

J. A. Lohrinus

Apport de la pathologie dans les maladies neuromusculaires

Les maladies neuromusculaires regroupent des affections diverses,^{1,2,3} comprenant pour le muscle : a) les dystrophies musculaires et myopathies congénitales/structurelles,⁴ b) les myopathies dysimmunitaires/inflammatoires⁵ et les vasculites, c) l'atteinte neurogène, d) les myopathies métaboliques et toxiques. Pour le nerf périphérique, les atteintes vasculitiques, inflammatoires, toxiques, métaboliques, ainsi que certaines neuropathies héréditaires, entrent en considéra-

tion. L'anamnèse et les examens cliniques/paracliniques permettent fréquemment de poser un diagnostic. Toutefois, dans de nombreux cas, la biopsie neuromusculaire reste un outil diagnostique important, avec des conséquences en matière thérapeutique, pronostique, et de conseil génétique. Cet article fournit quelques indications pratiques concernant les biopsies neuromusculaires et passe en revue notre collectif portant sur une année.

Mots-clés :

- maladies neuromusculaires
- pathologie
- dystrophies musculaires
- myopathies inflammatoires
- neuropathies

Pathology in neuromuscular disorders

Neuromuscular disorders can be divided into 4 groups for the muscle : (a) muscular dystrophies and congenital/structural myopathies ; (b) Inflammatory/dysimmune myopathies and vasculitis ; (c) neurogenic atrophy ; (d) metabolic and toxic myopathies. For the peripheral nerve, inflammatory diseases and vasculitis, metabolic, toxic and some hereditary neuropathies, can be considered. Clinical evaluation often allows the practitioner to render a diagnostic tool, with therapeutic, pronostic and genetic counseling implications. This paper provides some practical information and presents a survey of biopsy specimens submitted in the course of a one year period.

Med Hyg 2003 ; 61 : 2354-9

Aspects pratiques et possibilités de la biopsie neuromusculaire

L'analyse du tissu musculaire et nerveux offre de nombreuses possibilités, comprenant pour la pathologie, l'examen histologique standard en hématoxyline éosine et à l'aide de colorations spéciales, en particulier la coloration de Engel;⁶ les colorations histochimiques (enzymatiques); les colorations immunohistochimiques (réaction antigène-anticorps sur coupe); l'examen en microscopie électronique; l'analyse des protéines en Western blot. De plus, le tissu musculaire permet le dosage biochimique de certaines activités enzymatiques (en particulier de la chaîne respiratoire), ainsi que l'analyse de l'ADN mitochondrial.

Pour des raisons évidentes de logique médicale et de coût, l'ensemble de ces examens ne sont pas pratiqués sur chaque biopsie. Il s'agit donc pour le pathologiste d'effectuer une sélection des examens, sélection qui repose sur une parfaite connaissance des données cliniques du patient. Cela implique une étroite collaboration entre le médecin traitant et le pathologiste, sans laquelle l'apport de la biopsie neuromusculaire est fortement réduit.

Quelques règles de base sont à connaître. Pour la biopsie isolée de muscle, en cas de myopathie généralisée, fréquemment à prédominance proximale, le quadriceps ou le deltoïde sont indiqués. De façon générale, il faut choisir un muscle moyennement atteint cliniquement. En effet, un muscle sévèrement atteint peut montrer une image histologique terminale, non diagnostique. A l'inverse, un muscle peu atteint peut montrer une histologie normale. A noter que la résonance magnétique musculaire permet de mieux apprécier l'atteinte parfois sélective des groupes musculaires, et ainsi de guider la biopsie. Pour des raisons de volume tissulaire, la biopsie chirurgicale est préférable à la biopsie à

l'aiguille. En effet, la pathologie peut être focale, et le matériel est fréquemment partagé par le pathologiste, une partie étant utilisée pour examens biochimiques, ou analyse de l'ADN, effectués dans d'autres centres. Chez l'adulte, un volume approximatif de 1 cm³ est recommandé. Le prélèvement doit s'effectuer sans électro-cautérisation, ce geste compromettant totalement les examens histochimiques. Le fragment musculaire doit ensuite être déposé dans une gaze humidifiée au NaCl 0,9%, et acheminé le plus rapidement possible (idéalement quelques minutes, maximum 1 heure) à l'institut de pathologie. Le tissu ne doit jamais être fixé en formaline, la plupart des examens histochimiques et immunohistochimiques ne pouvant s'effectuer que sur matériel congelé.

