

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE  
MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE  
SCIENTIFIQUE

UNIVERSITE SAAD DAHLEB-BLIDA-1-

FACULTE DES SCIENCES DE LA NATURE ET DE LA VIE

DEPARTEMENT DE BIOLOGIE ET PHYSIOLOGIE CELLULAIRE



En vue de l'obtention du diplôme de Master en biologie

**Option : Biosignalisation cellulaire et moléculaire, immunologie**

***L'intérêt de l'immunohistochimie dans le  
diagnostic du Lymphome Hodgkinien***

Par : **Nassima Belianta**

Devant le jury composé de :

Mme.Sour,S	chargé de cours U.S.D.B	présidente
Mme,.Herkat ,S	chargé de cours U.S.D.B	Examinatrice
Mme.Amokrane ,A	chargé de cours U.S.D.B	Examinatrice
Mme, Benkhedda,G	Professeur en anatomie pathologique	promotrice

Blida Octobre 2014

Résumé :

Lymphome de Hodgkin est une prolifération lymphomateuse maligne caractérisée par une infiltration de grandes cellule tumorale ; c'est la cellule de Reed sternberg, habituellement si rare (1 %), mais reste la base de diagnostic.

Les vraies difficultés d'interprétation posent dans la distinction entre modification réactionnelle témoignant d'une simple stimulation des lymphocytes, réaction inflammatoire et prolifération tumorale.

Pour cela le pathologiste à besoin pour confirmer leur diagnostic définitive la technique de l'immunohistochimie, cette technique permet de typer avec précision le phénotype et l'étape de différenciation du lymphome Hodgkinien.

Le marquage immunohistochimiques réaliser sur 49cas a montre que la cellule de Reed Sternberg ont un phénotype CD15+(100%des cas),CD30+(53.06%des cas),CD20+(8.16cas).

Mots clés :, Lymphome de Hodgkin ,cellule de Reed Sternberg , immunohistochimie CD15 ,CD30,CD20.



## ملخص

لمفوم هودجكن هو انتشار لمفاوي خبيث يتميز بتسلل خلايا سرطانية لمفاوية كبيرة تدعى خلايا ريد ستيرنبرغ عادة هي قليلة ( اقل من 1%). لكنها تبقى أساس التشخيص. صعوبة تشخيص المرض تتمثل في التفريق بين تغيرات تتمثل في تحفيز بسيط للمفاويات، تفاعل التهابي، تكاثر ورمي. لهذا المختص بحاجة إلى تأكيد تشخيصه عن طريق تقنية الفحص المناعي الكيمونسيجي، هذه التقنية تقدم لنا بدقة النمط الظاهري وحالة تمايز لمفوم هودجكن. الوسم المناعي الذي اجري على 49 حالة قد أظهر أن خلايا ريد ستيرنبرغ لها نمط ظاهري: CD15+ (100% من الحالات)، CD30+ (53.06% من الحالات)، CD20+ (8.16% من الحالات).

كلمات البحث: لمفوم هودجكن، خلية ريد ستيرنبرغ، الكيمونسيجي المناعي، .  
CD20، CD30، CD15

## Liste des figures, graphiques et tableaux :

Figure1 : structure d'un thymus.....	3
Figure2 : Représentation schématique d'un ganglion lymphatique.....	5
Figure3 : les aires ganglionnaires.....	6
Figure4 :la structure de la rate.....	7
Figure 5 :la structure tissulaire des amygdales.....	8
Figure6 :la structure tissulaire de la plaque de Peyer.....	9
Figure7 : le système lymphoïde chez l'homme.....	9
Figure8 : les cellules de tissu lymphoïde.....	12
Figure9 :l'aspect de la cellule de Reed Sternberg au microscope optique.....	17
Figure10 : Mécanisme implique dans la survie des cellules de Reed Sternberg.....	17
Figure11 :les interactions entre la cellule de Reed Sternberg et les cellules réactionnelles.....	18
Figure12 : lymphoprolifération lié au virus d'Epstein Barr.....	21
Figure13 : adénopathie médiastinale de lymphome Hodgkinien par TDM thoracique.....	23
Figure14 : classification d'AnnArbor.....	26
Figure15 :les blocs archivés.....	29
Figure16 principe de l'immunohistochimie.....	35
Figure17 : répartition des patients selon le sexe .....	36
Figure18 : répartition des patients selon l'âge.....	37
Figure19 : répartition selon les différents types histologiques en fonction de la classification OMS .....	38
Figure20: répartition des patients selon la présentation clinique.....	39

Figure21 : lymphome de Hodgkin classique .....	41
Figure 22 : forme scléronodulaire .....	41
Figure23 : forme à cellularité mixte.....	42
Figure24 : forme riche en lymphocytes.....	42
Figure25 : forme à déplétion lymphocytaire.....	43
Figure 26 : forme à prédominance lymphocytaire.....	43
Figure27 :immunomarquage au CD30.....	44
Figure28 :immunomarquage au CD15. ....	44

**Liste des tableaux :**

<b>Tableau1</b> : les différentes classifications histologiques du lymphome Hodgkinien..	15
<b>Tableau2</b> : classification d'Ann Arbor.....	25
<b>Tableau3</b> : les facteurs pronostiques.....	27
<b>Tableau4</b> : répartition des cas selon la positivité de marquage.....	38

## Liste des abréviations

BALT: Tissu lymphoïde associé aux bronches

Bcl x :B cell lymphoma x

Bcl 2 :B cell lymphoma 2

BCR : B cell receptor

CD :classe de différenciation.

CFD : cellule folliculaire dendritiques

CMH: complexe d'histocompatibilité humaine

EBV : virus d'Epstein -Barr

Fas: Fatty acid synthase.

GALT: Tissu lymphoïde associée à l'appareil digestif

GM-CSF :Growth macrophage –stem cell factor

HCV: virus de l'Hépatite C.

HTLV: virus T lymphotrophique humaine

IkB $\alpha$ : inhibitor of NFkB.

IPS: score pronostique internationale.

LDH: Lactate déshydrogénase.

LHNPL: lymphome de Hodgkin nodulaire à prédominance lymphocytaire

LMP1: latent membrane protein-1

LHC: lymphome de Hodgkin classique

LHNPL: lymphome de Hodgkin nodulaire à prédominance lymphocytaire

LMP1: latent membrane protein-1

LHC: lymphome de Hodgkin classique

LHC-SN : lymphome de Hodgkin - scléronodulaire

LHC-CL: lymphome de Hodgkin – cellularite mixte

LHC-RL: : lymphome de Hodgkin- riche en lymphocyte

LHC-DN: lymphome de Hodgkin classique- déplétion lymphocytaire

MALT: mucosal associated lymphoid tissue

MGF: macrophage growth factor

NFkB: Nuclear Factor kappaB.

NIK: NFkB inducing kinase

ORL:Oto-rhino-laryngologie.:

RMN: résonance magnétique nucléaire.

SCF: stem cell factor.

TEP-FDG: Tomographie par émission de positons au 18 fluorodéoxyglucose.

TNF: tumor necrosis factor

TRAF3:TNF-receptor Associated Factor.

VCA: anticorps anti capside de EBV

VIH: virus immunodéficience Humaine

VS: vitesse de sédimentation



# SOMMAIRE

<b>INTRODUCTION.....</b>	<b>1</b>
--------------------------	----------

## **CHAPITRE1 : DONNEES BIBLIOGRAPHIQUES**

<b>1)Le Système immunitaire.....</b>	<b>2</b>
<b>1-1)Le Système lymphatique.....</b>	<b>2</b>
<b>1- 1-1)Les organes lymphoïdes primaires.....</b>	<b>2</b>
1) Moelle osseuse.....	3.
2)Thymus.....	3
<b>1- 1-2)Les organes lymphoïdes secondaires.....</b>	<b>4</b>
1) Ganglion lymphatique.....	4
2)La rate.....	6
3) tissu lymphoïdes associées aux muqueuse.....	7
<b>1- 2) Les lymphocytes.....</b>	<b>10</b>
<b>1- 2-1) origine et rôle des lymphocytes .....</b>	<b>10</b>
<b>1- 2-2) Les lymphocytes B.....</b>	<b>10</b>
<b>1-2-3) Les lymphocytes T.....</b>	<b>11</b>
<b>1-2-4) Les marqueurs de différenciation.....</b>	<b>11</b>
<b>1-3) le Lymphome de Hodgkin.....</b>	<b>13</b>
<b>1-3-1) Historique.....</b>	<b>13</b>
<b>1-3-2) Définition.....</b>	<b>13</b>
<b>1-3-3) Epidémiologie.....</b>	<b>13</b>
<b>1-3-4) les signes cliniques.....</b>	<b>14</b>
<b>1-3-5) Les classifications histologiques.....</b>	<b>15</b>

1-3- 6) la physiopathologie de la maladie de Hodgkin classique .....	16
1-3-7) Les moyens de diagnostic.....	22
1-3 8) Les facteurs pronostiques.....	27
1-3-9) traitement.....	27

## **CHAPITRE II : MATERIELS ET METHODES**

<b>II- 1)MATERIELS.....</b>	<b>29</b>
• Matériel biologique.....	29
• Matériel non biologique.....	29
<b>II-2)METHODES.....</b>	<b>30</b>
1) Etude rétrospective .....	30
2) Etude histologique.....	31
3) Etude immunohistochimique.....	32

## **CHAPITRE III : RESULTATS ET DISCUSSION**

• Résultats .....	36
• Discussion.....	45
• <b>CONCLUSION</b> .....	<b>48</b>

### **REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES**

### **ANNEXES**

## INTRODUCTION

Les lymphomes sont des maladies prolifératives se développant au niveau des ganglions ou d'autres tissus lymphoïdes.(Pauline et al,2008).

Deux grands groupes sont distingués : les lymphomes de Hodgkin et lymphomes non Hodgkiniens, ils se différencient par leurs caractéristiques histologiques, évolutives et thérapeutiques. (Pauline et al,2008)

Le lymphome Hodgkinien est une maladie du système immunitaire. Il est donc important de comprendre comment ce dernier fonctionne pour comprendre ce que sont le lymphome et sa prise en charge thérapeutique. (Pauline et al,2008)

Le lymphome (maladie) de Hodgkin est caractérisé par la présence de grosses cellules atypiques, les cellules de Reed –Sternberg, les lymphomes non Hodgkiniens (LNH) résultent des proliférations de cellules tumorales issues des lymphocytes B(type le plus courant),lymphocytes T(CD4 ,CD8) ou NK.(Salles et al,2012).

Le diagnostic histologique du lymphome Hodgkinien est porté sur la présence de cellule de Reed Sternberg dans une architecture ganglionnaire particulière.(Salles et al,2012).

La classification en stade dit de "Ann Arbor" est un élément de pronostic indispensable à laquelle viennent s'ajouter d'autres caractéristiques (âge, vitesse de sédimentation,..) (Jean et al,2005).

C'est en fonction de ces éléments pronostiques que les modalités thérapeutiques seront précisées, faisant appel généralement à une association chimiothérapie et radiothérapie (traitement combinés).(Jean et al,2005).

Notre objectif est de déterminer les aspects morphologiques grâce à la technique de l'immunohistochimie en utilisant le panel d'anticorps CD30, CD15, parfois CD20 chez nombre des patients atteints de lymphome de Hodgkin.(Jean et al,2005).

**I/Le système immunitaire :**

Malgré les attaques externes et internes répétées, la plupart des gens demeurent en bonne santé pendant la majorité de leur vie. Quand nous tombons malade, c'est généralement de façon temporaire et nous sommes en mesure de guérir en un temps relativement court. Notre capacité à résister aux attaques extérieures et aux mutations internes dépend largement de notre *système immunitaire*.(Pauline,2008).

**I-1/Le système lymphatique :**

Le système lymphatique fait partie du système de défense de l'organisme. Il protège le corps des maladies et des infections, et représente la partie la plus importante du système immunitaire. Le système lymphatique est constitué d'une série de petits tubes fins appelés *vaisseaux lymphatiques* qui se ramifient dans tout le corps. Les vaisseaux lymphatiques transportent la *lymphe*, un liquide qui contient des globules blancs appelés *lymphocytes*. Au sein du large réseau de vaisseaux lymphatiques, on trouve des groupes de petits organes en forme de haricots que l'on appelle les *ganglions lymphatiques*.(Pauline,2008).

Il existe des milliers de ganglions lymphatiques dans presque tous les endroits du corps, notamment les coudes, l'aîne, le cou et les aisselles. La lympe est filtrée par les ganglions lymphatiques et un certain nombre d'organes spécifiques tels que la rate. Les, amygdales, la moelle osseuse et le thymus.(Pauline,2008).

**I-1-1) Les organes lymphoïdes primaires :**

Sont la moelle osseuse et le thymus, ils donnent naissance aux deux populations de lymphocytes B et T..ainsi, les précurseurs de ces lymphocytes naissent dans la moelle osseuse et une partie migre dans le thymus se différenciant en lymphocyte T ; l'autre partie reste sur place y subissant une différenciation en lymphocytes B. (Brice,2009).

### 1) Moelle osseuse :

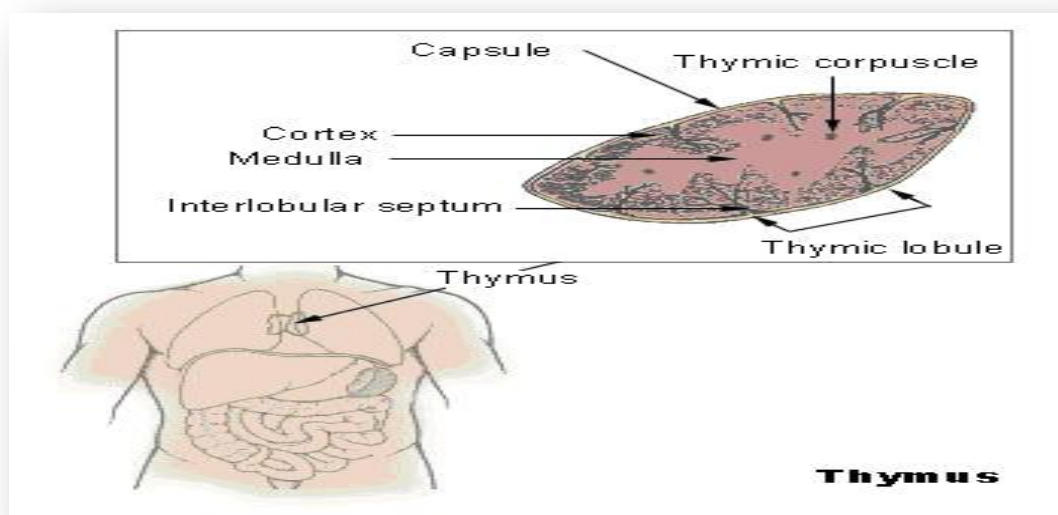
Elle est le siège de l'hématopoïèse et la différenciation des lymphocytes B, elle assure la multiplication et prolifération des cellules au contact des cellules réticulaires primitives et synthèse des cytokines.

Grand nombre de cellules meurent par apoptose phagocytées par les macrophages quelques uns des B se transforment en plasmocytes .Les lymphocytes B matures quittent la moelle en traversant la paroi des sinus veineux.(Brice,2009).

### 2) Thymus :

C'est un volumineux organe lymphoïde aplati situé dans la partie antéro-supérieure du médiastin et à la partie basse du cou. Il comporte deux lobes divisés en nombreux petits lobules.(Brice,2008).

Ceux-ci sont colonisés par des lymphocytes. Les cellules épithéliales du thymus fournissent non seulement une charpente, elles assurent une fonction de «nourrice» en favorisant la différenciation, la prolifération, et la maturation des sous populations cellulaires( Brice,2008).



**Figure1** : structure d'un thymus montrant le cortex et la médullaire des lobules .(Jeanet al,2007).

**I -1- 2) Les organes lymphoïdes secondaires :**

Sont ceux où les lymphocytes T et B migrent, se multiplient et réalisent leur maturation et leur transformation en cellules effectrices de la réaction immunitaire (Kohler,2012).

Ces organes lymphoïdes périphériques comprennent les ganglions lymphatiques, la rate, le tissu lymphoïde associé aux muqueuses (Poirier , 2011).

**1) Ganglion lymphatique :****1-1) Anatomie :**

Les ganglions sont des formations nodulaires dispersées le long des voies lymphatiques, ils sont regroupés dans plusieurs territoires superficiels (cervicaux, axillaires, inguinaux) et profonds (médiastinaux, mésentériques, iliaques...), ce sont des nodules réniformes, entourés d'une capsule fibreuse et possèdent un parenchyme divisé en deux parties, le cortex et le médullaire.

a) le cortex :

le cortex externe localisé en périphérie du ganglion et majoritairement constitué de lymphocytes B organisés en follicules. Avant toute stimulation, les follicules dits primaires sont formés de petites lymphocytes. Après stimulation antigénique, les follicules primaires se transforment en follicules secondaires, ces derniers comprennent chacun un centre germinatif caractérisé par la présence d'un réseau dense et complexe de CFD associé à une population lymphoïde B polymorphe majoritaire, des lymphocytes T (5% à 10%) et quelques macrophages sont également présents.

