence et de réplcation de l'EBV dans le LH.....	16
III-2-Implication de l'EBV dans les diverses formes de LH.....	17
IV- La détection de l'EBV par hybridation in situ	18
IV-3-1- Définition d'HIS.....	18
IV-3-2- Différents types d'HIS : FISH, CICH, SISH.....	18
IV-3-3- HIS et EBV.....	20
IV-4- Comparaison des techniques de Southern, HIS et PCR.....	21
 CHAPITRE II : MATERIEL ET METHODES	
Objectifs.....	23
 CHAPITRE III : RESULTATS ET DISCUSSION.....	35
 CONCLUSION.....	61
 REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	
 ANNEXES	

LISTE DES ABREVIATIONS

ADP : Adénopathie

AP : Phosphatase Alcaline

CISH : Chromogenic In Situ Hybridization

CSF1R : Colony Stimulating Factor 1 Receptor

DAB : Diaminobenzidine

DIG : Digoxigénine

DNP : Dinitrophénol

EBER : EBV Encoded small RNAs

EBNA : Epstein-Barr virus Nuclear Antigens

EBV : Epstein Barr Virus

FFPE : Formaldehyde Fixed and Paraffin Embedded

FISH : Fluorescence In Situ Hybridization

GM-CSF : Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factor

HE : Hématoxyline et Eosine

HIS : Hybridation In Situ

HRP : Horseradish Peroxidase

HRS : Hodgkin Reed Sternberg cell

IHC : Immunohistochimie

LCR : Liquide Céphalo-rachidien

LH : Lymphome de Hodgkin

LHc : Lymphome de Hodgkin classique

LHNPL : Lymphome Nodulaire à Prédominance Lymphocytaire

LMP : Latent Membrane Protein

LNH : Lymphome Non Hodgkinien

LP : Leader Protein

MDC : Macrophage-Derived Chemokine

MNI : Mononucléose Infectieuse

PBD : Paul-Bunnell-Davidsohn

PBO : Ponction de Biopsie Osseuse

RS : cellules de Reed-Sternberg

SISH : Silver In Situ Hybridization

SNPs : Single-Nucleotide Polymorphism

VCA : Viral Capsid Antigen

ZAP : ZEBRA Associated Proteins

ZEBRA : Z Epstein-Barr Replication Activators

Glossaire

Adénopathie : pathologie du ganglion lymphatique, qui peut être anormalement gros suite à une infection, une inflammation ou une tumeur.

Amygdalectomie : ablation des amygdales.

Anneau de Waldeyer : des amygdales pharyngées, palatines, linguales et tubaires. Ces organes lymphoïdes entourent de façon circulaire (en anneau) le pharynx.

Biopsie/microbiopsie : consiste à prélever une toute petite partie d'un organe ou d'un tissu (selon le diamètre de l'aiguille utilisée, on parle de biopsie ou de microbiopsie) afin d'effectuer des examens médicaux.

Biopsie exérèse : consiste à éliminer la totalité d'une lésion, dont le tissu sera analysé de la même façon qu'une biopsie.

Bouin aqueux : un fixateur cellulaire pour coupes histologiques utilisé en cyto-histologie, présente le désavantage de provoquer un phénomène d'auto-fluorescence cellulaire pouvant gêner les observations au microscope photonique à fluorescence. Le liquide de Bouin dégrade aussi rapidement les acides nucléiques.

Carcinome du nasopharynx : un cancer qui se développe aux dépens du nasopharynx (ou rhinopharynx), situé juste derrière les fosses nasales. Il peut être causé par le virus d'Epstein-Barr.

Leucoplasie chevelue buccale : est une atteinte muqueuse indolore due au virus d'Epstein-Barr Elle se présente sous forme de plaques blanchâtres, adhérentes dont la surface est irrégulière et parcourue de fines striures verticales.

Marqueurs myéloïdes : marqueurs de la lignée myéloïde c'est-à-dire les globules blancs (à l'exception des lymphocytes, de la lignée lymphoïde) : les monocytes, les macrophages, les cellules dendritiques et les granulocytes, y compris tous leurs précurseurs immatures de la moelle osseuse.

Microabcés : amas de cellules polynucléaires altérés

Mononucléose infectieuse (MNI) : correspond à la primo-infection symptomatique, généralement bénigne, provoquée par le virus d'Epstein-Barr(EBV). Transmise préférentiellement par la salive, on l'appelle « maladie du baiser », qui entraîne une fatigue associée à une fièvre, et une pharyngite (inflammation du pharynx).

Néoplasme : tissu nouvellement formé d'une tumeur bénigne ou maligne

Nosologique : de nosologie, branche de la médecine qui étudie les critères de classification des maladies.

Paludisme : affection, dû à des parasites du genre *Plasmodium* transmis à l'homme par des piqûres de moustiques *Anopheles* femelles infectés, appelés «vecteurs du paludisme».

Parenchyme : est un terme employé dans un ensemble de cellules constituant le tissu fonctionnel d'un organe.

Phase de latence : une latence "biologique" ; dont le virus étant en quelque sorte au repos.

SNPs : un type de polymorphisme de l'ADN dans lequel deux chromosomes diffèrent sur un segment donné par une seule paire de bases, entre individus d'une même espèce.

Stroma tumoral : le stroma tumoral est caractérisé par tout ce qui est présent au sein d'une tumeur et n'est pas une cellule tumorale. Le stroma comprend donc le tissu conjonctif, les vaisseaux, les leucocytes et la matrice extra-cellulaire. Le stroma sert de charpente à la tumeur et assure ses apports nutritifs.

LISTE DES FIGURES

Figure 1 :Micro-environnement de la cellule RS	8
Figure 2 : Structure du virus en microscopie électronique (coloration négative).....	10
Figure 3 : Représentation schématique d'organisation du génome de l'EBV sous forme linéaire et épisomique.....	12
Figure 4 : Les trois voies de l'activation du cycle lytique de l'EB V à partir de la forme de latence 1 dans les lymphocytes B.....	14
Figure 5 : Stratégie utilisée par l'EBV pour se maintenir à l'état latent dans les lymphocytes B mémoire	16
Figure 6 : Biopsie exérèse d'un ganglion cervicale droit d'un patient âgé 36 ans.....	25
Figure 7 :L'automate de la circulation (Leica ASP 6025).....	26
Figure 8 :L'enrobage de l'échantillon a la paraffine.....	26
Figure 9 : Montage et séchage des lames.....	28
Figure 10 : Manipulation des lames dans la chambre humide (Immune Simport).....	29
Figure 11 :.Application de post polymère sur les coupes.....	30
Figure 12 : Installation des lames et vérification automatique des réactifs nécessaires.....	32
Figure 13 : L'automate d'immunohistochimie et d'hybridation in situ (VENTANA).....	34
Figure 14 : Répartition des 66 sujets enquêtés selon les tranches d'âges.....	35
Figure 15 : Répartition des patients selon le sexe.....	36
Figure 16 :Répartition des 66 sujets étudiés selon le type/sous type du lymphome de Hodgkin.....	36
Figure 17 : Répartition par topographie ganglionnaire des 62 patients.....	37

Figure 18: Figure 18: Architecture ganglionnaire : normale à gauche ; effacée à droite dans le sous type scléro-nodulaire avec la présence de fibrose (Sous microscope optique ;G x4. Coloration HE).....	38
Figure 19: Architecture ganglionnaire effacée, absence des septa fibreux dans le sous type à cellularité mixte (Sous microscope optique ;G x10. Coloration HE)	38
Figure 20: Cellules de Hodgkin (Sous microscope optique ; G x40. Coloration HE).....	39
Figure 21: Cellules tumorales de Hodgkin Reed-Sternberg « HRS » (Sous microscope optique ; G x40. Coloration HE).....	40
Figure 22 : Cellules lacunaires (Sous microscope optique ; G x40. Coloration HE).....	40
Figure 23 : Cellules tumorales (HRS) au sein d'un fond cellulaire inflammatoire fait de polynucléaires et des lymphocytes (Sous microscope optique ; G x40. Coloration HE).....	41
Figure 24 : La présence des cellules histiocytaires dans le fond cellulaire inflammatoire (Sous microscope optique ; G x40 ,Coloration HE).....	41
Figure 25 : Cellule de Hodgkin Reed-Sternberg multinuclée au sein d'un fond riche en lymphocytes et en polynucléaires surtout les éosinophiles et d'histiocytes (Sous microscope optique ; G x40 ,Coloration HE).....	42
Figure 26: Résultats des immunomarquages au niveau des cellules tumorales.....	43
Figure 27: Résultat de l'immunomarquage EBV LMP1 au niveau des cellules tumorales.....	43
Figure 28: Marquage membranaire CD30 des cellules tumorales (Sous microscope optique ; G x40).....	44
Figure 29: Marquages membranaire (a droite) et paralogien (a gauche) du CD15 des cellules tumorales(Sous microscope optique ; G x40).....	44
Figure 30: Marquage membranaire EBV-LMP1 des cellules tumorales(a droite) et des lymphocytes B infectées (petites cellules), EBV latent (a gauche),(Sous microscope optique ; G x40)	45
Figure 31 : Marquage nucléaire EBER des cellules HRS (Sous microscope optique ; G x40).....	46

Figure 34: technique non contributive avec marquage EBER non spécifique (Sous microscope optique ; a gauche Gx10, a droite Gx40)46

LISTE DES TABLEAUX

Tableau I : Principales protéines de l'EBV.....	13
--	----

Introduction

Le lymphome hodgkinien (LH), est une hémopathie lymphoïde maligne (**Bonnet et Bernard, 2015**) ou un lymphome dont l'évolution est lente (**Lemée, 2014**), ce terme remplace celui de la maladie de Hodgkin utilisé dans l'ancienne classification de l'organisation mondiale de la santé (OMS 2001) des hémopathies (**Bonnet et Bernard, 2015**).

Il a été le premier syndrome lymphoprolifératif bien individualisé (**Brice, 2012**), caractérisé par une infiltration, le plus souvent ganglionnaire, par des cellules tumorales de Hodgkin (HRS) et de Reed-Sternberg (RS) minoritaires au sein d'un fond inflammatoire non tumoral réactionnel, riche en lymphocytes, plasmocytes, histiocytes et éosinophiles. La classification de l'OMS des tumeurs hématopoïétiques de 2008 et révisée en 2016 reconnaît deux entités clinicopathologiques de LH : Le LH classique et le LH nodulaire à prédominance lymphocytaire. Cette dernière entité, anciennement appelée paragranelome de Poppema et Lennert est considérée comme une forme rare. Les LH classiques sont classés en quatre sous-types morphologiques en fonction de la population cellulaire réactionnelle. Le LH scléro-nodulaire est la forme la plus fréquente : elle est identifiée dans 60 à 70 % des LH. Le LH à cellularité mixte regroupe environ 20 à 30 % des LH et constitue la forme la plus fréquemment rencontrée chez les patients immunodéprimés (**Hamdi et al, 2013**). Ce lymphome touche principalement le sujet jeune, avec un âge médian de 33 ans (**Bonnet et Bernard, 2015**).

Le développement du lymphome de Hodgkin peut être une conséquence de l'exposition à un agent infectieux, qui est le virus d'Epstein Barr (EBV) .L'EBV est un virus qui est très répandu dans la population , plus de 90 % des adultes l'ont rencontré au cours de leur vie, l'infection concerne les jeunes enfants et elle est totalement asymptomatique, il peut provoquer plusieurs maladies comme, la mononucléose infectieuse, lymphome de Burkitt, et éventuellement le lymphome de Hodgkin (**Kurth et al,2003**). Longtemps hypothétique dans cette pathologie, L'EBV a été documenté dans des études précédentes par la mise en évidence, chez environ 50 % de malades, des antigènes d'EBV dans les cellules tumorales, les cellules de Reed-Sternberg, au sein des tissus ganglionnaires atteints (**Cuervo ,2003**) . Avec un profil de latence de type II (expression restreinte des protéines EBNA1, LMP1 et LMP2) L'association est plus fréquente dans les formes à cellularité mixte (50-75 %) que dans les formes scléro-nodulaires (15-30 %) (**Depil et al ,2004**).

Les causes exactes de ce lymphome ne sont pas connues, peu de facteurs de risque susceptibles de favoriser la survenue d'un lymphome hodgkinien en plus de l'EBV, ont été identifiés, par exemple, les personnes atteintes par le VIH, ont plus de risque de développer un lymphome hodgkinien. Des interrogations existent également quand à un facteur héréditaire : certaines données semblent suggérer que les autres membres de la famille d'un patient atteint d'un lymphome hodgkinien ont légèrement plus de risque que la moyenne de le développer (**Institut national du cancer, 2014**).

Ce travail a pour but, d'une part, de chercher une éventuelle présence d'EBV dans les différents types de lymphome de Hodgkin, par immunohistochimie a la recherche de la protéine de latence LMP1, et une confirmation par hybridation *in situ* en détectant les transcrits non codants EBERs.,afin de montrer son incrimination ,et d'autre part, de chercher par une enquête génétique la possibilité de sa transmission entre générations.

Chapitre I :
Recherche bibliographique

I-Les lymphomes Hodgkiniens :

Le LH, anciennement appelé maladie de Hodgkin, fait partie des lymphomes B. Il se caractérise par une cellule néoplasique typique, la cellule Reed Sternberg, par un type d'évolution naturelle particulier, et plus important, par une excellente réponse au traitement, la plupart des patients pouvant être guéris (**Goldman et Schafer, 2013**).

L'origine infectieuse de cette maladie a été plusieurs fois suggérée depuis sa première description par Thomas Hodgkin en 1832. Cette hypothèse est basée à la fois sur des constatations épidémiologiques et certains aspects particuliers de sa présentation et de son évolution (**Solal-celigny et al, 1997**).

I-1-Historique :

Thomas Hodgkin avait observé chez six patients une augmentation indolore du volume des ganglions et de la rate, il en a décrit l'aspect macroscopique en 1832. Deux des six cas décrits par lui sont ce que nous appelons aujourd'hui lymphome de Hodgkin (LH) : c'est l'aspect microscopique ne s'est répandue qu'après 1860. Les cellules caractéristiques ont été décrites en détail par Carl Sternberg en 1898 et Dorothy Reed en 1902, c'est pourquoi elles portent aujourd'hui leur nom, cellules de Sternberg ou de Reed Sternberg (RS) (**Morère et al, 2011**).

I-2- Epidémiologie :

L'incidence du LH dans le monde varie considérablement. Les taux sont les plus élevés aux Etats-Unis, au Canada, en Suisse et au nord de l'Europe. Ils sont intermédiaires dans le sud et l'est de l'Europe, alors qu'ils sont faibles dans l'est de l'Asie. Aucune explication claire à cette variation d'incidence n'a été trouvée. Les facteurs hypothétiques en cause pourraient différer en fonction de l'âge d'apparition et dépendre du génotype d'EBV que l'on associe à l'affection.

Le LH survient le plus souvent chez les hommes et plus fréquemment chez les Blancs que les Afro-Américains et beaucoup moins dans les populations asiatiques (**Goldman et Schafer, 2013**).

- **Chez nous, en Algérie :**

Le nombre de nouveaux cas de LH est en nette progression depuis 2000 se stabilisant autour de 250 cas par an. Pour une période équivalente (1993-2002) 1723 cas du lymphome non hodgkinien ganglionnaires ont été rapportés (Boudjerra.N), ce qui place le LH (2309 cas en 10 ans) en nette prédominance par rapport aux LNH ganglionnaires dans notre pays.

L'incidence nationale telle que rapportée (0,734 cas pour 100 000 habitants) est inférieure à celle observée dans le monde (2-50cas pour 100 000 habitants chez l'homme et 1-2 cas pour la femme) ; elle est cependant supérieure à l'incidence rapportée au Maroc (0,40 cas pour 100 000 Hbts) et en Tunisie (estimée à 0,54 cas pour 100 000 Hbts).

Le LH occupe dans notre pays une place importante comparativement à nos voisins Marocains et Tunisiens (**Abad, 2009**).

I-3 – Etiopathogénie / Facteurs incriminés :

La cause de LH reste incertaine. Ce lymphome n'est pas associé à l'exposition aux rayonnements, à des produits chimiques ou à des agents biocides, il n'est pas plus fréquent parmi le personnel de santé ou chez sujets qui ont subi une amygdalectomie. Le principal suspect reste l'EBV, sur la base de données suggestives, mais qui ne constituent pas une preuve définitive (**Goldman et Schafer, 2013**).

I-4-physiopathologie :

Ce lymphome se développe à partir des cellules du tissu lymphoïde. C'est une prolifération, monoclonale tumorale de cellules du tissu lymphoïde d'origine B qui donne naissance aux cellules typiques de la maladie, les cellules de RS. Tous les organes du système lymphoïde, ganglions lymphatiques, rate, amygdales, tube digestif, poumon, peau, peuvent être atteints, d'emblée ou secondairement par la maladie (**Lefrère, 2008**).

I-4-1- La cellule de Hodgkin-Reed-Sternberg :

La cellule de RS / HRS est de très grande taille (50 µm), caractérisée par un noyau volumineux, irrégulier, souvent bi- ou polylobé, une chromatine fine, irrégulière, dispersée,

avec des plages claires. Les nucléoles sont volumineux et basophiles donnant un aspect en « masque de carnaval » ou en « oeil de hibou ». Le cytoplasme est assez étendu, d'une basophilie variable (**Salmeron, 2010**).

- **Immuno-phénotypage :**

La cellule de RS exprime des Ag habituellement présents dans les cellules lymphoïdes activées : le CD30 (Ki-1), le CD 25 (chaîne alpha du récepteur à l'Il 2), le CD71 (récepteur de la transferrine) et HLA-DR (1a). Les marqueurs myéloïdes ne sont habituellement pas détectés à l'exception du CD15 (Leu M1), retrouvé à la surface d'une grande proportion d'échantillons. La cellule de RS est souvent dépourvue de marqueurs lymphocytaires spécifiques de lignées. En effet, les marqueurs B (CD 20, Cd79a) ne sont exprimés que dans 20 à 30 % des cas et la cellule tumorale est presque constamment dépourvue d'Ig de surface. L'expression de marqueurs pan-T est retrouvée dans 15 % des LH classique mais il s'agit souvent d'une expression aberrante de marqueurs T, la cellule de RS ne dérivant réellement de la lignée T que dans 1 à 2 % des cas (mise en évidence de réarrangements des gènes du TCR γ) (**Salmeron, 2010**).

I-4-2- Origine de la cellule de RS :

L'immuno-phénotypage n'ayant pas permis de résoudre la question de l'origine de la cellule de RS, il a fallu recourir aux techniques de biologie moléculaire pour y parvenir.

Pour rappel :

- le réarrangement des gènes des Ig est un phénomène spécifique de la différenciation des LB.
- les mutations hypersomatiques modifient l'affinité du récepteur B vis-à-vis de son Ag . Elles ont lieu spécifiquement au sein des centres germinatifs. En cas de gain d'affinité, le lymphocyte poursuit sa maturation. En cas de mutation délétère, aboutissant à la non-production du récepteur B ou à un récepteur B insuffisamment affin, le lymphocyte est éliminé par apoptose.

Certains chercheurs, et notamment l'équipe de R. Küppers à Francfort, ont mis en évidence l'existence de ces réarrangements au sein de la cellule de RS, prouvant ainsi son identité B. En outre, l'analyse et le séquençage des gènes d'Ig réarrangés ont montré la présence de mutations hypersomatiques dans la majorité des cas de LH. Ceci suggère que le processus

oncogénique est intervenu au moment ou après le passage dans le centre germinatif **(Salmeron, 2010)**.

Ces mutations peuvent soit empêcher la fixation des facteurs transcriptionnels, soit rendre le réarrangement non fonctionnel, qui s'avère qu'il n'y a pas de transcrits d'Ig dans les cellules tumorales quel que soit le profil mutationnel. Cette absence de transcrits est due à une dérégulation des réseaux de facteurs de transcription. Il existe une perte globale du phénotype B de la cellule tumorale qui ne garde comme fonction lymphocytaire B que les fonctions de présentation d'Ag et les interactions avec les LT CD4+. En effet, il existe dans la cellule tumorale une diminution majeure ou une absence d'expression des facteurs transcriptionnels B des gènes des Ig comme OCT-2 et BOB-1, de PU-1 de PAX 5 et d'EBF1 qui a en outre un rôle dans la répression de différenciation T et myéloïde. Cette absence de fonction répressive, en plus de l'expression d'un facteur de transcription T comme NOTCH-1, explique probablement l'expression de marqueurs myéloïdes comme CD15, CSF1R (granulocytes), fascin, restin, TARC (cellules dendritiques) ou lymphoïdes T comme NOTCH-1, GATA-3 par les cellules de RS. De plus, NOTCH-1 inhibe la différenciation lymphocytaire B **(Brice, 2012)**.

Enfin, la cellule tumorale parvient à échapper à l'apoptose malgré l'absence quasi constante d'Ig de surface, absence qui, théoriquement, selon le principe de sélection positive, conduit à la mort cellulaire. La cellule de RS est donc issue d'un LB mature du centre germinatif, anormalement rescapé de l'apoptose (et ayant perdu secondairement son phénotype B) **(Salmeron, 2010)**.

I-4-3- Le Rôle de micro-environnement dans la survie de la cellule tumorale RS :

Les cellules de RS ne représentent qu'une minorité du contingent cellulaire pathologique : 99% du tissu lymphomateux est constitué d'un infiltrat pseudo-inflammatoire composé majoritairement de lymphocytes T CD4 mais aussi de fibroblastes, de cellules endothéliales, de cellules musculaires lisses, d'éosinophiles, de macrophages et de plasmocytes **(Figure1)**. Il existe un échange réciproque entre la cellule tumorale et son micro-environnement cellulaire grâce à l'expression et la sécrétion, par les deux parties, de cytokines et de leurs récepteurs membranaires. Cette interaction joue probablement un rôle primordial dans la lymphomagenèse, en participant au maintien du phénotype antiapoptotique

et prolifératif .

- **Un environnement favorable :**

Les cytokines retrouvées dans le milieu environnant jouent un double rôle. Elles assurent la prolifération des cellules de RS (IL13) et le recrutement des cellules immunitaires avoisinantes qui créent un environnement protecteur. Ce dernier rôle est assuré par la sécrétion de chimiokines (cytokines spécialisées dans la migration des leucocytes) par la cellule de RS et les cellules avoisinantes (TARC et MDC entraînent l'afflux de Th2 CD4 tandis que l'éotaxine attire les éosinophiles). Classiquement, il avait été admis que la majorité de l'infiltrat lymphocytaire était essentiellement composée de Th2 CD4.

Plus récemment, et notamment depuis la découverte et la caractérisation des LT régulateurs (T regs), il semblerait que cette sous-population immuno-modulatrice constitue la majeure partie de l'infiltrat lymphocytaire. Les T regs seraient capables d'inhiber la fonction des LT cytotoxiques par la sécrétion du TGF β et de l'IL10 d'une part, et par contacts de cellule à cellule d'autre part, créant ainsi un environnement profondément immunosuppresseur, favorisant la survie du clone tumoral. La cellule de RS est également sécrétrice de facteurs solubles qui induisent une réorganisation du stroma tumoral. Ainsi, VEGF, TGF β , HGF stimulent la néoangiogenèse, favorable au développement et au maintien de la tumeur.

- **Stimulation des voies de signalisation précédemment décrites :**

Les cellules environnantes influencent favorablement le phénotype tumoral en sécrétant des signaux de survie. Par exemple, les cellules musculaires lisses, les éosinophiles et les LT CD4 sécrètent les ligands respectifs des récepteurs transmembranaires NOTCH1, CD30 et CD40 activant ainsi la voie NF κ B. La cellule de RS est, en outre, dotée d'une capacité d'autostimulation par le biais d'une activation autocrine. C'est le cas de la sécrétion simultanée de l'IL13 et de son récepteur qui stimulent la voie STAT6 entraînant un signal prolifératif. Il en va de même pour le récepteur NOTCH1 et son ligand Jagged1, et pour le couple PDGFRA/PDGFA (Salmeron, 2010).

