

Biopsies Musculaires

Méthodes et intérêt pour les pathologies musculaires

1 / La consultation diagnostique

L'approche diagnostique est pluridisciplinaire. Quand un patient souffre d'une symptomatologie neuromusculaire il va bénéficier d'une consultation et d'un examen clinique très précis :

- L'histoire de la maladie
- Les **antécédents familiaux**
- L'examen neuromusculaire, on va évaluer l'état des réflexes ostéotendineux et on cherchera des déficits musculaires.

A la suite de l'examen clinique on pourra suspecter la présence d'une maladie neuromusculaire

2 / Les examens paracliniques

Lorsqu'on suspecte la maladie on va demander plusieurs examens para cliniques

- Dosage des enzymes musculaires ds le sang pr savoir s'il y a lyse muscu

Ainsi que des examens cibles en fonction des éléments cliniques

- Syndrome dysimmunitaire.
- Syndrome inflammatoire.
- Scanner et IRM pr connaître l'état de la masse muscu et la localisation des atrophies.
- Electromyogramme.

La biopsie muscu sera demandée pr confirmer nos suspicions ou les éliminer.

Ce n'est pas un examen de première intention ! Il faut intégrer les arguments cliniques et para cliniques.

3 / Choisir la localisation de la biopsie

Pour apprécier l'état des masses muscu on va choisir un muscle malade mais pas trop parce que si le tissu est très malade il sera remplacé par du tissu adipeux.

Ainsi on choisit en général le m. deltoïde ou le m. quadriceps.

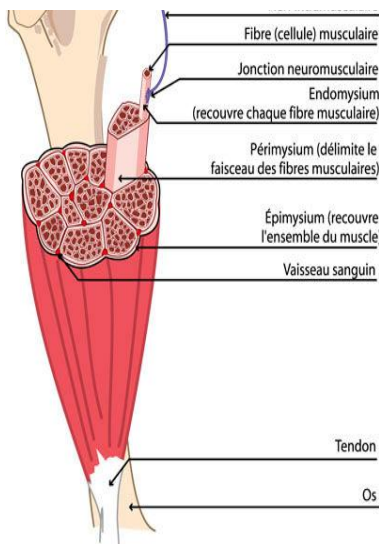
Avant de faire la biopsie il faut se **mettre d'accord avec un labo d'anapath** parce que tous les labos ne traitent pas les biopsies muscu.

4 / Réalisation de la biopsie

Cette biopsie est réalisée sous anesthésie locale avec une incision cutanée , on incise aussi le fascia

Puis on réalise le **prélèvement** muscu qui doit être **suffisamment abondant** car il ne sera pas destiné à l'anapath seulement mais aussi au biochimiste (dosage enzy) à la biomol (recherche d'anomalies génétiques). Cette biopsie sera ainsi séparée en plusieurs fragments.

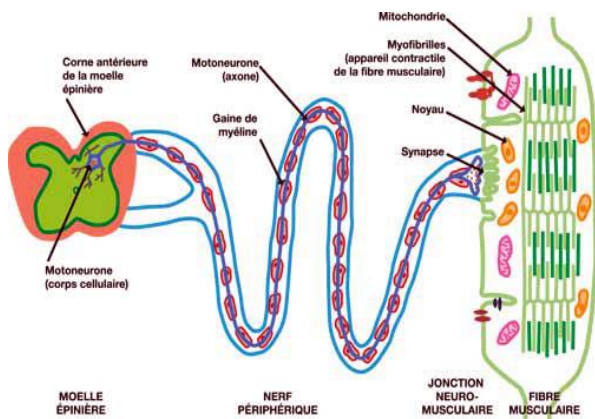
Rappel histologique :



Les cellules muscu sont agencées en faisceaux , et chaque fx contient plusieurs fibres muscu

- *L'endomysium est le tissu conjonctif entourant chaque fibre muscu*
- *Le perimysium delimite les fx*
- *L'epimysium recouvre l'ensemble du muscle*

Les cellules muscu sont tres particulières , elles sont très longues , multinuclées , avec les noyaux situes en périphérie sous la mb plasmique et les myofibrilles au centre



