

Immunophénotypage des lymphomes non hodgkiniens en milieu hospitalier de Kinshasa

Immunophenotyping of non Hodgkin lymphoma in medical institutions in Kinshasa/

Kabongo MJM*, Salmon I**, Kalengayi RM*, Dehou M-F**, Rimmelink M**

Correspondance

Kabongo Mpolesha
Service d'Anatomopathologie, CUK
Courrier: mpolkabongo@yahoo.fr
tél.: 00243818113939

Summary

Objective and methods. Retrospective analysis of immunohistochemical features of 58 specimens from Non-Hodgkin's Lymphomas (NHLs) patients diagnosed between 1993 and 2002 in three Laboratories of Pathology in Kinshasa and classified according to WHO recommendations.

Results: B type lymphoma was the predominant form (96.5%). CD20, CD45RO and CD3+ antigens were observed in 62%, 13% and 2% of these NHLs respectively.

In lymphocytic lymphomas, 50% were of B type with LCA+, L26+ (50%), UCHL1-, and CD3- markers. B Lymphomas of lymphoplasmocytic type had LCA + (50%), L26+ (50%), UCHL1+ and CD3- antigens in only 12.5% cases. All the follicular lymphomas were of B type with LCA+, L26+ and CD3- (100%), while only 33% were UCHL1+. Diffuse large cell lymphomas were B, LCA+ (60,86%), L26+ (56,52%), UCHL1+, (13,04%) and CD3-. Burkitt lymphomas were LCA+ (47,3%), L26+ (63,1%), UCHL1- (100%) and CD3- (100%). B lymphomas of lymphoblastic type were LCA+ (50%), L26+ (100%), UCHL1 +(100%), CD3- (100%)

Conclusions: The immunohistochemical analysis available in our milieu has allowed the confirmation of the predominance of B type lymphoma in Kinshasa. This study and recent ones from the same milieu or from other subsaharan African countries highlight the accuracy of immunohistochemical analysis in the management of NHL in our context.

Key words: Non Hodgkin's Lymphomas, immunophenotyping, DR Congo

* Université de Kinshasa, Département de Biologie Médicale, Service d'Anatomie Pathologique B.P 864, Kinshasa 11, République Démocratique du Congo

** Université Libre de Bruxelles, Hôpital Erasme, Service d'Anatomie Pathologique, Route de Lennik 808-B-1070, Bruxelles, Belgique

Résumé

Objectif: Déterminer le phénoype par analyse immunohistochimique, des lymphomes non-hodgkiniens dans 3 laboratoires d'histopathologie de Kinshasa.

Matériel et méthodes : Etude rétrospective de 58 spécimens de biopsies des lymphomes non-hodgkiniens provenant de 3 laboratoires d'anatomie pathologique de Kinshasa analysés entre 1993 et 2002. Ces échantillons ont été repris selon la classification en vigueur de l'Organisation mondiale de la Santé. Les anticorps utilisés pour l'étude immunohistochimique ont été : le vimentine, le LCA (CD45), le L26, l'UCHL1 (CD45RO) et le CD3.

Résultats : Quasi tous les spécimens de LNHs analysés se sont révélés être des lymphomes B (96,5%). L'antigène CD20 a été identifié dans 62% des cas, le marqueur UCHL1 était positif sur 13% d'échantillons et seulement 2% des spécimens étaient CD3+. Parmi les lymphomes lymphocytiques, 50% étaient des lymphomes B LCA+, L26+, UCHL1-, et CD3-. Les lymphomes lymphoplasmocytaires étaient dans 50%, des lymphomes B LCA+, L26+, avec seulement 12,5% porteurs de UCHL1+, et CD3-. Tous les lymphomes folliculaires étaient de type B (100%), LCA+ (100%), L26+ (100%), et CD3- (100%) ; 1/3 d'entre eux (33,3%) portait l'antigène UCHL1+. Les lymphomes diffus à grandes cellules étaient tous CD3-, mais porteurs dans 60,86% des cas de l'antigène LCA+ ; 56,5% exprimaient le marqueur L26+ ; tandis que l'UCHL1+ était visible uniquement chez 13% d'échantillons. Les 19 cas de lymphome de Burkitt dans cette série étaient des lymphomes B tous CD3- et UCHL1-. Ils ont exprimé l'antigène LCA+ dans 47,3% des cas, et le L26+ dans 63,1%. Quant aux lymphomes lymphoblastiques identifiés dans le groupe, ils étaient tous CD3-, UCHL1 et L26+ ; avec 50% de LCA+.