Que fait le pathologiste avec le matériel ?

A l'institut, une petite partie de la biopsie est systématiquement fixée en glutaraldéhyde/cacodylate et incluse en Epon pour un éventuel examen en microscopie électronique, qui sera pratiqué de cas en cas. Le muscle est ensuite congelé, puis une première série de coupes au cryostat est systématiquement examinée à l'aide des cinq colorations suivantes :

- Hématoxyline et éosine (HE, permet d'apprécier la structure générale, les nécroses, les régénérations, l'inflammation, etc.);
- oil-red-O (mise en évidence des lipides);
- Engel (coloration trichromique mettant en évidence les fibres rouges déshiquetées des mitochondriopathies, les bâtonnets de la myopathie à Nemaline, les inclusions de la myosite à corps d'inclusion, la fibrose des dystrophies, etc.);
- deux colorations histochimiques, permettant de faire la distinction entre les deux types de fibres du muscle squelettique (indispensable pour apprécier les atteintes neurogènes, ainsi

• 10 pertes myélino-axonales	50%
• 6 nerfs normaux	30%
• 2 vasculites de type panartérite noueuse	10%
• 1 polyneuropathie chronique démyélinisante	5%
• 1 biopsie non interprétable	5%

Tableau 2. Biopsies nerveuses.

que l'atrophie sélective d'un type de fibre). Il s'agit de :

- adénosine triphosphatase à pH acide (ATPase à pH 4,2) ;
- nicotinamide adénine dinucléotide tétrazolium réductase (NADH-TR, permettant de plus d'apprécier la structure myofibrillaire, les cibles de l'atteinte neurogène, les cores de certaines myopathies congénitales).

En fonction de l'histoire clinique, ces colorations standards seront complétées par d'autres examens.

La «série dystrophie» est une série d'immunomarquage, explorant en particulier les protéines associées au complexe membranaire de la dystrophine, telles que :

- les trois épitopes de la dystrophine ;
- l'adhéline ;
- les bêta-, gamma- et delta-sarcoglycanes ;
- etc.

Par exemple, les trois épitopes de la dystrophine sont absents dans la maladie de Duchenne.⁷ La protéine nucléaire émérine est absente dans la maladie d'Emery-Dreifuss⁸. La mérosine est absente dans certaines formes de dystrophie musculaire congénitale. La protéine de type 2 associée à la membrane du lysosome (LAMP-2) est absente dans la maladie de Danon.⁹ Le collagène VI est altéré dans la myopathie de Bethlem ou la maladie d'Ullrich.

La «série inflammatoire» va explorer en détail le type d'infiltrat inflammatoire présent dans le cadre d'une myopathie inflammatoire. Il s'agit d'une série d'immunomarquage comprenant :

- les lymphocytes B (CD20) et T (CD3) ;
- les sous-types de lymphocytes T, CD4 et CD8 ;
- les macrophages (CD68) ;
- le complément (C5b9) ;
- le complexe majeur d'histocompatibilité I (HLA-1) ;
- l'ubiquitine.

Cette série est intéressante dans la différenciation de la polymyosite, la dermatomyosite et la myosite à corps d'inclusion.

Enfin, la «série métabolique» explore les maladies métaboliques, par le biais de colorations histo-chimiques :

- la cytochrome oxydase (COX) montre certaines fibres entièrement négatives dans les maladies mitochondriales ;
- le PAS (*periodic acid-Schiff*) montre une augmentation du glycogène dans les glycogénoses ;
- la myophosphorylase est absente dans la glycogénose de type V (maladie de McArdle) ;
- la phosphofructokinase est absente dans la glycogénose de type VII (maladie de Tarui) ;
- la phosphatase acide est augmentée de façon non spécifique dans toutes les atteintes «toxiques» du muscle.

Pour l'examen du nerf périphérique, il s'agit presque systématiquement du nerf sural, sensitif. Celui-ci doit être acheminé à l'institut dans les

A. Dystrophies et myopathies congénitales/structurelles	7%
– 1 dystrophie musculaire de Duchenne	
– 1 myopathie myotubulaire	
– 1 mini-multi-core disease	
– 1 maladie de Danon	
– 1 atrophie des fibres de type I	
– 2 myopathies à corps d'inclusion	
B. Myopathies inflammatoires et vasculites	7%
– 2 polymyosites	
– 1 dermatomyosite	
– 2 myopathies inflammatoires non classées	
– 1 vasculite de type panartérite noueuse	
– 1 vasculite non classée	
C. Atrophies neurogènes	18%
D. Myopathies métaboliques	3%
– 2 amyloïdoses musculaires	
– 1 augmentation des lipides dans les fibres	
E. Altérations non spécifiques, terminales, autres	39%
F. Muscle sans lésion	26%