La paracortex correspond à la région thymodépendante ou prédominante des lymphocytes T, associés à des cellules histiocytaires dispersées, appelées cellules interdigitantes.

b) la médullaire :

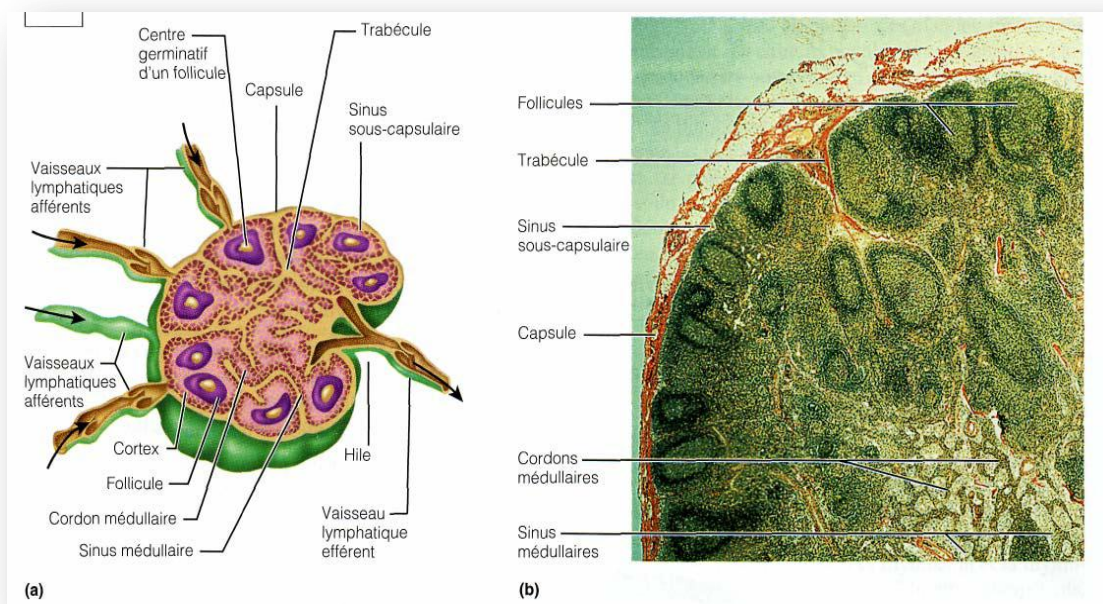
Il s'agit d'une zone riche en plasmocytes et macrophage, formée de cordons séparés par les sinus lymphatiques médullaires.

### 1-2) Vascularisation des ganglions :

Les ganglions sont alimentés par une double vascularisation lymphatique et sanguine des vaisseaux lymphatiques afférents abordent les ganglions par leur face convexe et se déversent dans les sinus périphériques puis médullaires collectés au sein d'un vaisseaux lymphatiques efférents , La circulation lymphatique permet la pénétration des antigènes dans les ganglions alors que la circulation sanguine consiste en une artère qui aborde le ganglion par le hile puis se divise en artérioles et capillaires qui irriguent la région périphérique des ganglions(Poirier,2011).

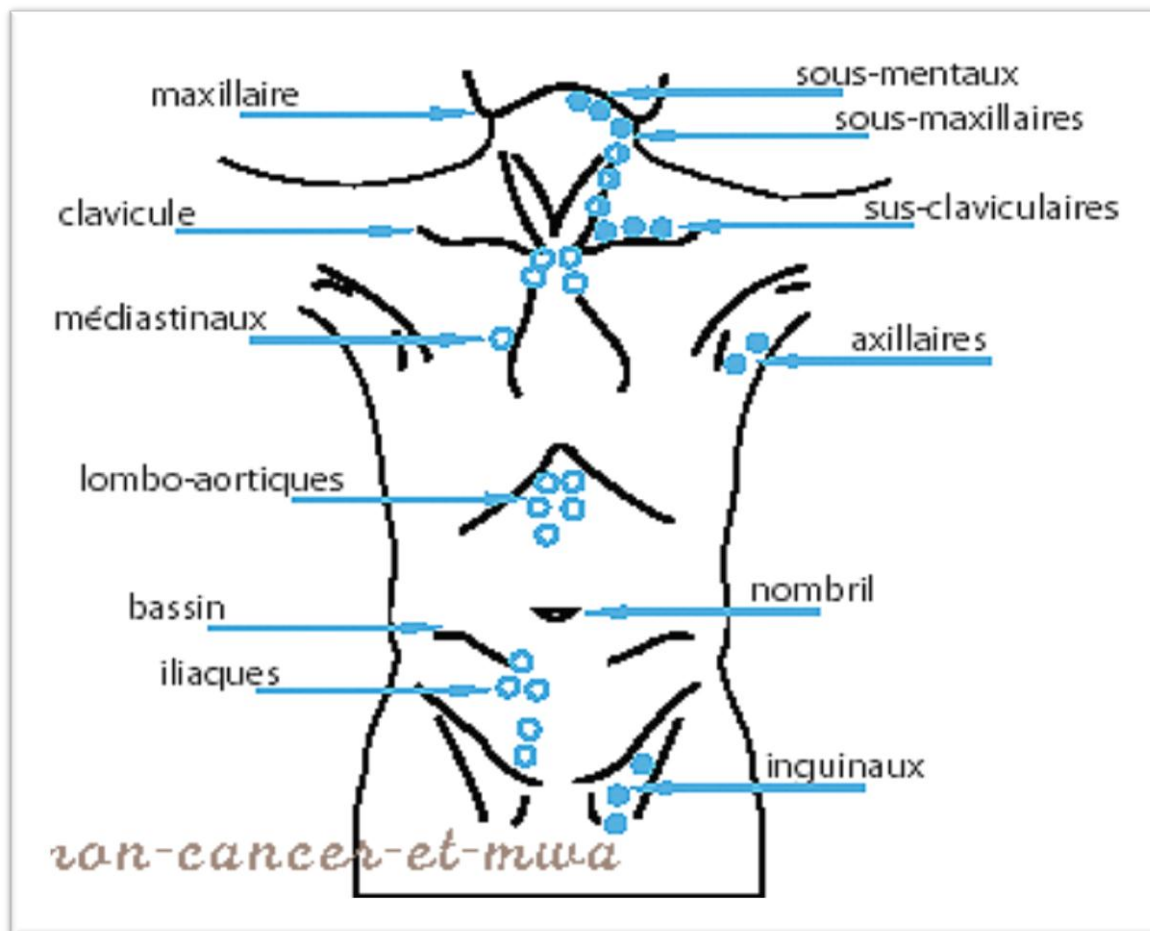
### 1-3)Physiologie :

Les ganglions lymphatiques sont les “stations d'épuration” du système lymphatique: ils rendent inoffensifs les agents pathogènes, notamment les bactéries et les virus. En outre, ils filtrent les déchets présent dans la lymphe, il assure l'initiation de la réponse immunitaire adaptative.(Kolhler,2012)



**Figure 2: (a) Coupe longitudinale d'un nœud lymphatique**

, **(b) Photomicrographie d'une partie d'un nœud lymphatique ((Poirier , 2011).**



**Figure3** : les aires ganglionnaires (Benoi ,2012).

## 2) Rate :

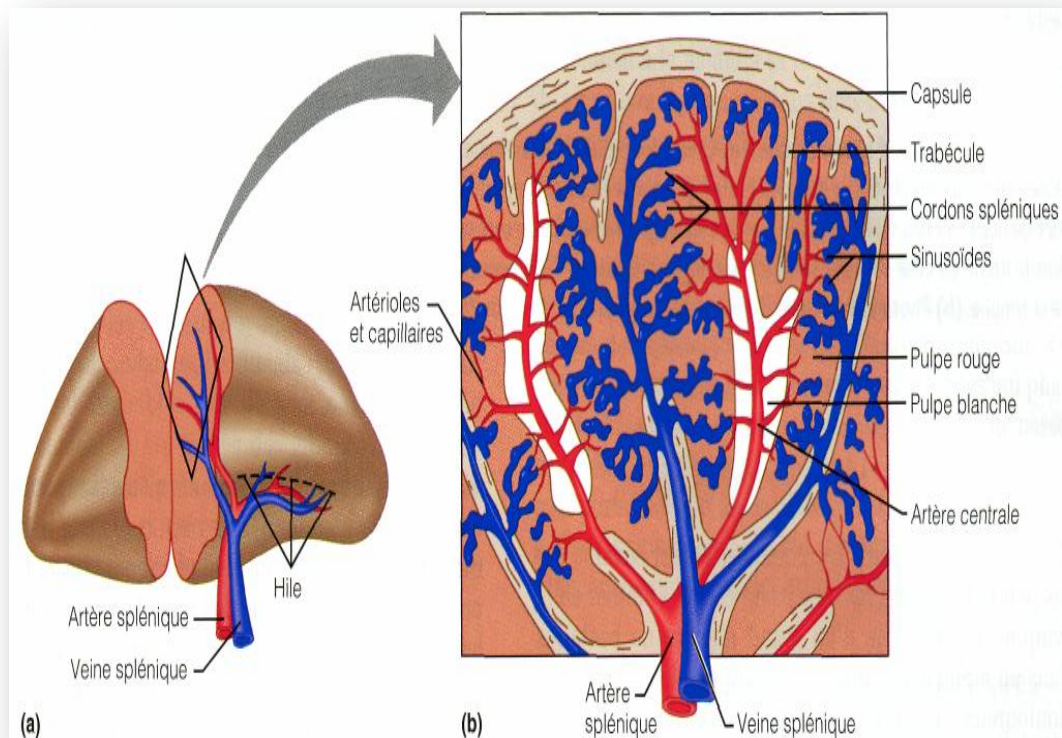
C'est un organe allongé entouré d'une capsule qui s'épaissit au niveau du hile, situé dans la partie supérieure gauche de l'abdomen, en dérivation sur circulation sanguine

. Deux fonctions essentielles :

. \* Développer une réponse immune dirigée contre les antigènes du sang : reconnaissance et capture des antigènes, différenciation des cellules immunocompétentes

\* Eliminer les substances particulières, les globules rouges âgés ou anormaux et les plaquettes. (Kolher,2012).





**Figure4** : ( a ):structure macroscopique, ( b ):représentation schématique de la structure histologique de la rate.(Jean et al,2012).

### 3) Formations lymphoïdes associées aux muqueuses :

Les muqueuses contiennent des formations lymphoïdes d'autant plus abondantes que le contact avec le milieu extérieur est facile à travers l'épithélium amenant une exposition avec les antigènes.(Kohler,2012).

La muqueuse digestive, respiratoire et uro génitale contient un tissu lymphoïde diffus ou des formations lymphoïdes bien individualisées :

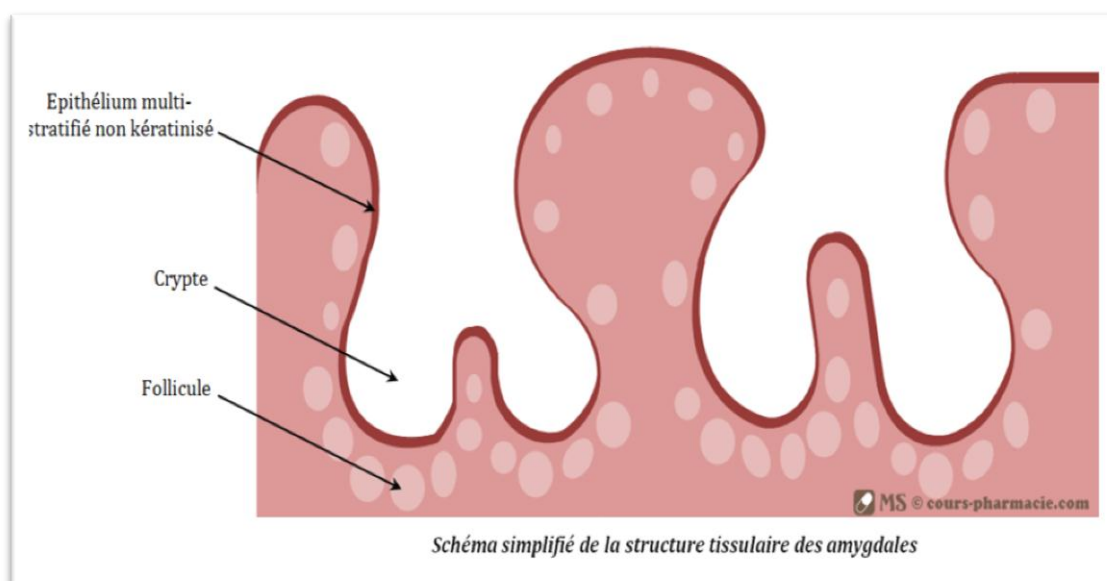
MALT (Mucosal Associated Lymphoïde Tissue) étroitement associé aux épithéliums de revêtement.

**3-1) Le GALT** ( Tissus Lymphoïdes Associées à l'appareil digestif) qui comprend notamment, les plaques de Peyer situées au niveau de l'iléon et l'appendice.

**3-2) Le BALT** ( Tissus Lymphoïdes Associées aux Bronches) situé dans la muqueuse des grosses voies aériennes (amygdales). (Kolher,2012).

**a) les amygdales :**

Constitue l'anneau ou cercle amygdalien de Waldeyer : tissu lymphoïde réparti en quatre groupes dont les amygdales palatines situées entre les piliers du voile du palais (les plus volumineuses), les amygdales tubaires (dans le pharynx), l'amygdale pharyngée (à la face postérieure du pharynx) et l'amygdale linguale (à la face dorsale de la langue) .(Jean et al,2007).



**Figure5** : la structure tissulaire des amygdales (Jean et al,2007).

**b) Les plaques de Peyer :**

Elles sont situées dans la muqueuse et la sous muqueuse de la paroi intestinale de l'iléon qui perd ses villosités à ce niveau.

Follicules lymphoïdes qui font saillie dans la lumière : chaque plaque en contient de 20 à 40 follicules lymphoïdes ; environ 250 plaques de Peyer chez l'homme. (Jean et al, 2007).

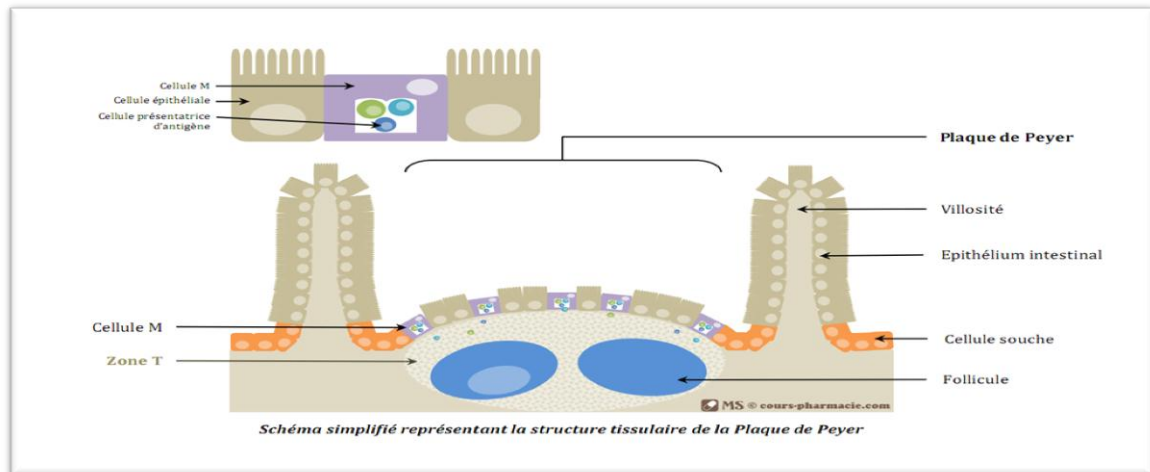


Figure6 : la structure tissulaire de la plaque de Peyer (Jean et al, 2007).

**c) l'appendice iléo-caecal :**

Revêtu par un épithélium de type colique, la sous muqueuse est envahi par de nombreux follicules lymphoïdes primaires et secondaires disposés sur toute la périphérie.

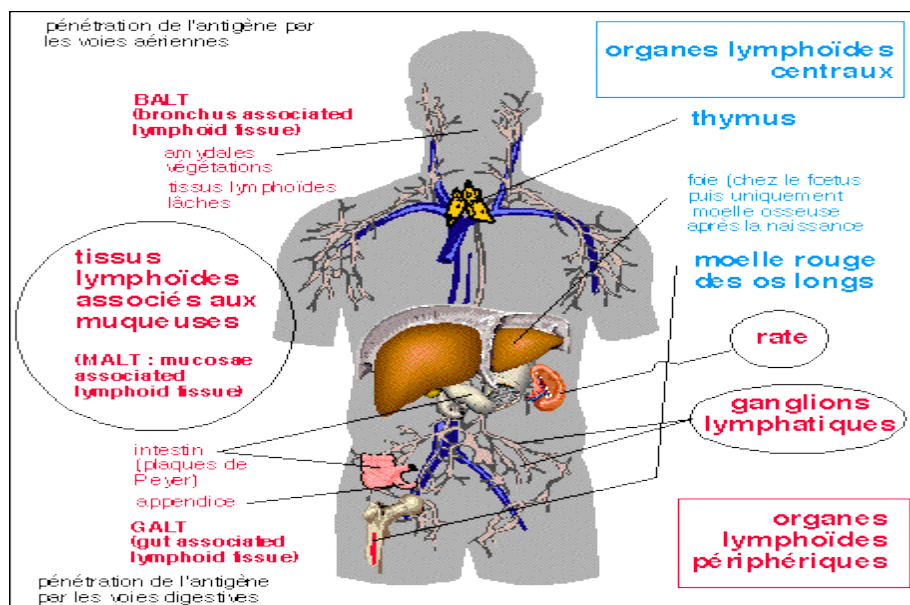


Figure7 : le système lymphoïde chez l'homme (Jean et al, 2007).