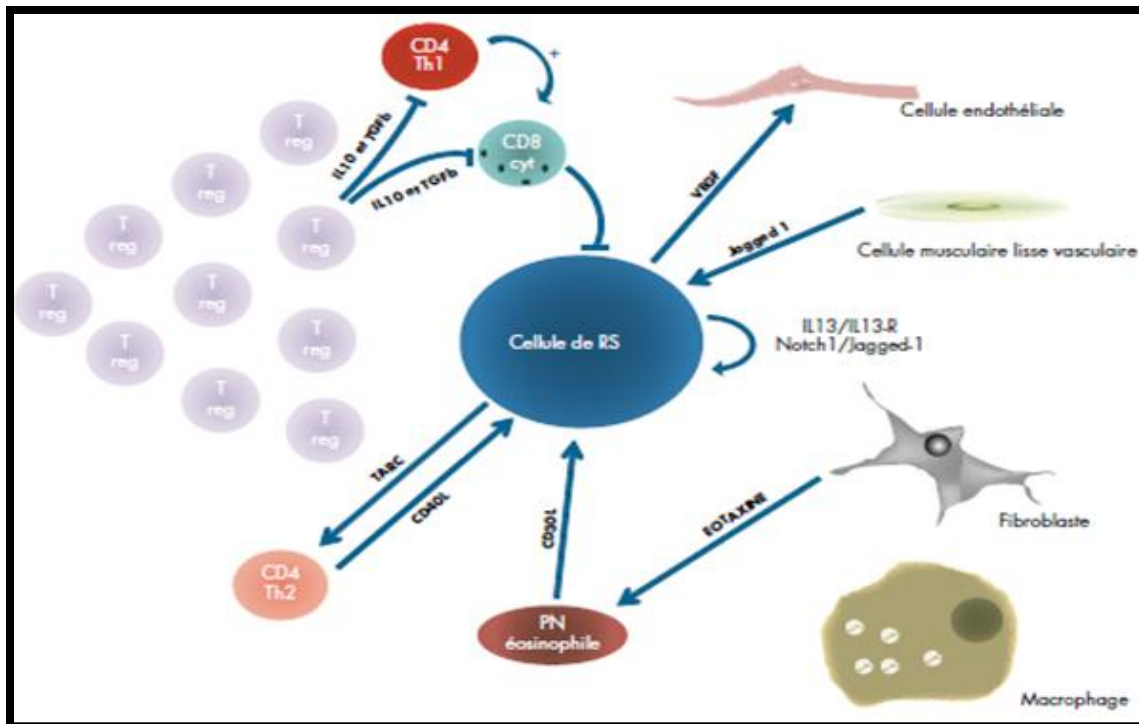


Figure 1 :Micro-environnement de la cellule RS (Salmeron, 2010)

I-5-Anomalies génétiques dans le LHc :

Les cellules tumorales du LH montrent des signes d'instabilité chromosomique avec une fréquente hyperploïdie et une variabilité intraclonale. Les amplifications les plus fréquentes impliquent les régions 17q, 2p, 12q, 17p, 22q, 9p, 14q, 16p et les délétions impliquent 13q, 6q, 11q, 4q. Il est intéressant de noter que l'amplification de la région 2p a été corrélée à une amplification de REL (membre de la famille NFκB) pouvant expliquer l'activation de NFκB dans ces cellules, de même que l'amplification 9p a pu être montrée comme associée à une amplification du gène JAK2 impliqué dans la transduction de signaux de cytokines et de PDL1/PDL2 dans la diminution de l'immunosurveillance.

Il a été montré par séquençage à haut débit une translocation impliquant un gène régulant l'expression du CMH de classe II (CIITA) dans 15% des cas, soulignant l'importance de l'interaction tumeur/microenvironnement dans cette maladie (Brice, 2012).

I-6- Classification de LH :

La classification du LH est basée sur la classification OMS 2008 des hémopathies malignes. C'est la nature de la réaction tissulaire, notamment la présence de fibrose, et

cellulaire qui est à l'origine de la classification de l'OMS qui a subdivisé les LH en deux types principaux :

1) Le LH classique, le plus fréquent, dont on décrit 4 sous-types :
Quatre variétés sont décrites, en fonction des anomalies retrouvées au microscope.

- La forme riche en lymphocytes qui est rare et ne représente que 5 % des cas. Il s'agit d'un fond ou microenvironnement riche en petits lymphocytes. L'architecture est le plus souvent nodulaire, rarement diffuse.

- La forme scléro-nodulaire, la plus fréquente, 70 % des cas. Son aspect est celui d'un épaissement fibreux de la capsule entourant les ganglions, un parenchyme nodulaire, une fibrose annulaire ou en bandes épaisses. Les cellules tumorales ont un cytoplasme abondant donnant un aspect lacunaire.

- La forme à cellularité mixte et se rencontre dans environ 20 à 25 % des cas. Au microscope, la population cellulaire est abondante, formée de cellules lymphoïdes, de plasmocytes, d'histiocytes, de polynucléaires avec des amas de cellules épithélioïdes, dont l'ensemble constitue un granulome. Il n'existe pas de sclérose.

- La forme à déplétion lymphocytaire et c'est la forme la plus rare, moins de 5 % cas et longtemps confondue avec les lymphomes car elle est très riche en cellules tumorales.

2) Le LH nodulaire à prédominance lymphocytaire LHNPL, parfois appelé paragranelome de Poppema et Lennert du nom de deux médecins allemands qui l'ont décrit, correspondant à 5-10 % des cas (**Brice, 2012**).

II-Le virus Epstein –Barr (EBV) :

De nombreuses données épidémiologiques et sérologiques indiquent que l'EBV est un facteur étiologique possible de LH (**Info cancer, 2015**).

II-1-Historique :

Dans les années 1950, un chirurgien anglais, Denis Burkitt, décrit des cas de lymphomes à localisation maxillaire chez les enfants d'Afrique de l'Est. Il remarque que ce type de

lymphome est plus fréquent dans les régions d’Afrique équatoriale où sévit le paludisme, ce qui lui a permis de suggérer finalement l’étiologie infectieuse de ces lymphomes. En 1954 Epstein et Barr arrivent à mettre en évidence cet agent infectieux dans des cellules tumorales de lymphome de Burkitt africain qui est le virus gammaherpesvirus humain ,l’EBV (Seigneurin, 2006).

II-2- Propriétés du virus :

L’EBV est l’un des virus humains qui a le plus fort pouvoir oncogène (Huraux et al, 2003). En effet la propriété biologique fondamentale de l’EBV est sa capacité in vitro et in vivo a faire proliférer les LB (Germi et al, 2011).

II-2-1-Classification et structure :

L’EBV appartient a la famille des *Herpesviridae*,a la sous-famille des *Gammaherpesvirinae*, au genre des *lymphocryptovirus* (Francés et al, 2008) et a l’espèce *Human herpes virus 4* (HHV- 4 ou EBV).

L’EBV est un virus à ADN, de grande taille (150 à 200 nm) (Grosjean et al, 2009), composé d’une capsidie icosaédrique entourée d’une enveloppe dérivée des membranes cellulaires dans laquelle sont insérées des glycoprotéines virales. Cette structure externe rend le virus fragile dans le milieu extérieur (voir figure 2).

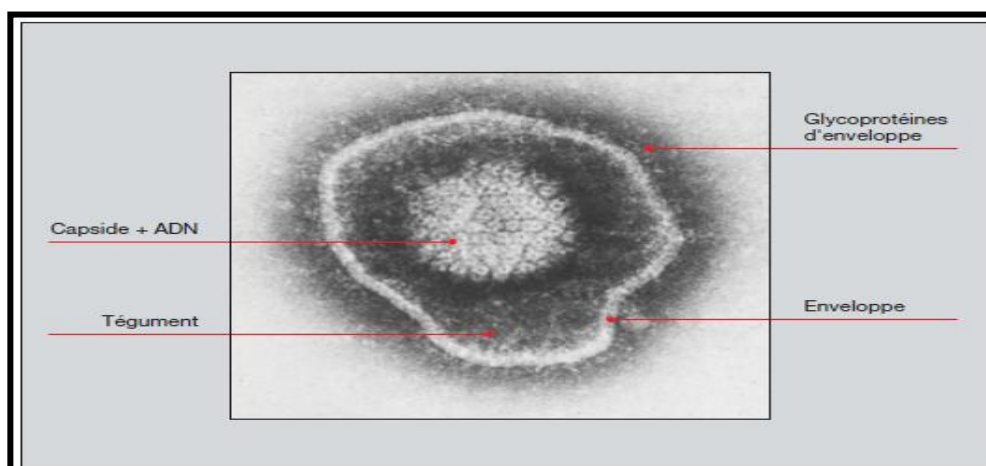


Figure 2 :Structure du virus en microscopie électronique (coloration négative) (Seigneurin, 2006).

Les deux sous types de l'EBV, EBV-1 et EBV-2 se diffèrent dans la séquence génétique, la distribution géographique, et les propriétés biologiques. Les séquences génétiques se diffèrent principalement dans les gènes de latence EBER1, EBER2, EBNA2, EBNA3, et EBNA-LP. L'EBV-1 est le type le plus dominant dans le monde, tandis que l'EBV-2 est souvent présent dans l'Afrique équatorial, la nouvelle Guinée et chez les patients immunodéprimés. **(Hundnall, 2014)**

II-2-2-Le génome de l'EBV :

Le génome est une molécule d'ADN double-brin d'un peu plus de 172 000 paires de bases, à une capacité de codage de 100 à 150 protéines **(Bedossa, 2006)**. Il est organisé en cinq domaines uniques, U 1 à U5, séparés par des séquences internes, IR, répétées en tandem. Les séquences répétées terminales TR, situées à chaque extrémité du génome permettent la circularisation sous forme d'épisome. Le virus possède une (OriP) et deux (Orilyt) homologues situées dans les séquences DR et DL. L'initiation de la transcription des gènes des EBNA peut s'effectuer à partir de trois promoteurs Cp, Wp ou Fp **(Voir figure3)**.

Pendant la phase de latence, le génome de l'EBV est maintenu sous forme épisomique extrachromosomique, fixé à la membrane nucléaire par une séquence intéressant OriP. Le génome viral peut s'intégrer dans l'ADN cellulaire de certaines lignées infectées de façon latente et coexister avec l'ADN épisomique. Le plus souvent, l'intégration survient par l'intermédiaire des séquences TR, et l'ADN viral est intégré dans sa totalité. Dans certains cas, l'intégration aboutit à une délétion intéressant la séquence OriP. **(Marelle et al, 1993)**

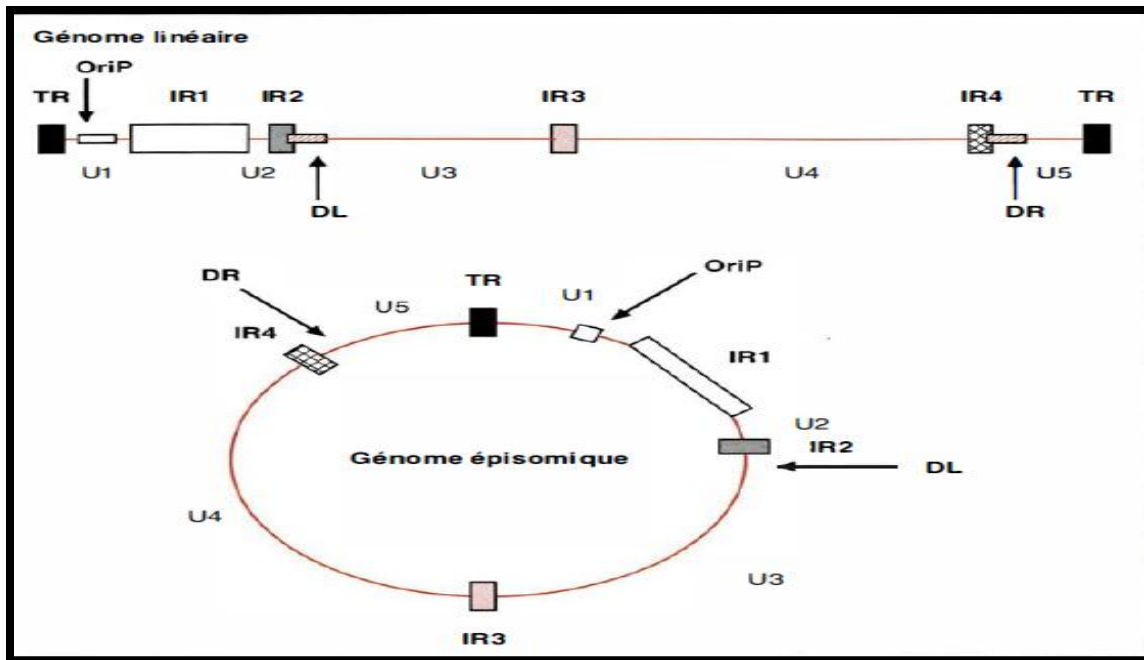


Figure 3: Représentation schématique d'organisation du génome de l'EBV sous forme linéaire et épisomique (172 kb) : TR : séquences terminales répétées ; U 1 à U5 : séquences uniques ; IR : séquences internes répétées ; OriP : origine de répliation latente ; DL et DR : séquences homologues contenant les origines de répliation lytique Orilyt. (Marelle et al , 1993)

II-2-3-Gènes et protéines de l'EBV :

Le génome de l'EBV code un grand nombre de protéines virales dont certaines sont dotées de propriétés antigéniques. Le tableau I présente les principales protéines virales et leurs fonctions (Raphaël et Feuillard, 2000)

Tableau I : Principales protéines de l'EBV .(Raphaël et Feuillard ,2000)

Dénomination	Nombre	Localisation	Fonctions
EBNA (Epstein-Barr nuclear antigens)	6*	Noyau	Latence et immortalisation
LMP (latency membrane proteins)	3**	Membrane plasmique	Latence et immortalisation
ZEBRA (immediate early antigen ou IEA)	1	Noyau	Passage de l'état latent au cycle lytique
Protéines non structurales précoces (Early antigens ou EA)	4	Noyau/ cytoplasme	Enzymes impliquées dans la réplication virale cours du cycle lytique (thymidine kinase,ADN polymérase)
Protéines structurales tardives -VCA (viral capsid antigen)	1	Noyau/ cytoplasme	Principale protéine structurale de la capside
- LMA (late membrane antigens)	2	Membrane plasmique	Glycoprotéines de surface sur l'enveloppe, cibles d'anticorps neutralisants (l'une d'entre elles est responsable de l'attachement spécifique au récepteur CD21)

* nommées EBNA-1, 2,3A, 3B, 3C, LP
** nommées LMP-1 , 2A, 2B

II-2-3-1- Expression des gènes du cycle de latences :

Dans certaines lignées cellulaires obtenues à partir de LB de porteurs sains du virus, un nombre restreint de gènes sont exprimés : six protéines nucléaires EBNA 1, 2 ,3A, 3B, L P et 3 C, trois protéines membranaires LMP 1, 2A/2 B, et deux ARN nucléaires non codants EBER 1 et 2.

Les EBER sont abondamment exprimés à raison de 107 copies par cellule ; ils joueraient un rôle dans la maturation des ARN viraux. La protéine EBNA 1 est impliquée dans le maintien de l' EBV sous forme épisomique et dans la réplication de l'épisome. EBNA2 et LMP auraient un rôle fondamental dans la transformation et l' immortalisation cellulaire. EBNA2 induit l'expression des marqueurs lymphocytaires B CD21 et CD23, et transactive le gène codant pour LMP . LMP aurait des fonctions similaires à celles d'un oncogène Dans les cellules lymphoïdes, LMP induit l'expression du proto-oncogène cellulaire bcl2, protégeant les cellules infectées de l'apoptose (Marelle et al, 1993).

II-2-3-2-Protéines des cycles réplcatif et productif lytique :

L'activation de la réplication de l'EBV, spontanée ou chimique, induit la transcription du gène codant pour la protéine transactivatrice ZEBRA. ZEBRA induit l'expression des gènes précoces de l'EBV, la réplication de l'ADN viral et l'expression des gènes tardifs. Des facteurs additifs de l'hôte et d'autres facteurs viraux sont nécessaires pour l'entrée de l'ADN viral en phase de synthèse, l'expression des gènes tardifs et la maturation du virus (Marelle et al, 1993) (voir figure 4).

L'entrée dans le cycle réplcatif est déclenchée par l'expression de la protéine ZEBRA, codée par le gène BZLF1. Le promoteur PZ du gène BZLF1 possède des motifs API identiques à ceux des proto-oncogènes cellulaires c-jun et c-jos. ZEBRA active la transcription de son propre gène et celle du gène BRLF1 qui code pour la protéine R. Ces protéines liées à l'ADN induisent l'expression des gènes EA, puis la réplication du génome viral, linéarisé à partir des séquences Ori_{lyt}, et une cascade d'événements aboutissant à la production de virions. Des protéines tardives interagissant avec ZEBRA, les ZAP, pourraient inhiber l'action de ZEBRA sur les gènes précoces et tardifs de l'EBV, et jouer un rôle important dans l'établissement de la latence après l'infection des lymphocytes. Après la réplication du génome viral, les Ag tardifs MA, VCA et BCRF1 sont exprimés BCRF1 possède 70 % d'homologie avec l'Il 10 et inhibe la synthèse d'interféron γ normalement impliqué dans les défenses immunitaires antivirales (Marelle et al, 1993).

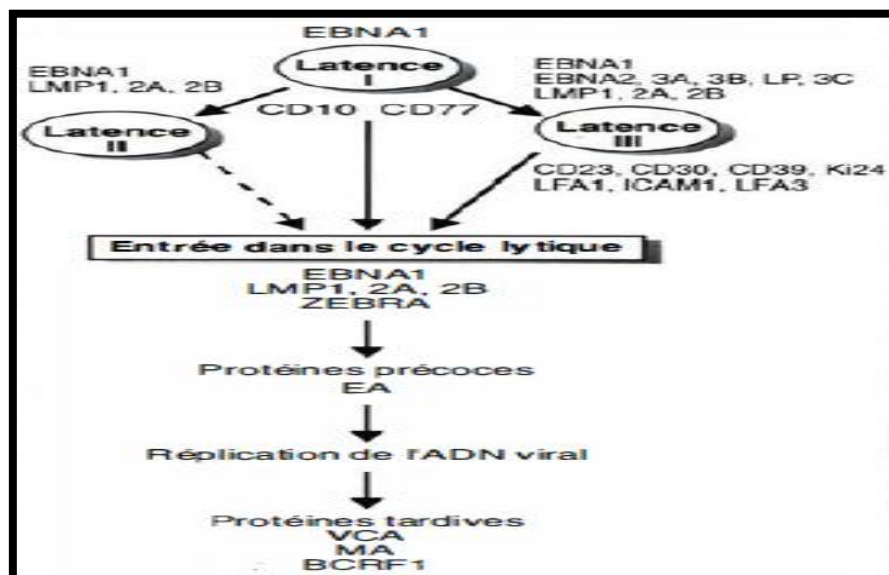


Figure 4 : Les trois voies de l'activation du cycle lytique de l'EBV à partir de la forme de latence I dans les lymphocytes B (Marelle et al, 1993).

II-2-4- Tropisme de l'EBV :

L'EBV, herpesvirus à tropisme double pour les cellules lymphoïdes et épithéliales (**Stephan et al, 2000**) mais dans certaines circonstances il est capable d'infecter d'autres types cellulaires tels que les cellules T, les cellules NK, les cellules musculaires lisses et potentiellement les monocytes (**Thierry, 2014**).

- **L'EBV dans les lymphocytes B :**

Dans le modèle actuel, soutenu notamment par Thorley-Lawson, l'EBV infecte initialement les LB naïfs présents dans les tissus ganglionnaires de l'anneau deWaldeyer. La mise en route d'un programme de latence de type III (growth program) conduit à l'activation de ces cellules qui se transforment en lymphoblastes, similaires sur le plan morphologique et phénotypique à ceux observés après activation de LB naïfs par un Ag. Ces lymphoblastes se différencient en cellules B mémoire suite à la mise en place d'une latence de type II par le virus (default program). L'expression des protéines LMP1 et LMP2 jouent le rôle des signaux de survie normalement procurés par l'interaction avec l'Ag et par les LT h, ce qui permet aux cellules B infectées par l'EBV de se différencier en cellules B mémoire au sein des centres germinatifs en l'absence de stimulation antigénique. Ces cellules B mémoire infectées par l'EBV circulent ensuite dans le sang périphérique. Elles n'expriment alors plus aucune protéine virale (latency program) sauf si elles sont amenées à effectuer une division cellulaire dans le cadre de processus de régulation homéostatique (maintien d'un compartiment mémoire stable). Dans ce cas, la cellule exprime EBNA1 de manière isolée afin de permettre la réplication virale. Enfin, un certain nombre de ces cellules B mémoire infectées par l'EBV se différencieront en plasmocytes retrouvés dans l'anneau de Waldeyer. Cette différenciation terminale s'accompagne d'une réactivation virale avec mise en route d'un cycle lytique permettant la libération de virus et la transmission à un nouvel hôte, ce qui clôt le cycle. De manière finaliste, l'EBV utilise des voies de différenciation cellulaire normales pour se maintenir et se propager. Les cellules B mémoire à vie longue constituent une niche idéale où le virus peut persister à longs termes. De plus, l'absence d'expression de protéine virale lui permet de rester caché au système immunitaire (**Depil et al, 2004**) (**figure 5**).

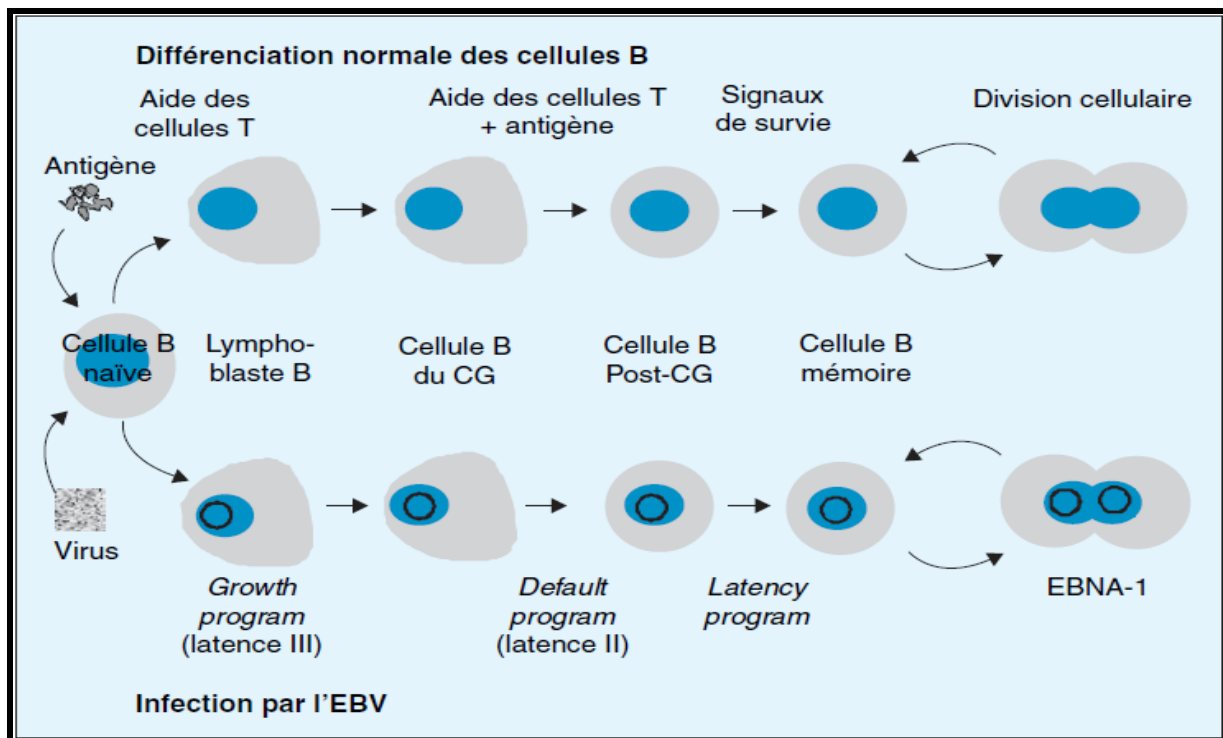


Figure 5 : Stratégie utilisée par l'EBV pour se maintenir à l'état latent dans les lymphocytes B mémoire

Ce schéma présente le modèle décrit par Thorley-Lawson, dans lequel l'EBV utilise les voies de différenciation normales des LB pour persister de manière latente dans les LB mémoire. Le processus de différenciation LB associé à la mise en place des programmes viraux est mis en parallèle avec le processus d'activation observé après stimulation antigénique. CG : centre germinatif (Depil *et al*, 2004).