Tableau 1. Biopsies musculaires.

mêmes conditions que le muscle. Nous prélevons un petit fragment pour un éventuel examen en microscopie électronique, puis le nerf est fixé en formaline et inclus en paraffine. Le HE permet d'apprécier l'architecture générale du nerf, ainsi que l'inflammation, le Van Gieson-Luxol montre la fibrose et la myéline, le rouge Congo met en évidence l'amyloïde, et le neurofilament (immunomarquage) montre la quantité et la qualité des axones.

Les biopsies neuromusculaires examinées à l'Institut de pathologie de Lausanne entre fin août 2002 et début août 2003

Durant cette période, pour un total de 92 patients, nous avons examiné 97 biopsies musculaires, 20 biopsies nerveuses et 2 biopsies cutanées. Les patients nous ont été adressés par le service de neurologie du Centre hospitalier universitaire vaudois (CHUV) (essentiellement au travers de la consultation des maladies neuromusculaires), l'unité de neuropédiatrie, d'autres services du CHUV ou d'hôpitaux périphériques, ainsi que des neurologues installés en pratique privée. Pratiquement, beaucoup de biopsies se font ambulatoirement, par le service de chirurgie plastique du CHUV.

Le tableau 1 reflète les diagnostics concernant le muscle, alors que le tableau 2 montre les diagnostics des biopsies nerveuses.

Les deux biopsies cutanées ont été effectuées dans le cadre de maladies inflammatoires, la première a montré des altérations compati-

Bibliographie

1. Karpati G. *Structural and molecular basis of skeletal muscle diseases*. Basel: ISN neuropath press, 2002.
2. Feldman, EL, et al. *Atlas of neuromuscular diseases. A practical guideline*. Vienne, New-York: Springer, 2003.
3. Zierz S, Jerusalem F. *Muskelerkrankungen*. Stuttgart: Thieme, 2003.
4. Dubovitz V. *Muscle disorders in childhood*. London: Saunders, 1995.
5. Mastaglia FL, Garlepp MJ, Phillips BA, et al. *Inflammatory myopathies: Clinical, diagnostic and therapeutic aspects*. *Muscle Nerve* 2003; 27: 407-25.
6. Engel WK, Cunningham GC. *Rapid examination of muscle tissue: An improved trichrome method for fresh frozen biopsy sections*. *Neurology* 1963; 13: 919.

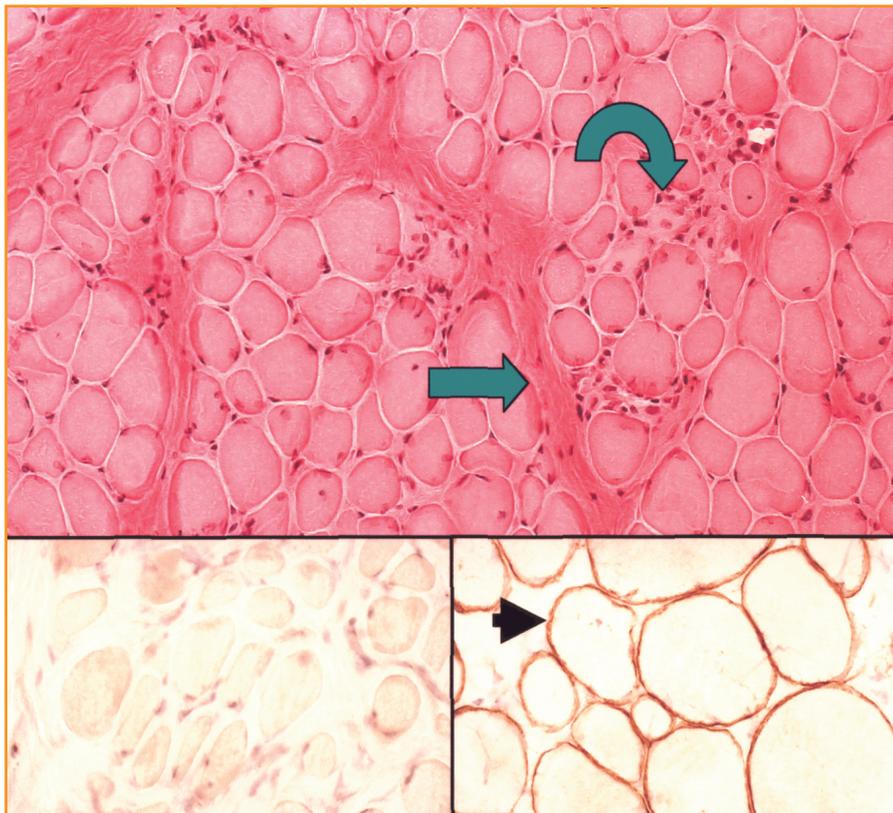


Fig. 1. Maladie de Duchenne.