## **I-2) Les lymphocytes :**

### **I-2-1) Origine et rôle des lymphocytes :**

Les lymphocytes sont organisés en tissus et organes. Le corps humain contient environ  $1.10 \times 10^{12}$  lymphocytes, soit 2 % du poids du corps ; Ils constituent des formations anatomiques individualisées, au niveau de la moelle osseuse, du thymus, des ganglions, de la rate, des formations lymphoïdes annexées aux épithéliums digestifs et bronchiques.(Batteux et al,2012).

- Les lymphocytes sont les cellules centrales du système immunitaire. Ils assurent les fonctions essentielles d'identification de l'antigène participant avec les macrophages à la réaction immunitaire qui provoque la neutralisation et l'élimination des agents étrangers.(Batteux,et al,2012).

### **I-2-2) Les lymphocytesB :**

Dérivent de précurseurs de la moelle osseuse, mais subissent également une maturation dans la moelle. Les lymphocytes B se caractérisent par leur capacité de synthétiser des anticorps, glycoprotéines qui se lient à des antigènes spécifiques (Ferland et al,2012).

Ces glycoprotéines, aussi appelées immunoglobulines. Dans Certains cas, les immunoglobulines sont sécrétées et circulent dans le sang. Dans d'autres situations, elles restent fixées à la surface des lymphocytes B, où elles se comportent comme des récepteurs pour les antigènes, Une fois activée, la cellule B se divise par mitoses successives pour produire un clone de cellules, les plasmocytes, capables de synthétiser des immunoglobulines et lymphocytes mémoires.(Batteux al,2012)

### **. I-2-3)Les lymphocytesT :**

Les lymphocytes T immunologiquement immatures migrent de la moelle osseuse vers le thymus, où ils deviennent des lymphocytes T matures (thymodépendants).

Les cellules T immatures prolifèrent dans le thymus, où elles acquièrent différents marqueurs de surface pour devenir des lymphocytes matures quoique «naifs», aboutissant à la tolérance du soi, Des clones de cellules T matures peuplent ensuite les tissus lymphoïdes périphériques (ganglions, tissus lymphoïdes associés aux muqueuses et à la rate) ; de là, elles continuent à circuler dans le courant sanguin, à la recherche permanente d'antigènes.(Fermandt et al,2012).

\*Les lymphocytes T se répartissent en plusieurs sous-populations fonctionnelles :

– Cellules T auxiliaires ou T helper. Ces lymphocytes T « aident » les autres lymphocytes à réaliser leurs fonctions effectrices. La plupart portent le marqueur de surface CD4.(Fermandt et al,2012).

– Cellules T cytotoxiques. Ces lymphocytes tuent les cellules infectées par des virus et les cellules malignes. La plupart portent le marqueur de surface CD8.(Fermandt et al,2012).

#### **I-2-4) marqueurs de différenciation :**

Marqueurs identifiés et caractérisés à la surface des lymphocytes grâce à l'utilisation des anticorps monoclonaux.

##### **➤ Marqueur de différenciation des lymphocytes B :**

CD5 : Marqueur de différenciation de BCR

CD19 :co-récepteur du BCR

CD21:co-recepteur du BCR ;CR2

CD28:marqueur d'activation plasmocytes.

CD40:activation des cellules B

B220:isoforme de CD45

CD79 $\alpha$ . $\beta$ :molécule associée au BCR

CD80 : activation des cellules T(Penh,2009).

➤ **Marqueur de différenciation des Lymphocytes T :**

CD2 : molécule d'adhésion

CD3 : molécule associée au TCR

CD4 : co-récepteur pour CMH1

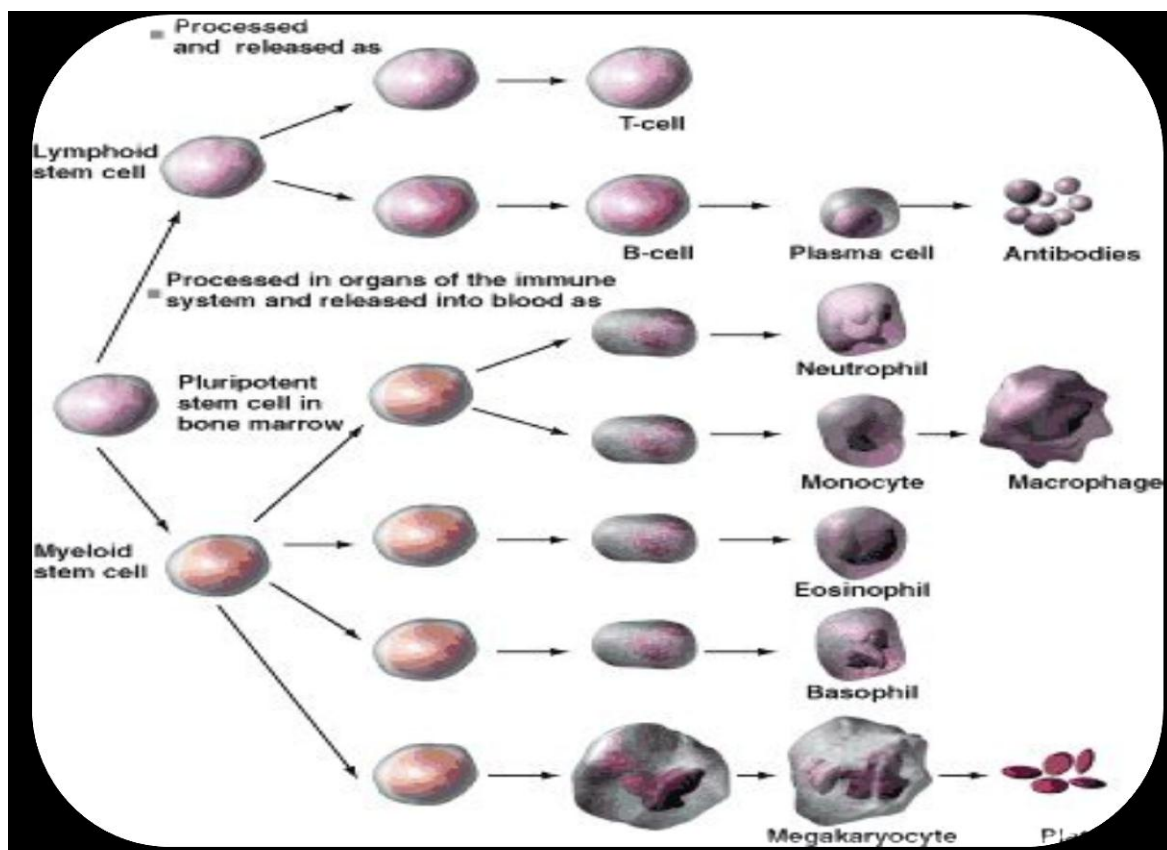
CD5 : modulation signalisation TCR

CD7 : costimulation

CD8 : co-récepteur pour CMH1

CD28 : activation des cellules T naïves

CD40L : activation des cellules B naïves (Penh,2009)



**Figure8 :** les cellules du tissu lymphoïde (Penh,2009).

**I-3)Le lymphome de Hodgkin :****1-3-1) Historique :**

La maladie tire son nom de Thomas Hodgkin, le médecin britannique qui l'a identifié pour la première fois en 1832, bien avant que l'existence et la fonction des lymphocytes n'aient été connues ; les médecins l'ont donc appelé la maladie de Hodgkin, puis lymphome Hodgkinien. En effet depuis qu'il est établi que la cellule d'origine est un lymphocyte B anormal, la maladie est considérée comme étant un type de lymphome.(Vassal,2003).

Toutes les autres formes de lymphomes sont appelées des lymphomes non-Hodgkiniens (LNH).(Vassal,2003).

Le lymphome Hodgkinien est un cancer relativement peu fréquent, il représente 1% de la totalité des cancers et 15% de l'ensemble des lymphomes, chaque année, de 1200 à 1500 nouveaux cas sont diagnostiqués en France.

**I-3-2) Définition :**

La maladie de Hodgkin est une maladie maligne du système lymphatique observée surtout chez l'adulte jeune, l'adolescent et le grand enfant. Elle se caractérise par une infiltration lymphocytaire pléomorphe de cellules géantes, multi nucléées (les Cellules de Reed-Sternberg). Ces cellules semblent issues de cellules B, incapables de synthétiser des immunoglobulines. Dans 1/3 des cas, on retrouve le virus d'Epstein-Barr dans les cellules tumorales. La maladie progresse préférentiellement par contiguïté via le système lymphatique.(Nicola ,2008).

Le lymphome Hodgkinien a été beaucoup plus étudié que tous les autres types de lymphomes. Cela a permis d'obtenir des avancées rapides dans le diagnostic et le traitement de cette maladie, et aujourd'hui plus de 80 % des patients atteints d'un lymphome Hodgkinien guérissent.(Nicola,2008).

**I-3-3) Epidémiologie de lymphome de Hodgkin :**

L'incidence de la maladie Hodgkin chez l'enfant de moins de 20 ans est de 12,1 par million. Elle est cependant rare chez l'enfant de moins de 15 ans (5 à 10% des cas) et reste tout à fait exceptionnelle avant l'âge de 2 ans. Son incidence augmente avec l'âge : elle est de moins de 1 par million chez les enfants de moins de 5 ans et de 32

par million chez les adolescents entre 15 et 19 ans. Il existe une prédominance masculine qui s'atténue avec l'âge : avant l'âge de 7ans, les filles sont rarement touchées alors qu'autour de la puberté, le sex-ratio tend vers 1.(Nicola ,2008).

Elle est 5 à 10 fois moins fréquente que les lymphomes non Hodgkiniens. L'origine de la cellule tumorale dans la maladie de Hodgkin a été longuement débattue, mais plusieurs travaux récents indiquent qu'un certain nombre de maladie de Hodgkin se développent à partir des lymphocytes de la lignée B.(Nicola,2008).

#### **I-3-4) les signes cliniques :**

Le plus souvent, le premier signe de la maladie de Hodgkin est un gonflement aisément palpable d'un ou de plusieurs ganglions lymphatiques au niveau du cou, de l'aisselle ou, plus rarement, de l'aîne. habituellement, ces gonflements ne sont pas douloureux.

Un gonflement des ganglions lymphatiques dans l'espace situé entre les deux poumons (médiastin) est également possible. Ceci peut engendrer des symptômes, comme par exemple une sensation d'oppression ou de la douleur dans la région du sternum. La maladie de Hodgkin est quelque fois associée à un ou plusieurs des symptômes suivants:

- alternance de poussées de fièvre et de périodes au cours desquelles la température est normale;
- perte de poids ou manque d'appétit.
- forte fatigue sans raison apparente.
- transpiration abondante, surtout la nuit.
- démangeaisons sur tout le corps.

Chez certains patients, les symptômes apparaissent dès le début de la maladie. Chez d'autres, ils ne se manifestent que plus tardivement, voir jamais. (Jagroff,2010).



**I-3-5) Classification Histologique :****Tableau1 : Les différentes classifications histologiques**

Jackson et Parker (1944)	Luker, Butler, Hicks (1966)	Classification révisée (Rye,1966)
Paragranulome Hodgkinien (5% des cas)	Type 1 : forme lympho-histiocytaire nodulaire	Type1 : forme à prédominance lymphocytaire (10% des cas)
	Type 2 : forme lympho-histiocytaire diffuse	
Granulome Hodgkinien (90% des cas)	Type3 : forme avec sclérose nodulaire.	Type2 : forme à scléronodulaire (50% des cas)
	Type4 : forme avec cellularité mixte	Type3 : forme avec cellularité mixte (35% des cas)
	Type 5 : forme avec fibrose diffuse .	Type4 : forme avec déplétion lymphoïde (5% des cas)
Sarcome Hodgkinien (5% des cas)	Type6 : forme réticulaire .	

(Blay et al ,2001).

**❖ Classification OMS(2008) :**

- Lymphome de Hodgkin nodulaire à prédominance lymphocytaire (LHNPL)
- Lymphome de Hodgkin classique(LHC) :
  - Forme sclérosante nodulaire (LHC-SN)
  - Forme à cellularité mixte (LHC-CM)
  - Forme riche en lymphocytes.(LHC-RL)
  - Forme à déplétion lymphocytaire.(LHC-DL)

(Gherradi.2010)

**I-3-6) Physiopathologie de la maladie de Hodgkin classique :**

Quelle que soit la localisation, on observe une prolifération des cellules malignes associées à un stroma riche en cellules inflammatoires (le granulome Hodgkinien).

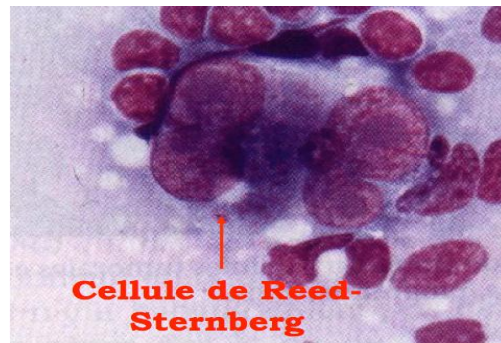
La tumeur associe à trois éléments :

- les cellules de Reed-Sternberg, dont la détection est nécessaire au diagnostic, sont des cellules de grande taille, à noyaux multiple ou unique mais polylobé, monstrueux, dont la chromatine est abondante et irrégulièrement disposée, avec plusieurs volumineux nucléoles. elles sont de nature lymphoïde B.
- les cellules de Hodgkin sont des cellules tumorales de grande taille présentant des anomalies nucléaires moins marquées que les cellules de Sternberg .
- le granulome Hodgkinien est fait de cellules normales, en proportion variée, associant des lymphocytes, des plasmocytes, des polynucléaires neutrophiles et éosinophiles, des fibroblastes, des histiocytes-macrophages(Les remaniements sont fréquents : nécrose, sclérose nodulaire).(Blay et al,2001).

**I-3-6-1) Définition de la Cellule de Reed Sternberg :**

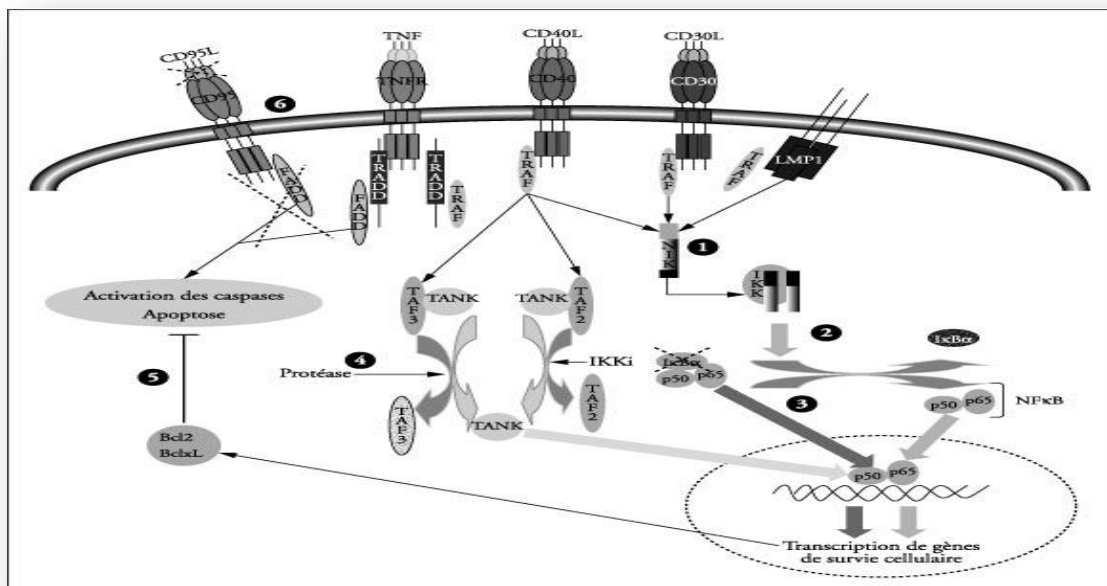
C'est une cellule géante d'environ 40µm de diamètre à noyau clair, mono ou parfois poly lobée avec un aspect en miroir ; pluri nucléole, les variantes cytologiques de la cellule de Sternberg peuvent aussi être rencontrées (cellule lacunaire ; cellule de Hodgkin ; cellule tumorale géante).(Blay et al.2001)

Le phénotype habituel des cellules de Sternberg dans la maladie de Hodgkin classique est caractérisée par l'expression de molécule de surface CD30 éventuellement des antigènes CD15 parfois ; CD20. (Blay et al.2001)



**Figure9** :l'aspect de la cellule de Sternberg au microscope optique  
(Grossissementx400)(Boint.2012)

### I-3-6-2) Mécanisme de pathogénie de cellule de Reed Sternberg :



**Figure10** : Mécanisme impliqué dans la survie des cellules de Reed Sternberg  
(Boint,2012).

- 1) CD30 ; CD40 ; LMP1 : activation de la voie NF kb en activant NIK.
- 2)IKB $\alpha$  mutée inactive perd son rôle inhibiteur NFkB.
- 3) anomalie de fonction de IKK induisent une phosphorylation aberrant de IKB qui libère NFkB.
- 4) dégradation de TRAF3 et libération de TANK activateur de NFkB.