Conclusion : L'immunophénotypage des LNHs réalisable dans notre contexte, a permis la confirmation de la prépondérance du lymphome B chez nous. Cette enquête d'avant 2003 et d'autres ultérieures dans notre service et ailleurs en Afrique, illustrent le besoin de vulgarisation de l'analyse immunohistochimique en vue d'une meilleure prise en charge diagnostique et thérapeutique des lymphomes

Mots clés : Lymphomes Non-Hodgkiniens, immunophénotypage, Kinshasa, RDCongo

Introduction

De nombreux travaux ont été consacrés aux lymphomes dans la littérature mondiale et illustrent la pertinence de l'immunophénotypage dans la classification de ces hémopathies (1-17). Les données africaines sont éparpillées dans ce secteur ; notamment l'étude princeps de Thomas et *al.* (18) au Nigeria en 1991. Des études menées en R D Congo, la première à notre connaissance est celle de De Smet et *al.* en 1956 (19), suivie du travail d'Olson et son équipe en 1969 (20). Ces derniers auteurs ont étudié la tumeur de Burkitt, avant Kalengayi et *al.* qui, en 1984, ont décrit le lymphome de Burkitt (21) et la maladie de Hodgkin la même année (22). Plus récemment, l'équipe de Kalengayi et Kabongo a revu des cas de maladie de Hodgkin et les LNHs à la lumière de nouvelles classifications standard (23, 24). La présente étude couvrant la période de 1998 à 2003, et recourant à l'immunophénotypage des lymphomes, est la première du genre dans notre milieu. Elle vise essentiellement à démontrer la faisabilité de la technique dans notre service en étudiant la réactivité des anticorps monoclonaux sur les spécimens fixés au formaldéhyde 10% et enrobés dans la paraffine. La pratique de l'analyse immunohistochimique pourrait contribuer à améliorer le diagnostic et la prise en charge thérapeutique des lymphomes chez nous. D'autres travaux consacrés aux lymphomes ont été initiés dans notre laboratoire, illustrant la pertinence de la recherche dans ce domaine (25); il en est de même de nombreux autres rapports en Afrique Subsaharienne à partir de 2008 (26-28).

Matériel et méthodes

L'enquête rétrospective a couvert la période du 1er janvier 1993 au 17 mai 2002. Cent quatre-vingt sept biopsies provenant du Laboratoire d'Anatomie Pathologique des Cliniques Universitaires de Kinshasa (CUK ; 1994-2002),

72 du Laboratoire d'Anatomie Pathologique du Centre Yolo-Médical, 36 du Laboratoire de l'Institut National de Recherche Biomédical (INRB, 1993-2002), 29 du Laboratoire d'Anatomie Pathologique de l'Hôpital Général Provincial de Référence de Kinshasa (HGPRK, 1993-2002), 50 biopsies ont été répertoriées. Elles concernaient tous les spécimens pour lesquels un diagnostic de lymphome était évoqué, quel qu'en soit le type. L'immunomarquage n'a concerné que 110 biopsies sur base des blocs de paraffine retrouvés et encore utilisables. La procédure était marquée par l'usage en premier lieu de l'anticorps anti-vimentine en vue de la sélection pour soumission à d'autres anticorps. Cinquante huit cas de LNHs ont été retrouvés dans le groupe et ont constitué la base de l'étude.

Procédure

Après recatégorisation des LNHs selon les recommandations de l'OMS, les spécimens retenus ont été soumis à quatre gammes d'anticorps : anti-LCA (leucocyte common antigen), L26 (anti-CD20), UCHL1 (anti-CD45RO) et anti-CD3.

L'anticorps anti-LCA révèle les antigènes communs à tous les globules blancs. L'anticorps L26 ou CD20 reconnaît les antigènes des lymphocytes B, dont il est un marqueur spécifique (9-13). L'anti-CD3 et le UCHL1, révélateurs des antigènes des lymphocytes T, sont des marqueurs des lymphomes T : le UCHL1 marquant occasionnellement les lymphomes B (1, 7, 10-12).