III-Implication de l'EBV dans la pathogénie de LH :

Les nombreuses études sur l'expression des gènes de latence de l'EBV dans le LH ont toutes confirmé la notion de latence de type I ou II suggérant un rôle actif de l'EBV dans la pathogénie du LH associé à l'EBV. (Raphaël et Feuillard, 2000)

III-1- Le rôle des protéines de latence et de réplication de l'EBV dans le LH :

L'infection par l'EBV pourrait intervenir dans la survie anormale des cellules LB en l'absence des signaux fournis par la reconnaissance de l'Ag. Une intégration clonale du virus dans les cellules tumorales a ainsi été démontrée dans les formes associées à l'EBV. Les protéines de latence de type II fourniraient différents signaux oncogéniques et anti-

apoptotiques. LMP1 est un oncogène majeur de l'EBV. Il s'agit d'une molécule membranaire active de manière constitutive, capable d'induire les voies d'activation cellulaire NFκB, MAP-kinases (JNK et p38) et JAK/STAT. L'activation de NFκB est retrouvée de manière constante dans les cellules de RS (**Depil et al ,2004**). De plus, la présence de LMP1 est associée à la multinucléarité des cellules lymphoïdes (**Raphaël et Feuillard ,2000**). Elle interviendrait dans la prolifération cellulaire et l'inhibition de l'apoptose. Le LMP1 activerait également différents gènes anti-apoptotiques dont bcl-2. Le LMP2 pourrait fournir des signaux de survie mimant l'activation du BCR en recrutant des tyrosine-kinases par l'intermédiaire des motifs ITAM présents dans son domaine intra-cytoplasmique. L'EBNA1 est une protéine essentielle à la réplication virale et au maintien du virus sous sa forme épisomale, dépourvue d'activité oncogénique in vitro. L'EBNA1 pourrait néanmoins posséder des propriétés oncogéniques in vivo, comme le suggère le développement de lymphome induit par l'expression d'EBNA1 dans un modèle de souris transgénique (**Depil et al ,2004**).

Moins de 10 % des cas de LH expriment la protéine initiatrice du cycle lytique ZEBRA avec un signal intense dans de rares cellules de RS, témoignant de l'entrée de l'EBV dans le cycle lytique. En revanche, l'expression des protéines tardives du cycle lytique n'a pas été détectée sauf dans de très rares cas, le cycle lytique très rarement engagé est le plus souvent incomplet (**Raphaël et Feuillard, 2000**). L'expression de cette protéine a été clairement mise en évidence dans les cellules de RS et de HRS par les techniques IHC et l'utilisation d'Ac monoclonaux (**Raphaël et Feuillard ,2000**).

III-2-Implication de l'EBV dans les diverses formes de LH :

L'implication de l'EBV dans le LH varie avec le type histopathologique, l'âge des sujets, l'existence d'une pathologie associée (sida ou autres déficits immunitaires) et les régions du globe. Chez les sujets non immunodéprimés, tous types confondus, l'incidence de détection de l'EBV dans le LH est de l'ordre de 30 à 40% des cas. Les taux de détection les plus élevés s'observent dans les formes à cellularité mixte (50 à 75% des cas). Dans les formes scléro-nodulaires, les résultats varient de 10% à 30% des cas. L'absence de détection du virus dans les formes LHNPL renforce la conception actuelle qui tend à faire de ces lésions une entité particulière sortant du cadre nosologique de LH. Dans les LH survenant au cours du sida, les taux de détection de l'EBV sont proches de 100% dans plusieurs séries. Alors que l'EBV de type A (ou type1), réputé plus oncogène, prédomine chez les sujets non immunodéprimés, le

virus de type B (ou type 2) s'observe plus fréquemment chez les patients immunodéprimés. (Brousset *et al*, 1995).

IV- La détection de l'EBV par hybridation in situ :

IV-3-1-Définition d'HIS :

Les méthodes in situ sont conçues pour révéler les domaines spatiaux d'expression génétique dans un spécimen. Si les spécimens sont assez petits et assez transparents, les procédures in situ peuvent être effectuées sur des échantillons entiers, ce qui présente l'avantage d'une visualisation tridimensionnelle rapide et claire. Si les spécimens sont trop grands ou opaques, les méthodes in situ peuvent être utilisées sur des coupes, qui pour un travail embryologique, seront en général plutôt des séries de coupe (Slack, 2004)

L'HIS sur coupe tissulaire correspond à la détection microscopique d'un signal d'hybridation entre une sonde marquée et un acide nucléique, ADN ou ARN. L'HIS est la seule technique de biologie permettant de localiser les acides nucléiques dans les différents territoires d'un tissu ou d'une cellule et de préciser le type de la cellule contenant le signal. Par exemple, la technique la plus performante de détection de l'EBV dans le LH est l'HIS. Elle seule permet d'affirmer la présence d'EBV dans les cellules tumorales. Les techniques de PCR réalisées à partir d'extractions d'acides nucléiques sont en apparence plus sensibles, mais les résultats obtenus par cette méthode ne sont pas significatifs, parce qu'ils détectent la présence, à l'état normal, de quelques lymphocytes non tumoraux non infectés par EBV (Tagu et Moussard, 2003).

IV-3-2-Différentes types d'HIS : FISH, CISH, SISH

- **FISH :**

Dans les techniques FISH, une séquence nucléotidique complémentaire de la séquence à étudier, marquée par un fluorochrome et servant de sonde, s'hybride spécifiquement avec la séquence cible dont elle permet la détection au microscope à fluorescence.

- **CISH :**

La CISH correspond à une modification de la méthodologie de la FISH (**Leroy et De Cremoux, 2014**) (plus simple et pratique que la FISH), a été développée et affinée depuis l'an 2000 (**CytoTest, 2013**).

Les méthodes de CISH peuvent se faire sur des suspensions cellulaires, des empreintes, ou des coupes congelées ou déparaffinées, et permettent d'identifier dans chaque cellule la présence et le nombre de copie d'un segment chromosomique donné et d'apprécier une éventuelle co-localisation. Elles sont de plus en plus utilisées pour rechercher des anomalies chromosomiques variées (polysomies, monosomies), ou géniques (délétions ou amplifications de certains gènes, translocation), anomalies qui peuvent avoir dans certaines tumeurs une valeur diagnostique ou pronostique (**Emile et al, 2012**).

Son originalité tient au mode de révélation (**Leroy et De Cremoux, 2014**) dont, les sondes sont marquées avec un fragment antigénique et détectées par des Ac conjugués à une enzyme, la HRP ou l'AP, qui catalyse les réactions des substrats chromogènes. Les chromogènes résultants précipitent sur le site cible de la sonde et peut être détectée sous un microscope avec un champ lumineux standard. (**CytoTest, 2013**).

Il existe deux types de tests CISH : le test standard qui utilise une seule sonde et le test double couleur utilisant deux sondes(en général une sonde centromérique et une sonde correspondant au gène d'intérêt) (**Leroy et De Cremoux, 2014**).

La technique de la CISH est la méthode de choix qui cible l'EBER utilisés par les laboratoires, car elle convient avec le travail habituel, effectué sur un tissu FFPE, et permet l'observation directe de la présence du virus dans les cellules d'intérêt (**Ola Idowu et al, 2015**)

- **SISH :**

La SISH correspond à une autre modification de la technique de FISH. La révélation de la SISH se fait via une technique de peroxydase avec catalyse d'ions d'argent en argent métallique, entraînant le dépôt de nanoparticules de métal au niveau du site d'hybridation de la sonde spécifique .Cette technique est entièrement automatisée, ce qui diminue le risque de variations technique et d'erreurs. Une sonde marquée au DNP se lie a la cible ADN.Un Ac monoclonal de lapin anti-DNP est utilisé pour créer des sites de liaison pour l'Ac de chèvre anti-lapin couplé a un multimère d'HRP qui est la base du système de détection sans biotine Des réactifs argentiques sont ajoutés, conduisant aux dépôts de nanoparticules de métal permettant la visualisation du signal d'HIS.

Un système d'analyse d'image avec quantification des signaux est disponible (**Leroy et De Cremoux, 2014**).

IV-3-3- HIS et EBV :

Les premiers essais réussis dans la localisation du virus dans des coupes tissulaires, ont été réalisées à l'aide d'HIS pour :

1) la détection de l'ADN de l'EBV :

Pour cela les chercheurs ont utilisé le fragment Bam HI W cloné du génome du l'EBV en tant que sonde. Étant donné que ce fragment est répété jusqu'à 10 à 15 fois dans le génome viral, cette approche permettait une plus grande sensibilité que l'utilisation de sondes de gène à copie unique. Ces sondes peuvent être marquées avec divers molécules radioactifs (par exemple, S³⁵, P³³, H³) et des molécules non radioactif (par exemple, la biotine, la DIG, bromodésoxyuridine, fluorescéine isothiocyanate). Les sondes marquées S³⁵ se sont avérés être toujours plus sensibles que les sondes non radioactives. Pour des raisons pratiques, cela signifie que si l'infection à EBV latente doit être détectée par HIS d'ADN, les sondes marquées S³⁵ doivent être utilisés. Des sondes d'ADN non radioactifs sont suffisantes pour la détection d'une infection à EBV réplicatif, par exemple, dans la leucoplasie orale chevelue, cependant, la réplication virale est plus appropriée et plus commodément mise en évidence par des tests simples immunohistologiques.

2) La détection de l'ARN de l' EBV :

Au cours des dernières années, la méthode standard pour la détection de l' EBV est celle faite à partir de petits ARNs codé par l'EBV (EBER), EBER-1 et -2 (**Darby et Hewitson, 2006**).

EBER1 et EBER2, sont non-polyadénylé et ne sont donc pas traduit en protéine; ils fonctionnent pour inhiber le maintien de l'EBV sous forme épisomique et l'apoptose.

Ces deux transcrits appelées EBER, sont exprimées à des niveaux élevés (environ un million d'exemplaires par cellule infectée) qui sont considérés comme étant le meilleur marqueur naturelle de l'infection latente. L'HIS cible l'un ou les deux EBERs, ce qui permet de déterminé si la tumeur biopsié est reliée a l'EBV.

Les systèmes commerciaux pour HIS EBER facilite la mise en œuvre dans les laboratoires cliniques (par exemple, Ventana [Tucson, AZ], Leica [Bannockburn, IL], Dako [Glostrup, Danemark], Invitrogen [Carlsbad, CA], Biogenex [San Ramon, CA]) (Margaret *et al*, 2008)

IV-4- Comparaison des techniques de Southern, HIS et PCR dans le « LH , EBV+ »

En 1987, en utilisant la technique de Southern blotting, Weiss et al ont pour la première fois mis en évidence l'EBV dans des ganglions atteints de LH. À l'instar du NPC, un seul type d'EBV (virus clonal) semblait présent dans les lésions hodgkiniennes. Ceci suggérait que l'infection des cellules de RS précédait leur expansion clonale. La nécessité d'un contrôle morphologique a conduit plusieurs équipes à développer des techniques d'HIS à l'aide de sondes spécifiques du génome viral. Grâce à une sonde ADN de type BamHI W, le groupe de Weiss a pu montrer que le génome viral se localisait bien dans les cellules de RS. Un raffinement morphologique a été apporté par l'utilisation de sondes non radioactives et la réalisation de double marquage (HIS+ immunomarquage). Il a ainsi été démontré que le génome d'EBV était en apparence restreint aux cellules de RS (CD30+/CD15+) . Par la suite, l'application de la PCR à la détection d'EBV dans le LH a fourni des pourcentages de cas positifs sensiblement supérieurs (50 à 80% selon les séries) à ceux que laissaient prévoir les investigations réalisées en Southern blotting et en HIS. Cette forte incidence est actuellement expliquée par l'amplification de génomes viraux issus des petits "lymphocytes réservoirs" (10-6 LB circulants), non détectables par les techniques d'HIS avec des sondes ADN ou les techniques d'HIC avec des Ac anti-LMP1, mais facilement visualisés en utilisant l'HIS avec les oligonucléotides ou les ribosondes EBER . La détection des petits transcrits EBER par HIS est actuellement la technique de choix pour détecter le virus d'EBV dans les tissus humains. En effet, les ARN EBER1/2 représentent une cible de choix en raison de leur abondance dans les cellules infectées et de leur résistance aux fixateurs usuels qui permettent leur détection sur des coupes histologiques de routine avec possibilité d'études rétrospectives sur des blocs de tissus archivés. L'HIS avec les oligonucléotides EBER permet en outre de détecter les petits lymphocytes réservoirs souvent retrouvés dans les échantillons tissulaires, en particulier dans le LH. Ainsi, quatre types de lésions peuvent être distingués:

- 1) le LH EBV+ dans lesquelles le virus est uniquement présent dans les cellules de RS.
- 2) celles où il intéresse à la fois les cellules de RS et de rares lymphocytes réservoirs.

3) celles où seuls ces derniers sont positifs .

4) le LH où ni les cellules tumorales ni les lymphocytes environnants ne sont positifs pour l'EBV (**Brousset et al, 1995**).

Chapitre II :

Matériel et méthodes

Objectifs :

L'objectif de notre travail, est de montrer l'incrimination d'EBV dans le LH après avoir déterminé au sein d'un échantillon de patients ses caractéristiques (l'âge, le sexe, le type, la topographie ganglionnaire) et ses critères de diagnostic histologique et immunohistochimique, premièrement par la méthode d'immunohistochimie, par l'utilisation de marqueur EBV-LMP1 et deuxièmement pour confirmer sa présence ou pas par la technique d'hybridation in situ CISH par l'utilisation de la sonde EBER et déterminer la différence ainsi que les critères d'interprétation des différents résultats.

De chercher par une enquête génétique familiale si la maladie est transmissible ou pas et son mode de transmission.

- Sélection des cas et données cliniques :

Notre travail porte sur une étude de différents types de LH diagnostiqués et recrutés chez 66 patients dans la période d'octobre 2014 jusqu'à juin 2016, sans prendre en considération une tranche d'âge précise.

Parmi ces cas, il y a ceux qui proviennent de l'hôpital du CHU de Frantz Fanon (Blida) et ceux qui sont des cas qui proviennent de l'extérieur (d'autres hôpitaux, cliniques privées). Ces derniers ont été adressés au service d'anatomie pathologique de l'hôpital Frantz Fanon Blida pour le diagnostic ou pour une relecture. Chaque cas est référencié et archivé, avec des éléments d'identification du patient (Nom, prénom, âge, sexe..), le lieu de prise en charge, le diagnostic de certitude établi : morphologique et immunohistochimique (selon la classification OMS 2008).

L'étude morphologique a été refaite pour tous les cas afin de revoir et préciser le diagnostic et de déterminer le type dans certains cas.

I- Etude morphologique et immunophénotypique et moléculaire :

• Prélèvements :

Les prélèvements adressés ont consisté en :

- des biopsies exérèse ganglionnaire : 25 cas
- des biopsies ou microbiopsies ganglionnaires : 35 cas.

I-1- Etude morphologique :

L'étude morphologique est faite à partir de la méthode de coloration des tissus à HE : une coloration qui permet de visualiser la morphologie des cellules (noyau et cytoplasme) à fin de déterminer leur répartition selon le type histologique, architecture et structure ce qui permet de déterminer à la fin le diagnostic de LH.

La réalisation de cette étude, étapes par étapes a été faite dans le laboratoire d'anatomie pathologique compartiment ou section technique d'HE: les étapes de traitement de ces échantillons tissulaires sont les suivantes :

- **Fixation :**

Ces biopsies ont été fixées grâce à un agent fixateur, le formol qui préserve les tissus en immobilisant leurs structures, inhibe l'autolyse tissulaire et donc leur altération et entraîne un durcissement des tissus permettant la confection des coupes. la fixation est effectuée par immersion des échantillons durant 48h, dans du formol à 10 %.

Mensuration, description des pièces et la mise en cassettes :

C'est l'étape de la macroscopie. Le diagnostic du LH exige toujours une biopsie ou biopsie exérèse ganglionnaire complète, non fragmentée, portant sur un ganglion pathologique suffisamment volumineux.

-Les carottes biopsiques et les biopsies exérèses sont mesurées (**Annexe I**) et mises en cassettes numérotées entotalité. (**Figure 6**)



Figure 6: Biopsie exérèse d'un ganglion cervicale droit d'un patient âgé 36 ans

- **La circulation, l'imprégnation et l'inclusion :**

La fixation permet d'obtenir une rigidité au prélèvement, mais qui demeure insuffisante pour les durcir d'avantage, l'imprégnation par la paraffine est nécessaire.

Les tissus contenus dans les cassettes sont déshydratés par passage dans des alcools, l'alcool est éliminé par des solvants (xylène) puis la paraffine liquide à 65° imprègne les tissus et est refroidie. Ce passage dans des liquides intermédiaires constitue l'étape appelée « circulation » La circulation et est donc réalisée en 3 phases : la déshydratation, l'éclaircissement et l'imprégnation, et sont automatisées dans un appareil (Leica ASP 6025) (**Figure 7**) qui comporte un ensemble de 12 bains disposés en cercle, qui permet un transfert automatique sachant que la durée de chaque bain diffère de l'autre (**Annexe II**) .

L'étape finale de l'inclusion (enrobage) (**Annexe III**). est manuelle et consiste à inclure notre prélèvement imprégné dans un bloc de paraffine qui facilite la manipulation, l'entreposage de notre biopsie et lui fournit un support externe (forme adaptée à la pince à objet du microtome). Les étapes de l'enrobage sont réalisées grâce à un appareil (SLEE MPS/P) (**Figure 8**).



Figure 7 :L'automate de la circulation



Figure8:L'enrobage de l'échantillon a la paraffine.

- Coupes, étalement sur lames et colorations :

Le bloc solide de paraffine contenant le tissu est coupé grâce à un microtome (Leica RM 2135) (**Annexe IV**), les coupes de 3 à 5microns d'épaisseur sont étalées sur des lames dans un bain marie (Memmert) réglé à 45,9°C. Et après dissolution de la paraffine, puis réhydratation, le tissu est coloré.

Coloration HE :

La coloration de routine HE qui associe un colorant basique nucléaire (hématoxyline) et un colorant acide cytoplasmique (éosine) qui permet donc de visualiser de façon satisfaisante les composants cellulaires.

Cette étape est réalisée grâce à un automate de coloration (Leica ST 4040).

D'abord les lames vont passer respectivement par 3 bains de Xylène pour éliminer encore une autre fois la paraffine, puis 3 bains d'alcool ce qui permet la réhydratation, ensuite par 2 bains d'hématoxyline, la solution d'hématoxyline localise la chromatine nucléaire, elle donne une coloration bleu violette. Cette substance est chargée négativement, et n'a, à la base, aucune affinité pour les acides nucléiques présents dans les noyaux cellulaires. Il est donc nécessaire de combiner l'hématoxyline avec un « mordant », pour cela un autre bain est effectué contenant une solution acide (alcool + HCl) qui va chélater le colorant et lui conférer une importante charge positive et il va se lier à la chromatine nucléaire, chargée négativement, ensuite un bain d'une solution basique eau ammoniacale est effectuée afin de bleuir les noyaux. Ensuite les lames sont prolongées dans un bain d'Eosine Y, solution qui localise le cytoplasme. L'éosine est une substance chargée négativement, qui va se combiner aux tissus acidophiles (= éosinophiles) et leur donner une teinte rose à rouge. Les lames sont ensuite passées par 5 bains d'alcool pour la déshydratation des coupes, ensuite dans le xylène (4bains) pour leurs éclaircissements.

Un rinçage par l'eau de robinet est effectué après l'utilisation de colorant hématoxyline.

Enfin les lames sont séchées à l'étuve.

- Montage et examen des lames :

La coupe colorée est protégée contre les bris mécaniques et la dégradation chimique des colorants par une lamelle de verre collée (**Figure 9**). Elle est analysée au microscope optique au grossissement : x4, x10 et x40. Les blocs et les lames sont ensuite archivés

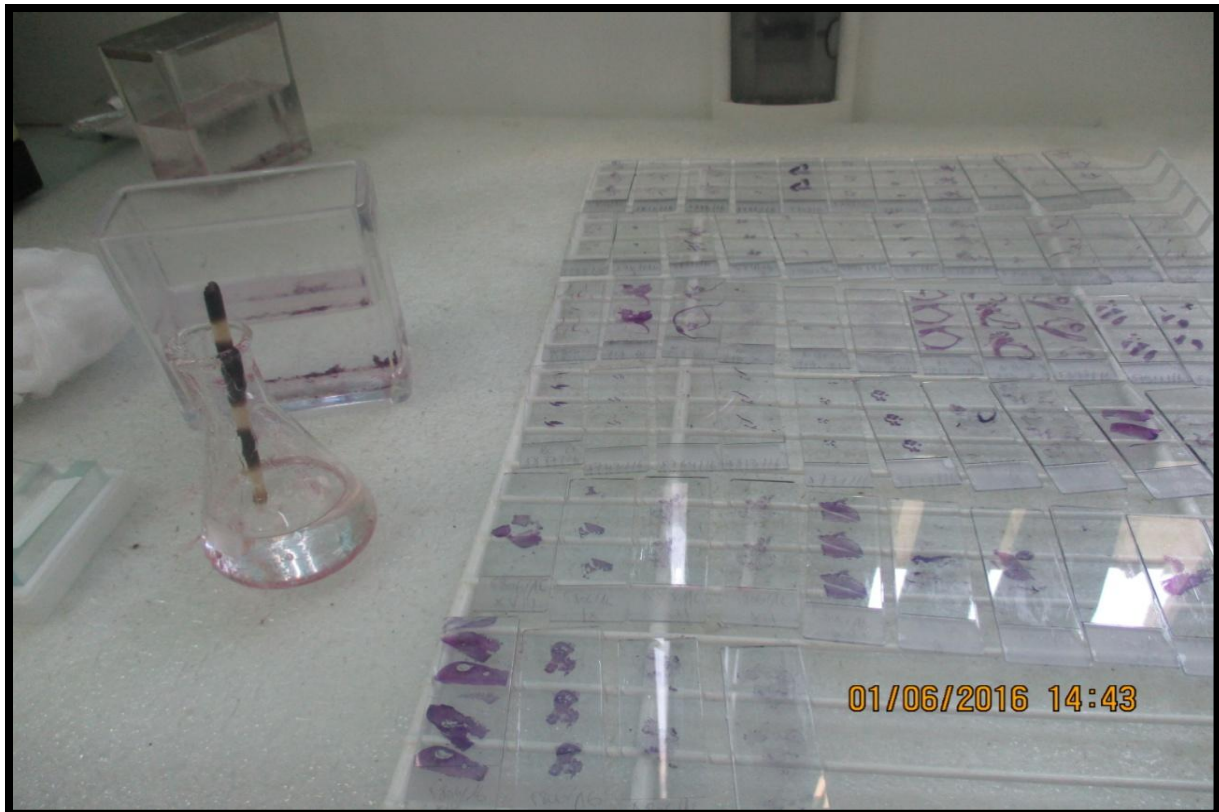


Figure 9 : Montage et séchage des lames.

I-2- Etude immunophénotypique :

L'immunomarquage consiste à confirmer le diagnostic de LH et à rechercher des protéines indicatrices de la présence de l'EBV dans les cas choisis. Cette technique met en jeu un Ac spécifique de la protéine recherchée (Ag), ainsi qu'un système de révélation de la réaction Ac-Ag permettant de localiser les Ags par observation microscopique du prélèvement.

