

UNIVERSITE DE LILLE
FACULTE DE MEDECINE HENRI WAREMBOURG
Année 2022

THESE POUR LE DIPLOME D'ETAT
DE DOCTEUR EN MEDECINE

**APPORT DU MARQUEUR H-FTAA DANS LE DIAGNOSTIC
DE L'AMYLOSE**

Présentée et soutenue publiquement le 03/10/2022
à 16H00 au pôle recherche

Par William LERICHE

JURY

Président :

Monsieur le Professeur Xavier LEROY

Asseseurs :

Madame le Professeur Viviane GNEMMI

Monsieur le Docteur Louis TERRIOU

Directeur de thèse :

Monsieur le Docteur Jean-Baptiste GIBIER

Avertissement

La Faculté n'entend donner aucune approbation aux opinions émises dans les thèses : celles-ci sont propres à leurs auteurs.

Liste des abréviations

AL	Amylose Light chain
AMM	Autorisation de mise sur le marché
ARN	Acide ribonucléique
BGO	Biopsie de graisse ombilicale
BGSA	Biopsie de glandes salivaires accessoires
BMDex	Bortezomib - Melphalan - Dexaméthasone
BNP	Brain natriuretic peptide
BOM	Biopsie ostéo-médullaire
CL	Chaîne légère
ECG	Electrocardiogramme
ERO	Espèces réactives de l'oxygène
FEVG	Fraction d'éjection du ventricule gauche
HES	Hématoxyline éosine safran
IEC	Inhibiteur de l'enzyme de conversion
Ig	Immunoglobuline
IHC	Immunohistochimie
IRM	Imagerie par résonance magnétique
MGUS	Gammopathie monoclonale de signification indéterminée

MM	Myélome multiple
NT-proBNP	N-terminal pro Brain natriuretic peptide
NYHA	New York Heart Association
PAS	Acide Périodique de Schiff
RMN	Résonance magnétique nucléaire
RC	Rouge Congo
SAA	Sérum amyloïde A
SAP	Serum amyloid P
ThT	Thioflavine T
TNF	Tumor necrosis factor
TTR	Transthyrétine

Sommaire

Avertissement.....	2
Liste des abréviations.....	3
Sommaire	5
Résumé	7
Introduction.....	8
1 Généralités sur les amyloses	8
1.1 Amylose AL	9
1.1.1 Epidémiologie	9
1.1.2 Physiopathologie de l'amylose AL	9
1.1.3 Manifestations cliniques.....	12
1.1.4 Pronostic et traitements	16
1.2 L'amylose AA	19
1.2.1 Epidémiologie	19
1.2.2 Physiopathologie de l'amylose AA.....	19
1.2.3 Manifestations cliniques.....	20
1.2.4 Pronostic et traitement.....	21
1.3 Amyloses héréditaires	21
1.3.1 Epidémiologie	21
1.3.2 Physiopathologie de l'amylose héréditaire à transthyrétine (ATTRv)....	22
1.3.3 Manifestations cliniques de l'amylose héréditaire à transthyrétine.....	23
1.3.4 Pronostic et traitement.....	24
1.4 Amylose à transthyrétine wild-type	25
2 Diagnostic de l'amylose.....	28
2.1 Généralités	28
2.2 Types de prélèvements	29
2.2.1 Biopsie myocardique.....	29
2.2.2 Biopsie rénale	30
2.2.3 Biopsie des glandes salivaires accessoires	30
2.2.4 Aspiration et biopsie de graisse sous ombilicale.....	31
2.2.5 Autres sites biopsiques	32
2.3 Techniques histochimiques	33
2.3.1 Coloration du Rouge Congo.....	33

2.3.2	La thioflavine T et S	39
2.3.3	Autres colorations	40
2.3.4	L'H-FTAA	41
2.4	Typage de l'amylose.....	43
2.4.1	Immunohistochimie	43
2.4.2	Immunofluorescence.....	44
2.4.3	Microscopie électronique	45
2.4.4	Techniques protéomiques.....	45
3	Objectifs de l'étude	47
	Matériel et méthodes	49
1	Sélection des prélèvements	49
2	Techniques histologiques	50
2.1	Marquage par l'H-FTAA.....	50
2.2	Coloration par le rouge Congo	51
3	Méthode d'analyse	51
4	Analyse statistique	52
	Résultats.....	53
1	Validation de la méthode	53
2	Flowchart.....	56
3	Analyses descriptives	57
4	Résultats discordants	63
5	Performances diagnostiques	69
	Discussion	70
1	Justificatif de l'étude	70
2	Performances diagnostiques de l'H-FTAA.....	72
3	Discussion des cas discordants	73
4	Facilité d'interprétation de l'H-FTAA et concordance inter-observateur.	75
5	Facilité de la mise en œuvre de l'H-FTAA.....	77
6	Pertinence de la méthode.....	78
7	Limites de l'étude	79
	Conclusion et Perspectives	80
	Références	82
	ANNEXE 1.....	90
	ANNEXE 2.....	91

Résumé

Contexte :

Les amyloses regroupent un ensemble de maladies caractérisées par la présence de dépôts protéiques insolubles prenant une conformation spécifique en feuillets β -plissés. Actuellement, leur diagnostic histopathologique est basé sur la coloration du Rouge Congo qui offre de bonnes performances diagnostiques mais peut se révéler parfois insuffisante en raison d'un manque de sensibilité sur les dépôts de faible abondance et d'une certaine subjectivité d'interprétation. Le développement de nouveaux outils diagnostics telle que la sonde luminescente conjuguée H-FTAA apporte une alternative prometteuse par rapport au Rouge Congo. Notre objectif est d'évaluer la place de ce marqueur dans le dépistage de l'amylose.

Matériel et Méthodes :

Nous avons conduit une étude rétrospective monocentrique sur l'ensemble des biopsies des glandes salivaires accessoires et des biopsies de graisse ombilicale adressées à l'institut de pathologie du CHU de Lille pour suspicion d'amylose entre le 1^{er} janvier 2019 et le 31 décembre 2019. Chaque prélèvement disponible a été marqué par la sonde fluorescente H-FTAA puis interprété par deux observateurs indépendants et en aveugle des résultats définitifs. Ces résultats ont ensuite été comparés au statut du Rouge Congo après relecture, considéré comme le gold standard. La sensibilité, la spécificité et la concordance diagnostique inter-observateur ont été calculées en référence au gold standard.

Résultats :

Sur 183 prélèvements analysés, l'H-FTAA retrouve 33 cas positifs d'amylose. Comparativement au Rouge Congo, le marquage par l'H-FTAA présente une sensibilité de 0,97 et une spécificité de 0,99. Par ailleurs, il a permis la requalification du diagnostic initial après relecture du Rouge Congo dans 3 cas sur 33 (9%). Leur typage révèle des formes à transthyrétine wild-type. La concordance inter-observateur est estimée à 0,89, démontrant une bonne reproductibilité grâce à sa simplicité de lecture.

Conclusion :

Les performances diagnostiques de l'H-FTAA dans la recherche d'amylose systémique apparaissent proches du gold standard actuel. Sa capacité à détecter les atteintes minimales sur les tissus suggère d'ailleurs une sensibilité supérieure face au Rouge Congo dont c'est l'une des principales limites reconnues. Sa facilité d'emploi et d'interprétation font également de la sonde H-FTAA un marqueur complémentaire idéal dans cette indication, en particulier dans les atteintes précoces ou pour les formes ATTR wild-type.

Introduction

1 Généralités sur les amyloses

Les amyloses forment un groupe de maladies rares caractérisées par des dépôts protéiques extracellulaires dans divers organes ou tissus. Ces dépôts de précurseurs protéiques polymérisés s'assemblent en prenant une conformation anormale, hautement organisée dite en feuillets bêta plissés [1].

Il existe à ce jour près de 40 protéines amyloïdogènes qui ont été identifiées comme pouvant induire la formation de dépôts amyloïdes chez l'homme. L'utilisation de la spectrométrie de masse comme méthode de typage des dépôts amyloïdes continue d'élargir ce spectre en mettant en évidence de nouveaux types d'amylose [2].

On distingue classiquement deux groupes au sein des amyloses, héréditaire ou acquise, en fonction de l'origine des dépôts de protéines.

Elles peuvent toucher, selon le précurseur protéique, un organe spécifique (amylose cardiaque, amylose rénale ...) ou plusieurs tissus à la fois, elle est alors dénommée amylose systémique (tableau 1) [1].

1.1 Amylose AL

1.1.1 Epidémiologie

L'amylose AL est la plus fréquente des amyloses systémiques dans les pays occidentaux, en particulier en Europe et en Amérique du Nord. Son incidence est estimée entre 1/80 000 et 1/330 000 [3]. Elle touche essentiellement les adultes et les sujets âgés avec une moyenne d'âge au diagnostic de 63 ans [4].

1.1.2 Physiopathologie de l'amylose AL

Cette maladie résulte directement de la production de chaînes légères d'immunoglobuline (Ig) monoclonales par un clone tumoral de cellule B, correspondant le plus souvent à un plasmocyte. Les chaînes d'Ig s'agrègent selon une conformation anormale et se disposent en fibrilles insolubles. C'est en microscopie électronique qu'a initialement été identifiée l'ultrastructure des fibrilles, d'une taille de 7 à 10 nm de diamètre, droites, enchevêtrées mais non branchées (Figure 1) [5]. La disposition si particulière des protéines en feuillets β -plissés est mise en évidence grâce aux techniques de diffraction par rayons X [6]. Plus récemment, les progrès en imagerie par résonance magnétique nucléaire (RMN) et par microscopie électronique par transmission à balayage ont permis non seulement d'identifier les structures moléculaires des fibrilles mais aussi de distinguer des différences dans l'organisation des dépôts selon les différents types d'amylose [7].

Les chaînes légères d'Ig ne sont pas les seuls composants retrouvés au sein des dépôts amyloïdes. Ils comportent également des glycosaminoglycanes, des protéoglycanes et le composant amyloïde P (SAP) [8]. Il s'agit d'une protéine

plasmatique précurseur du composé amyloïde (AP) et retrouvée dans toutes les fibrilles, qu'elles soient issues d'une amylose ou de toute autre pathologie protéique conformationnelle comme par exemple la maladie d'Alzheimer. Ce composé semble être à l'origine de la stabilisation des dépôts [9].

Il faut toutefois rappeler que toutes les chaînes légères (CL) d'Ig ne sont pas pourvoyeuses d'amylose. En effet, les maladies responsables d'hyperproduction de CL comme le myélome multiple (MM) ou la gammopathie monoclonale d'origine indéterminée (MGUS), ne sont pas systématiquement associées à une amylose AL. Selon certaines études disponibles, 10 à 15% des patients atteints d'un myélome multiple développent une amylose AL [10] [11]. D'autres données avancent des proportions bien plus élevées suggérant une coexistence du MM et de l'amylose AL dans 57 à 80% des cas [12] mais elles restent débattues [13].

Il est cependant admis que seules certaines chaînes légères sont amyloïdogènes, en fonction de leur génotype et notamment au profit de l'isotype λ [14].

Les manifestations pathogéniques dépendent à la fois d'un effet toxique direct des chaînes légères monoclonales sur les tissus atteints et également d'un effet mécanique de ces dépôts. Ces derniers sont connus depuis longtemps et leurs effets sont logiques sur certains organes. Ainsi, l'atteinte cardiaque a pour conséquence attendue une hypertrophie myocardique qui induit elle-même des troubles de la contractilité.

La toxicité directe des chaînes légères sur les tissus a été plus difficile à mettre en évidence. En 2017, Imperlini et al. utilisent des modèles expérimentaux animaux et humains. Ils exposent, à des cellules cardiaques fibroblastiques, les chaînes légères de tropisme cardiocytaire retrouvées dans l'amylose AL cardiaque. Ils identifient une multitude d'effets cytogènes délétères, regroupant de façon non exhaustive, une

activation des voies apoptotiques, un stress oxydatif par production d'espèces réactives à l'oxygène (ERO), une altération des protéines structurales du cytosquelette et de la synthèse des protéines. L'activité mitochondriale est également altérée par effet d'internalisation des chaînes légères conduisant à des dysfonctions métaboliques et des dommages structurels [15]. Un an plus tôt, *Sapp et al.* soulevaient déjà une protéotoxicité à la fois intrinsèque et extrinsèque des CL prenant une place à part entière dans la pathogénie de l'amylose cardiaque [16].

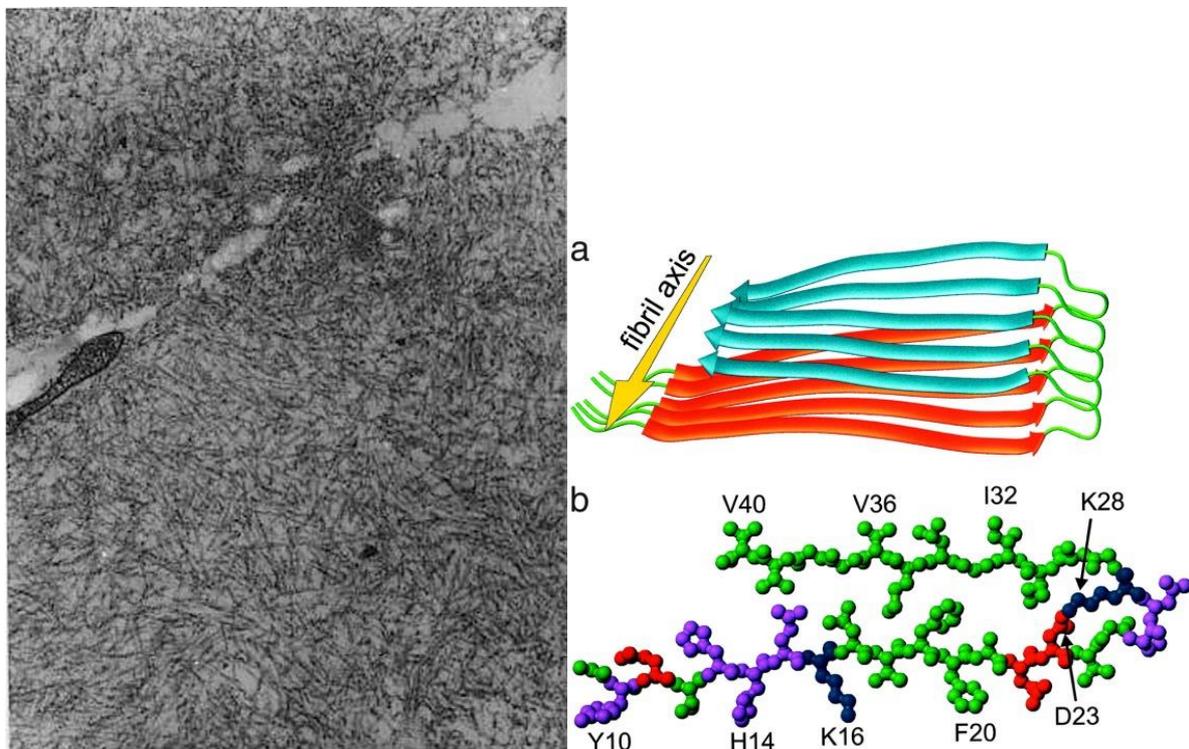


Fig. 1. Microscopie électronique (x 13000). Les fibrilles amyloïdes s'enchevêtrent, rappelant l'aspect d'un paquet d'épingles. a) Disposition de feuillettes β parallèles dans un agencement à double couche avec l'arrangement β plissé caractéristique de la fibrille amyloïde. b) structure chimique des feuillettes.

1.1.3 Manifestations cliniques

Les manifestations cliniques de l'amylose AL dépendent essentiellement des organes atteints, bien qu'il existe des symptômes généraux restant toutefois très peu spécifiques tels que l'asthénie ou l'amaigrissement.

1.1.3.1 Manifestations cardiaques

Le cœur est, avec le rein, l'un des deux organes les plus fréquemment touchés par les dépôts d'amylose AL. L'atteinte cardiaque survient chez environ 50 à 70% des patients présentant une amylose AL. Menaçant le pronostic vital, elle fait toute la gravité de la maladie [17].

L'infiltration des dépôts amyloïdes peut toucher toutes les tuniques (myocarde, endocarde, péricarde et tissu de conduction). La symptomatologie cardiaque dépend donc du site et du degré d'infiltration. Il s'agit le plus souvent d'une cardiopathie restrictive consécutive à l'hypertrophie des parois ventriculaires ou du septum interventriculaire. Les signes précoces sont souvent aspécifiques et cantonnés à des signes d'insuffisance cardiaque droite comme une hépatomégalie, une turgescence des veines jugulaires et des œdèmes périphériques [18]. L'évolution sans traitement aboutit inéluctablement à une insuffisance cardiaque avec préservation ou non de la fraction d'éjection ventriculaire gauche (FEVG). Elle peut également se révéler ou être associée à des troubles de la conduction comme la fibrillation atriale, le flutter ou les BAV [19].

L'électrocardiogramme peut être utile à l'orientation diagnostique de l'amylose cardiaque. Un tracé objectivant un microvoltage diffus notamment des QRS, est assez spécifique bien que tardif dans l'évolution de la maladie et d'une sensibilité très relative (< 30%) [20]. Il peut s'y associer des aspect de pseudo-infarctus [21].

L'échographie cardiaque, couplée à l'examen Doppler peut aussi aider au diagnostic. Les signes les plus spécifiques comme la triade associant une hypertrophie ventriculaire droite, gauche et un épanchement péricardique se révèlent tardivement et sous-entendent le plus souvent une forme avancée. Il en est de même pour les valeurs de FEVG qui diminuent seulement à partir des formes avancées. Le 2D-strain est une méthode d'analyse fine de la contractilité myocardique. Sa diminution, relativement plus importante en base qu'en apical peut être évocatrice d'amylose cardiaque [22]. Elle reste également et surtout utile pour le suivi de la fonction ventriculaire [23].

C'est l'avancée des techniques d'IRM de ces 15 dernières années qui a le plus fait progresser l'imagerie cardiaque dans son apport diagnostique pour l'amylose. Elle repose sur l'analyse en séquence T1, après injection de gadolinium, du délai de rehaussement sous endocardique. Cela permet de distinguer les myocardiopathies hypertrophiques si ce délai est normal, des amyloses cardiaques s'il est allongé [24].

Enfin, les dosages biologiques de la troponine, du BNP mais surtout du NT-proBNP ont été largement étudiés pour le diagnostic et le pronostic de l'amylose AL cardiaque. Il en ressort globalement qu'une valeur élevée du peptide natriurétique est corrélée à une atteinte cardiaque en cas d'amylose systémique [25]. Des valeurs élevées de ces marqueurs sont associées à un pronostic plus sombre. En revanche, la mise en évidence d'une réponse thérapeutique sur ces valeurs s'accompagne d'un meilleur taux de survie [26].

1.1.3.2 Manifestations rénales

Le rein est l'organe le plus souvent touché dans l'amylose AL à une fréquence estimée à 70% [27]. Elle est la cause de près de 1 % de l'ensemble des insuffisances rénales terminales nécessitant une dialyse chronique [28].

Les manifestations sont principalement d'ordre biologique initialement.

On définit l'atteinte rénale avec l'apparition d'une protéinurie supérieure à 0,5 g/24H [29]. Cependant, plus de la moitié des patients atteints présentent une protéinurie d'au moins 3 g/24H réalisant donc un véritable syndrome néphrotique associée au trouble de l'albuminémie plasmatique. Il est intéressant de noter par ailleurs qu'une atteinte rénale isolée est associée à une protéinurie supérieure par rapport à une atteinte multi organe [30].

Les dépôts amyloïdes peuvent toucher la quasi-totalité des compartiments du rein. Le tropisme prédomine dans les glomérules expliquant les signes cliniques les plus fréquents (97 % des cas) selon l'étude de *Said et al.* en 2013. L'atteinte vasculaire est également fréquente (85%) et peut être responsable, sur le plan clinique, d'hypertension artérielle [31].

1.1.3.3 Autres atteintes d'organes

Divers organes peuvent être touchés dans l'amylose AL.

- **Le foie :**

C'est une atteinte communément retrouvée dans les amyloses AL mais elle est souvent modérée ou de faible expression clinique.

Quand elle est symptomatique, elle est caractérisée par une hépatomégalie, dont l'un des signes cliniques les plus connus est l'apparition d'une flèche hépatique [32].

Kyle et Greipp rapportent que 34% des patients de leur étude ont une hépatomégalie, dans 16% les phosphatases alcalines étaient élevées et 4% avaient une hyperbilirubinémie [33]. La cholestase ictérique est exceptionnelle.

- **Le système nerveux périphérique et autonome :**

Elle est responsable de neuropathies périphériques symétriques qui commencent typiquement aux extrémités inférieures, semblables aux neuropathies diabétiques [34].

Les troubles dysautonomiques font également partie du panel des symptômes, au premier rang desquels on retrouve l'hypotension orthostatique. La gastroparésie et les signes de dysmotilité gastro-intestinale sont souvent difficiles à distinguer quant à leur origine neuropathique ou intestinale.

