



Disponible en ligne sur
 ScienceDirect
 www.sciencedirect.com

Elsevier Masson France

 www.em-consulte.com



Recommandations

Prise en charge des biopsies musculaires et nerveuses. Recommandations formalisées d'experts sous l'égide de la Société française de neuropathologie, de la Société française de myologie et de l'Association française contre les myopathies

Management of muscle and nerve biopsies: Expert guidelines from two French professional societies, Société française de neuropathologie and Société française de myologie and a patient-parent association, Association française contre les myopathies

E. Uro-Coste^{a,*}, C. Fernandez^b, F.-J. Authier^{c,d}, G. Bassez^{c,d}, C. Butori^e, F. Chapon^f,
 M.-B. Delisle^a, O. Dubourg^g, L. Feasson^h, R. Gherardi^{c,d}, C. Lacroixⁱ, A. Laquerriere^j,
 F. Letournel^k, L. Magy^l, T. Maisonobe^g, P. Marcorelles^m, C.-A. Maurageⁿ, P. Mezin^o,
 J.-M. Mussini^p, I. Penisson-Besnier^q, N.-B. Romero^g, N. Streichenberger^r, J.-M. Vallat^l,
 G. Viennet^s, A. Vital^t, T. Voit^g, W. Boucharef^u, D. Figarella-Branger^b

^a Service d'anatomie pathologique et histologie-cytologie, centre de référence des maladies rares neuromusculaires Aquitaine-Grand Sud Ouest, hôpitaux de Toulouse, CHU Rangueil, 1, avenue Jean-Poulhès, TSA 500032, 31059 Toulouse cedex 9, France

^b Service d'anatomie pathologique et de neuropathologie, centre de référence des maladies rares neuromusculaires, hôpital la Timone, CHU de Marseille, Assistance publique des hôpitaux de Marseille, 264, rue Saint-Pierre, 13385 Marseille cedex 05, France

^c Département de pathologie, centre de référence des maladies rares neuromusculaires, CHU Henri-Mondor, Assistance publique des hôpitaux de Paris, 51, avenue du Maréchal-de-Lattre-de-Tassigny, 94000 Créteil, France

^d Inserm U955-E10, interactions cellulaires dans le système neuromusculaire, faculté de médecine de Créteil, université Paris 12, 8, rue du Général-de-Gaulle, 94000 Créteil, France

^e Laboratoire de pathologie clinique et expérimentale, hôpital Louis-Pasteur, CHU de Nice, 30, avenue de la Voie-Romaine, 06002 Nice, France

^f Laboratoire de neuropathologie, centre de compétence des maladies rares neuromusculaires, hôpital Côte-de-Nacre, CHU de Caen, avenue de la Côte-de-Nacre, 14033 Caen cedex 9, France

^g Inserm UMRS 974, CNRS UMR 7215, unité de morphologie neuromusculaire, centre de référence des maladies rares neuromusculaires Paris Est, institut de myologie, CHU Pitié-Salpêtrière, université Paris 6, 47-83, boulevard de l'Hôpital, 75013 Paris, France

^h Unité de myologie, service de physiologie clinique et de l'exercice, centre de référence des maladies rares neuromusculaires, hôpital Bellevue, CHU de Saint-Étienne, 42055 Saint-Étienne cedex 2, France

ⁱ Laboratoire de neuropathologie, centre de référence des neuropathies amyloïdes et autres neuropathies rares, CHU de Bicêtre, Assistance publique des hôpitaux de Paris, 94275 Le Kremlin-Bicêtre, France

^j Laboratoire d'anatomie et de cytologie pathologiques, hôpital Charles-Nicolle, CHU de Rouen, 1, rue Germont, 76031 Rouen cedex, France

^k Département de pathologie cellulaire et tissulaire, laboratoire de neurobiologie et neuropathologie, centre de référence des maladies rares neuromusculaires, CHU d'Angers, 4, rue Larrey, 49933 Angers cedex, France

* Auteur correspondant.

Adresse e-mail : uro-coste.e@chu-toulouse.fr (E. Uro-Coste).

0035-3787/\$ – see front matter

doi:10.1016/j.neurol.2010.03.015

¹ Service de neurologie, centre de référence neuropathies périphériques rares, hôpital Dupuytren, CHU Limoges, 2, avenue Martin-Luther-King, 87042 Limoges cedex, France

^m Service d'anatomie pathologique, pôle de biologie, centre de compétence des maladies rares neuromusculaires, hôpital Morvan, CHU de Brest, 2, avenue Foch, 29609 Brest cedex, France

ⁿ Service d'anatomie pathologique, centre de référence des maladies rares neuromusculaires, hôpital R.-Salengro, CHU de Lille, rue du 8-Mai-1945, 59037 Lille, France

^o Département d'anatomie et de cytologie pathologiques, laboratoire de pathologie cellulaire, centre de référence des maladies rares neuromusculaires, hôpital Albert-Michallon, CHU de Grenoble, boulevard de la Chantourne, BP 217, 38043 Grenoble cedex 9, France

^p Service de médecine interne, centre de référence des maladies rares neuromusculaires, Hôtel-Dieu, CHU de Nantes, place Alexis-Ricordeau, 44093 Nantes cedex, France

^q Département de neurologie, centre de référence des maladies neuromusculaires, CHU d'Angers, 4, rue Larrey, 49933 Angers cedex 9, France

^r Service de pathologie et neuropathologie, centre de biologie et pathologie Est, groupement hospitalier Est, centre de référence des maladies rares neuromusculaires, université Claude-Bernard Lyon I, 59, boulevard Pinel, 69677 Bron, France

