

UNIVERSITE DE LILLE
FACULTE DE MEDECINE HENRI WAREMBOURG
Année 2024

THESE POUR LE DIPLOME D'ETAT
DE DOCTEUR EN MEDECINE

**ETUDE DES AMYLOSES DIGESTIVES CHEZ LES
PERSONNES AGEES**

Présentée et soutenue publiquement le 16 octobre 2024
à 16H00 au pôle formation

Par Charles BENEZECH

JURY

Président :

Monsieur le Professeur Xavier LEROY

Assesseurs :

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

α-Syn	<i>alpha</i> -synucléine
Aβ	β -amyloïde
AL	Amylose à chaîne légère
EFEMP1	EGF-containing fibulin-like extracellular matrix protein 1
IAPP	Islet amyloid polypeptide
IHC	Immunohistochimie
RC	Rouge Congo
SAA	Sérum amyloïde A
TTR	Transthyrétine

Sommaire

AVERTISSEMENT	2
LISTE DES ABREVIATIONS	3
SOMMAIRE	4
RESUME	6
INTRODUCTION	7
1. Amylose et vieillissement	7
2. Histologie de la paroi digestive	9
3. Amyloses digestives	10
4. Amylose à TTR	11
5. Diagnostic	13
5.1 Prélèvements	14
5.2 Détection du dépôt amyloïde	14
5.3 Typage de l'amylose	16
6. EFEMP1	17
7. Objectif	18
MATERIEL ET METHODES	19
1. Protection des données à caractère personnel	19
2. Sélection des prélèvements	19
3. Prélèvements non disponibles	19
4. Critères histologiques des prélèvements	20
5. Techniques histologiques	20
5.1 Préparation des prélèvements	20
5.2 Rouge Congo	21

5.3 Techniques d'immunohistochimie	22
5.4 Spectrométrie de masse	23
RESULTATS	24
6. Description des patients à l'inclusion	30
7. Description des prélèvements à l'inclusion	30
8. Analyse des techniques histologiques et immunohistochimiques	31
9. Analyse populationnelle des EFEMP1	35
10. Analyse populationnelle des TTR	35
11. Analyse populationnelle de l'amylose SAA	36
12. Caractéristiques histologiques EFEMP1	36
13. Caractéristiques histologiques TTR	44
14. Caractéristiques histologiques TTR et EFEMP1	45
15. Caractéristiques histologiques SAA	49
DISCUSSION	51
1. Données épidémiologiques	51
2. Étude de la positivité à EFEMP1	51
3. Étude de la positivité à TTR	53
4. Étude de la positivité à TTR et EFEMP1	54
5. Limites du rouge Congo	54
6. Évolution du diagnostic des amyloses	55
7. Perspectives	56
REFERENCES	57

Résumé

Contexte : Les amyloses et notamment l'amylose à transthyrétine non mutée, représentent des pathologies affectant particulièrement les personnes âgées. Le développement de nouvelles thérapeutiques offre de vraies chances de guérison pour les patients. Nous avons souhaité étudier la prévalence et le type d'amylose affectant le tube digestif de personnes âgées dans l'objectif d'étudier l'intérêt d'un dépistage sur pièce opératoire digestive.

Matériel et Méthodes : Nous avons conduit une étude rétrospective monocentrique sur l'ensemble de pièces opératoires du tractus digestif adressés à l'institut de pathologie du CHU de Lille pour suspicion d'amylose entre le 1^{er} janvier 2018 et le 31 décembre 2021. Chaque prélèvement a été étudié au Rouge Congo et suivi en cas de positivité d'un typage de l'amylose.

Résultats : Sur 186 prélèvements analysés, nous retrouvons 69 cas positifs d'amylose. 58 présentent un marquage positif à EFEMP1, 5 à la TTR et EFEMP1, 4 à TTR, 1 à SAA et 1 en cours de typage.

Conclusion : Les dépôts amyloïdes digestifs chez les personnes âgées sont fréquents et représentent 37 % de nos prélèvements. Notre étude suggère une prédominance de l'amylose à EFEMP1 chez les personnes âgées. Cette nouvelle amylose dont les caractéristiques restent encore à déterminer est actuellement peu décrite. Cette étude est la première française à notre connaissance à étudier l'intérêt d'un dépistage des amyloses après 80 ans sur pièce opératoire digestive. Elle est également la première à étudier sur une population caucasienne les dépôts de EFEMP1.

Introduction

Les amyloses sont un ensemble hétérogène de maladies rares dont la physiopathologie repose sur le dépôt extracellulaire de protéines généralement endogènes et mal repliées [1] [2].

L'organe atteint subit une altération de son fonctionnement et/ou de sa structure pouvant provoquer des symptômes cliniques selon l'importance des dépôts et l'organe touché comme les troubles du rythme cardiaque en cas d'atteinte cardiaque [3].

Ces dépôts se forment à partir de protéines qui, en raison de divers mécanismes tels que le vieillissement, les mutations génétiques, l'inflammation et les troubles néoplasiques, entraînent une surproduction, un mauvais repliement et une diminution de l'élimination des protéines amyloïdogènes spécifiques à chaque type d'amyloïdose [4] [5].

A ce jour, nous dénombrons plus de 42 types de protéines amyloïdogènes [6].

Néanmoins certaines protéines pouvant donner des amas fibrillaires amyloïdes comme β -amyloïde ($A\beta$), Tau, *alpha*-synucléine (α -Syn) et islet amyloid polypeptide (IAPP) jouent un rôle pathologique dans des maladies neurodégénératives ou endocriniennes mais ne sont pas considérées comme conduisant à une amylose.

Aujourd'hui les trois amyloses systémiques extra-cérébrales les plus fréquentes sont l'amylose à chaînes légères (AL), l'amylose à sérum amyloïde A (SAA) et l'amylose à transthyrélines (TTR).

1. Amylose et vieillissement

De nombreuses populations mondiales sont vieillissantes et cette avancée dans des âges de plus en plus extrêmes s'accompagne fréquemment d'une accumulation de fibrilles amyloïdes pouvant être responsables de pathologies diverses. Nous pouvons citer pour exemple la maladie d'Alzheimer ou l'amylose à TTR [7].

Ainsi l'âge représente le premier facteur dans la formation des amyloses 07/10/2024 08:14:00[6].

Ces dépôts se forment à partir de précurseurs protéiques. Leurs accumulations intracérébrales dans la maladie d'Alzheimer ou de Parkinson ainsi que leurs caractéristiques biochimiques et cliniques ont fait l'objet de nombreuses recherches. A contrario, les recherches concernant les dépôts extra-cérébraux sont moins nombreuses et leurs caractéristiques restent encore à préciser [9].

Néanmoins le vieillissement peut être aussi associé à des dépôts considérés aujourd'hui comme physiologique comme les corps amylacés ou les dépôts de lipofuscines [10] [11].

Les corps amylacés semblent être une forme d'élimination des déchets cellulaires de ces mêmes précurseurs protéiques que l'on retrouve dans certaines amyloses.

Dans le système nerveux central, des observations montrent des corps amylacés contenant des amas fibrillaires. Il est noté également des corps amylacés intracellulaires pouvant correspondre à une forme immature de ces derniers [12]. Ces corps amylacés sont généralement ensuite éliminés par le système phagocytaire. [13]

Un consensus récent émerge pour considérer ces corps amylacés comme appartenant à un système d'élimination des déchets cellulaires par phagocytose ou

par élimination par voies naturelles comme dans l'urine pour des corps amyloïdes prostatique par exemple.

Ces différentes observations montrent que différents mécanismes tendent à former des dépôts amyloïdes dont certains sont physiologiques tandis que d'autres semblent pathologiques.

La littérature admet également que la formation de feuillets β peut avoir des fonctions physiologiques notamment chez l'homme, le transporteur p-mel17 permettant le transport de la mélanine dans les mélanosomes. Ils sont également retrouvés chez des bactéries et des champignons participant à la structure de biofilms ou de spores [6].

2. Histologie de la paroi digestive

Nous pouvons résumer une paroi digestive à un ensemble de tuniques formant un tube. Ces différents segments permettent l'extraction de nutriments contenus dans le bol alimentaire et l'élimination des déchets de ce processus.

Les différentes couches fonctionnelles communément admises sont de la profondeur vers la surface :

- la muqueuse : elle comporte un épithélium évoluant le long du tube digestif reposant sur un tissu conjonctif et une fine couche de muscle lisse, la musculaire muqueuse.
- la sous muqueuse : c'est une couche de tissu collagène lâche qui permet à différentes structures vasculaires et nerveuses de venir au contact de la muqueuse.

- la musculuse : cette couche est constituée essentiellement de fibres musculaires lisses qui permettent le péristaltisme du tube digestif.
- l'adventice : cette couche externe se compose essentiellement de tissu conjonctif lâche et comporte des structures vasculaires, des nerfs ainsi que du tissu adipeux. Dans la cavité péritonéale l'adventice prend la forme d'une séreuse et est revêtue sur son versant extérieur par un épithélium pavimenteux (le mésothélium).

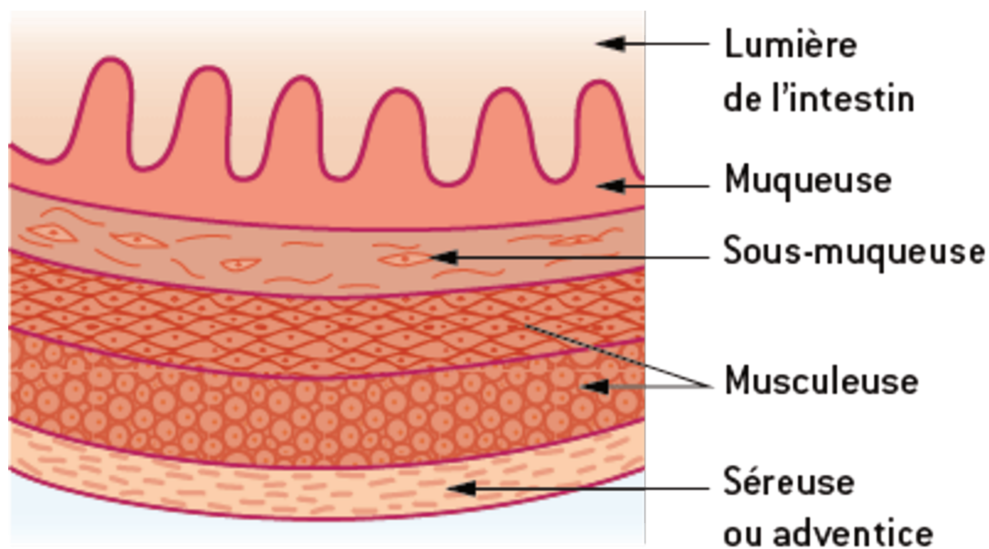


Figure 1 : Schématisation d'une paroi digestive.

3. Amyloses digestives

L'atteinte digestive par les amyloses est peu étudiée comparativement aux atteintes rénales ou cardiaques. La symptomatologie des atteintes digestives est le plus souvent aspécifique comparativement aux atteintes rénales et cardiaques.

D'après la littérature scientifique, cette atteinte n'est pas rare et varie selon le type d'amylose [14,15]. Ces différentes études, nous renseignent également sur une atteinte préférentielle de l'intestin grêle, avec une prédominance des amyloses AL ou

à TTR. Néanmoins, ces études se basent sur une analyse des biopsies et pièces opératoires dont le diagnostic d'amylose a déjà été réalisé. De plus, l'amylose à TTR est décrite comme touchant des patients significativement plus âgés que les autres types d'amyloses. Ces études soulignent également un gradient proximo-distal. Les amyloses AL kappa et SAA sont généralement proximales tandis que AL lambda et TTR sont plus distales. Elles nous renseignent aussi sur des patterns histologiques des dépôts avec par exemple une atteinte préférentielle des vaisseaux de la sous-muqueuse pour l'amylose à TTR.

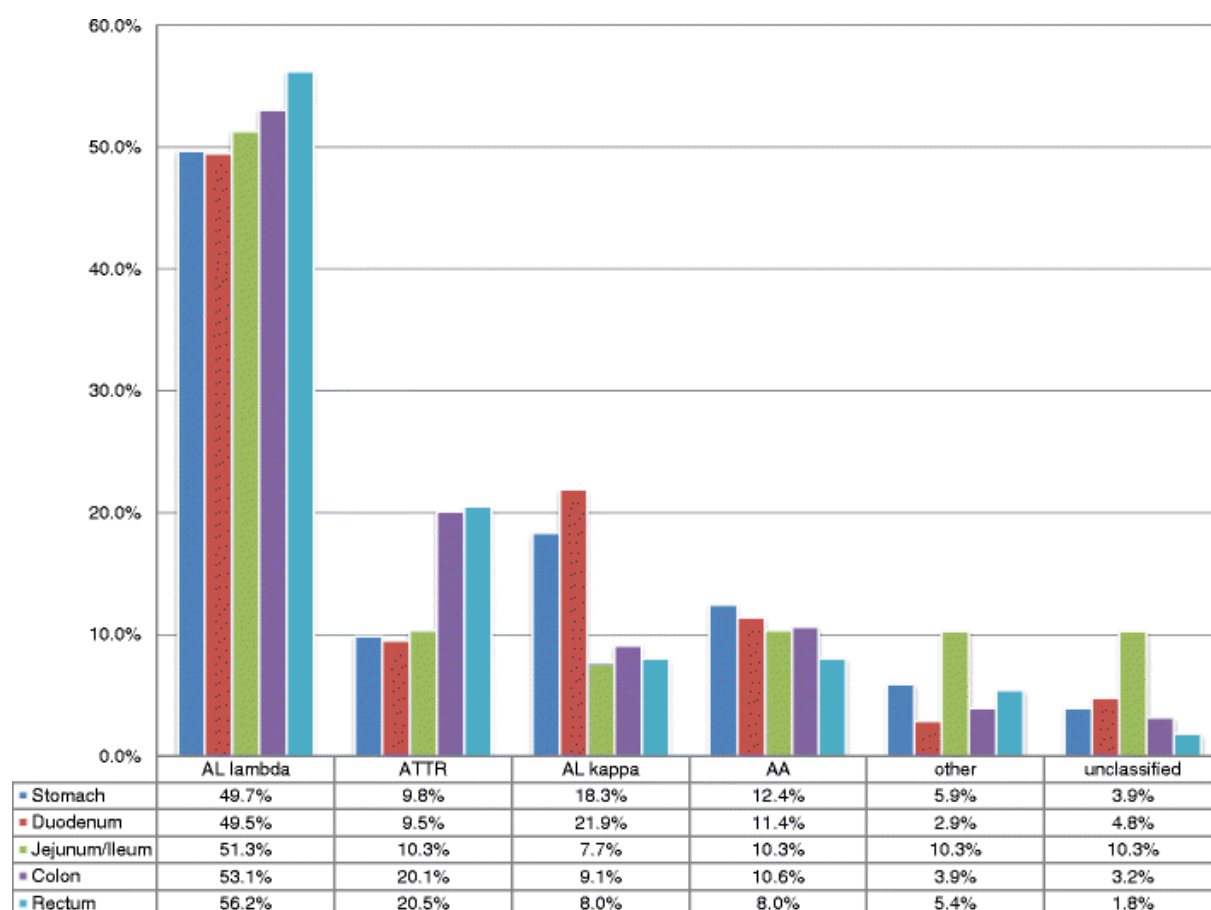


Figure 2 : Prévalences proportionnelles des différents types d'amyloïdes dans les biopsies gastro-intestinales : distribution anatomique du proximal au distal.

(Freudenthaler et al) [15]

4. Amylose à TTR

Historiquement dénommée amylose sénile, elle se rencontre essentiellement chez des personnes âgées de sexe masculin dans sa forme non mutée. En effet, des séries autopsiques ont permis d'identifier ces dépôts, même chez des personnes asymptomatiques.

Cette protéine connue aussi sous le nom de pré-albumine a une production essentiellement hépatique [16]. Sa fonction biologique principale est le transport de la protéine de liaison au rétinol et de la thyroxine. Cette protéine a une capacité naturelle à former des fibres amyloïdes insolubles lorsqu'elle perd sa conformation tétramérique mais qui peut être favorisée par de simples mutations génétiques dans le cadre des amyloses TTR mutées.