- **Le tractus gastro-intestinal :**

Cette atteinte est à l'origine de signes digestifs généraux et non spécifiques comme des diarrhées ou des constipations. Ces signes n'orientent généralement pas le diagnostic initial mais seront des symptômes d'accompagnement.

- **Les téguments et les tissus mous :**

La macroglossie est couramment rapportée dans l'amylose. Si elle n'est pas pathognomonique de cette maladie, elle trouve un intérêt dans sa spécificité à

l'amylose AL, en effet, elle n'est jamais retrouvée dans les autres formes d'amylose [34]. On citera de façon non exhaustive l'hypertrophie du canal carpien et le purpura périorbitaire résultant d'une fragilité vasculaire [35].

1.1.4 Pronostic et traitements

1.1.4.1 Facteurs pronostics

Le pronostic de l'amylose AL est généralement sombre. Le déterminant majeur dans la survie liée à cette pathologie est l'étendue de l'atteinte cardiaque. En l'absence de traitement et dans les cas de découverte tardive, la médiane de survie est de 6 mois [36]. C'est pour cela que le suivi par imagerie cardiaque et par les marqueurs biologiques précédemment cités est un élément angulaire dans la prise en charge des patients.

D'autres facteurs pronostics ont été retenus comme le niveau d'immunoglobulines à chaînes légères au diagnostic [37], le nombre d'organes touchés et niveau d'acide urique plasmatique [38].

Par ailleurs, un facteur génétique est associé à un pronostic défavorable. Il s'agit de la translocation t(11 ;14). Ce facteur de risque tient davantage dans la moindre réponse thérapeutique au tandem Bortezomib-dexaméthasone chez les patients porteurs de cette mutation comparativement aux patients qui en sont dépourvus [39].

Enfin, la réponse thérapeutique à la fois hématologique mais également au niveau des organes atteints est un facteur majeur de la survie. La Mayo Clinic a développé des critères de réponses aux traitements permettant d'estimer l'efficacité des thérapeutiques et de la corréliser à une survie. Sur le plan hématologique, le dosage sérique des CL libres permet de définir 4 niveaux de réponse :

- une réponse complète en cas d'absence de CL sérique et urinaire
- une très bonne réponse partielle en cas de taux <40 mg/L
- une réponse partielle en cas de diminution de plus de 50% du taux initial
- une absence de réponse dans les autres cas [40].

(Annexe 1)

1.1.4.2 Traitements

Sur le plan thérapeutique, la prise en charge doit nécessairement porter sur le traitement étiologique pour éliminer le clone responsable de la maladie et de façon conjointe sur le traitement symptomatique des atteintes d'organes. Nous ne développerons pas ici cette seconde partie.

Chimiothérapies

Les premières chimiothérapies utilisées dès 1972 associaient le Melphalan et la prednisone [41]. La médiane de survie progressait sous ce traitement à 12 à 18 mois [42] mais le traitement restait peu satisfaisant sur les formes graves et avancées en raison d'une réponse thérapeutique trop retardée. Plus récemment, un autre schéma propose le Melphalan en association avec la Dexaméthasone qui a le mérite d'être plus rapidement efficace mais au prix d'une toxicité plus importante [43].

Autogreffe

L'introduction de l'autogreffe dans la prise en charge de l'amylose AL apparaît logique par sa capacité à éradiquer rapidement la population plasmocytaire clonale responsable de la production de chaînes légères. Une étude datant de 2007 a cependant remis en cause l'intérêt de cette stratégie thérapeutique. Elle ne rapportait pas de bénéfice sur la survie des patients traités par Melphalan à haute dose et autogreffe comparativement aux patients traités par le tandem Melphalan-

Dexaméthasone, tout en étant grevée d'un taux de mortalité post-greffe élevé de 24% [44].

Ces résultats ont été contestés, notamment par les études de la Mayo Clinic qui retrouvent une survie sans progression à 3 ans de 51% et une survie globale à 3 ans de 83% chez les patients ayant bénéficié d'un traitement par Melphalan haute dose et autogreffe comparativement à des valeurs de 29% et 58% respectivement dans le groupe traité par Melphalan-Dexaméthasone [45].

L'autogreffe reste donc dans l'arsenal thérapeutique. En raison de la forte toxicité du traitement d'induction nécessaire à sa mise en œuvre, le nombre de patients éligibles à ce traitement est limité et estimé à 20% et ils doivent présenter tous les critères d'éligibilité (âge «physiologique» < 70ans ; un score de performance supérieur ou égal à deux ; une pression artérielle systolique supérieure à 90 mm Hg ;un taux de troponine < 0,06 ng/mL ; une clairance de la créatinine > 30mL/min et un score de dyspnée selon la NYHA de I ou II) [46]. Les progrès dans la réduction de la mortalité péri-greffe ces dernières années passant de 40% à 4 à 7% [47] sont également à la faveur de la poursuite de ce traitement dans les cas indiqués.

Inhibiteurs du protéasome

Le Bortézomib a immédiatement été très prometteur dans les premiers essais thérapeutiques, montrant des taux de réponse hématologiques dans 80% des cas [48].

Il est souvent utilisé en association avec le dexaméthasone, y compris après autogreffe pour consolider la réponse [49]. Il s'utilise à ce jour en France en association avec le Daratunumab, le cyclophosphamide et la dexaméthasone (Dara-CyBorD) en première intention. Il existe d'autres protocoles efficaces, notamment l'association

Bortézomib, Melphalan et dexaméthasone (BMDex). Cette dernière montre un intérêt dans la réponse cardiaque [50].

1.2 L'amylose AA

L'amylose AA est un type d'amylose secondaire au dépôt de fibrilles insolubles de protéines issues du Sérum amyloïde A (SAA) produites en excès lors des situations inflammatoires chroniques. A l'image de l'amylose AL, les dépôts peuvent toucher de différents organes.

1.2.1 Epidémiologie

L'amylose AA est de plus en plus rare dans les pays développés, en particulier en Europe et en Amérique du Nord. Cela est principalement lié à la baisse et à la prise en charge efficace des maladies inflammatoires chroniques dans ces régions [51].

L'incidence est estimée à 1 à 2 cas par million de personnes et par an avec un âge moyen au diagnostic de 50 à 70 ans. Le sexe ratio est discrètement plus élevé chez l'homme (56%) [52]. En France, on estime entre 250 et 500 cas incidents en 2019.

1.2.2 Physiopathologie de l'amylose AA

L'amylose AA complique les maladies s'accompagnant d'un syndrome inflammatoire chronique. Il s'agit principalement des rhumatismes inflammatoires chroniques tels que la polyarthrite rhumatoïde, la spondyloarthropathie, mais aussi les maladies inflammatoires chroniques de l'intestin (rectocolite hémorragique et maladie de Crohn), les infections chroniques (tuberculose, dilatation des bronches) et d'autres maladies inflammatoires plus rares comme la fièvre méditerranéenne familiale.

Dans cette pathologie, le précurseur amyloïde est le SAA. Il s'agit d'une apolipoprotéine soluble codée par le gène SAA-1. Cette protéine, tout comme la

protéine-C réactive (CRP) est synthétisée principalement mais non exclusivement par le foie sous l'impulsion de cytokines pro-inflammatoires, en particulier le TNF- α et les interleukines (IL) 1 et 6. A l'état normal, le SAA est dégradé par les macrophages dans le compartiment lysosomal. Chez les patients atteints d'amylose AA, le SAA a la capacité de s'agréger en protofilaments avec les glycosaminoglycanes et le sérum amyloid P (SAP) pour constituer des fibrilles résistantes à la protéolyse. Un allèle du gène SAA-1 (SAA-1.1) en particulier a été identifié comme facteur de risque de survenue d'amylose AA chez les européens [53].

L'existence d'une pathologie inflammatoire chronique est donc un facteur de risque d'excès de production de précurseur amyloïde sur un terrain sous-jacent de prédisposition génétique [52].

1.2.3 Manifestations cliniques

Il n'existe pas de signe spécifique de l'amylose AA rendant son diagnostic difficile dans un contexte de maladie chronique.

L'atteinte rénale est la plus fréquente, tout comme l'amylose AL et survient dans 97% des cas [54]. Elle se manifeste généralement par des œdèmes des membres inférieurs, une protéinurie avec un syndrome néphrotique dans 50% des cas, pouvant évoluer jusqu'à une insuffisance rénale. L'atteinte digestive est très fréquente, mais pas nécessairement symptomatique.

L'atteinte cardiaque est exceptionnelle. En cas de présentation cardiaque, l'élimination des autres types d'amylose est indispensable.

1.2.4 Pronostic et traitement

Le pronostic tient à plusieurs facteurs.

- Les complications de l'amylose elle-même : la présence d'une insuffisance rénale au diagnostic est un facteur majeur d'évolution vers l'insuffisance rénale terminale.
- La nature de la maladie sous-jacente : pour les maladies inflammatoires, l'élément pronostique est la capacité des traitements anti-inflammatoires à être efficace et à diminuer l'inflammation
- Les comorbidités.

La prise en charge thérapeutique comporte deux volets.

- Les traitements anti-inflammatoires en privilégiant dorénavant les biothérapies comme les anti TNF α , les anti IL-1 et IL-6 par rapport aux immunosuppresseurs d'ancienne génération (cyclophosphamide).
- La néphroprotection via les antihypertenseurs de la famille des IEC ou des ARA2 et la prise en charge, le cas échéant de l'insuffisance rénale terminale.

1.3 Amyloses héréditaires

1.3.1 Epidémiologie

Parmi les amyloses héréditaires, la plupart sont rares prises individuellement. Si on les considère collectivement, elles représentent environ 10% des amyloses

systemiques actuellement diagnostiquées [55] et sont vraisemblablement sous-diagnostiquées.

La plus fréquente au sein de cette famille est l'amylose à transthyréline héréditaire (ATTRv) qui sera la seule que nous développerons brièvement ici.

En raison de la large répartition géographique de l'ATTRv et des différences régionales dans les fréquences de mutation, il est difficile d'obtenir des statistiques précises sur la prévalence de l'ATTRv. L'âge moyen au diagnostic est de 39 ans.

1.3.2 Physiopathologie de l'amylose héréditaire à transthyréline (ATTRv)

La transthyréline (TTR) est une protéine essentiellement synthétisée par le foie et de façon anecdotique par les plexus choroïdes et l'épithélium pigmentaire rétinien.

La fonction physiologique de la TTR comprend le transport de la thyroxine et de la protéine de liaison au rétinol, c'est d'ailleurs de sa fonction que son nom a été tiré.

A l'état normal, cette protéine possède une conformation tétramérique. De simples mutations ponctuelles du gène codant la TTR peuvent favoriser sa capacité innée à former des oligomères de 6 à 10 monomères (Figure 2). Ils s'agrègent finalement en fibres amyloïdes insolubles provoquant, comme expliqué précédemment, une toxicité cellulaire ou des lésions tissulaires [56].

On recense au moins 120 mutations du gène de la TTR, mais elles ne sont pas toutes pathogéniques. La mutation la plus fréquente à travers le monde est la V30M. Leur répartition est cependant très régionalisée avec de fortes disparités de fréquence selon les pays ou les régions géographiques. Ainsi, s'il existe des clusters de mutation V30M

en Suède, au Portugal ou encore au Japon [57], la mutation la plus fréquente aux Etats-Unis est la T60A (26%), devant la V30M (16%) [58].

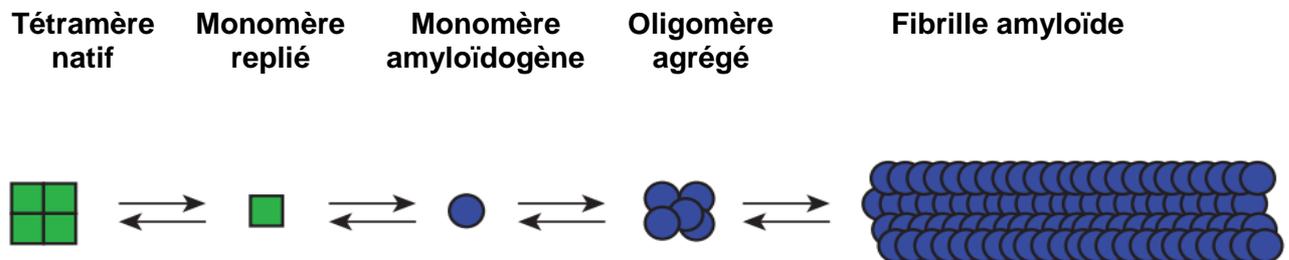


Figure 2 : Voie de transformation des fibrilles TTR

1.3.3 Manifestations cliniques de l'amylose héréditaire à transthyréline

Leurs symptômes cliniques varient considérablement allant d'un phénotype à prédominance neuropathique à un phénotype à prédominance cardiaque.

L'hétérogénéité des manifestations cliniques s'explique par de multiples facteurs tels que le site mutationnel spécifique du gène TTR, la distribution géographique, l'âge au diagnostic, le mode de transmission et l'agrégation épidémique ou non.

A titre d'exemple, la mutation V30M induit une polyneuropathie sensori-motrice périphérique progressive à l'image des neuropathies diabétiques, alors que d'autres mutations (Thr60Ala, Val122Ile ...) provoquent exclusivement une cardiomyopathie infiltrante [59].

1.3.4 Pronostic et traitement

L'atteinte cardiaque et sa sévérité est de nouveau l'élément déterminant relatif à la survie des patients. Les examens de diagnostic et de surveillance sont similaires à ceux utilisés dans l'amylose cardiaque AL et que nous avons déjà évoqués, à savoir l'ECG, l'échographie cardiaque, les marqueurs biologiques, l'IRM cardiaque. La scintigraphie au pyrophosphate de technétium (99mTc-PYP) distingue l'ATTR-CA de l'AL-CA, ou d'une autre cardiomyopathie hypertrophique avec une spécificité de 100%, ce qui en fait un outil de premier choix.

Depuis peu, des possibilités thérapeutiques existent pour les patients. Deux stratégies ont été développées : stabiliser le tétramère pour éviter la formation des monomères amyloïdogènes ou bien diminuer la synthèse de la transthyréline.

Les stabilisateurs de tétramères de transthyréline :

Le Tafamidis est un médicament récemment mis sur le marché. Il s'agit d'un traitement de 1^{ère} intention de l'amylose cardiaque à transthyréline. Il est le seul médicament disposant d'une AMM dans cette indication. La molécule se fixe sur un site de liaison à la thyroxine du tétramère de transthyréline, entraînant l'inhibition de sa dissociation en monomères.

Le Diflunisal est un anti-inflammatoire non stéroïdien capable de stabiliser les tétramères de TTR in vitro. Des études cliniques ont montré une réduction significative de la progression des neuropathies chez les patients traités comparés aux patients traités par le placebo. Il n'est cependant pas observé d'effet bénéfique sur l'atteinte cardiaque [60].

Les « genes silencers »

Le Patisiran et l'Inotersen sont deux molécules ayant l'AMM dans le traitement de la polyneuropathie de stade 1 ou 2 chez les adultes atteints d'amylose à transthyrétine héréditaire. Ces deux molécules ont un mode d'action similaire. Par l'intermédiaire d'un oligonucléotide interférent (ARNi), ces médicaments ciblent spécifiquement une séquence dans la région 3' des ARN messagers mutants et de wild-type de la TTR. Ils provoquent la dégradation catalytique de l'ARNm de la TTR entraînant une diminution du taux sérique de protéine TTR. Pour une efficacité optimale, le Patisiran a une présentation galénique particulière sous forme de nanoparticules lipidiques pour délivrer l'ARN interférent aux hépatocytes qui représentent la principale source de protéine TTR dans la circulation.

D'autres progrès très récents de thérapie génique sont en cours d'étude. Gillmore et Al. en 2021 utilisent la technologie d'endonucléase CRISPR-Cas9 pour créer des outils d'édition génomique pour modifier le gène de la TTR dans le but d'en diminuer les concentrations circulantes [61]. Elles reprennent la même vectorisation lipidique que les « genes silencers ».

1.4 Amylose à transthyrétine wild-type

Anciennement appelée amylose sénile, elle est retrouvée essentiellement chez les personnes âgées et en particulier les hommes.

Elle a été identifiée secondairement à des études autopsiques qui ont révélé la présence de dépôts de transthyrétine non mutée dans une proportion importante de la population âgée, même chez des sujets sans antécédents de maladies sous-jacentes.

Depuis l'atteinte cardiaque a été bien caractérisée. Il a notamment été mis en évidence que les patients présentant des dépôts dans le cœur fixaient à ce niveau en scintigraphie au Technécium. Cette découverte a permis de se rendre compte que la prévalence de la maladie était sous-estimée dans la population générale. En plus d'être sensible, la scintigraphie au Technécium semble être assez spécifique de l'amylose à TTR surtout lorsque les patients n'ont pas de pic monoclonal et que la fixation est intense (score de Perugini). A tel point que la preuve histologique n'est plus obligatoire sauf en cas de gammopathie monoclonale (en effet certains cas d'amylose AL peuvent fixer en scintigraphie Technécium).

Sur le plan tissulaire, il est possible de mettre en évidence des dépôts dans d'autres organes que le cœur. Il est donc probable que cette maladie soit associée à des manifestations cliniques, autres que dans le cœur, mais qu'elles soient encore mal précisées.

Concernant le traitement, la stratégie est similaire à celle de l'amylose à transthyréline mutée.

Les caractéristiques des types d'amylose les plus fréquentes sont résumées dans le Tableau 1.

Tableau 1 : caractéristiques des types d'amyloses les plus fréquentes

Type d'amylose	Acquise / héréditaire	Protéine précurseur	Atteinte d'organe					Traitement
			Cœur	Rein	Foie	NP	Autres	
AL	Acquise	Immuno-globuline à chaîne légère monoclonale	+++	+++	++	+	Tissus mous Gastro-intestinal	Chimiothérapie Autogreffe
AA	Acquise	SAA	-/+	+++	+	-	Gastro-intestinal	Suppression de l'inflammation
ATTR	Héréditaire	Transthyrétine mutée	++	-	-	+++	-	Transplantation hépatique Diflunisal Symptomatique
	Acquise	Transthyrétine wild-type	+++	-	-	-	Syndrome du canal carpien	Symptomatique
AFib	Héréditaire	Fibrinogène muté	-	+++	+/-	-	-	Symptomatique Transplantation d'organe
ALect2	Acquise	Lect2	-	+++	++	-	-	Symptomatique
AapoA1	Héréditaire	ApoA1 mutée	+	++	++	+/-	Testicule	Symptomatique Transplantation d'organe
ALys	Héréditaire	Lysosyme mutée	-	+	++	-	Gastro-intestinal Peau	Symptomatique
AGel	Héréditaire	Gelsoline mutée	-	+/-	-	++	-	Symptomatique
Aβ2M	Héréditaire ou acquis	Aβ2M	-	-	-	-	Syndrome du canal carpien	Symptomatique Transplantation d'organe

Aβ2M=β2-microglobulin-related. AFib=fibrinogen A α-chain. Agel=gelsolin amyloid. AL=amyloid light chain. ALect2=leucocyte cell-derived chemotaxin2. ALys=lysozyme amyloid. AA=amyloid A. AApoA1=apolipoprotein A1 amyloid. NP= neuropathie périphérique. SAA=serum amyloide A. TTR=transthyretine.

+ indique les fréquences relatives : +++ très commune, ++ commune; + peu commun; +/- rare; - pas de survenue..

2 Diagnostic de l'amylose

2.1 Généralités

Les premières descriptions anatomiques connues d'organe atteint par l'amylose remontent aux XVII^e et XVIII^e siècles. Nicolaus Fontanus en 1639 puis Antoine Portal en 1789 décrivent, sur des pièces autopsiques de foie et de rate anormalement volumineuses, un aspect « lardacé » et « cireux » en ignorant totalement l'origine de leur cause. Ces descriptions sont reprises durant le XIX^e siècle par Carl Rokitansky (1842) et qui surviendraient préférentiellement chez des sujets porteurs de tuberculose ou de syphilis. George Budd conclut en 1852 que la substance responsable de cet aspect n'est pas de d'origine grasseuse mais correspond essentiellement à de l'albumine.

C'est a posteriori que l'on a associé ces descriptions aux atteintes amyloïdes des organes.

En 1854, Rudolf Virchow, célèbre médecin allemand, décrit la réaction de dépôts tissulaires du système nerveux avec l'iode et l'acide sulfurique. Il s'agissait d'une réaction qui était déjà connue dans le monde de la botanique comme marqueur de l'amidon chez les plantes. Ainsi, Virchow a qualifié de façon erronée ces dépôts comme ressemblant à de l'amidon ou « d'amyloïde ». Bien qu'inexact, le terme a par la suite perduré en raison de descriptions d'amyloses systémiques réelles par Virchow lui-même, qui conservaient les propriétés tinctoriales [62].