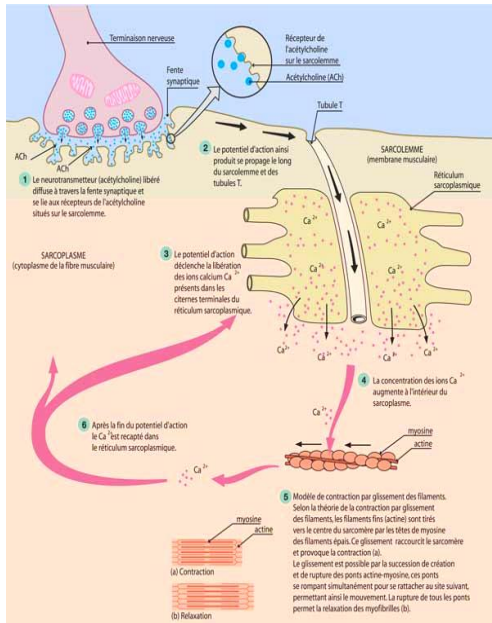
Les cellules muscu sont riches en mitochondries et en reticulum sarcoplasmique.

L'innervation de la fibre détermine son type histochimique.

Principales protéines du cytosquelette : Actine , myosine , desmine , calpaine etc...Une anomalie d'une de ces protéines entraîne une myopathie particulière d'où l'intérêt des biopsies musculaires.

Il y a également la **dystrophine** et les sarcoglycanes qui relient les myofibrilles à la membrane > rôle de cohésion assurant l'intégralité.

Dans les myopathies on a une anomalie d'une de ces protéines > perte de la cohésion mb plasmique-myofibrilles > déchirure de la mb lors de la contraction > nécrose des cellules > remplacement du tissu muscu par du tissu adipeux.



Le potentiel d'action arrive au niveau de la plaque motrice, par l'intermédiaire de l'Ach le PA circule le long du sarcolemme jusqu'aux tubules transverses qui, par l'intermédiaire d'un pontage protéique avec le reticulum sarcoplasmique (triade) entraîne l'ouverture de canaux calciques et la sortie du calcium vers le sarcoplasme.

Le calcium permet le glissement de la myosine sur l'actine et donc le raccourcissement (par augmentation de l'affinité et changement de conformations notamment celle de la tropomyosine cf p1)

5 / Devenir de la biopsie

Quand la biopsie arrive au laboratoire

1. On la **congèle**, les fibres étant orientées longitudinalement, on met la biopsie dans de la gomme aggragante et on va congeler l'ensemble.
2. On **coupe transversalement** la biopsie congelée à l'aide du **Cryostat**
3. La fine tranche obtenue sera mise sur une lame.

NB : on fait au moins 15 lames avec une seule biopsie et chaque lame sera traitée différemment

6 / Mécanismes d'atteintes musculaires

- Par lésion du motoneurone qui innerve la cellule muscu ou de la transmission neuromuscu
- Par atteinte primitive de la cellule muscu (le plus souvent)
 1. Soit de son architecture par anomalie d'une des protéines de son cytosquelette > dystrophie muscu
 2. Soit de son métabo oxydatif ou glycolytique > myopathie métabolique

Rappel p1 : les fibres de type 1 sont lentes, oxydatives, ont pr substrat les lipides, rouges, résistante
Les fibres de type 2 sont rapides, glycolytiques, utilisent le glycogène, fatigables anaérobies

3. Soit par anomalie de son développement : myopathies congénitales
- Myopathies inflammatoires le plus souvent dues à une anomalie de l'immunité, les cellules muscu étant reconnues comme antigène.

7 / Histochimie

- **L'hémateine-eosine** nous renseigne sur la **morphologie** des myocytes et sur l'état de l'endomysium
- **Le trichrome de Gomori** met en évidence des **aggrégats tubulaires** anormaux et des **amas mitochondriaux** en masse.
- **Le noir Soudan** nous renseigne sur la **charge lipidique** dans la cellule.
- **La réaction au PAS** nous renseigne sur la **charge glycogénique** dans la cellule.