Les marqueurs immunohistochimiques recherchés sont : CD15, CD30, EBV-LMP1.

La technique est réalisée dans le laboratoire d'IHC de service anatomie pathologique dont deux méthodes ont été suivies : en manuelle pour CD30 et EBV LMP1 et en automate pour CD15, selon le protocole suivant :

- **Déparaffinage, réhydratation et démasquage :**

Un nombre important d'Ag, notamment du fait des modifications conformationnelles de l'épitope liées à la fixation, ne sont pas reconnus par les Acs correspondants après inclusion en paraffine. Ces difficultés peuvent être contournées en prétraitant les coupes, avant l'application de l'Ac primaire.

Cette étape est réalisée à l'aide d'un autocuiseur pendant 30 min afin de réhydrater les coupes et les démasquer par la chaleur. Les lames sont mises dans un racks métallique séparées par un espace de 3-4 mm pour éviter le piégeage de bulles d'air et puis elles sont mises dans un bac contenant une solution Trilogy à ph 9 pour l'EBV-LMP1 et Declere a ph = 6 pour le CD30. Cette solution permet le déparaffinage, réhydratation et le démasquage de sites antigéniques de la protéine cible. Le bac est prolongé dans l'eau dans l'autocuiseur, ce dernier est refermé et mis en marche.

Après avoir ressorti les lames, on change le bac tout de suite, les lames qui sont déjà dans un portoir à lame (rack métallique), sont mises dans un autre bac contenant la même solution pendant 5 min. Enfin les lames sont mises dans un bac contenant l'eau distillée pendant 5 min Pour le refroidissement.

- **Manipulation des lames dans une chambre humide :**



Figure 10 : Manipulation des lames dans la chambre humide

La chambre humide est remplie d'eau pour que les lames ne sèchent pas. Les lames sont déposées l'une à côté de l'autre. Les produits à utiliser seront rajoutés par ordre en respectant le temps voulu, et on réalisant deux lavages après l'utilisation de chaque produit.

La chambre humide nous permet d'incuber nos Acs .Le temps diffère selon l'Ac.

Avec un stylo hydrophobe « Dacopen », on limite le fragment pour empêcher la sortie des réactifs hors de la coupe, ensuite 2 gouttes de peroxydase (100µl) sont rajoutées à l'aide d'une micropipette sur les coupes pendant 5 min , ceux ci permet d'inhiber toute activité de peroxydase endogène . 2 lavages de 5 min s chacun sont faits à l'aide d'une solution de lavage.

Les Acs sont ensuite rajoutés (anti : CD30, EBV LMP1). Les Acs sont les réactifs essentiels en IHC. Le choix de l'Ac est primordial dans les techniques d'immunolocalisation. Il est extrêmement utile de connaître les caractéristiques des Ac que l'on utilise : la réussite ou l'échec d'une immunolocalisation dépend en partie de ces paramètres. Le volume d'Ac qu'on doit ajouter, à l'aide d'une micropipette, diffère selon la grandeur de la coupe : 100µl pour un petit fragment 200µl pour un fragment moyen, 300µl pour un grand fragment, durant une heure pour l'EBV-LMP1 et 40 min pour le CD30. Les lames sont ensuite lavées 2 fois pendant 5 min. Ensuite un Ac post primaire est rajouté pendant 30 min , puis éliminé par 2 lavages de 5min chacun, ensuite un polymère est rajouté pendant 30 min puis éliminé par 2 lavages de 5 min chacun. une réaction de couleur brune est réalisée pour la révélation des Acs à l'aide d'un Chromogène qui est le DAB ,100µl de DAB est rajouté pendant

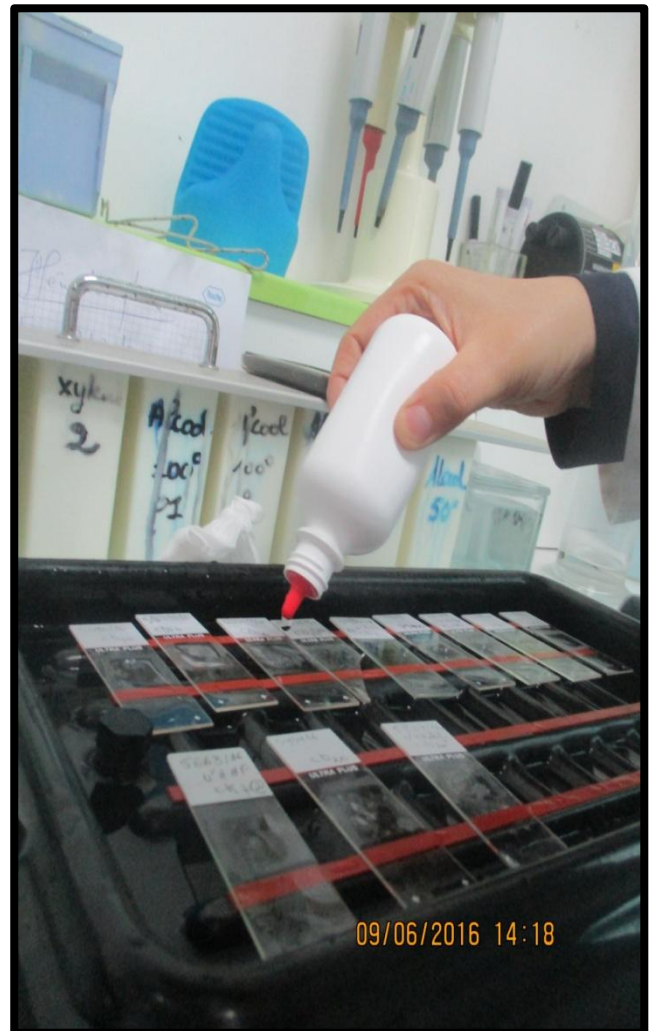


Figure 11: Application de post polymère sur les coupes

10min, la coloration marron peut apparaitre avant que les 10 min soient terminées. 3 lavages de 5 min chacun sont réalisés.

Pour obtenir une meilleur coloration on ajoute l'Hématoxyline pendant 5min, puis on réalise le dernier lavage avec l'eau de robinet jusqu'à l'élimination de tout l'excès de colorant (Hématoxyline) .Les lames sont ensuite plongées pendant quelques secondes dans l'eau ammoniacuée afin de bleuter la coloration puis on les fait passer dans la batterie

- La Batterie :

Alcool :

- ✓ 50° :3min
- ✓ 90° :3 min
- ✓ 100° : 3min
- ✓ 100° :1min

Xylène :

- ✓ 3 bains de 3 min chacun, ce ci facilite le montage

Le CD15 est réalisé en automate (VANTANA) .Après avoir ressorti les lames de l'étuve, on les met directement dans l'automate qui fait automatiquement toutes les étapes indispensables. A la fin, on les lave avec de l'eau savonnée pour éliminer l'huile , puis on les laisse dans l'eau distillée pendant quelques minutes .

Les lames sont ensuite montées et observées à l'aide de microscope optique au grossissement : x4, x10 et x40

I-3-Etude moléculaire : HIS / CISH :

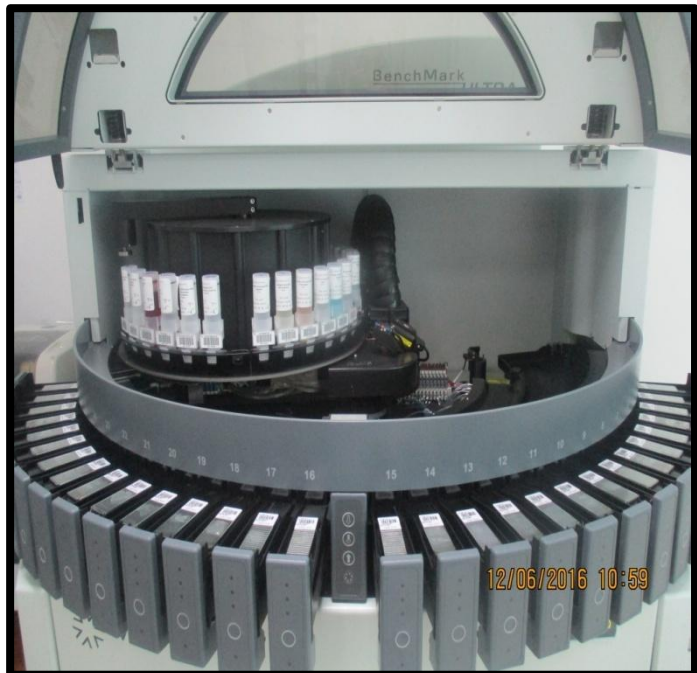
La CISH est une forme d'HIS qui utilise une réaction chromogénique pour mettre en évidence les sondes d'ADN ou d'ARN hybridées. Cette dernière est la méthode de choix qui cible l'EBER et qui peut être interprété en utilisant la microscopie optique, et permet l'observation directe de la présence du virus dans les cellules d'intérêt.

Cette technique est réalisée dans le laboratoire d'IHC de service d'anatomie pathologique à l'aide d'un automate (VENTANA). Cet appareil est composé de 30 chambres de réaction entièrement indépendantes, il permet un chargement continu des lames , cadence accélérée de traitement des échantillons, chargement des réactifs possible pendant le processus de coloration, autres options flexibles pour le prétraitement optimal des coupes (adhésion des

coupes, déparaffinage, conditionnement cellulaire). Les lames sont traitées selon le protocole suivant :

Préparation et vérification du bon déroulement de la technique : en mettant les lames qui ont été préalablement étuvées pendant 24h à 40°C, dans l'automate qui va automatiquement les lire et vérifier les réactifs nécessaires grâce à un code à barre.

Les grandes étapes que l'automate suit sont citées au dessous, pour plus de détails sur le protocole voir les annexes



(Annexe VI).

Figure 12: Installation des lames et vérification automatique des réactifs nécessaires

➤ **Prétraitement des lames :**

-Déparaffinage et réhydratation

- **Un prétraitement à la chaleur** (à 86 °C) suivie d'une **digestion enzymatique** des tissus (Protéase 3) est nécessaire afin de permettre aux sondes de traverser les membranes cytoplasmique et nucléaire.

- **Dépôt de la sonde**
- **Dénaturation/ hybridation**
- **immunodétection**

Les produits utilisés :

- **Solutions :**

-EZ Prep (10x) : solution utilisée pour éliminer la paraffine des tissus .

-Cell Conditioning 2 (CC2) : utilisé pour un prétraitement d'échantillons. CC2 est un tampon citrate à un pH légèrement acide qui permet l'amélioration de signal.

-Liquid Coverslip : Est une solution de lamelle couvre-objet prédilué utilisé comme une barrière entre les réactifs aqueux et l'air. Cette barrière empêche l'évaporation.

-Reaction Buffer (10x) : solution de lavage utilisées entre les différentes étapes de l'hybridation.

-SSC (10x) : utilisé pour les lavages de stringence et pour le rinçage des diapositives entre les étapes de coloration.

- **Enzymes :**

-ISH Protease 3 : une endopeptidase (protéase alcaline) qui est utilisée pour perméabiliser les membranes cellulaires et éliminer les protéines qui entourent la cible ADN ou ARN des séquences d'intérêt.

- **Sonde :**

-INFORM EBER Probe : est une sonde d'oligonucléotide marquée à la fluorescéine qui a une affinité pour le transcrit d'ARN précoce du virus d'Epstein-Barr.

- **Détection d'ISH :**

Le système de détection (Kit) est composé d'Ac primaire de souris anti-fluorescéine qui, après application d'un système indirect biotine-streptavidine permet la détection des sondes marquées à la fluorescéine. Le kit est destiné à être utilisé comme système de détection de différentes sondes d'ISH Ventana en vue de colorer en bleu les sites d'interaction sonde-cible qui est facilement visualisée par microscopie optique.

- **Contre-colorant :**

-Red Counterstain II : Permet la coloration du fond en rose dans les noyaux et le cytoplasme, et facilite l'observation microscopique.

Après avoir ressorti les lames, on les lave avec de l'eau savonnée pour éliminer l'huile, puis on les laisse dans l'eau distillée pendant quelques minutes.

Les lames sont ensuite montées : Une lamelle est fixée sur la coupe histologique en appliquant une goutte de colle et quelques gouttes de Xylène. On laisse les lames sèches à l'air libre. Ensuite les lames sont observées à l'aide d'un microscope optique au grossissement : x4, x10 et x40.



Figure 13 : L'automate d'immunohistochimie et d'hybridation in situ (VENTANA)

II-Etude génétique :

- 7 familles ont été interrogées afin d'établir l'arbre généalogique de chacune. Leurs coordonnées ont été obtenues à partir du service d'hématologie du CHU de Frantz Fanon de Blida.

Chapitre III :

Résultats et discussion

Résultats :

I- Etude descriptive :

La répartition des 66 patients de LH, étudiés à partir d'octobre 2014 jusqu'à juin 2016 dans le service d'anatomie pathologique du CHU de Frantz Fanon (Blida), est représentée sous forme de diagrammes selon : l'âge, le sexe, le type et la topographie ganglionnaire.

I-1-Répartition selon l'âge :

La **figure 14** ; répartit 66 sujets avec âge précis selon les tranches d'âges : il ressort que plus de 1/2 des sujets ont un âge entre 20 et 39, et que plus de 1/6 entre 10 et 19, et plus de 22% ont au moins 40 ans, avec un faible pourcentage de 3.03% chez les sujets de /ou moins de 9 ans. L'âge moyen est : 30 ans .

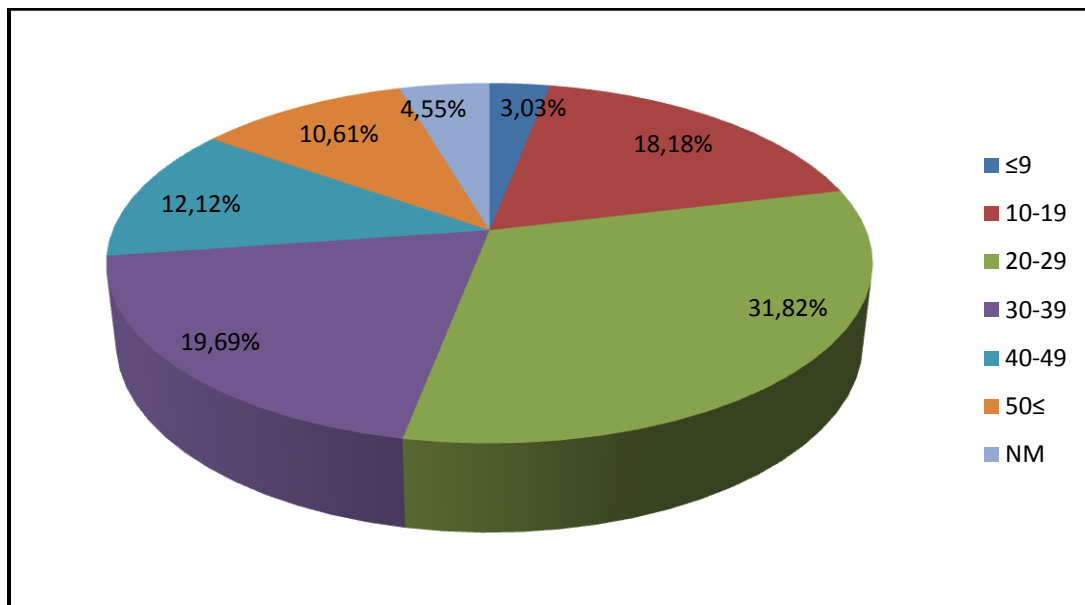


Figure 14 : Répartition des 66 sujets étudiés selon les tranches d'âges. Avec NM : Non mentionné.

I-2- Répartition selon le sexe :

La **figure 15** représente la répartition par sexe des 66 patients au service d'anatomopathologie dans la période octobre 2014 – juin 2016 (a droite) et de 155 patients au service d'hématologie en Janvier 2016(a gauche).

Parmi les 66 cas étudiés, on a constaté que 56 % des patients atteints sont des femmes tandis que 44 % sont des hommes donc un sex-ratio de 0.78 environ (Figure 20) et parmi 155 patients au service d'hématologie de CHU de Frantz Fanon(Blida), pendant le mois de Janvier

2016, 58% des patients sont des femmes et 42 % sont des hommes donc un sex-ratio de 0.72 environ .

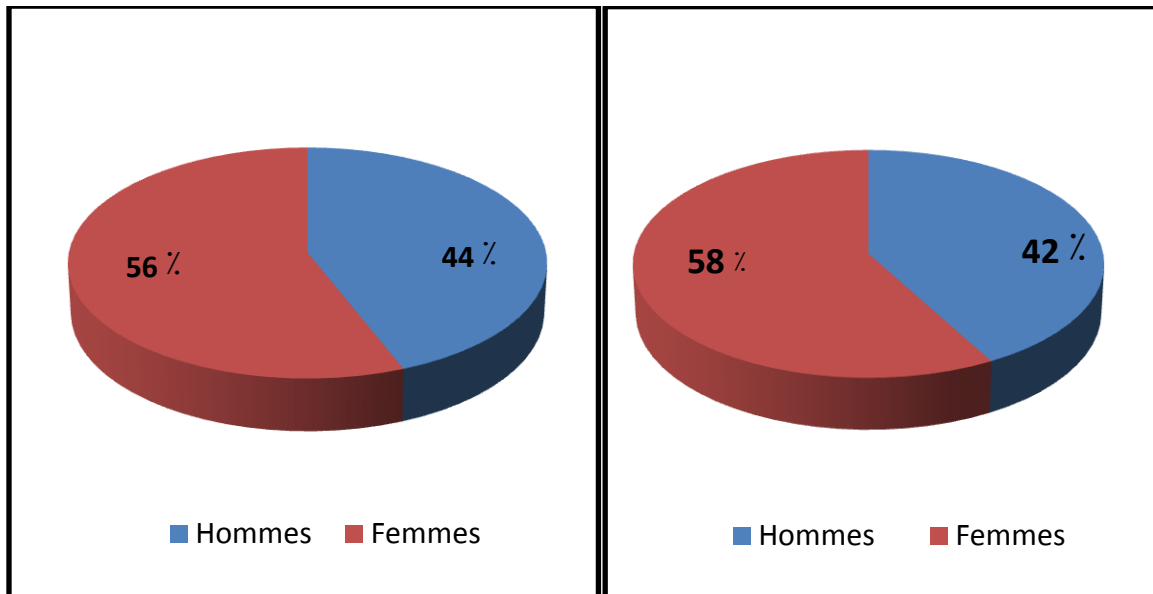


Figure 15: Répartition des patients selon le sexe.

I-3- Répartition selon le type :

Parmi les 66 cas étudiés, plus de 92% ont un LHc, et plus de 2/3 de ces derniers ont le sous-type scléro-nodulaire, et 9.09% cellularité mixte, et 3.03% riche en lymphocytes, et avec un faible pourcentage du sous-type à déplétion lymphocytaire (**Figure 16**).

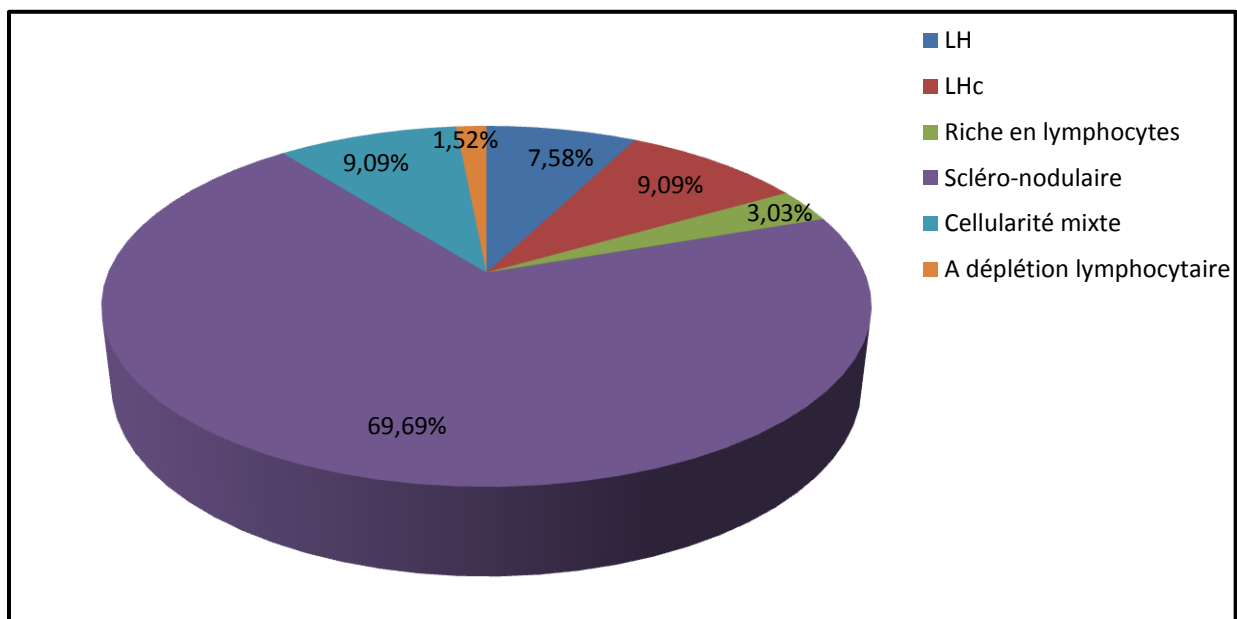


Figure 16 : Répartition des 66 sujets étudiés selon le type/sous type du lymphome de Hodgkin. Avec LH : type non précisé ; LHc : lymphome de Hodgkin classique avec sous type non précisé.

I-4- Répartition selon la topographie ganglionnaire :

La figure 17 représente La répartition par topographie ganglionnaire des 62 patients. La majorité des patients présente des adénopathies périphériques localisées, le plus souvent de topographie cervicale (58.06 %), et avec une faible fréquence de topographie inguinale (4.84%), médiastinale (3.22 %) ou axillaire (1.61%) .Les 33.87 % sont des adénopathies non précisées .

Ces adénopathies sont représentées chez 62 patients. Les 4 cas qui restent sont des PBO.

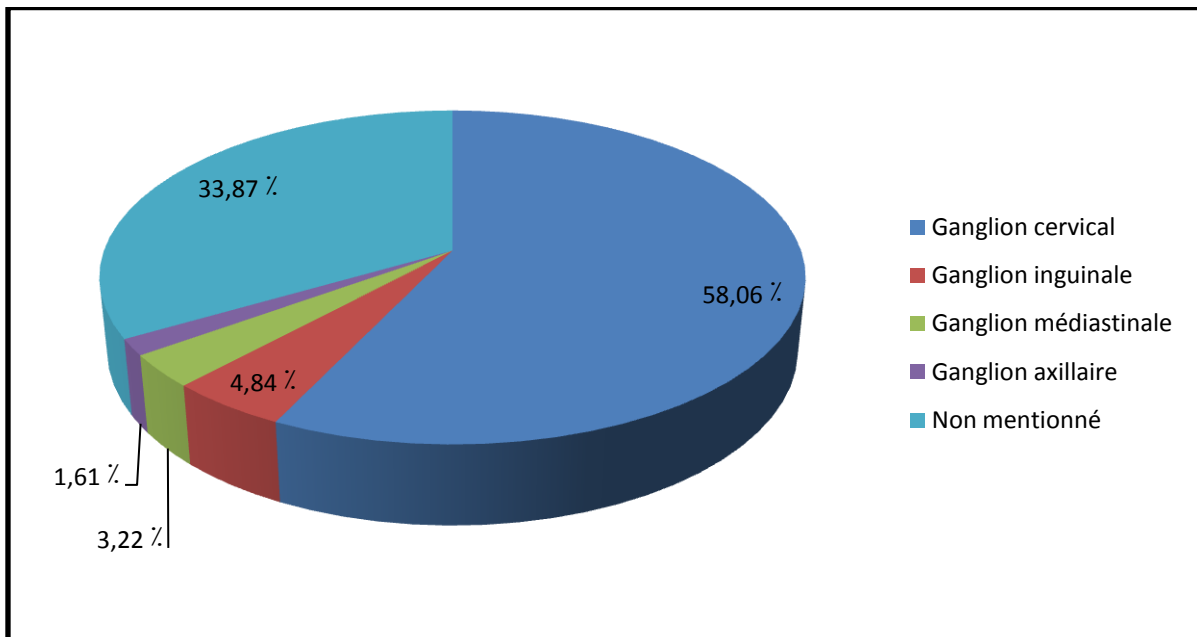


Figure 17: Répartition par topographie ganglionnaire des 62 patients.