2.2 Types de prélèvements

Si la démarche diagnostique repose initialement sur des faisceaux d'arguments cliniques, biologiques et radiologiques que nous avons vu précédemment, le diagnostic de confirmation d'une amylose et son typage nécessitent le plus souvent un prélèvement histologique.

La biopsie de l'organe cliniquement ou biologiquement atteint est souvent la méthode la plus sensible et présente l'avantage de fournir une quantité suffisante de tissu pathologique, idéal pour le typage ultérieur et l'éventuelle détection de pathologies concomitantes [63]. Cependant il peut s'agir d'un geste invasif, difficile à réaliser chez des patients parfois fragiles.

Le caractère systémique de la plupart des amyloses offre l'opportunité de détecter les dépôts amyloïdes dans divers tissus, notamment ceux plus faciles d'accès que les organes profonds.

On privilégiera alors des gestes moins invasifs en première intention, au profit de sites biopsiques qui se distinguent par une facilité de réalisation technique. Les risques sont minimes et le coût très restreint ce qui en fait également un examen de dépistage, même en l'absence de forte suspicion clinique.

2.2.1 Biopsie myocardique

La biopsie endomyocardique est considérée aujourd'hui comme une technique éprouvée, avec une nette amélioration de la sécurité démontrée au fil des ans. Le taux de complications à l'heure actuelle est d'environ 1% ou moins. Elle requiert cependant une technique de cathétérisme vasculaire nécessitant un plateau technique

conséquent. Il doit regrouper un support d'imagerie interventionnelle, une équipe d'anesthésie et une surveillance post-interventionnelle [64]. Les patients ayant bénéficié de ce type de biopsie peuvent également être placés sous traitement anticoagulant temporaire après le geste.

2.2.2 Biopsie rénale

La biopsie rénale percutanée reste une méthode intéressante dans le diagnostic de l'amylose, en particulier si elle touche électivement et exclusivement le rein. Si la procédure est techniquement moins lourde que la biopsie cardiaque, elle doit être tout de même être réalisée sous contrôle échographique ou scanographique. Elle est tributaire des contre-indications générales traditionnelles, à savoir un rein unique, une hypertension artérielle (HTA) non contrôlée, des anomalies anatomiques rénales, une pyélonéphrite aiguë ou des troubles de la coagulation.

Concernant le risque de complications, la biopsie rénale est sûre et efficace ; les taux de saignement oscillent de 0,3 % à 7,4 %, et les taux de néphrectomie sont extrêmement faibles (0,1 % à 0,5 %) [65].

2.2.3 Biopsie des glandes salivaires accessoires

Les biopsies de glandes salivaires accessoires (BGSA) étaient au départ des examens consacrés à la recherche du syndrome de Gougerot-Sjögren mais ont montré de bons résultats dans le diagnostic de l'amylose, qu'elle soit AL ou AA. Plusieurs études récentes rapportent des valeurs de sensibilité comprises entre 68% pour *Lecadet et al.* en 2018 [66] et 89% pour l'étude de Suzuki et al. en 2016. Elle se cantonne aux

amyloses AL [67]. Une étude lilloise et parisienne (Jamet et al.) de 2015 conforte ces résultats de sensibilité élevée (86%) et apporte de plus des éléments inédits sur d'éventuelles présentations histopathologiques spécifiques en fonction du type d'amylose. Elle suggère que des dépôts amyloïdes s'organisant en nodules périductulaires seraient associés à l'amylose à transthyrétine. Elle concernerait l'amylose TTR héréditaire, excepté le mutant V30M car aucun cas sur 8 n'a été associé à cette description, mais aussi l'ATTR wild-type [68].

Ces biopsies sont par ailleurs associées à des spécificités élevées, de 91 à 100% [69].

2.2.4 Aspiration et biopsie de graisse sous ombilicale

La graisse abdominale sous ombilicale est aisément accessible à la biopsie. C'est un prélèvement simple à réaliser, sans complication majeure. Elle peut consister soit en l'aspiration à l'aiguille soit en une réelle biopsie chirurgicale au punch ou au bistouri.

La sensibilité de cette méthode diagnostique est élevée, dans les mêmes ordre de grandeur que les BGSA (80 à 90%) pour les amyloses AL et AA et ATTR-v et une spécificité proche des 100% [70].

Certains pathologistes ont obtenus des résultats plus médiocres, notamment sur des « smears » ou étalements d'aspiration. C'est pourquoi de nombreuses équipes recommandent la biopsie chirurgicale de graisse. Le prélèvement est généralement de meilleur qualité, présente moins d'artefacts et contient plus de matériel pour typer l'amylose le cas échéant [69].

Il est à noter que dans l'amylose ATTR de type sauvage, la sensibilité de la biopsie du tissu adipeux est un peu plus faible, environ 73 % [71].

2.2.5 Autres sites biopsiques

Il existe d'autres sites de prélèvement pour le diagnostic.

La biopsie rectale était courante jusque dans les années 1970. Elle a progressivement été supplantée par les techniques moins invasives malgré une excellente sensibilité (80%). La biopsie ostéo-médullaire est corrélée à une sensibilité inférieure de l'ordre de 68% [72].

La biopsie cutanée apporte des résultats contrastés quant à ses performances diagnostiques. Une étude récente de Bicong et al. annonce une sensibilité limitée de la biopsie cutanée pour l'ensemble des amyloses à 43%. L'analyse en sous-groupe pour le diagnostic spécifique des amyloses AL améliore la sensibilité à 64% (35%-87% ; IC 95%). Dans l'amylose à TTR, elle prend un intérêt particulier par sa faculté à non seulement détecter la maladie (80% de sensibilité) mais surtout de le faire à un stade précoce voire asymptomatique (14% de patients de la série de Leonardi et Al.) [73].

Il n'existe pas aujourd'hui de consensus sur les sites biopsiques à privilégier. Ils dépendent principalement des manifestations cliniques, de l'état du patient et des habitudes des équipes qui prennent en charge ces malades. Il est le plus souvent bénéfique de combiner plusieurs sites peu invasifs. A Lille, la pratique la plus courante consiste en une BGSA et une BGO en première intention.

Si des dépôts amyloïdes sont retrouvés dans un site spécifique d'amylose localisée (génito-urinaire, tractus, paupière, conjonctive, larynx, ...), il est recommandé, pour l'amylose AL au moins, de dépister un autre site fréquemment atteint de l'amylose systémique (BGSA, BGO, BOM ...) avant de conclure à une amylose localisée.

Il y a consensus qu'une amylose systémique est également présente si l'amyloïde a été détectée dans un seul site tissulaire s'il s'accompagne d'un tableau classique d'amylose [29].

2.3 Techniques histochimiques

2.3.1 Coloration du Rouge Congo

La coloration du Rouge Congo (RC) est considérée aujourd'hui comme le « gold standard » pour la détection des dépôts amyloïdes. Elle offre une bonne sensibilité (80 à 90%) couplée d'une spécificité de 100% [74].

C'est une teinture organique synthétisée pour la première fois par Paul Böttiger en Allemagne en 1883 et utilisée initialement dans le domaine textile. Le terme Congo est employé à but uniquement commercial, sans lien avec le pays homonyme.

Elle a également pu être utilisée un temps comme indicateur de pH avec une forme acide bleue et une forme basique rouge, avec une zone de virage comprise entre un pH de 3,0 à 5,2.

C'est en 1922 que Bennhold découvre pour la première fois l'intérêt du RC en histologie. Ses travaux expérimentaux permirent l'identification des dépôts amyloïdes dans l'organisme après injection intra-veineuse de 10 cc d'une solution de RC à 1%. Il retrouvait une disparition du produit dans le sang plus rapide chez les patients présentant un syndrome néphrotique que chez les sujets sains. De plus, sur l'un des patients du groupe malade, décédé 20 heures après l'injection, le foie et la rate apparaissaient colorés par le RC.

Ces résultats ont été vivement critiqués mais ont été à l'origine de plusieurs études déterminantes dans l'adoption de cette coloration pour le diagnostic de l'amylose [70].

On attribue la première description de la biréfringence jaune-verte en lumière polarisée à Paul Divry en 1927 [76].

Le Rouge Congo est un colorant azosulfoné et symétrique. Il possède un centre hydrophobe formé par un groupe diphenyl situé entre les deux extrémités qui sont chargées. Le mécanisme de la liaison sélective de la fibrille n'est pas totalement élucidé et plusieurs modes de liaison ont été proposés pour l'interaction du RC avec des fibrilles. L'une des hypothèses principales soutient que la structure beta-plissée seule ne serait pas suffisante pour former la structure capable de lier le Rouge Congo. Il se lierait aux protéines par l'intermédiaire de liaisons électrostatiques entre ses groupes sulfonates chargés négativement et de deux acides aminés chargés positivement. Récemment, la spectroscopie par résonance magnétique nucléaire à l'état solide a permis la détermination de structures amyloïdes à haute résolution et semble conforter cette hypothèse.

D'après le modèle d'Espargaro et al. le mode de liaison implique l'interaction électrostatique de l'un des groupes sulfate avec le groupe amino-protoné d'un monomère amyloïde [77].

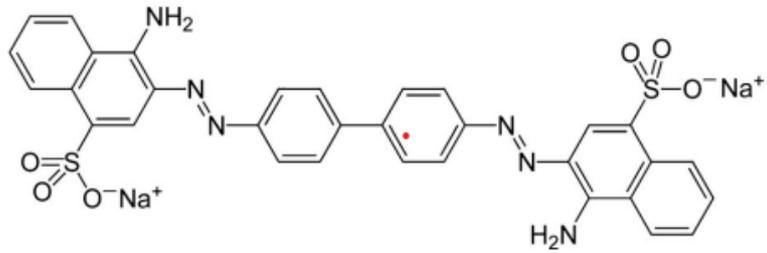


Figure 3 : structure chimique du Rouge Congo

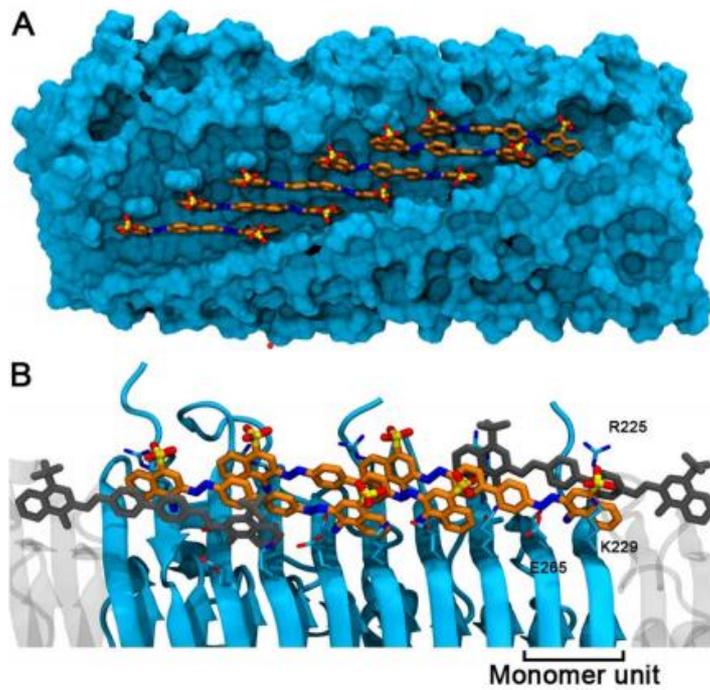


Figure 4 : représentation de la fixation des molécules du rouge Congo (en orange) avec les monomères de fibrilles amyloïdes (en bleu). D'après A. Espargaro et al.

En pratique, pour le pathologiste, l'examen en microscopie optique en lumière blanche avec le RC permet de mettre en évidence les dépôts amyloïdes. Ils prennent un aspect orange ou « rouge brique » et en lumière polarisée la biréfringence jaune-vert pomme est très spécifique de l'amylose. C'est bien le changement de couleur du jaune au vert ou bleu-vert parfois, qui est ici important et qui définit cette biréfringence et pas simplement la couleur verte attendue.

La polarisation s'effectue avec l'apposition d'un filtre polariseur et va sélectionner une onde lumineuse incidente. Placé perpendiculairement au premier filtre, il éteindra le flux lumineux parvenant à l'observateur. Si le prélèvement comporte un composé capable de biréfringer la lumière, comme c'est le cas pour les fibrilles amyloïdes, les faisceaux incidents seront déviés et apparaîtront brillants au microscope.

On peut également souligner le fait qu'avec cette coloration, les dépôts d'amylose sont spontanément fluorescents en lumière rouge avec le filtre Texas Red. Cette propriété peut être intéressante en soutien diagnostique aux cas jugés difficiles [78].

Cette coloration, ancienne, éprouvée et très spécifique expose toutefois certaines limites.

Concernant les étapes pré-analytiques, il existe quelques particularités concernant cette coloration qui doivent absolument être respectées pour avoir un résultat fiable. Il faut donc définir des protocoles techniques spécifiques pour les prélèvements concernés par la coloration du RC. Elle doit tout d'abord être réalisée sur des coupes légèrement plus épaisses, entre 5 et 8 μm pour ne pas méconnaître des dépôts de petite taille. Ensuite, comme nous l'avons vu précédemment, le RC est halochromique, avec une zone de virage du rouge au bleu en milieu acide. Il requiert donc un contrôle du pH lors de son utilisation pour qu'il reste rouge. La solution du Rouge Congo utilisée

par le laboratoire doit respecter des délais d'utilisation précis, selon certains auteurs une solution datant de plus d'un mois est considérée comme périmée [5].

Lors de l'analyse, certaines structures apparaissent faussement positives physiologiquement, notamment en cas de dosage trop important du produit. Si la limitante élastique des vaisseaux et les hématies sont connues pour marquer en rouge brique le RC [79], d'autres composants comme le collagène peuvent présenter les mêmes propriétés que les dépôts amyloïdes en cas de « surdosage » du colorant.

Les dépôts de très petite taille sont aussi un des points faibles de cette coloration et peuvent souvent passer inaperçus (Figure 5).

Enfin, le RC est un colorant de la famille des aromatiques et hétérocycliques. Beaucoup d'entre eux ont été classés comme agents toxiques et probablement cancérigènes. C'est le cas du Rouge Congo [80]. Cette donnée relativement récente a transformé les pratiques, en particulier au laboratoire d'anatomie et cytopathologie de Lille où les colorations de RC sont dorénavant automatisées pour protéger les personnels techniques des expositions répétées à ces produits toxiques.

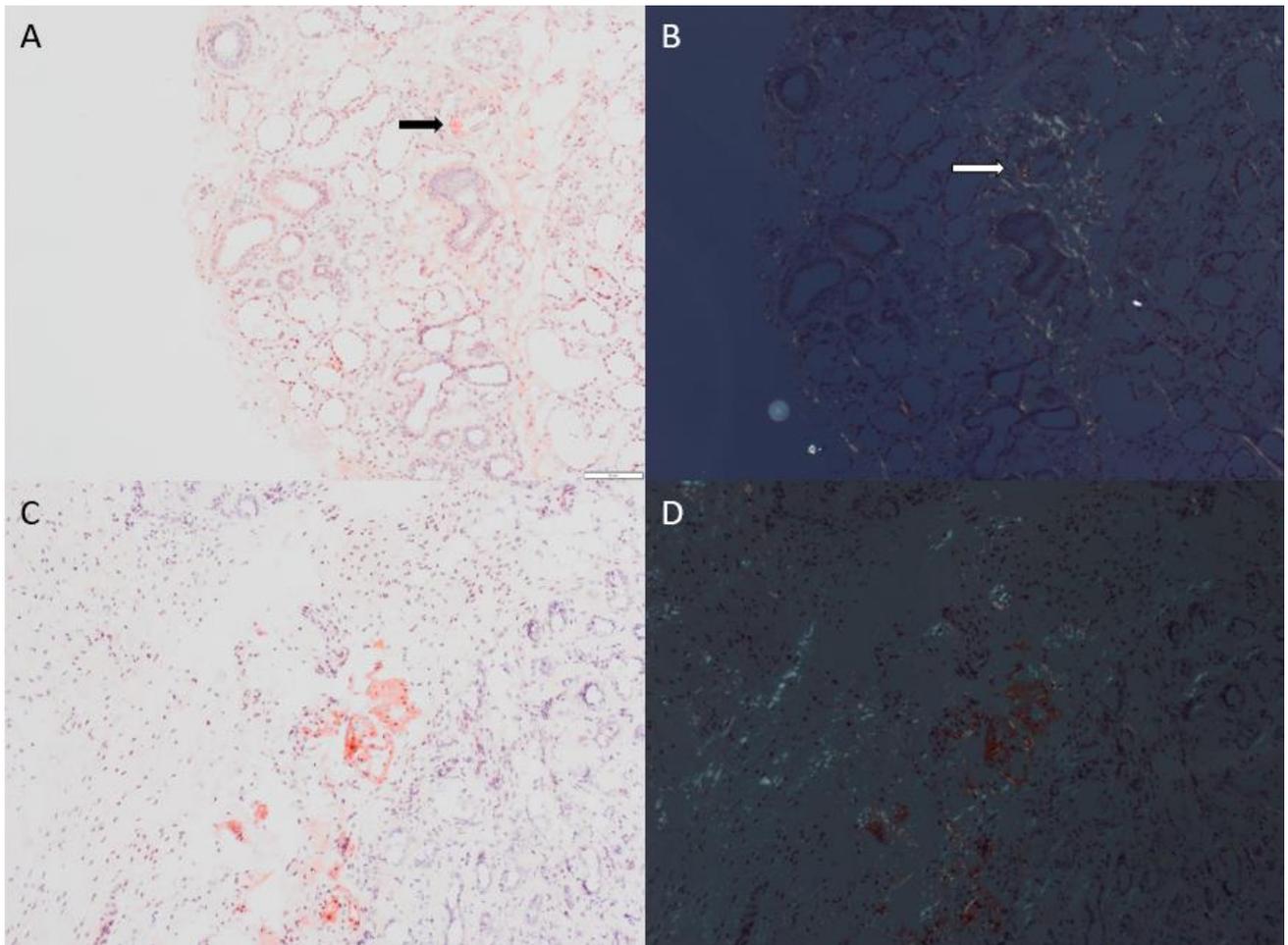


Figure 5 : exemples de limites de la coloration par le RC.

A) Marquage d'un dépôt amyloïde très faiblement abondant (indiqué par la flèche). B) biréfringence jaune-verte en lumière polarisée de ce dépôt. C) Marquage par le Rouge Congo de structures collagènes de couleur rouge brique, similaire aux dépôts amyloïdes. D) absence de biréfringence jaune-verte en lumière polarisée.

2.3.2 La thioflavine T et S

En 1959, Vassar et Culling ont été les premiers à décrire l'utilisation du colorant benzathiole ; Thioflavine T (ThT) comme marqueur fluorescent de l'amylose en histologie et ont parallèlement démontré le potentiel de la microscopie à fluorescence pour le diagnostic des fibrilles amyloïdes dans un rapport pionnier. Ils ont noté que la ThT se localisait sélectivement sur les dépôts amyloïdes, présentant alors une augmentation spectaculaire de la luminosité fluorescente. L'avantage des composés fluorogéniques est qu'ils ne deviennent hautement fluorescents que lorsqu'ils sont liés à une entité moléculaire particulière. Les colorants directs comme le Rouge Congo nécessitent une coloration puis un rinçage ce qui entraîne un niveau important de coloration de fond et une faible reproductibilité [81].

Comme le RC, les colorations par le ThT peuvent être effectuées sur des tissus en paraffine et congelés.

Elles offrent comme avantage une interprétation plus aisée que le RC. La positivité de la technique repose sur la présence de dépôts de couleur jaune-vert vifs fluorescents.

Un autre avantage de la coloration par la thioflavine est qu'elle est capable de détecter de très petites quantités de fibrilles. Souvent, dans cette situation, la coloration par le Rouge Congo peut être douteuse ou négative (due en partie par "l'ombre de polarisation").

La coloration par la ThT n'est cependant pas entièrement spécifique de l'amylose.

Elle colore également d'autres structures telles que la fibrine, les grains de zymogène, les cellules de Paneth, l'appareil juxtaglomérulaire ou la kératine. Par conséquent, les

résultats positifs avec la ThT doivent fréquemment être confirmés soit par microscopie électronique, soit par la coloration au rouge Congo elle-même.

La thioflavine S (forme anionique) présente les mêmes propriétés que la T (forme cationique).