^s Service d'anatomie pathologique, hôpital Jean-Minjoz, CHU de Besançon, 3, boulevard Fleming, 25000 Besançon, France

^t Service de pathologie, centre de référence des maladies rares neuromusculaires Aquitaine-Grand Sud Ouest, CHU de Bordeaux, place Amélie-Raba-Léon, 33076 Bordeaux cedex, France

^u Service des actions médicales, paramédicales et psychologiques, Association française contre les myopathies, 1, rue de l'Internationale, BP 59, 91002 Evry cedex, France

IN F O A R T I C L E

Historique de l'article :

Reçu le 6 décembre 2009

Reçu sous la forme révisée le

11 janvier 2010

Accepté le 3 mars 2010

Disponible sur Internet le

10 mai 2010

1. Introduction. Présentation de la méthodologie et du contexte

Ces recommandations sont le résultat du travail d'un groupe d'experts réunis par la Société française de neuropathologie, la Société française de myologie et l'Association française contre les myopathies. Le groupe majoritairement formé par des pathologistes, comprend également des neurologues et des pédiatres ayant une expertise dans la prise en charge et l'analyse des biopsies musculaires et nerveuses. Le comité d'organisation (D. Figarella-Branger aidée de C. Fernandez et W. Boucharef) avait réalisé une enquête préalable auprès de sept centres pratiquant au minimum 250 biopsies musculaires ou nerveuses par an. Un texte et des organigrammes de prise en charge technique d'une biopsie musculaire ou nerveuse synthétisant l'activité de ces sept centres ont servi de base à la discussion plus large du groupe d'experts. Ces experts se sont réunis à trois reprises pour établir un texte de référence pour la prise en charge optimale de ces biopsies afin que le maximum d'informations diagnostiques soit apporté par ce matériel précieux. Une bibliographie consensuelle a servi de base à la discussion (Carpenter et Karpati, 2001 ; Dubowitz, 1985 ; Engel et Franzini-Armstrong, 1994 ; Fernandez et al., 2002 ; Karpati et al., 2001). Outre les problèmes purement techniques et diagnostiques, les experts ont également tenu compte des aspects légaux et éthiques pour la réalisation du geste (information du patient) et pour la conservation des fragments congelés dans des centres de ressources biologiques (information et preuve de la non opposition). Cette initiative s'intègre

dans la dynamique nationale de l'accréditation de centres de référence ou de compétence « maladies rares » sur la pathologie musculaire et nerveuse.

Les propositions de recommandations ont été rediscutées lors d'une réunion de synthèse. Un texte a circulé puis a été modifié pour qu'il puisse correspondre à la pratique de chacun dans la mesure où celle-ci était argumentée auprès des autres experts. Les résultats ont été présentés à la communauté lors d'une communication orale (Deuxièmes journées de recherche clinique en myologie. Marseille, 25-27 mai 2009). Le texte ci-après ne correspond donc pas à un avis unique mais à un consensus d'experts sur le minimum opposable lors de la réalisation d'une biopsie musculaire ou nerveuse. De façon délibérée, les recommandations n'ont pas porté sur les indications des biopsies musculaires et nerveuses mais sur leur prise en charge technique dans les services d'anatomie pathologique ou dans les laboratoires spécialisés en myologie. Les options techniques proposées ne sont pas exhaustives. Elles ont été volontairement réduites aux situations les plus fréquemment rencontrées. Le message essentiel est que le conditionnement initial de la biopsie musculaire doit être parfaitement réalisé, pour permettre dans un second temps la réalisation des études complémentaires les plus pointues si elles s'avèrent utiles. Les indications de ces techniques complémentaires sont discutées le plus souvent lors de réunions de concertation pluridisciplinaires.

Ce minimum requis soulève également le problème de la rentabilité de cet acte d'anatomie pathologique dans la mesure où de nombreuses techniques indispensables ne sont pas à la nomenclature des actes d'anatomie pathologique.

2. Recommandations pour la prise en charge d'une biopsie musculaire

2.1. Prélèvement

2.1.1. Standard

Il est en général préférable de réaliser une biopsie chirurgicale à ciel ouvert plutôt qu'une biopsie à l'aiguille, cette dernière

ramenant souvent trop peu de matériel pour permettre une analyse histopathologique optimale et la mise en banque tissulaire d'un fragment congelé (Fig. 1). La biopsie doit porter sur un territoire présentant une atteinte modérée (éviter les territoires trop atteints). En l'absence d'orientation, les prélèvements au niveau du quadriceps ou du deltoïde doivent être favorisés. Dans les suspicions de fasciites, une biopsie de fascia musculaire est réalisée au même site. Le scanner (ou l'IRM) peut aider pour le choix du muscle. La biopsie peut être réalisée par un médecin (neurologue, pédiatre, pathologiste...) ou un chirurgien qui en a l'expertise en fonction des habitudes de chacun des centres. Le préleveur doit faire signer au patient un document l'informant des éventuels risques de la biopsie.

2.1.2. Options

Il est fortement recommandé de faire signer un consentement éclairé au patient pour la mise en banque (centre

de ressources biologiques) d'un fragment de muscle, lors de l'acte de prélèvement. Les centres de ressource biologiques mettent des prélèvements de tissus ou de liquides humains à la disposition de la recherche clinique, en rapport avec la maladie dont le patient est atteint. Il est préférable de faire signer au patient un consentement spécifique pour d'éventuelles études génétiques, indépendamment de la signature du consentement pour la recherche.