II-Etude morphologique :

Sur une coupe de tissu ganglionnaire, on observe :

➤ **Architecture générale :**

Destruction et disparition de l'architecture normale du ganglion lymphatique avec granulome inflammatoire et plus ou moins une fibrose (**figure 18**)

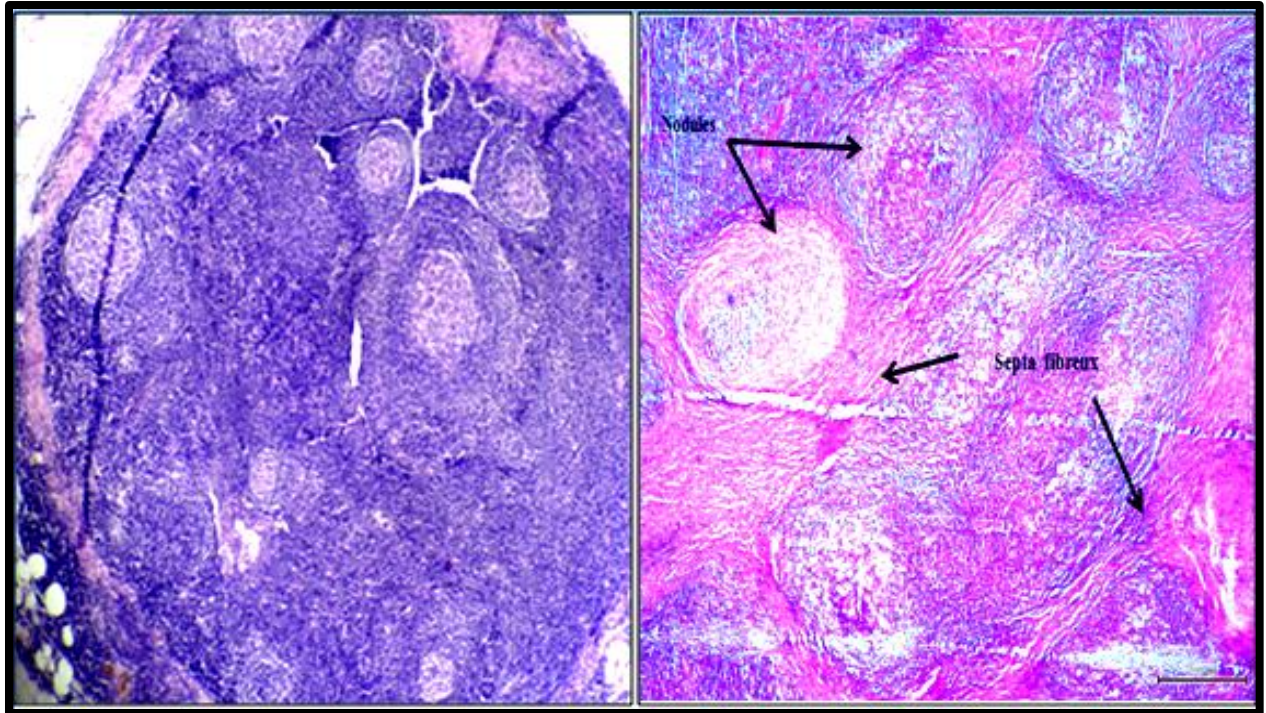


Figure 18: Architecture ganglionnaire : normale à gauche ; effacée à droite dans le sous type scléro-nodulaire avec la présence de fibrose (Sous microscope optique ;G x4. Coloration HE)

- **Le sous-type scléro-nodulaire :**

Des bandes de sclérose divisant le parenchyme en nodules contenant des cellules malignes et les cellules du granulome en proportion variable.

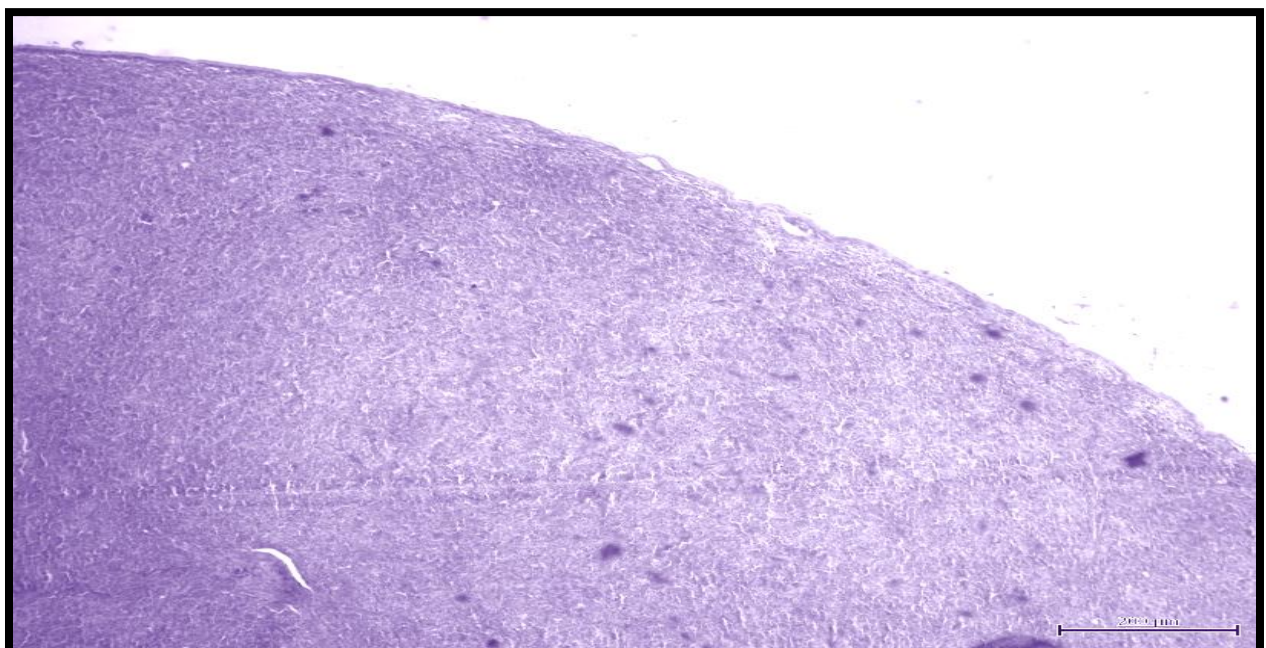


Figure 19: Architecture ganglionnaire effacée, absence des septa fibreux dans le sous type à cellularité mixte (Sous microscope optique ;G x10. Coloration HE)

- **Cellules tumorales :**

Les caractères morphologiques des cellules tumorales dans le LH sont caractérisés par une prolifération qui comprend :

- grandes cellules mononuclées ressemblant à de grands monoblastes avec des nucléoles volumineux et un cytoplasme basophile, appelées cellules de Hodgkin (**Figure 20**) ,

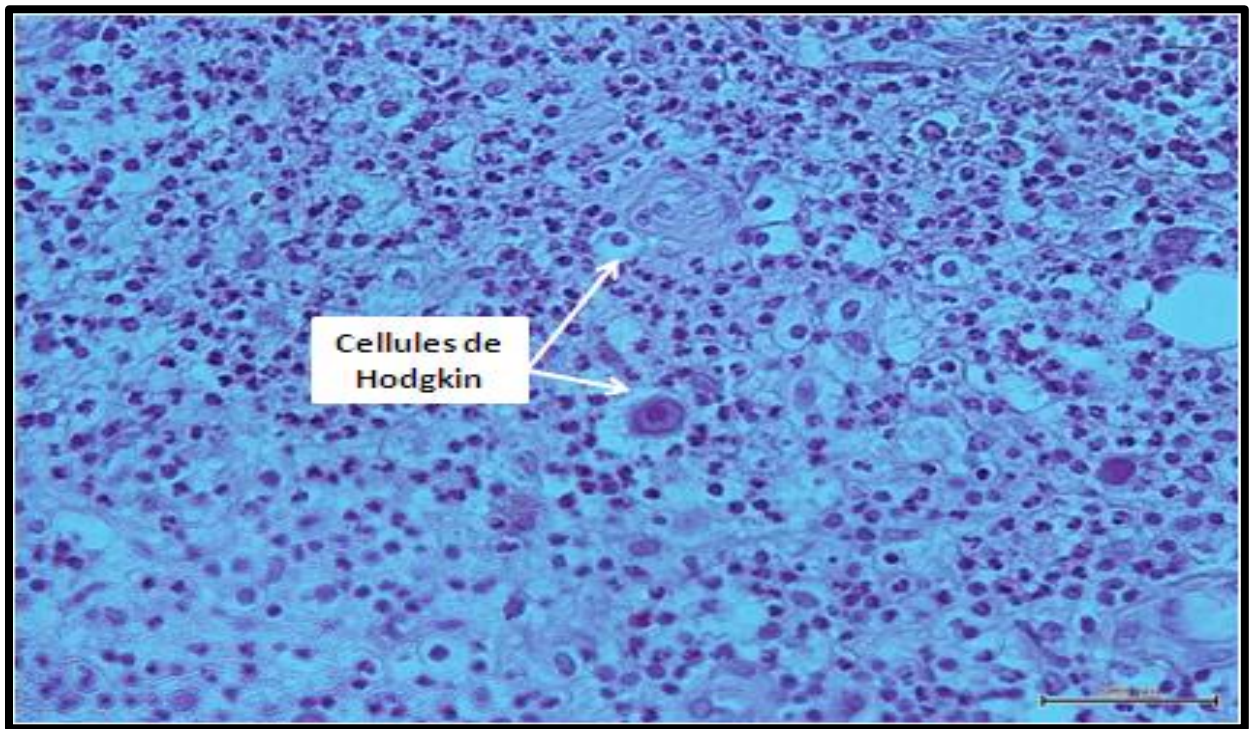


Figure 20 : Cellules de Hodgkin (Sous microscope optique ; G x40. Coloration HE)

- cellules volumineuses à géantes bilobées avec deux noyaux symétriques (noyaux en miroir), des nucléoles multiples et volumineux acidophiles, un cytoplasme abondant et clair discrètement basophile, appelées cellules de Reed-Sternberg (**Figure21**).

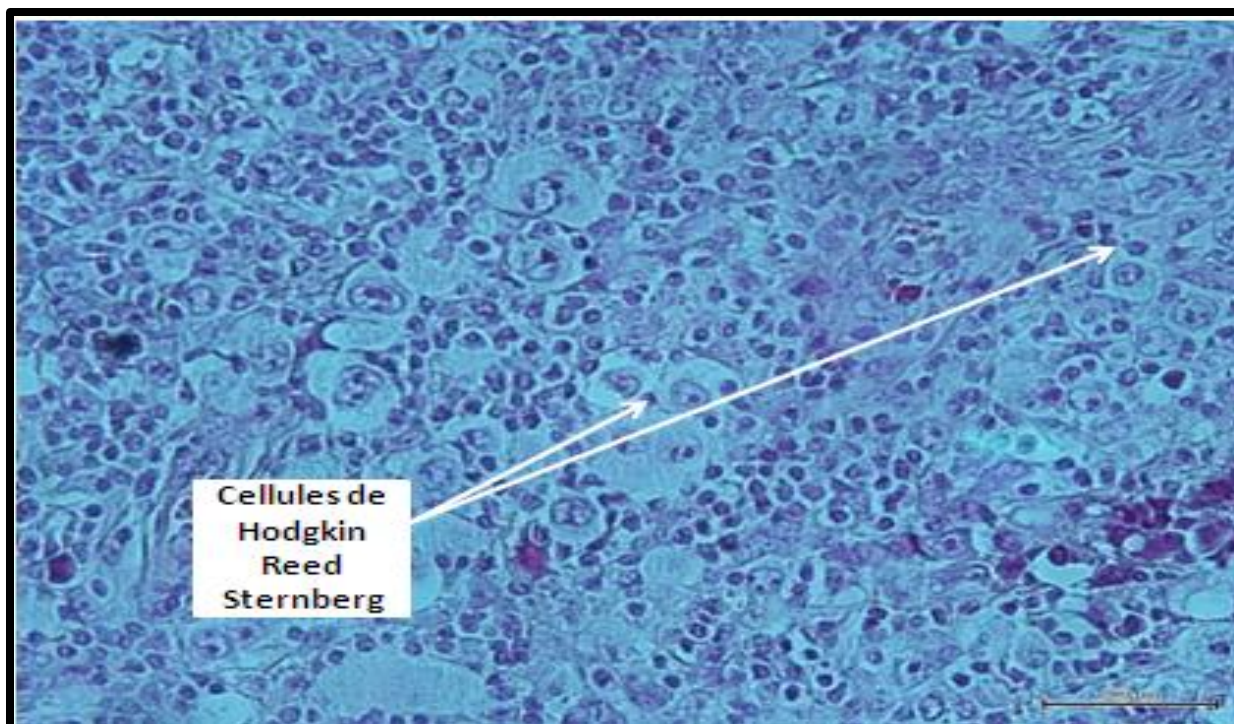


Figure 21: Cellules tumorales de Hodgkin Reed-Sternberg « HRS » (Sous microscope optique ; G x40. Coloration HE)

-D'autres cellules avec un aspect lacunaire particulier, un cytoplasme abondant et pâle rétracté ou détruit en périphérie par l'effet des fixateurs (d'où l'aspect lacunaire), noyau polylobé ressemble à celui de la cellule de RS mais les nucléoles sont souvent plus petits et moins nombreux (**Figure 22**), sont aussi parfois présentes.

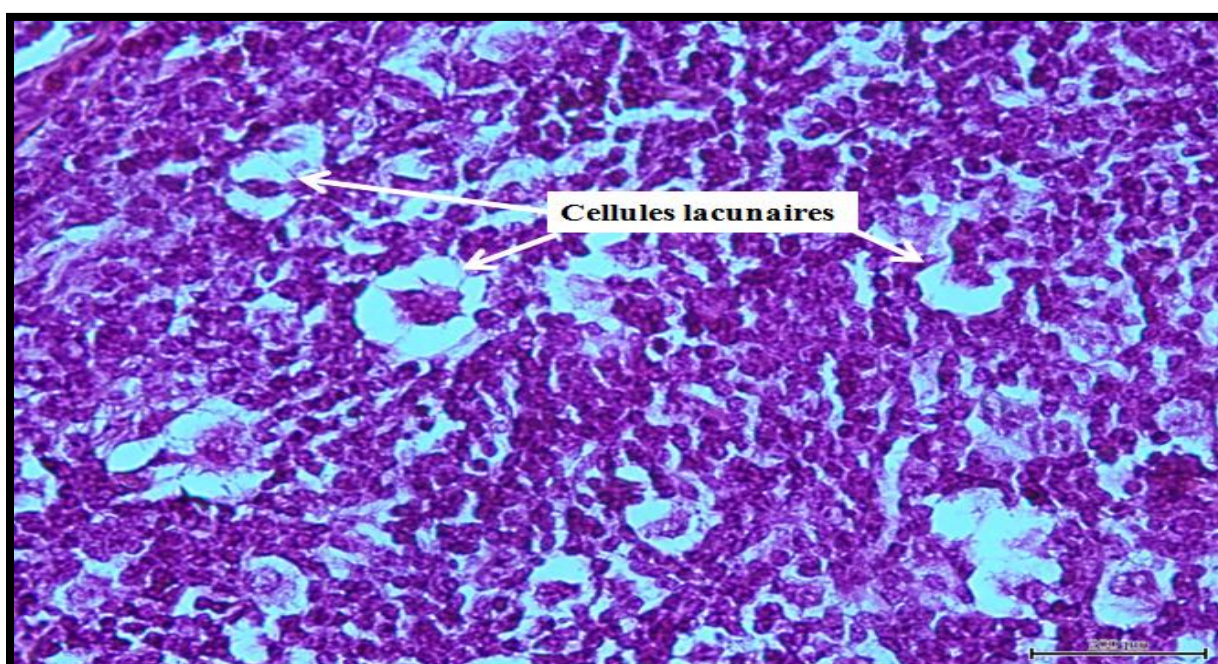


Figure 22 : Cellules lacunaires (Sous microscope optique ; G x40. Coloration HE)

- **Fond cellulaire inflammatoire :**

Un fond cellulaire avec une population hétérogène constituée de lymphocytes, de polynucléaires neutrophiles et éosinophiles (**Figure 23**), d'histiocytes (**Figure 24**) .

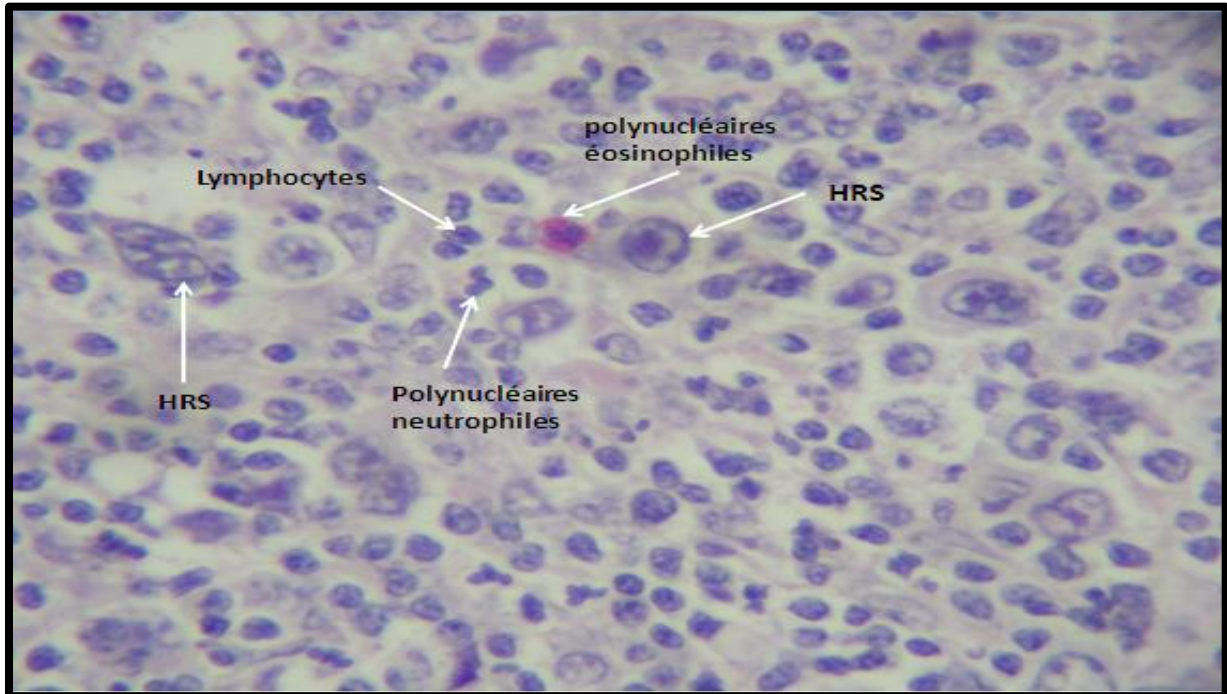


Figure 23 : Cellules tumorales (HRS) au sein d'un fond cellulaire inflammatoire fait de polynucléaires et des lymphocytes (Sous microscope optique ; G x40. Coloration HE)

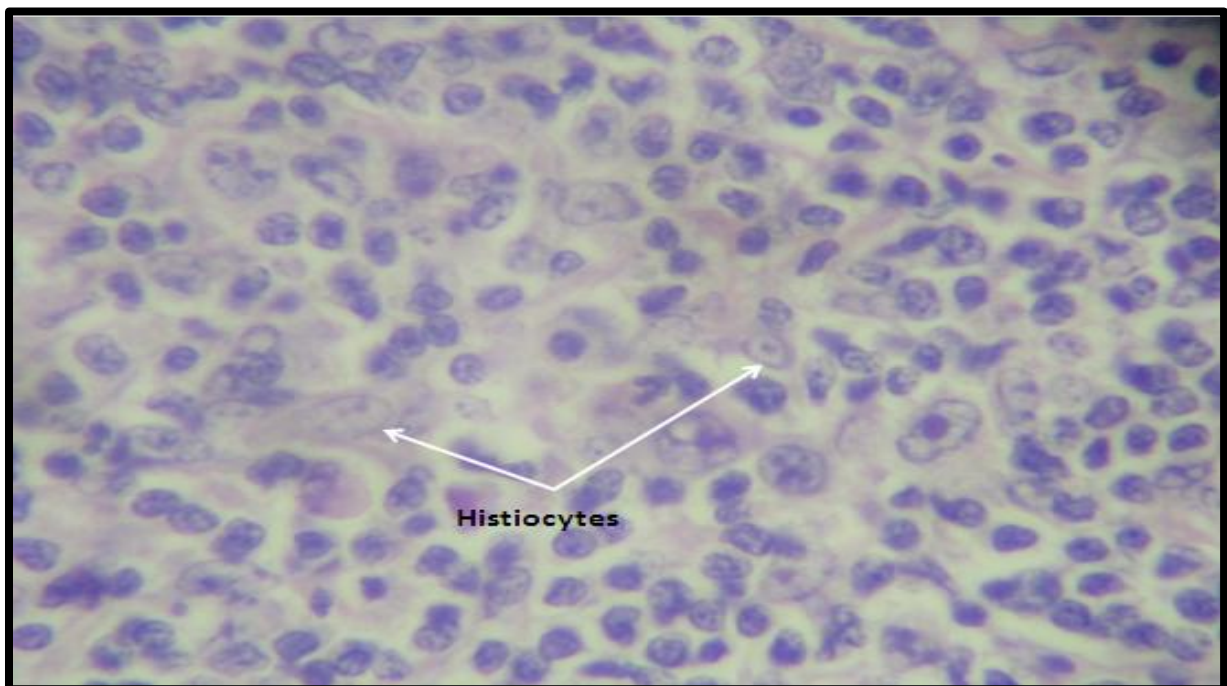


Figure 24 : La présence des cellules histiocytaires dans le fond cellulaire inflammatoire (Sous microscope optique ; G x40. Cloration HE.)