2.3.3 Autres colorations

- **Cristal violet, méthyl violet, violet de Paris :**

Les colorants cristal violet et violet de méthyle sont des dérivés de la pararosaniline. Avant la découverte du rouge Congo, ils étaient les principaux colorants disponibles pour l'identification de l'amylose. Ces outils histochimiques ont la capacité de produire une coloration métachromatique sur les dépôts amyloïde. Ils seront colorés en rouge, contrastant avec le fond coloré en bleu. C'est cette propriété qui a initialement été décrite pour faire le diagnostic de l'amylose à la fin du XIXe siècle [82]. La difficulté principale mise en évidence dans les décennies suivantes, grâce à l'avancé des connaissances de ces pathologies, est que le cristal violet ne produit pas de coloration métachromatique avec tous les dépôts amyloïdes, ceci s'explique probablement par la grande diversité chimique des fibrilles amyloïdes en fonction de leur précurseur. Ce manque de sensibilité a contribué aux nombreuses théories de la pathogenèse et des schémas de classification erratiques défendus par leurs auteurs[83].

Cette sensibilité limitée (< 70%) rend la coloration du cristal violet peu fiable et n'est plus recommandée en pratique de nos jours [84].

- **Le rouge Sirius**

Cette coloration a été utilisée avec des résultats satisfaisants. A l'instar du rouge Congo, elle colore les dépôts en rouge et induit une biréfringence jaune-vert quand

ils sont observés en lumière polarisée. Cependant, cette coloration est moins spécifique.

- **Le Periodic Acid-Schiff et le vert lumière**

Il s'agit de colorations beaucoup plus anecdotiques dans ces pathologies. On rappellera simplement le fait que les dépôts amyloïdes prennent un aspect acellulaire vert d'eau. C'est principalement sur les colorations systématiques des biopsies rénales que ces colorations sont susceptibles de révéler ce phénomène. Elles ne sont pas utilisées sur les autres types de prélèvement en raison de leur absence totale de spécificité.

2.3.4 L'H-FTAA

Les polythiophènes conjugués luminescents (LCP) représentent une nouvelle classe de sondes fluorescentes récemment développées pour la détection d'agrégats protéiques.

En 2009, Nilsson et al. [85] améliorent le concept et mettent au point des structures pentamériques appelées oligothiophènes conjugués luminescents (LOC). Par rapport aux ligands amyloïdes classiques, les LCP et LCO possèdent une structure thiophène conjugué qui fait le lien entre la conformation moléculaire et ses propriétés spectrales. En fonction de la protéine à laquelle elle se lie, le composé aura des propriétés optiques différentes. Il est possible de distinguer alors les plaques β -amyloïdes des agrégats de protéine Tau. Cette sonde étant initialement évaluée sur des tissus cérébraux pour la maladie d'Alzheimer.

La découverte de son affinité pour les dépôts pré-fibrillaires a ouvert d'autres perspectives d'emploi qui nous intéressent dans cette étude.

Plusieurs formes ont été synthétisées, afin de déterminer la structure chimique la plus performante. La base commune du squelette moléculaire est un trimère de thiophène auquel s'ajoute un ou plusieurs oligothiophènes. Ils forment alors des tétramères (q-HTAA ou q-FTAA), des pentamères (p-HTAA ou p-FTAA) des hexamères (hx-HTAA ou hx-FTAA) et des heptamères (h-HTAA ou h-FTAA).

Ces composés varient également en fonction d'un groupement α -terminal sur le LCO qui peut être hydrogène (variant « H ») ou carboxyle (variant « F ») (figure 5).

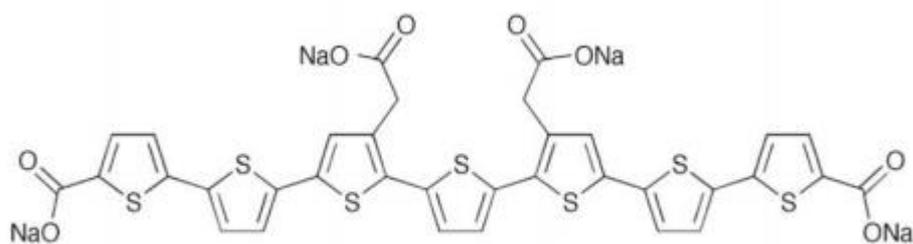


Figure 6 : Structure chimique de l'h-FTAA

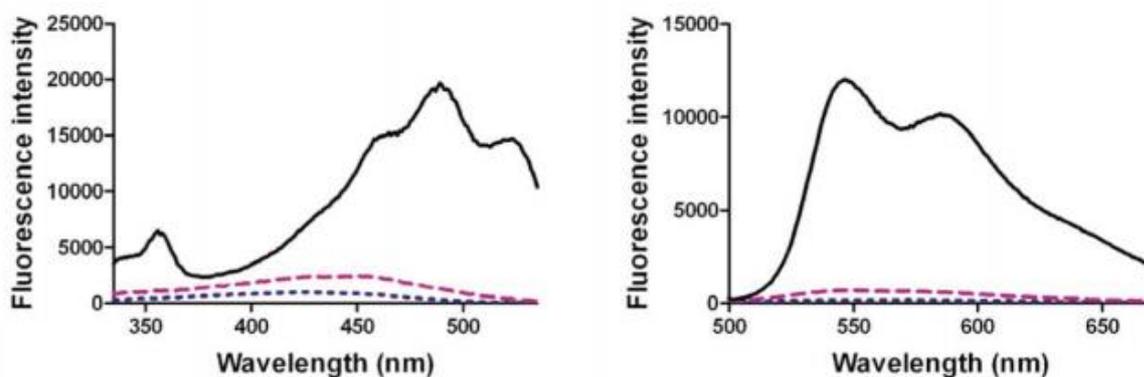


Figure 7 : spectre d'excitation de l'h-FTAA (à gauche) avec une longueur d'onde d'absorption maximale à 480 nm. Spectre d'émission avec une longueur d'onde d'émission maximale à 548 nm.

2.4 Typage de l'amylose

Le typage de l'amylose est une étape indispensable dans la démarche diagnostique des amyloses. Il conditionne à la fois sa prise en charge thérapeutique, mais aussi son suivi et son pronostic. Bien qu'il existe une relative prédilection de certains types d'amyloïde pour des organes particuliers, le typage sur des bases cliniques seules n'est absolument pas fiable et nécessite un recours aux techniques complémentaires.

Tout un panel de techniques s'offre aux pathologistes mais certaines restent difficilement accessibles en routine.

2.4.1 Immunohistochimie

L'identification des protéines précurseurs et la connaissance de leur nature chimique ont permis de développer des anticorps polyclonaux et monoclonaux dirigés contre les épitopes des protéines amyloïdes.

Bien qu'il soit d'une importante utilité, le typage en immunohistochimie sur prélèvement en paraffine rencontre cependant des problèmes récurrents liés à la technique intrinsèquement et à la nature des dépôts étudiés.

Tout d'abord, la nature idiosyncrasique des chaînes légères d'immunoglobuline monoclonale dans l'amyloïde (AL) présente des défis. Elle est dû au fait que les fibrilles comprennent la région hypervariable des chaînes légères d'immunoglobuline, or les anticorps développés sont dirigés sur le domaine fixe de Ig. La reconnaissance des épitopes est donc parfois très subtile voire impossible avec un échec du marquage. Par ailleurs le bruit de fond est exacerbé par la présence de protéines

sériques au sein du prélèvement. Pour toutes ces raisons, il est difficile de donner des performances exactes de cette méthode car la sensibilité et la spécificité de l'IHC varient selon le type d'amyloïde, les méthodes locales et l'expérience du lecteur [86].

Certains centres estiment à 30% le taux d'échec de typage de l'amylose, notamment pour les formes AL.

Enfin, le faible nombre disponible d'anticorps commerciaux spécifiques aux protéines précurseurs est un autre frein à cette technique.

En pratique, afin de compenser le bruit de fond, l'utilisation d'un panel d'anticorps est recommandée car il apporte une occasion d'identifier la réaction d'anticorps la plus forte. Le panel employé comporte au moins les anticorps anti-Ig kappa, anti-Ig lambda, anti-SAA et anti-SAP auxquels s'adjoignent d'autres anticorps selon le contexte.

2.4.2 Immunofluorescence

L'immunofluorescence (IF) nécessite un matériel congelé, limitant partiellement son utilisation aux laboratoires disposant d'une capacité de prise en charge de ces prélèvements.

Si elle peut être mise en œuvre, elle doit être privilégiée. Pour plusieurs raisons, l'IF est une technique plus fiable pour le typage des dépôts amyloïdes AL que l'IHC.

D'après l'expérience de plusieurs auteurs, la « contamination » par les protéines sériques est beaucoup moins gênante dans les coupes congelées [87] et le taux de réussite du typage sur ces prélèvements sont compris entre 65 et 87% .

2.4.3 Microscopie électronique

La microscopie immunoélectronique est une technique qui associe la microscopie électronique et l'immunohistochimie. Elle utilise des anticorps traditionnels combinés à des billes d'or qui seront-elles-même visualisées en microscopie électronique. Les performances diagnostiques selon Merlini et al. sont élevées, avec une sensibilité de 79% et une spécificité de 100% [88]. Mais l'IEM est d'accès très limité et n'est actuellement réalisée que dans un certain nombre de cas, dans des centres très spécialisés.

2.4.4 Techniques protéomiques

Compte tenu des pièges associés aux méthodes basées sur les anticorps pour la caractérisation des protéines des fibrilles amyloïdes, la caractérisation chimique directe des protéines dans les dépôts amyloïdes a été explorée pour créer une technique efficace.

C'est dans ce contexte qu'a été développée la spectrométrie de masse couplée à la dissection laser (LCM-MS). C'est une technique récente mise au point et validée en 2009 [89].

Pour résumer simplement, les dépôts amyloïdes identifiés au Rouge Congo sont disséqués avec un microscope à capture laser. Ils sont ensuite soumis à une spectrométrie de masse en tandem où les peptides ionisés sont dissociés en fragments plus petits puis sont séparés selon leurs rapports masse sur charge.

Un logiciel informatique est ensuite utilisé pour analyser les fragments et les comparer aux bases de données de protéines de référence pour l'identification de la protéine native.

Les excellentes performances de LCM-MS ont été rapportées par plusieurs essais. Dans une étude collaborative entre le National Amyloidosis Center et la Mayo Clinic, le typage précis a pu être obtenu dans 94 % des cas, contre 76 % avec l'IHC [90].

Cette technique reste onéreuse et difficile d'accès mais commence à s'imposer comme une référence pour le typage des amyloses.

3 Objectifs de l'étude

Dans l'introduction, nous avons vu que le Rouge Congo est la technique de référence pour le diagnostic de l'amylose en raison de ses bonnes performances de sensibilité et spécificité. Malgré tout, nous avons aussi illustré qu'elle est imparfaite car soumise à la subjectivité d'une interprétation colorimétrique par l'examineur et assez exigeante sur le plan technique

Dans le laboratoire d'anatomie et cytologie pathologique de Lille, l'automatisation de la technique de coloration du Rouge Congo a été mise en place afin de limiter les risques d'exposition des personnels techniques. Cette automatisation a eu un impact significatif sur l'aspect du rouge Congo avec notamment un aspect teinté orange du collagène. De l'avis des praticiens, ce changement a rendu plus difficile l'interprétation des lames notamment lorsque la coloration est réalisée sur coupe congelée.

Par ailleurs, un autre changement de pratique est attendu au laboratoire avec la mise en place de la pathologie digitale. A priori, les lames n'auront pas la possibilité d'être polarisées au moment de l'acquisition par le scanner. Afin de garder une spécificité équivalente au rouge Congo il faudra donc conserver un accès à un microscope ce qui alourdit une procédure censée simplifier la prise en main d'un dossier histopathologique.

C'est dans ce contexte que nous avons voulu évaluer le recours à une nouvelle technique histochimique par fluorescence, l'H-FTAA. Cette technique présente l'avantage d'avoir, à priori, une lecture aisée.

L'objectif principal de ce travail est d'évaluer les performances diagnostiques de sensibilité et de spécificité de la coloration par l'H-FTAA comparativement au Rouge Congo pour le diagnostic d'amylose sur les biopsies de glandes salivaires accessoires et de graisse sous-ombilicale et, parallèlement, de relever les situations discordantes pour en identifier les causes.

L'objectif secondaire est d'estimer sa simplicité de lecture et sa reproductibilité entre deux examinateurs différents.

Matériel et méthodes

1 Sélection des prélèvements

Pour réaliser cette étude, nous avons décidé de tester l'ensemble des cas de biopsies de glandes salivaires accessoires et de biopsies de graisse ombilicale parvenues au laboratoire d'anatomie et cytopathologie du CHU de Lille entre le 1^{er} janvier 2019 et le 1^{er} janvier 2020 et disposant de matériel histologique cryopréservé. Afin de disposer de ces prélèvements congelés, les procédures internes du laboratoire requièrent que les demandes d'examens sur ces dossiers stipulent explicitement une recherche d'amylose par le médecin préleveur. Il avait donc été demandé, en amont de cette étude, que chacun de ces prélèvements fasse l'objet d'une ou plusieurs lames blanches supplémentaires par rapport à la prise en charge habituelle et qu'elles soient conservées à -18°C.

Le recensement des cas parvenus sur cette période a été fait grâce à l'exploitation de la base de données de notre logiciel DIAMIC®.

Un certain nombre de ces dossiers histologiques ne disposaient pas de lames blanches en réserve, probablement par oubli de la procédure au moment de la prise en charge pré-analytique initiale. Dans ces situations, les techniciens de recherche du laboratoire ont effectués, a posteriori, des lames blanches sur le matériel cryopréservé restant.

2 Techniques histologiques

2.1 Marquage par l'H-FTAA

Les marquages par la sonde H-FTAA sont réalisés sur coupes congelées de 6 μm pour les BGSA tout aussi bien que pour les BGO. Le composé que nous avons à disposition est dilué au 1/5000^{ème} avec une solution de PBS (Phosphate-Buffered Saline ; Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Germany) qui correspond à une solution tampon phosphate salin communément utilisée dans ce domaine. Les coupes histologiques étaient préalablement réhydratées à l'eau distillée pendant 5 min. Sur chaque lame réalisée, 200 μL de cette dilution d'H-FTAA étaient disposés et mis en contact avec le prélèvement durant 30 min, en chambre humide, à température ambiante et à l'abri de la lumière. Après ce délai, les lames subissaient deux rinçages successifs au PBS avant montage de la lamelle en milieu aqueux (FluoromountTM; Sigma-Aldrich, St Louis, USA).

L'H-FTAA a été fourni par le Dr Per Hammarström, IFM-Department of Chemistry, Linköping University, à titre gracieux dans le cadre d'une collaboration scientifique.

2.2 Coloration par le rouge Congo

Les lames colorées par le rouge Congo étaient réalisées au moment du diagnostic selon le protocole en vigueur du laboratoire.

Elle est réalisée sur des coupes histologiques de 6 µm d'épaisseur sur automate BenchMark Special Stains ; ROCHE[®] à l'aide du kit de coloration proposé par la même compagnie (Congo Red Staining Kit ; VENTANA ; ROCHE).

3 Méthode d'analyse

L'ensemble des lames réalisées avec le marquage par l'H-FTAA étaient interprétées par deux lecteurs indépendants sur des séries de 30 lames par session. Un lecteur expérimenté que nous appellerons « lecteur senior » et un débutant que nous appellerons « lecteur junior ». La lecture était effectuée en aveugle entre les deux observateurs et en aveugle du résultat du compte rendu définitif et du rouge Congo.

Les lames étaient analysées immédiatement après leur réalisation ou au plus tard dans les 72 heures suivantes en préservant une conservation dans l'obscurité et à 4°C. Elles étaient lues sur microscope à fluorescence (Olympus[®] BX61) avec un filtre FITC disposant d'un pic d'émission (Em) d'une longueur d'onde de 519 nm. D'autres filtres pouvaient être utilisés en cas de doute sur le marquage en FITC, comme le DAPI (Em= 455 nm), voire le TRITC (Em = 572 nm).

L'acquisition des images a été réalisée par scanner numérique de lames Axio Scan.Z1 ; ZEISS[®] et le logiciel d'analyse d'image ZEN[®]. En cas de difficulté pour obtenir un

résultat satisfaisant, l'acquisition était complétée par caméra numérique (LEICA[®] DFC 450 C) et le logiciel LAS V4.8.

Les résultats étaient ensuite comparés entre les deux observateurs puis aux résultats définitifs établis dans le compte-rendu anatomopathologique définitif.

Dans les cas positifs ou discordants, une relecture de la coloration par le rouge Congo en lumière blanche et en lumière polarisée était effectuée, en utilisant la lame faite au moment du diagnostic conservée dans nos archives et une nouvelle coloration au RC uniquement pour les cas discordants.

4 Analyse statistique

Les performances diagnostiques du marquage par l'H-FTAA ont été estimées comparativement aux résultats définitifs sur la coloration du rouge Congo, étant considérée comme le gold standard. Nous nous sommes toutefois permis de reclasser le diagnostic après relecture du RC en cas de désaccord avec le diagnostic initial.

Un coefficient de corrélation de kappa de Cohen a été calculé pour estimer la concordance entre les deux observateurs, senior et junior.

Les tests statistiques ont été obtenus à l'aide du logiciel R (version 4.2.1).

Les intervalles de confiance des proportions à 95% (IC95) sont calculés à l'aide d'une loi normale.

Résultats

1 Validation de la méthode

Bien que l'utilisation du H-FTAA pour la détection de l'amylose ait été validée dans la littérature [91], nous avons souhaité réaliser une première étape de validation de méthode pour confirmer notre protocole de marquage.

Sur une série de cas fortement positifs et négatifs (5 dans chaque catégorie), nous avons réalisé un marquage manuel avec l'H-FTAA.

Les séries d'images suivantes présentent les dépôts amyloïdes colorés par le rouge Congo, en lumière blanche, en lumière polarisée et en fluorescence avec le filtre Texas Red et sont comparées aux mêmes dépôts révélés par l'H-FTAA avec le filtre FITC. Elles mettent en évidence la similarité des dépôts identifiés selon les deux techniques, objectivant leur affinité avec l'H-FTAA.

Exemple 1 :

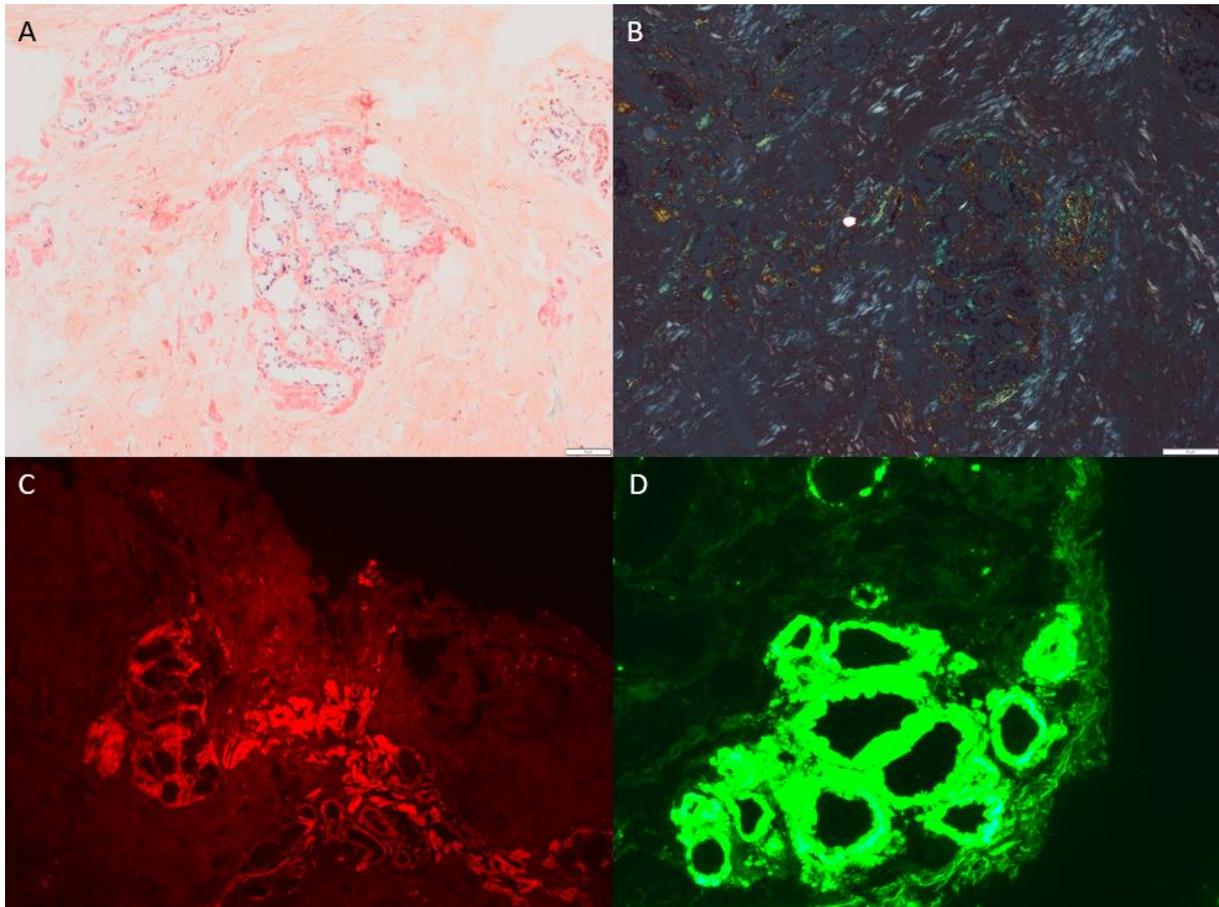


Figure 8 : A) présence de dépôts amyloïdes rouge brique de disposition péri-acinaire sur cette BGSA ; B) biréfringence jaune-vert des dépôts en lumière polarisée ; C) auto fluorescence spontanée en filtre Texas Red ; D) marquage par l'I-H-FTAA de dépôts de même disposition péri-acinaires en FITC.