2.2. Conditionnement de la biopsie musculaire

Il est recommandé de conditionner au plus tôt (quelques minutes) les fragments musculaires surtout si des analyses de la chaîne enzymatique mitochondriale doivent être réalisées (cf. infra) et pour cela l'idéal est de conditionner les prélèvements au bloc opératoire (technicien ou autre personnel habilité disponible). À défaut, les fragments

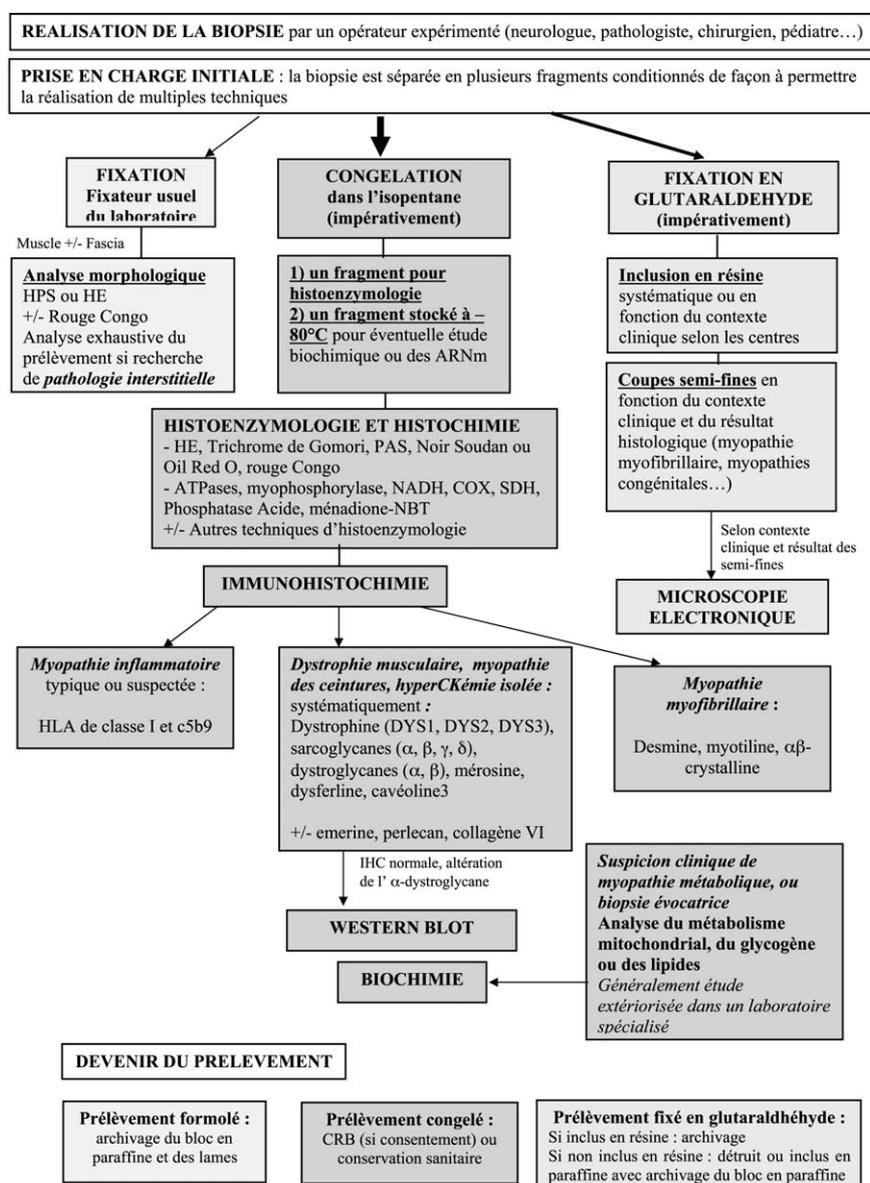


Fig. 1 – Organigramme pour la prise en charge d'une biopsie musculaire.
Technical chart for a muscular biopsy.

musculaires peuvent être placés sur une compresse stérile imbibée de sérum physiologique, puis dans un pot stérile, lui-même transporté dans de la glace, le plus rapidement possible vers le lieu de conditionnement.

2.2.1. Standard

Le conditionnement dépend de la taille des fragments tissulaires prélevés :

- si les fragments sont de taille suffisante, trois conditionnements devront être effectués :
 - une congélation,
 - une fixation au glutaraldéhyde pour une inclusion en résine,
 - une fixation (par le fixateur usuel du laboratoire) pour une inclusion en paraffine ;
- si les fragments sont de taille insuffisante pour réaliser les trois conditionnements, seront privilégiées :
 - la congélation,
 - puis la fixation au glutaraldéhyde, ou au formaldéhyde (ou fixateur usuel) en cas de suspicion de myosite (inclusion en paraffine).

Pour la congélation, il est recommandé de réaliser au minimum deux fragments. Ces fragments seront montés sur un support (en veillant à l'orientation pour permettre la réalisation de coupes transversales) et congelés dans de l'isopentane refroidi par de l'azote liquide (Fig. 1). S'il existe des fragments supplémentaires (même fragmentés ou mal orientés), leur congélation directement dans l'azote liquide permettra de les utiliser pour la biochimie (*western blot*, chaînes respiratoire mitochondriale...) ou la biologie moléculaire (exemple : analyse des ARNm de la dystrophine). Le stockage se fera à -80°C .