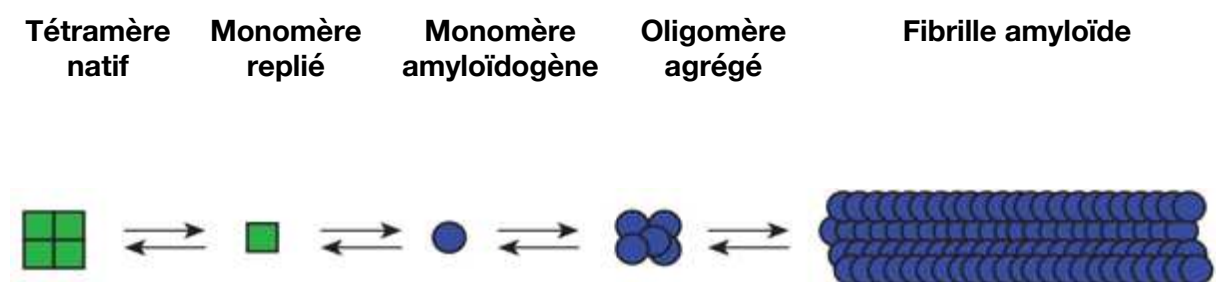


Figure 3 : schématisation de la formation des fibrilles de TTR à partir des tétramères.

La principale complication en termes de morbi-mortalité sont les troubles du rythme cardiaque [3]. Le pronostic en absence de traitement reste sombre avec des survies inférieures à un an pour certains patients [17].

Ces dépôts cardiaques sont caractérisables par la scintigraphie au technétium dont la spécificité et la sensibilité semblent bonne pour ce type d'amylose au point d'en faire le diagnostic sous certaines conditions avec le score Perugini [18].

Les dépôts cardiaques sont l'atteinte principale d'un point de vue clinique. Des études récentes montrent une aggravation de la fragilité des patients liées en partie à tous les

troubles extracardiaques induits par les dépôts de l'amylose à TTR [19]. Parmi les dépôts extracardiaques, les plus étudiés concernent le syndrome du canal carpien et les troubles poly-neuropathiques [20] [21]. Cependant certains auteurs rapportent qu'une atteinte de l'oreille interne [22] et du tractus digestif [23] précèderaient les autres atteintes.

Le développement au cours des dernières décennies de thérapies pour traiter les dépôts progresse. Ces traitements sont d'autant plus efficaces qu'ils sont prescrits tôt dans le développement de la maladie.

Les stabilisateurs des tétramères de transthyrétine comme le Tafamidis est actuellement le traitement de première intention. Ce médicament se fixe sur les tétramères et diminue la dissociation des tétramères de transthyrétine [24]. Le Diflunisal par le même mécanisme d'action obtient des résultats comparables [25].

Une autre approche thérapeutique actuellement utilisée et approuvée sont des ARN interférants dont font partie le Patisiran et l'Inotersen. Ces traitements vont interférer avec l'ARNm de la TTR et réduire sa synthèse cytoplasmique [26,27].

Des approches par édition des gènes avec la technologie CRISPR/Cas9 sont également en phase d'étude [26].

5. Diagnostic

Les amyloses malgré une forte suspicion clinique nécessiteront généralement une confirmation histologique à l'exception d'amyloses à TTR sous certaines conditions. Nous pouvons schématiser cela en trois étapes : le prélèvement, la confirmation du caractère amyloïde du dépôt et le typage du dépôt.

5.1 Prélèvements

Le diagnostic peut se réaliser sur un prélèvement de l'organe symptomatique permettant un typage de l'amylose avec une bonne sensibilité et spécificité mais ces prélèvements ne sont pas forcément les plus simples d'un point de vue de la morbi-mortalité notamment quand cela concerne le cœur.

Sur la base du caractère systémique de la majorité des amyloses ont donc été mises au point des techniques moins invasives avec notamment la biopsie de glande salivaire accessoire ou de graisse ombilicale [28].

Les biopsies du tractus digestif sont également une possibilité dont la plus connue est la biopsie de la muqueuse rectale avec une sensibilité d'environ 80 % [29].

Les biopsies des muqueuses duodénales et gastriques sont reconnues équivalentes à la biopsie rectale en termes de sensibilité.

5.2 Détection du dépôt amyloïde

5.2.1 Rouge Congo

Le diagnostic histologique d'un dépôt amyloïde se fait historiquement par la coloration RC et reste la principale méthode pour détecter la structure amyloïde d'un dépôt au CHU de Lille.

Utilisé depuis 1922 [30,31] dans ce but, ce colorant azosulfoné et symétrique se lie sur les fibrilles amyloïdes par des liaisons électrostatiques [32]. Cette liaison est dépedante d'un certain nombre de conditions, notamment le type de solvant, la composition de la solution, ou encore le pH, ce qui rend sa réalisation difficile même en conditions standardisées. Cela se traduit pour le pathologiste à une coloration

rouge communément appelée “rouge brique”. Cette coloration confère également une biréfringence généralement jaune-verte à la lumière polarisée [33] et une fluorescence à la lumière rouge sous le filtre Texas RED [34].

Malgré cette capacité à se déposer sur les fibrilles amyloïdes elle n’en est pas spécifique et elle peut manquer de sensibilité particulièrement pour les dépôts de petite taille [30].

5.2.2 Thioflavine T et S

Utilisable sous une forme cationique (thioflavine T) ou anionique (thioflavine S) ces molécules sont utilisées pour leurs propriétés à se déposer sur les dépôts amyloïdes mais sans en être spécifique. Couplé à un microscope à fluorescence elles ont une interprétation plus aisée que le RC par l’intensité de la fluorescence.

Les dépôts de petite taille sont également plus faciles à repérer par le pathologiste grâce à ces molécules.

5.2.3 Autres colorants

Nous pouvons citer également le Violet Cristal, le Rouge Sirius et le Périodic Acid-Schiff avec la lumière verte. Ces différents colorants ont tous montré des affinités avec des dépôts fibrillaires mais sans jamais être totalement sensible et/ou spécifique.

5.2.4 H-FTAA

Les polythiophènes conjugués luminescents ont été utilisés initialement pour distinguer les dépôts fibrillaires des agrégats de protéines tau dans la maladie d'Alzheimer. Leurs propriétés optiques se modifient en fonction de la structure sur laquelle ils se déposent et notamment avec les dépôts fibrillaires. Ils permettent une

facilité de lecture accrue en comparaison avec le RC notamment dans les dépôts de petite taille. Nous n'avons à ce jour aucune donnée sur leur spécificité envers les fibrilles amyloïdes [35].

5.3 Typage de l'amylose

Le typage de la protéine du dépôt amyloïde permet d'adapter la thérapeutique et de fournir un pronostic. Les pathologistes disposent de différents outils pour caractériser les dépôts amyloïdes.

5.3.1 Immunohistochimie

Comme précédemment décrit, plus de 40 protéines ont été identifiées et parmi ce panel, nous avons trois amyloses principales (AL, TTR et SAA).

Dans notre pratique courante ces trois amyloses sont recherchées de concert. Certaines études estiment l'efficacité du typage par IHC pour plus de 9 amyloses sur 10 [14].

Dans un second temps, ce panel peut être étendu à d'autres amyloses moins fréquentes.

5.3.2 Autres techniques

D'autres techniques comme l'immunofluorescence et la microscopie électronique existent. Ces techniques se servent d'anticorps parfois identiques à ceux de l'IHC et ont une précision accrue sur la localisation du dépôt ainsi que sur la spécificité de la liaison anticorps-épitope.

5.3.3 Spectrométrie de masse

La méthode par immunohistochimie présuppose la connaissance de la protéine pathologique. Néanmoins, il arrive que la protéine en cause ne soit pas reconnue par le panel d'anticorps à disposition. Dans ces cas, une caractérisation moléculaire des dépôts est possible. Dans ces cas nous utilisons la spectrométrie de masse. Cette technique permet, après une dissection du dépôt amyloïde, de déterminer la protéine incriminée dans la formation du dépôt mais apporte également une signature moléculaire confirmant que le dépôt est de nature amyloïde.

Cette technique fragmente toutes les protéines du dépôt. Après une ionisation de ces protéines elles sont séparées en fonction de leur masse et de leur charge. Une analyse par un logiciel permet de déterminer les différents constituants de ces dépôts qui signent la nature amyloïde et la protéine responsable du dépôt.

Les dépôts sont schématiquement un amas de protéines fibrillaires s'agencant selon une certaine architecture. Mais ils peuvent contenir des composants qui semblent être présents de façon universelle dans ces dépôts. Les plus étudiés sont le composant P amyloïde sérique et les protéoglycanes à héparanes sulfate dont un rôle stabilisateur des fibrilles est évoqué. La présence, entre autres, de ces protéines dans les dépôts forment une signature moléculaire pour les dépôts amyloïdes [6].

6. EFEMP1

Dans le cadre de notre étude, nous avons rencontré une nouvelle protéine pouvant donner des dépôts amyloïdes : EGF-containing fibulin-like extracellular matrix protein 1 (EFEMP1) aussi nommé fibuline-3 [36].

À ce jour, nous n'avons pas d'information sur de potentiels effets cliniques liés à ces dépôts d'EFEMP1 non muté. Cependant, la lecture de la littérature scientifique montre un rôle dans la formation des drusens de la dégénérescence liée à l'âge et la dystrophie maculaire en nids d'abeille dite Malattia Leventinese dans laquelle elle présente une mutation [37] [38]. EFEMP1 est une molécule qui suscite un intérêt croissant, compte tenu de son profil très diversifié d'associations physiopathologiques [39].

7. Objectif

Comme précédemment décrit, nous sommes confrontés à un vieillissement populationnel et selon les données épidémiologiques l'amylose TTR est la plus fréquente avec une prédominance masculine chez les patients de plus de 80 ans [40].

La principale complication est cardiaque. Le diagnostic par biopsie cardiaque est un geste pouvant comporter des risques, particulièrement sur un cœur pathologique et chez un patient âgé.

L'errance diagnostique avant les premiers symptômes expose également les patients à des complications cardiaques et neuropathiques dont la prise en charge est spécifique à l'amylose à TTR. Cette prise en charge symptomatique et curative est aujourd'hui bien documentée. Des séries autopsiques montre une atteinte digestive fréquente avec notamment la présence de dépôts dans les vaisseaux de la sous muqueuse [23].

Nous avons souhaité étudier l'intérêt de dépister les amyloses, notamment à TTR, sur pièces opératoires digestives chez des personnes âgées.

Matériel et méthodes

1. Protection des données à caractère personnel

Le projet de recherche a été déclaré à la CNIL via le DPO du CHRU de Lille.

Les données étudiées ont été entièrement pseudo-anonymisées par leur numéro DIAMIC (numéro identifiant chaque cas dans notre logiciel de résultats anatomopathologiques).

2. Sélection des prélèvements

Pour la réalisation de cette étude, nous avons sélectionné l'ensemble des prélèvements d'origine digestive, hors biopsies et cytologies, parvenus au laboratoire d'anatomie et de cytopathologie du CHU de Lille sur une période comprise entre le 1^{er} janvier 2018 et le 31 décembre 2021, chez des patients âgés de 80 ans ou plus. La sélection des prélèvements s'est faite à l'aide du logiciel interne du service, DIAMIC, en utilisant la codification ADICAP. Cette codification française permet de classer, en laboratoire, les actes médicaux et les examens. Elle standardise le classement des examens et simplifie l'analyse des données.

3. Prélèvements non disponibles

Un certain nombre de prélèvement de notre liste ont été exclus en raison de la non-disponibilité du matériel.

Les prélèvements réalisés dans le cadre de relectures ne sont plus physiquement présents dans les archives du service. En effet après réalisation de l'avis de relecture

par un pathologiste du service, les blocs et les lames du pathologiste demandeur lui sont retournés.

Les prélèvements concernant le réseau LYMPHOPATH ont été également exclus par absence de matériel disponible. Ce réseau d'anatomo-cytopathologistes labellisée par l'Inca permet une double lecture pour les prélèvements tumoraux concernant des lymphomes. Certains prélèvements étaient indisponibles par la non mise en réserve des prélèvements. D'autres étaient également utilisés pour d'autres travaux de recherche et donc non disponibles pour notre étude.

4. Critères histologiques des prélèvements

Chaque prélèvement pour être utilisable nécessite un bloc comprenant l'épaisseur de la paroi digestive, de la muqueuse digestive jusqu'à l'adventice. Ceci a été grandement facilité par le fait que les limites des pièces opératoires digestives sont systématiquement prises selon les protocoles internes au service. Néanmoins, de nombreuses pièces opératoires ont été exclues pour différentes raisons. Nous retrouvons des mauvais codages ADICAP. Ces prélèvements ne comportaient pas de structure digestive à analyser. Cette erreur est généralement due à de mauvaises codifications lors de l'enregistrement des prélèvements.

D'autres cas de figures montrent que certains prélèvements ont bien une origine digestive mais sans avoir de paroi digestive analysable, notamment des prélèvements de nodules péritonéaux ou des prélèvements ganglionnaires.

5. Techniques histologiques

5.1 Préparation des prélèvements

Les prélèvements ont été généralement reçus à l'état non fixé. Néanmoins certains ont pu être transmis à notre laboratoire à l'état fixé si la chirurgie était réalisée hors des horaires d'ouverture du laboratoire. Ce dernier cas peut concerner les gestes opératoires réalisés en urgence, la nuit ou lors des week-end.

Les différentes pièces opératoires sont ensuite fixées au formol pendant un minimum de 24h et donc prélevées le lendemain ou surlendemain en fonction de l'avancement de la fixation par le formol.

Lors de cette étape dite de macroscopie sont prélevés les limites digestives des pièces opératoires. La raison du prélèvement des limites est de confirmer microscopiquement l'absence de reliquat tumoral à ce niveau. Cela nous permet dans notre pratique courante de confirmer au clinicien et au chirurgien la résection complète de la tumeur dans le cadre des chirurgies carcinomateuses.

Les limites sont ensuite incluses en paraffine pour former ce qu'on nomme des blocs de paraffine. Ces blocs permettent la réalisation toutes nos techniques de coloration et d'immunohistochimie.

5.2 Rouge Congo

Pour la réalisation des techniques au rouge Congo, nos techniciens ont étalé sur des lames des coupes de 5 et 8 μ m d'épaisseur faites à partir des blocs de paraffine. La coloration est ensuite réalisée sur automate BenchMark Special Stains ; ROCHE® à l'aide du kit de coloration proposé par la même compagnie (Congo Red Staining Kit ; VENTANA ; ROCHE).

L'interprétation de nos RC repose sur une coloration dite rouge brique et d'une biréfringence généralement vert/jaune à la lumière polarisée des dépôts.

Dans les cas d'interprétation difficile ou quand la technique est jugée non optimale, la technique peut être réalisée une deuxième fois.

L'ensemble des lames ont été labélisées par le pathologiste junior puis par une validation lors d'une relecture commune avec le pathologiste sénior. Le pathologiste sénior était en aveugle de l'interprétation du pathologiste junior.

5.3 Techniques d'immunohistochimie

Pour la réalisation des techniques immunohistochimiques, nos techniciens ont étalé sur des lames des coupes de 3 à 4 μm d'épaisseur faites à partir des blocs de paraffine. L'ensemble des techniques ont été réalisées sur des automates BenchMark Ultra® (Ventana Medical Systems, USA).

L'ensemble des anticorps utilisés sont retranscrits dans le tableau 1.

Anticorps	Fabricant / Distributeur	Clone	Dilution	Hôte
ATTR	AMY-KIT Anyled	Poly	1/50	Rabbit
SAA	Dako	MC-1	1/100	Mouse
Lambda	Dako	Poly	1/20000	Rabbit
Kappa	Cell Signaling	D14E12	1/400	Rabbit
EFEMP1	Santa Cruz Biotechnology	Mab3-5	1/500	Mouse

Tableau 1 : Caractéristiques des anticorps utilisés.

L'interprétation de nos anticorps se fait de façon dichotomique par leur présence ou leur absence.

L'intensité de nos marquages varie en fonction des différents anticorps ce qui en rend certains, notamment celui pour la transthyréline, plus difficile à repérer et à interpréter. Dans les cas d'interprétation difficile ou quand la technique est jugée non optimale, la technique peut être réalisée une deuxième fois.

L'ensemble des lames a été labélisé par le pathologiste junior puis par une validation lors d'une relecture commune avec le pathologiste sénior. Le pathologiste sénior était en aveugle de l'interprétation du pathologiste junior.