Exemple 2 :

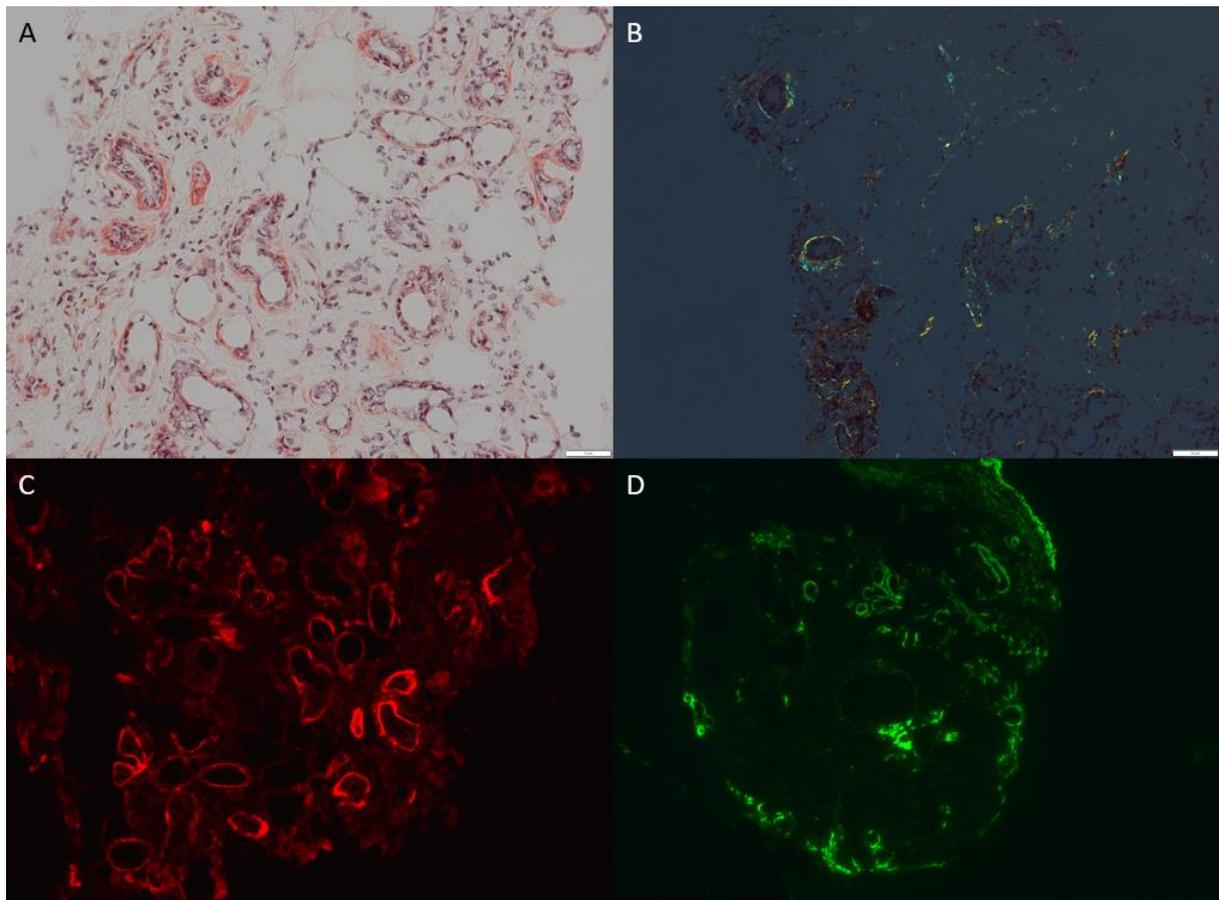


Figure 9 : A) présence de dépôts amyloïdes au RC ; B) biréfringence jaune-vert des dépôts en lumière polarisée C) auto fluorescence spontanée en filtre Texas Red ; D) marquage par l'I-H-FTAA de dépôts de même disposition en FITC

2 Flowchart

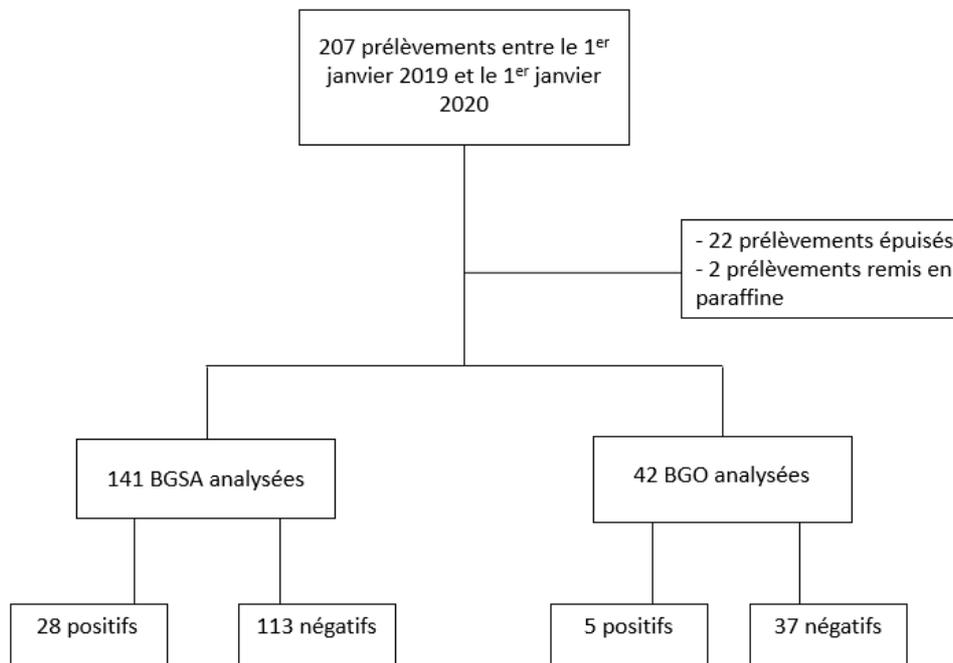


Figure 7 : diagramme de flux

Nous avons recensé un total de 207 prélèvements cryopréservés pour recherche d'amylose sur l'année civile 2019 et se dichotomisant en 161 BGSA et 46 BGO. Parmi ces prélèvements, 20 BGSA et 4 BGO n'étaient plus disponibles en raison d'un épuisement total du matériel ou, plus rarement, d'une remise en paraffine du matériel congelé lors du diagnostic initial.

Au final, 141 BGSA et 42 BGO étaient analysables. Dans le détail, 15/33 (45%) concernent une amylose AL de type lambda, 4/33 (12%) concernent une amylose AL de type kappa, 6/33 (18%) concernent une amylose ATTR et 2/33 (6%) concernent

une amylose AA. Dans 6/33 (18%) cas positifs, l'amylose n'avait pas ou pu être typée en immunohistochimie au moment du diagnostic.

3 Analyses descriptives

Lors de l'analyse des lames, nous avons séparé les résultats en deux groupes selon le lecteur.

Elles étaient, dans chaque cas, lues en aveugle des résultats établis par le Rouge Congo et interprétées de manière indépendante entre les deux lecteurs.

Les résultats obtenus sont répertoriés dans le tableau 2.

Le lecteur sénior retrouve au total 28 cas jugés positifs d'amylose et 131 cas jugés négatifs sur les prélèvements de BGSA. Sur les BGO, 5 cas sont jugés positifs et 37 négatifs d'amylose.

Pour le lecteur junior, seulement 24 BGSA ont été jugées positives d'amylose avec la sonde H-FTAA et 5 BGO positives.

Dans un second temps, l'aveugle avec les résultats du compte-rendu définitif a été levé et les données ont été comparées entre-elles. En cas de discordance, les lames de Rouge Congo étaient relues puis reclassées si nécessaire. Cela a été le cas pour trois d'entre-elles.

Devant ces résultats différents, nous avons calculé un test de concordance inter-observateur global sur l'ensemble des biopsies qui est de 0,89 [0,84 ; 0,93].

Tableau 2 : Ensemble des résultats interprétés par les deux lecteurs, en comparaison au rouge Congo.

N	Lecteur senior	Lecteur junior	RC	Concordance RC/H-FTAA	Typage	Tissu
1	-	-	-	Oui	/	BGSA
2	-	-	+	Non	AA	BGSA
3	+	+	+	Oui	AL- λ	BGSA
4	-	-	-	Oui	/	BGSA
5	-	-	-	Oui	/	BGSA
6	-	-	-	Oui	/	BGSA
7	-	-	-	Oui	/	BGSA
8	-	-	-	Oui	/	BGSA
9	-	-	-	Oui	/	BGSA
10	-	-	-	Oui	/	BGSA
11	-	-	-	Oui	/	BGO
12	+	+	+	Oui	AL- λ	BGSA
13	-	-	-	Oui	/	BGSA
14	-	-	-	Oui	/	BGSA
15	-	-	-	Oui	/	BGSA
16	-	-	-	Oui	/	BGO
17	+	+	+	Oui	ATTR	BGSA
18	-	-	-	Oui	/	BGSA
19	+	+	+	Oui	AL- λ	BGSA
20	-	-	-	Oui	/	BGO
21	-	-	-	Oui	/	BGSA
22	-	-	-	Oui	/	BGSA
23	+	+	-	Non	/	BGSA
24	+	+	- *	Non	*	BGSA
25	-	-	-	Oui	/	BGSA
26	+	+	- *	Non	*	BGSA
27	+	+	+	Oui	AL- λ	BGSA
28	-	-	-	Oui	/	BGSA
29	-	-	-	Oui	/	BGO
30	-	-	-	Oui	/	BGSA
31	-	-	-	Oui	/	BGSA
32	-	-	-	Oui	/	BGSA
33	-	-	-	Oui	/	BGSA
34	-	-	-	Oui	/	BGSA
35	-	-	-	Oui	/	BGSA
36	-	-	-	Oui	/	BGSA
37	-	-	-	Oui	/	BGO
38	-	-	-	Oui	/	BGSA
39	-	-	-	Oui	/	BGO
40	-	-	-	Oui	/	BGSA
41	-	-	-	Oui	/	BGO
42	+	+	+	Oui	AL- λ	BGSA

43	+	+	+	Oui	AL- λ	BGO
44	-†	-†	+	Non	AL- λ	BGSA
45	-	-	-	Oui	/	BGSA
46	-	-	-	Oui	/	BGSA
47	-	-	-	Oui	/	BGSA
48	+	+	+	Oui	ATTR	BGSA
49	-	-	-	Oui	/	BGSA
50	-	-	-	Oui	/	BGSA
51	-	-	-	Oui	/	BGO
52	-	-	-	Oui	/	BGO
53	-	-	-	Oui	/	BGSA
54	-	-	-	Oui	/	BGSA
55	-	-	-	Oui	/	BGO
56	-	-	-	Oui	/	BGSA
57	+	+	+	Oui	ATTR	BGSA
58	+	+	+	Oui	ATTR	BGO
59	-	-	-	Oui	/	BGSA
60	-	-	-	Oui	/	BGO
61	-	-	-	Oui	/	BGSA
62	-	-	-	Oui	/	BGSA
63	+	+	+	Oui	AL- λ	BGSA
64	-	-	-	Oui	/	BGSA
65	-	-	-	Oui	/	BGSA
66	-	-	-	Oui	/	BGO
67	+	-	+	Oui	AA	BGSA
68	-	-	-	Oui	/	BGSA
69	-	-	-	Oui	/	BGO
70	-	-	-	Oui	/	BGSA
71	-	-	-	Oui	/	BGSA
72	-	-	-	Oui	/	BGSA
73	+	+	+	Oui	AL- λ	BGSA
74	+	+	+	Oui	AL- λ	BGO
75	-	-	-	Oui	/	BGSA
76	-	-	-	Oui	/	BGO
77	-	-	-	Oui	/	BGSA
78	-	-	-	Oui	/	BGO
79	-	-	-	Oui	/	BGSA
80	-	-	-	Oui	/	BGO
81	-	-	-	Oui	/	BGSA
82	-	-	-	Oui	/	BGSA
83	-	-	-	Oui	/	BGO
84	-	-	-	Oui	/	BGSA
85	-	-	-	Oui	/	BGSA
86	-	-	-	Oui	/	BGO
87	+	+	+	Oui	AL- λ	BGSA
88	-	-	-	Oui	/	BGSA

89	-	-	-	Oui	/	BGO
90	-	-	-	Oui	/	BGSA
91	-	-	-	Oui	/	BGSA
92	-	-	-	Oui	/	BGSA
93	-	-	-	Oui	/	BGSA
94	-	-	-	Oui	/	BGSA
95	-	-	-	Oui	/	BGSA
96	-	-	-	Oui	/	BGSA
97	-	-	-	Oui	/	BGSA
98	-	-	-	Oui	/	BGO
99	+	+	+	Oui	NT	BGSA
100	+	+	+	Oui	AL- κ	BGSA
101	-	-	-	Oui	/	BGSA
102	-	-	-	Oui	/	BGSA
103	-	-	-	Oui	/	BGSA
104	-	-	-	Oui	/	BGO
105	-	-	-	Oui	/	BGSA
106	-	-	-	Oui	/	BGSA
107	+	+	+	Oui	NT	BGSA
108	-	-	-	Oui	/	BGSA
109	-	-	-	Oui	/	BGSA
110	+	-	+	Oui	NT	BGSA
111	-	-	-	Oui	/	BGO
112	-	-	-	Oui	/	BGSA
113	-	-	-	Oui	/	BGO
114	-	-	-	Oui	/	BGSA
115	-	-	-	Oui	/	BGSA
116	-	-	-	Oui	/	BGSA
117	-	-	-	Oui	/	BGSA
118	-	-	-	Oui	/	BGO
119	+	+	+	Oui	ATTR	BGSA
120	+	+	+	Oui	AL- κ	BGSA
121	+	+	+	Oui	AL- κ	BGO
122	-	-	-	Oui	/	BGSA
123	-	-	-	Oui	/	BGSA
124	-	-	-	Oui	/	BGSA
125	-	-	-	Oui	/	BGSA
126	-	-	-	Oui	/	BGO
127	-	-	-	Oui	/	BGSA
128	-	-	-	Oui	/	BGSA
129	-	-	-	Oui	/	BGSA
130	-	-	-	Oui	/	BGSA
131	-	-	-	Oui	/	BGO
132	-	-	-	Oui	/	BGSA
133	-	-	-	Oui	/	BGO
134	-	-	-	Oui	/	BGSA

135	-	-	-	Oui	/	BGSA
136	-	-	-	Oui	/	BGO
137	-	-	-	Oui	/	BGSA
138	+	+	+	Oui	AL- λ	BGSA
139	+	+	+	Oui	AL- λ	BGO
140	+	-	+	Oui	NT	BGSA
141	-	-	-	Oui	/	BGSA
142	-	-	-	Oui	/	BGSA
143	-	-	-	Oui	/	BGO
144	-	-	-	Oui	/	BGSA
145	-	-	-	Oui	/	BGSA
146	-	-	-	Oui	/	BGSA
147	-	-	-	Oui	/	BGSA
148	-	-	-	Oui	/	BGSA
149	-	-	-	Oui	/	BGSA
150	-	-	-	Oui	/	BGSA
151	-	-	-	Oui	/	BGSA
152	-	-	-	Oui	/	BGSA
153	-	-	-	Oui	/	BGSA
154	-	-	-	Oui	/	BGSA
155	-	-	-	Oui	/	BGSA
156	+	+	+	Oui	AL- λ	BGSA
157	+	+	+	Oui	AL- κ	BGSA
158	-	-	-	Oui	/	BGSA
159	-	-	-	Oui	/	BGO
160	+	-	+	Oui	ATTR	BGSA
161	-	-	-	Oui	/	BGSA
162	-	-	-	Oui	/	BGSA
163	-	-	-	Oui	/	BGSA
164	-	-	-	Oui	/	BGSA
165	-	-	-	Oui	/	BGSA
166	-	-	-	Oui	/	BGSA
167	-	-	-	Oui	/	BGO
168	-	-	-	Oui	/	BGSA
169	-	-	-	Oui	/	BGSA
170	-	-	-	Oui	/	BGO
171	-	-	-	Oui	/	BGSA
172	-	-	-	Oui	/	BGO
173	-	-	-	Oui	/	BGSA
174	-	-	-	Oui	/	BGO
175	-	-	-	Oui	/	BGSA
176	-	-	-	Oui	/	BGO
177	-	-	-	Oui	/	BGSA
178	-	-	-	Oui	/	BGO
179	-	-	-	Oui	/	BGSA
180	-	-	-	Oui	/	BGO

181	+	+	-*	Non	*	BGSA
182	-	-	-	Oui	/	BGSA
183	+	+	+	Oui	AL- λ	BGSA

*N : numéro d'échantillon ; NT : non typable en immunohistochimie ; * : résultat définitif reclassé après relecture.
AA : amylose AA ; ATTR : Amylose à transthyrétine ; AL- λ : amylose AL de type lambda ; AL- κ : amylose AL de type kappa ; † : échantillon secondairement exclu par manque de matériel résiduel.*

4 Résultats discordants

Pour trois des prélèvements, (N° 24, 26 et 181) la lecture avec l'H-FTAA était considérée comme positive par les deux lecteurs, or le compte-rendu initial ne mentionnait pas la présence de dépôts amyloïdes. C'est lors de la relecture attentive et orientée par l'H-FTAA que nous avons effectivement retrouvé la présence de dépôts fibrillaires. Leur point commun était que leur abondance était particulièrement faible voire parfois unique (comme pour le cas 181).

Ces trois cas sont illustrés ci-dessous.

Après rectification du diagnostic, le typage a secondairement été réalisé. Il a confirmé que pour l'ensemble de ces prélèvements, il s'agissait d'une amylose à transthyréline chez des patients âgés, probablement de type wild-type.