Le HE (agrandissement original 200x) montre une irrégularité de la taille des fibres, avec nombreuses fibres atrophiées, fibres en nécrose (flèche courbe) et fibrose (flèche droite). L'insert inférieur gauche montre une absence complète d'expression membranaire de la dystrophine (épitope 1, 400x), alors que celle-ci est normalement exprimée dans un contrôle (insert inférieur droit, flèche).

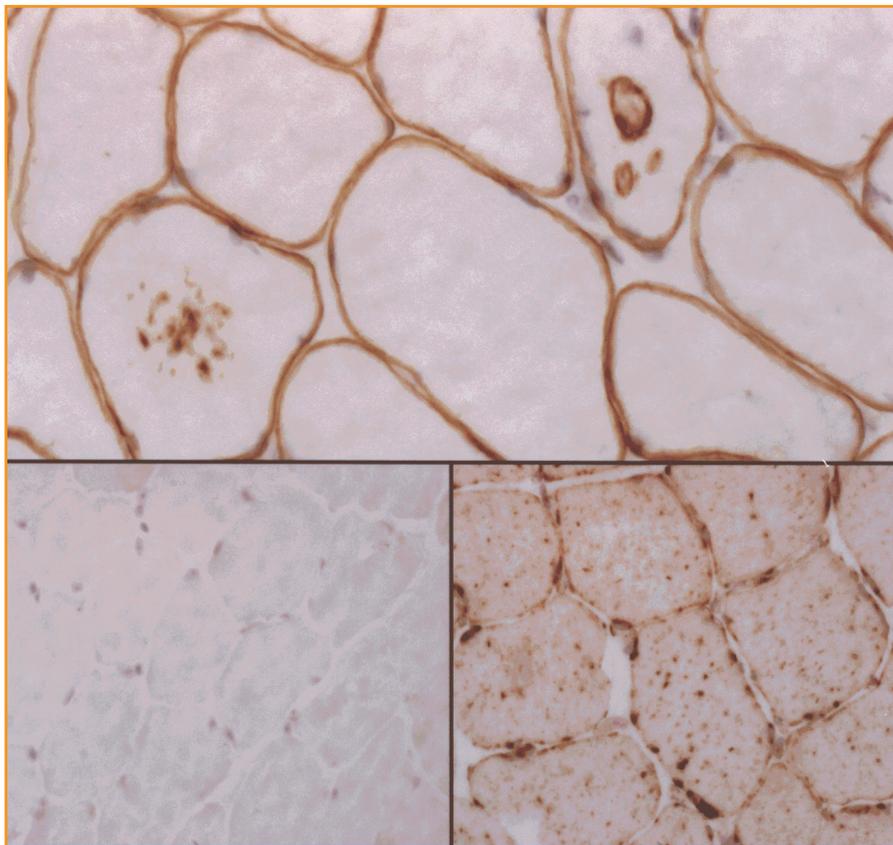


Fig. 2. Maladie de Danon.

Un immunomarquage de la dystrophine (épitope 1, 400x) montre des inclusions dans 2 fibres. L'insert inférieur gauche montre une absence complète d'expression de LAMP-2 (400x), alors que l'expression est normale dans un témoin (insert inférieur droit, positivité granulaire dans les lysosomes).

bles avec une maladie de Churg et Strauss et la deuxième une inflammation non spécifique.