2.2.2. Options

Suivant le contexte et le centre, d'autres conditionnements pourront être effectués, à savoir culture de myoblastes ou encore test de contracture, analyse des mitochondries sur prélèvement frais, réalisation d'une biopsie cutanée lors du même temps avec mise en culture des fibroblastes, etc.

2.3. Analyse morphologique sur prélèvement fixé en fixateur usuel et inclus en paraffine

2.3.1. Standard

Une coloration à l'hématéine-éosine (HE) ou à l'hématéine-phloxine-safran (HPS) sera réalisée pour l'analyse morphologique standard. Dans le cadre de la pathologie inflammatoire, l'analyse de la quasi totalité des fragments est recommandée à la recherche de remaniements inflammatoires segmentaires. Le mode d'analyse (coupes sériées, petits fragments...) dépendra de chaque centre, mais une étude exhaustive du matériel doit être effectuée. En fonction des premiers résultats, d'autres colorations seront réalisées (rouge Congo si dépôt suspect d'amylose, par exemple).

2.3.2. Options

Le reste des colorations est en option.

2.4. Histochimie et histoenzymologie

2.4.1. Standard

Tout laboratoire de pathologie musculaire doit pouvoir réaliser l'ensemble des techniques décrites ci-dessous. Cependant en fonction de l'habitude de chacun, ces techniques pourront être réalisées d'emblée en panel systématique, ou secondairement en fonction du contexte clinique ou des premières analyses morphologiques. Quel que soit le choix de la procédure (panel systématique ou « à façon »), il est souvent préférable de couper initialement un grand nombre de lames pour éviter trop de manipulation des fragments (risque accru de décongélation, perte de matériel).

Les techniques d'histochimie et d'histoenzymologie devant être disponibles sont les suivantes :

- histochimie (Tableau 1) : HE, trichrome de Gomori, Periodic Acid Schiff (PAS), Noir Soudan ou Oil Red O, rouge Congo ;
- histoenzymologie (Tableau 2) : ATPases à 3 pH différents (9,4 ; 4,63 ; 4,35) (ATP : adénosine triphosphate), myophosphorylase, NADH (complexe I de la chaîne mitochondriale, NADH-CoQ réductase), COX (complexe IV, cytochrome c oxydase), SDH (complexe II, succinyl-CoQ déshydrogénase), phosphatase acide. Une coloration de ménadione-nitrobleue de tétrazolium (NBT) doit être réalisée s'il existe des inclusions compatibles avec des corps réducteurs (marquage intense même en l'absence de substrat α -glycérophosphate).

2.4.2. Options

Les ATPases à 3 pH différents peuvent être remplacées par la détection en immunohistochimie des chaînes lourdes de myosines (lente, rapide \pm développementale ou néonatale).

D'autres techniques (phosphatase alcaline, estérase non spécifique, phosphofructokinase, myoadénylate désaminase, rouge d'alizarine) pourront être réalisées suivant la pratique de chaque centre et les indications cliniques.

2.5. Immunohistochimie

2.5.1. Standard

Un bilan immunohistochimique (Fig. 1) doit être réalisé dans les trois cas suivants :

- myopathies inflammatoires confirmées morphologiquement ou suspectées cliniquement. Le bilan comprendra systématiquement l'anticorps anti-HLA de classe 1 et anti-complexe d'attaque membranaire C5b-9 ;
- contexte clinique de dystrophie musculaire, de myopathie des ceintures (Guglieri et al., 2008), de dystrophie musculaire congénitale (CMD) (Peat et al., 2008) ou d'hyperCKémie (CK : créatine kinase) isolée : quel que soit le résultat de la biopsie musculaire (informative ou non), le bilan comprendra l'étude du complexe membranaire de la dystrophine (anticorps anti-dystrophine [Dys 1, Dys 2, Dys 3], anti-sarcoglycane [α , β , γ , δ], anticorps anti-dystroglycane [α et β], anticorps anti-mérosine et celle de la dysferline et de la cavéoline 3). En fonction du contexte clinique et si ce premier panel est normal, d'autres anticorps pourront être utilisés : à titre d'exemple, émerine si

Tableau 1 – Colorations histochimiques, spécificité des colorations et analyse des lésions élémentaires.
Histochemistry: specificity and analysis of elementary lesions.

Coloration	Affinités tinctoriales	Analyse des lésions élémentaires
Hématéine-éosine (HE)	Noyaux : bleus Cytoplasme des fibres musculaires : rose foncé Tissu conjonctif : rose clair	Situation des noyaux : périphériques ou centraux Fibres musculaires : nécrose, régénération, atrophie, hypertrophie, segmentations, vacuoles... Tissu conjonctif ou vaisseaux : dépôts, inflammation
Trichrome de Gomori	Mitochondries : rouge vif Cytoplasme des fibres musculaires : vert-bleu Tissu conjonctif : vert	Fibres musculaires Accumulation des mitochondries, agrégats tubulaires, bâtonnets, inclusions (myopathies congénitale ou myofibrillaire) Tissu conjonctif : fibrose (dystrophie musculaire)
PAS (Periodic Acid Schiff)	Glycogène : fuchsia, amylase sensible Polyglucosans : fuchsia, amylase résistant	Accumulation intracellulaire dans les vacuoles ou diffuse (glycogénoses)
Noir Soudan Huile rouge	Lipides : noir pour le noir soudan et rouge pour l'huile rouge	Accumulation intracellulaire primitive (lipidose) ou secondaire (dysfonction mitochondriale)
Rouge Congo	Amylose : rouge cerise à l'examen standard et biréfringence jaune-vert en lumière polarisée	Dépôts amyloïdes extracellulaires ou intracellulaires, voire nucléaires (myosite à inclusions)

tableau compatible avec une dystrophie musculaire d'Emery Dreyfus et tout spécialement, symptomatologie musculaire chez des sujets féminins, perlecan (si tableau de dystrophie musculaire congénitale...), collagène VI (à étudier également sur fibroblastes en culture) ;

- aspect histologique de myopathie myofibrillaire : étude des protéines sarcomériques ou du cytosquelette accumulées ou modifiées dans ces affections (actuellement seuls les anticorps anti-desmine, anti-myotiline et anti- α -B-crystalline ont un réel intérêt diagnostique).