Le tableau 1 illustre la provenance de ces anticorps et le fabricant, de même que les diverses dilutions utilisées. Les images ont été photographiées à l'aide d'une caméra montée sur un microscope assisté par un ordinateur.

Tableau 1 : Dilutions, firmes et références des anticorps utilisés dans cette étude

Anticorps Anti-	Firme	Références
Vimentine*	Biogenex	MU-074 UC
LCA*	Novocastra	NCL-L-LCA-RP
CD20 (L26)**	Dako	M 0755
CD45RO (UCHL-1)**	Biogenex	MU-113 UC
CD3**	Novocastra	NCL-CD3-PS1

* Dilution 1/200 ; ** Dilution 1/100 ; type anticorps : monoclonal

Technique Immunohistochimique

Les différentes étapes sont reprises ci-dessous : Le déparaffinage des coupes est réalisé grâce à 2 bains de xylol en les laissant séjourner 7 minutes dans chaque bain. Elles sont ensuite réhydratées en les passant pendant 5 minutes dans des solutions d'alcool à concentrations décroissantes (à 100°, 95°, 70°) pour terminer dans l'eau distillée : elles subissent alors un prétraitement si nécessaire. Celui-ci consiste en un passage soit dans la trypsine durant 20 minutes à 37°C 1900~1 CaC₁₂ 0,1% pH 7.8 dans un aliquot (-20°C), soit dans la pepsine durant 5 minutes à 37°C aliquot (-20°C), dans la protéase pendant 10 minutes à la température ambiante aliquot (-20°C), dans la protéase K durant 7 minutes à la température ambiante prêt à l'emploi ou dans un micro-ondes dans du tampon citrate pH 6.0.

Ces spécimens seront refroidis pendant 20 à 30 minutes ; avant le passage à l'inhibition des peroxydases endogènes pendant 30 minutes à la température ambiante, à l'aide de 200 ml de méthanol + 6 ml de H₂O₂ 30%.

Les coupes sont alors rincées à l'eau courante d'abord, puis à l'eau distillée avant trempage pendant 10 minutes dans du tampon TBS pH 7.6. Cette étape est suivie par une 1^{ère} incubation avec le 1^{er} anticorps et rinçage 2 fois dans du tampon TBS pH 7.6, pendant 7 minutes.

La seconde incubation s'effectue avec le 2^{ème} anticorps (biotinylated anti-immunoglobulins for mouse, rabbit, guinea, pig and rat antibodies

= MULTILINK) pendant 20 minutes à la température ambiante et à la dilution de 1/100 (diluant spécifique). Les coupes seront alors rincées 2 fois pendant 7 minutes à l'aide du tampon TBS pH 7.6 et ensuite interviendra une nouvelle incubation avec le complexe Streptavidine-Peroxydase (marqueur à révéler avec le chromogène DAB) pendant 20 minutes à la température ambiante et à la dilution 1/100 (diluant spécifique).

Elles seront rincées dans du tampon TBS pH 7.6, 2 fois pendant 7 minutes; la peroxydase sera révélée avec le chromogène DAB contenu dans un Kit comprenant : 4,5 ml eau bidistillée, 0,5 ml tampon concentré, 4 gouttes de chromogène et 2 gouttes de H₂O₂.

Les lames sont alors de nouveau rincées à l'eau courante (du robinet) d'abord, puis à l'eau distillée, avant une contre coloration avec l'hématoxyline de Mayer pendant 2 à 5 minutes. La dernière étape consiste à bleuir les lames dans l'eau courante.

Résultats

L'immunomarquage réalisé sur les 58 spécimens de biopsies des LNHs a révélé 2 cas de lymphomes lymphocytiques, dont un lymphome B LCA+, L26+, et un second UCHL1- et CD3- . Huit cas de Lymphomes lymphoplasmocytaires retrouvés étaient des lymphomes B LCA + (50%), L26+ (50%), UCHL1+ et CD3- (12,5%). L'unique cas de lymphome des cellules du manteau de notre série était un lymphome B LCA- L26+ UCHL1+ CD3-. Trois cas de lymphomes folliculaires dans ce groupe correspondaient aux lymphomes B (100%), LCA+ (100%), L26+ (100%), CD3- (100%) et UCHL1+ (33,3%). Les lymphomes diffus à grandes cellules étaient tous CD3-(100%) avec respectivement l'expression des marqueurs LCA+ (60,86%), L26+ (56,52%), et UCHL1+ (13,04%) (Tableau 2).