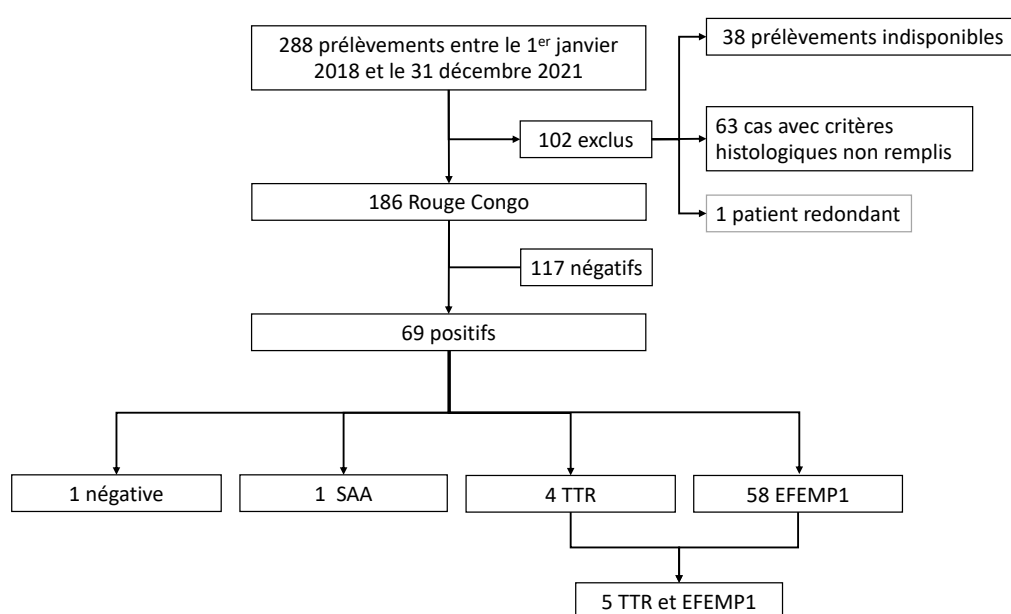
5.4 Spectrométrie de masse

Cette étape a été réalisée dans notre étude pour les cas dont l'immunohistochimie est prise en défaut. Les blocs concernés ont été envoyés à l'Oncopole de Toulouse pour analyse.

Les résultats nous ont été rendus par le Dr COLOMBAT.

Résultats

L'interrogation des bases de données par le logiciel DIAMIC nous a permis de recenser 288 prélèvements via le codage ADICAP.



SAA : sérum amyloïde A ; TTR : transthyrétine

Figure 3 : Diagramme de flux.

Après cette première étape nous avons exclu 102 prélèvements pour 3 raisons principales :

- Absence de matériel : 38 prélèvements dont 13 prélèvements correspondent à des cas réalisés dans le cadre du réseau LYMPHOPATH sur des ganglions ou du matériel digestif et 8 cas correspondent à des relectures pour des pathologistes extérieurs au service du CHU de Lille. Dans ces deux cas de figure, le matériel ayant servi à faire le diagnostic a été retourné au service ou

pathologiste demandeur. 17 cas n'ont pas pu être analysé par absence du matériel en réserve au moment de la réalisation de l'étude.

- Non-satisfaction de nos critères histologiques : 63 prélèvements. La principale raison de toutes ces exclusions correspond à l'impossibilité d'avoir une paroi digestive analysable sur toute son épaisseur.
- Redondance patient : 1 prélèvement.

Sexe	Age	Segment digestif	RC	TTR	1 ^{ère} EFEMP1	2 ^{ème} EFEMP1	Indication	Zone atteinte
F	86	Intestin grêle	Négatif					
F	82	Intestin grêle	Négatif					
F	85	Intestin grêle	Négatif					
H	92	Intestin grêle	Négatif					
F	94	Colon	Positif	Négatif	Positif		Carcinologique	SS + SM + M
F	82	Intestin grêle	Négatif					
F	81	Estomac	Négatif					
F	86	Intestin grêle	Négatif					
F	86	Colon	Négatif			Positif	Carcinologique	M
H	80	Rectum	Positif	Négatif	Positif		Carcinologique	SS + SM + PN
F	93	Colon	Négatif					
H	81	Colon	Négatif					
H	86	Colon	Positif	Positif	Négatif		Carcinologique	SM
H	85	Colon	Négatif					
H	85	Duodénum	Négatif					
F	90	Colon	Négatif					
F	81	Œsophage	Négatif					
H	83	Colon	Négatif					
H	82	Intestin grêle	Négatif					
H	82	Intestin grêle	Négatif					
H	87	Colon	Négatif					
F	95	Colon	Négatif					
F	94	Duodénum	Positif	Positif	Négatif		Carcinologique	SM
F	90	Colon	Positif	Négatif	Positif		Carcinologique	SS + SM
F	89	Intestin grêle	Négatif					
F	88	Intestin grêle	Négatif			Positif	Stomie	SS
F	85	Intestin grêle	Négatif			Positif	Carcinologique	SS
H	87	Rectum	Négatif					

F	91	Colon	Négatif		Positif	Stomie	SS + SM
H	83	Rectum	Négatif				
F	86	Colon	Négatif				
H	90	Rectum	Négatif				
H	85	Intestin grêle	Négatif				
H	91	Colon	Négatif				
H	84	Rectum	Positif	Négatif	Positif	Carcinologique	SS + SM + M+ SP
F	90	Intestin grêle	Négatif				
F	90	Rectum	Positif	Négatif	Positif	Carcinologique	SS + SM
H	85	Colon	Négatif				
F	96	Intestin grêle	Négatif		Positif	Carcinologique	SS
F	89	Intestin grêle	Négatif				
H	87	Intestin grêle	Négatif		Positif	Perforation	SS + SP
H	87	Colon	Positif	Négatif	Positif	Carcinologique	SS
H	87	Colon	Négatif				
F	88	Colon	Positif	Négatif	Positif	Carcinologique	SS + SM + M
H	88	Estomac	Négatif		Positif	Carcinologique	PN +SP
F	81	Intestin grêle	Négatif		Positif	Carcinologique	SS + SP
F	91	Rectum	Positif	Négatif	Positif	Stomie	SS
H	85	Colon	Négatif		Positif	Polypes	SS
H	86	Intestin grêle	Positif	Négatif	Positif	Carcinologique	SS
H	82	Intestin grêle	Négatif				
F	80	Intestin grêle	Positif	Négatif	Négatif	Carcinologique	SS
F	85	Colon	Négatif				
H	89	Estomac	Négatif		Positif	Carcinologique	SP + M + PN
H	86	Colon	Négatif				
H	87	Colon	Négatif		Positif	Carcinologique	SS
F	85	Colon	Positif	Négatif	Positif	Carcinologique	SS + PN +SP
H	87	Colon	Négatif		Positif	Carcinologique	SM
F	85	Colon	Négatif		Positif	Stomie	SS
F	89	Intestin grêle	Négatif		Positif	Carcinologique	SS
H	89	Œsophage	Négatif				
H	85	Estomac	Négatif				
F	85	Estomac	Positif	Négatif	Positif	Caustique	SS
F	89	Colon	Négatif		Positif	Carcinologique	SM
F	84	Intestin grêle	Négatif				
F	88	Colon	Négatif				
F	87	Colon	Négatif				
H	85	Œsophage	Négatif				
F	92	Œsophage	Négatif				
F	84	Colon	Négatif		Positif	Stomie	SS
F	81	Colon	Négatif				
H	90	Colon	Positif	Négatif	Positif	Carcinologique	SS
F	86	Intestin grêle	Négatif		Positif	Carcinologique	SS+ M

F	82	Intestin grêle	Négatif					
H	90	Rectum	Négatif					
H	86	Œsophage	Négatif					
F	87	Intestin grêle	Négatif					
F	87	Intestin grêle	Négatif					
H	96	Colon	Négatif					
H	90	Colon	Négatif					
H	89	Intestin grêle	Négatif		Positif	Diverticulose	SP	
F	87	Colon	Négatif					
F	89	Intestin grêle	Négatif		Positif	Stomie	SS + SP	
H	90	Colon	Négatif					
H	94	Intestin grêle	Négatif					
F	90	Colon	Négatif					
H	87	Intestin grêle	Négatif					
F	86	Colon	Négatif					
H	89	Colon	Négatif					
H	87	Duodénum	Négatif					
H	87	Intestin grêle	Négatif		Positif	Carcinologique	SS	
F	84	Colon	Négatif					
F	101	Colon	Positif	Négatif	Positif	Carcinologique	SS + SM + M + PN	
H	91	Colon	Négatif		Positif	Stomie	SS	
F	87	Colon	Négatif					
H	92	Intestin grêle	Négatif					
F	95	Colon	Négatif					
H	84	Intestin grêle	Positif	Positif	Négatif	Carcinologique	SM	
F	87	Estomac	Négatif					
H	82	Œsophage	Négatif					
H	84	Œsophage	Négatif					
F	95	Intestin grêle	Négatif					
F	90	Colon	Positif	Négatif	Négatif	SAA	Carcinologique	SM + SB
F	88	Estomac	Négatif					
H	84	Rectum	Positif	Négatif	Positif	Carcinologique	SS + SM + M	
F	95	Duodénum	Négatif					
F	101	Intestin grêle	Positif	Négatif	Positif	Non tumoral	SS + SM + PN	
F	82	Colon	Négatif					
F	86	Colon	Négatif					
H	90	Colon	Négatif					
F	89	Colon	Positif	Négatif	Positif	Carcinologique	SS + SM + SP + PA	
H	87	Intestin grêle	Négatif		Positif	Carcinologique	SS	
F	91	Colon	Négatif		Positif	Fistule	SS + SM	
H	86	Colon	Négatif					
H	81	Colon	Positif	Négatif	Positif	Carcinologique	SS	
H	83	Colon	Positif	Positif	Négatif	Stomie	SM	
H	87	Intestin grêle	Négatif					

F	87	Intestin grêle	Positif	Négatif	Positif		Fistule	SS + SM
H	86	Estomac	Négatif					
F	85	Colon	Positif	Négatif	Positif		Ischémie	SS + M
H	87	Intestin grêle	Positif	Négatif	Positif		Ischémie	SS + SM + SP
H	84	Colon	Négatif			Positif	Carcinologique	SS
F	85	Intestin grêle	Négatif					
F	87	Intestin grêle	Positif	Positif	Positif		Ischémie	SS + SM + M
F	86	Rectum	Négatif					
F	91	Colon	Négatif			Positif	Carcinologique	SS + SM + M + PN
H	84	Intestin grêle	Négatif					
F	85	Intestin grêle	Négatif			Positif	Diverticulose	PN
H	94	Estomac	Négatif					
F	88	Intestin grêle	Négatif					
H	86	Intestin grêle	Négatif					
H	88	Intestin grêle	Négatif					
F	88	Colon	Positif	Négatif	Positif		Fistule	SS + M
F	82	Rectum	Négatif					
H	89	Colon	Négatif			Positif	Diverticulose	SS
H	84	Colon	Négatif					
F	82	Intestin grêle	Positif	Négatif	Positif		Carcinologique	SS + SM + SP + PN
F	84	Intestin grêle	Négatif					
H	88	Œsophage	Négatif					
H	85	Colon	Négatif					
H	82	Colon	Négatif					
H	88	Duodénum	Positif	Positif	Positif		Carcinologique	SS + SM
H	83	Œsophage	Négatif					
H	90	Rectum	Négatif					
H	81	Intestin grêle	Négatif					
H	82	Estomac	Négatif					
F	84	Colon	Positif	Négatif	Positif		Carcinologique	SS
F	83	Intestin grêle	Négatif					
F	93	Colon	Positif	Négatif	Positif		Carcinologique	SS + SM + SP
F	86	Intestin grêle	Négatif			Positif	Carcinologique	SS
H	96	Colon	Négatif			Positif	Carcinologique	SS + SM + PN
H	87	Intestin grêle	Négatif					
H	94	Estomac	Négatif					
H	83	Intestin grêle	Négatif					
H	82	Rectum	Négatif					
H	82	Duodénum	Négatif					
H	90	Colon	Négatif					
H	84	Œsophage	Négatif					
F	86	Intestin grêle	Négatif					
F	88	Intestin grêle	Négatif					
H	85	Colon	Positif	Négatif	Positif		Carcinologique	SS + M

H	86	Rectum	Négatif					
F	86	Colon	Négatif					
H	89	Intestin grêle	Négatif					
H	80	Œsophage	Négatif					
F	84	Estomac	Négatif					
H	86	Rectum	Négatif					
F	86	Estomac	Négatif					
F	103	Intestin grêle	Positif	Positif	Positif	Carcinologique	SS + SM + SP	
F	88	Colon	Positif	Positif	Positif	Carcinologique	SS (EFMEP1) + SM	
H	82	Intestin grêle	Négatif					
F	83	Colon	Négatif					
H	85	Œsophage	Négatif					
H	85	Rectum	Négatif					
F	88	Œsophage	Négatif					
F	82	Colon	Négatif					
F	87	Colon	Négatif					
H	85	Intestin grêle	Négatif					
F	83	Intestin grêle	Négatif					
F	85	Intestin grêle	Négatif					
H	86	Colon	Négatif		Positif	Carcinologique	SS	
H	84	Estomac	Négatif					
H	86	Colon	Positif	Positif	Positif	Carcinologique	SM + SP	
F	89	Colon	Positif	Négatif	Positif	Carcinologique	SS + M	
F	82	Colon	Négatif					
F	89	Colon	Négatif		Positif	Carcinologique	SS + M	
F	89	Intestin grêle	Positif	Négatif	Positif	Carcinologique	SS	

RC : Rouge Congo ; TTR : transthyrétine ; F : femme ; H : homme ; SS : sous séreuse ; SM : sous muqueuse ; SP : sous péritonéal ; M : mésentère ; PN : plexus nerveux ; SB : sous basal.

Tableau 2 : ensemble des résultats

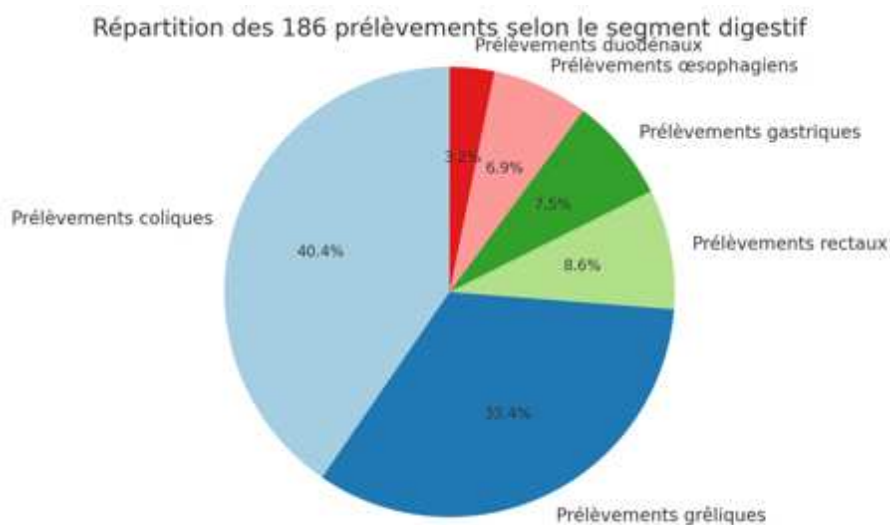
6. Description des patients à l'inclusion

L'analyse populationnelle de nos 186 prélèvements montre que 94 étaient des femmes et 92 étaient des hommes. La moyenne d'âge était de 86,86 ans. L'âge des patients était compris entre 80 et 103 ans.

7. Description des prélèvements à l'inclusion

La répartition des 186 prélèvements selon le segment digestif est la suivante :

- Prélèvements coliques : 75 (40.38%)
- Prélèvements grêliques : 62 (33.33%)
- Prélèvements rectaux : 18 (8.6%)
- Prélèvements gastriques : 14 (7.5%)
- Prélèvements œsophagiens : 13 (6.9%)
- Prélèvements duodénaux : 6 (3.2%)



8. Analyse des techniques histologiques et immunohistochimiques

Nous avons ensuite réalisé 186 RC. Notre première lecture nous a permis d'identifier 38 prélèvements avec des dépôts colorés et biréfringents à la lumière polarisée. Sur ces 38 prélèvements positifs, nous avons réalisé une série d'immunomarquages qui a permis d'identifier 9 dépôts amyloïdes à la transthyrétine et un dépôt amyloïde à la SAA.