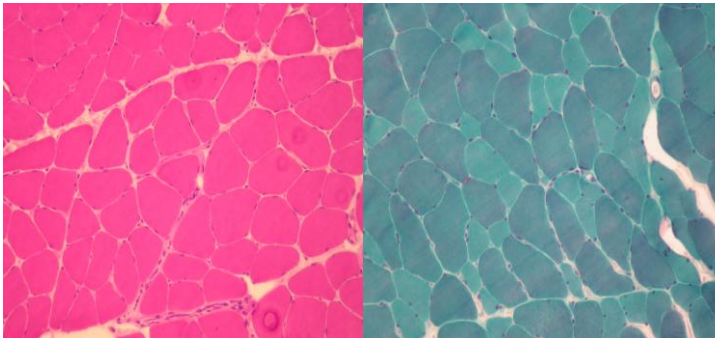


HES : Coupe en paraffine

*Ici se trouve une biopsie muscu non congelée. En anapath lorsqu'on reçoit une biopsie on la fixe au formol puis on l'inclue dans la **paraffine** et on fait des **coupes** qu'on va colorier par l'**HES** >> c'est la technique de base. Lorsque la biopsie muscu subit le traitement de routine on observe que **les cellules muscu sont très cohésives** et on devine assez mal leurs contours. Le tissu conjonctif perimysial est colorie en orange.*

>>> Avec la technique de base on ne peut pas bien analyser les cellules muscu

MUSCLE NORMAL



Hématéine éosine

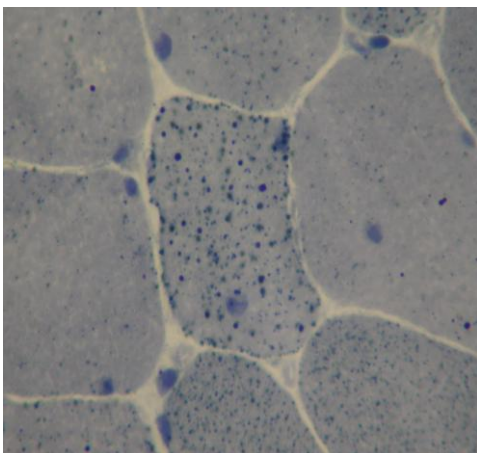
Trichrome de Gomori

*Si on a congelé transversalement les biopsies et qu'on les a colories avec la **coloration standard** On observe que **les myocytes sont cohésives** ayant une forme polygonale, on devine les noyaux en périphérie. Le tissu conjonctif qui englobe les cellules(**endomysium**) est très peu abondant dans le muscle normal.*

*Avec le **trichrome**, on observe une différence de couleur : certaines fibres sont claires et d'autres sont plutôt sombres. Sachant que le trichrome colorie les mitochondries en rouge, les cellules sombres sont riches en mitochondries, ce sont donc des fibres de type 1, les cellules claires st pauvres en mitoch et st de type 2. On peut ainsi connaître la distribution des différents types de fibres en sachant qu'elles ont une disposition aléatoire.*

NB c'est le motoneurone qui détermine le type de fibre !!!

Noir soudan : lipides

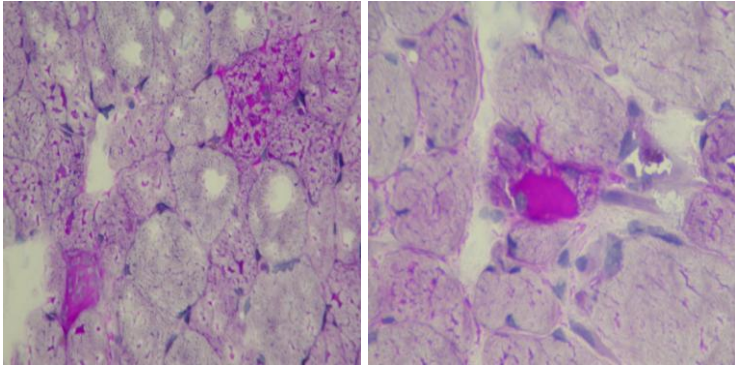


*Le **noir Soudan** va colorer les **gouttelettes lipidiques** qui sont plus nombreuses dans les fibres de type 1.*

En bas on observe de nombreuses gouttelettes lipidiques, ce sont les fibres de type 1, elles sont entourées par des fibres de type 2 qui ont moins de gouttelettes.