- Echantillon 24 :

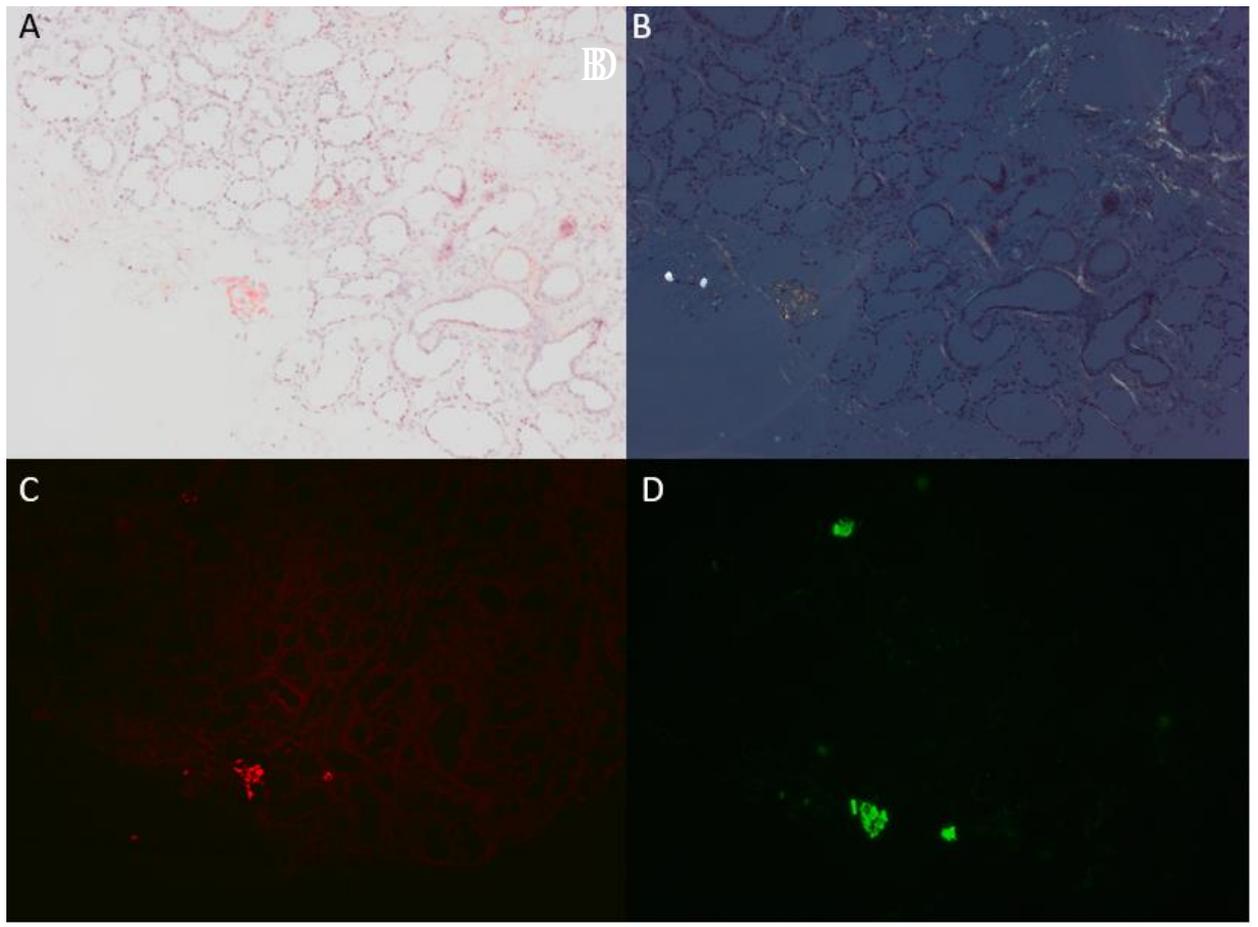


Figure 10 : A) coloration d'un petit dépôt amyloïde en rouge Congo ; B) biréfringence jaune-verte en lumière polarisée ; C) auto fluorescence en filtre Texas Red ; D) marquage par l'H-FTAA de dépôts en FITC

- **Echantillon 26** :

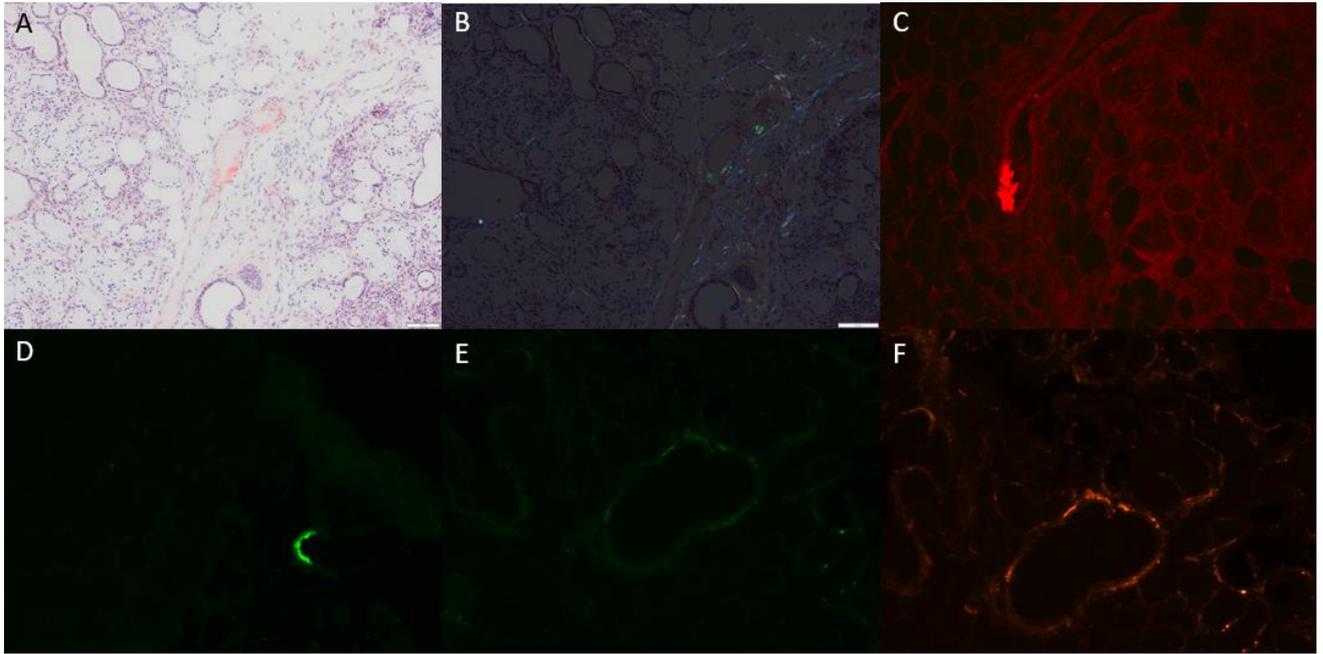


Figure 11 : A) coloration d'un dépôt amyloïde perivasculaire en rouge Congo ; B) biréfringence en lumière polarisée ; C) auto fluorescence en filtre Texas Red ; D) et E) marquage par l'H-FTAA de très petits dépôts en FITC ; F) en TRITC.

- Echantillon 181 :

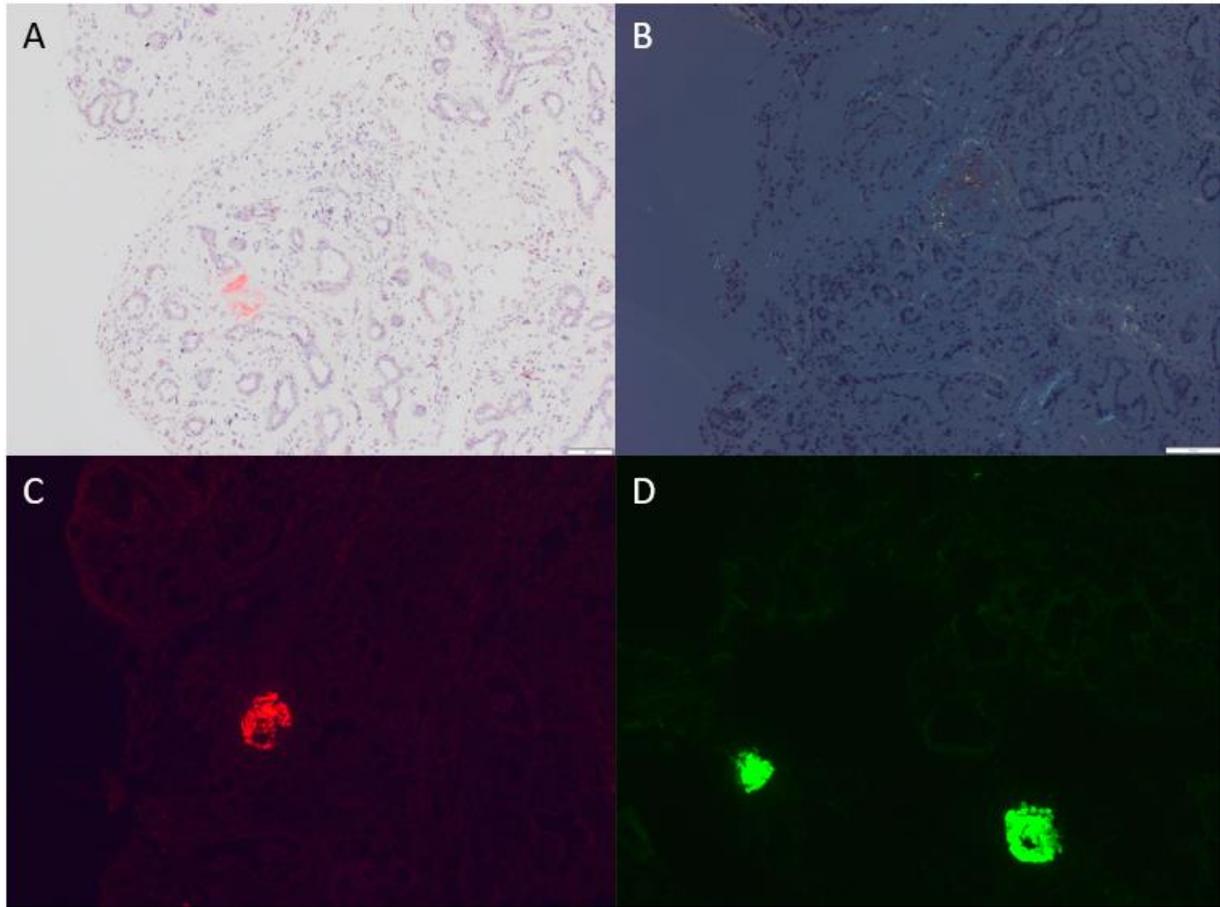


Figure 12 : A) coloration d'un amas fibrillaire en rouge Congo ; B) lumière polarisée ; C) auto-fluorescence en Texas Red ; D) marquage des dépôts par l'H-FTAA.

- **Echantillon 2** :

Ce prélèvement a été classé de façon erronée sur le marquage H-FTAA par les deux lecteurs. Il s'agit du seul faux négatif de notre série. Il montre un marquage par l'H-FTAA très discret, localisé dans le tissu conjonctif entre les acini. A la différence de tous les autres cas positifs, ce marquage est inhomogène et ne semble pas circonscrire d'amas évident.

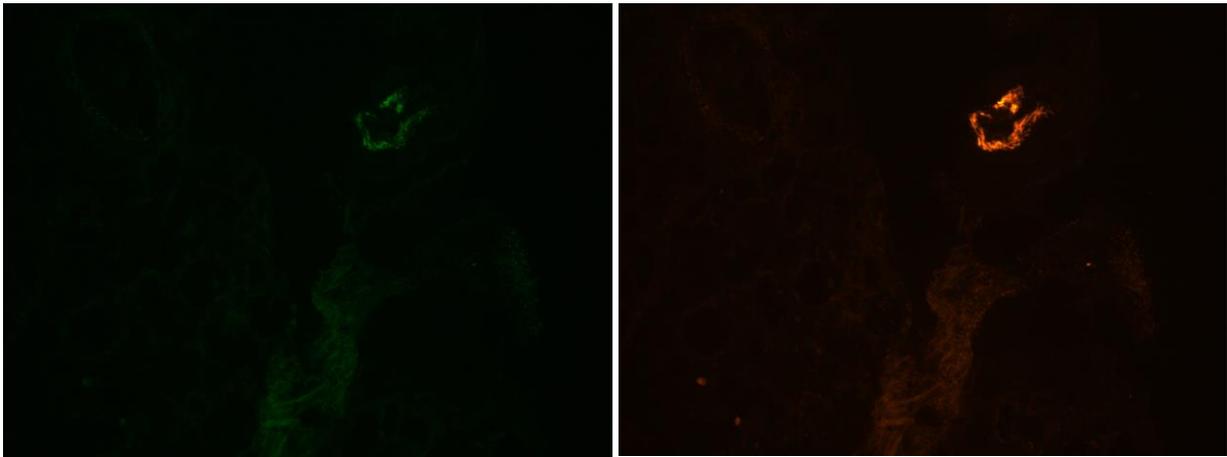


Figure 13 : marquage d'un dépôts amyloïde en H-FTAA considéré à tort comme artéfactuel.

- **Echantillon 23** :

Ce prélèvement montre que des artefacts sont possibles avec le marquage par la sonde fluorescente. Il s'agit d'un cas pour lequel les deux lecteurs l'ont catégorisé comme positif devant un marquage assez intense et significatif. Cependant, il n'existe aucune prise de coloration au RC sur ces dépôts. La nature de ces fixations n'a pas pu être identifiée.

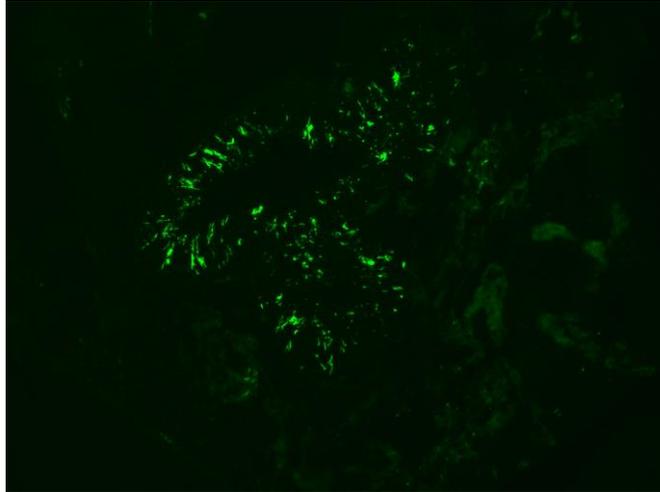


Figure 14 : marquage considéré comme faussement positif en H-FTAA.

Enfin, l'échantillon n°44 a été retirée de l'analyse de données. Il s'agit d'un cas pour lequel nous ne disposions pas de lames blanches et a donc été recoupé.

Malheureusement, le prélèvement était épuisé sur les lames que nous avons coloré par l'H-FTAA.

5 Performances diagnostiques

Pour bâtir le tableau de contingence suivant (Tableau 3), nous avons utilisé les valeurs du lecteur sénior après concertation et mise en commun des résultats. Les performances diagnostiques sont calculées en comparaison au Gold standard, correspondant dans notre étude au Rouge Congo après relecture.

Tableau 3 : tableau de contingence des tests

BGSA	Amylose sur Rouge Congo	Absence d'amylose sur Rouge Congo	Total
H-FTAA positif	27	1	28
H-FTAA négatif	1	111	112
BGO	Amylose sur Rouge Congo	Absence d'amylose sur Rouge Congo	Total
H-FTAA positif	5	0	5
H-FTAA négatif	0	37	37
Total	Amylose sur Rouge Congo	Absence d'amylose sur Rouge Congo	Total
H-FTAA positif	32	1	33
H-FTAA négatif	1	148	149

Nous avons ainsi calculé une sensibilité globale de 0,97 [0,97 ; 0,995] et une spécificité de 0,99 [0,976 ; 1].

Tableau 4 : résumé des résultats de sensibilité et de spécificité du test

Test H-FTAA	Sensibilité	Spécificité
BGSA	0,96	0,99
BGO	1	1
TOTAL	0,97 [0,945 ; 0,995]	0,99 [0,976 ; 1]

Discussion

1 Justificatif de l'étude

Le diagnostic précoce de l'amylose est déterminant dans la prise en charge des patients touchés par ces pathologies. Face à l'évolution naturelle et aux complications qui en découlent, la mise en place de traitements adaptés est nécessaire d'autant plus qu'il existe désormais de nouvelles thérapies très prometteuses et efficaces. Elles offrent l'espoir d'une limitation des atteintes d'organes ou d'une récupération fonctionnelle rapide en cas d'atteinte avérée, notamment cardiaque ou rénale et concourent à une meilleure survie à long terme.

La confirmation des amyloses systémiques passe quasiment systématiquement par un examen histologique, le rôle du pathologiste dans cette situation est donc déterminant et requiert les meilleurs outils diagnostiques possibles.

Nous avons vu que la coloration par le Rouge Congo est une technique séculaire et éprouvée. Elle présente cependant, comme tout test diagnostique, un certain nombre de limites qui peuvent rendre l'interprétation de cette coloration très subtile et délicate.

Dans leur étude de 1995, Linke et al. nous rapportent des analyses rétrospectives de biopsies jugées négatives chez des patients ayant développé a posteriori une amylose AA. L'étendue des dépôts amyloïdes manqués était surprenante et perturbante en proportion (jusqu'à 90 % sur les biopsies rectales) [92]. Elle souligne l'importance des erreurs liées au manque d'expérience de l'observateur, qui est un facteur significatif de faux négatifs. Des erreurs étaient aussi retrouvées parmi les laboratoires

spécialisés et expérimentés en amylose témoignant d'une difficulté intrinsèque dans le diagnostic. Elles sont probablement en lien avec les pièges de coloration déjà évoqués en introduction, en particulier les dépôts de très petite taille ou les agrégats pré-fibrillaires mal formés mais aussi d'une certaine subjectivité lors de l'interprétation. Dans ce contexte, la première batterie de coloration se doit d'être la plus efficace possible face à ce défi fréquemment rencontré en pratique courante. Il nous apparaissait donc judicieux et justifié d'évaluer l'intérêt d'un outil alternatif ou complémentaire permis par le développement de ce marquage récemment mis au point qu'est l'H-FTAA.

2 Performances diagnostiques de l'H-FTAA.

Au cours de cette étude, les performances diagnostiques de l'H-FTAA ont été évaluées sur une relativement large série incluant 182 prélèvements analysables. Ces performances, qu'elles soient considérées sur les BGSA ou sur les BGO étaient sensiblement similaires concernant la spécificité (0,99 et 1 respectivement) et statistiquement assez proches concernant la sensibilité (0,96 contre 1). Nous avons donc décidé de retenir les résultats agrégés afin d'augmenter la puissance statistique des valeurs, notamment liées au fait que l'effectif des BGO positives était significativement restreint (n=5).

Au total, les résultats suggèrent comparativement au RC, que l'H-FTAA aurait une sensibilité de 0,97 et une spécificité de 0,99. Il s'agit de bonnes performances qui sont à mettre en perspective avec deux études récentes.

Sjölander et al. publient en 2016 une étude dont l'objectif est globalement similaire au nôtre. Elle met en évidence la capacité du marqueur H-FTAA à identifier les dépôts amyloïdes mis en évidence par une coloration au RC sur une large diversité de tissus (cardiaque, vasculaire, hépatique, rénal, pancréatique...) et les répartit en deux cohortes, l'une de 53 échantillons et l'autre de 61 échantillons. Ce travail rapporte que l'intégralité des analyses montraient une positivité au H-FTAA suggérant alors une sensibilité de 100% tandis que la spécificité était de l'ordre de 85% [93].

La publication de Hahn et al. en 2017 démontre également, dans le même registre d'étude, d'excellentes sensibilités et spécificités de l'H-FTAA dans la détection d'amylose. Elle se concentre plus spécifiquement sur l'amylose à transthyrétine mais leurs données montrent que le ligand fluorescent a une sensibilité supérieure pour la détection de l'amylose et améliore particulièrement la reconnaissance de minuscules

dépôts en forme de points, souvent difficiles à discerner dans la coloration au Rouge Congo [91].

Enfin, un autre travail de Sjölander s'orientant cette fois davantage sur un type de prélèvement précis, en l'occurrence, la biopsie de graisse abdominale propose des conclusions semblables. Les résultats obtenus font part d'une sensibilité de 98% en comparaison au Rouge Congo [94].

Les trois études citées sous-entendent une sensibilité et globalement des performances plus élevées que pour le RC seul en utilisant un critère de jugement combiné comme par exemple l'association du RC avec l'immunotypage TTR pour l'étude sur l'ATTR de Hahn.

3 Discussion des cas discordants

Sur les 33 échantillons considérés, au final, comme porteurs d'amylose, 3 d'entre eux concernent des prélèvements jugés négatifs au départ sur le Rouge Congo. En extrapolant cette donnée, cela représente 9% de faux négatifs sur une période d'un an.

Notre étude n'était pas calibrée pour montrer une supériorité de l'H-FTAA par rapport au RC car nous utilisons le RC comme gold standard. Toutefois l'analyse précise des cas discordants avant relecture a au moins montré que pour les cas avec une faible abondance des dépôts, l'utilisation de l'H-FTAA pourrait éviter d'omettre des situations. Il faut néanmoins mentionner que la lecture en fluorescence du Rouge Congo n'est pas systématique dans notre service bien que l'on sache que c'est la manière la plus sensible de lire un Rouge Congo.

De manière intéressante, il s'agissait à chaque fois d'amylose à transthyrétine chez des sujets âgés donc probablement de type wild-type. On sait que ce type d'amylose se caractérise souvent par des dépôts, nodulaires, peu abondants et parfois uniques [68]. D'ailleurs, dans la littérature, il est connu que les BGSA et BGO sont moins rentables pour le dépistage de ce type d'amylose [71] et il est possible que cela soit lié à un manque de sensibilité du Rouge Congo dans cette situation.

Un autre enseignement important de l'étude des cas discordants ressort. Les faux négatifs en première lecture n'étaient pas dus à un défaut de qualité de la technique ou secondaires à des artefacts. Nos résultats nous rassurent donc malgré tout sur la qualité de la technique du Rouge Congo dans le laboratoire même après automatisation.

4 Facilité d'interprétation de l'H-FTAA et concordance inter-observateur.

L'interprétation du marquage par l'H-FTAA est spontanément perçue par l'observateur comme plus facile que celle du Rouge Congo. En effet, ce dernier est jugé sur une échelle colorimétrique et nécessite une expérience non négligeable pour discerner de vrais dépôts amyloïdes d'un marquage artéfactuel dû au collagène ou à d'éventuelles hématies diffusées au sein du tissu étudié.

La fluorescence est d'interprétation plus binaire. Les dépôts fibrillaires marqués tranchent franchement avec un fond très sombre, lié à l'absence d'affinité pour l'heptamère envers les structures protéiques normalement conformées. Ce faible bruit de fond offre un contraste optimal mais il est dépendant d'une bonne qualité technique pré-analytique, notamment d'un rinçage rigoureux des lames avant montage.

L'étude de Sjölander confirme cette impression. Selon cette équipe, l'H-FTAA était 10 à 60 fois plus brillant que le Rouge Congo en fonction de la longueur d'onde d'excitation.