Les dystrophies et myopathies congénitales/structurelles représentent 7% de notre collectif. Il s'agit d'un groupe de patients qui sont symptomatiques dès la naissance ou qui le deviennent pendant l'enfance ou l'adolescence, et qui font souvent partie d'une constellation familiale. Le diagnostic de ces maladies, qui repose fréquemment sur la biopsie, est indispensable en matière de pronostic et de conseil génétique. Pour la maladie de Duchenne (fig. 1), la biopsie musculaire pose un diagnostic de certitude. Cependant, l'examen clinique est en général suggestif de la maladie, et le test génétique à disposition, si bien que l'examen morphologique n'est plus pratiqué dans tous les cas. En revanche, dans d'autres situations moins claires cliniquement, le résultat de la biopsie sera le point de départ, qui permettra d'orienter les éventuels tests génétiques du patient et de sa famille, si l'altération génétique de la maladie en question est connue. La maladie de Danon (fig. 2) en est un exemple. Il s'agit d'une forme sévère de cardiomyopathie et myopathie squelettique liée à une mutation dans le gène LAMP-2 (lysosome-associated membrane protein-2), situé sur le chromosome Xq24. Les myopathies héréditaires à corps d'inclusion¹⁰ (fig. 3) sont un groupe hétérogène d'affections dont la génétique est complexe et imparfaitement comprise. Le diagnostic n'est possible qu'au travers de la biopsie musculaire. Il permet d'initier des études familiales, indispensables dans le domaine des maladies neuromusculaires.

Le Western blot est très utile pour confirmer une dystrophie liée à l'altération d'une protéine associée au complexe membranaire de la dystrophine (maladies de Duchenne, Becker, déficit en adhaline, en sarcoglycanes). Cet examen est indispensable en cas de suspicion de dystrophie liée à un déficit en calpaïne, cette protéine ne pouvant être testée en immunohistochimie sur coupe.

Les myopathies inflammatoires et vasculites représentent également 7% de notre collectif. Dans ce groupe de pathologies, l'impact de la biopsie est différent, puisqu'il va essentiellement être impliqué dans la stratégie thérapeutique. La biopsie doit être effectuée avant l'introduction d'un traitement anti-inflammatoire, ce traitement pouvant rapidement diminuer l'inflammation du muscle et compromettre le diagnostic. Le type d'inflammation est en principe différent entre une polymyosite et une dermatomyosite, ces deux affections découlant de mécanismes immunopathologiques différents. Dans la polymyosite (fig. 4), l'infiltrat inflammatoire est endomyséal, composé de lymphocytes T, avec prédominance de CD8. La dermatomyosite (fig. 5) provoque une atrophie péri-fasciculaire, avec infiltrat lymphocytaire à

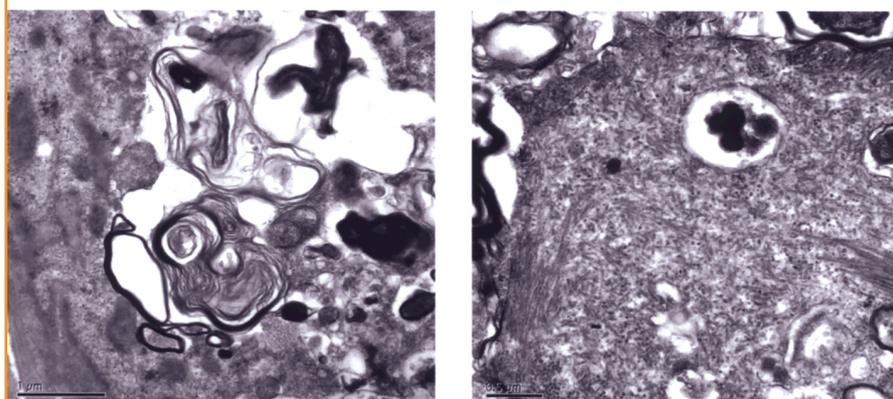
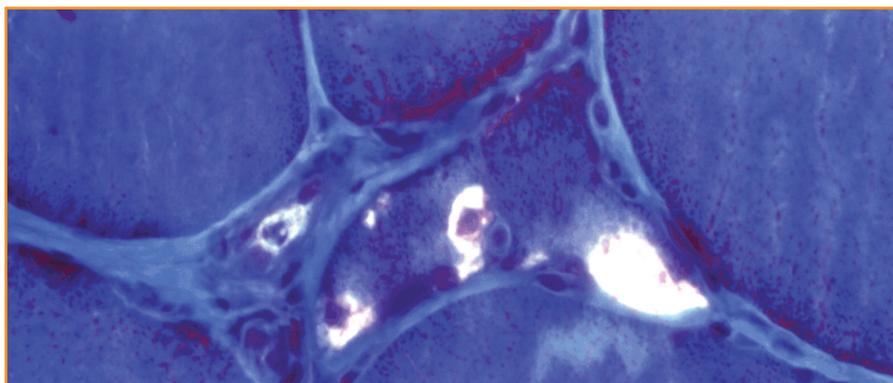


Fig. 3. Myopathie héréditaire à corps d'inclusion.