*Au centre se trouve une **cellule avec d'énormes gouttelettes anormales**, cette fibre est surchargée en lipide car il y a un problème au niveau de la chaîne respi mitoch : il y a une enzyme qui est **déficiente** et donc les lipides ne sont plus correctement métabolises >>> **myopathie métabolique**.*

PAS : GLYCOGENE



La glycolyse est utilisée par les fibres de type 2 . Ces fibres sont riches en glycogène qui est coloré en rose .

La photo de gauche montre une fibre de type 2 normale , elle est discrètement colorée en rose.

La photo de droite montre une fibre de type 2 anormale car elle contient de volumineux amas de glycogène , c'est une fibre musculaire qui présente un déficit d'une enzyme de la glycolyse.

>>> c'est donc une myopathie métabolique avec déficit d'enzyme .

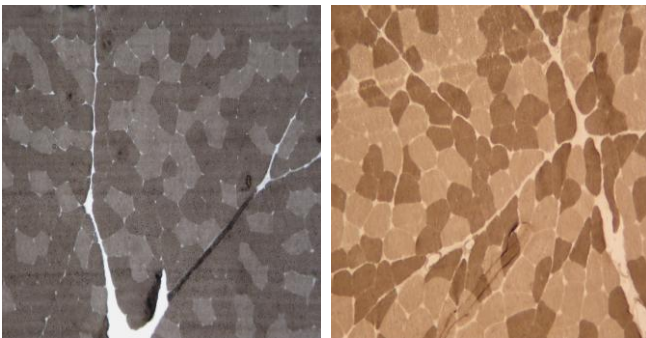
8 / Histo-enzymologie : lien entre la morpho et la biochimie des tissus .

- Nous permet de mettre en évidence les **divers types de fibres** (type 1 ou 2)
- Nous donne un **aspect fonctionnel de la cellule** : d'éventuels déficit enzy , évaluation de l'activité de certains organites intracell , tels que les mitochondries , les lysosomes et le reticulum sarcoplasmique .
- Peut montrer des **variations architecturales non visibles avec les techniques de routine** , en particulier les anomalies architecturales des myofibrilles .

ATPases myofibrillaires

ph 4,35

ph 9,4



Substratum : myosine

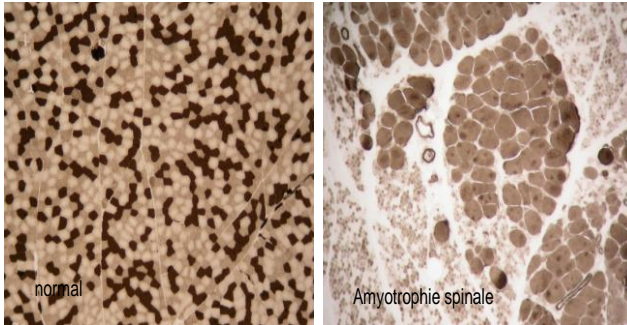
Mise en évidence de l'activité ATPasique

Les ATPases dont il existe plusieurs types , sont situées dans les myofibrilles et ont pour substratum la myosine. Celles qui sont activées a pH 4.5 ne le sont pas a pH 9.4 >> aspect en négatif.

- *A pH 4.5 les fibres de type 1 sont colorées en noir alors que les fibres de type 2 sont plus claires.*
- *A pH 9.4 c'est l'inverse.*

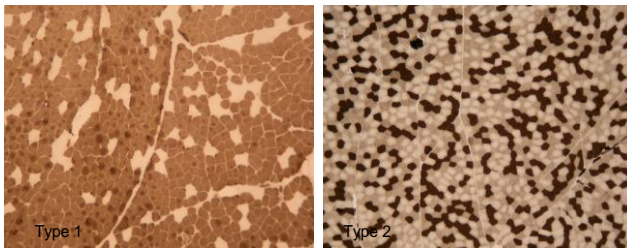
On observe que les fibres de type 1 et de type 2 sont agencées au hasard et ont pratiquement la même taille.

ATPase 4,35 : processus neuropathique



C'est le motoneurone qui détermine le type de fibres .Le motoneurone innervant plusieurs fibres va envoyer des collatérales mélangées qui vont aller innerver des fibres éloignées. Ainsi une fibre innervée par un certain motoneurone va avoir pour voisine une fibre innervée par un autre motoneurone. Quand il y a une lésion d'un motoN , les fibres innervées par ce motoN seront innervées par le motoN innervant la fibre d'a cote >> effet de regroupement traduisant un processus neuropathique. C'est ce passe dans l'amyotrophie spinale .