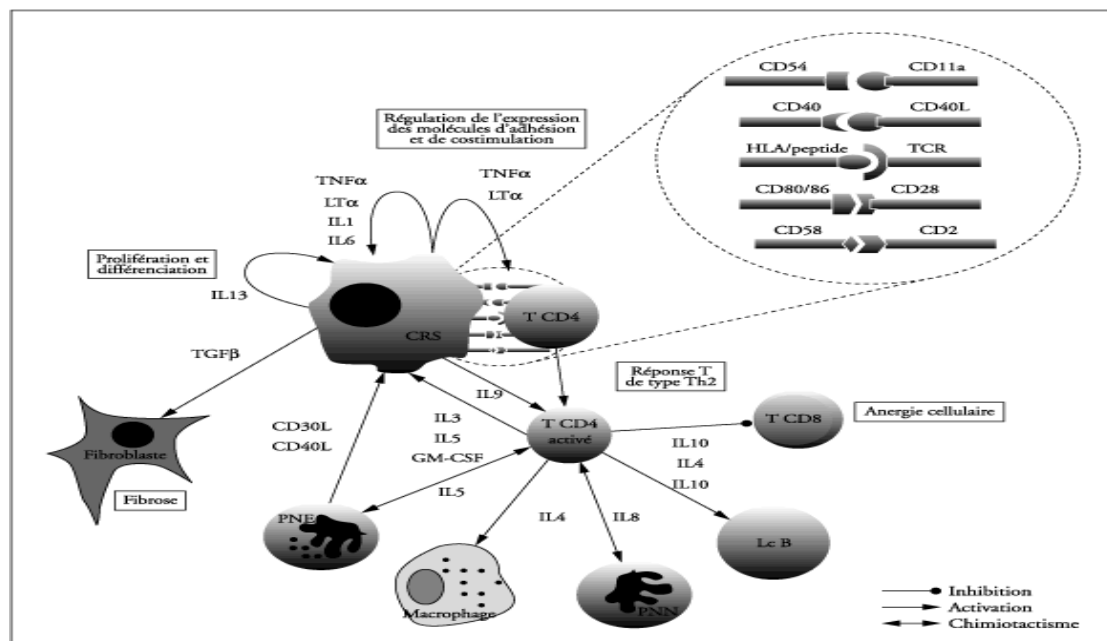
5) expression de molécule anti apoptotique.

6) absence d'expression de ligand de CD95 sur les lymphocytes environnant les cellules tumorale ou anomalie de transduction de signal apoptotique par le récepteur Ras.(Rubio et al .2001).

### a)Cytokines et facteurs de croissance

Les interactions des cellules de Reed-Sternberg avec leur environnement s'effectuent notamment par l'intermédiaire des cytokines et des facteurs de croissance.(Rubio et al .2001) L'apport de CD30L et de CD40L dans une culture de lignées de cellules de Hodgkin induit la prolifération des cellules tumorales en modifiant la sécrétion des cytokines (IL6, IL8, TNF et LT alpha) et l'expression en surface de CD54, CD80 et CD86(Rubio et al.2001).

De plus Pinto *et al.* Ont montré, *in vitro*, que les éosinophiles, recrutés et activés par les cellules de Hodgkin et de Reed-Sternberg, mais également par les cytokines sécrétées par les lymphocytes T (IL5, GM-CSF et IL3), sont munis de CD40L et de CD30L. Ils sont alors capables de transmettre des messages de prolifération, d'activation et de résistance à l'apoptose des cellules tumorales.



**Figure11** : interaction de la cellule de Reed Sternberg et les cellules réactionnelles (Boint ,2012)

**b) inhibition de l'apoptose**

L'expression des gènes des protéines anti-apoptiques de la famille bcl2 a été rapporté dans la maladie de Hodgkin. Alors que bcl2 a été détecté dans 44 à 53 % des cas,(Rubio et al .2001),bclx et Mcl1 l'ont été dans 88% à 100 % et Bax, inhibiteur de bcl2 et de bclx, semblerait moins exprimé que bclx, Mcl1 et bcl2 . Au total, 90 à 100 % des cas de cette maladie expriment une ou plusieurs protéines inhibitrices de l'apoptose.(Rubio et al.2001)

Le rôle anti-apoptotique du ligand de CD40, activant la molécule CD40 à la surface de la cellule de Reed-Sternberg, a été corrélé à l'induction de l'expression des protéines anti-apoptotique bclx et bcl2 .(Rubio et al .2001)

**c) Expression d'oncogènes :**

L'expression du proto-oncogène c-kit est apparue particulièrement élevée dans les cellules de Reed-Sternberg. C-kit est le récepteur membranaire du facteur de croissance( *stem cell factor*) (SCF) .(Blay et al .2001). Plusieurs autres oncogènes sont exprimés sans être associés à une amplification génique : c-fms, c-fps/ fes, c-myc, N-ras et MGF (*macrophage growth factor*) . La protéine p53 a été mise en évidence par des techniques immunohistochimiques au niveau des cellules de Reed-Sternberg. La présence d'une protéine p53 mutée est cependant controversée (Blay .2001).

**I-3-6-3) Rôle du virus d'Epstein-Barr :**

L'EBV a été mis en évidence dans certaines biopsies tumorales de maladie de Hodgkin. Il a été impliqué dans la physiopathologie de la maladie de Hodgkin (Herbercht et al,2006).

**a) Implication dans la maladie de Hodgkin :**

Le risque de développer une maladie de Hodgkin chez les patients ayant présenté un tableau de mononucléose infectieuse est estimé trois fois supérieur à celui d'une population témoin.

Les patients atteints de maladie de Hodgkin ont des taux élevés d'anticorps anti-capside de EBV (VCA). La clonalité du génome d'EBV a été montrée dans les cellules tumorales et les lymphocytes réactionnels. La présence d'un même clone au diagnostic et aux différentes rechutes a été rapportée. Les taux de détection dans la maladie de Hodgkin des sujets VIH-positifs sont proches de 100 % (Herbercht et al, 2006)..

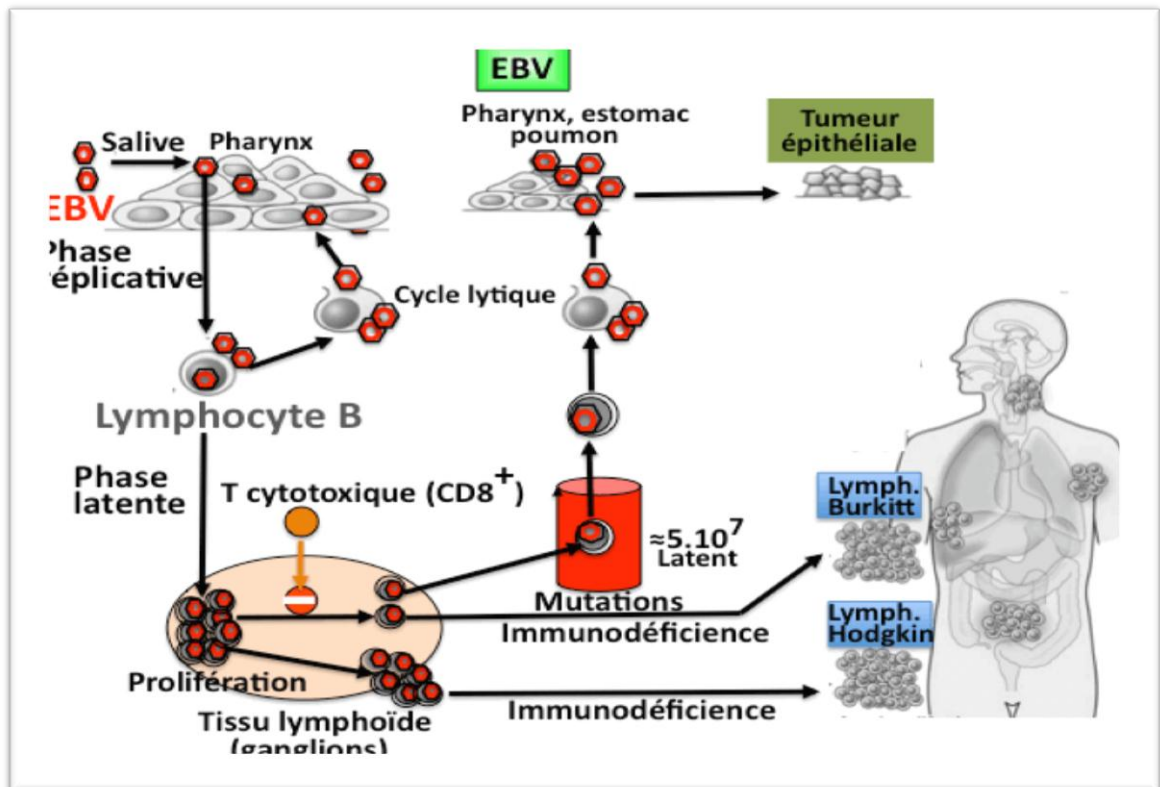
L'implication du virus varie avec *le type histopathologique, l'âge des patients*, leur *origine géographique* et l'existence d'un *déficit immunitaire secondaire* ou non à l'infection par le VIH : 50 à 75 % des formes à Cellularité mixte contre 10 à 30 % des formes scléronodulaire expriment le virus. (Herbecht et al, 2006).

#### **b) Lymphoprolifération liée au Virus d'Epstein-Barr (EBV) :**

Les lymphocytes B expriment à leur surface la molécule CD21, un récepteur du virus EBV. ce virus EBV est capable d'immortaliser des lymphocytes B après internalisation, celui-ci induit l'expression de protéines virales de latence dont la protéine LMP1 qui, exprimée à la surface des lymphocytes B infectés, transduit un signal d'activation, de prolifération et de survie. Les lymphocytes B infectées prolifère puis donnent des cellules « réservoirs » qui expriment la protéine virale LMP2a et persistent à vie dans l'organisme. L'infection est normalement contrôlée par des lymphocytes T cytotoxiques spécifiques.. (Lepuile et al 2010).

Ces cellules sont aussi caractéristiques de la primo-infection à EBV que représente la mononucléose infectieuse. Ce mécanisme de contrôle peut être pris en défaut s'il existe un déficit immunitaire T, primitif ou acquis, particulièrement au cours de l'infection HIV et des transplantations d'organe ou de cellules souches hématopoïétique, Les mécanismes par lesquels le virus EBV intervient dans la genèse des formes endémiques du "lymphome de Burkitt" restent mal connus. Un autre type de lymphome B favorisé 10 par l'EBV est représenté par environ 40% des maladies de Hodgkin. Dans ces cas, le clone de cellules de Sternberg dérive d'un lymphocyte B du centre germinatif qui aurait dû mourir par apoptose lors du processus de sélection

d'affinité mais qui a été sauvé par le signal anti apoptotique apporté par les protéines de latence LMP1 et LMP2 du virus.(Lepuile et al,2010).



**Figure 12 :** le rôle de virus d'Epstein Barr dans le lymphome de Hodgkin (Herbechtet al,2006).

➤ **Primo infection à l' EBV :**

- Pénétration du virus dans les cellules de l'épithélium.
- Multiplication des virus.
- Infection des LB, multiplication et prolifération via CD21.
- Réponse cytotoxique aspécifique puis spécifique: LT CD8 reconnaissant l'EBV.
- Constitution de réservoir de latence dans les LB mémoires
- Parfois le virus échappe au système immunitaire. où ré-infection des cellules épithéliales et transmission du virus.

### **I-3-7) Les moyens de diagnostic :**

#### **a) Les circonstances de découverte :**

La maladie de Hodgkin est révélée dans près de 4 cas sur 5 par une adénopathie périphérique indolore de siège cervicale ou sus claviculaire ,dans environ de 10% des cas elle est découverte devant des adénopathies médiastinales mises en évidence sur un cliché thoracique réalisé de manière fortuite ou à l'occasion de signes de compression (toux, dyspnée, douleurs). Enfin dans 10 à 20% des cas la maladie est révélée par la présence de signes généraux, tels que la fièvre ,une amaigrissement, des sueurs nocturnes et plus rarement d'un prurit. (Salles ,2012).

#### **b) interrogatoire :**

Outre les antécédents, facteurs de risque, circonstances d'installation, il précise les signes généraux dits signes d'évolutivité :

o Fièvre  $>38^{\circ}$  depuis  $>7$  jours

o Sueurs nocturnes profuses

o Amaigrissement supérieur à 10% du poids dans les 6 mois précédents.(Salles,2012)

#### **c) examen clinique :**

Inventaire et mensuration (pour analyse comparative de suivi) des aires ganglionnaire foie, rate, cavité buccale et anneau de Waldeyer, testicules, peau, sphère neurologique (Salles ,2012).

#### **d)examen Biologie :**

Aucun signe n'est obligatoire ni spécifique de lymphome :

o Signes inflammatoires (VS $>40$ , autres marqueurs)



o Hémogramme : +/- insuffisance médullaire, cellules Lymphomatoses circulants.

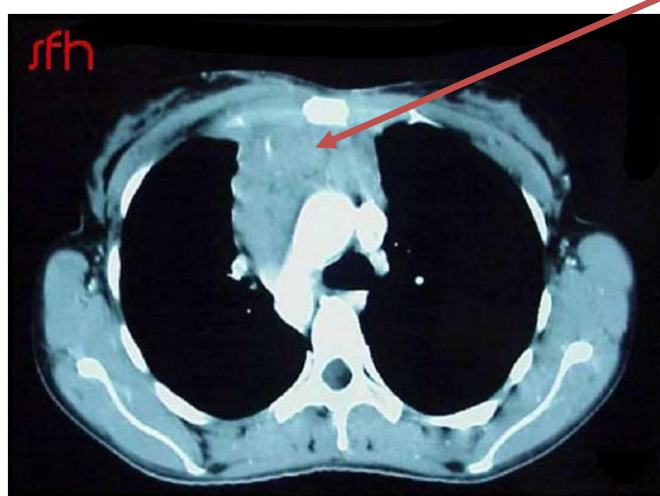
-Bilan biochimique : fonctions rénales et hépatiques, uricémie, Calcémie, LDH +++

- Bilan immunologique : électrophorèse des protides et immunofixation (+/- hypo ou hypergammaglobu- linémie, anomalie monoclonale, cryoglobuline), recherche dirigée d'auto-anticorps.

- Bilan sérologique : VIH, HCV, HTLV, EBV(Salles,2012).

**e) imagerie :**

Radiologie de thorax ; scanner ; RMN ; examen de la moelle osseuse, échographie échographie ;PET-scan(tomographie par émission de positons) ;ORL ;laparotomie (Lepuuil,2014).



Infiltrations  
ganglionnaires

**Figure13** : adénopathie médiastinale du lymphome Hodgkinien par TDM thoracique.(Romina,2013).

**\*Radiographie pulmonaire** : elle est utilisée pour évaluer la taille d'une atteinte médiastinale éventuelle (le rapport médiastino-thoracique est un facteur pronostique).

\*Tomodensitométrie (TDM) cervico-thoraco-abdomino-pelvienne :elle est importante pour l'évaluation de l'atteinte initiale et indispensable pour le repérage en vue de la radiothérapie selon la technique « involved field » .

\*TEP-FDG : elle permet d'améliorer la qualité de la stadification de l'atteinte ganglionnaire ou extra-ganglionnaire en complétant les données des autres examens d'imagerie.(Lepuil,2014).

#### **f) Examen anatomo-pathologique :**

1) cytologie :

Ponction : Lors d'une ponction, on aspire quelques cellules à l'aide d'une aiguille. aucune anesthésie n'est nécessaire. Les cellules aspirées sont étalées sur une lame de verre. Ensuite, un anatomopathologiste (médecin spécialisé dans ce type de diagnostic), les examine au microscope.(Lipcome,2006).

2) histologie :

➤ Biopsie tissulaire :

Pour un diagnostic précis, l'anatomopathologiste a besoin d'une plus grande quantité de tissu que les quelques cellules libres prélevées par ponction. par conséquent, il est également nécessaire de réaliser une biopsie (= prélèvement de tissu) du ganglion lymphatique atteint ou du tissu lymphoïde suspect. Pour cet examen, on recourt à une anesthésie (souvent locale)(Lipcome,2006)..

➤ Biopsie médullaire :

A la recherche d'une atteinte extra-ganglionnaire on réalise systématiquement une biopsie médullaire chez les patients ayant un stade III ou IV ou des signes généraux (classification « B » d'Ann Arbor). L'envahissement est le plus souvent focal, plus rarement massif.

L'examen histologique permet de retrouver les cellules de Reed-Sternberg qui sont à la base du diagnostic de la maladie. Dans certains cas, ces cellules sont absentes, mais la myélofibrose et la présence d'un granulome sont suffisamment suspects pour considérer qu'il existe une atteinte médullaire. On observe fréquemment une fibrose au contact des cellules tumorales. Comme l'atteinte osseuse, cette atteinte médullaire est d'autant plus fréquente qu'il existe des signes généraux et que l'extension de la maladie est importante.(Lipcome,2006).

Les examens pratiqués comportent :

\*Une étude morphologique en microscopie optique : on distingue en particulier l'architecture de la prolifération, folliculaire (respectant les centres germinatifs des ganglions) ou diffuse, la taille et les caractéristiques cyto-nucléaires des cellules.