Ces premiers résultats nous ont conduit à classer nos dépôts selon deux principaux patterns histologiques.

Un premier pattern correspondant à nos prélèvements positifs à la TTR avec des dépôts principalement dans la paroi des artères de la sous muqueuse. La couleur au RC était vive et de teinte rouge brique, typique des descriptions historiques.

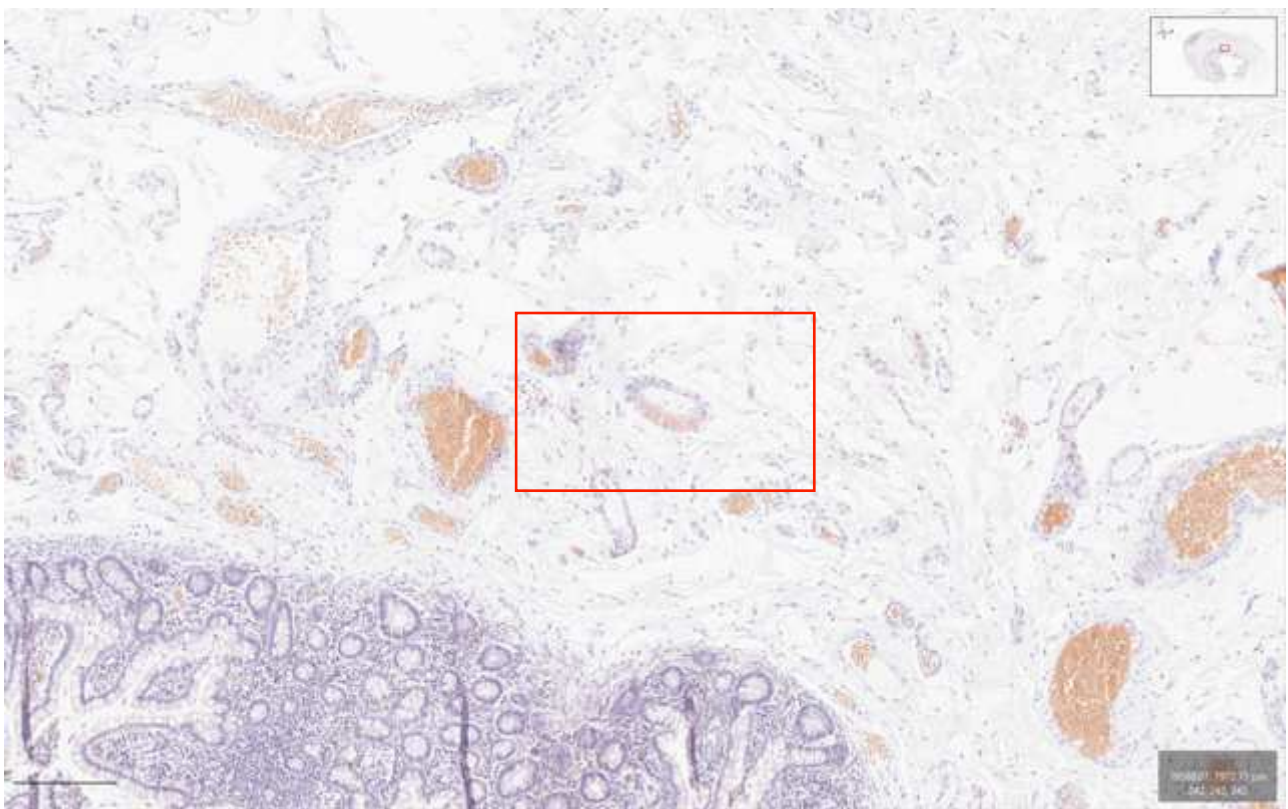


Figure 4 : RC d'une paroi colique à faible grossissement centré sur la sous muqueuse.

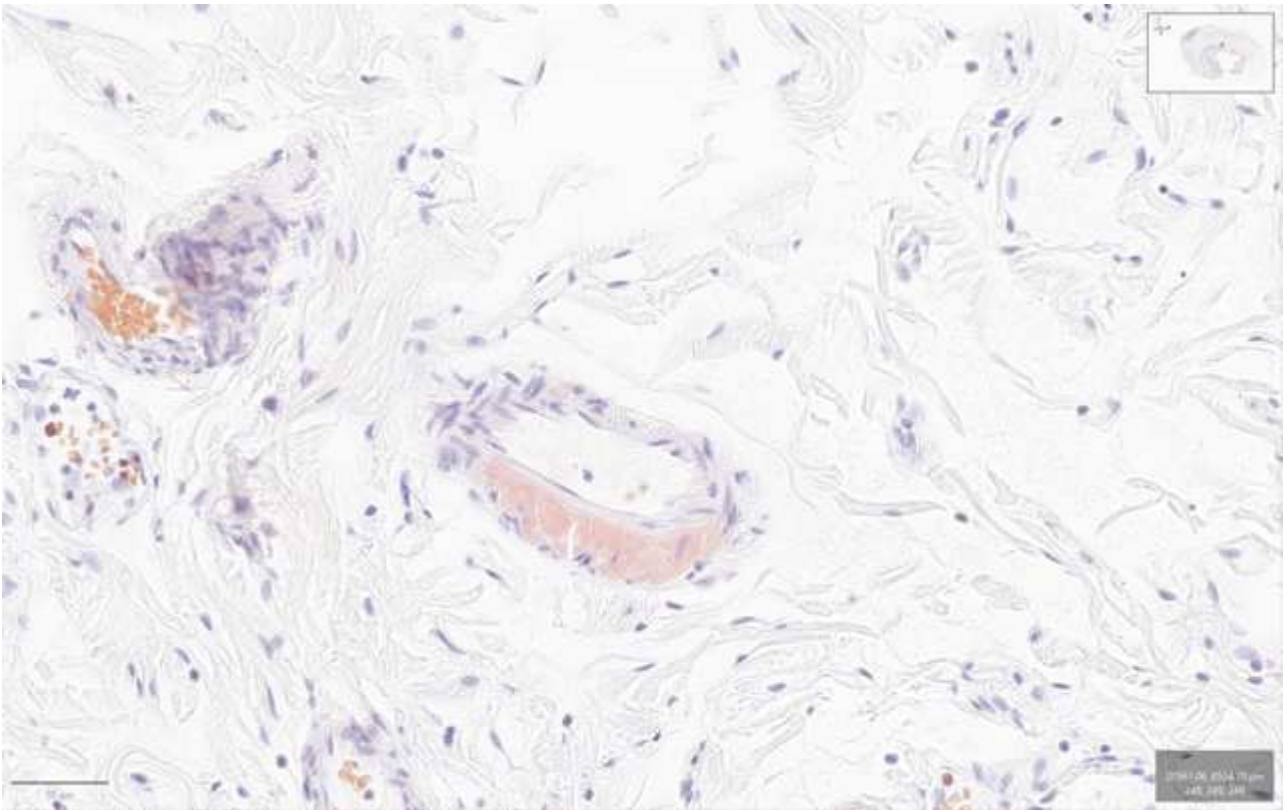


Figure 5 : RC d'une paroi colique à fort grossissement centré sur la sous muqueuse.

Présence d'un dépôt rouge brique dans l'épaisseur de la paroi artérielle.

Un second pattern que nous avons identifié correspond à un RC rouge pâle et parfois plus massif touchant principalement les vaisseaux de la sous séreuse. Un caractère particulier de ces dépôts est sa richesse cellulaire qui dans de notre étude était absente pour les dépôts à TTR.

Ces dépôts présentaient également une biréfringence plus difficile à obtenir à la lumière polarisée.

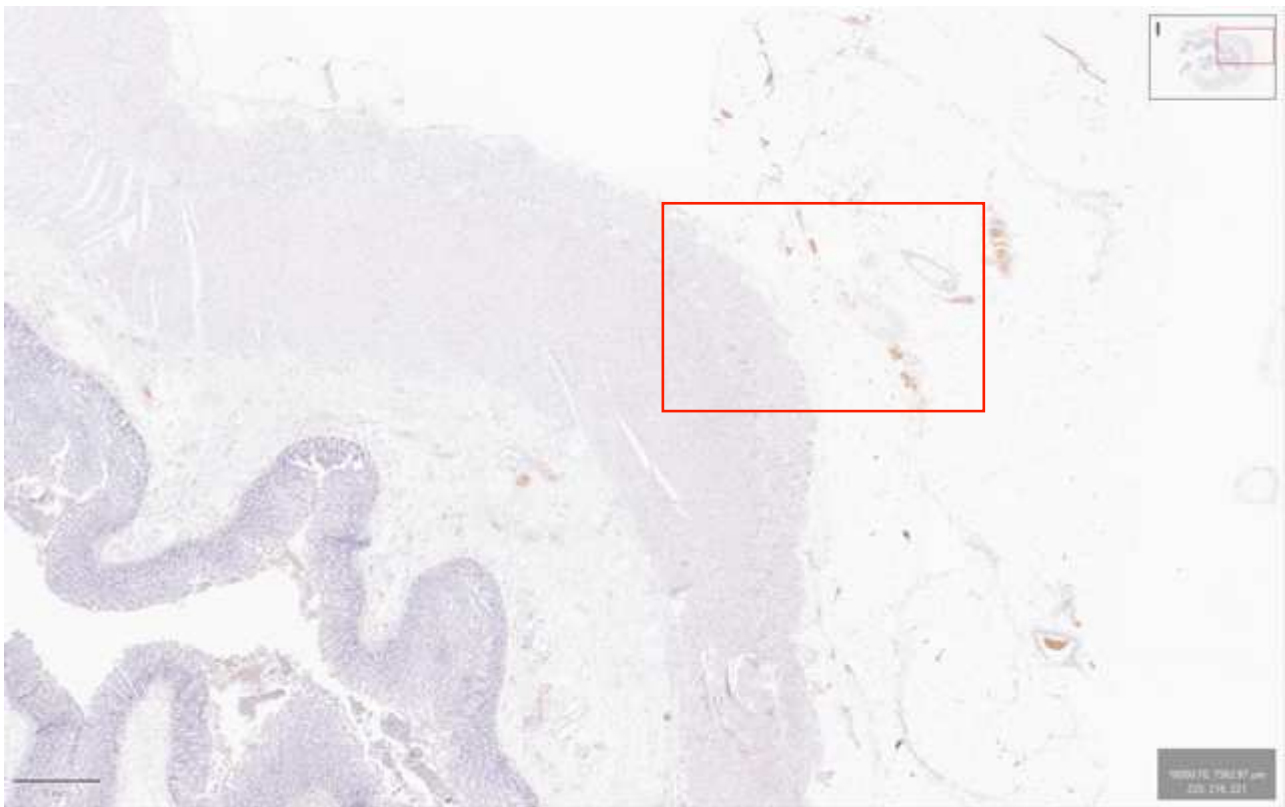


Figure 6 : RC d'une paroi colique à faible grossissement.

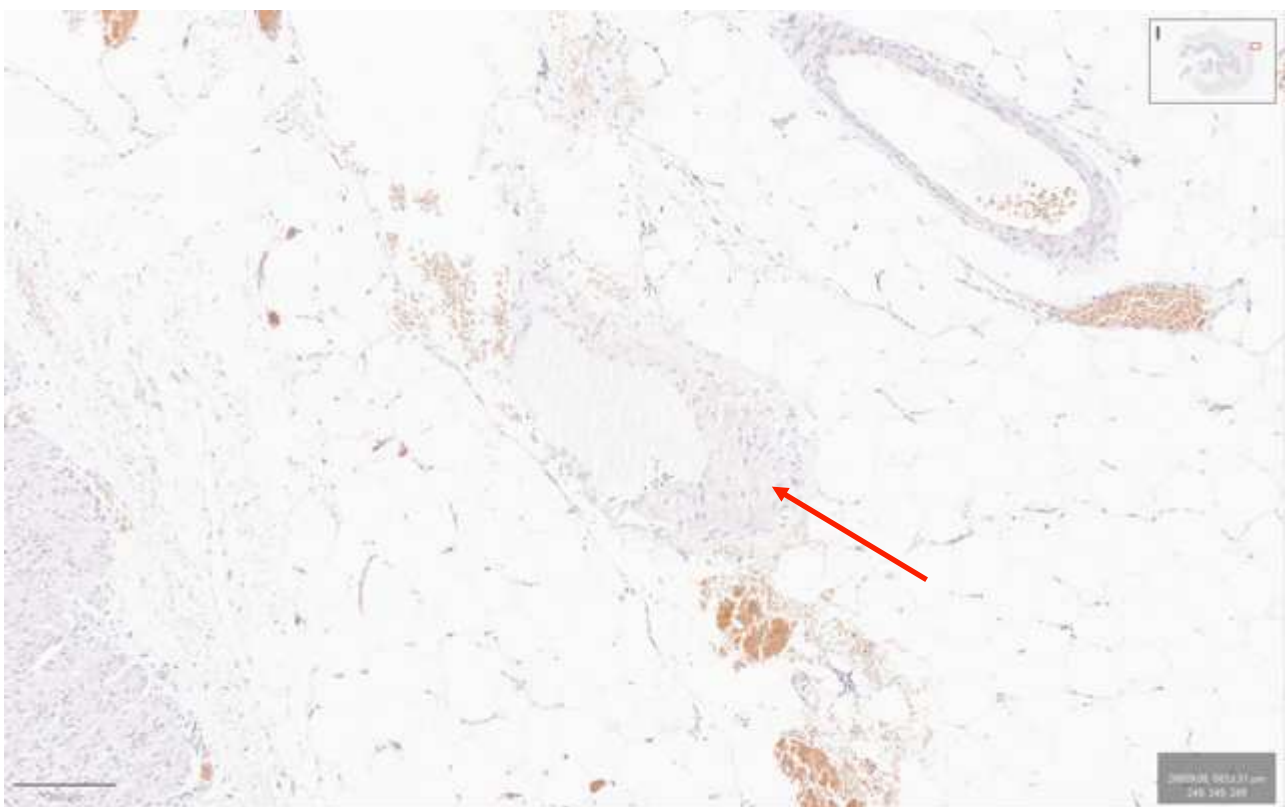


Figure 7 : RC d'une paroi colique à fort grossissement centré sur la sous séreuse.
Présence d'un dépôt de coloration rouge pâle dans l'épaisseur de la paroi vasculaire.

Devant ces 2 patterns nous avons préparé et transmis deux prélèvements pour chacun des patterns au service d'anatomopathologie de l'Oncopole de Toulouse pour la réalisation d'une spectrométrie de masse. Cette analyse a permis de confirmer la nature amyloïde nos deux patterns. Les résultats ont permis l'identification de la protéine de notre deuxième pattern : EFEMP1.

Nous avons ensuite commandé un anticorps spécifique de cette protéine, puis réalisé une mise au point dans le service selon les données de la littérature.

L'ensemble des cas positifs ont été testés, ce qui nous a permis finalement d'obtenir les résultats suivants.

Sur nos 38 prélèvements positifs au RC :

- 27 prélèvements sont uniquement positifs à EFEMP1
- 4 prélèvements positifs uniquement à la TTR
- 5 prélèvements doubles positifs à la TTR et à la EFEMP1.
- 1 prélèvement positif à SAA.
- 1 prélèvement dont la caractérisation par spectrométrie de masse à l'Oncopole de Toulouse est en cours.

Devant le caractère atypique de la coloration au rouge Congo pour ces dépôts de EFEMP1, nous avons réexaminé l'intégralité de nos prélèvements initialement négatifs avec l'expérience acquise. Cela nous a permis d'identifier 31 prélèvements supplémentaires avec une positivité à notre anticorps anti EFEMP1.

Nos résultats finaux sont :

- 63 prélèvements positifs à EFEMP1, ce qui correspond à 33,7% des prélèvements analysables.
- Ce pourcentage augmente jusqu'à 37% si nous ajoutons les autres types d'amyloses retrouvées dans cette étude soit 69 prélèvements positifs.

Un contrôle négatif par IHC EFEMP1 de 40 cas négatifs au RC sélectionnés aléatoirement a été réalisé. Nous retrouvons une absence totale de marquage par EFEMP1 pour ces prélèvements.