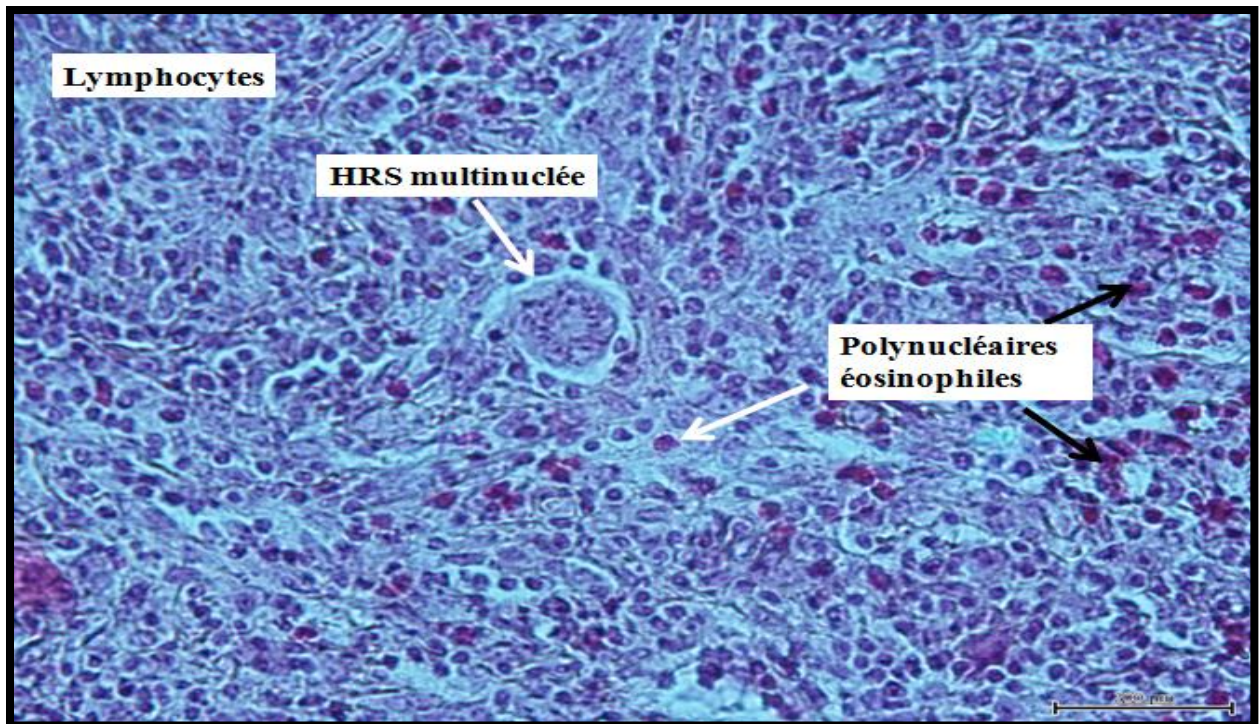


Figure 25 : Cellule de Hodgkin Reed-Sternberg multinuclée au sein d'un fond riche en lymphocytes et en polynucléaires surtout les éosinophiles et d'histiocytes (Sous microscope optique ; G x40. Coloration HE)

III-Etude immunophénotypique :

Chez les 66 patients de notre étude, 83 % des cas ont un marquage CD 15 positif, 6 % de cas CD 15 négatif et 3% cas avec un marquage CD 15 non contributif. **(figure 26)**

Pour le CD 30, 71,20% cas avec un marquage CD 30+ (dont un cas faiblement positif), 3% cas CD 30 - et 1,50% cas avec un marquage CD 30 non contributif. **(Figure 27)**

L'étude du profil de latence a l'aide de l'AC anti-LMP 1 a été réalisé seulement sur 15 (22,70%) parmi les 66 cas . **(Figure 26)**

Dans les cellules tumorales, le marquage EBV LMP1 est positif dans 60% des cas et négatif dans 40% **(Figure 27)**.

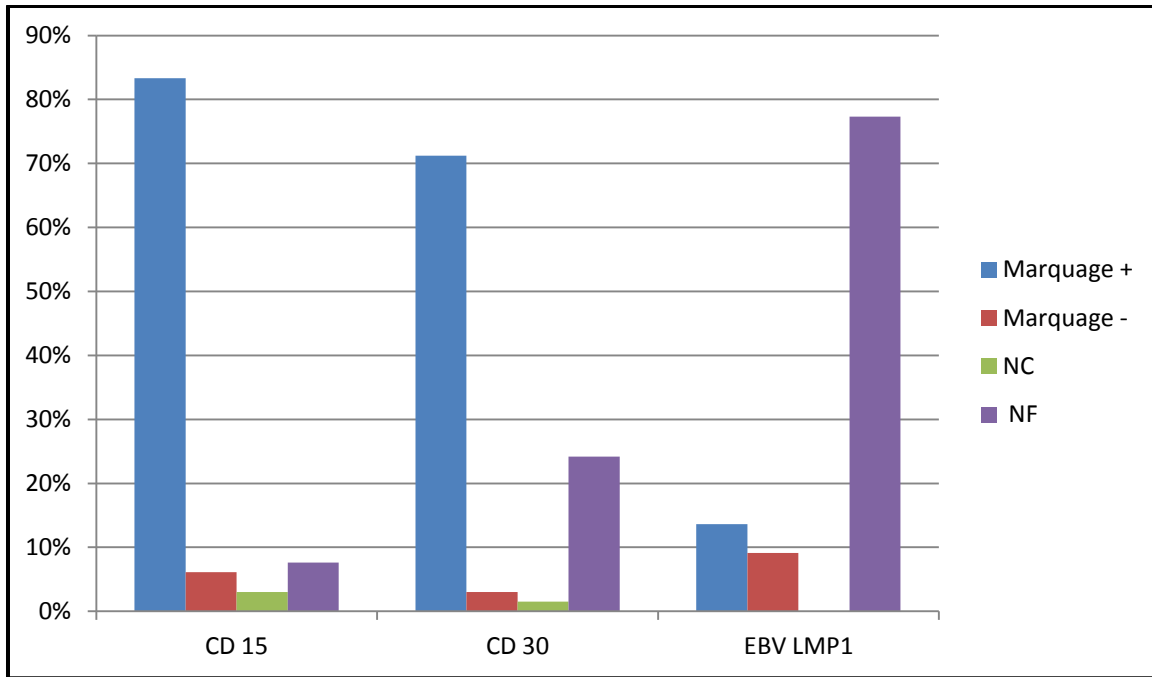


Figure 26 : Résultats des immunomarquages au niveau des cellules tumorales, avec NC : Non contributif ; NF : Non fait .

- Les cas où le marquage est mentionné comme non fait, ils n'ont pas été faits à cause d'un problème du réactif.

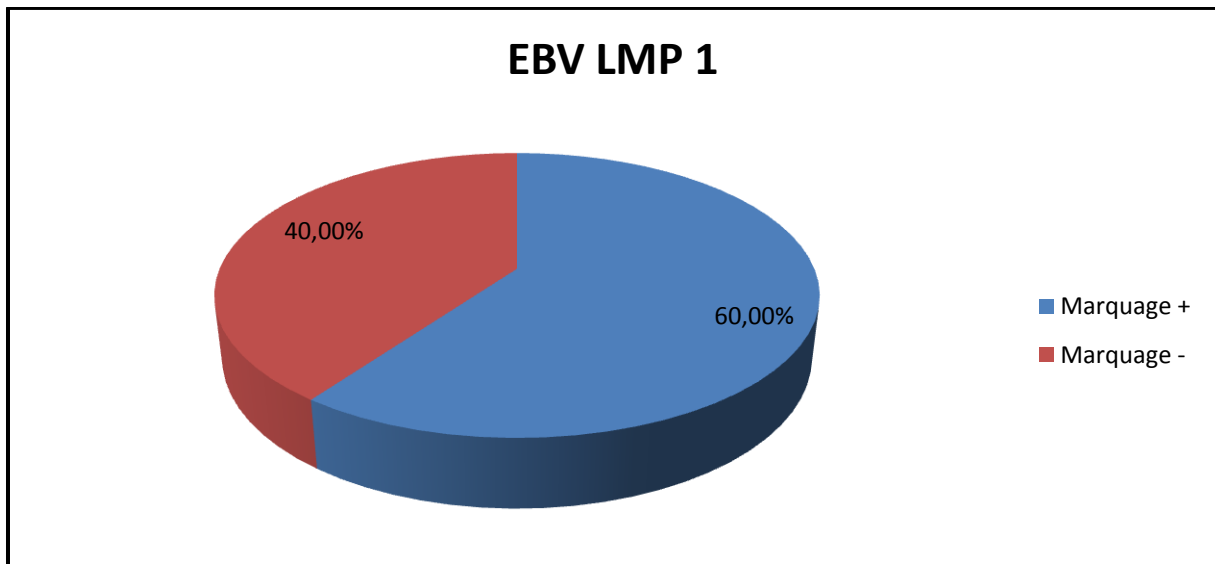


Figure 27: Résultat de l'immunomarquage EBV LMP1 au niveau des cellules tumorales.

-Les cellules HRS et RS expriment l'Ag CD30. Le marquage est membranaire (**Figure 28**).

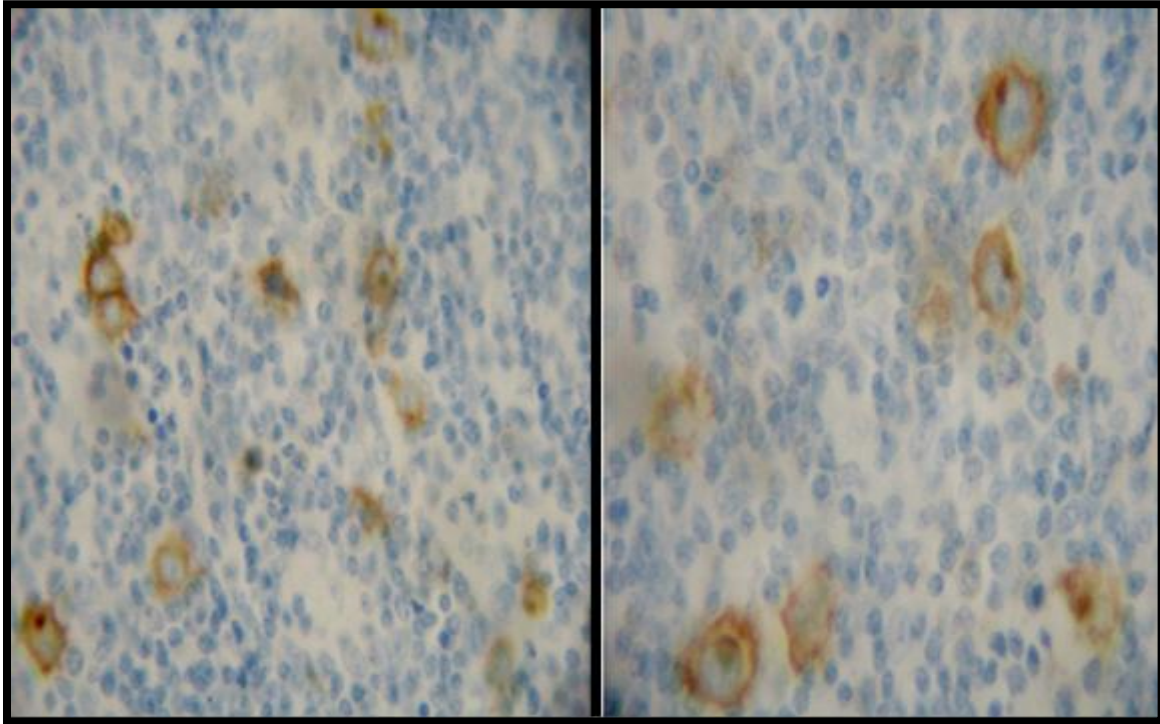


Figure 28: Marquage membranaire CD30 des cellules tumorales (Sous microscope optique ; G x40)

-Les cellules HRS et RS expriment également l'Ag CD15, sous forme d'un marquage membranaire, et parfois aussi sous forme d'un signal cytoplasmique paragolgien (**Figure 30**).

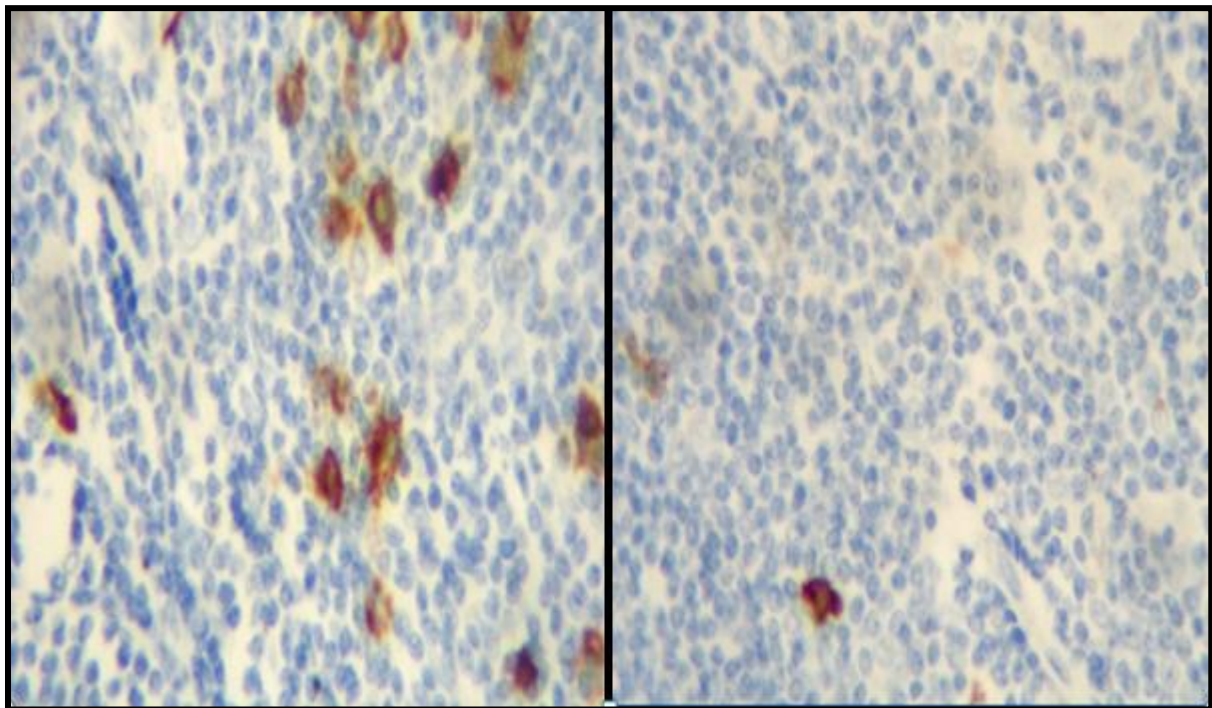


Figure 29: Marquages membranaire (a droite) et paragolgien (a gauche) du CD15 des cellules tumorales(Sous microscope optique ; G x40).

- Les cellules HRS peuvent être infectées de façon latente par le virus EBV. Sur une série de 15 cas, l'étude immunohistochimique révèle l'expression de la protéine virale de latence LMP1 dans 9 cas par les cellules HRS et les LB (**Figure 30**).

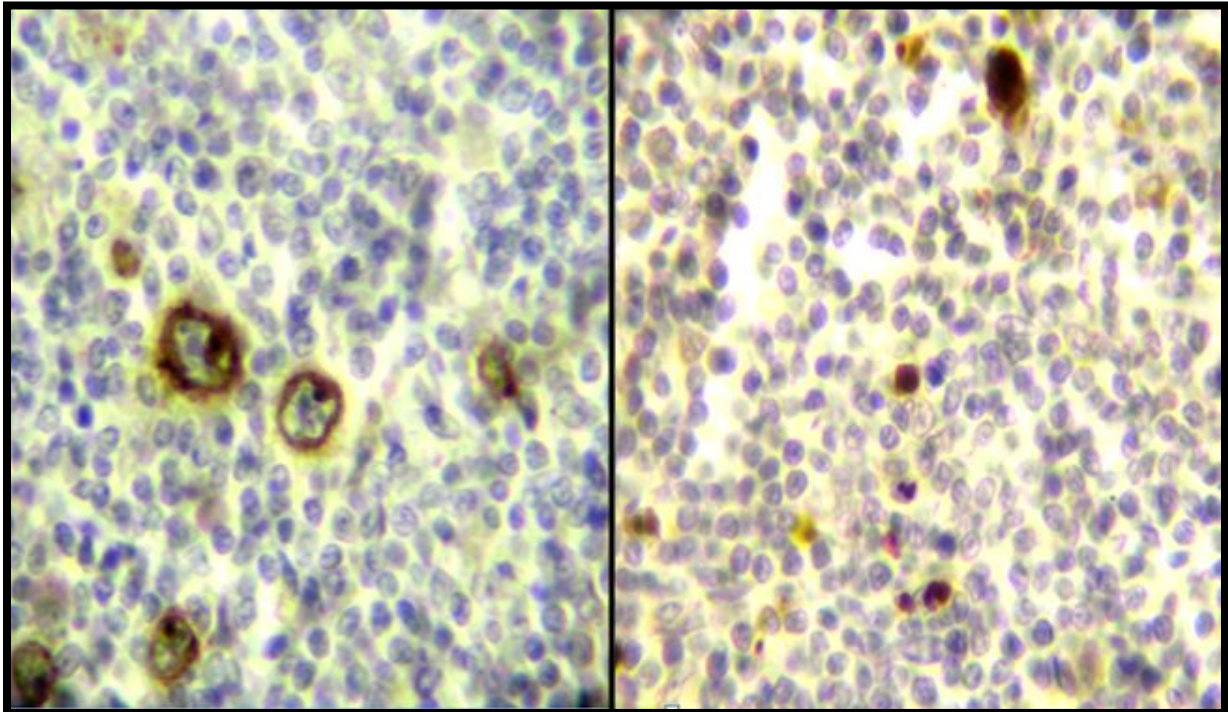


Figure 30: Marquage membranaire EBV-LMP1 des cellules tumorales(a droite) et des lymphocytes B infectés (petites cellules), EBV latent (a gauche),(Sous microscope optique ; G x40)

IV-Etude moléculaire : Détection d'ARNm d'EBV par HIS/CISH

Cette technique a été réalisée sur 9 cas seulement à cause d'une insuffisance du réactif .

- L'EBV est détecté en HIS / CISH par la technique des EBERs avec un signal nucléaire qui a concerné les cellules HRS (**Figure 31**).

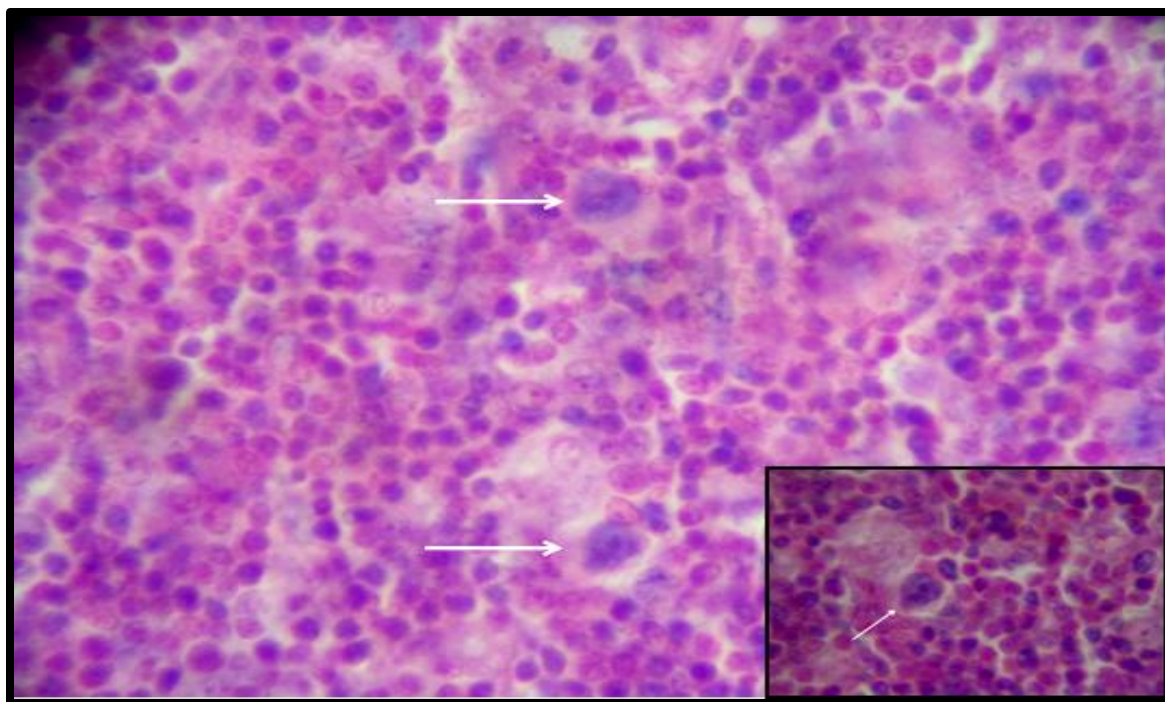


Figure 31 : Marquage nucléaire EBER des cellules HRS (Sous microscope optique ; G x40)

- la technique n'a été réussie que dans uniquement 4/9 cas, à cause d'un problème de technique non contributive (**Figure 32**).

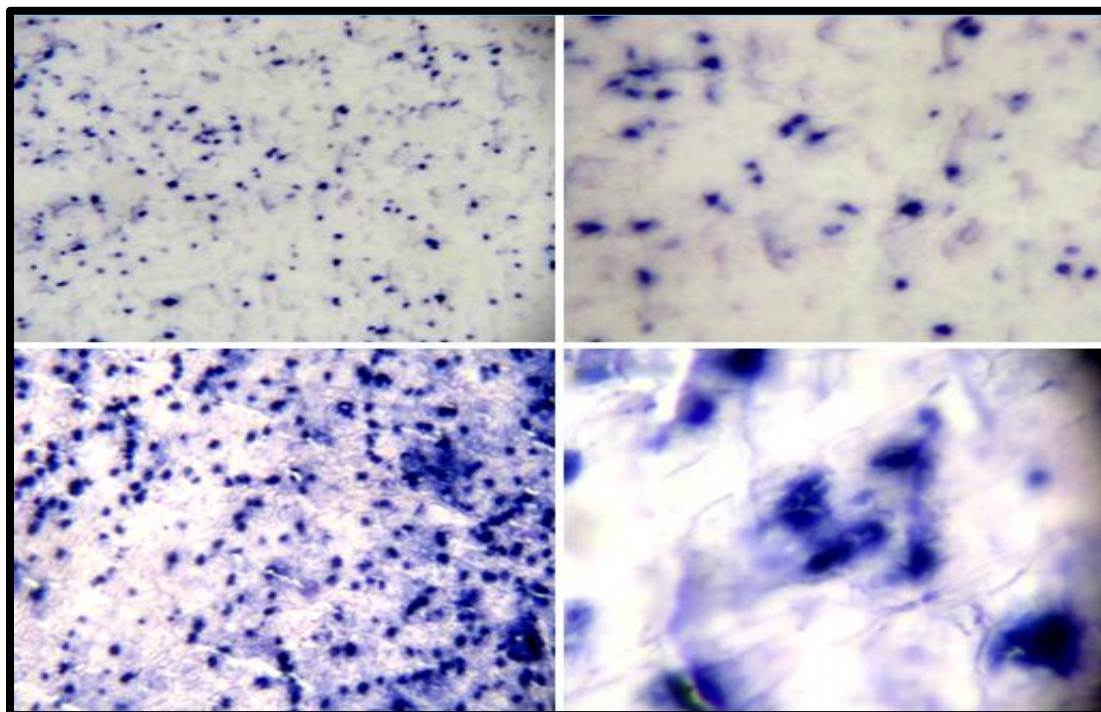


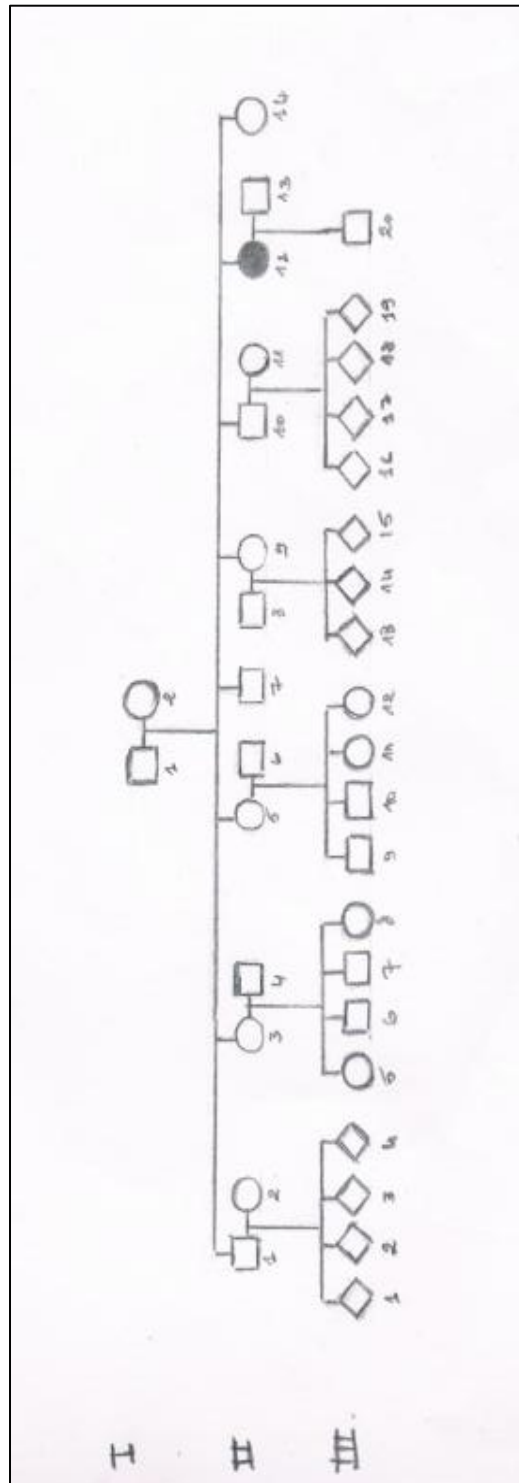
Figure 32: technique non contributive avec marquage EBER non spécifique (Sous microscope optique ; a gauche Gx10, a droite Gx40)

V- Etude génétique

-Construction des arbres généalogiques :

Les arbres généalogiques des 7 familles (détaillées ci-après) ont été constitués à partir d'une enquête génétique.