\*Des examens immunohistochimiques : identification de structures membranaires ou cytoplasmiques, regroupées en CD, par des techniques basées sur la réaction antigène-anticorps utilisant des anticorps monoclonaux

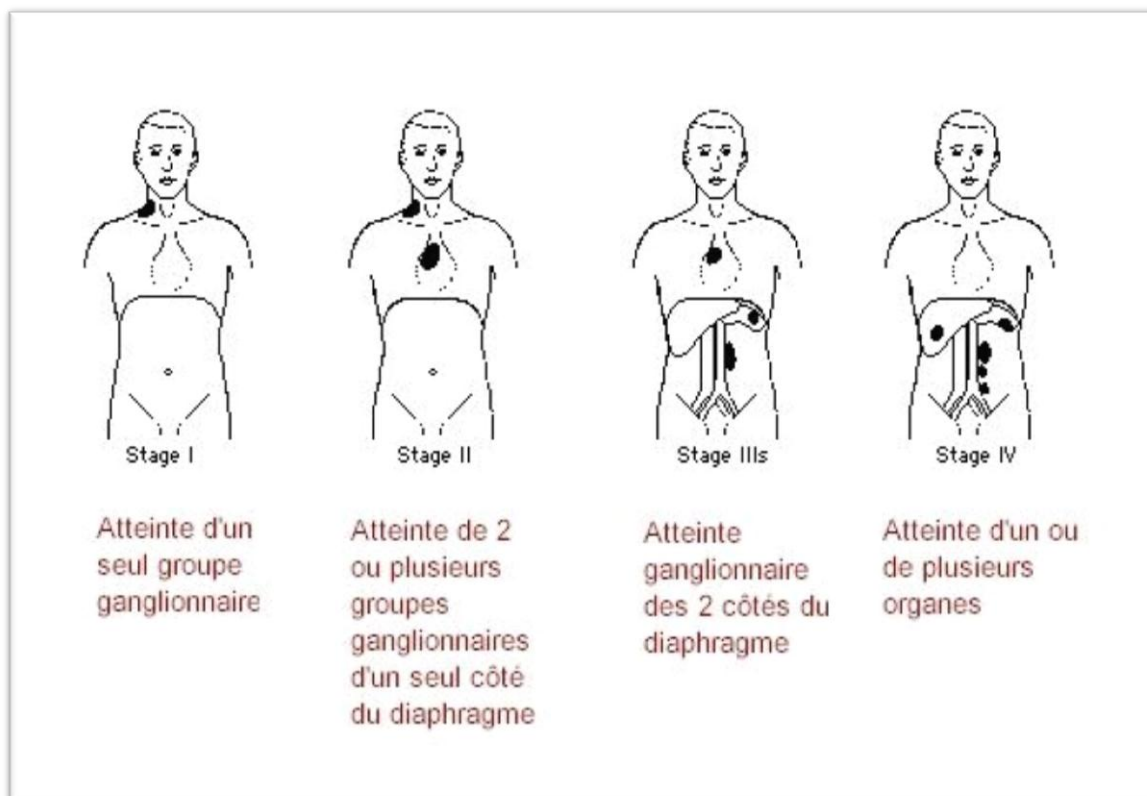
\*Parfois des examens cytogénétiques et de biologie moléculaire.

**Tableau2 : Classification d'Ann Arbor**

Stade	Extension de la maladie
Stade I	Atteinte d'un seule aire ganglionnaire
Stade II	Atteinte de deux aires ganglionnaires ou plus ,du même cote du diaphragme.
Stade III	Atteinte ganglionnaire sus et sous diaphragmatiques
Stade IV	Atteinte viscérale (os, fois, poumons) ou médullaire

Sigle	Classification clinico-biologique
A	Absence de signe clinique d'évolutivité
B	Présence des signes clinique d'évolutivité : -Perte de poids inexplicée supérieure ou égale à 10% du poids du corps dans les six mois précédents - Fièvre inexplicée supérieure à 38° au moins 7 jours - Sueurs nocturnes profuses
a	Absence de syndrome inflammatoire
b	Présence d'un syndrome inflammatoire

(Gressin,2005)

**Figure14** : classification d'Ann Arbor(Gressin,2005).

**I-3- 8) Pronostic :**

le pronostic dépend principalement du **stade**, plus que du **type histologique**

-stade I : très bon ,80% de survie à 10 ans .

-LH nodulaire à prédominance lymphocytaire et LH classique sous type scléronodulaire sont de meilleur pronostic.

**Tableau 3** : les facteurs pronostiques

Groupe favorable si tous les facteurs sont réunis	Groupe défavorable si ≥ 1 critère
Age < 50 ans	Age ≥ 50 ans
Nombre de territoire ganglionnaire atteinte ≤ 3	Nombre de territoire ganglionnaire atteinte ≥ 3
IMT < 35%	IMT ≥ 35% ou masse ganglionnaire BULKY
B et VS < 30 mm	B et VS ≥ 30 mm
A et VS < 50 mm	A et VS ≥ 50 mm

( Herbercht, 2005)

**I-3- 9) Traitement :**

La décision thérapeutique essentiellement le choix des chimiothérapies doit être pris en concertation pluridisciplinaire par des spécialistes car les stratégies sont en évolution permanente. Ces tumeurs sont très chimio sensibles et il n'y a pas d'intérêt pour la chirurgie d'exérèse, le traitement des lymphomes Hodgkinien le plus fréquent, repose sur la chimioimmunothérapie Elle associe anticorps monoclonaux anti B et protocole de chimiothérapie dont le nombre de cures et l'intensité de l'âge et bilan d'extension et de facteurs pronostiques spécifique. (Boyer et al ,2010).

L'association chimiothérapie radiothérapie est souvent utilisée dans la maladie de Hodgkin parce que son mode d'extension est longtemps locorégionale. (Beyer et al, 2010).

Ceci justifie une surveillance particulière à très long terme des complication suivante : pathologie thyroïdienne notamment hypothyroïdie, cancer de sein,..(Lepuil et al,2013).

Pour les stades localisés, l'objectif est de tester un traitement par chimiothérapie exclusive, pour les stades disséminés ; il s'agit de réduire la durée du traitement pour les formes de bon pronostic et d'identifie précocement les échecs du traitement initial (Lepuil et al,2013)..

## II-1/Matériel :

Notre étude a été réalisée au niveau du laboratoire d'Anatomie Pathologique de l'Hôpital Franz fanon de BLIDA .au cours de notre stage qui s'est déroulé du mois mars au mois juin 2014.

Au cour de ce travail, une étude rétrospective a été développée à partir des fiches des malades recueillies uniquement des registres d'anatomopathologie.

Cette étude a porté sur patients atteints du lymphome Hodgkinien pendant une année(2013).

### Objectif :

Notre objectif est de déterminer les aspects morphologiques grâce à la technique de l'immunohistochimie en utilisant le panel d'anticorps **CD15,CD30**,parfois**CD20** chez nombre des patients atteintes de lymphome de Hodgkin.

#### ➤ Matériel biologique :

Il s'agit des blocs archivés, inclus en paraffine comportant des fragments tissulaires obtenus souvent à partir de biopsies ganglionnaires.



**Figure 15:** les blocs archivés

#### ➤ Matériel non biologique :

Appareillages :

- Appareil de circulation
- Appareil d'inclusion en paraffine+Plaque de refroidissement.

- Etuve thermostatic (memmert)
- Bain marie ou plaque chauffante.
- Microtome(Leica)
- Automate de coloration (Leica).
- Congélateur /réfrigérateur
- Cryostat (Leica).
- Microscope photonique.

**Autre matériel utilisé :**

- Chambre humide (étude de IHC)
- Minuterie
- Porte lame ( voir annexe).

**II-2) Méthodes :**

**1) Etude rétrospective :**

Une enquête rétrospective a permis d'obtenir différentes types d'information sur chaque cas (a partir des dossiers médicaux) :

\*Des données épidémiologiques (sexe et âge).

\*Des renseignements cliniques.

\*Des données histologiques.

\*Des données immunohistochimique.

**2) Etude histologiques :**

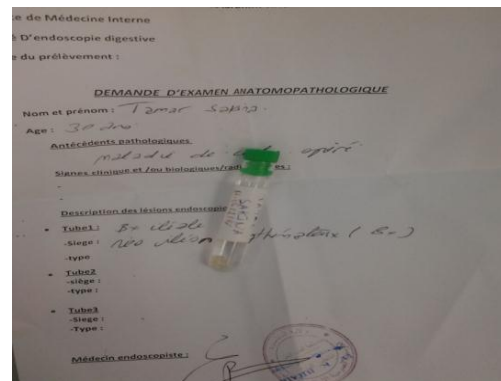
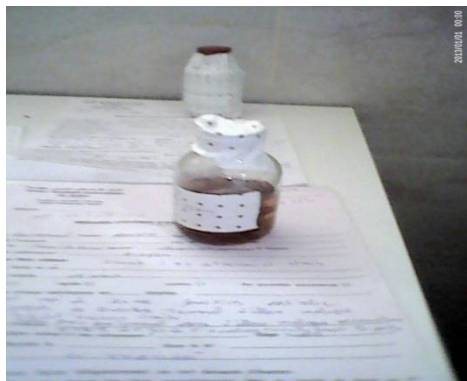
➤ La technique :

- Réception des prélèvements

Les prélèvements fixés au formol à 10% ont été adressés au laboratoire et enregistrés sous des numéros d'immatriculations correspondant aux fiches de renseignement comportant l'identité, l'âge, le sexe, la nature de prélèvements (biopsie ou pièce



opérateur), le siège anatomique du prélèvement, ainsi d'autre information clinique



- Examen macroscopique

Au cours de cet examen nous nous sommes intéressés à l'étude de : l'aspect externe, la couleur, la taille dans les 3 dimensions, la consistance de la tumeur et le remaniement éventuelle (nécrotique ou hémorragique), la pièce est coupée en plusieurs tranches de section, pour détecter les foyers tumoraux.

- Fixation :

Cette phase consiste à immerger les fragment tissulaires dans une solution de formol à 10% afin de préserver les structure tissulaires et ses déterminants antigéniques dans une état aussi proche que possible de l'état vivant. La durée de fixation dépend de la taille de prélèvements

- Déshydratation :

C'est la première étape de la circulation qui consiste à déshydrater le fragment tissulaire qu'il contient .Elle consiste à faire passer l'échantillon contenu dans les cassettes d'inclusion dans 5bains d'alcool à concentration croissante 70°, 75°, 90°, 95°, 100° respectivement.

Les échantillons sont par la suite passés dans (2) bains de xylène pour subir l'éclaircissement. la durée pour chaque bain est de (2) heures.

- Imprégnation :

A cette étape l'espace qui était occupé par l'eau éliminée lors de la déshydratation va être remplacée par la paraffine liquéfiée ; donnant par conséquent une rigidité au tissu qui va lui permettre de garder sa forme interne au moment de la coupe.

- L'inclusion :

Consiste à enrober les tissus dans des substances de consistance ferme, susceptibles d'être débitées en coupes minces ; la paraffine est la substance à avoir la propriété d'être liquide à une température d'environ 60°et de se solidifie à la température ambiante.

- Confection des coupes :

Cette opération consiste à débiter à l'aide d'un microtome rotatif des coupes minces (3à5µm d'épaisseur) le prélèvement tissulaires pour permettre son étude par transparence en microscope optique.

- Coloration des préparations histologique :

Les coupes minces ainsi obtenues ont été étalées sur des lames puis colorées après déparaffinages par des colorants aux teintes variées qui présentent des affinités pour les structures tissulaires et cellulaires qui sont :

**L'Hématéine** : colore les noyaux en bleu violacé.

**L'Eosine** : colore le cytoplasme en rose.

### 3) Etude immunohistochimique :

- ❖ **Objectif :**

L'immunohistochimie est toujours réalisée dans un deuxième temps, en complément de l'examen histologique standard pour classer une tumeur si l'histologie seule ne le

permet pas ou pour apporter des informations complémentaires en terme de pronostic ou à visée thérapeutique.

### ❖ Principe

l'immunohistochimie permet de localiser et d'identifier in situ un constituant tissulaire (antigène) grâce à une réaction immunologique de type anticorps – antigène dont le principe consiste à faire agir des anticorps tissulaires.

Afin de déterminer le phénotype de lymphome de Hodgkin au panel d'anticorps anti CD15 ,CD30, nous avons choisi une méthode indirecte ( En Vision) ,qui consiste à utiliser un polymère de dextran sur lequel sont fixé des molécules d'enzymes (peroxydase )qui peut –elle même relier deux molécules de chromogène diabenzidine (DAB)(substrat).la réaction enzyme –substrat dégage une coloration brunâtre visualisée sous microscope

La positivité /négativité est considérée comme indicateur de la présence des cellules tumorales.

### ❖ Mode opératoire :

#### ➤ Déparaffinage et réhydratation :

- Xylène.....2\*5min
- Alcool100%..... 5min
- Alcool90%.....5min
- Alcool70%.....5min
- Eau distillée.....5min

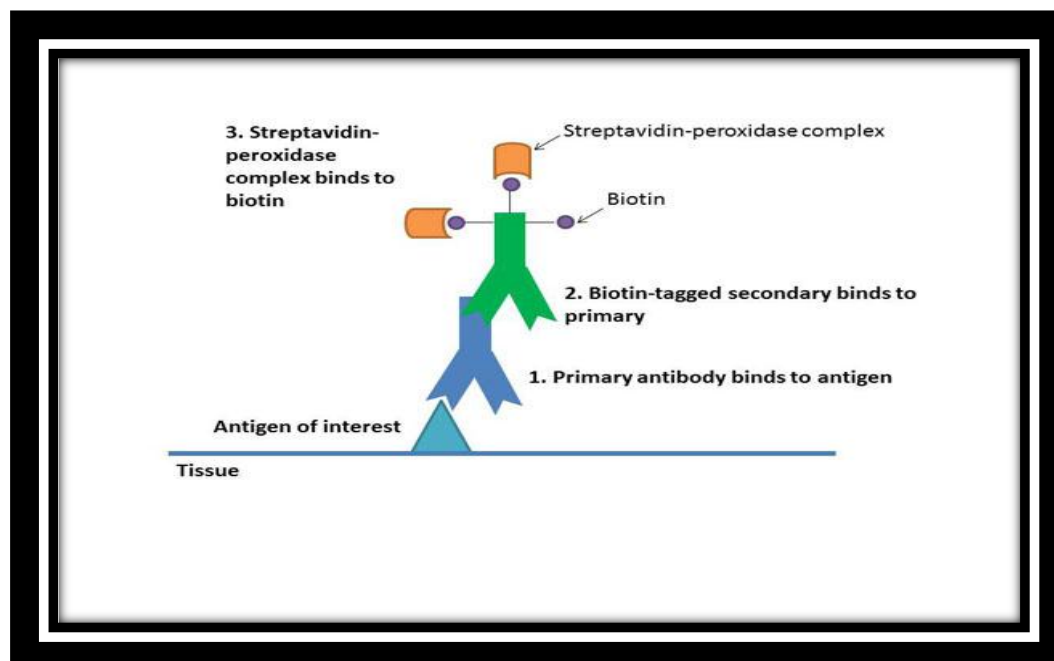
➤ Démasquage antigéniques par la chaleur ou bain marie

- Transférer les lames dans le bac de solution de démasquage pré chauffée 10min.
- Sortir le bac du bain marie et laisser refroidir sur la paillasse (20min)
- Transférer le portoir dans un bac d'eau distillée ( 5min)
- .Deuxième lavage en eau distillée. ( 5min)
- Lavage en TBS. ( 5min)

➤ **Immuomarquage :**

- Préparation d'une chambre humide.
- Cercler les coupes avec le Dakopen.(gel hydrophobe).
- Blocage des peroxydase endogène : appliquer suffisamment de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, pour recouvrir le tissu. (5min)
- Rincer à l'eau distillée .
- .Placer les lames dans un bain de TBS propre. (5min) .
- Appliquer l'anticorps primaire (CD15 ,CD30) (30min) .
- Rincer en eau distillée.
- Placer les lames dans un bain de TBS propre(5min)
- Appliquer l'anticorps secondaire biotinylé (10min)
- Rincer en eau distillée.
- Placer les lames dans un baignoire de TBS propre(5 min).
- Système d'amplification à la streptavidine (10min).
- Rinçage dans un baignoire de TBS(5min)
- Révélation en utilisant le chromogène DAB(3,3-Diaminobenzidine) (10 min).

- Rincer en eau distillée.
- **Contre coloration à l'Hématoxyline :**
  - Incuber les lames dans une solution hématoxyline pendant (5min).
  - Rinçage en eau ammoniacale.
  - Rinçage à l'eau courante puis dans 3 bains d'alcool (70°,90°,100°).
  - Un bain de xylène.
  - Montage Aqueux de type Faramount.



**Figure16** : principe de l'immunohistochimie (Wantkinem,2010).

### III) Résultats

#### III- 1) Etude rétrospective

71 lymphomes hodgkiniens ont été diagnostiqués au niveau du laboratoire d'Anatomie Pathologique pendant l'année 2013.