9. Analyse populationnelle des EFEMP1

Catégorie	Détails	Nombre de cas	Pourcentage	Moyenne d'âge
Sexe	Femmes	38	60%	88,88 ans
	Hommes	25	40%	86,63 ans
	Total	63	100%	88,08 ans
Segments digestifs atteints	Colon	33	52,38%	-
	Intestin grêle	21	33,33%	-
	Rectum	5	7,93%	-
	Estomac	3	4,76%	-
	Duodénum	1	1,58%	-
Raisons de la chirurgie	Chirurgies carcinologiques	43	68,25%	-
	Chirurgies non carcinologiques	20	31,75%	-

Tableau 3 : Analyse populationnelle de EFEMP1

10. Analyse populationnelle des TTR

Catégorie	Détails	Nombre de cas	Pourcentage	Moyenne d'âge
Sexe	Hommes	5	55,56%	85,4 ans
	Femmes	4	44,44%	93 ans
	Total	9	100%	88,77 ans
Segments digestifs atteints	Colon	4	44,44%	-
	Intestin grêle	3	33,33%	-
	Duodénum	2	22,22%	-
Raisons de la chirurgie	Chirurgies carcinologiques	7	77,78%	-
	Chirurgies non carcinologiques	2	22,22%	-

Tableau 4 : analyse populationnelle de la TTR

Dans le sous-groupe des amyloses uniquement positives à TTR nous avons 3 hommes et 1 femme avec une moyenne d'âge de 86.75 ans. Les segments digestifs atteints sont 2 colons, un duodénum et un intestin grêle.

11. Analyse populationnelle de l'amylose SAA

Le segment digestif analysé est un colon pour une chirurgie carcinologique chez une femme de 90 ans.

12. Caractéristiques histologiques EFEMP1

Parmi les caractéristiques histologiques de l'amylose EFEMP1, nous notons plusieurs patterns pouvant être seuls ou associés :

Caractéristique histologique	Nombre de cas	Pourcentage
Veines sous séreuse	54	79,36%
Veines sous muqueuse	24	38,09%
Mésentériques	13	20,63%
Plexus nerveux	10	15,87%
Sous péritonéaux	9	14,28%

Tableau 4 : distribution EFEMP1 selon les patterns



Figure 8 : Immunohistochimie anti- EFEMP1 d'une paroi colique à faible grossissement centré sur la sous séreuse. Marquage de dépôt dans la paroi de structures veineuses.

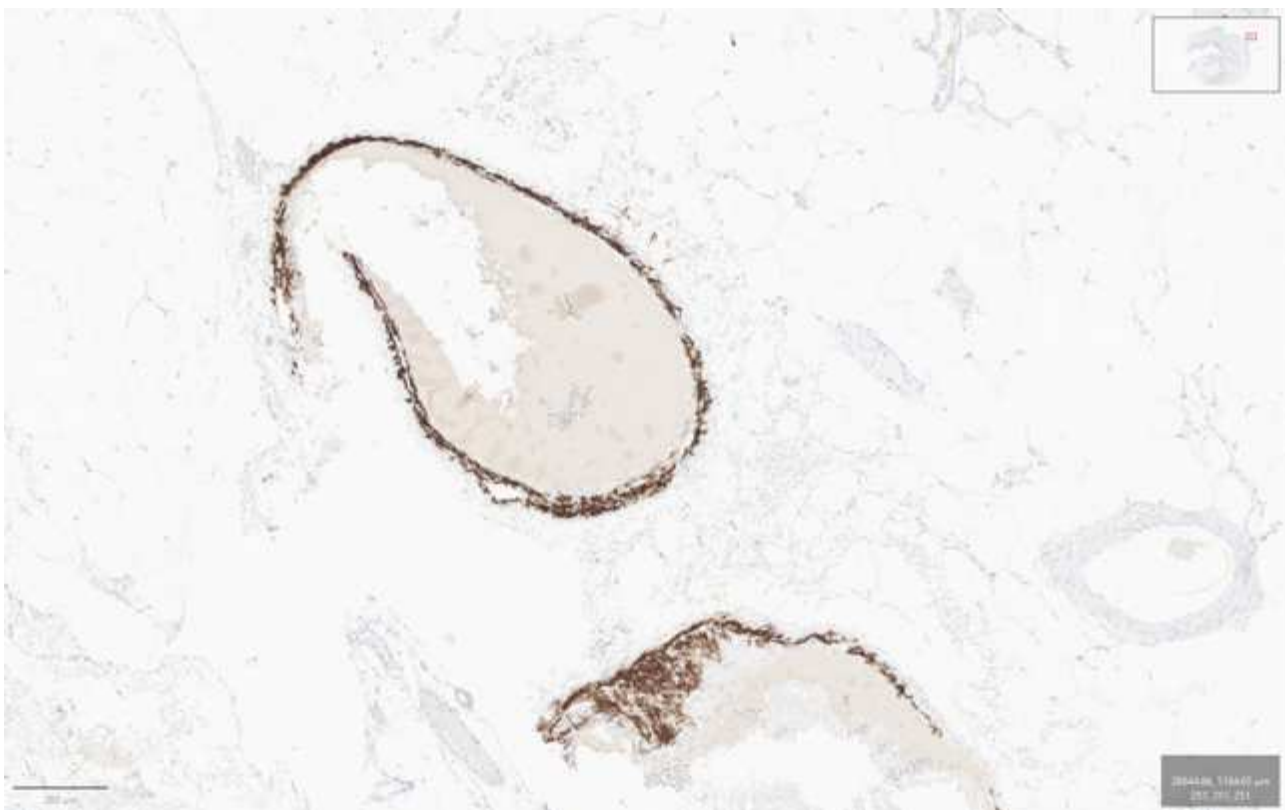


Figure 9 : Immunohistochimie anti-EFEMP1 d'une paroi colique à fort grossissement centré sur la sous séreuse. Marquage de dépôt dans la paroi de structures veineuses.

Notre marquage était également présent dans les vaisseaux de la sous muqueuse.



Figure 10 : Immunohistochimie anti-EFEMP1 d'une paroi colique à fort grossissement centrée sur la sous muqueuse. Marquage de dépôt dans la paroi de structures veineuses.

Ces marquages focaux correspondent à des RC difficiles d'interprétation par la couleur pâle mais également par la difficulté à obtenir une biréfringence jaune/verte à la lumière polarisée.

Nos prélèvements positifs à EFEMP1 peuvent être focaux comme sur la figure 10 mais pouvaient également être des marquages beaucoup plus massifs (figure 11).

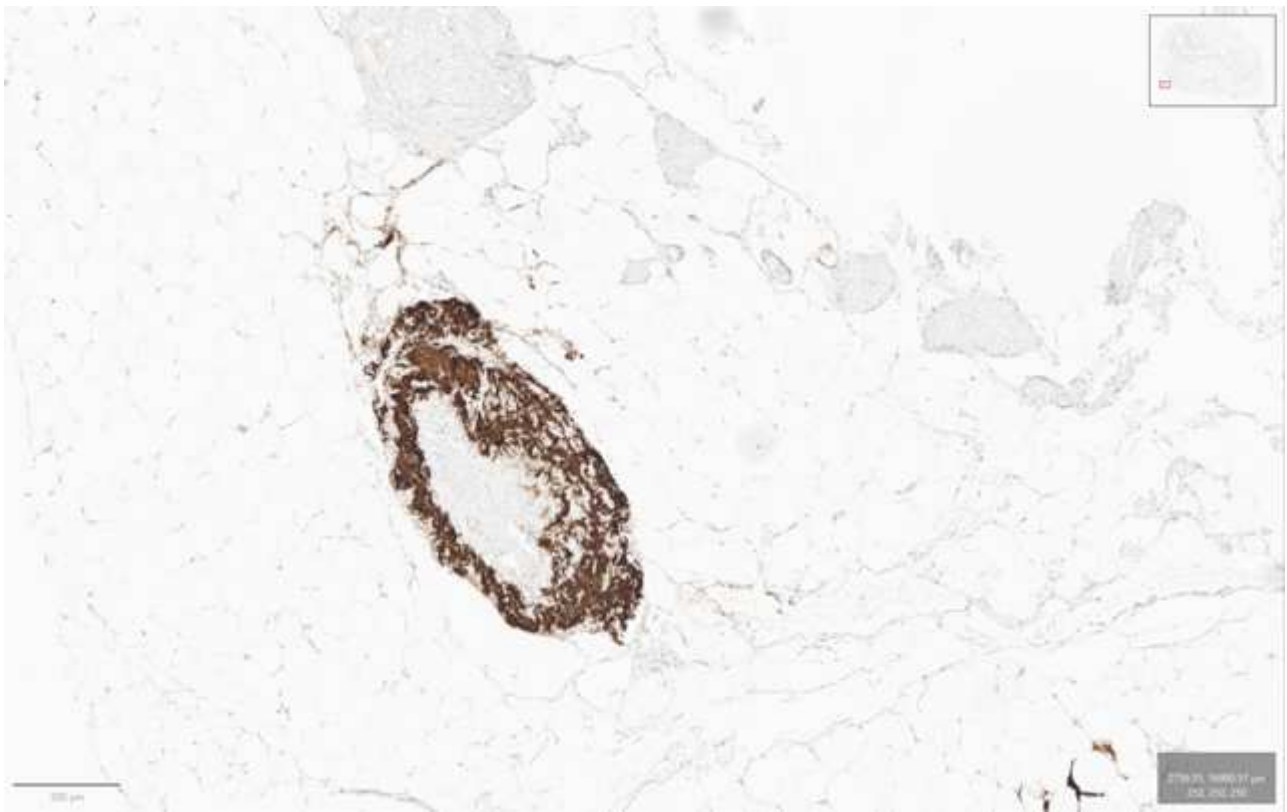


Figure 11 : Immunohistochimie anti-EFEMP1 d'une paroi colique à fort grossissement centré sur la sous séreuse. Marquage d'un dépôt dans la paroi de structures veineuses.



Figure 12 : Immunohistochimie anti-EFEMP1 d'une paroi iléale à faible grossissement centrée sur la sous séreuse. Marquage de dépôt dans la paroi de structures veineuses.



Figure 13 : Immunohistochimie anti-EFEMP1 d'une paroi iléale à fort grossissement centrée sur la sous séreuse. Marquage de dépôt dans la paroi de structures veineuses.

Notre 3^{ème} pattern correspond à des dépôts dans le tissu adipeux du mésentère et soulignant les contours des adipocytes. Sur l'exemple de la figure 14, nous pouvons observer le marquage des dépôts à EFEMP1 excluant les structures artérielles.

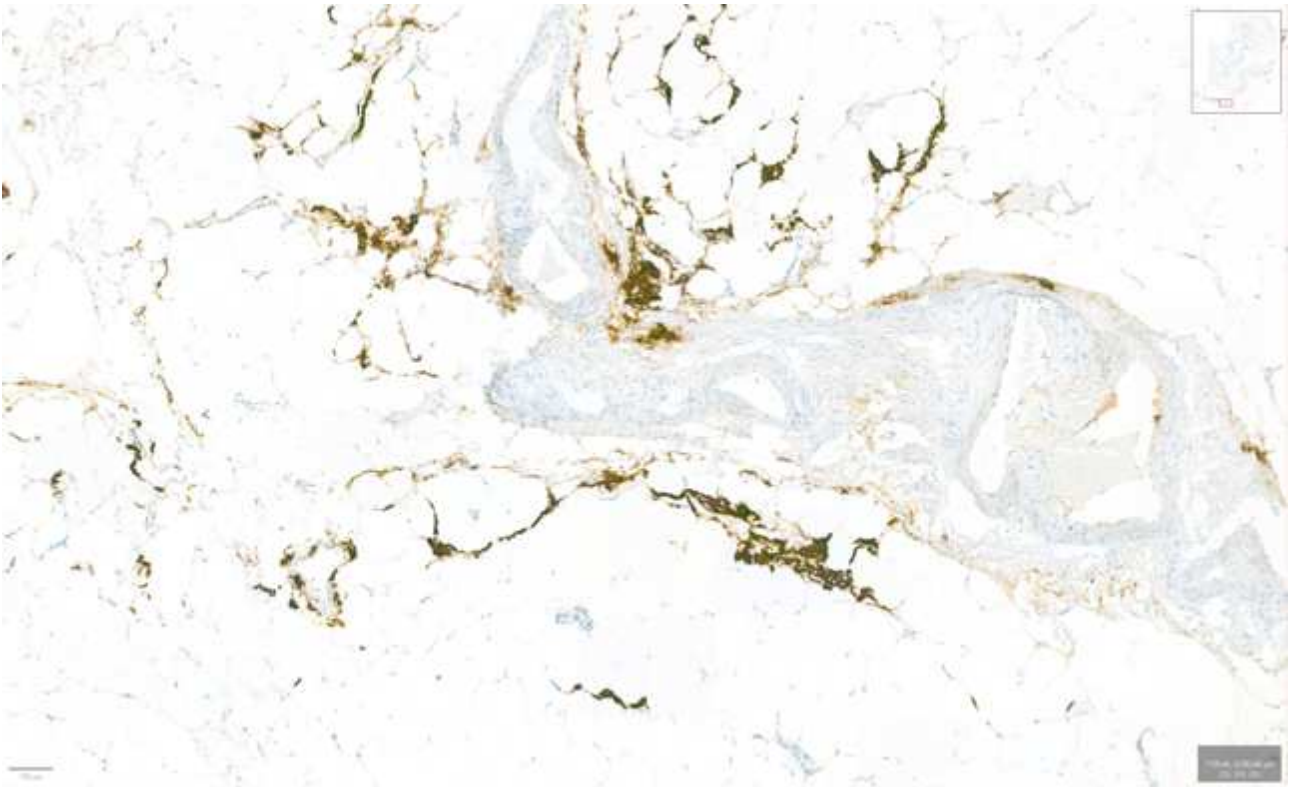


Figure 14 : Immunohistochimie anti-EFEMP1 d'une paroi colique à fort grossissement centrée sur la sous séreuse. Marquage de dépôt péri-adipocytaires dans le mésentère.

Nos dépôts à EFEMP1 présentaient également un marquage des plexus nerveux notamment dans les plexus d'Auerbach.



Figure 15 : Immunohistochimie anti-EFEMP1 d'une paroi colique à fort grossissement centrée sur la musculature. Marquage en regard des plexus d'Auerbach.

Notre dernier pattern identifié est sous péritonéal. Ces dépôts se présentent sous forme d'amas granuleux se positionnant directement sous le péritoine. À l'instar de la plupart de nos patterns nous avons observé des dépôts focaux à massifs.



Figure 16 et 17 : Immunohistochimie anti-EFEMP1 d'une paroi colique à fort grossissement centrée sur le péritoine de deux prélèvements différents. Marquage de dépôts focaux en sous péritonéal.