Le Engel montre plusieurs vacuoles claires dans les fibres musculaires (600x). La microscopie électronique montre des corps myéloïdes (en bas à gauche) et une inclusion cytoplasmique tubulo-filamentaire (en bas à droite), deux éléments caractéristiques de cette maladie.

- 7 Emery AEH. *Duchenne muscular dystrophy*. New-York: Oxford university press, 1993.
- 8 Nagano A, Koga R, Ogawa M, et al.

ce niveau, constitué d'un mélange de lymphocytes B et T, avec prédominance de CD4. Les nécroses et régénérescences sont toujours pré-

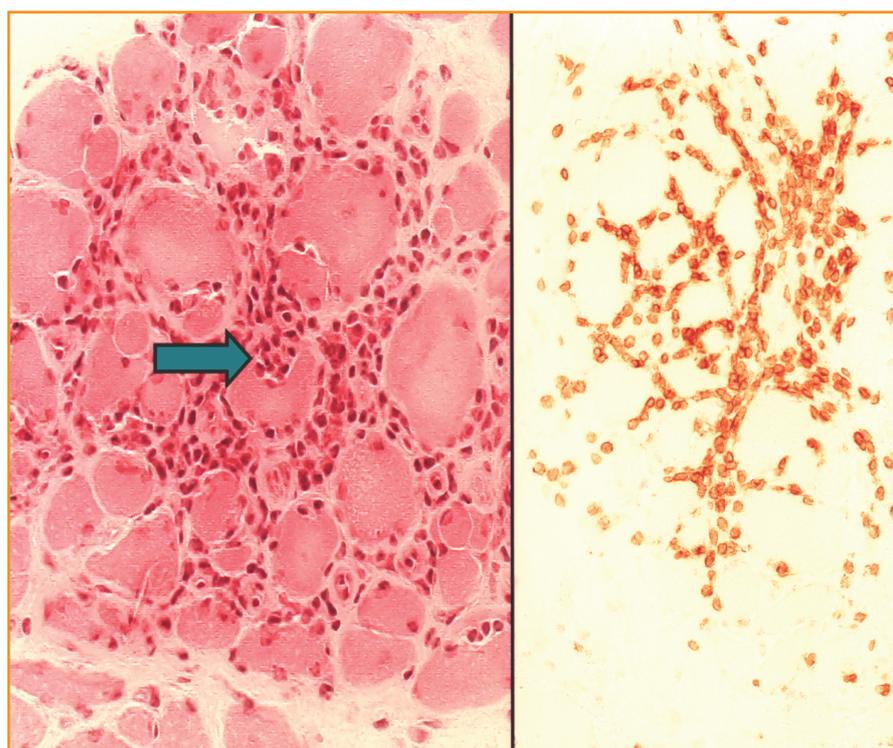


Fig. 4. Polymyosite.

A gauche, le HE (200x) montre l'infiltrat inflammatoire endomyoséal, autour et à l'intérieur (flèche) des fibres. A droite, un immunomarquage montre qu'il s'agit de lymphocytes T (CD3, 200x).

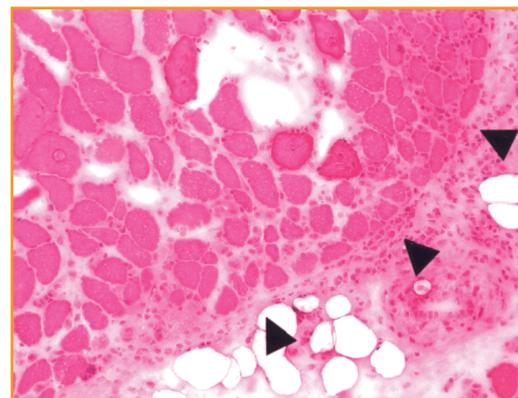


Fig. 5. Dermatomyosite.

Le HE (200x) montre un infiltrat inflammatoire perifasciculaire (dans le tissu fibro-adipeux entourant les fascicules), avec atrophie caractéristique des fibres musculaires en périphérie du fascicule (pointes de flèche).

sentes. La myosite à corps d'inclusion est une entité qui se rapproche morphologiquement de la polymyosite, mais qui répond mal au traitement stéroïdien et/ou immunosuppresseur. Son diagnostic repose sur la présence d'inclusions visibles au Engel et positives pour l'ubiquitine. Les myopathies inflammatoires non classées doivent être intégrées dans un contexte clinique, par exemple une connectivite. Une suspicion clinique de panartérite noueuse est une indication classique de la biopsie neuromusculaire (fig. 6), les lésions pouvant s'observer tant dans le muscle que le nerf.