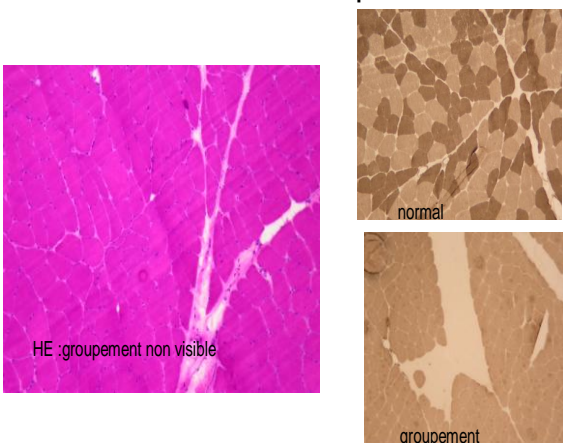
ATPase 4,35: predominance d'un type de fibres



Normalement les fibres de type 1 et de type 2 sont a des proportions équivalentes , dans le cas d'une myopathie congénitale il y a prédominance de fibres de type 1. C'est tout a fait caractéristique en histo-enzymologie

NB : la photo de gauche montre des fibres de type 1 majoritaire dans le cadre d'une myopathie alors que la photo de droite montre des fibres a des proportions normales.

Groupement des mêmes types de fibres histochimiques

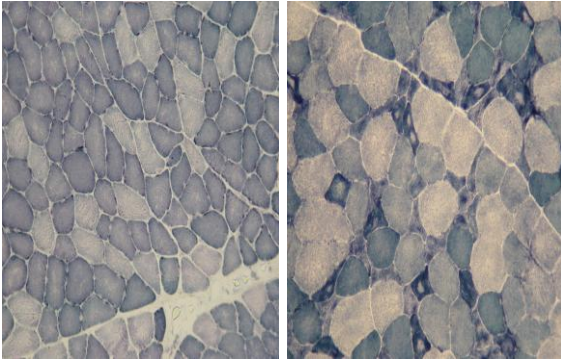


Utilite de l'histo-enzymologie

Avec la coloration standard on ne voit souvent rien , dans ce cas on voit que les cellules muscu sont tout a fait normales , bien régulières , sans augmentation de leur taille ou du tissu conjontif >> biopsie normale OR ce n'est pas le cas...

Avec l'Histoenzymo on voit qu'il y a de gros groupements de fibres de type 2 cad qu'il y a eu nécrose de motoN et réarrangement >> Aspect caractéristique d'une neuropathie muscu.

NADH : ATROPHIE NEUROPATHIQUE

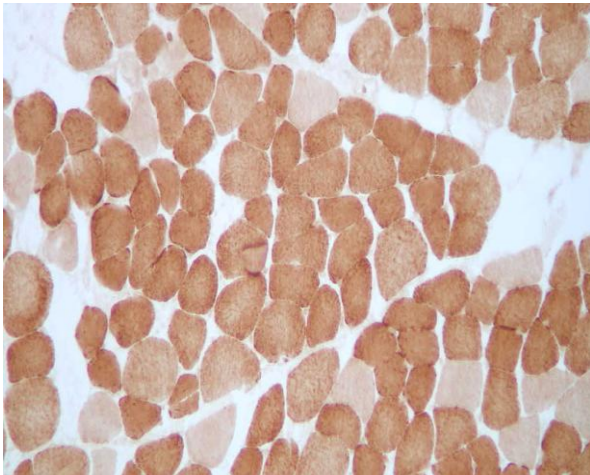


Localisation intermyofibrillaire ,
Substratum : mitochondries réticulum et système T

La NADH

*C'est une enzyme présente dans les mitochondries , le reticulum endoplasmique et le système T . Sa localisation est intermyofibrillaire
Comme elle est présente dans les mitoch , les fibres de type 1 seront plus sombres que les fibres de type 2, dc meme aspect que pour les ATPases.
Comme la NADH est aussi présente dans le RE , et que le RE encercle les myofibrilles , la mesure de l'activité de cette enzyme nous renseigne sur la structure intermyofibrillaire afin de savoir si les myofibrilles sont agencées régulièrement >> coloration homogène
NB : On obtient une image en cycle si les myofibrilles ne sont pas agencées régulièrement.*