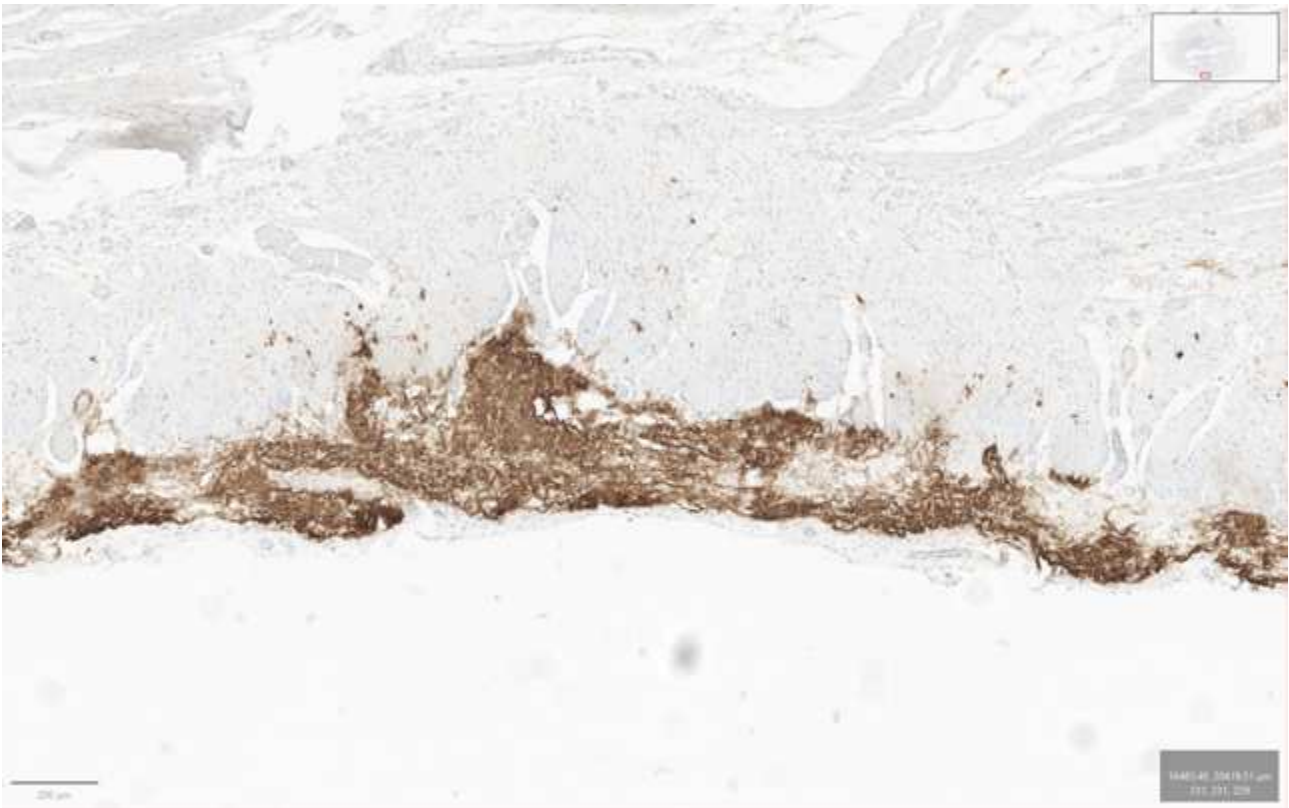


Figure 18 : Immunohistochimie anti-EFEMP1 d'une paroi colique à fort grossissement centrée sur le péritoine. Marquage de dépôts massifs en sous péritonéal.

13.Caractéristiques histologiques TTR

Concernant les amyloses à transthyréline, les nombreux dépôts observés le sont uniquement dans les artères de la sous muqueuse.



Figure 19 : Immunohistochimie anti-transthyréline d'une paroi colique à fort grossissement centré sur la sous muqueuse. Marquage des structures vasculaire. Lame correspondant au RC des figures 4 et 5.

14. Caractéristiques histologiques TTR et EFEMP1

Concernant les prélèvements comportant un double marquage, immunohistochimie marque des dépôts distincts. Le marquage de la TTR était exclusivement en regard des artères localisées dans la sous muqueuse. L'EFEMP1 était principalement localisée sur les parois veineuses de la sous séreuse.

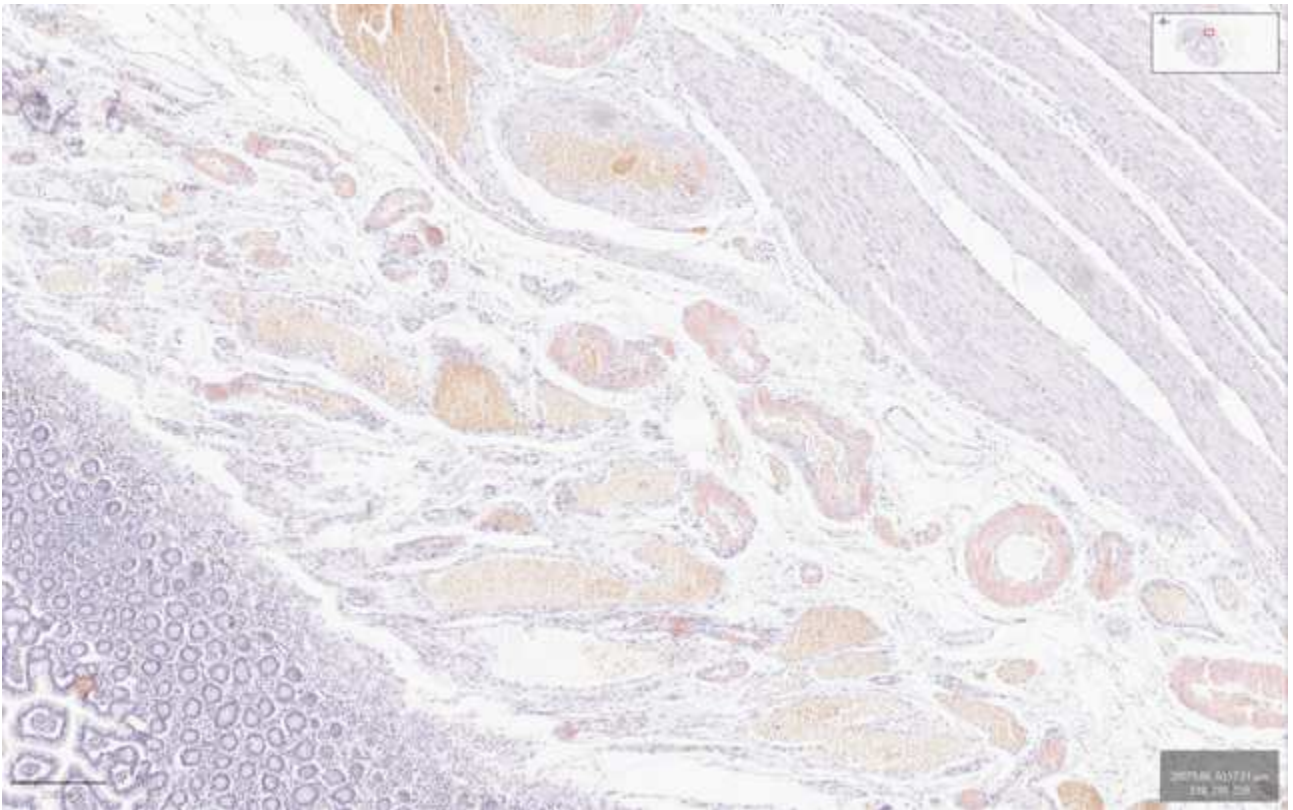


Figure 20 : RC d'une paroi colique à fort grossissement centré sur la sous muqueuse.

Présence d'un dépôt rouge pâle dans l'épaisseur de la paroi vasculaire.

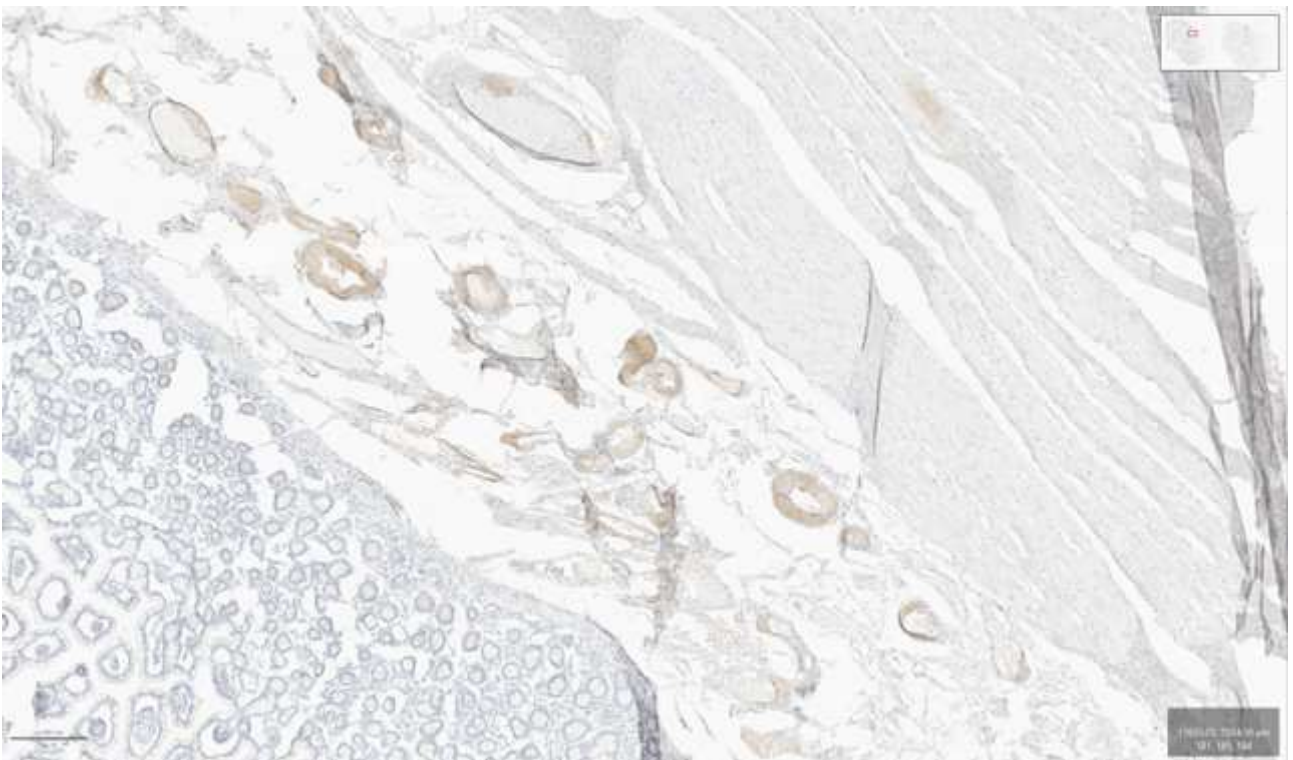


Figure 21 : Immunohistochimie anti-transferrine d'une paroi colique à fort grossissement centrée sur la sous muqueuse. Marquage des structures vasculaires.

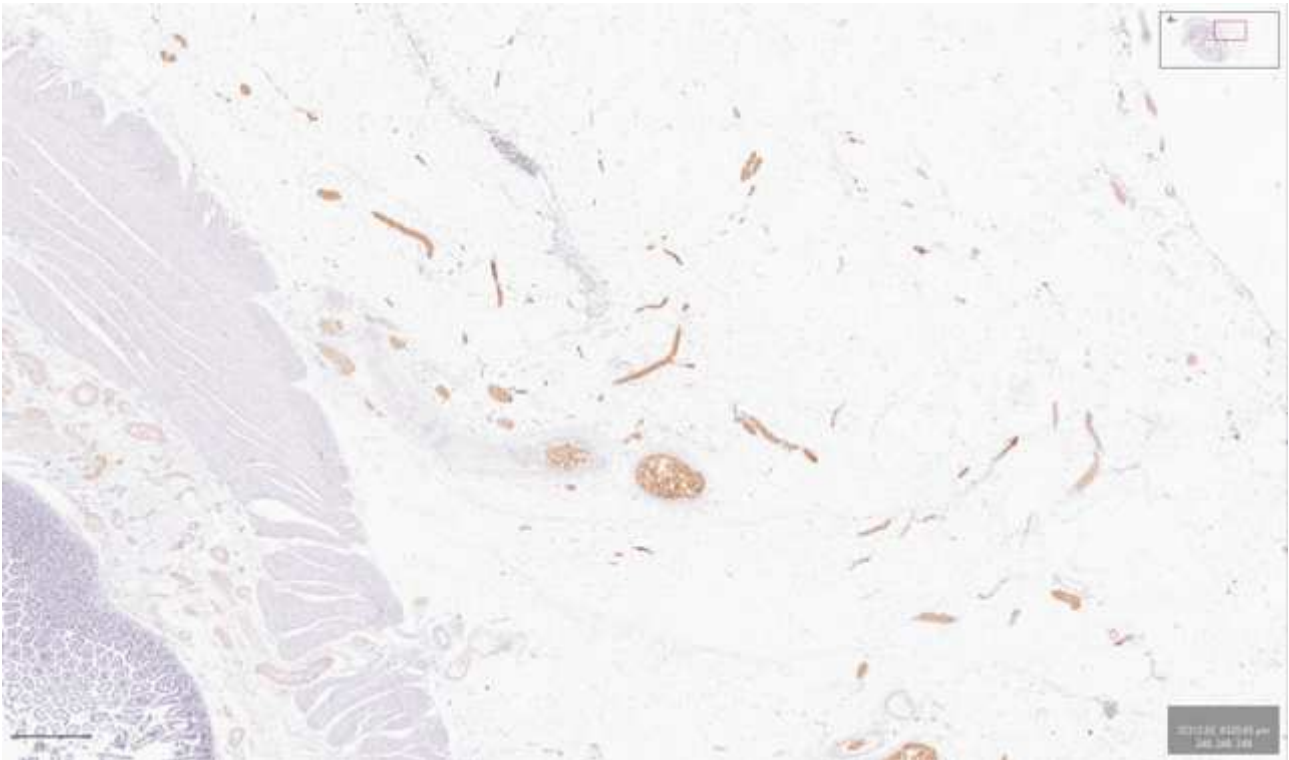


Figure 22 : RC d'une paroi colique à faible grossissement centré sur la sous séreuse.

Présence d'un dépôt rouge pâle dans l'épaisseur des parois vasculaires.

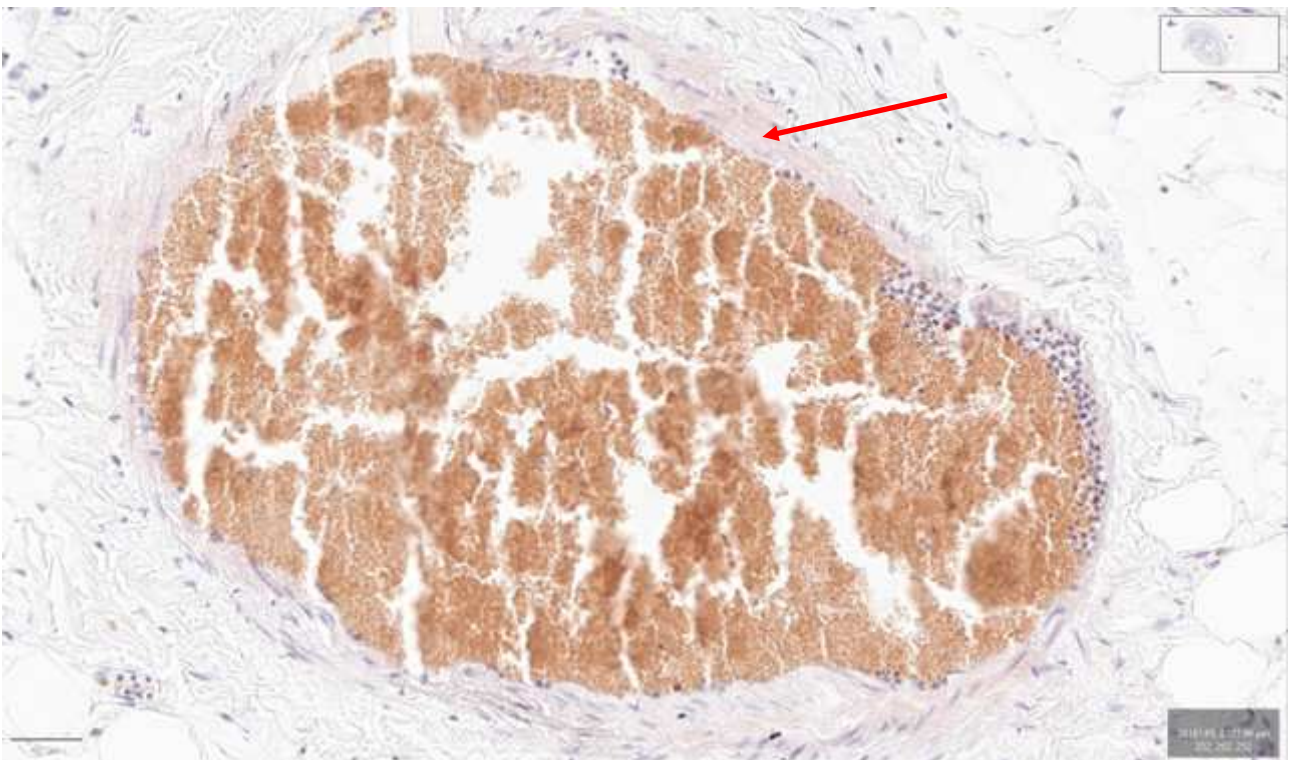


Figure 23 : RC d'une paroi colique à fort grossissement centré sur la sous séreuse.

Présence d'un dépôt rouge pâle dans l'épaisseur de la paroi vasculaire.