Les atrophies neurogènes (fig. 7) représentent 18% du collectif. Elles confirment fréquemment une suspicion clinique, mais peuvent également orienter le diagnostic dans les cas où l'examen clinique ne permet pas de différencier clairement une atteinte neurogène d'une atteinte myogène. Les biopsies nerveuses sont presque toujours associées à une biopsie musculaire, et c'est dans ces biopsies nerf-muscle que l'atteinte neurogène est la plus fréquente.

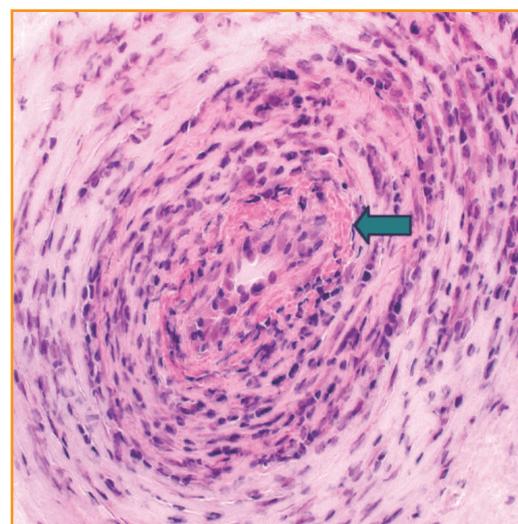


Fig. 6. Panartérite noueuse.

Le HE (400x) montre une inflammation sévère d'une petite artère, avec nécrose fibrinoïde de la paroi (flèche).

Emerin deficiency at the nuclear membrane in patients with Emery-Dreifuss muscular dystrophy. *Nat Genet* 1996; 12: 254-9.

9 Sugie K, Yamamoto A, Murayama K, et al. Clinicopathological features of genetically confirmed Danon disease. *Neurology* 2002; 58: 1773-8.

10 Askanas V, Engel WK. Sporadic inclusion-body myositis and hereditary inclusion-body myopathies: Current concepts of diagnosis and pathogenesis. *Curr Opin Rheumatol* 1998; 10: 530-42.

11 Kyriakides T, Marquez B, Panoussopoulos A, et al. Amyloid myopathy: Evidence for mechanical injury to the sarcolemma. *Clin Neuropathol* 2002; 21: 145-8.

Remarques

Voici quelques sites internet concernant les maladies neuromusculaires, principalement destinés aux praticiens :

<http://www.geneclinics.org>

<http://www.genetests.org>

<http://www.neuro.wustl.edu/neuromuscular>

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/omim>

<http://orphanet.infobiogen.fr>

Adresse de l'auteur :

Dr Johannes Alexander
Lobrinus
Institut universitaire de
pathologie
CHUV
1011 Lausanne
alobrinus@hospvd.ch

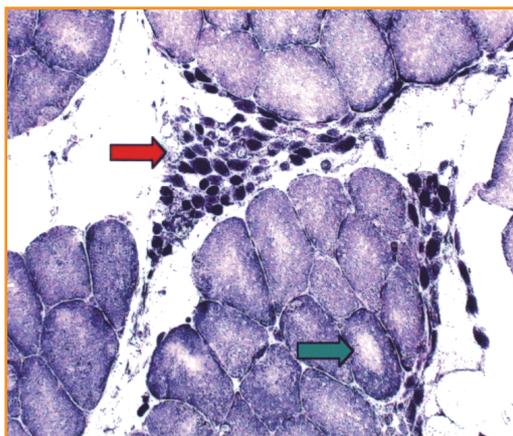


Fig. 7. Atrophie neurogène.

Le NADH-TR (100x) montre un groupe de fibres fortement atrophiées (flèche rouge) ainsi qu'une fibre avec une image de cible (flèche verte), deux altérations caractéristiques de l'atrophie neurogène.

La myopathie amyloïde¹¹ peut être à l'origine d'une faiblesse musculaire, elle s'observe en général dans un contexte de myélome ou de gammapathie monoclonale de signification indéterminée (MGUS).

L'augmentation du contenu en lipides des fibres musculaires peut s'observer dans le traitement stéroïdien au long cours, ou dans un trouble du métabolisme des lipides.