Les listings proposés ne sont pas exhaustifs et évoluent en fonction des avancées de la recherche. En 2009, ils sont la proposition de notre groupe de travail.

Des témoins normaux doivent systématiquement être inclus dans la même manipulation d'immunohistochimie. L'idéal est de placer le fragment de muscle témoin sur la même lame que le muscle du patient.

2.5.2. Options

Tout autre anticorps est optionnel.

Tableau 2 – Techniques histoenzymologiques, description dans le muscle normal, analyse des lésions élémentaires.
Histoenzymology, description in normal muscle and analysis of elementary lesions.

Réaction enzymologique	Description	Analyse des lésions élémentaires
ATPases à 3 pH différents (ATP : adénosine triphosphate)	Identification des différents types de fibres musculaires : I, IIA, IIB, IIC	Anomalie de la répartition (prédominance d'un type de fibre, groupement de fibres de même type) Sélectivité de l'atrophie pour un type histoenzymologique Perte focale de la réactivité (ex. : perte en myosine des myopathies de réanimation)
Myophosphorylase	Phosphorylase musculaire	Déficit des fibres musculaires (maladie de Mc Ardle)
NADH (NADH-CoQ réductase)	Complexe I de la chaîne mitochondriale, permet l'analyse du secteur intermyofibrillaire	Anomalie de l'architecture interne Répartition hétérogène (fibres effacées, lobulées, cores, cibles, fibres annulaires...) Accumulation (agrégats mitochondriaux, tubulaires, certaines inclusions)
Cytochrome C Oxydase	Complexe IV de la chaîne respiratoire mitochondriale	Recherche de fibres négatives (myopathies mitochondriales, déficits secondaires)
SDH (succinyl-CoQ déshydrogénase)	Complexe II de la chaîne respiratoire mitochondriale	Accumulation (en particulier dans les fibres Cox- dans les mitochondriopathies) Perte (agrégats tubulaires)
Phosphatase acide	Lysosomes	Accumulation Au niveau du secteur interstitiel (macrophages, dépôts, maladies de surcharge) Dans des vacuoles autophagiques
Ménadione-NBT (nitro blue de tetrazolium)	Identification des fibres de type II	Visualisation des corps réducteurs avec un marquage intense même en l'absence du substrat (α -glycerophosphate)

2.6. Western blot

2.6.1. Standard

Un western blot doit être réalisé devant toute dystrophie musculaire, myopathie des ceintures, dystrophie musculaire congénitale et hyperCKémie isolée, à la recherche d'une anomalie de la calpaïne si l'ensemble du panel décrit ci-dessus est normal en immunohistochimie.

Un western blot doit être réalisé s'il existe une anomalie de l'expression de l' α -dystroglycane en immunohistochimie si la cause la plus fréquente, une mutation dans le gène *FKRP* (Fukutin-related protein), a été exclue.

2.6.2. Recommandations

Un western blot est fortement recommandé pour confirmer tout déficit d'une protéine du complexe membranaire de la dystrophine observé en immunohistochimie.

2.7. Microscopie électronique

2.7.1. Standard

Le prélèvement fixé dans la glutaraldéhyde doit être systématiquement inclus en résine devant toute suspicion clinique de myopathie myofibrillaire ou de myopathie congénitale et a fortiori si la biopsie musculaire est évocatrice d'une telle pathologie en microscopie optique. Dans ce contexte, des coupes semi-fines devront être réalisées, et s'il existe des altérations évocatrices sur ces coupes préparatoires, l'examen sera complété par des coupes ultrafines et une analyse ultrastructurale.

En l'absence d'inclusion en résine, le prélèvement fixé dans la glutaraldéhyde pourra être secondairement inclus en paraffine ou jeté.

2.7.2. Options

L'ultrastructure est en option et permet d'identifier les amas granuleux ou filamentaires des myopathies myofibrillaire (Claeys et al., 2008) et d'étiqueter certaines myopathies congénitales (par exemple, myopathie à bâtonnets).

On peut éventuellement aussi utiliser cette technique pour rechercher la présence d'inclusions tubulo-réticulaires dans les dermatomyosites, l'épaississement des membranes basales dans les polyarthrites rhumatoïdes et le diabète, etc.

2.8. Biochimie

2.8.1. Standard

Les études biochimiques complémentaires ne sont jamais systématiques. Elles sont indiquées après discussion pluridisciplinaire en prenant en compte à la fois les anomalies observées sur la biopsie musculaire et le contexte clinicobiologique (Burr et al., 2008). Elles concernent l'étude de la chaîne respiratoire mitochondriale, l'étude du métabolisme du glycogène ou encore celle du métabolisme lipidique (Bruno et DiMauro, 2008). Pour la plupart des techniques, et en particulier pour celles qui mesurent une activité enzymatique, l'utilisation d'un fragment frais ou à défaut la congélation rapide (dans les cinq minutes qui suivent le prélèvement, en plongeant le fragment mis dans un cryotube directement dans l'azote) sont obligatoires. Par la suite, le prélèvement doit être conservé à -80°C et il est impératif que la chaîne du froid ne soit jamais rompue.