L'identification des dépôts amyloïdes est alors naturellement plus aisée en utilisant la fluorescence comparée au Rouge Congo et même s'ils ne sont pas exprimés en termes strictement quantitatifs, il apparaît logique que la sensibilité de la sonde fluorescente puisse être supérieure à la technique histochimique traditionnelle.

Le degré de concordance inter-observateur obtenu dans notre étude est une donnée supplémentaire plaidant pour l'efficacité et la reproductibilité de cette méthode diagnostique. Ici nous obtenons un coefficient de concordance κ de 0,89.

Selon Landis (1977), il s'agit d'une force d'accord presque parfaite.

Selon McHugh (2012), une valeur comprise entre 0,80 et 0,90 correspond à un niveau d'accord fort.

Quoiqu'il en soit, ces données témoignent indéniablement d'une facilité de lecture grâce à cette technique et d'une bonne corrélation entre deux observateurs de niveau d'expérience très différent.

5 Facilité de la mise en œuvre de l'H-FTAA

Nous avons pu constater que ce marquage est une technique histochimique très simple à mettre en œuvre ne nécessitant pas de matériel particulier. Elle est donc à la portée de n'importe quel laboratoire d'anatomie-cytopathologie.

Sur le plan technique, les volumes de dilution du composé sont très faibles, ce qui permet, grâce à sa bonne stabilité, de créer des quantités conséquentes de composé, ce qui est appréciable dans la pratique courante d'un laboratoire.

On y retrouve un autre avantage qui est celui de l'absence de toxicité connue vis-à-vis de ce produit. C'est à ce titre qu'il permet un emploi plus artisanal et manuel afin d'affiner la mise au point technique et par la suite, grâce à la simplicité de la procédure, la convertir en protocole automatisé pour une utilisation en routine peu chronophage en ressources humaines.

De même, dans son analyse, il ne requiert que l'emploi d'un microscope à fluorescence, qui est devenu un outil d'examen routinier de nos jours. Si son accès est facile, il rallonge la prise en charge des prélèvements soumis à l'H-FTAA. En revanche, nous avons remarqué un gain significatif de vitesse de lecture avec ce marqueur par rapport au Rouge Congo, notamment sur les cas litigieux.

6 Pertinence de la méthode

Le procédé expérimental que nous avons voulu mettre en place s'inscrivait dans un objectif de se rapprocher au maximum de l'activité routinière. L'intérêt d'une sélection de cas positifs n'était pas pertinent vis-à-vis de notre objectif, c'est pourquoi nous avons décidé d'inclure les cas sur une séquence temporelle d'une année, dans l'espoir d'avoir un recrutement représentatif de la pratique quotidienne.

Cette méthode nous a également permis une lecture en double aveugle, indispensable à ce genre d'étude.

Les résultats nous montrent que l'H-FTAA identifie tous les types d'amyloses qui lui ont été confrontés. La répartition des types d'amyloses est concordante avec les données épidémiologiques, l'amylose AL représente une large majorité (58%), devant l'ATTR (18%) et l'amylose AA (6%). Bien que les effectifs soient petits, il ne semble pas que ce marquage soit pris en défaut sur l'un des types les plus fréquemment rencontrés.

7 Limites de l'étude

Il convient d'évoquer un certain nombre de limites qui nous sont apparues lors de cette étude.

Le critère de jugement principal est comparé sur l'interprétation du Rouge Congo, considéré comme le Gold Standard du diagnostic histologique de dépistage de l'amylose. Dès lors, le but n'est pas ici de démontrer une supériorité de l'H-FTAA par rapport au Rouge Congo.

Il s'agit par ailleurs d'une étude monocentrique avec des effectifs assez restreints pour certains types d'amyloses, cette maladie restant rare. L'extrapolabilité des résultats est donc limitée pour certains cas (amylose AA, ATTR,...) tandis que d'autres formes, beaucoup plus rares, n'ont pas pu être testées.

Enfin, la limite principale de notre étude est le fait que l'ensemble des lames colorées par le Rouge Congo n'ont pas été relues en aveugle et de façon indépendante par les mêmes lecteurs. Cela nous aurait permis de répondre de manière plus pertinente à la question : l'H-FTAA augmente-il les performances diagnostiques chez des lecteurs moins expérimentés avec le Rouge Congo. Il aurait été aussi pertinent de relire les cas avec le Rouge Congo en fluorescence puisque l'on sait que la sensibilité est meilleure dans la littérature.

Conclusion et Perspectives

Nous rapportons une étude sur l'apport du marquage par l'H-FTAA sur une série de 183 BGO et BGSA dans le diagnostic de l'amylose.

Les performances diagnostiques de sensibilité et de spécificité apparaissent élevées (respectivement 0,97 et 0,99) comparativement au Rouge Congo et probablement davantage sur la sensibilité grâce à sa faculté particulière à détecter les petits dépôts amyloïdes. Il s'y associe une bonne concordance et reproductibilité inter-observateur grâce à la facilité de lecture de cette technique histochimique.

S'il n'est pas ici question de remplacer le Rouge Congo comme coloration de référence dans le diagnostic d'amylose, l'H-FTAA semble être un excellent outil complémentaire qui peut s'envisager en association en cas de doute diagnostique sur la présence de dépôts amyloïdes.

Comme mentionné précédemment, même si le pourcentage de faux négatifs en première lecture du Rouge Congo est significatif, il reflète une situation diagnostique délicate et bien identifiée dans la littérature : celle de très rares dépôts de petite taille au cours de l'amylose à transthyrétine. Plus qu'un défaut technique, les cas manqués avec le Rouge Congo relèvent d'un défaut de sensibilité. Pour l'augmenter, il est pertinent de généraliser la lecture des Rouge Congo en fluorescence et de coupler cette coloration avec une autre technique comme l'H-FTAA. Une idée séduisante aurait été de combiner les deux techniques sur une même lame afin de pouvoir faire une acquisition en immunofluorescence et de montrer la positivité des deux techniques sur les dépôts. C'est un procédé que nous avons expérimenté sur une dizaine de prélèvements porteurs de dépôts amyloïdes. Malheureusement, il s'est avéré que la

double coloration (séquentiellement le Rouge Congo puis l'H-FTAA) semble exercer un phénomène de compétition sur les sites de fixation de la sonde et aucune fluorescence n'est visible en FITC.

En pathologie numérique, il sera donc indispensable de scanner une lame en lumière blanche pour le Congo et une lame en fluorescence pour l'H-FTAA. Le gain espéré d'une réduction du nombre de lames nécessaires pour la prise en charge de ces prélèvements disparaît face à cet obstacle.

Références

- [1] Wechalekar AD, Gillmore JD, Hawkins PN. Systemic amyloidosis. *The Lancet* 2016;387:2641–54. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(15\)01274-X](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(15)01274-X).
- [2] El-Meanawy A, Mueller C, Iczkowski KA. Improving sensitivity of amyloid detection by Congo red stain by using polarizing microscope and avoiding pitfalls. *Diagn Pathol* 2019;14:57. <https://doi.org/10.1186/s13000-019-0822-4>.
- [3] Desport E, Bridoux F, Sirac C, Delbes S, Bender S, Fernandez B, et al. AL Amyloidosis. *Orphanet J Rare Dis* 2012;7:54. <https://doi.org/10.1186/1750-1172-7-54>.
- [4] Quock TP, Yan T, Chang E, Guthrie S, Broder MS. Epidemiology of AL amyloidosis: a real-world study using US claims data. *Blood Adv* 2018;2:1046–53. <https://doi.org/10.1182/bloodadvances.2018016402>.
- [5] Noël L-H. [Systemic amyloidosis: practical diagnosis]. *Nephrol Ther* 2010;6:88–96. <https://doi.org/10.1016/j.nephro.2009.10.002>.
- [6] Glenner GG. Amyloid deposits and amyloidosis. The beta-fibrilloses (first of two parts). *N Engl J Med* 1980;302:1283–92. <https://doi.org/10.1056/NEJM198006053022305>.
- [7] Chiti F, Dobson CM. Protein Misfolding, Functional Amyloid, and Human Disease. *Annu Rev Biochem* 2006;75:333–66. <https://doi.org/10.1146/annurev.biochem.75.101304.123901>.
- [8] Pepys MB, Rademacher TW, Amatayakul-Chantler S, Williams P, Noble GE, Hutchinson WL, et al. Human serum amyloid P component is an invariant constituent of amyloid deposits and has a uniquely homogeneous glycostructure. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1994;91:5602–6. <https://doi.org/10.1073/pnas.91.12.5602>.
- [9] Hind CR, Collins PM, Caspi D, Baltz ML, Pepys MB. Specific chemical dissociation of fibrillar and non-fibrillar components of amyloid deposits. *Lancet Lond Engl* 1984;2:376–8. [https://doi.org/10.1016/s0140-6736\(84\)90544-0](https://doi.org/10.1016/s0140-6736(84)90544-0).
- [10] Madan S, Dispenzieri A, Lacy MQ, Buadi F, Hayman SR, Zeldenrust SR, et al. Clinical features and treatment response of light chain (AL) amyloidosis diagnosed in patients with previous diagnosis of multiple myeloma. *Mayo Clin Proc* 2010;85:232–8. <https://doi.org/10.4065/mcp.2009.0547>.
- [11] Rajkumar SV, Gertz MA, Kyle RA. Primary systemic amyloidosis with delayed progression to multiple myeloma. *Cancer* 1998;82:1501–5.
- [12] Dinner S, Witteles W, Witteles R, Lam A, Arai S, Lafayette R, et al. The prognostic value of diagnosing concurrent multiple myeloma in immunoglobulin light chain amyloidosis. *Br J Haematol* 2013;161:367–72. <https://doi.org/10.1111/bjh.12269>.
- [13] Falk RH. AL amyloidosis or multiple myeloma? An important distinction. *Br J Haematol* 2014;164:748–9. <https://doi.org/10.1111/bjh.12677>.

- [14] Gertz MA. Immunoglobulin light chain amyloidosis: 2011 update on diagnosis, risk-stratification, and management. *Am J Hematol* 2011;86:180–6. <https://doi.org/10.1002/ajh.21934>.
- [15] Imperlini E, Gnechi M, Rognoni P, Sabidò E, Ciuffreda MC, Palladini G, et al. Proteotoxicity in cardiac amyloidosis: amyloidogenic light chains affect the levels of intracellular proteins in human heart cells. *Sci Rep* 2017;7:15661. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-15424-3>.
- [16] Sapp V, Jain M, Liao R. Viewing Extrinsic Proteotoxic Stress Through the Lens of Amyloid Cardiomyopathy. *Physiology* 2016;31:294–9. <https://doi.org/10.1152/physiol.00047.2015>.
- [17] Picken MM. The Pathology of Amyloidosis in Classification: A Review. *Acta Haematol* 2020;143:322–34. <https://doi.org/10.1159/000506696>.
- [18] Martinez-Naharro A, Hawkins PN, Fontana M. Cardiac amyloidosis. *Clin Med Lond Engl* 2018;18:s30–5. <https://doi.org/10.7861/clinmedicine.18-2-s30>.
- [19] *synthese_mg_amylose_cardiaque.pdf* n.d.
- [20] Cyrille NB, Goldsmith J, Alvarez J, Maurer MS. Prevalence and prognostic significance of low QRS voltage among the three main types of cardiac amyloidosis. *Am J Cardiol* 2014;114:1089–93. <https://doi.org/10.1016/j.amjcard.2014.07.026>.
- [21] Griffin JM, Rosenblum H, Maurer MS. Pathophysiology and Therapeutic Approaches to Cardiac Amyloidosis. *Circ Res* 2021;128:1554–75. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.121.318187>.
- [22] Bodez D, Ternacle J, Guellich A, Galat A, Lim P, Radu C, et al. Prognostic value of right ventricular systolic function in cardiac amyloidosis. *Amyloid Int J Exp Clin Investig Off J Int Soc Amyloidosis* 2016;23:158–67. <https://doi.org/10.1080/13506129.2016.1194264>.
- [23] Selvanayagam JB, Hawkins PN, Paul B, Myerson SG, Neubauer S. Evaluation and management of the cardiac amyloidosis. *J Am Coll Cardiol* 2007;50:2101–10. <https://doi.org/10.1016/j.jacc.2007.08.028>.
- [24] Mabru M, Dacher JN, Bauer F. Left ventricular hypertrophy: Cardiac magnetic resonance may help differentiate amyloidosis from hypertrophic cardiomyopathy. *Arch Cardiovasc Dis* 2010;103:55–6. <https://doi.org/10.1016/j.acvd.2008.11.006>.
- [25] Palladini G, Campana C, Klersy C, Balduini A, Vadacca G, Perfetti V, et al. Serum N-terminal pro-brain natriuretic peptide is a sensitive marker of myocardial dysfunction in AL amyloidosis. *Circulation* 2003;107:2440–5. <https://doi.org/10.1161/01.CIR.0000068314.02595.B2>.
- [26] Palladini G, Russo P, Nuvolone M, Lavatelli F, Perfetti V, Obici L, et al. Treatment with oral melphalan plus dexamethasone produces long-term remissions in AL amyloidosis. *Blood* 2007;110:787–8. <https://doi.org/10.1182/blood-2007-02-076034>.
- [27] Ryšavá R. AL amyloidosis: advances in diagnostics and treatment. *Nephrol Dial Transplant Off Publ Eur Dial Transpl Assoc - Eur Ren Assoc* 2019;34:1460–6. <https://doi.org/10.1093/ndt/gfy291>.

- [28] Tang W, McDonald SP, Hawley CM, Badve SV, Boudville N, Brown FG, et al. End-stage renal failure due to amyloidosis: outcomes in 490 ANZDATA registry cases. *Nephrol Dial Transplant Off Publ Eur Dial Transpl Assoc - Eur Ren Assoc* 2013;28:455–61. <https://doi.org/10.1093/ndt/gfs492>.
- [29] Gertz MA, Comenzo R, Falk RH, Fermand JP, Hazenberg BP, Hawkins PN, et al. Definition of organ involvement and treatment response in immunoglobulin light chain amyloidosis (AL): a consensus opinion from the 10th International Symposium on Amyloid and Amyloidosis, Tours, France, 18-22 April 2004. *Am J Hematol* 2005;79:319–28. <https://doi.org/10.1002/ajh.20381>.
- [30] Muchtar E, Gertz MA, Kyle RA, Lacy MQ, Dingli D, Leung N, et al. A Modern Primer on Light Chain Amyloidosis in 592 Patients With Mass Spectrometry-Verified Typing. *Mayo Clin Proc* 2019;94:472–83. <https://doi.org/10.1016/j.mayocp.2018.08.006>.
- [31] Said SM, Sethi S, Valeri AM, Leung N, Cornell LD, Fidler ME, et al. Renal amyloidosis: origin and clinicopathologic correlations of 474 recent cases. *Clin J Am Soc Nephrol CJASN* 2013;8:1515–23. <https://doi.org/10.2215/CJN.10491012>.
- [32] Elnegouly M, Specht K, Zoller H, Matevossian E, Bassermann F, Umgelter A. Liver transplantation followed by autologous stem cell transplantation for acute liver failure caused by AL amyloidosis. Case report and review of the literature. *Ann Hepatol* 2016;15:592–7. <https://doi.org/10.5604/16652681.1203163>.
- [33] Kyle RA, Greipp PR. Amyloidosis (AL). Clinical and laboratory features in 229 cases. *Mayo Clin Proc* 1983;58:665–83.
- [34] Vaxman I, Gertz M. When to Suspect a Diagnosis of Amyloidosis. *Acta Haematol* 2020;143:304–11. <https://doi.org/10.1159/000506617>.
- [35] Agarwal A, Chang DS, Selim MA, Penrose CT, Chudgar SM, Cardones AR. Pinch Purpura: A Cutaneous Manifestation of Systemic Amyloidosis. *Am J Med* 2015;128:e3-4. <https://doi.org/10.1016/j.amjmed.2015.04.008>.
- [36] Dispenzieri A, Kyle RA, Gertz MA, Therneau TM, Miller WL, Chandrasekaran K, et al. Survival in patients with primary systemic amyloidosis and raised serum cardiac troponins. *Lancet Lond Engl* 2003;361:1787–9. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(03\)13396-X](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(03)13396-X).
- [37] Kumar S, Dispenzieri A, Katzmann JA, Larson DR, Colby CL, Lacy MQ, et al. Serum immunoglobulin free light-chain measurement in primary amyloidosis: prognostic value and correlations with clinical features. *Blood* 2010;116:5126–9. <https://doi.org/10.1182/blood-2010-06-290668>.
- [38] Kumar S, Dispenzieri A, Lacy MQ, Hayman SR, Leung N, Zeldenrust SR, et al. Serum uric acid: novel prognostic factor in primary systemic amyloidosis. *Mayo Clin Proc* 2008;83:297–303. <https://doi.org/10.4065/83.3.297>.
- [39] Bochtler T, Hegenbart U, Kunz C, Granzow M, Benner A, Seckinger A, et al. Translocation t(11;14) is associated with adverse outcome in patients with newly diagnosed AL amyloidosis when treated with bortezomib-based regimens. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol* 2015;33:1371–8. <https://doi.org/10.1200/JCO.2014.57.4947>.

- [40] Muchtar E, Dispenzieri A, Gertz MA, Kumar SK, Buadi FK, Leung N, et al. Treatment of AL Amyloidosis: Mayo Stratification of Myeloma and Risk-Adapted Therapy (mSMART) Consensus Statement 2020 Update. *Mayo Clin Proc* 2021;96:1546–77. <https://doi.org/10.1016/j.mayocp.2021.03.012>.
- [41] Jones NF, Hilton PJ, Tighe JR, Hobbs JR. Treatment of “primary” renal amyloidosis with melphalan. *Lancet Lond Engl* 1972;2:616–9. [https://doi.org/10.1016/s0140-6736\(72\)93014-0](https://doi.org/10.1016/s0140-6736(72)93014-0).
- [42] Kyle RA, Bayrd ED. Amyloidosis: review of 236 cases. *Medicine (Baltimore)* 1975;54:271–99. <https://doi.org/10.1097/00005792-197507000-00001>.
- [43] Palladini G, Milani P, Foli A, Obici L, Lavatelli F, Nuvolone M, et al. Oral melphalan and dexamethasone grants extended survival with minimal toxicity in AL amyloidosis: long-term results of a risk-adapted approach. *Haematologica* 2014;99:743–50. <https://doi.org/10.3324/haematol.2013.095463>.
- [44] Jaccard A, Moreau P, Leblond V, Leleu X, Benboubker L, Hermine O, et al. High-Dose Melphalan versus Melphalan plus Dexamethasone for AL Amyloidosis. *N Engl J Med* 2007;357:1083–93. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa070484>.
- [45] Gertz MA, Lacy MQ, Dispenzieri A, Buadi FK, Dingli D, Hayman SR, et al. Stem cell transplantation compared with melphalan plus dexamethasone in the treatment of immunoglobulin light-chain amyloidosis. *Cancer* 2016;122:2197–205. <https://doi.org/10.1002/cncr.30051>.
- [46] Muchtar E, Dispenzieri A, Gertz MA, Kumar SK, Buadi FK, Leung N, et al. Treatment of AL Amyloidosis: Mayo Stratification of Myeloma and Risk-Adapted Therapy (mSMART) Consensus Statement 2020 Update. *Mayo Clin Proc* 2021;96:1546–77. <https://doi.org/10.1016/j.mayocp.2021.03.012>.
- [47] Tsai SB, Seldin DC, Quillen K, Berk JL, Ruberg FL, Meier-Ewert H, et al. High-dose melphalan and stem cell transplantation for patients with AL amyloidosis: trends in treatment-related mortality over the past 17 years at a single referral center. *Blood* 2012;120:4445–6. <https://doi.org/10.1182/blood-2012-09-457341>.
- [48] Wechalekar AD, Lachmann HJ, Offer M, Hawkins PN, Gillmore JD. Efficacy of bortezomib in systemic AL amyloidosis with relapsed/refractory clonal disease. *Haematologica* 2008;93:295–8. <https://doi.org/10.3324/haematol.11627>.
- [49] Landau H, Hassoun H, Rosenzweig MA, Maurer M, Liu J, Flombaum C, et al. Bortezomib and dexamethasone consolidation following risk-adapted melphalan and stem cell transplantation for patients with newly diagnosed light-chain amyloidosis. *Leukemia* 2013;27:823–8. <https://doi.org/10.1038/leu.2012.274>.
- [50] Wechalekar AD, Schonland SO, Kastiris E, Gillmore JD, Dimopoulos MA, Lane T, et al. A European collaborative study of treatment outcomes in 346 patients with cardiac stage III AL amyloidosis. *Blood* 2013;121:3420–7. <https://doi.org/10.1182/blood-2012-12-473066>.
- [51] Real de Asúa D, Costa R, Galván JM, Filigheddu MT, Trujillo D, Cadiñanos J. Systemic AA amyloidosis: epidemiology, diagnosis, and management. *Clin Epidemiol* 2014;6:369–77. <https://doi.org/10.2147/CLEP.S39981>.