Tableau 2 : Synthèse de l'Immunomarquage des cas de LNHs (Réactivité par anticorps : anti-

Types de lymphomes	Nb	Vimentine	LCA	L26	UCHL1	CD3	Immunotype	
		+	+	+	+	+	B	T
Leucémiolymphoïde chronique	2	2	2	1	0	0	2	-
Lymphome lymphoplasmocytoïde	8	8	4	4	1	0	8	-
Lymphome des cellules du manteau	1	1	0	1	1	0	1	-
Lymphome folliculaire (diffus)	3	3	3	3	1	0	3	-
Lymphome à grandes cellules	23	23	14	13	3	1	21	2
Lymphome de Burkitt	19	19	9	12	0	0	19	-
Lymphome lymphoblastique	2	2	1	2	2	0	2	-
Total	58	58	33	36	8	1	56	2
Fréquences (%)	100	100	56,6	62	13	2	96,5	3,4

En d'autres termes ces lymphomes ont été L26+ dans 13/58 LNHs (22,41%). Les 19 cas de lymphome de Burkitt étaient des lymphomes B LCA+ (47,3%), L26+ (63,1%), UCHL1- (100%) et CD3- (100%). Tous les lymphomes lymphoblastiques décrits étaient des lymphomes B L26+ (100%), UCHL1+(100%), CD3- (100%), avec toutefois 50% d'entre eux exprimant le LCA+.

La quasi-totalité des lymphomes ont été de type B dans ce groupe (96,5%) avec des antigènes LCA+ (56,8%), et L26+ (62%). Les lymphomes T ont été très rarement identifiés, exprimant le UCHL1+ (13%) et le CD3+ (2%) (Tableau 2). Les lymphomes CD20+ UCHL1- CD3- ainsi que les CD20 + UCHL1+ CD3- ont été considérés comme des lymphomes B.

La Figure 1 illustre un cas de lymphome lymphoblastique avec activité macrophagique intense, CD 20+ et UCHL 1-.

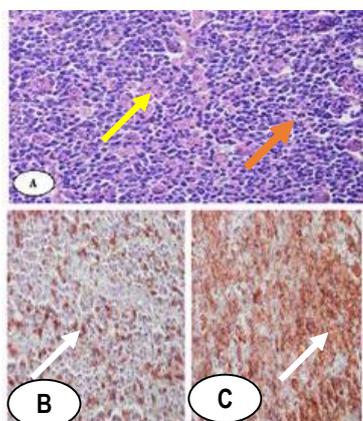


Figure 1 : A : Lymphome Lymphoblastique avec activité macrophagique intense (lymphoblastes= le fond des cellules à noyau bleu (flèches jaunes), macrophages= grandes cellules à cytoplasme

éosinophile (flèches rouges) (HE 400×) ; B : Lymphome Lymphoblastique avec activité macrophagique intense, UCHL1 négatif (cellules marquées en brun, flèches blanches), 400× ; C : Lymphome Lymphoblastique avec activité macrophagique intense, CD20 (L26) positif (cellules marquées en brun, flèches blanches), 400×

Discussion

L'immunomarquage et la relecture des spécimens biopsiques selon le modèle actualisé de l'OMS montrent que dans les centres concernés, les LNHs rencontrés sont quasi tous de type B. Les différents immunomarqueurs retrouvés ont été en terme de fréquence : le L26+ (62%), LCA+ (56,8%), UCHL1+ (13%) et CD3+ (2%). Ces observations sont semblables à celles décrites par Tumwine et *al* en Ouganda, avec 92% des lymphomes B dans une série (26, 27). Thomas et son équipe ont rapporté au Nigéria, concernant l'immunoréactivité L26, 75% de spécimens positifs, valeur proche des 62% de notre série. Ces valeurs sont toutefois inférieures aux 100% d'échantillons positifs pour ce marqueur, dans un groupe décrit par Muzaffar et *al* (10). La non expression du L26 sur la totalité de lymphomes B a été décrite ailleurs dans quelques études antérieures, renforçant ainsi l'observation dans notre petite série (9, 13). Les disparités rapportées pourraient résulter des effets d'une fixation prolongée dans la présente série, fait rapporté par d'autres auteurs (1). La proportion non négligeable des lymphomes négatifs pour le LCA dans cette étude (43%) est un fait à

considérer; en effet la fixation prolongée pourrait induire l'altération de certains marqueurs, tout comme certains anticorps anti-LCA ne réagissent pas de façon optimale sur les spécimens fixés au formol et enrobés dans la paraffine. La différenciation plasmocytaire de certains lymphomes pourrait également justifier ce phénomène, les cellules néoplasiques perdant l'immunoréactivité pour le LCA.