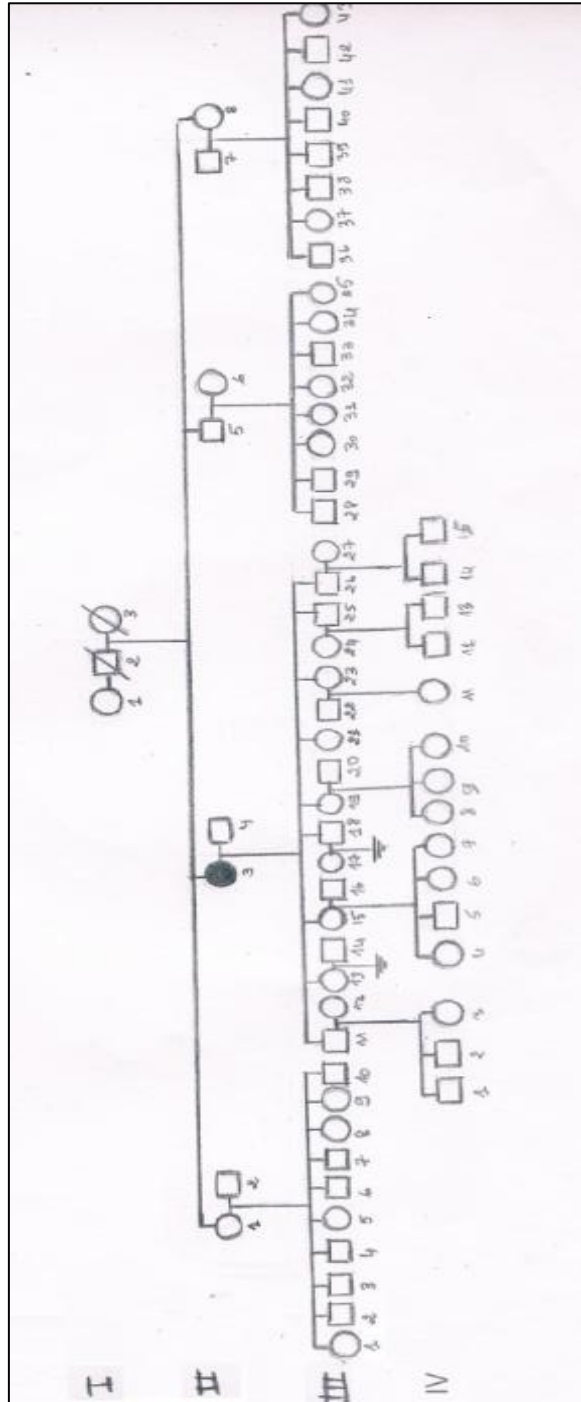
- **Arbre généalogique de la famille 1 :**



Les informations utilisées pour l'établissement de cet arbre généalogique ont été obtenues de la part du malade (l'individu II12).

Individu II 12 : de sexe féminin (B.Saadia), née le 30/04/1989 (27 ans), d'origine Tiaret, elle a été diagnostiquée d'un lymphome de Hodgkin de type I en stade IV en Novembre 2014.

- Arbre généalogique de la famille 2 :

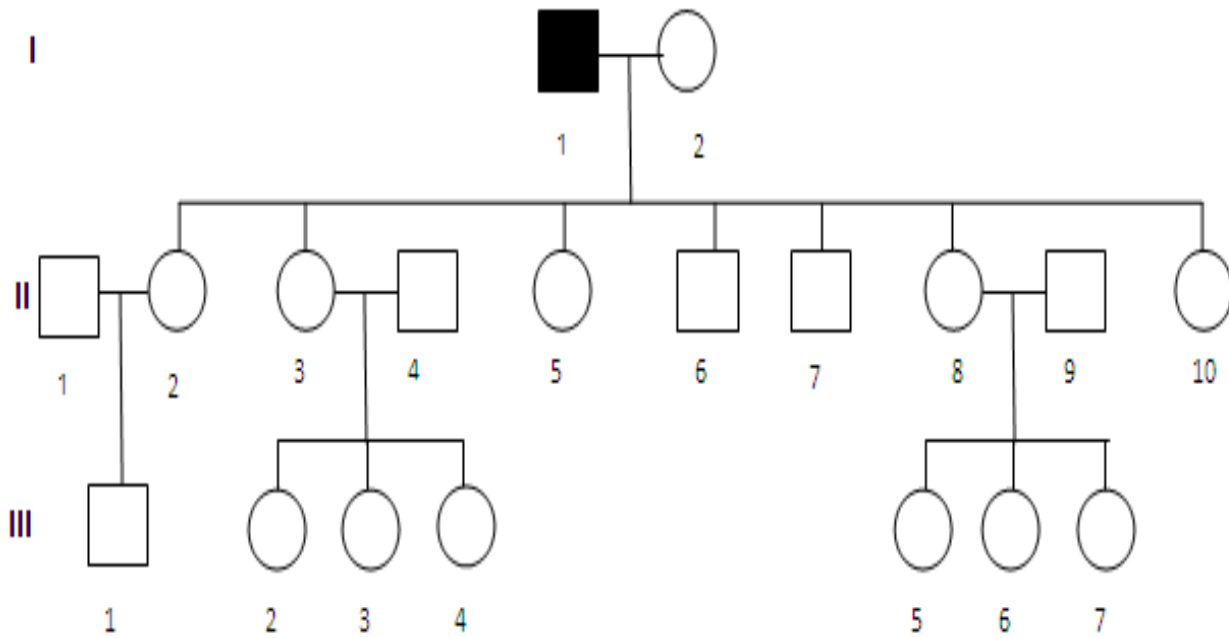


Les informations utilisées pour l'établissement de cet arbre généalogique ont été obtenues de la part de l'individu III 26 le fils de la malade II 3

Individu II 3 : de sexe féminin (B.Fatiha) ,agée 56 ans , d'origine Kolea, elle a été diagnostiquée d' un lymphome de Hodgkin de type II (scléro nodulaire) en stade IV en Avril 2016.

L'établissement de la IV génération est incomplet. Les individus non représentés sont tous sains.

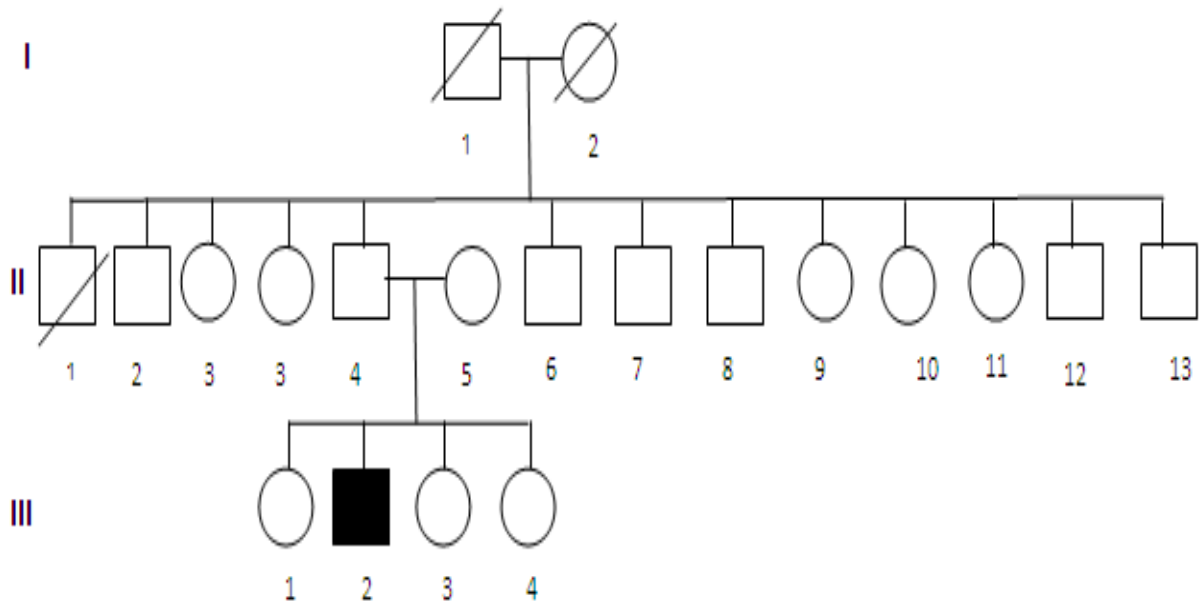
- **Arbre généalogique de la famille 3 :**



Les informations utilisées pour l'établissement de cet arbre généalogique ont été obtenues de la part du malade I 1.

Individu I 1 : de sexe masculin (Z.Aissa) ,né le 11/01/1953 (63 ans), d'origine Blida, il a été diagnostiqué d'un lymphome de Hodgkin de type II , scléro-nodulaire en Mars 2016

- **Arbre généalogique de la famille 4 :**

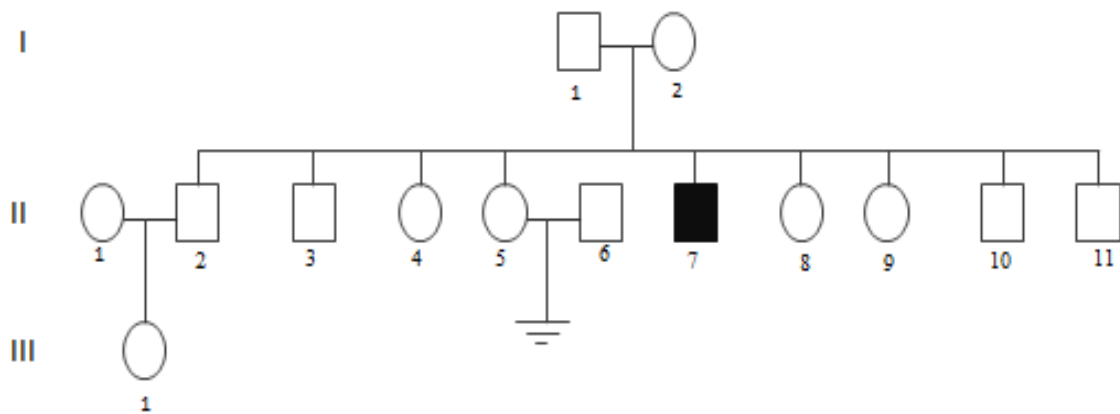


Les informations utilisées pour l'établissement de cet arbre généalogique ont été obtenues de la part du père (individu II 4) du malade III 2.

Individu III 2 : de sexe masculin (F.Adel) ,née le 01/06/1997 (19 ans) , d'origine Blida, il a été diagnostiqué d'un lymphome de Hodgkin de type II scléro- nodulaire en stade IV en Juin 2015.

L'établissement de la génération II et III est incomplet. Les individus non représentés sont tous sains.

- **Arbre généalogique de la famille 5 :**

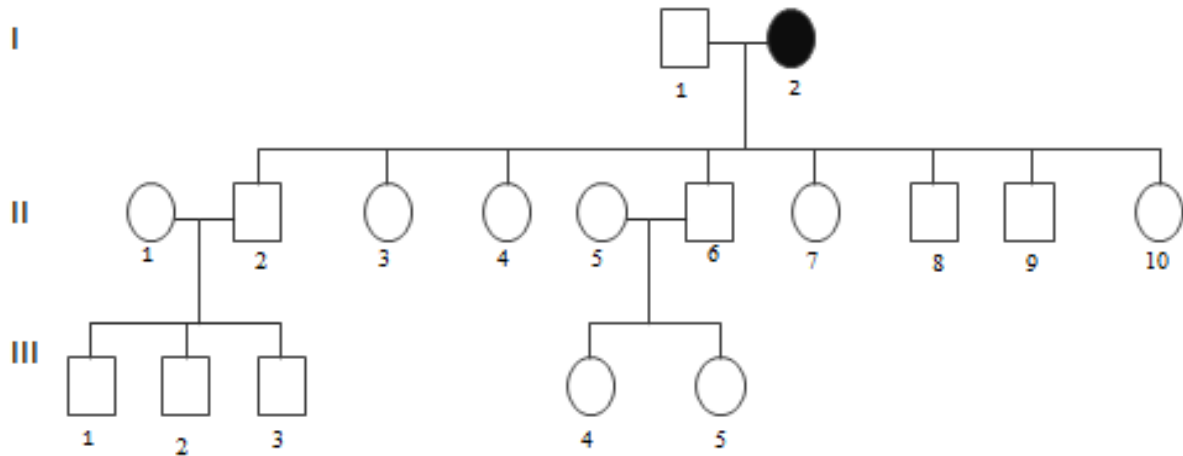


Les informations utilisées pour l'établissement de cet arbre généalogique ont été obtenues de la part du père (individu I 2) du malade II 7.

Individu II 7 : de sexe masculin (B.A/Rezak) , agé 19 ans , d'origine Blida, il a été diagnostiqué d' un lymphome de Hodgkin de type II scléro -nodulaire en stade IV en Novembre 2014.

L'établissement de la génération I est incomplet. Les individus non représentés sont tous sains.

- **Arbre généalogique de la famille 6:**

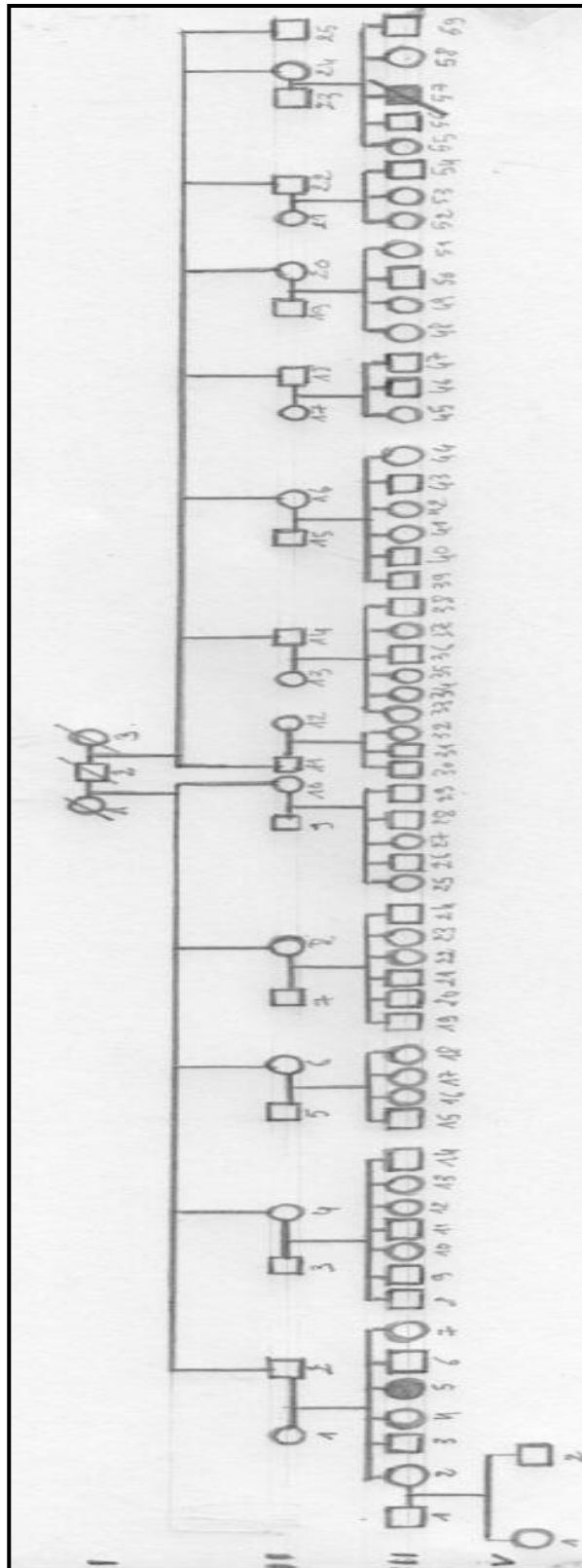


Les informations utilisées pour l'établissement de cet arbre généalogique ont été obtenues de la part de la fille (individu II 7) du malade I 2.

Individu I 2 : de sexe féminin (H.Aicha), née le 04/04/1957 (59 ans), d'origine Tissemsilt , elle a été diagnostiquée d' un lymphome de Hodgkin de type III a cellularité mixte en stade II en 2014

L'établissement de la génération I est incomplet. Les individus non représentés sont tous sains.

- Arbre généalogique de la famille 7:



Les informations utilisées pour l'établissement de cet arbre généalogique ont été obtenues de la part du malade III 5.

Individu III 5 : de sexe féminin (M.Gamra) ,agée 23 ans , d'origine Tissemsilt , elle a été diagnostiquée d'un lymphome de Hodgkin de type III en Décembre 2015.

Discussion :

Le LH est une forme de cancer qui touche le système lymphatique (une prolifération lymphoïde), appartenant à la grande catégorie des lymphomes depuis la classification de l'OMS des maladies hématologiques en 2001. Et d'après les résultats de notre étude, il est plus fréquent chez les femmes que chez les hommes avec un sexe ratio légèrement en faveur de la femme, (0.78 environ) ce qui est nouveau, dont l'incidence baisse chez l'homme (44%) mais augmente dans les années récentes chez la femme (56%). Ceci convient avec ce qui était décrit par **Morère et al, 2011**(sex- ratio : 0.92environ dans la population française) .Cette situation, posera alors la question de l'existence de facteurs de risque spécifique chez la femme. Comme il survient beaucoup plus rarement chez les enfants, le nombre de patients augmente avec l'âge, et relativement souvent entre l'âge de 20 à 39 ans avec presque 52%. Et avec un âge moyen estimé de 30 ans.

L'atteinte est majoritairement ganglionnaire périphérique, le plus souvent de topographie cervicale estimée par 58.06 % et avec une faible fréquence de topographie inguinale, médiastinale ou axillaire .Les 33.87 % représente également des atteintes ganglionnaires dont le siège n'était pas précisé. 4 cas n'ont pas été présentés car il ne s'agit pas des adénopathies, par contre une atteinte osseuse (PBO) dans le cadre d'un bilan d'extension.

Sur le plan histologique, l'architecture ganglionnaire de LHc est effacée par une prolifération nodulaire faite de grandes cellules mono et/ou multinucléées (HRS, RS, lacunaire), disposées au sein d'un stroma inflammatoire hétérogène non néoplasique, qui selon les cas, il s'agit de lymphocytes, de plasmocytes, de polynucléaires neutrophiles et éosinophiles, d'histiocytes et de fibroblastes, et plus ou moins une fibrose. Les cellules malignes apparaissent de grande taille, avec de grands nucléoles semblables à des inclusions, une membrane nucléaire épaisse avec un halo périnucléolaire, un cytoplasme abondant éosinophile ou amphophile dont la morphologie varie de la cellule de RS classique, au noyau polylobé, jusqu'à la cellule de HRS, avec un gros noyau monolobé. Les cellules de RS peuvent prendre un aspect caractéristique, lacunaire, à cause de la rétraction du cytoplasme formant un halo périnucléaire

Les deux sous types de LHc se différencient sur le plan morphologiques par :

-Le sous type sclérosant nodulaire :Il possède une architecture nodulaire, des bandes de sclérose cernant ces nodules, et des cellules tumorales en particuliers les cellules lacunaires. Ces cellules lacunaires ont des lobes plus petits et des nucléoles moins proéminents.

-Le sous type à cellularité mixte : où il n'existe pas de sclérose nodulaire.

Le type classique est le plus représenté, plus de 92% de cas, avec une dominance du sous-type scléro-nodulaire avec presque 70%, suivi par le sous-type de cellularité mixte, puis le riche en lymphocytes, et finalement par le sous-type à déplétion lymphocytaire avec 1,52% seulement. Il n'existe aucun cas dans notre échantillon représentant le deuxième type le LHNPL, et ceci est due à sa rareté.

L'histologie est convaincante lorsqu'on observe à la fois des cellules malignes caractéristiques au sein des cellules réactionnelles.

La reconnaissance morphologique des cellules de RS est nécessaire pour le diagnostic mais nonsuffisante, dans ce cas la, il faut avoir recours à l'IHC pour déterminer le profil d'expression protéique membranaire des cellules malignes.

Sur le plan immunophénotypique, et comme dans LH habituel, les cellules HRS et RS exprimaient les Ags CD15 et CD30. Avec un marquage cytoplasmique granuleux, membranaire et parfois sous forme d'un signal paragolgien pour le premier (CD 15), et avec un marquage membranaire pour le deuxième (CD 30).

Le marqueur le plus utile est le CD15 qui est exprimé dans 75 à 85 % des cas (**Goldman et Schafer, 2013**), et dans notre étude dans 83% des cas.

Le plus connu des Ag porté par la cellule de RS est l'Ag CD30 et qui est exprimé dans environ 71,20 % des cas. Cet Ag est un récepteur pour le ligand des cytokines CD30L, et pourrait également jouer un rôle dans la régulation de la croissance et de la transformation cellulaire. Le CD30 n'est pas spécifique de la cellule de RS; il apparaît aussi sur des cellules lymphoïdes activées, mais habituellement pas sur les cellules monocytaires et macrophagiques. Il existe des cellules Sternberg-like dans certains lymphomes malins non hodgkiniens en particulier les lymphomes anaplasiques ou dans certains processus non lymphomateux, réactionnels « MNI » ou tumoraux.

L'étude IHC montre que la protéine membranaire de latence LMP1, d'origine virale, marque avec un caractère granulaire le cytoplasme des cellules de HRS et de RS dans 60% des cas. La détection de la protéine de latence LMP1, peut apporter une aide et orientation diagnostic qui sera en faveur d'un LH.

Le LMP1 n'est pas identifié dans les cellules lymphocytaires bénignes. Le signal est parfois apparu dans les éosinophiles (Faux positifs), mais ces dernières peuvent être distinguées de cellules HRS/RS par la taille de la cellule et le noyau, la forme et le caractère granulaire de cytoplasme (**Gulley et al, 2002**).

Vue que l'expression de cette protéine au niveau des cellules tumorales est parfois négatif pour des raisons techniques ou biologiques, une combinaison de cette technique immunohistochimique avec HIS a la sonde EBER semble être nécessaire pour l'identification des LH liés a l'EBV.

En outre, l'ARN EBV-codé (EBER1 et EBER2) est exprimé en abondance, bien que les transcriptions de l'EBERs sont non polyadénylé et restent non traduits. L'HIS d'EBER a été donc recommandée comme le meilleur test pour la détection et la localisation de l'EBV latent dans les échantillons tissulaire (**Gulley et al, 2002**).

A cause d'absence de réactif, 9 cas seulement ont été testés, et parmi ces derniers, la technique n'a été réussie que dans uniquement 4 cas, à cause d'un problème de technique non contributive.

L'EBER était positif dans 2 cas avec un signal localisé dans le noyau, et négatif dans 2 autres cas, ce qui renforce les résultats obtenus par l'IHC détectant LMP1 (présence ou absence de l'EBV).

Les cellules lymphocytaires bénignes qui ont exprimés la protéine LMP1 ont exprimés le transcrit EBER, ce qu'est peut être en rapport avec une infection latente de ces lymphocytes non tumoraux.