Trente-neuf pour cent des biopsies montrent des altérations non spécifiques, peu marquées, ou au contraire terminale. La biopsie exclut la normalité, mais ne livre pas de diagnostic final. Les résultats histologiques doivent alors être intégrés dans le contexte clinique.

Vingt-six pour cent des biopsies sont normales. Il s'agit fréquemment de patients souffrant de myalgies, mais avec un status neurologique

et des examens paracliniques normaux. Rarement, il s'agit d'un problème d'échantillonnage dans une pathologie focale. Un muscle normal n'exclut pas formellement une vasculite, ni une myopathie inflammatoire.

La pathologie du nerf périphérique est d'approche plus difficile. A l'exception des vasculites, des amyloïdoses et de rares neuropathies héréditaires ou démyélinisantes, qui sont histologiquement caractéristiques, le nerf montre fréquemment (50% dans notre collectif) une perte myéline-axonale non spécifique, qui doit à nouveau être intégrée dans un contexte clinique.

Conclusion

La biopsie du muscle et/ou du nerf est un outil irremplaçable dans les investigations paracliniques d'un patient souffrant d'une maladie neuromusculaire. Cependant, ce geste ne doit pas être entrepris à l'aveugle. Il doit au contraire être envisagé après examen clinique complet, lorsque les autres examens paracliniques n'ont pas permis de poser un diagnostic final. La biopsie a des implications pronostiques et de conseil génétique dans le groupe des dystrophies et myopathies congénitales/structurelles. Elle a des implications thérapeutiques dans le groupe des myopathies inflammatoires et vasculites. Elle reste un outil incontournable dans le diagnostic de certaines myopathies métaboliques, pensons en particulier aux maladies mitochondriales. Une collaboration étroite entre le clinicien et le pathologiste est la pierre angulaire sur laquelle repose la réussite d'une biopsie neuromusculaire.

Actualité

Clonage : pas de décision de l'ONU avant deux ans

La commission juridique de l'Assemblée générale de l'ONU vient de voter le report pour deux ans de toute décision concernant le clonage humain par un vote de 80 voix contre 79 et 15 abstentions. Ce report avait été demandé par l'Organisation de la conférence islamique (OCI) alors que l'ONU était profondément divisée sur cette question.

D'un côté, le Costa Rica, les Etats-Unis, les Philippines et plus

de 50 autres pays, soutenus par le Vatican, réclamaient l'adoption, avant 2004, d'une convention internationale interdisant toute forme de clonage humain (reproductif et à visée thérapeutique).

De l'autre, la Belgique, la Grande-Bretagne, la Chine et une minorité importante de pays dont la France et l'Allemagne estiment qu'un clonage limité ouvre des perspectives pour l'amélioration de la santé des

individus et de l'humanité dans son ensemble.»

L'ambassadeur américain James Cunningham a regretté la décision de la commission juridique en estimant que 100 Etats membres étaient prêts à voter pour l'interdiction de toute forme de clonage humain. «Une interdiction totale du clonage humain devrait être la norme internationale» a-t-il déclaré.

Pour sa part, l'ambassadeur belge, Marc Pecsteen avait affirmé, avant le vote, qu'il était d'accord pour un délai car, a-t-il estimé, «une convention sur ce sujet doit être universelle

ou, en tout cas, aussi universelle que possible.»

J.-Y. Nau

Cette actualité est publiée en collaboration avec La Revue du praticien – Médecine générale (parue le 17 novembre 2003)

Pratique

Apport de la pathologie dans les maladies neuromusculaires

J. A. Lobrinus

Med Hyg 2003 ; 61 : 2354-9

Les maladies neuromusculaires regroupent des affections diverses,^{1,2,3} comprenant pour le muscle : a) les dystrophies musculaires et myopathies congénitales/structurelles,⁴ b) les myopathies dysimmunitaires/inflammatoires⁵ et les vasculites, c) l'atteinte neurogène, d) les myopathies métaboliques et toxiques. Pour le nerf périphérique, les atteintes vasculitiques, inflammatoires, toxiques, métaboliques, ainsi que certaines neuropathies héréditaires, entrent en considération. L'anamnèse et les examens cliniques/paracliniques permettent fréquemment de poser un diagnostic. Toutefois, dans de nombreux cas, la biopsie neuromusculaire reste un outil diagnostique important, avec des conséquences en matière thérapeutique, pronostique, et de conseil génétique. Cet article fournit quelques indications pratiques concernant les biopsies neuromusculaires et passe en revue notre collectif portant sur une année.