Outre les anomalies imputables au protocole technique, notamment la fixation prolongée, la proportion importante de lymphomes lymphocytiques (ou leucémie lymphoïde chronique) exprimant le L26+ (50%) pourrait être également liée au fait que ce marqueur B ne présente pas une sensibilité totale comme montré ailleurs (9-12). Le seul cas L26-, UCHL1+ et CD3- a quant à lui été considéré comme un lymphome B.

Un lymphome plasmocytaire sur deux a présenté dans cette étude, une positivité pour le L26; ce fait est exceptionnel vu que les plasmocytes bénins ou malins sont généralement L26- et ont tendance en se différenciant à perdre les marqueurs B spécifiques (17). Cette positivité s'expliquerait par l'acquisition d'un phénotype aberrant par les cellules néoplasiques ou par leur différenciation plasmocytaire incomplète. Cinquante % de ces lymphomes plasmocytaires étaient aussi paradoxalement LCA+, l'anticorps anti-LCA ne réagissant pas avec les plasmocytes (8); la différenciation plasmocytaire incomplète, ou l'acquisition d'un phénotype aberrant par les cellules néoplasiques pourraient expliquer cette situation.

L'unique cas de lymphome des cellules du manteau de cette série était LCA- L26+ UCHL1+ CD3. Les centrocytes, cellules du centre germinatif d'un follicule lymphoïde stimulé, sont des lymphocytes B, donc L26+. La curiosité est le marquage UCHL1+ qui, tout en étant occasionnellement exprimé par les lymphocytes B (7,10-12), pourrait traduire

l'acquisition d'un phénotype aberrant par les centrocytes néoplasiques.

Le marqueur UCHL1+ étant occasionnellement exprimé sur les lymphocytes B comme évoqué ci-dessus (1, 7), on peut comprendre sa présence dans 30% de lymphocytes folliculaires dans cette enquête.

La présente étude a décrit une proportion de 22,41% de lymphomes à grandes cellules regroupant les lymphomes immunoblastiques, centroblastiques et les anaplasiques à grandes cellules des classifications de KIEL et REAL. Cette proportion est largement supérieure à celle de 5% de Thomas et *al* (18) dans une enquête au Nigéria. Le protocole technique, avec le temps de fixation prolongé dans notre série, pourraient expliquer cette différence; Dans le même laboratoire et dans un travail ultérieur, Lebwaize et *al* avaient observé 100% d'immunoréactivité pour le L6 (CD 20)(25).

Dans les lymphomes de Burkitt, la positivité pour le L26 CA+ est plus faible que celles de 100% par Thomas et *al*. (18) au Nigeria, ainsi que Lebwaize et *al*. (25) dans une série incluant 6 laboratoires de Kinshasa. La méthodologie différente et les aléas des protocoles de conditionnement des spécimens pourraient être les faits déterminants; de même que le fait connu que le L26 n'est pas positif dans tous les lymphomes B (9).

L'identification concomitante des marqueurs L26+ UCHL1+ sur les 2 lymphomes lymphoblastiques dans cette étude est préoccupante ; la nature B de ces lymphomes est néanmoins confortée par la négativité du CD3, spécifique des lymphocytes T ; et la littérature soutient que l'UCHL1+, quoique très présent sur les lymphocytes T, marque parfois les lymphocytes B. Quelques travaux récents ont rapporté l'expression du L26+ sur des lymphocytes T (14), jadis considérés comme exclusif des lymphocytes B (10-12). Quelques auteurs soutiennent toutefois que les lymphomes lymphoblastiques sont L26- et les cas positifs seraient donc des lymphomes lymphoblastiques T à phénotype aberrant.