Le site des maladies orphelines Orphanet (<http://www.orpha.net/consor/cgi-bin/Disease.php?lng=FR>) permet pour chaque maladie de trouver le laboratoire d'analyse diagnostique adapté ainsi que ses coordonnées (<http://www.orpha.net/consor/cgi-bin/ClinicalLabs.php?lng=FR>). Il est vivement conseillé de se mettre en rapport directement avec ces laboratoires spécialisés, pour vérifier les indications et préparer le conditionnement et le transport du prélèvement dans des conditions sécurisées. Par ailleurs, certains tests spécifiques peuvent être réalisés sur une simple prise de sang et ne nécessitent pas de prélèvement musculaire. Un exemple est la recherche de la maladie Pompe par dosage de l'activité enzymatique α -1,4-glucosidase acide (ou maltase acide) sur les leucocytes. De plus, dans un contexte clinicobiologique évocateur, l'étude génétique est parfois directement réalisée : un adulte jeune présentant des épisodes de rhabdomyolyse avec myoglobinurie, déclenchés par le jeûne ou le stress, et ayant un profil sérique anormal des acylcarnitines, peut être directement testé génétiquement pour le gène *CPT2* (responsable du déficit en carnitine palmitoyltransférase II).

2.9. Étude génétique de l'ADN mitochondrial musculaire

En cas de suspicion de mitochondriopathie surtout s'il existe une atteinte oculomotrice, une étude de l'ADN mitochondrial du muscle a un intérêt capital. Elle recherchera en particulier des délétions en PCR ou certaines mutations ponctuelles. Ces études sont en général extériorisées dans des laboratoires experts. Elles nécessitent un consentement signé du patient pour étude génétique.

2.10. Banque tissulaire

Les prélèvements musculaires congelés doivent être conservés à visée sanitaire le plus longtemps possible dans des conditions optimales. Faute de place dans les congélateurs, les prélèvements pourront être soit fixés par le fixateur usuel du laboratoire pour une inclusion en paraffine, soit détruits. Toute destruction doit faire l'objet d'une déclaration au responsable de l'établissement.

En sus de la conservation à visée sanitaire, les prélèvements musculaires congelés pourront également être stockés en centre de ressource biologique (CRB) pour une cession à des fins de recherche. Le stockage en CRB doit respecter la réglementation en vigueur (consentement du patient, dossier d'autorisation auprès du ministère de la Recherche) et les infrastructures devront être conformes (idéalement certification ISO 9001 ou Afnor). Un catalogue des collections doit être disponible pour d'éventuelles mises en réseau.

3. Recommandations pour la prise en charge d'une biopsie nerveuse

3.1. Recommandations pour une biopsie nerveuse

3.1.1. Standard

La biopsie doit intéresser un territoire atteint cliniquement (mais pas trop) (Fig. 2). En pratique les nerfs biopsiés sont : le nerf fibulaire superficiel (ex. musculo-cutané), le sural, le