Figure 24 : Immunohistochimie anti-EFEMP1 d'une paroi colique à fort grossissement centrée sur la sous séreuse. Marquage de dépôt dans la paroi de structures veineuses.

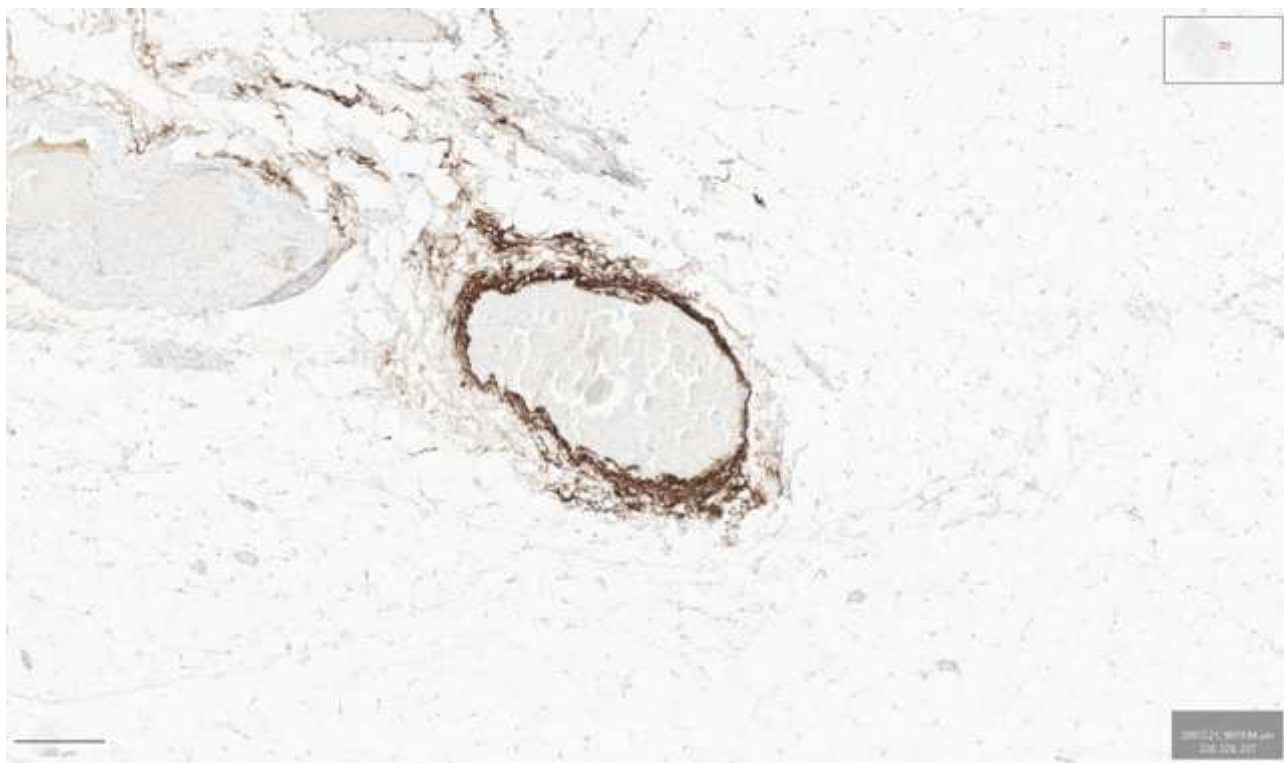


Figure 25 : Immunohistochimie anti-EFEMP1 d'une paroi colique à fort grossissement centrée sur la sous séreuse. Marquage de dépôt dans la paroi de structures veineuses.

15. Caractéristiques histologiques SAA

Pour l'amylose SAA, elle présente un phénotype particulier avec de nombreux dépôts notamment en regard de la muqueuse, en regard de structures vasculaires ainsi qu'au sein des fibres musculaires lisses.

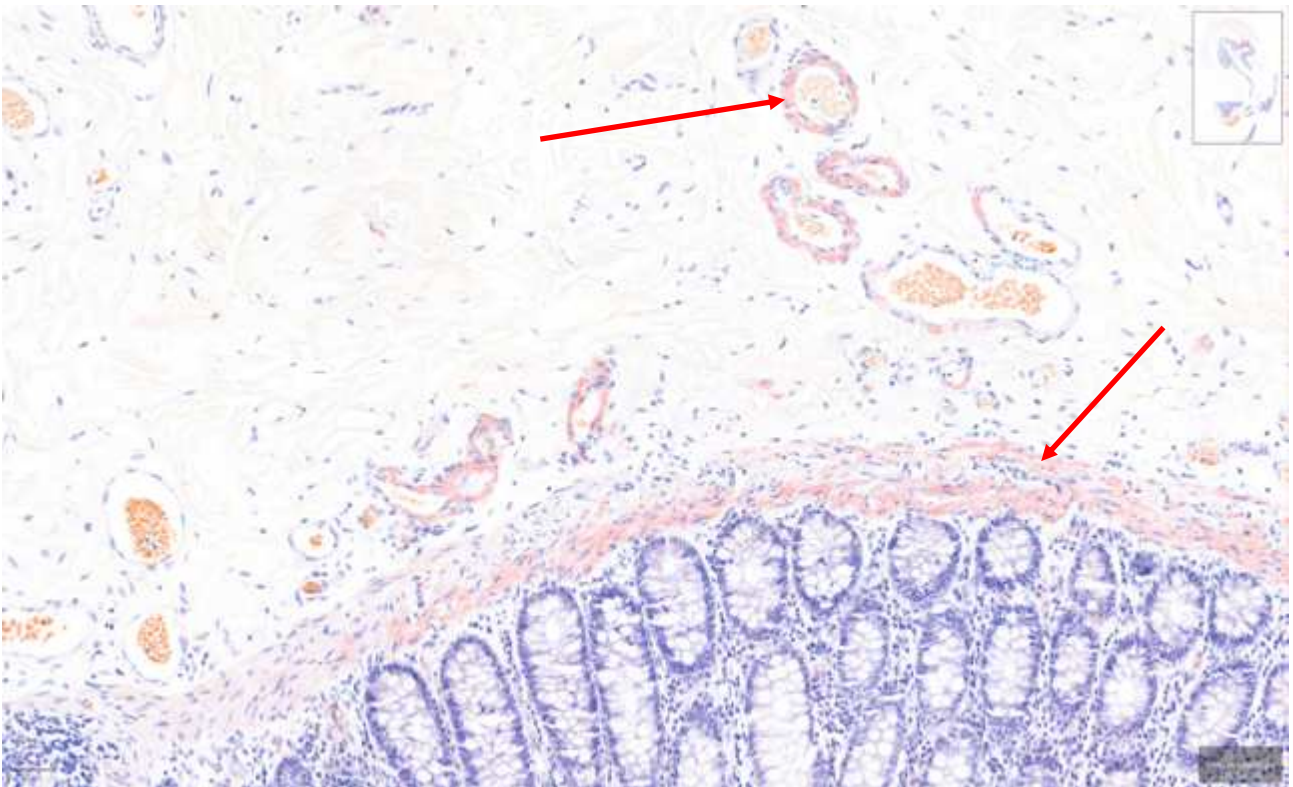


Figure 26 : RC d'une paroi colique à faible grossissement de l'amylose à SAA.

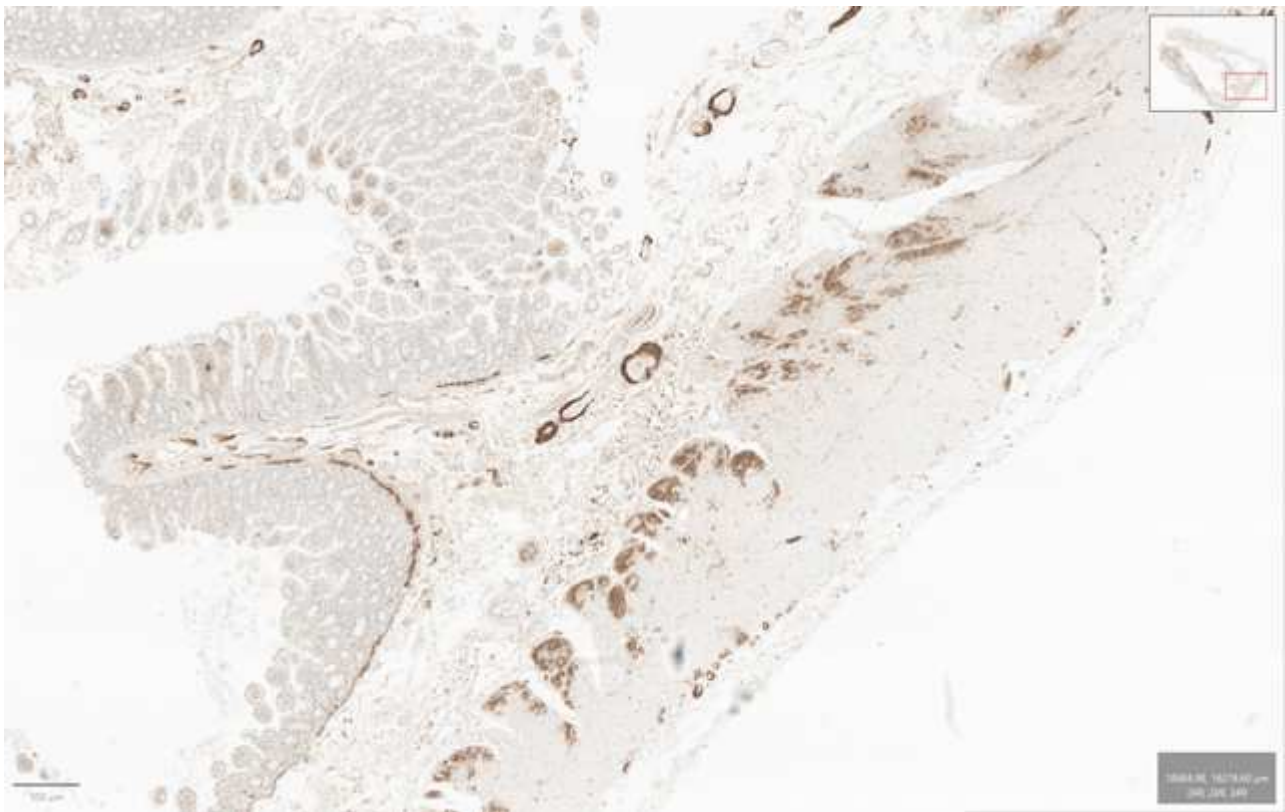


Figure 27 : Immunohistochimie avec un anticorps anti-SAA d'une paroi colique à faible grossissement.

Discussion

Les données de notre étude montrent une prévalence élevée des dépôts amyloïdes chez les personnes de plus de 80 ans. Nous avons montré que 37 % de nos prélèvements analysables étaient atteints par un dépôt amyloïde. Cela représente 69 patients sur 4 ans. Notre deuxième information importante est l'écrasante majorité de dépôts amyloïdes à EFEMP1, protéine reconnue amyloïde qui nous était inconnue au moment du lancement de notre l'étude [41] [36].

Elle est aussi à notre connaissance la première étude descriptive française des dépôts à EFEMP1 et la première chez une population caucasienne.

1. Données épidémiologiques

Notre étude a montré une large prédominance de l'amylose à EFEMP1. La littérature scientifique concernant les données épidémiologiques montre la large prédominance au niveau des amyloses digestives de la TTR et des AL.

Cependant les études précédentes se limitent à l'étude de cas d'amyloses dont le diagnostic est déjà réalisé. Les prélèvements de ces études montrent aussi qu'une part importante des prélèvements concerne uniquement la muqueuse et sous muqueuse ce qui exclut la sous séreuse une analyse de la séreuse et sous séreuse [14,15]. Selon nous, ces deux éléments associés à un RC pris en défaut dans certaines conditions biaisent ces données épidémiologiques.

2. Étude de la positivité à EFEMP1

Nous avons observé une positivité à notre anticorps anti-EFEMP1 sur des prélèvements allant de l'œsophage au rectum. Cette positivité a été principalement constatée dans la paroi

des veines de la sous séreuse et dans une moindre mesure dans la paroi des veines de la sous muqueuse. D'autres patterns plus atypiques comme l'atteinte de plexus nerveux, en sous péritonéal et du mésentère sont observés.

Actuellement, nous suspectons que ces différents patterns forment un continuum lésionnel appartenant à l'amylose à EFEMP1.

Une étude récente de Ichimata (2024) retrouve les mêmes types de patterns que dans notre étude. Cette étude se base sur une analyse rétrospective de cas d'autopsie et cherche à relier des symptômes digestifs à ces dépôts amyloïdes sans obtenir de résultat significatif. Néanmoins, Ichimata et al proposent d'utiliser des prélèvements d'origine chirurgicale comme dans notre étude pour approfondir la relation entre symptômes digestifs et dépôts d'EFEMP1 [42].

Nous notons aussi l'absence d'atteinte artérielle de cette amylose ce qui est en accord avec les précédentes études sur EFEMP1 [36] Comme chez Ichimata (2024) et Tasaki (2019), nos RC étaient difficiles à interpréter. Nous notons une majorité de femmes atteintes comme rapporté dans la littérature [36].

Il est difficile à ce stade de faire la part entre un vieillissement physiologique des parois digestives et un dépôt pathologique. De plus, la majorité de nos cas positifs sont liés à des chirurgies carcinologiques, ce qui pourrait être un élément confondant.

L'atteinte massive de certains prélèvements nous font émettre les hypothèses suivantes pour de possibles symptômes :

- Une atteinte de la motilité digestive par infiltration en regard des plexus nerveux d'Auerbach, par exemple.
- Un risque accru de saignement digestif par infiltration et fragilisation des parois veineuses d'autre part. La littérature rapporte à ce jour un cas d'hémorragie digestive dont l'étiologie serait liée à des dépôts massifs d'EFEMP1 [43]

La mise au point d'un score de gravité de l'amylose et sa corrélation avec les symptômes cliniques de patients pourrait être également un point de départ pour de nouvelles recherches.

Nous avons prouvé le caractère amyloïde par spectrométrie de masse pour un seul prélèvement et qui correspond à des dépôts massifs des veines de la sous séreuse. Il serait intéressant de confirmer le caractère amyloïde des différents patterns par spectrométrie de masse.

Cette première cohorte permettra aussi de faire un retour rétrospectif et prospectif des signes cliniques notamment digestifs de ces patients et de déterminer si nous pouvons attribuer ou non une symptomatologie à cette amylose.

3. Étude de la positivité à TTR

Nos résultats montrent la présence de 9 cas positifs à la TTR en comprenant nos 5 prélèvements doubles positifs. Après consultations des données cliniques, deux prélèvements étaient connus pour une amylose à TTR.

Pour l'interprétation, l'étude du RC sur les dépôts de TTR présente une lecture plus aisée que pour EFEMP1 avec un rouge brique caractéristique ainsi qu'une biréfringence aisée à obtenir à la lumière polarisée. Ces caractéristiques nous permettent d'avoir une très forte suspicion avant la réalisation d'un immuno-marquage. Cependant l'IHC est d'interprétation plus difficile et demande de l'expérience pour ne pas omettre de faux négatifs.

La littérature scientifique rapporte une prédominance masculine pour cette amylose.

Mais nous ne pouvons pas affirmer cela de façon certaine. Nos 9 prélèvements se répartissent entre 5 hommes et 4 femmes.

Cependant dans notre sous-groupe des amyloses avec une positivité uniquement à la TTR nous retrouvons une majorité d'hommes plus franche avec 4 hommes pour 1 femme. Ces résultats restent difficiles à interpréter devant le faible effectif.

Notre étude est sur une population théoriquement plus à risque de développer une amylose à TTR mais nous ne retrouvons que peu de cas positifs. Ce faible effectif pourrait s'expliquer en partie par un biais d'échantillonnage, il est possible que l'amylose à TTR se développe d'une façon focale et segmentaire sur les artères de la sous muqueuse.

De plus, la temporalité de cette atteinte par rapport à une atteinte cardiaque n'est pas claire et n'a pas été étudié dans cette étude.

4. Étude de la positivité à TTR et EFEMP1

Dans notre étude nous avons rencontré des cas doubles positifs. Cette double positivité représente une minorité de nos prélèvements, 5 prélèvements au total. Tasaki et al (2024) retrouvent également des prélèvements positifs à l'EFEMP1 et la TTR.