Conclusions et perspectives

La présente enquête princeps dans notre milieu, montre la réalité de l'analyse immunohisto-chimique sur des spécimens fixés au formaldéhyde 10% et enrobés dans la paraffine et conservés pendant longtemps. Elle suggère la prédominance du type B dans les LNHs et l'implication de cette technique dans une meilleure orientation diagnostique et de stratégies thérapeutiques. Les protocoles opérationnels méritent néanmoins codification et vulgarisation pour une meilleure rentabilité.

Remerciements

Nous avons le plaisir de remercier vivement l'Université Libre de Bruxelles pour nous avoir accordé la bourse qui nous a permis de finaliser ce travail. Notre gratitude est exprimée au Personnel Technique du Service d'Anatomie Pathologique de l'Hôpital Erasme/ULB ainsi qu'à celui du Service d'Anatomie Pathologique des CUK, de l'INRB, du Centre Yolo Médical et de l'Hôpital Général Provincial de Références de Kinshasa pour la franche collaboration.

Références

1. Elias JM. The lymph node biopsy. Immunophenotype. In ELIAS JM: Immunohistopathology. A practical approach to diagnosis". Ed: ELIAS JM; Chicago, ACSP PRESS, p. 236, 1990.
2. Chan JKC, NG CS and Hui PK. A simple guide to the terminology and application of leucocyte monoclonal antibodies. *Histopa-thology* 1988; **12**: 461-480.
3. Myskow MW, Krajewski AS, Salter DM, Dobson CM and Miller EP. Paraffin section immunophenotyping of Non-Hodgkin's Lymphomas, using a panel of monoclonal antibodies. *Am J Clin Pathol* 1988; **90**: 564-574.
4. Chott A, Kaserer K, Augustin I, Veseley M and Heinz R. Ki-1 positive Large Cell Lymphoma. A clinicopathologic study of 41 cases. *Am J Sur Pathol* 1990; **14**: 439-448.
5. Weiss, LM, Wood GS and Dorfmann FR. T-cell signet-ring cell lymphoma. A histologic, ultrastructural and immunohistochemical study of two cases. *Am J Surg Pathol* 1985; **9**: 273-279.
6. Piris M, Brown DC, Gatter KC and Mason DY. CD30 expression in non hodgkin's lymphoma. *Histopathology* 1990; **17**: 211-218.
7. Chan JKC, NG CS and Hui PK. A simple guide to the terminology and application of leucocyte monoclonal antibodies. *Histopa-thology* 1988; **12**: 461-480.
8. Kurin PJ, Pinkus GS. Leucocyte common antigen: A diagnostic discriminant between hematopoietic neoplasms in paraffin sections using monoclonal antibodies: Correlation with immunologic studies and ultrastructural localization. *Hum Pathol* 1985; **16**(4): 353-365.
9. Norton AJ, Isaacson PG. Monoclonal antibody L26: An antibody that is reactive with normal and neoplastic lymphocytes in routinely fixed and paraffin embedded tissues. *J Clin Pathol*, 1987; **40**(12): 1405-12.
10. Muzaffar S, Pervez S, Aijaz F, Aziz SA, Hasan SH. Immunophenotypic analysis of non-Hodgkin's lymphoma. *J Pak Med Assoc* 1997; **47**: 106-109.
11. Linder J, YE Y, Armitage JO, et al. Monoclonal antibodies marking B-cell non hodgkin's lymphoma in paraffin sections. *Mod Pathol* 1988; **1**(1): 29-34.
12. Smith SH, Brown MH, Rowes D, et al. Functional subsets of human helper-inducer cells defined by a new monoclonal antibody, UCHL1. *Immunology* 1986; **58**(1): 63-70.
13. Lauritzen AF, Ralfkiaer E: Use of monoclonal antibodies for the typing of malignant lymphomas in routinely processed biopsy samples. *APMIS* 1991; **99**: 631-639.
14. Yokose N, Ogata K, Sugisaki Y, Mori S, Yamada T, AN E, Dan K. CD20-positive T cell leukemia/lymphoma: case report and review of the literature. *Ann Hematol* 2001; **80**: 372-375.
15. Chadburn A, Knowles DM: Paraffin-resistant antigens detectable by antibodies L26 and polyclonal CD3 predict the B- or T-cell lineage of 95% of diffuse aggressive non-Hodgkin's lymphomas. *Am J Clin Pathol* 1994; **102**: 284-291.
16. Wang J, Sun NC, Nozawa Y, Arber DA, Chu P, Chang KL, Weiss LM. Histological and immunohistochemical characterization of extranodal diffuse large-cell lymphomas with prominent spindle cell features. *Histopa-thology* 2001; **39**: 476-81.
17. Henry K. Neoplastic disorders of lymphoreticular tissue. In "Systemic Pathology: thymus, lymph node, spleen and lymphatics". Eds: HENRY K and SYMMERS W St C; Churchill Livingstone. London. Third Edition, 1992, pp 611-960.