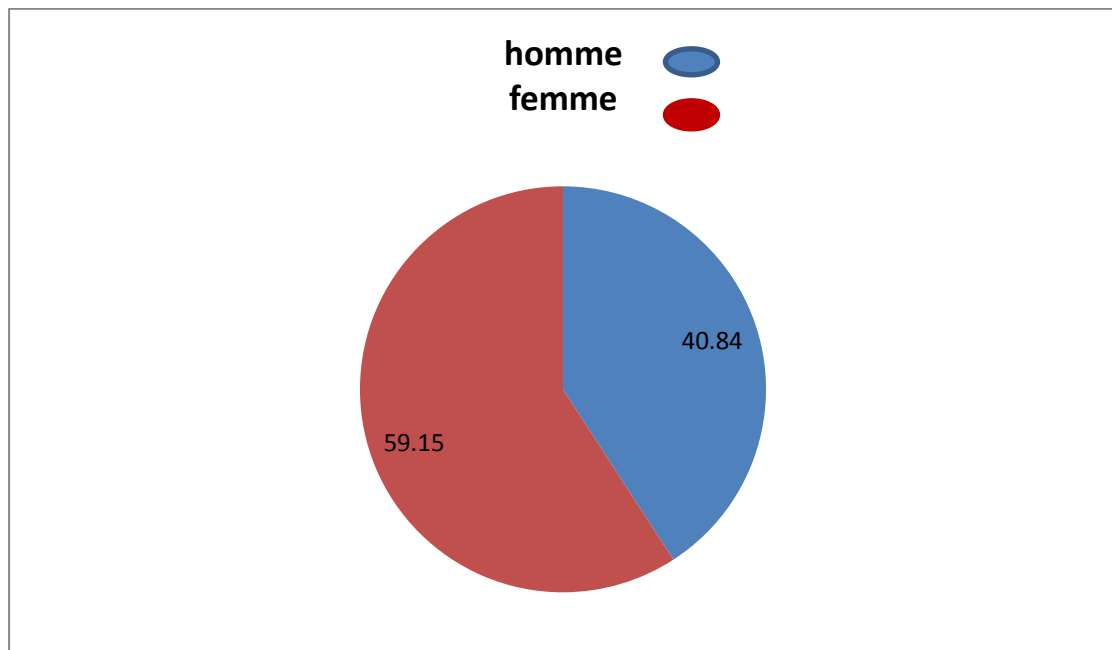
##### ❖ Répartition selon le sexe

Parmi les 71 cas du lymphome Hodgkinien recensés :

29 homme (40.84%) des cas

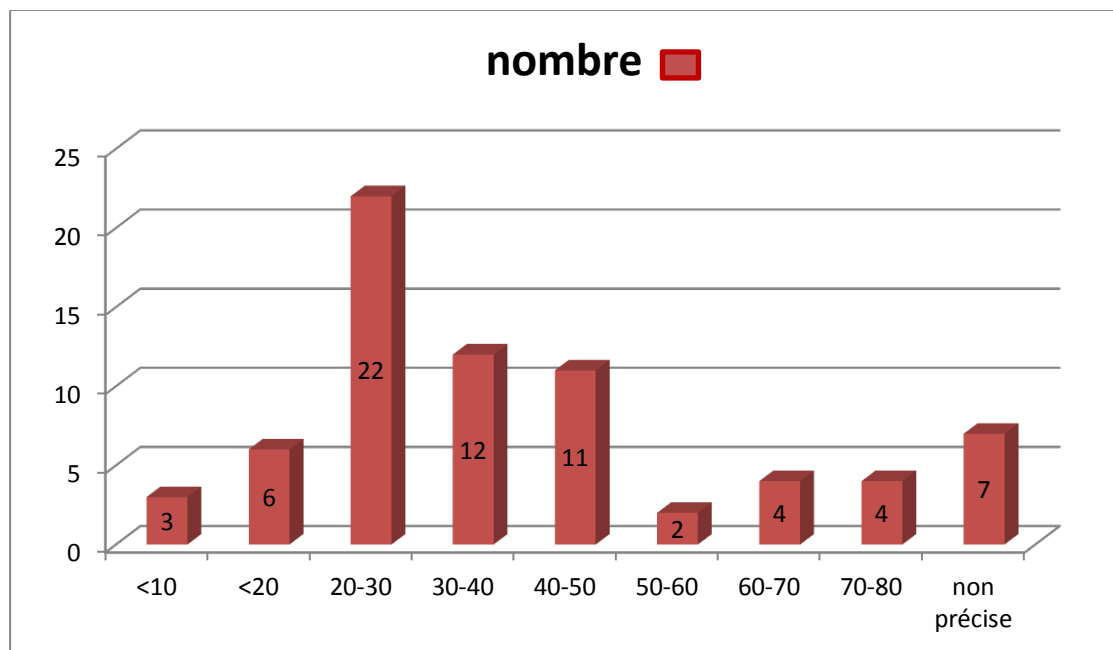
42 femme (59.15%) des cas

Soit un sex ratio F\H : 1.44



**Figure17** : la répartition des patients selon le sexe

## ❖ Répartition selon l'âge :



**Figure18:** répartition des patients selon l'âge

L'analyse des résultats obtenus en fonction de l'âge montre que le lymphome Hodgkinien survient à tout âge, avec des extrêmes entre 3- 80 ans, la distribution est bimodale : il y a 2 pics des fréquences une entre 20-30 ans est l'autre entre 30-40 ans.

## ❖ Répartition les types histologiques selon la classification OMS :

Nous avons obtenus les résultats suivants :

**-Hodgkin Nodulaire à prédominance lymphocytaire** : 3 cas. soit 5%

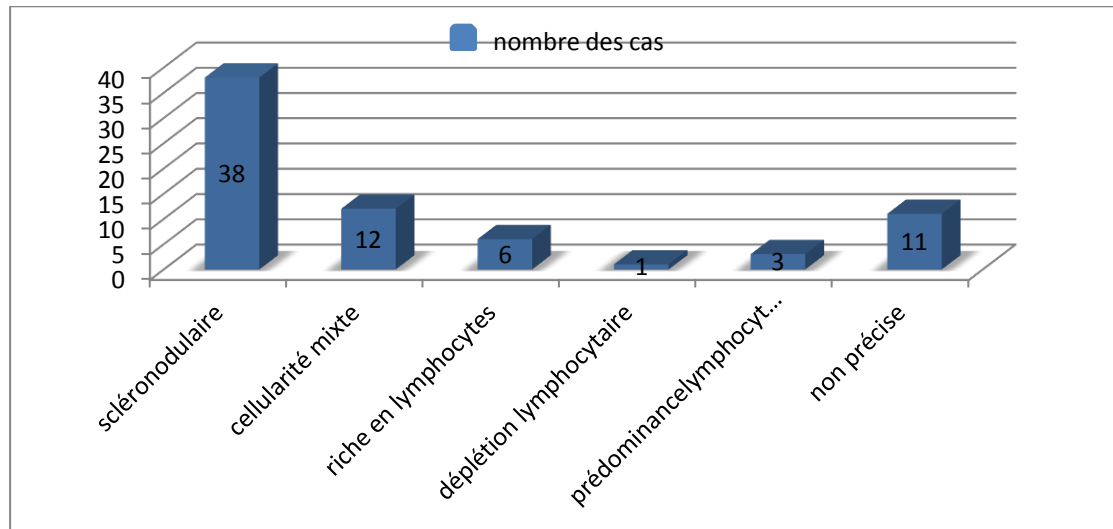
**-Hodgkin classique :**

-Scléronodulaire : 38 cas, soit 66.66%

-Cellularité mixte : 12 cas ,soit 21.05%

-Riche en lymphocyte : 6 cas ,soit 10.52%

-Déplétion lymphocytaire : 1 cas ,soit 1.75%



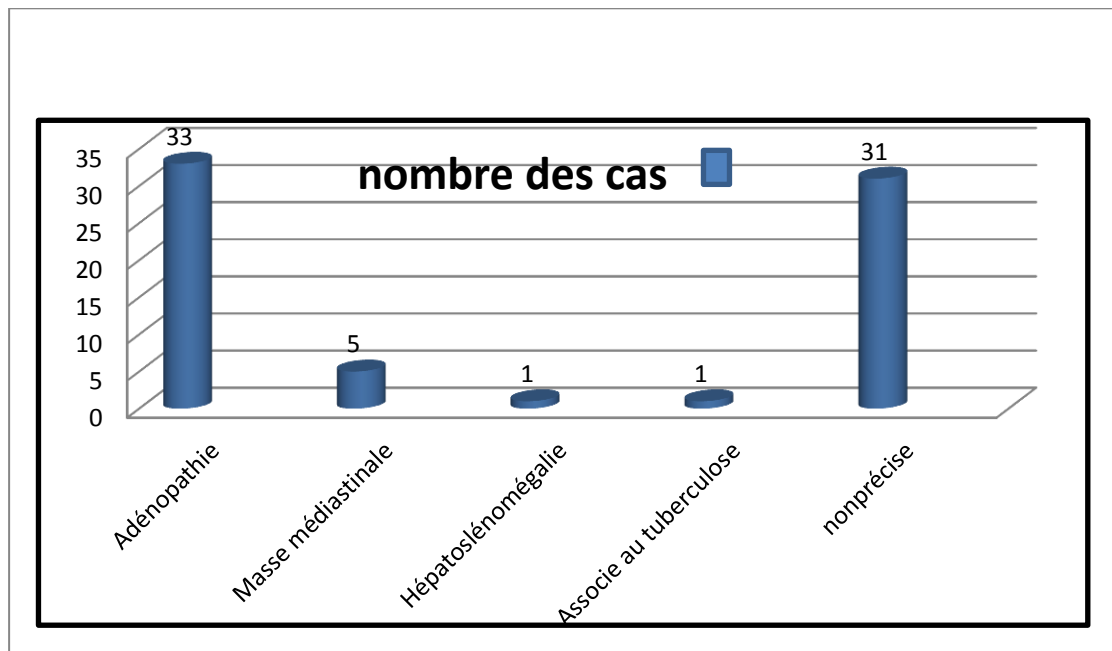
**Figure19:** la répartition en fonction les types histologiques selon la classification OMS(2008).

❖ Répartition selon la positivité des marqueurs :

Anticorps	Nombre des cas réalisé	Cas positives	Pourcentage de positivité
CD15	49	49	100
CD30	49	26	53.06
CD20	49	4	8.16

Les cellules de Sternberg sont marquées dans 100%des cas par l'anticorps CD15 et à53.06%des cas par l'anticorps CD30. Donc les cellules de Sternberg expriment les antigènes CD15 ,CD30 , avec prédominance nette pour le CD15.





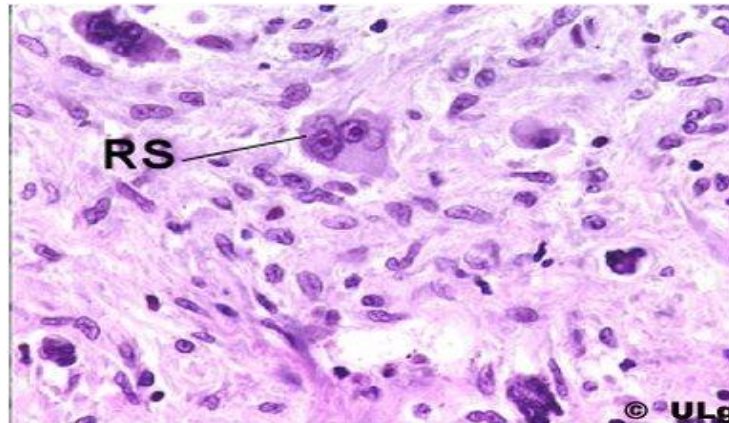
**Figure20:** répartition des patients selon la présentation clinique.

L'analyse des résultats montre que les signes cliniques initiales révèlent le lymphome Hodgkin sont multiples, la plus commune est la découverte d'une ou de poly adénopathie touchant (33 cas 82.50%), (5 cas 12.5%) présentent une masse médiastinale, (1 cas 2,5%) présente une hépatosplénomégalie et (1 cas 2,5%) sont associés à tuberculose.

### III- 2) Etude histologique

Etude histologique a été réalisée sur 71 cas présentant un lymphome Hodgkinien dont le diagnostic a été basé sur la reconnaissance des cellules de Reed Sternberg (cellule tumorale du lymphome Hodgkinien).

#### A) Lymphome de Hodgkin classique :

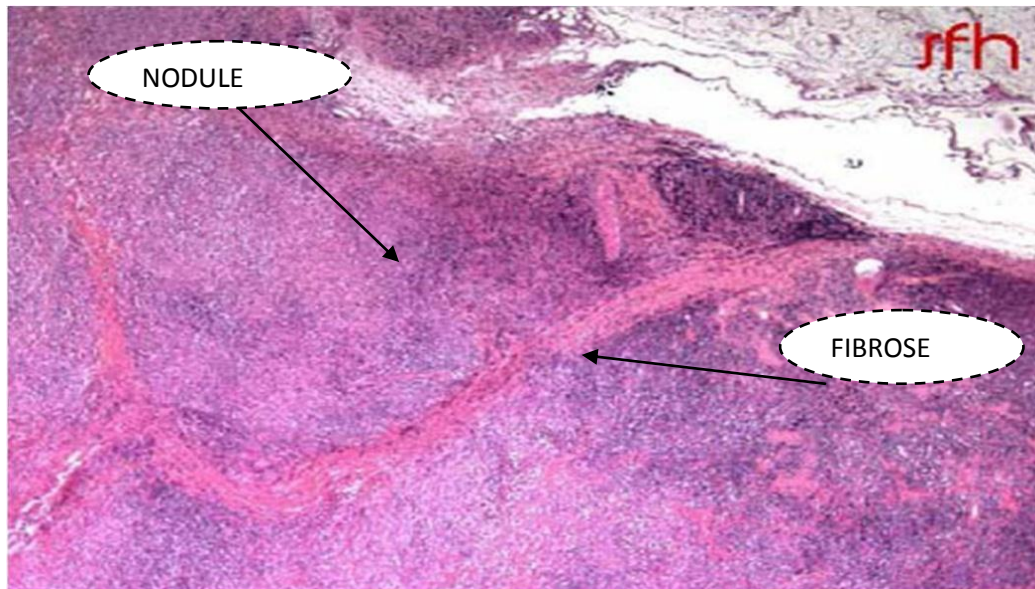


Les résultats obtenus montre que 95% des cas présentent un lymphome de Hodgkin classique formé de cellule de grand taille, au noyau irrégulier, plissé, habituellement bilobé ou plurilobé, à chromatine irrégulière ponctuée par un ou plusieurs nucléoles acidophiles et centraux correspondant à des cellules de Hodgkin et à des cellules de Reed-Sternberg (noyaux se faisant face "en miroir") (**RS**). Ces cellules se disposent au sein d'un tissu d'aspect fibreux et se mêlent à de rares lymphocytes d'aspect normale.

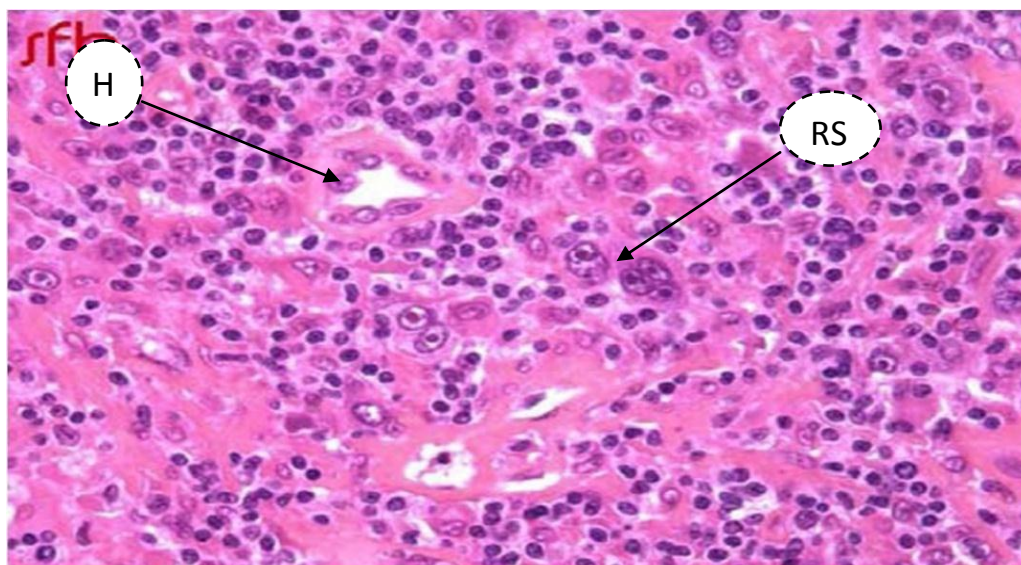
**Figure21:** Lymphome de Hodgkin: scléronodulaire : (coloration HES)

,Grossissement (X25) (photo original)

L'analyse histologique montre une architecture nodulaire avec un sclérose plus au moins importante.

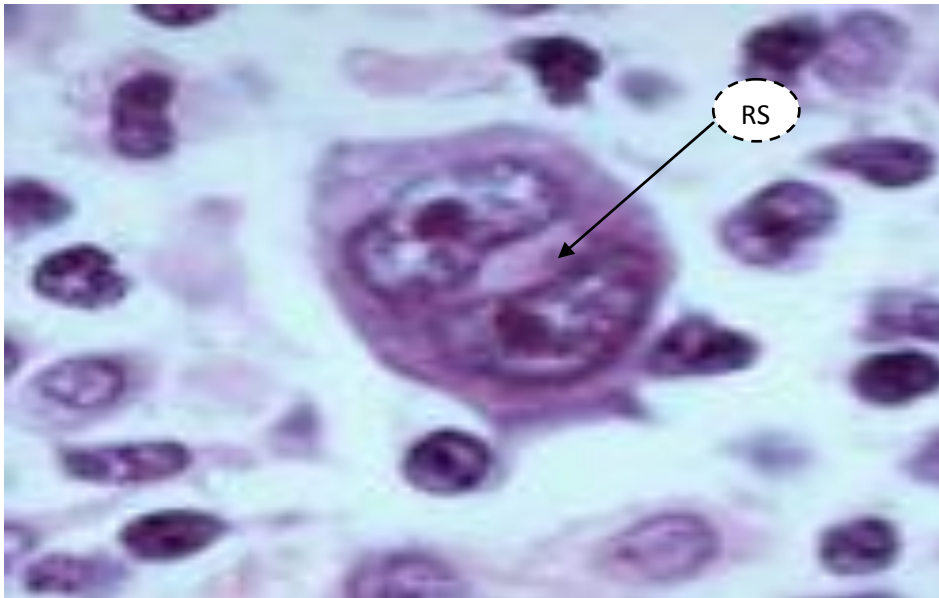


**Figure22 :**lymphome de Hodgkin : scléronodulaire forte Grossissement (X400)  
quelques cellules de Reed sternberg ( grande taille, noyau volumineux parfois bi ou plurinucléé et montrant de volumineux nucléoles entourées de nombreux lymphocytes( coloration HES).