Outre l'aide diagnostic apporter par cette identification des LH liés a l'EBV chez les patients, un éventuel bénéfice de thérapie oncologique ciblée pourra être discuté.

Selon certaines études, la liaison de ce LH lié a l'EBV peut être un facteur pronostic qui peut influencer la survie, d'où l'intérêt de cette détection combinée de l'EBV (LMP1 et EBER).

L'examen des six premières généalogies montre qu'il n'existe pas une transmission ni verticale ni horizontale de la maladie, dont dans chacune on n'observe qu'un seul individu

malade avec des antécédents et descendants sains .En revanche, dans la septième famille, on observe 2 malades dans la même génération (la troisième génération) : les individus III 5 et III 57 .Mais avec le manque des informations sur tout les individus de la première génération, cela ne confirme ni n'infirmes la transmission de la maladie .

D'après ces observations et d'après l'explication de **Pr.Babis, 2006** le lymphome de Hodgkin est une maladie qui est rarement transmissible. Il semble y avoir un risque plus élevé de lymphome de Hodgkin dans les proches de patients atteints de cette maladie. Le risque est d'environ 3à 5 fois supérieure à celle de la population générale (**Babis, 2006**) (**Goldman et Schafer, 2013**). Cela ne veut pas clairement dire que la transmission de la maladie est due à une prédisposition génétique, mais elle pourrait être liée à l'exposition socio-économique et environnementale similaires parmi les membres de la même famille (à savoir l'alimentation, l'environnement, etc.), mais un risque héréditaire existe, étant donné que l'incidence de la maladie de Hodgkin dans la population américaine est seulement d'environ 2 Personnes sur 100.000, le risque parmi les membres de la famille proche ne se lève que pour 6-10 sur 100.000, ce qui est toujours un risque très faible (**Babis, 2006**).

Le lymphome de Hodgkin résulte dans la majorité des cas de l'action d'une cause extérieure dont l'infection par le virus d'Epstein Barr qui représente 50 % des cas, ce qui induit au dysfonctionnement de plusieurs gènes dont les gènes des immunoglobulines .Alors il s'agit de l'apparition d'une mutation à l'échelle individuelle des gènes dans les cellules tumorales (cellules de RS, cellules de Hodgkin, lacunaires). La transmission de la mutation reste toujours non élucidée.

Conclusion

Le LH est un lymphome qui est rarement transmissible, lié au sexe et l'âge pour des raisons qui sont encore inconnues, il survient initialement dans les ganglions lymphatiques en particulier avec une atteinte cervicale.

Le LHc est le type majoritaire dont le sous type scléro-nodulaire est abondant d'une manière très remarquable dans une population atteinte.

Le diagnostic de ce lymphome nécessite à la fois un test histologique et IHC. La cellule de RS et HRS sont les cellules caractéristiques exprimant les marqueurs CD30 et CD15. La détection du virus EBV est également importante pour montrer son incrimination dans le mécanisme de la cancérogénèse.

La détection exacte de la présence ou de l'absence de l'EBV nécessite, l'utilisation de la technique d'IHC pour la détection de la protéine de la latence LMP1 suivie par une confirmation par la technique d'HIS-CISH pour la détection des transcrits EBERs.

Références bibliographiques

- Abad M.T.(2009).Epidémiologie de la maladie de Hodgkin en Algérie .Revue Algérienne d' Hématologie : Sous l'égide de la société Algérienne d'Hématologie et de Transfusion Sanguine. N°1.P :8-10.
- Babis A (2006).Penn medecine 1994. disponible sur Internet :<http://www.oncolink.org>
- Bedossa,A.(2006).Le virus Epstein-Barr et les marqueurs de l'infection :Cahier de formation de biologistes. Bioforma,Paris.
- Bonnet.A et Bernard.S .(2015). Hodgkin lymphoma. .John Libbey. Vol 21. N° 5.P :130.
- Brice.P.(2012).Le lymphome hodgkinien. John Libbe.1ere édition.ParisSection 2 :1-18
- Brousset P.Rousset P.Meggeto F.Knecht H.Schlaifer D.Mariame B.Selves J.Bibeau F. Delsol G.(1995).Implication du virus d'Epstein-Barr dans la maladie de Hodgkin. John Libbey. Vol 1. N° 3.P : 219-26.
- Cuervo .S.(2003). Le lymphome de Hodgkin et le virus d'Epstein-Barr : une possible association.... John Libbey. Vol 7. N° 6.P :465.
- CytoTest Inc. (2013).9430 Key West Avenue.Suite 210.Rockville.MD 20850.USA disponible sur Internet : <http://www.cytotest.com>
- Darby I.A. et Hewitson T.D. (2006). In situ hybridization protocols. 3^e édition.New Jersey.P :116
- Depil S et Morales O et Auriault C.(2004). Maladie de Hodgkin et virus d'Epstein-Barr : physiopathologie et perspectives thérapeutiques. Ann Biol Clin.Vol 62. N° 6.P :639-648.
- Emile J.F et Leteurtre E et Serge.(2012).Pathologie générale : Enseignement thématique biopathologie tissulaire.Guyétant.2^e édition.France.P :28-29
- Francés C et Guillot.B et Guilhou.J.J.(2008).Manifestations dermatologiques des maladies infectieuses,métaboliques et toxiques.Springer.Paris.P31.P :20-21.
- Germe R et Baccard.M et Seigneurin.J.M et Morand.P.(2011). Infections à virus Epstein-Barr.Elsevier Masson.. Article 8-070-K-10.P :1.
- Goldman L et Schafer A.I.(2013). Cecil medicine :Cancérologie.24^e édition.Italie.P : 99,115-117

- Gros Jean.J et Clavé.D et Archambaud.M et Pasquier.C.(2009).Bactériologie et virologie pratique.De boeck .1ere édition.Paris.P :225.
- Gulley M.L et Glaser S.L et Craig F.E et Borowitz M et Mann R.B et Shema S.J et Ambinder R.F.(2002).Guidelines for Interpreting EBER In Situ Hybridization and LMP1 Immunohistochemical Tests for Detecting Epstein-Barr Virus in Hodgkin Lymphoma.117.P:159-267.
- Hamdi.L et Creidy.R et Raphae.M et Khelifa.R et Krzysiek.R et Besson.C.(2013). Lymphopénie et lymphome de Hodgkin : impact pronostique et physiopathologie. John Libbey. Vol. 19. N° 5.P :334.
- Hudnall D.S.(2014).Viruses and human cancer.New York. P :9
- Huraux.J.M et Nicolas.J.C et Agut.H etPeigue-La feuille.H.(2003).Traité de virologie médicale.ESTEM.P :92.
- InfoCancer .(2015).Lymphomes Hodgkiniens (maladie de Hodgkin). France . disponible sur Internet : <http://www.arcagy.org/>
- Institut national du cancer.(2014).Le lymphome hodgkinien.France. disponible sur Internet : <http://www.e-cancer.fr/>
- Kurth J et Hansmann M.L et Rajewsky K et Kiippers R.(2003). Epstein-Barr virus-infected B cells expanding in germinal centers of infectious mononucleosis patients do not participate in the germinal center reaction. Vol 100.No. 8.P : 4730-4735
- Lefrère F.(2008). Hématologie et transfusion.6^e édition.France.Paris.P :139
- Lemée.E.(2014). Place du brentuximab vedotin adcetris dans le traitement du lymphome de Hodgkin. disponible sur Internet : <https://books.google.dz/>
- Leroy .K et De Cremoux.P.(2014).Anomalies moléculaires des cancers :ciblage thérapeutique. John Libbey.Pris. P :27-30.
- Marelle L et Rea.D et Raphael.M.(1993).Le virus d'EBV et les proliférations lymphoïdes.Medicine/science.Vol 9. N° 6-7.P :694,695,697.
- Margaret L et Gulley et Weihua T.(2008).Laboratory assays for Epstein-Barr virus related :Journal of molecular diagnostics.10(4).P: 279–292.
- Moore K.L et Dalley A.F.(2001).Anatomie médicale :Aspects fondamentaux et applications cliniques.4^e édition.France :36
- Morère J,F et Mornex F et Soulières D.(2011).Thérapeutique du cancer .2^e édition.France.P :793

- Ola Idowu M et Dumer C.I et Garret C.T (2015).Molecular oncology testing for solid tumors :A pragmatic approach.P :306
- Raphael.M et Feuillard.J.(2000). Rôle du virus d'Epstein-Barr dans la maladie de Hodgkin. John Libbey. Vol. 6. N° 1.P :9-11
- Salmeron G.(2010).Physiopathogénie du lymphome de Hodgkin.Hématologie. John Libbey. Vol. 16. N° 3.P :253-259.
- Seigneurin J.M. Fafi-Kremer S.Baccard M. Morand P.(2006).Le virus Epstein-Barr et les marqueurs de l'infection :Cahier de formation.Biologie médicale.BIOFORMA,Paris.N°36 .P :10-12.
- Seigneurin J.M .(1997). Infection à virus d'Epstein-Barr chez l'immunodéprimé : physiopathologie et méthodes d'analyse. Virologie .John Libbey. Vol 1. N° 5.P :391-402.
- Slack J.(2004).Biologie du développement.1^{er} édition.P:125
- Solal Celigny P et Brousse N et Ferme C et Gisselbrecht C et Reyes F et Coiffier B .(1997).Lymphomes (Lymphomes non Hodgkiniens – maladie de Hodgkin).3^e édition.France.P :19
- Stephan,J.L et Galambrun.C et Pozetto.B.(2000).Les infections par le virus d'Epstein-Barr. John Libbey. Vol 3. N° 3.P :1.
- Tagu D et Moussard C.(2003). Principes des techniques de biologie moléculaire.2^e édition.Paris.P :36
- Thierry.E.(2014). Etudes fonctionnelles et structurales des complexes H_elicase-Primase du virus Epstein-Barr.HAL.P :9.

ANNEXES

Annexe I :

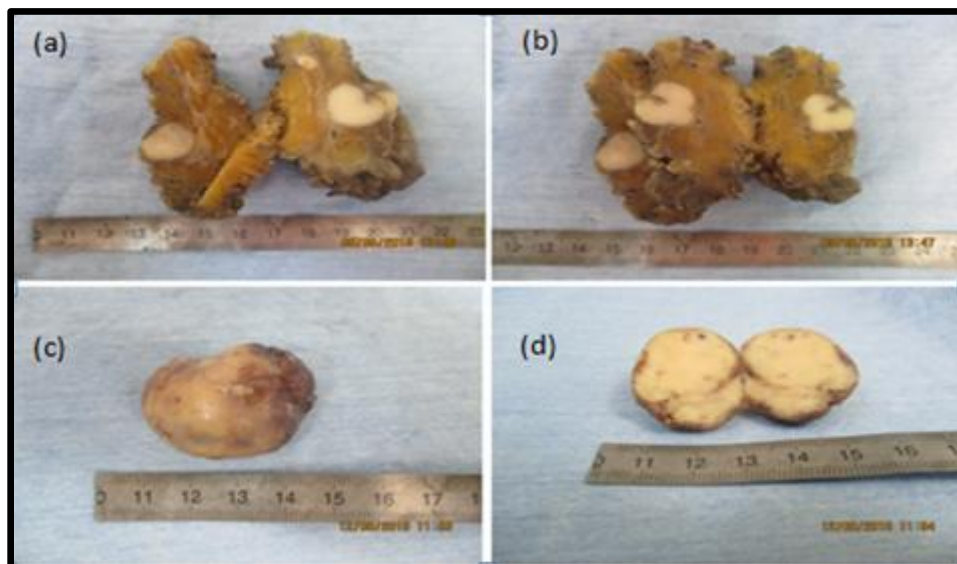


Figure 1 : Biopsie ganglionnaire : (a) (b) ganglion axillaire gauche ; (c) (d) ganglion cervicale droit

Annexe II :

1. ROUTINE				
Réactif	Durée (h:min)	Temp	P/V	Temp...
Formol	01:00	37	P/V	
Eau de traitement	00:02	-	-	
Éthanol (70%)	00:40	45	-	
Éthanol (80%)	00:40	45	-	
Éthanol (95%)	00:40	45	-	
Éthanol (100%)	00:45	45	-	
Éthanol (100%)	01:00	45	-	
Éthanol (100%)	01:15	45	-	
Xylène	00:45	45	-	
Xylène	01:00	45	-	
Xylène	01:15	45	-	
Paraffine	01:00	65	v	
Paraffine	01:00	65	v	
Paraffine	01:30			

02/06/2016 14:48

Figure2 : La durée de chaque bain dans le circulateur

Annexe III :



Figure 3 : L'inclusion de l'échantillon par la paraffine : (a) biopsies disposées dans des cassettes numérotées ;(b) distributeur de la paraffine liquide ;(c) durcissement de la paraffine sur la plaque froide

Annexe IV :

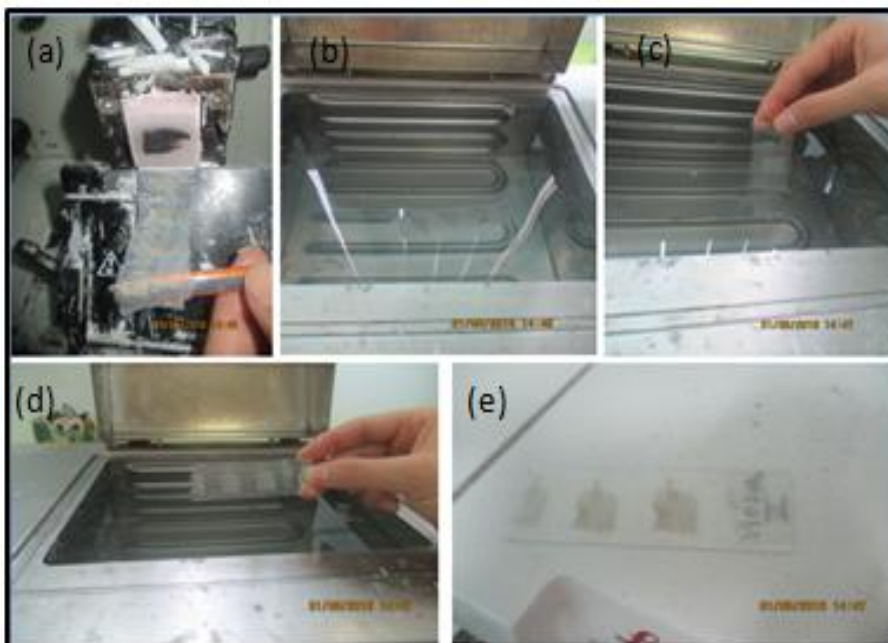


Figure 4 : Réalisation et étalement des coupes : (a) Formation du ruban à l'aide d'un microtome ;(b) (c) (d) Étalement de la coupe à l'aide d'un bain marie ; (e) numérotation de la lame par un crayon

Annexe V :

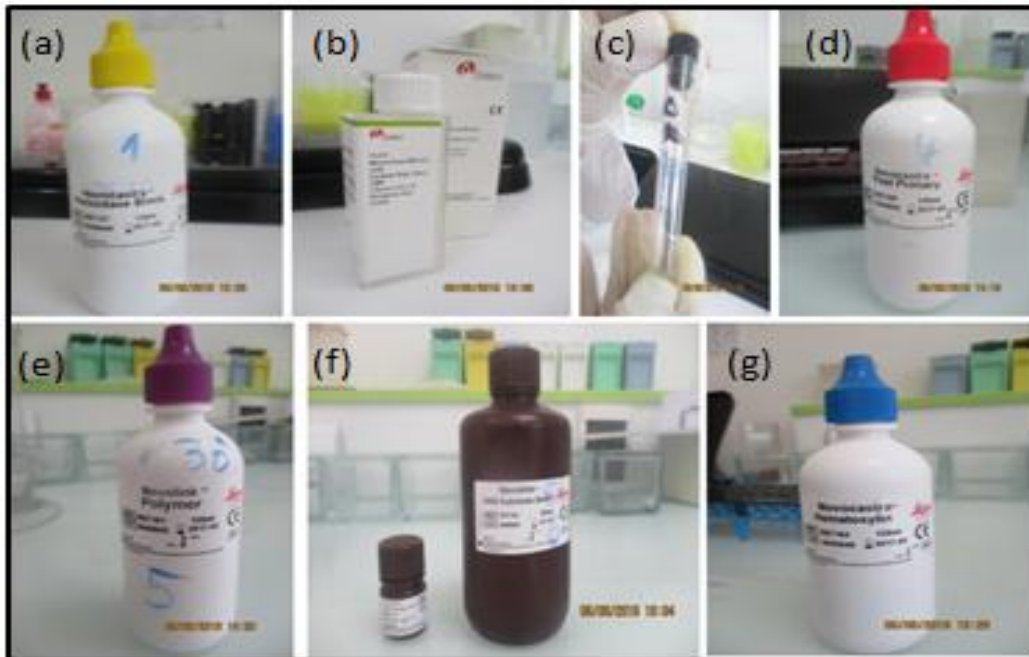


Figure 5 : Les produits utilisés dans la technique d'IHC : (a) peroxydase ;(b) Anti EBV-LMP1 ; (c) Anti CD30 ; (d) post primary ;(e) polymère ;(f) DAB ; (g) Hématoxyline

Annexe VI :

Protocole détaillé de l'automate pour la CISH :

Protocole N° 72 :EBER (18/04/2016)

Procédure : U INFORM Iview Blue ISH (v1.02.0023)

BenchMark ULTRA IHC/ISH Staining Module

Ventana Medical Systems,Inc ;1910 Innovation Park Drive Tucson,Arizona USA.

Étape N° Désignation des étapes

- 1-Activer les stations de mixage
- 2-Désactiver les stations de mixage
- 3-(Régler la température à 72 °C par défaut)

- 4-Chauffage des lames jusqu'à (72Deg C) à partir de températures moyennes(Déparaffinage)
- 5-Incuber 4 minutes
- 6-Déposer/Ajuster volume EZ Prep
- 7-Rincer la lame avec EZ Prep
- 8-Déposer/Ajuster volume EZ Prep
- 9-Déposer l'huile de paraffine
- 10-Rincer la lame avec EZ Prep
- 11- Déposer/Ajuster volume EZ Prep
- 12-Déposer l'huile de paraffine
- 13-Rincer la lame avec EZ Prep
- 14-Déposer Depar Volume Adjust
- 15- Déposer l'huile de paraffine
- 16-Activer les stations de mixage
- 17-Chauffage des lames désactivé
- 18-Point de pause (zone de chargement)
- 19- Rincer la lame avec EZ Prep
- 20-Ajuster le volume sur la lame avec EZ Prep
- 21-Appliquer CC Coverslip Long
- 22-Chauffage des lames jusqu'à 36 Deg C
- 23-Déposer 450µl d' EZ Prep
- 24-Déposer Cell Conditioner #2
- 25- (Régler la température à 86 °C par défaut)
- 26-Chauffer la lame(à 86 °C),et incuber 4 minutes (avec tampon CC2 (Cell Conditioning #2)
- 27- Déposer Cell Conditioner #2
- 28-Incuber 8 minutes
- 29- Chauffage des lames désactivé

- 30-Incuber 4 minutes
- 31-Rincer la lame avec Reaction Buffer
- 32-Déposer 450 µl de Reaction Buffer
- 33- Déposer l'huile de paraffine
- 34- Point de pause (zone de chargement)
- 35- Chauffage des lames jusqu'à 36 Deg C
- 36- Rincer la lame avec Reaction Buffer
- 37-Ajuster le volume sur la lame avec Reaction Buffer
- 38-Déposer une goutte de (ISH-PROTEASE 3) (Enzyme), Appliquer Coverslip, et
incuber(4minutes)
- 39- Rincer la lame avec Reaction Buffer
- 40- Ajuster le volume sur la lame avec Reaction Buffer
- 41- Déposer l'huile de paraffine
- 42- Point de pause (zone de chargement)
- 43- Rincer la lame avec SSC
- 44- Ajuster le volume sur la lame avec SSC
- 45- Déposer l'huile de paraffine
- 46- Rincer la lame SSC
- 47- Ajuster le volume sur la lame avec SSC
- 48- Appliquer CC Coverslip Long
- 49- Chauffer les lames à 50 DegC, et incuber 4 Minutes
- 50- Déposer 150 µL de SSC
- 51- Déposer une goutte de INFORM EBER et incuber 4 minutes
- 52- Chauffer les lames à 82 Deg C, et incuber 8 minutes
- 53- Chauffage des lames jusqu'à 55 Deg C
- 54- Incuber 1 Heure
- 55- Rincer la lame avec SSC

- 56- Ajuster le volume sur la lame avec SSC
- 57- Déposer l'huile de paraffine
- 58- Rincer la lame avec SSC
- 59- Déposer 450 μ L de SSC
- 60- Déposer l'huile de paraffine
- 61- Incuber 8 minutes
- 62- Rincer la lame avec SSC
- 63- Déposer 450 μ L de SSC
- 64- Déposer l'huile de paraffine
- 65- Incuber 8 minutes
- 66- Rincer la lame avec SSC
- 67- Déposer 450 μ L de SSC
- 68- Déposer l'huile de paraffine
- 69- Incuber 8 minutes
- 70- Rincer la lame avec SSC
- 71- Ajuster le volume sur la lame avec SSC
- 72- Déposer l'huile de paraffine
- 73- Chauffage des lames désactivé
- 74- Rincer la lame avec Reaction Buffer
- 75- Ajuster le volume sur la lame avec Reaction Buffer
- 76- Déposer l'huile de paraffine
- 77- Point de pause (zone de chargement)
- 78- Chauffage des lames jusqu'à 36 Deg C
- 79- Rincer la lame avec Reaction Buffer
- 80- Ajuster le volume sur la lame avec Reaction Buffer
- 81- Déposer une goutte de iVIEW ANTI-FLUOR, Déposer huile de paraffine, et incuber 20 minutes

- 82- Rincer la lame avec Reaction Buffer
- 83- Ajuster le volume sur la lame avec Reaction Buffer
- 84- Déposer l'huile de paraffine
- 85- Rincer la lame avec Reaction Buffer
- 86- Ajuster le volume sur la lame avec Reaction Buffer
- 87- Déposer une goutte de iVIEW BLUE BIOT, Déposer l'huile de paraffine, et incuber 8 minutes
- 88- Rincer la lame avec Reaction Buffer
- 89- Ajuster le volume sur la lame avec Reaction Buffer
- 90- Déposer l'huile de paraffine
- 91- Rincer la lame avec Reaction Buffer
- 92- Ajuster le volume sur la lame avec Reaction Buffer
- 93- Déposer une goutte de iVIEW BLUE SA-AP, Déposer l'huile de paraffine, et incuber 16 minutes
- 94- Rincer la lame avec Reaction Buffer
- 95- Déposer 300 μ L de Reaction Buffer
- 96- Déposer l'huile de paraffine
- 97- Rincer la lame avec Reaction Buffer
- 98- Ajuster le volume sur la lame avec Reaction Buffer
- 99- Déposer une goutte de iVIEW BLUE ENHAN, déposer l'huile de paraffine, et incuber 4 minutes
- 100- Déposer une goutte de iVIEW BLUE NBT et une goutte de iVIEW BLUE BCIP,et incuber 32 minutes
- 101- Rincer la lame avec Reaction Buffer
- 102- Ajuster le volume sur la lame Reaction Buffer
- 103- Déposer l'huile de paraffine
- 104- Rincer la lame avec Reaction Buffer
- 105- Ajuster le volume sur la lame avec Reaction Buffer

106- Déposer une goutte de (Red Stain II) (Contre-coloration), Appliquer Coverslip, et incuber (8minutes)

107- Rincer la lame avec Reaction Buffer

108- Ajuster le volume sur la lame avec Reaction Buffer

109- Déposer l'huile de paraffine

110- Rincer la lame avec Reaction Buffer

111- Ajuster le volume sur la lame avec Reaction Buffer

112- Déposer l'huile de paraffine

113- Chauffage des lames désactivé

114- Rincer la lame avec Reaction Buffer