18. Thomas JO, Rafindadi A, Heryet A, Jones M, Gatter, KC. and Mason, DY. Immunophenotyping of Nigerian cases of non Hodgkin's lymphomas on paraffin sections. *Histopathology*, 1991; **18**: 505-510.
19. De Smet MP: Observations cliniques des tumeurs malignes des tissus réticulo-endothéliaux et des tissus hémolymphopoiétiques au Congo. *Ann Soc Belge Méd Trop* 1956 ; **36**: 53-70.
20. Olson CW, Smith JH, Testerman N, Bastin JP and Frazee H. Burkitt's tumors in the Democratic Republic of Congo. *Cancer* 1969; **23**: 740-746.
21. Kalengayi MMR. and Mubikayi L. Pathology of Burkitt's Lymphoma in Zaire. In *Virus-Associated Cancers in Africa*. Eds: Williams AO, O'Connor GT, De-The GB and Johnson CA; Oxford. Oxford University Press. 1984, pp 655-664.
22. Mubikayi L et Kalengayi MMR. La Maladie de Hodgkin au Zaïre. Profil histopathologique et anatomoclinique. In Williams AO, O'conor GT, De-THE GB et Johnson CA (eds): "Les Cancers associés aux virus en Afrique". Oxford. University Press. 1984, pp, 675-685.
23. Kabongo MJM et Kalengayi MMR. Réévaluation du Profil anatomoclinique de la Maladie de Hodgkin en République Démocratique du Congo. *Congo Médical* 1998 ; **2**: 269-274.
24. Kabongo MJM et Kalengayi MMR. Profil anatomoclinique des lymphomes non-hodgkiniens en République Démocratique du Congo à la lumière de la Classification Internationale de Kiel. *Congo Médical* 1998 ; **2**: 350-356.
25. Lebwaze BM, Kabongo JM, Kalengayi RM, Youssef H, Hugues P, Luzzi A, Ilunga JN, Raphaël M. Apport de l'immunohistochimie dans le diagnostic des lymphomes B agressifs chez les patients Infectés ou non par le VIH en République démocratique du Congo. *Ann. Afr. Med.* 2012; **5**(4): 1134-1140.
26. Tumwine L, *et al.* B-cell non-Hodgkin lymphomas in Uganda: an immunohistochemical appraisal on tissue microarray. *Hum Pathol* 2008, **39**: 817-823.
27. Tumwine LK, Agostinelli C, Campidelli C. *et al.* Immunohistochemical and other prognostic factors in B cell non Hodgkin lymphoma patients, Kampala, Uganda. *BMC Clin Pathol.* 2009; **9**: 11.
28. Adisa AO, Oluwasola AO, Adeyemi BF, Kolude B, Akang EE, Lawoyin JO. Immunohistochemical analysis of undifferentiated and poorly-differentiated head and neck malignancies at a tertiary hospital in Nigeria. *Head Neck Oncol.* 2010; **2**: 33.
29. Oluwasola A, Olayiwola Olaniyi John A, Otegbayo Jesse A, Ogun Gabriel O, Akingbola Titi S, Ukah Cornelius O, Akang Effiong EU, Aken'Ova Yetunde A. A Fifteen-Year Review of Lymphomas in a Nigerian Tertiary Healthcare Centre *Journal of Health Population and Nutrition*; 2011; **29**: 310–316 .
30. Décio de Natale Caly, Abrão Rapoport, Otávio Alberto Curioni, Rogério Aparecido Dedivitis, Claudio Roberto Cernea, Lenine Garcia Brandão. Value of immunohisto-chemistry in the diagnosis of malignant cervical lymph nodes. *Braz. J. Otorhinolaryngol* 2013; **79**(5): 625-8.