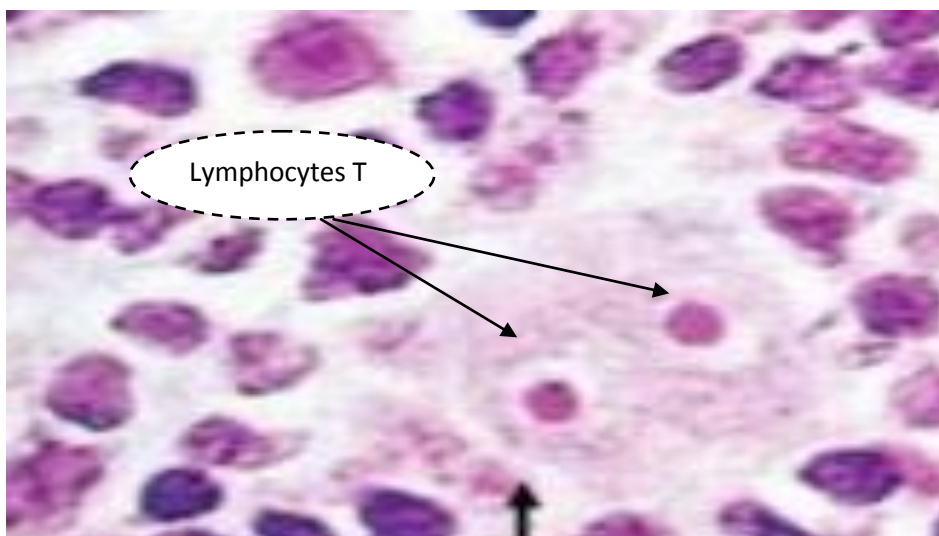
**Figure23:** lymphome de Hodgkin : Cellularité mixte ,coloration :HE ,  
Grossissement X 100(photo original).

L'analyse histologique montre une prolifération diffuse sans fibrose, les cellules de Reed sternberg dispersées sur un fond granulomateux.



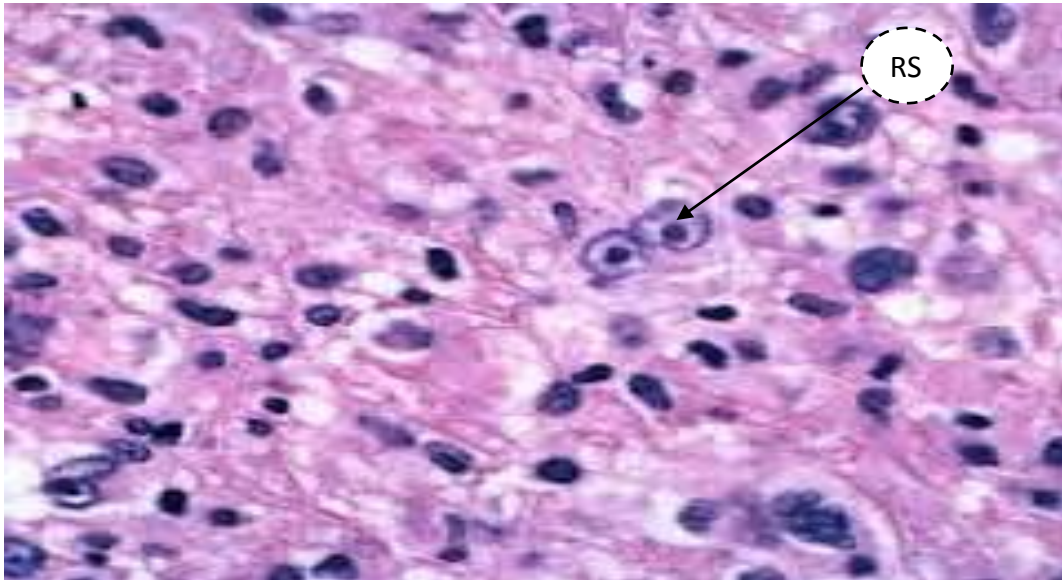
**Figure24 :** lymphome de Hodgkin :Riche en lymphocytes Coloration: HE  
Grossissement X 100( Photo original).

La prolifération est nodulaire ,les cellules de Reed sternberg sont entourées d'une population non néoplasique :les lymphocytes ,essentiellement de phénotype T.



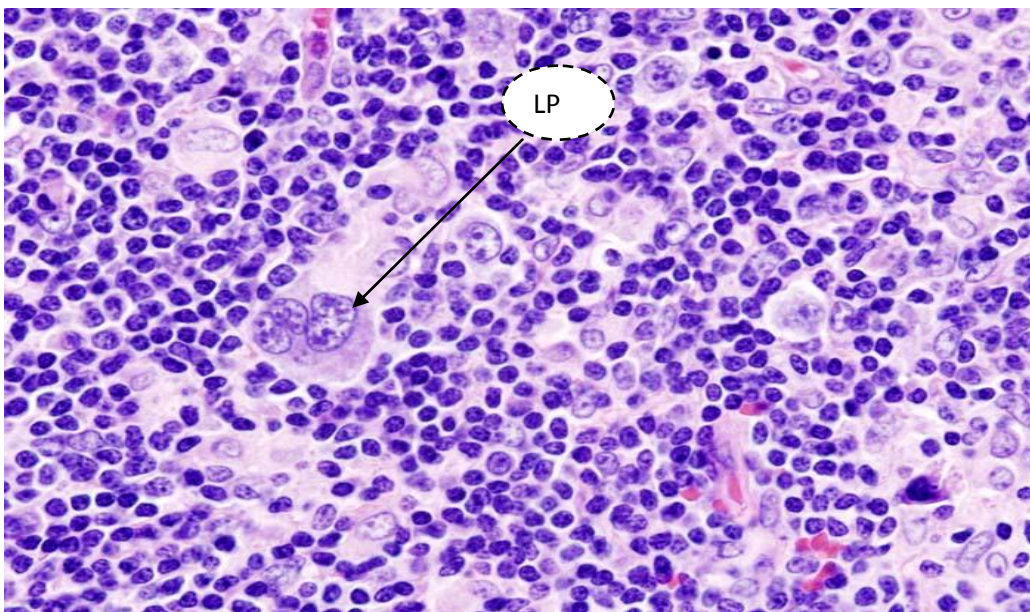
**Figure25** : lymphome de Hodgkin :déplétion lymphocytaire coloration: HE  
Grossissement x 40( photo original)

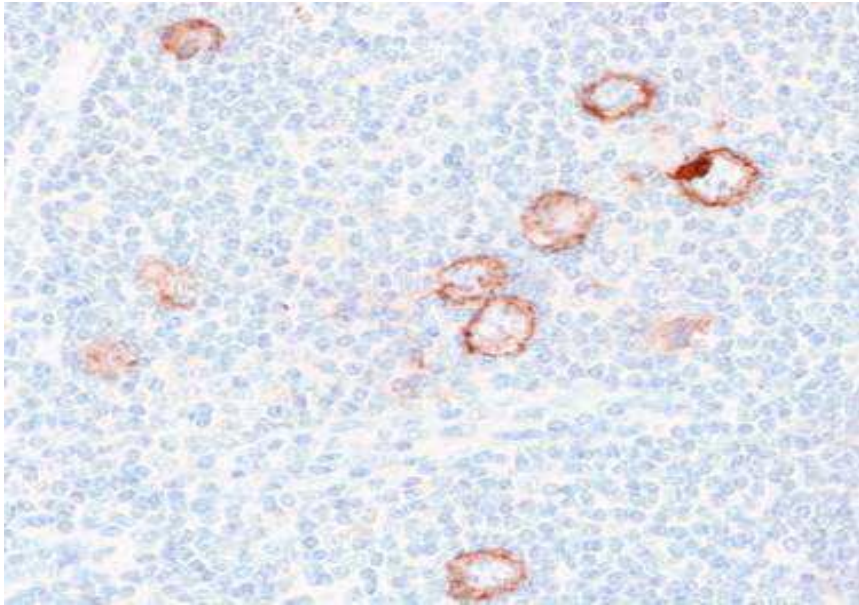
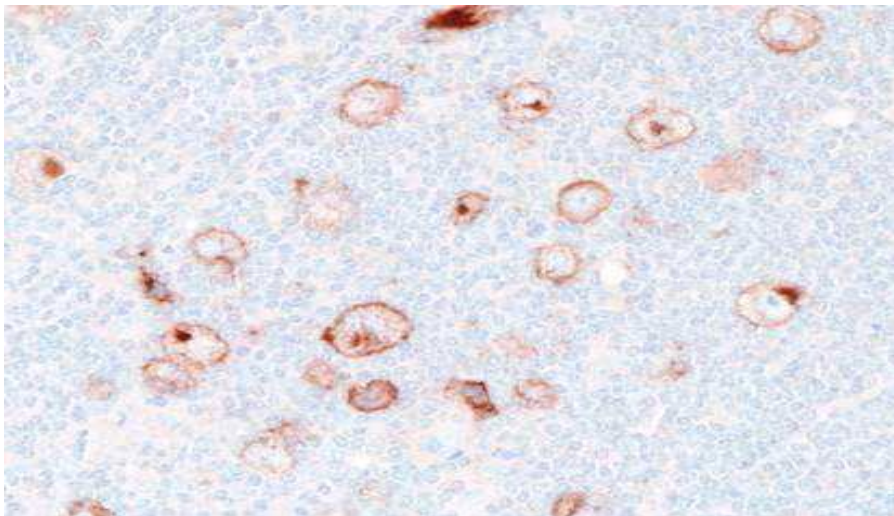
Cette variété contient de très nombreuses cellules tumorales et très peu de lymphocytes normaux.



**Figure26**: lymphome de Hodgkin : prédominance lymphocytaire Coloration HE  
Grossissement x40(photo original).

un fond lymphocytaire ou se dispersées des cellules tumorales de type popcorn(LP)  
grands , à cytoplasme peu abondant avec un noyau volumineux , clair polylobé.



**III - 3) Etude immunohistochimique:****Figure27** : Immunomarquage au CD30**Figure28**: Immunomarquage au CD15

Les cellules de Reed sternberg sont marquées par CD30 etCD15

Donc les cellules de Reed sternberg expriment les antigène CD15 ,CD30 ,avec prédominance nette pour le CD15

## Discussion

Le lymphome de Hodgkin est une prolifération tumorale de cellules lymphoïdes dans un ou plusieurs organes lymphoïdes, avec parfois extension dans des sites extra-ganglionnaires.

L'étude de fréquence du LH en fonction du sexe montre qu'il ya une prédominance féminine (59.15% femme, 40.84% homme) avec un sexe ratio 1.44 en faveur des femmes ce qui ne correspond pas du tout aux données de la littérature (Salles,2012), la prédominance est plutôt masculine.

L'incidence en France des LH : 2a5cas pour 100000 habitant par ans chez les hommes. ,1a2cas pour habitant par ans chez les femmes. (Salles,2012).

La répartition du LH selon l'âge montre un pic atteignant les personnes jeunes âgées de 20-30ans (22cas,34.37%) ,ces résultats correspondant parfaitement aux données des auteurs ( Pauline et al,2008) , l'autre pic entre30-40 ans(12cas,18.75%) ,Ces résultats ne correspondant pas aux données de littérature.(Pauline et al,2008).qui trouvé que le deuxième pic concernant les sujets âgés de plus de 60ans. Notre série montre que le lymphome de Hodgkin se voit chez l'enfant >5ans( 3 cas ,4.68%)et(6cas ,9.37%) chez les sujet de >20ans ,ces chiffres sont proches des résultats de(Lepuile,2013) qui démontre que l'incidence de maladie est :1par million pour les enfant de >5ans ,et 32cas par million pour les sujet de 15-19ans.

Ainsi ,les études histologiques présentent une prédominance des lymphomes Hodgkiniens classique avec(95%)par rapport aux lymphomes Hodgkinien nodulaire à prédominance lymphocytaire''paragranulome de Popema et Lennert''soit (5%). ces résultats sont similaires à ceux de la littérature (lepuile,2013)

Toutefois ,le lymphome de Hodgkin classique renferme quatre variétés morphologiques dont la forme. scléronodulaire la plus fréquente par rapport aux autres types histologiques et représente (66.66%)des cas ,ce résultat se rapproche à celui de ( Pauline et al,2008),qui ont trouvé environ de(60-75%)des cas de forme de scléronodulaire. la forme à cellularité mixte représente (40%),la forme riche en lymphocytes (10.34%),la déplétion lymphocytaire (1.72%).

Ainsi le lymphome Hodgkinien nodulaire à prédominance lymphocytaire (5%). Ces formes sont rares par rapport aux autres, Ces résultats sont similaires à ceux de la littérature (Pauline et al,2008).

La répartition des LH selon les manifestations cliniques ,on a constaté que l'augmentation du volume des ganglions lymphatiques a été le motif de consultation le plus fréquent (82,50%),parfois atteinte médiastinale(12,50%),plus rarement une hépatosplénomégalie et associée à tuberculose(2.5%) pour les deux signes ,ces résultats est proche de travaux de(Fab,2008) qui trouve que l'adénopathie est plus fréquente est représente (60-70%) ,ensuite l'adénopathie médiastinale (10-20%) et en enfin les signes généraux( dyspnée, toux, douleurs thoracique dyspnée, toux, ,fièvre,..)qui représentent (10%).

L'analyse histologique des prélèvements tissulaires a confirmé la présence des cellules de RS , ce qui a permis de poser le diagnostic du LH et de préciser ainsi ses variantes histopathologiques ,néanmoins, des cellules d'aspect identique aux cellule de RS peuvent être présentes dans les atteintes ganglionnaires de la mononucléose infectieuse ,les LNH B de grandes cellules riches en lymphocytes T et les LNH à grandes cellules anaplasiques. De plus, le diagnostic du lymphome Hodgkinien classique de type riche en lymphocytes peut être difficile ,souvent confondu avec le paraganulome de Poppema et Lennert ,donc ,l'étude immunohistochimique à l'expression des cellules de RS au CD15 CD30est déterminante au diagnostic différentiel.

Les résultats obtenus montrent que les cellules de RS expriment dans 100%des cas l'antigène CD15 ,dans 53.06%des cas l'antigène CD30 .ces résultats sont en accord avec la plupart des études immunohistochimiques des lymphomes Hodgkiniens.



La survie et la prolifération anormales des cellules de Reed-Sternberg résultent de l'existence d'une anergie lymphocytaire, de l'acquisition de mécanismes de résistance à l'apoptose et de l'amplification de la voie de NFkappaB impliquée dans la survie cellulaire (Bubio et al,2001). .

A ce jour, il n'y a ni cause, ni facteur favorisant de la maladie de Hodgkin clairement identifié. Il existe cependant un excès de signes d'antécédents d'infections au virus d'Epstein Baar : titre élevé d'anticorps anti-EBV chez les patients, risque accru de maladie après mononucléose infectieuse.

L'hybridation in situ est venue confirmer les liens unissant la maladie de Hodgkin et le virus. Le virus exprime un certain nombre de gènes du cycle de latence tels que la protéine de latence membranaire (LMP1) et les gènes EBER1/2. Cependant aucun lien de cause à effet n'a été identifié. Il existe par ailleurs un sur-risque chez les jumeaux Monozygotes, lorsque survient une maladie de Hodgkin chez l'un d'entre eux.

Nous ne pouvons pas peut être expliqué cette différence des résultats par rapport aux données de la littérature par la prise d'une petite série (71 cas) dans une période assez courte (6mois), L'analyse de notre résultats donnerait des statistiques plus probables, donc ces résultats ne nous permettant pas d'en tirer des conclusions finales.

*Conclusion :*

L'analyse des données cliniques, histologiques, immunohistochimiques chez 71 patients présentant un lymphome Hodgkinien, a permis de signaler les résultats suivants :

- Le lymphome de Hodgkin est plus fréquent :
  - Chez les personnes jeunes d'âge 20-30ans (22 cas).
  - Chez les femmes (59.15%).
- Le lymphome de Hodgkin classique c'est le type le plus fréquent (95%) par rapport au lymphome de Hodgkin nodulaire à prédominance lymphocytaire''Paragranulome de poppema et Lennert ' soit (5%).
- La forme de scléronodulaire est la plus fréquent (66.66%) par rapport aux autres types histologiques du lymphome de Hodgkin classique.

Les cellules de Reed Sternberg sont marquées dans (100%des cas) par l'anticorps CD15+.

- La survie et la prolifération anormales des cellules de Reed-Sternberg résultent de l'existence d'une anergie lymphocytaire, de l'acquisition de mécanismes de résistance à l'apoptose et de l'amplification de la voie de NFkappaB impliquée dans la survie cellulaire (Bubio et al,2001).
- L'immunohistochimie est un outil indispensable pour poser un diagnostic positif et différentiel.
- Même si le lymphome de Hodgkin a un taux de guérison élevé par rapport à d'autres cancers, la gestion des toxicités à long terme, le traitement des rechutes ou le traitement des cas résistant demeurent des défis pour les années à venir.