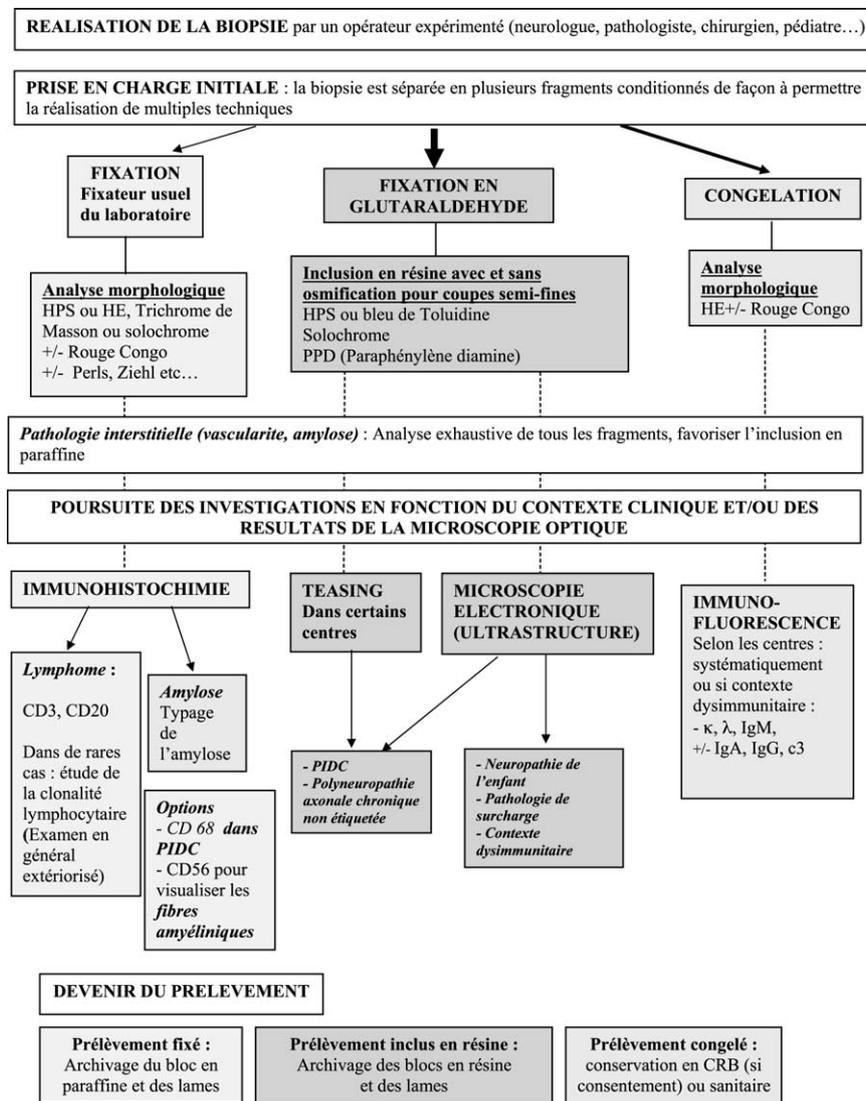


Fig. 2 – Organigramme pour la prise en charge d'une biopsie nerveuse.
Technical chart for a nerve biopsy.

crural, le radial. Le siège doit permettre le prélèvement d'un fragment de muscle dans le même temps opératoire, si on suspecte une atteinte interstitielle (inflammation, surcharge...). La biopsie peut être réalisée par un médecin ou un chirurgien qui en a l'expérience en fonction de l'habitude de chacun des centres.

Le préleveur doit savoir :

- choisir le siège du prélèvement en fonction de la symptomatologie clinique et de la suspicion diagnostique (pathologie interstitielle ou atteinte primitive axonale ou myélinique) ;
- avoir une bonne expertise chirurgicale concernant le territoire qu'il doit biopsier et respecter les règles permettant l'obtention d'une biopsie interprétable à savoir :
 - prélèvement de 4 cm de long au moins,
 - ne pas traumatiser le nerf (dilacération, « coups de pince »...) qui deviendrait ainsi ininterprétable.

Le préleveur doit faire signer au patient un document l'informant des éventuels risques de la biopsie et des règles

d'hygiène à respecter pour éviter toute complication post-biopsie.

3.1.2. Options

Il est fortement recommandé de faire signer un consentement éclairé au patient pour une éventuelle mise en banque tissulaire (CRB) avant tout acte de prélèvement.

Il est recommandé de conditionner au plus tôt les fragments et idéalement au bloc opératoire (technicien disponible). À défaut, le fragment de nerf peut être placé sur une compresse stérile imbibée de sérum physiologique puis dans un pot stérile, posé dans la glace et transporté au plus tôt vers le lieu de conditionnement.

3.2. Conditionnement de la biopsie nerveuse

3.2.1. Standard

Le prélèvement doit mesurer 4 cm de long au minimum et sera coupé en trois dans le sens de la longueur pour permettre (Vallat et al., 2009) :

- une congélation (0,5 cm) ;
- une fixation au glutaraldéhyde pour une inclusion en résine (0,5 cm), et si disponible la dissociation de fibres isolées (*teasing*) (au moins 1 cm) ;
- une fixation dans le fixateur usuel du laboratoire pour une inclusion en paraffine (2 à 3 cm).

Si les fragments sont de taille insuffisante pour réaliser les trois conditionnements, seront privilégiées : la fixation glutaraldéhyde, puis la congélation.

Remarque 1 : pour la congélation, le fragment doit être monté dans la gomme adragante et pourra être orienté soit perpendiculairement (coupes horizontales), soit parallèlement (coupes longitudinales) au support. Il doit être congelé dans de l'isopentane refroidi par de l'azote liquide. Le stockage se fera à -80°C .

Remarque 2 : la taille des prélèvements destinés à la résine ou à la paraffine dépend du contexte clinique. Dans le cadre d'une pathologie interstitielle, le fragment destiné à la paraffine doit être le plus long possible (3 cm minimum) pour augmenter les chances d'objectiver les lésions qui sont focales.

3.2.2. Options

La glutaraldéhyde pourra être utilisée comme fixateur unique pour une inclusion en résine et pour l'inclusion en paraffine. L'inclusion en paraffine peut être remplacée par une inclusion en résine exclusive. Cependant il faut souligner que si la glutaraldéhyde permet souvent une meilleure morphologie, ce fixateur risque d'altérer certains antigènes. De plus, l'inclusion en résine exclusive rend difficile l'immunohistochimie.

3.3. Analyse morphologique sur le prélèvement inclus en paraffine

3.3.1. Standard

Des colorations à l'HE ou à l'HPS et un trichrome (ou solochrome) seront réalisés pour l'analyse morphologique standard. Dans le cadre d'une suspicion de pathologie interstitielle (vascularite, amylose, inflammation...), une coloration par le rouge Congo est nécessaire. L'analyse de la totalité des fragments est recommandée à la recherche des lésions segmentaires si les premières coupes ne montrent pas d'altération ou encore si l'étude des premiers fragments (congelés, en résine) s'avère normale.

Le mode d'analyse (coupes sériées, petits fragments...) dépendra de chaque centre, mais assurera un examen exhaustif du matériel prélevé.

En fonction du contexte clinique, d'autres colorations pourront être réalisées (exemple, coloration de Perls si suspicion de vascularite, coloration de Ziehl si suspicion de lèpre...).

3.3.2. Options

Le reste est en option.

3.4. Immunohistochimie sur prélèvement inclus en paraffine

3.4.1. Standard

Premièrement, l'étude de l'expression de CD3, CD20 doit être réalisée devant tout contexte de lymphome. Celle-ci pourra

être complétée par une recherche de clonalité ; deuxièmement, le typage de l'amylose.