Les dépôts observés étaient distincts les uns des autres supposant pour nous une possible absence de synergie dans leur formation bien que théoriquement nous pouvons supposer qu'ils partagent des facteurs favorisants communs chez ces patients.

Néanmoins dans le système nerveux central il est rapporté des possibilités de synergies entre des protéinopathies dans des maladies neurodégénératives. [44]

Nous n'avons pas à ce jour de données concernant ce genre de synergie en dehors du système nerveux central.

5. Limites du rouge Congo

Nous avons basé notre détection des dépôts amyloïde sur la coloration RC.

Comme décrit dans l'introduction cette coloration présente de nombreuses limitations. Sa difficulté à l'exécution, sa non-spécificité rend cette coloration parfois difficile dans son interprétation.

Malgré le caractère amyloïde de nos dépôts EFEMP1, la coloration était plus pâle pour ces dépôts. Ce qui limite aussi la détection d'une biréfringence qui est dépendante de la coloration par le RC.

Cela pourrait s'expliquer par une affinité réduite entre les fibrilles de EFEMP1 et le RC.

De plus le caractère très cellulaire des dépôts nous fait également supposer que les dépôts pourraient être en partie intracellulaire et donc rendant la coloration RC plus difficile.

La littérature souligne que le RC est insuffisant pour diagnostiquer ces dépôts et que d'autres techniques plus sensibles doivent être utilisés, notamment les colorants ayant une fluorescence comme les thioflavines S et T [41] .

6. Évolution du diagnostic des amyloses

Le diagnostic des amyloses repose principalement sur la démonstration de dépôts amyloïdes sur une biopsie. Avec le développement de traitement efficace la fiabilité et la sensibilité du dépistage mérite d'être la plus élevée possible.

Nos études montre les difficultés de l'étude de notre RC dans le cadre des EFEMP1, la moitié de nos prélèvements positifs l'ont été alors que la première lecture les a interprétés comme négatifs.

Actuellement le développement de nouveaux protocoles pour détecter les dépôts amyloïdes semblent plus que jamais nécessaire.

Mais cela doit aussi s'accompagner d'une meilleure compréhension des modèles d'amyloses et également de la nosologie des amyloses.

Certains types d'amyloses semblent ethniques comme l'amylose associée à la protéine Leukocyte Cell-Derived Chemotaxin 2 (ALECT2) particulièrement présente au Moyen-Orient et état unis [45] alors que d'autres amyloses semblent plus « universelles » comme l'amylose AL, TTR et notre amylose à EFEMP1 si les études avenir le confirme.

Les amyloses sont également un groupe de maladie dont l'incidence augmente sensiblement ces dernières années en partie lié au vieillissement des populations mondiales mais également par une amélioration quotidienne du diagnostic de ces maladies.

7. Perspectives

Les amyloses représentent probablement un des nombreux enjeux de santé publique. Notre étude montre qu'il reste encore de nombreuses questions à explorer concernant les maladies à dépôts notamment concernant la TTR et EFEMP1.

Nous pensons que cette série de patient peut former la base d'études cliniques futures.

Références

1. Benson MD, Buxbaum JN, Eisenberg DS, Merlini G, Saraiva MJM, Sekijima Y, et al. Amyloid nomenclature 2018: recommendations by the International Society of Amyloidosis (ISA) nomenclature committee. *Amyloid Int J Exp Clin Investig Off J Int Soc Amyloidosis*. déc 2018;25(4):215-9.
2. Benson MD, Buxbaum JN, Eisenberg DS, Merlini G, Saraiva MJ, Sekijima Y, et al. Amyloid nomenclature 2018: recommendations by the International Society of Amyloidosis (ISA) nomenclature committee. *Amyloid*. 2018 Dec;25(4):215–9.
3. Sekijima Y, Nakamura K. Hereditary Transthyretin Amyloidosis. In: Adam MP, Feldman J, Mirzaa GM, Pagon RA, Wallace SE, Bean LJ, et al., éditeurs. *GeneReviews(®)*. Seattle (WA): University of Washington, Seattle; 1993.
4. Misra P, Blancas-Mejia LM, Ramirez-Alvarado M. Mechanistic Insights into the Early Events in the Aggregation of Immunoglobulin Light Chains. *Biochemistry*. 23 juill 2019;58(29):3155-68.
5. Chiti F, Dobson CM. Protein Misfolding, Amyloid Formation, and Human Disease: A Summary of Progress Over the Last Decade. *Annu Rev Biochem*. 20 juin 2017;86:27-68.
6. Buxbaum JN, Dispenzieri A, Eisenberg DS, Fändrich M, Merlini G, Saraiva MJM, et al. Amyloid nomenclature 2022: update, novel proteins, and recommendations by the International Society of Amyloidosis (ISA) Nomenclature Committee. *Amyloid*. 2 oct 2022;29(4):213-9.
7. Reitz C, Brayne C, Mayeux R. Epidemiology of Alzheimer disease. *Nat Rev Neurol*. mars 2011;7(3):137-52.
8. Buxbaum JN, Dispenzieri A, Eisenberg DS, Fändrich M, Merlini G, Saraiva MJM, Sekijima Y, Westermarck P. Amyloid nomenclature 2022: update, novel proteins, and recommendations by the International Society of Amyloidosis (ISA) Nomenclature Committee. *Amyloid*. 2022 Dec;29(4):213-219. doi: 10.1080/13506129.2022.2147636. Epub 2022 Nov 24. PMID: 36420821.
9. Tasaki M, Lavatelli F, Obici L, Obayashi K, Miyamoto T, Merlini G, et al. Age-related amyloidosis outside the brain: A state-of-the-art review. *Ageing Res Rev*. 2021;70:101388.
10. Riba M, Valle J del, Augé E, Vilaplana J, Pelegrí C. From corpora amylacea to wasteosomes: History and perspectives. *Ageing Res Rev*. 2021;72:101484.
11. Terman A, Brunk UT. Lipofuscin: mechanisms of formation and increase with age. *APMIS Acta Pathol Microbiol Immunol Scand*. févr 1998;106(2):265-76.

12. Augé E, Bechmann I, Llor N, Vilaplana J, Krueger M, Pelegrí C. Corpora amylacea in human hippocampal brain tissue are intracellular bodies that exhibit a homogeneous distribution of neo-epitopes. *Sci Rep*. 14 févr 2019;9(1):2063.
13. Suzuki A, Yokoo H, Kakita A, Takahashi H, Harigaya Y, Ikota H, et al. Phagocytized corpora amylacea as a histological hallmark of astrocytic injury in neuromyelitis optica. *Neuropathology*. 2012;32(6):587-94.
14. Abe R, Katoh N, Takahashi Y, Takasone K, Yoshinaga T, Yazaki M, et al. Distribution of amyloidosis subtypes based on tissue biopsy site - Consecutive analysis of 729 patients at a single amyloidosis center in Japan. *Pathol Int*. janv 2021;71(1):70-9.
15. Freudenthaler S, Hegenbart U, Schönland S, Behrens HM, Krüger S, Röcken C. Amyloid in biopsies of the gastrointestinal tract-a retrospective observational study on 542 patients. *Virchows Arch Int J Pathol*. mai 2016;468(5):569-77.
16. Bezerra F, Saraiva MJ, Almeida MR. Modulation of the Mechanisms Driving Transthyretin Amyloidosis. *Front Mol Neurosci*. 2020;13:592644.
17. Ruberg FL, Berk JL. Transthyretin (TTR) cardiac amyloidosis. *Circulation*. 4 sept 2012;126(10):1286-300.
18. Tahara N, Lairez O, Endo J, Okada A, Ueda M, Ishii T, et al. (99m) Technetium-pyrophosphate scintigraphy: a practical guide for early diagnosis of transthyretin amyloid cardiomyopathy. *ESC Heart Fail*. févr 2022;9(1):251-62.
19. Broussier A. Fragilité et cardiopathie amyloïde [Internet]. 2023. Disponible sur: /document
20. Ruberg FL, Grogan M, Hanna M, Kelly JW, Maurer MS. Transthyretin Amyloid Cardiomyopathy: JACC State-of-the-Art Review. *J Am Coll Cardiol*. 11 juin 2019;73(22):2872-91.
21. Maurer MS, Ruberg FL. Early Diagnosis of Cardiac Amyloidosis by Carpal Tunnel Surgery: Is it All in the Wrist? *J Am Coll Cardiol*. 23 oct 2018;72(17):2051-3.
22. Bartier S, Bodez D, Kharoubi M, Guellich A, Canouï-Poitrine F, Chatelin V, et al. Association between hearing loss and hereditary ATTR amyloidosis. *Amyloid Int J Exp Clin Investig Off J Int Soc Amyloidosis*. déc 2019;26(4):234-42.
23. Ueda M, Horibata Y, Shono M, Misumi Y, Oshima T, Su Y, et al. Clinicopathological features of senile systemic amyloidosis: an ante- and post-mortem study. *Mod Pathol*. 1 déc 2011;24(12):1533-44.
24. Coelho T, Maia LF, Silva AM da, Cruz MW, Planté-Bordeneuve V, Lozeron P, et al. Tafamidis for transthyretin familial amyloid polyneuropathy. *Neurology*. 2012;79(8):785-92.
25. Chao CC, Tzeng SR, Chiang MC, Hsueh HW, Hsieh WJ, Chao YC, et al. Diflunisal versus tafamidis on neuropathy and cardiomyopathy in hereditary transthyretin amyloidosis. *Ann Clin Transl Neurol*. 2 août 2024;

26. Ioannou A, Fontana M, Gillmore JD. RNA Targeting and Gene Editing Strategies for Transthyretin Amyloidosis. *BioDrugs Clin Immunother Biopharm Gene Ther.* mars 2023;37(2):127-42.
27. Ioannou A, Fontana M, Gillmore JD. Patisiran for the Treatment of Transthyretin-mediated Amyloidosis with Cardiomyopathy. *Heart Int.* 2023;17(1):27-35.
28. Merrill D, Benson MU, John L Berk, Angela Dispenzieri, Thibaud Damy, Julian D Gillmore, Bouke P Hazenberg, Francesca Lavatelli, Maria M Picken, Christoph Röcken, Stefan Schönland, Westermarck P. Tissue biopsy for the diagnosis of amyloidosis: experience from some centres. *Amyloid.* 2022;29(1):8-13.
29. Hachulla E, Grateau G. Diagnostic tools for amyloidosis. *Joint Bone Spine.* 2002;69(6):538-45.
30. Yakupova EI, Bobyleva LG, Vikhlyantsev IM, Bobylev AG. Congo Red and amyloids: history and relationship. *Biosci Rep.* 31 janv 2019;39(1):BSR20181415.
31. Howie AJ. Origins of a pervasive, erroneous idea: The « green birefringence » of Congo red-stained amyloid. *Int J Exp Pathol.* août 2019;100(4):208-21.
32. 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.* 18 mai 2020;59(21):8104-7.
33. Clement CG, Truong LD. An evaluation of Congo red fluorescence for the diagnosis of amyloidosis. *Hum Pathol.* août 2014;45(8):1766-72.
34. Shehabeldin A, Hussey C, Aggad R, Truong L. Increased Diagnostic Specificity of Congo Red Stain for Amyloid: The Potential Role of Texas Red-Filtered Fluorescence Microscopy. *Arch Pathol Lab Med.* 1 août 2023;147(8):907-15.
35. Sjölander D, Röcken C, Westermarck P, Westermarck 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.* juin 2016;23(2):98-108.
36. Dao LN, Kurtin PJ, Smyrk TC, Theis JD, Dasari S, Vrana JA, et al. The novel form of amyloidosis derived from EGF-containing fibulin-like extracellular matrix protein 1 (EFEMP1) preferentially affects the lower gastrointestinal tract of elderly females(a). *Histopathology.* févr 2021;78(3):459-63.
37. Marmorstein LY, Munier FL, Arsenijevic Y, Schorderet DF, McLaughlin PJ, Chung D, et al. Aberrant accumulation of EFEMP1 underlies drusen formation in Malattia Leventinese and age-related macular degeneration. *Proc Natl Acad Sci.* 2002;99(20):13067-72.
38. Daniel S, Hulleman JD. Exploring ocular fibulin-3 (EFEMP1): Anatomical, age-related, and species perspectives. *Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis.* août 2024;1870(6):167239.

39. Livingstone I, Uversky VN, Furniss D, Wiberg A. The Pathophysiological Significance of Fibulin-3. *Biomolecules*. 8 sept 2020;10(9).
40. Ueda M. Transthyretin: Its function and amyloid formation. *Neurochem Int*. mai 2022;155:105313.
41. Tasaki M, Ueda M, Hoshii Y, Mizukami M, Matsumoto S, Nakamura M, et al. A novel age-related venous amyloidosis derived from EGF-containing fibulin-like extracellular matrix protein 1. *J Pathol*. avr 2019;247(4):444-55.
42. Ichimata S, Hata Y, Yoshida K, Nishida N. Clinicopathological Appearance of Epidermal Growth-Factor-Containing Fibulin-like Extracellular Matrix Protein 1 Deposition in the Lower Gastrointestinal Tract: An Autopsy-Based Study. *Int J Mol Sci* [Internet]. 2024;25(14). Disponible sur: <https://www.mdpi.com/1422-0067/25/14/7581>
43. Ichimata S, Aikawa A, Sugishita N, Katoh N, Kametani F, Tagawa H, et al. Enterocolic granulomatous phlebitis associated with epidermal growth factor-containing fibulin-like extracellular matrix protein 1 deposition and focal amyloid properties: A case report. *Pathol Int*. mars 2024;74(3):146-53.
44. Walker L, Attems J. Prevalence of Concomitant Pathologies in Parkinson's Disease: Implications for Prognosis, Diagnosis, and Insights into Common Pathogenic Mechanisms. *J Park Dis*. 2024;14(1):35-52.
45. Gibier JB, Gilbertson JA, Perbet R, Leriche W, Truant S, Leteurtre E, et al. Découverte fortuite d'une atteinte hépatique d'amylose à leukocyte chemotactic factor 2. *Ann Pathol*. 2020;40(6):472-7.

AUTEUR : Nom : BENEZECH Prénom : Charles

Date de Soutenance : 16/10/2024

Titre de la Thèse : Étude des amyloses digestives chez des personnes âgées

Thèse - Médecine - Lille 2024

Cadre de classement : Anatomie et Cytologie Pathologiques

DES + FST ou option : Anatomie et Cytologie Pathologiques

Mots-clés : amylose ; transthyrétine ; EFEMP1 ; digestif ; personnes âgées

Résumé :

Contexte : Les amyloses et notamment l'amylose à transthyrétine non mutée, représentent des pathologies affectant particulièrement les personnes âgées. Le développement de nouvelles thérapeutiques offre de vraies chances de guérison pour les patients. Nous avons souhaité étudier la prévalence et le type d'amylose affectant le tube digestif de personnes âgées dans l'objectif d'étudier l'intérêt d'un dépistage sur pièce opératoire digestive.

Matériel et Méthodes : Nous avons conduit une étude rétrospective monocentrique sur l'ensemble de pièces opératoires du tractus digestif adressés à l'institut de pathologie du CHU de Lille pour suspicion d'amylose entre le 1^{er} janvier 2018 et le 31 décembre 2021. Chaque prélèvement a été étudié au Rouge Congo et suivi en cas de positivité d'un typage de l'amylose.

Résultats : Sur 186 prélèvements analysés, nous retrouvons 69 cas positifs d'amylose. 58 présentent un marquage positif à EFEMP1, 5 à la TTR et EFEMP1, 4 à TTR, 1 à SAA et 1 en cours de typage.

Conclusion : Les dépôts amyloïdes digestifs chez les personnes âgées sont fréquents et représentent 37 % de nos prélèvements. Notre étude suggère une prédominance de l'amylose à EFEMP1 chez les personnes âgées. Cette nouvelle amylose dont les caractéristiques restent encore à déterminer est actuellement peu décrite. Cette étude est la première française à notre connaissance à étudier l'intérêt d'un dépistage des amyloses après 80 ans sur pièce opératoire digestive. Elle est également la première à étudier sur une population caucasienne les dépôts de EFEMP1.

Composition du Jury :

Président : Monsieur le Professeur Xavier LEROY

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

Directeur : Monsieur le Docteur Jean-Baptiste GIBIER