## Référence bibliographiques :

- 1)G ,Vassal, ,Martmann,O ,Couanet,D,O,Oberlin “la maladie de hodgkin “à l’institut Gustave Roussa (Decembre 2003) ,1-15.
- 2)G,Salles “ maladie de Hodgkin diagnostic , classification internationale à visée pronostique, évolution et principe traitement “service d’hématologie ,centre Hospitalière Lyon –Sud (Novembre2012)1-24.
- 3)R,Gressin “la maladie de Hodgkin” faculté de médecine de Grenoble (Fevrier2005)1-6.
- 4)Rommina “lymphome malins “Université médicale Virtuelle Francophone (Fevrier 2013)
- k5)M .Rubio ,H,CHesquières,J ,Blay,G,Salles “la maladie de Hodgkin :la biologie au service du clinicien vers de nouveaux facteurs pronostiques et de nouvelles approches thérapeutiques ,Bulletins du cancer (Novembre2001).
- 6)J,Ferland,P ,thomas,B,Arnulf,M,Delfau,V,Frenkel,L,Vallat,’’Mécanisme physiopathologiques des anomalies de la prolifération lymphocytaire .notion de clonalité (septembre2012).
- 7)F,Batteux, O ,Garaud,L ,Prin,Y ,Renaudineau ,L Vallat,lymphocytes B : diversité oncogénese,différenciation et activation (Octobre2011).
- 8)L ,Lipome ‘phénotype ,différenciation ,circulation et hémostasie des cellules du système immunitaire (Fevrier2008)1-5.
- 9)A, Six, ‘Différenciation lymphocytaires T et B’’ Université Pierre et Marie Curie (septembre2009)1-44.
- 10)C ,Köhler’ ’organe et tissu lymphoïde ’’université médicale virtuelle francophone(Aout2012).
- 11)I,lepuil,le lymphome de Hodgkin classique chez l’adulte, institut nationale de cancer(octobre2013) 3-37
- 12)Benoi “les lymphomes hodgkin et non hodgkin “institut nationale de cancer’’(février 2012)page1-17. .
- 13)Wantkinem’’pratique de l’immunohistochimie :application diagnostiques ‘la revue du praticien, (janvier2010)page 1-87.
- 14)J,Francois’’immunologie médicale ‘UFR LYON DC1(Aout 2007)page1-62.
- 15)J,Benoi, ‘EBV et lymphoprolifération transformation cellulaires et oncogenese’’Elsevier Masson SAS(fevrier2007) page 1-52.

- 16)Gerard ''histologie de ganglions lymphatique 'institut nationale de cancerdecembre2012page14-24.
- 17)Jagroff,"First international synoposium on childhood ,adolescent and young adult Hodgkin lymphoma" (jiullet2010)1-16.
- 18)R,Herbercht''maladie de Hodgkin «université louis pasteur faculté de médecine (2005-2006)page 124-131.
- 19)K.Nicola ''lymphome malins ''institut nationale de cancer(aout 2008)
- 20)I,lepuil''lymphome de Hodgkin'' de Boeck,Bruxelles (octobre2013)page 1-4.
- 21)B.Pauline,G.Philipe ,G.Bouguet ''lymphome de Hodgkin 'comité de France lymphome Espoire ,brochure (mai2008)..
- 22)L ,Lipcome,V ,Costes''pathologie tumoral du système lymphoide''faculté de médecine montplllier nimes(,novembre,2006)
- 23)M,Boyer,S,Cuerier ''le traitement du lymphome de Hodgkin chez l'adulte pharmacothérapie(septembre,2010).

## SUMMARY

Hodgkin lymphoma is a malignant lymphomatosis proliferation, characterized by a lymph node infiltration of large tumor cells is the cell Sternberg Reed, usually so rare (1%) ,but remains the basis of diagnosis.

The real difficulties of interpretation arise in the distinction between reactive changes reflecting a single lymphocyte stimulation, inflammation and tumor proliferation.

For this, the pathologist need to confirm their final diagnostic technique of immunohistochemistry, this technique allows to name precisely the phenotype and differentiation stage Hodgkin lymphoma.

The immunohistochemical staining performed on 49cases showed that the Reed-Sternberg cells have a phenotype CD15+( 100%),CD 30+(53.06%),CD20+(8.16%).

Keyword: Hodgkin lymphoma, Reed Sternberg cell, immunohistochemistry,

. CD15,CD30,CD20

## ANNEXE3

### Répartition des populations

Tableau1 : répartition des patients selon le sexe :

Sexe	n=71	%
Homme	29	40.84
Femme	42	59.15

Tableau 2:répartition des patients selon l'âge

Age	N=64	%
>10	3	4.68
10-20	6	9.37
20-30	22	34.37
30-40	12	18.75
40-50	11	17.18
50-60	2	3.12
60-70	4	6.25
70-80	4	6.25
Non précise	7	-

Tableau3 : répartition des patients selon le type histologique

Type histologique	N=60	%
Lymphome de Hodgkin nodulaire a prédominance lymphocytaire	3	5
Lymphome de Hodgkin classique	57	95
Non précise	11	-

Tableau4 : répartition des patients selon le sous –type histologique

Lymphome de Hodgkin classique	n=57	%
scléronodulaire	38	66.66
Cellularite mixte	12	21.05
Riche en lymphocytes	6	10.52
Déplétion lymphocytaire	1	1.75
Non précise	11	-

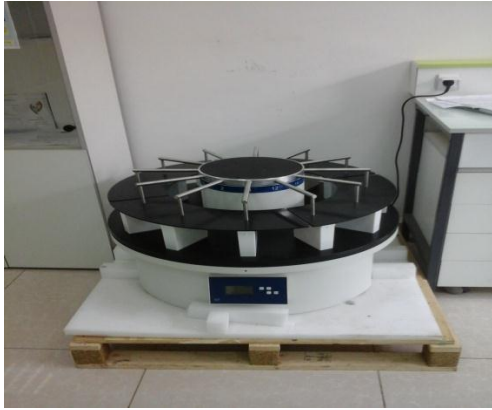
Tableau5 : répartition des patients selon la positivité de marquage

	Nombre de cas réalisé	Cas positif	Pourcentage de positivité(%)
CD15	49	49	100
CD30	49	26	53.06
Non précise	22	-	-

Tableau 6 : répartition des patients selon les signes cliniques

Signe clinique	Nombre des patients	Pourcentage (%)
Adénopathie	33	82.50
Masse médiastinale	5	12.50
Hépatoslénomégalie	1	2.50
Associe à une tuberculose	1	2.50
Non précise	31	-

## ANNEXE 1 : matériels (Appareillages)



Appareil de circulation(Leica)



Etuve "Type Memmert"



Incubateur "Type Memmert"



Microtome de type Leica



Automate de coloration de type Leica



## ANNEXE 1 : matériels (Appareillages)

---



Cryostat de type Leica



Appareil d'inclusion en paraffine de type Leica

## **ANNEXE2**

### **1) Réactifs et solutions :**

- Anticorps primaire (anti CD15 ,antiCD30,antiCD20).molécules enzymatiques
- Anticorps secondaire conjugué à un polymère de dextran sur laquelle sont fixés de la molécule enzymatique
- Ammoniaque (NH 3+)
- 3-3'Diaminobenzidine(DAB).
- Chlorure(HCL).
- Eau (distillé, courant).
- Eau oxygénéeà3%
- Eosine
- Ethanol a différents concentration.
- Formol.
- Hématoxyline de Mayer.
- Milieu de montage type Faramount
- Paraffine.
- Target Retrieval Solution(TRS).
- Tris Buffered saline(TBS).
- Xylène

### **2) Préparation des solutions et des dilutions :**

- Solution de démasquage TRS :

A diluer au 1/10en eau distillée

- Préparation de TBS :

A diluer1 sachet de TBS en 25L'eau distillée

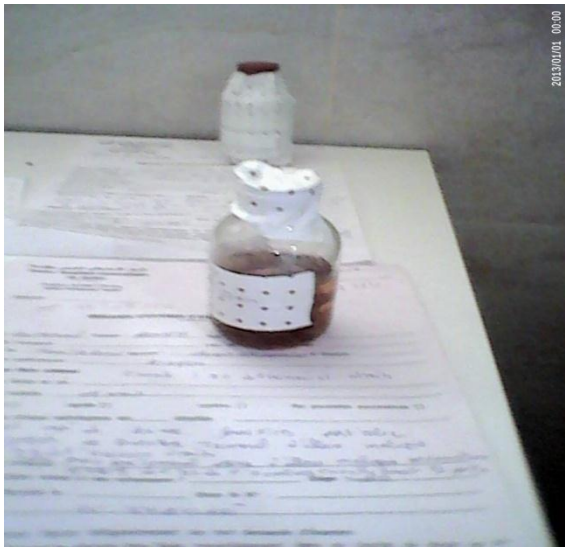
- Préparation de la DAB+ :

Ajoute 1 goutte de DAB+dans un 1ml de diluant

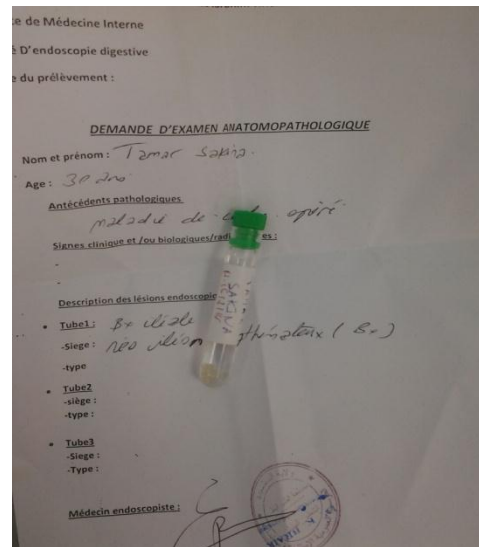
### **3) Verrerie et autre matériels :**

- Bacs de rinçage
- Cassettes en plastique
- Crayon
- Dakopen
- Eprouvette graduée
- Gants stérilisés
- Lames coupantes
- Lames et lamelles
- Micropipette
- Moules en métal Papier absorbant
- Pincés, pinceau et piquets
- Porte lames
- Portoirs inoxydables

#### 4) Réception du prélèvement :



Pièce opératoire



biopsie

#### 5) Réalisation de l'examen microscopique :

##### *a) Fixation :*

Lors de prélèvement, les fragments tissulaires ont été déposés dans les cassettes en plastique portant le numéros d'immatriculation correspondant puis immédiatement immergées dans une solution de formol à 10% pendant 24h.

##### *b) Circulation :*

Après la fixation, les cassettes ont séjourné dans un appareil de circulation réalisant les étapes suivantes :

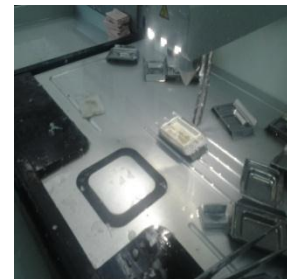
- Déshydratation des tissus par immersion successives dans 8 bains d'alcool éthylique de concentration croissante jusqu'à l'alcool absolu dont chacun dure 2 heures de temps.

- L'éclaircissement a été effectué dans 2 bains de xylène durant 2 heures
- L'imprégnation a été réalisée à chaud dans 2 cuves en acier inoxydable et thermostatées (65°) contenant de la paraffine liquéfiée chaque bain dure 2 heures de temps.

***c) Inclusion en paraffine :***

La phase d'inclusion a été réalisée comme suite :

- Les fragments tissulaires ont été placés et centrés dans des moules à moitié rempli de paraffine préalablement chauffés dans une consol thermique.
- Les parties des cassettes portant le numéro d'immatriculation ont été plaquées sur les fragments tissulaires suivit du remplissage total des moules avec la paraffine dissoute.
- Après refroidissement des moules sur un plateau réfrigéré, les blocs ont été démoulés et conservés au congélateur 4 °C jusqu'à la réalisation des coupes.





***d) Confection et étalement des coupes :***

Après débitage des blocs à l'aide d'un microtome rotatif, les rubans obtenus (3 à 5 µm d'épaisseur) ont été étalés sur des lames contenant de l'eau courante préalablement numérotées par le matricule correspondant, dépliés puis séchés sur une plaque chauffante réglée à 62°C puis directement mises dans une étuve à 100°C pendant 20 min afin d'éliminer la paraffine du prélèvement.



*f) Coloration des coupes*

- 2bains de xylène 2 min
- 3 bains d'alcool 2min
- 2 bains de hématoxyline 2min
- 1 bains d'eau 2min
- 1 bains d'alcool +HCL (quelque goutte ) 2min.
- 1 bains de R CH + NH<sub>3</sub>+ 5(quelque goutte)2 min.
- 2bains d'Eosine 2 min .
- 3 bains de R-OH 2min
- 1bains de xylène .



***g) Montage et observation :***

Après le séchage, les lames ont été parsemées de quelques gouttes d'Eukit et recouverte de lamelles, l'observation et la prise des photos ont réalisées à l'aide d'un photo microscope à différents grossissements.



**6) l'immunohistochimie :**

- Réalisation des coupes

Le même principe que l'examen microscopique sauf que les coupes ont été ramollies à la surface d'un bain marie réglé à 49° puis recueillies sur des lames silanisées et mises dans une étuve à 49° pendant toute la nuit.



➤ Déparaffinage et Réhydratation

- Déparaffinage des lames par immersion dans 2 bacs de xylène de 4 fois 5min.
- Réhydratation dans 3 bacs d'alcool de concentration décroissante dont le dernier est un mélange d'alcool et d'eau distillée (5min pour chacune).
- Puis blanchissement à l'eau distillée pendant 5 min.



➤ Démasquage des sites antigéniques :

- Transférer les lames dans un bac de solution de démasquage préchauffée pendant 40min.
- Sortir le bac du bain marie et laisser refroidir sur la paillasse pendant 20 min .
- Transférer le portoir dans un bac d'eau distillée
- Deuxième lavage en eau distillée (5min).
- Lavage en TBS pendant( 5min)



➤ **Immunomarquage**

- Préparation d'une chambre humide (Plateau +une compresse humide)
- Cerclage des coupes avec un feutre "DakoPen" pour empêcher la diffusion des anticorps sur toute la lame.
- Blocage des peroxydases endogènes en appliquant suffisamment d'eau oxygénée à 3% pendant 5min.
- Rinçage à l'eau distillée
- Placer les lames dans un bac de TBS propre pendant 5 min.
- Tapotage des lames pour éliminer l'excès en tampon.
- Appliquer suffisamment l'anticorps primaire sur toute la surface du tissu puis incuber dans chambre humide à 4°C pendant 5 min.
- Tapotage des lames pour éliminer l'excès en tampon.
- Application de l'EN Vision +Dual Link pendant 30min.
- Rinçage en TBS.
- Placer les lames dans un bac de TBS propre pendant 5 min.
- Révélation en appliquant suffisamment le substrat chromogène DAB sur tout le tissu (3à5min).
- Rinçage l'eau distillée.

➤ **Contre coloration et montage**

- Incubation des lames dans une solution d'hématoxyline de MEYER pendant 5 min
- Rinçage à eau distillée
- Rinçage en eau ammoniacquée.
- Rinçage à l'eau courante

La positivité de l'immunomarquage a été évaluée comme indicateur de la présence des cellules tumorales.

## Glossaire

- ✚ **Adénopathie** : gonflement d'un ou de plusieurs ganglions lymphatiques, ce gonflement témoigner d'une affection non tumorale (inflammation) ou tumorale qui peut être primitive (lymphome) soit secondaire (métastase).
- ✚ **Biopsie** : prélèvement d'un fragment de tissu ou d'organe à des fins d'examen microscopique.
- ✚ **Cytoponction** : Technique consistant à prélever, à l'aide d'une fine aiguille, des cellules d'une lésion située en profondeur en vue d'un diagnostic cytologique.
- ✚ **Cryoglobuline** : est une immunoglobuline présente dans le sang, cette dernière ayant la propriété de précipiter lorsque la température est inférieure de 37°.
- ✚ **Diaphragme** : cloison musculotendineuse qui sépare la cavité thoracique de la cavité abdominale.
- ✚ **Echographie** : L'échographie est un examen réalisé au moyen d'ultrasons. La réflexion (écho) des ondes permet de visualiser l'organe cible sur un écran.
- ✚ **Granulome** : tumeur de nature inflammatoire observée dans certaines maladies est formée par une prolifération de cellules dans un tissu (granulome pulmonaire).
- ✚ **Hématopoïèse** : c'est le processus physiologique permettant la création et le renouvellement des cellules sanguines ou hématocytes.
- ✚ **Hypogammaglobulinémie** : consiste en un groupe de maladies hétérogènes qui aboutissent à un déficit immunitaire d'expression et de gravité variable.
- ✚ **Hémogramme** : numération et formule sanguine (NFS).
- ✚ **Immunocompétente** : est la capacité de l'organisme à produire une réponse immunitaire normale après exposition à un antigène.
- ✚ **Laparotomie** : Dans certains cas, une opération est nécessaire pour examiner l'ensemble de la cavité abdominale, effectuer des prélèvements et enlever des organes atteints par la maladie. Ceci peut donner des informations nécessaires au choix du traitement.
- ✚ **Lymphome de Burkitt** : est une tumeur (lymphome non Hodgkin) qui provient de l'évolution maligne et de la prolifération des cellules.
- ✚ **Lymphopénie** : diminution du nombre des lymphocytes.

- ✚ **Monocléose infectieuse** :est une maladie provoquée par le virus d'Epstein Barr touche surtout les adolescent et les jeunes adulte
- ✚ **Mutation** : modification brusque et irréversible du matériel génétique (mutation spontanée)
  
- ✚ **Myélofibrose** : est une trouble de la moelle osseuse dans laquelle la moelle est remplacée par cicatrice de tissu.
- ✚ **Pléomorphe** : qui peut changer de forme selon des influences déterminées.
- ✚ **Prurit** : sensation naissant dans la peau et entraînant une envie de se gratter ,se déclencher par la libération dans la peau de différentes médiateurs chimiques notamment l'histamine.
  
- ✚ **Uricémie** : c'est la concentration de l'acide urique dans le sang
- ✚ **VCA** : anticorps anti capsid de virus