- [52] Papa R, Lachmann HJ. Secondary, AA, Amyloidosis. *Rheum Dis Clin North Am* 2018;44:585–603. <https://doi.org/10.1016/j.rdc.2018.06.004>.
- [53] Chen M, Zhou H, Cheng N, Qian F, Ye RD. Serum amyloid A1 isoforms display different efficacy at Toll-like receptor 2 and formyl peptide receptor 2. *Immunobiology* 2014;219:916–23. <https://doi.org/10.1016/j.imbio.2014.08.002>.
- [54] Lachmann HJ, Goodman HJB, Gilbertson JA, Gallimore JR, Sabin CA, Gillmore JD, et al. Natural History and Outcome in Systemic AA Amyloidosis. *N Engl J Med* 2007;356:2361–71. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa070265>.
- [55] Benson MD. The Hereditary Amyloidoses. In: Picken MM, Herrera GA, Dogan A, editors. *Amyloid Relat. Disord. Surg. Pathol. Clin. Correl.*, Cham: Springer International Publishing; 2015, p. 65–80. https://doi.org/10.1007/978-3-319-19294-9_5.
- [56] Muchtar E, Dispenzieri A, Magen H, Grogan M, Mauermann M, McPhail ED, et al. Systemic amyloidosis from A (AA) to T (ATTR): a review. *J Intern Med* 2021;289:268–92. <https://doi.org/10.1111/joim.13169>.
- [57] Ando Y, Coelho T, Berk JL, Cruz MW, Ericzon B-G, Ikeda S, et al. Guideline of transthyretin-related hereditary amyloidosis for clinicians. *Orphanet J Rare Dis* 2013;8:31. <https://doi.org/10.1186/1750-1172-8-31>.
- [58] Gertz MA, Benson MD, Dyck PJ, Grogan M, Coelho T, Cruz M, et al. Diagnosis, Prognosis, and Therapy of Transthyretin Amyloidosis. *J Am Coll Cardiol* 2015;66:2451–66. <https://doi.org/10.1016/j.jacc.2015.09.075>.
- [59] Yamamoto H, Yokochi T. Transthyretin cardiac amyloidosis: an update on diagnosis and treatment. *ESC Heart Fail* 2019;6:1128–39. <https://doi.org/10.1002/ehf2.12518>.
- [60] Berk JL, Suhr OB, Obici L, Sekijima Y, Zeldenrust SR, Yamashita T, et al. Repurposing diflunisal for familial amyloid polyneuropathy: a randomized clinical trial. *JAMA* 2013;310:2658–67. <https://doi.org/10.1001/jama.2013.283815>.
- [61] Gillmore JD, Gane E, Taubel J, Kao J, Fontana M, Maitland ML, et al. CRISPR-Cas9 In Vivo Gene Editing for Transthyretin Amyloidosis. *N Engl J Med* 2021;385:493–502. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa2107454>.
- [62] Kyle RA. Amyloidosis: a convoluted story. *Br J Haematol* 2001;114:529–38. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2141.2001.02999.x>.
- [63] Mollee P, Renaut P, Gottlieb D, Goodman H. How to diagnose amyloidosis. *Intern Med J* 2014;44:7–17. <https://doi.org/10.1111/imj.12288>.
- [64] Francis R, Lewis C. Myocardial biopsy: techniques and indications. *Heart Br Card Soc* 2018;104:950–8. <https://doi.org/10.1136/heartjnl-2017-311382>.
- [65] Bandari J, Fuller TW, Turner li RM, D’Agostino LA. Renal biopsy for medical renal disease: indications and contraindications. *Can J Urol* 2016;23:8121–6.
- [66] Lecadet A, Bachmeyer C, Buob D, Cez A, Georgin-Lavialle S. Minor salivary gland biopsy is more effective than normal appearing skin biopsy for amyloid detection in systemic amyloidosis: A prospective monocentric study. *Eur J Intern Med* 2018;57:e20–1. <https://doi.org/10.1016/j.ejim.2018.07.026>.

- [67] Suzuki T, Kusumoto S, Yamashita T, Masuda A, Kinoshita S, Yoshida T, et al. Labial salivary gland biopsy for diagnosing immunoglobulin light chain amyloidosis: a retrospective analysis. *Ann Hematol* 2016;95:279–85. <https://doi.org/10.1007/s00277-015-2549-y>.
- [68] Jamet M-P, Gnemmi V, Hachulla É, Dhaenens C-M, Bouchindhomme B, Delattre C, et al. Distinctive Patterns of Transthyretin Amyloid in Salivary Tissue: A Clinicopathologic Study of 92 Patients With Amyloid-containing Minor Salivary Gland Biopsies. *Am J Surg Pathol* 2015;39:1035–44. <https://doi.org/10.1097/PAS.0000000000000430>.
- [69] Picken MM. Amyloidosis-where are we now and where are we heading? *Arch Pathol Lab Med* 2010;134:545–51. <https://doi.org/10.5858/134.4.545>.
- [70] van Gameren II, Hazenberg BPC, Bijzet J, van Rijswijk MH. Diagnostic accuracy of subcutaneous abdominal fat tissue aspiration for detecting systemic amyloidosis and its utility in clinical practice. *Arthritis Rheum* 2006;54:2015–21. <https://doi.org/10.1002/art.21902>.
- [71] Ikeda S, Sekijima Y, Tojo K, Koyama J. Diagnostic value of abdominal wall fat pad biopsy in senile systemic amyloidosis. *Amyloid Int J Exp Clin Investig Off J Int Soc Amyloidosis* 2011;18:211–5. <https://doi.org/10.3109/13506129.2011.623199>.
- [72] Muchtar E, Dispenzieri A, Lacy MQ, Buadi FK, Kapoor P, Hayman SR, et al. Overuse of organ biopsies in immunoglobulin light chain amyloidosis (AL): the consequence of failure of early recognition. *Ann Med* 2017;49:545–51. <https://doi.org/10.1080/07853890.2017.1304649>.
- [73] Leonardi L, Adam C, Beaudonnet G, Beauvais D, Cauquil C, Not A, et al. Skin amyloid deposits and nerve fiber loss as markers of neuropathy onset and progression in hereditary transthyretin amyloidosis. *Eur J Neurol* 2022;29:1477–87. <https://doi.org/10.1111/ene.15268>.
- [74] Gupta N, Kaur H, Wajid S. Renal amyloidosis: an update on diagnosis and pathogenesis. *Protoplasma* 2020;257:1259–76. <https://doi.org/10.1007/s00709-020-01513-0>.
- [75] Yakupova EI, Bobyleva LG, Vikhlyantsev IM, Bobylev AG. Congo Red and amyloids: history and relationship. *Biosci Rep* 2019;39:BSR20181415. <https://doi.org/10.1042/BSR20181415>.
- [76] Sarkar S, Raymick J, Cuevas E, Rosas-Hernandez H, Hanig J. Modification of methods to use Congo-red stain to simultaneously visualize amyloid plaques and tangles in human and rodent brain tissue sections. *Metab Brain Dis* 2020;35:1371–83. <https://doi.org/10.1007/s11011-020-00608-0>.
- [77] Espargaró A, Llabrés S, Saupe SJ, Curutchet C, Luque FJ, Sabaté R. On the Binding of Congo Red to Amyloid Fibrils. *Angew Chem Int Ed Engl* 2020;59:8104–7. <https://doi.org/10.1002/anie.201916630>.
- [78] Clement CG, Truong LD. An evaluation of Congo red fluorescence for the diagnosis of amyloidosis. *Hum Pathol* 2014;45:1766–72. <https://doi.org/10.1016/j.humpath.2014.04.016>.

- [79] Linke RP. Highly sensitive diagnosis of amyloid and various amyloid syndromes using Congo red fluorescence. *Virchows Arch Int J Pathol* 2000;436:439–48. <https://doi.org/10.1007/s004280050471>.
- [80] Jalandoni-Buan: Characterization and identification... - Google Scholar n.d. https://scholar.google.com/scholar_lookup?journal=Philippine+J.+Sci.&title=C+haracterization+and+identification+of+congo+red+decolorizing+bacteria+from+monocultures+and+consortia&author=A.C.+Jalandoni-Buan&author=A.L.A.+Decena-Soliven&author=E.P.+Cao&author=V.L.+Barraquio&author=W.L.+Barraquio&volume=139&publication_year=2010&pages=71-78& (accessed July 25, 2022).
- [81] Biancalana M, Koide S. Molecular mechanism of Thioflavin-T binding to amyloid fibrils. *Biochim Biophys Acta* 2010;1804:1405–12. <https://doi.org/10.1016/j.bbapap.2010.04.001>.
- [82] Elghetany MT, Saleem A. Methods for staining amyloid in tissues: a review. *Stain Technol* 1988;63:201–12. <https://doi.org/10.3109/10520298809107185>.
- [83] Buxbaum JN, Linke RP. A molecular history of the amyloidoses. *J Mol Biol* 2012;421:142–59. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2012.01.024>.
- [84] Cooper JH. An evaluation of current methods for the diagnostic histochemistry of amyloid. *J Clin Pathol* 1969;22:410–3.
- [85] Hammarström P, Simon R, Nyström S, Konradsson P, Aslund A, Nilsson KPR. A fluorescent pentameric thiophene derivative detects in vitro-formed prefibrillar protein aggregates. *Biochemistry* 2010;49:6838–45. <https://doi.org/10.1021/bi100922r>.
- [86] Owen-Casey MP, Sim R, Cook HT, Roufosse CA, Gillmore JD, Gilbertson JA, et al. Value of antibodies to free light chains in immunoperoxidase studies of renal biopsies. *J Clin Pathol* 2014;67:661–6. <https://doi.org/10.1136/jclinpath-2014-202231>.
- [87] Picken MM. New insights into systemic amyloidosis: the importance of diagnosis of specific type. *Curr Opin Nephrol Hypertens* 2007;16:196–203. <https://doi.org/10.1097/MNH.0b013e3280bdc0db>.
- [88] Fernández de Larrea C, Verga L, Morbini P, Klersy C, Lavatelli F, Foli A, et al. A practical approach to the diagnosis of systemic amyloidoses. *Blood* 2015;125:2239–44. <https://doi.org/10.1182/blood-2014-11-609883>.
- [89] Rezk T, Gilbertson JA, Mangione PP, Rowczenio D, Rendell NB, Canetti D, et al. The complementary role of histology and proteomics for diagnosis and typing of systemic amyloidosis. *J Pathol Clin Res* 2019;5:145–53. <https://doi.org/10.1002/cjp2.126>.
- [90] Gilbertson JA, Theis JD, Vrana JA, Lachmann H, Wechalekar A, Whelan C, et al. A comparison of immunohistochemistry and mass spectrometry for determining the amyloid fibril protein from formalin-fixed biopsy tissue. *J Clin Pathol* 2015;68:314–7. <https://doi.org/10.1136/jclinpath-2014-202722>.
- [91] Hahn K, Nilsson KPR, Hammarström P, Urban P, Meliss RR, Behrens H-M, et al. Establishing and validating the fluorescent amyloid ligand h-FTAA (heptamer formyl thiophene acetic acid) to identify transthyretin amyloid deposits in carpal

- tunnel syndrome. *Amyloid Int J Exp Clin Investig Off J Int Soc Amyloidosis* 2017;24:78–86. <https://doi.org/10.1080/13506129.2017.1316711>.
- [92] Linke RP, Gärtner HV, Michels H. High-sensitivity diagnosis of AA amyloidosis using Congo red and immunohistochemistry detects missed amyloid deposits. *J Histochem Cytochem Off J Histochem Soc* 1995;43:863–9. <https://doi.org/10.1177/43.9.7642960>.
- [93] Sjölander D, Röcken C, Westermark P, Westermark GT, Nilsson KPR, Hammarström P. Establishing the fluorescent amyloid ligand h-FTAA for studying human tissues with systemic and localized amyloid. *Amyloid Int J Exp Clin Investig Off J Int Soc Amyloidosis* 2016;23:98–108. <https://doi.org/10.3109/13506129.2016.1158159>.
- [94] Sjölander D, Bijzet J, Hazenberg BP, Nilsson KPR, Hammarström P. Sensitive and rapid assessment of amyloid by oligothiophene fluorescence in subcutaneous fat tissue. *Amyloid* 2015;22:19–25. <https://doi.org/10.3109/13506129.2014.984063>.

ANNEXE 1

Principales étiologies des amyloses cardiaques.

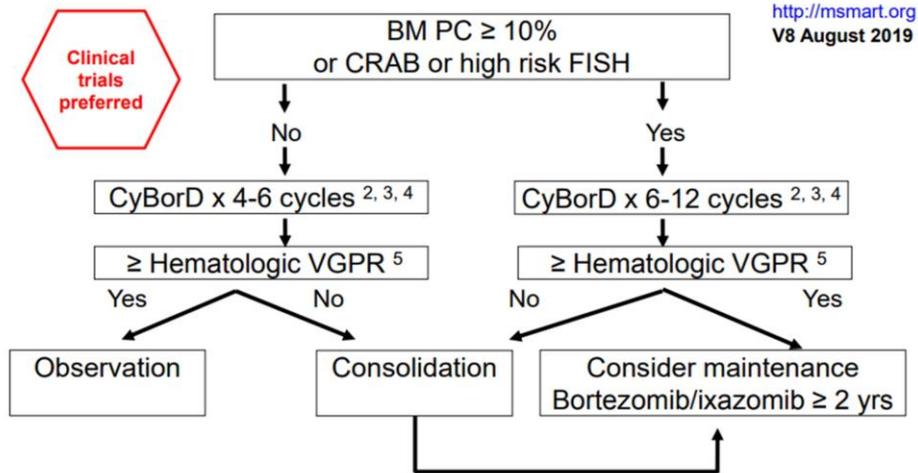
	Amylose cardiaque AL	Amylose cardiaque à transthyrétine wild-type	Amylose cardiaque à transthyrétine héréditaire
Age au diagnostic	50 à 90 ans	70 à 100 ans	30 à 80 ans
Répartition par sexe	Globalement égale entre homme et femme	Nette prédominance masculine	Prédominance masculine
Protéine précurseur	Chaîne légère d'Ig	Transthyrétine	Transthyrétine
Origine génétique	Non	Non	Transmission autosomique dominante
Atteinte extracardiaque	Rein, SNP, foie, tractus gastro-intestinal, peau et tissus mous	Canal carpien, tractus gastro-intestinal	SNP
Manifestations cliniques	Maladie systémique avec atteinte cardiaque et rénale (60-70%) ; hépatique (15%) et du SNP (10%)	Phénotype cardiaque prédominant avec cardiomyopathie restrictive et IC avec FEVG préservée	Dépend du variant. - Val122Ile : phénotype cardiaque - Thr60Ala : phénotype mixte - Val30Met : prédominance neuropathique
Pronostic au diagnostic	Médiane de survie 4 à 6 mois en cas d'insuffisance cardiaque	Médiane de survie 2 à 6 ans en l'absence de traitement	Médiane de survie 3 à 12 ans

Ig, immunoglobuline ; IC, insuffisance cardiaque ; FEVG, fraction d'éjection ventriculaire gauche. D'après Griffin et al.

ANNEXE 2

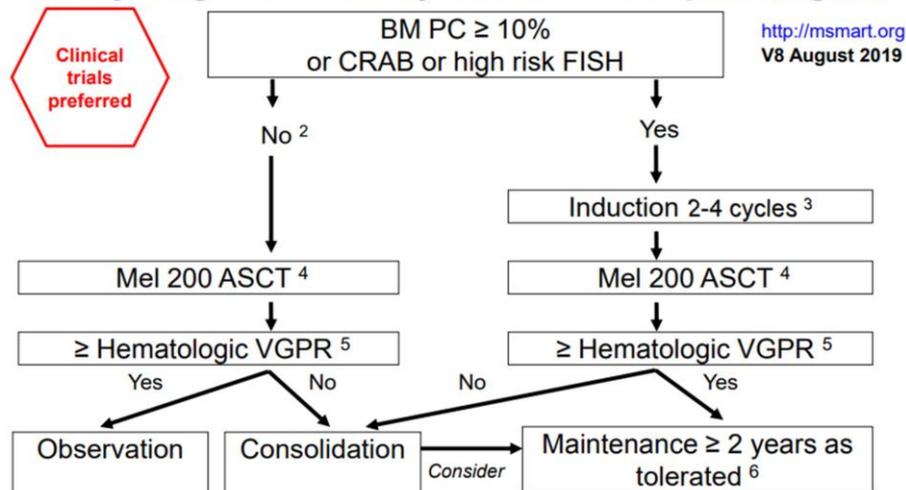
Prise en charge thérapeutique de l'amylose AL au diagnostic d'après Mayo Consensus.

(A) Newly Diagnosed AL Amyloidosis¹ - Transplant ineligible



- 1 Consider adding doxycycline for at least a year
- 2 Or BMel-Dex
- 3 If < PR at 2 months consider changing therapy
- 4 If young, consider stem cell collection for eventual ASCT
- 5 Decision to change/add therapy if > CR made based on a number clinical factors. Re-refer to amyloid center of excellence

(B) Newly Diagnosed AL Amyloidosis¹ - Transplant eligible



- 1 Consider adding doxycycline for at least a year
- 2 Induction (CyBorD or low-dose lenalidomide VRd) also used if delay (e.g. >1 month) in proceeding to ASCT
- 3 If CR, collect stem cells and option to observe without ASCT
- 4 For CrCl <30, use Mel 140 mg/m². Age >70, consider Mel 140
- 5 Decision to change/add therapy if > CR made based on a number clinical factors. Re-refer to amyloid center of excellence
- 6 If high-risk FISH (del 17p, t(4;14), or t(14;20)), use proteasome inhibitor for maintenance; otherwise lenalidomide

AUTEUR : Nom : LERICHE Prénom : William

Date de Soutenance : 03/10/2022

Titre de la Thèse : Intérêt du marqueur H-FTAA dans le diagnostic de l'amylose.

Thèse - Médecine - Lille 2022

Cadre de classement : Anatomie et Cytologie Pathologiques

DES + FST ou option : Anatomie et Cytologie Pathologiques

Mots-clés : amylose ; Rouge Congo ; H-FTAA ; glandes salivaires

Résumé :

Contexte : Les amyloses regroupent un ensemble de maladies caractérisées par la présence de dépôts protéiques insolubles prenant une conformation spécifique en feuillets β -plissés. Actuellement, leur diagnostic histopathologique est basé sur la coloration du Rouge Congo qui offre, de bonnes performances diagnostiques mais peut se révéler parfois insuffisante en raison d'un manque de sensibilité sur les dépôts de faible abondance et d'une certaine subjectivité d'interprétation. Le développement de nouveaux outils diagnostics telle que la sonde lumineuse conjuguée H-FTAA apporte une alternative prometteuse par rapport au Rouge Congo. Notre objectif est d'évaluer la place de ce marqueur dans le dépistage de l'amylose.

Matériel et Méthodes : Nous avons conduit une étude rétrospective monocentrique sur l'ensemble des biopsies des glandes salivaires accessoires et des biopsies de graisse ombilicale adressés à l'institut de pathologie du CHU de Lille pour suspicion d'amylose entre le 1^{er} janvier 2019 et le 31 décembre 2019. Chaque prélèvement disponible a été marqué par la sonde fluorescente H-FTAA puis interprété par deux observateurs indépendants et en aveugle des résultats définitifs. Ces résultats ont ensuite été comparés au statut du Rouge Congo après relecture, considéré comme le gold standard. La sensibilité, la spécificité et la concordance diagnostique inter-observateur ont été calculés en référence au gold standard.

Résultats : sur 183 prélèvements analysés, l'H-FTAA retrouve 33 cas positifs d'amylose. Comparativement au Rouge Congo, le marquage par l'H-FTAA présente une sensibilité de 0,97 et une spécificité de 0,99. Par ailleurs, il a permis la requalification du diagnostic initial après relecture du rouge Congo dans 3 cas sur 33 (9%). La concordance inter-observateur est estimée à 0,89, démontrant une bonne reproductibilité grâce à sa simplicité de lecture.

Conclusion : Les performances diagnostiques de l'H-FTAA dans la recherche d'amylose systémique apparaissent proches du gold standard actuel. Sa capacité à détecter les atteintes minimales sur les tissus suggère d'ailleurs une sensibilité supérieure face au Rouge Congo dont c'est l'une des principales limites reconnues. Sa facilité d'emploi et d'interprétation font également de la sonde H-FTAA un marqueur complémentaire idéal dans cette indication.

Composition du Jury :

Président : Monsieur le Professeur Xavier LEROY

Asseseurs : Madame le Professeur Viviane GNEMMI
Monsieur le Docteur Louis TERRIOU

Directeur : Monsieur le Docteur Jean-Baptiste GIBIER