3.4.2. Options

Le reste est en option. À titre d'exemple :

- recherche de macrophages (CD68) dans un contexte de polyradiculonévrite inflammatoire démyélinisante chronique (PIDC) ;
- expression de NCAM (CD56) pour une meilleure visualisation des fibres amyéliniques.

3.5. Étude sur prélèvements congelés

3.5.1. Standard

Premièrement, la réalisation d'une coloration standard (HE) si les autres techniques sont négatives afin de rechercher une pathologie inflammatoire ou amyloïde segmentaire ; deuxièmement, l'analyse en immunofluorescence de l'expression de κ , λ , IgM dans tout contexte dysimmunitaire.

3.5.2. Options

Selon les centres, l'étude en immunofluorescence est réalisée soit en fonction du contexte clinique, soit d'une manière systématique en utilisant éventuellement d'autres marqueurs (IgG, IgA, c3, etc.).

3.6. Analyse morphologique sur le prélèvement fixé en glutaraldéhyde

3.6.1. Inclusion en résine

3.6.1.1. *Standard*. Coloration de bleu de toluidine ou de paraphénylène diamine, coloration de solochrome.

3.6.1.2. *Options*. Le reste est en option.

3.6.2. Analyse en microscopie électronique

3.6.2.1. *Standard*. Pas de standard.

3.6.2.2. *Recommandations*. Dans tout contexte de PIDC ou de polyneuropathie axonale chronique de cause indéterminée ou de neuropathie de l'enfant, si la coupe semi-fine n'a pas permis un diagnostic formel, il est recommandé de poursuivre les investigations pour mettre en évidence des lésions minimales. L'étude ultrastructurale est recommandée si on suspecte une pathologie de surcharge ou dans un contexte dysimmunitaire (recherche de dépôts et d'espacement des lamelles de myéline).

3.6.2.3. *Options*. Le reste est en option (exemple, technique d'immunomarquages en ultrastructure). D'autres renseignements peuvent être recueillis lors de cet examen : structure des prolongements non myélinisés, de la matrice endoneurale, des vaisseaux, des cellules péri-neurales.

3.7. Dissociation de fibres nerveuses (*teasing*)

3.7.1. Standard

Pas de standard.

3.7.2. Recommandations

En fonction des centres et si on dispose d'un opérateur expérimenté, la dissociation des fibres nerveuses (*teasing*), sur un minimum d'une quarantaine de fibres, peut apporter des éléments d'orientation diagnostique, en particulier dans le contexte de PIDC ou polyneuropathie axonale chronique de cause indéterminée.

3.8. Banque tissulaire

Les prélèvements nerveux congelés suivent la même logique que les prélèvements musculaires.

4. Conclusions

La standardisation des pratiques dans les différents centres de référence « maladies rares » pour la pathologie neuromusculaire est un objectif incontournable de la démarche qualité. Elle assurera la mise en place de références opposables pour les différentes techniques indispensables à une bonne prise en charge des prélèvements tissulaires et amènera à l'accréditation de ces centres. Le réseau national Cornemus, coordonnant tous les centres de référence de pathologie neuromusculaire, jouera un rôle facilitateur pour la diffusion et l'évolution de ces recommandations. Elles devront être réactualisées dans un délai maximum de trois ans.

Points techniques illustrés sur des sites internet : différents points techniques (congélation, coloration, histo-enzymologie) sont exposés sur des sites internet en particulier celui de l'université de Limoges pour la biopsie nerveuse (<http://www.unilim.fr/neurolim/biopner.htm>) et le site de l'univer-

sité de Washington pour les biopsies musculaires (<http://neuromuscular.wustl.edu/lab/mbiopsy.htm#selection>) et nerveuses (<http://neuromuscular.wustl.edu/nother/bx.html>).

R É F É R E N C E S

- Bruno C, DiMauro S. Lipid storage myopathies. *Curr Opin Neurol* 2008;21:601-6.
- Burr ML, Roos JC, Ostör AJ. Metabolic myopathies: a guide and update for clinicians. *Curr Opin Rheumatol* 2008;20:639-47.
- Carpenter S, Karpati G. Pathology of skeletal muscle. New York: Oxford University Press; 2001.
- Claeys KG, Fardeau M, Schröder R, Suominen T, Tolksdorf K, Behin A, et al. Electron microscopy in myofibrillar myopathies reveals clues to the mutated gene. *Neuromuscul Disord* 2008;18:656-66.
- Dubowitz V. Muscle biopsy. A practical approach. Bailliere Tindall, editors. New York; 1985.
- Engel AG, Franzini-Armstrong C. Myology. New York: McGraw-Hill; 1994.
- Fernandez C, Figarella-Branger D, Pellissier JF, Allasia C. Biopsie musculaire. *Encycl Med Chir Neurologie* 2002;29:17-030-G-10.
- Guglieri M, Straub V, Bushby K, Lochmüller H. Limb-girdle muscular dystrophies. *Curr Opin Neurol* 2008;21:576-84.
- Karpati G, Hilton-Jones D, Griggs RC. Disorders of voluntary muscle, 7th ed, Cambridge: Cambridge Press University; 2001.
- Peat RA, Smith JM, Compton AG, Baker NL, Pace RA, Burkin DJ, et al. Diagnosis and etiology of congenital muscular dystrophy. *Neurology* 2008;71:312-21.
- Vallat JM, Vital A, Magy L, Martin-Negrier ML, Vital C. An update on nerve biopsy. *J Neuropathol Exp Neurol* 2009;68:833-44.