Cytochrome oxydase-succinodéshydrogénase



Localisation intermyofibrillaire substratum mitochondries

La Cytochrome oxydase (cox) et la Succinodeshydrogenase (sdh)

*Il s'agit de 2 enzymes appartenant a la chaine respi mitoch et dont la localisation est interneurofibrillaire et ont pr substratum les mitochondries.
On réalise les deux reactions enzy sur deux lames differentes.*

Pour le reste désolé mais ça sera sous forme de commentaire des diapos pke la taille du fichier est devenue trop grande ;)

Diapo 23 : Au niveau de la mitochondrie se fait le métabo oxydatif a ce niveau se trouvent la sdh et la cox . En cas de mitochondriopathie ou myopathie métabo par atteinte de la mitoch il y aura atteinte d'une de ces enzymes .

Avec HE >> on ne voit pas gd chose avec la coloration standard

Avec le Trichrome >> Ce dernier colore les mitoch en rouge , on voit de gros amas mitochondriaux en périphérie de la cellules car les mitoch étant anormales vont s'accumuler ds la cellule .

Avec le Noir Soudan >> Ce dernier colore les lipides , or étant donné qu'il existe une anomalie ds une enzyme de la chaine respi on va voir de grosses gouttelettes lipidiques autour de la mb plasmique . Ces lipides se trouvent ds les mitochondries.

NB Grâce a l'histo chimie on va suspecter une maladie mitochondriale mais avec l'histo enzymo on pourra dire quelle enzyme est responsable de la maladie .

Avec l'activité enzy de la cox >> l'activité enzy de la cox est colorée en brun . Ttes les cellules colorées en brun ont dc une activité cox . L'activité enzy de la sdh est quant a elle colorée en noir . Certaines cellules sont colorées en brun sur la photo alors que d'autres ne sont colorées qu'en noir , ça veut dire qu'elles ont un déficit en cox sinon elles auraient été comme les autres colorées en brun .

Diapo 24 : Avec HE on voit un aspect déchiqueté de la cellule avec du blanc . ce blanc correspond en fait a des lipides non colorés a l'HE ; Avec le noir soudan on aurait eu une coloration noir de ces trainées blanches Avec le trichrome de Gomori >> on voit bien les mitochondries périphériques colorées en rouge . Avec l'activité enzy de la NADH >> on voit que par rapport aux cellules environnantes , il y a une augmentation de la NADH car il y a déjà des amas mitochondriaux . Avec l'activité enzy de la sdh >> la cellule est colorée en noir parceque seule la sdh a été marquée , l'activité enzy de la cox n'a pas été marqué car il y a déficit de cette enzyme . Normalement la cellule aurait due etre brune .

NB pr la glycogénose c la meme chose >> surcharge en glycogene mise en évidence par le PAS

Diapo 25 : Immunohistochimie : mise en évidence d'un antigène dans un tissu

- Étude des protéines du cytosquelette dans les dystrophies musculaires
Ttes les protéines sont antigéniques , on va se servir de cette propriété pr les mettre en évidence .
- Qualification de l'infiltrat leucocytaire dans les myopathies inflammatoires
Ds le cas de maladies autoimmunes les cellules muscu st reconnues comme étrangères .

Diapo 26 : Technique PAP

- 1) La protéine X que l'on veut mettre en évidence n'est pas visible sur le microscope . On va la mettre en évidence par un énorme paquet d'autres protéines qui vont augmenter sa taille et qui pourront etre colorés.
- 2) On fait agir un anticorps anti-X spécifique .
- 3) On lui rajoute une énorme molécule qui se fixe sur l'anticorps pour « amplifier » la protéine .

Diapo 27 : La Myopathie de Duchenne est une maladie très fréquente . elle est autosomique recessive liée a l'X dc seuls les garçons vont etre atteints , les femmes transmettent la maladie a leurs fils . Cette maladie touche 1 naissance d'un garçon sur 3500 naissances . Ds cette maladie il y a une anomalie de la Dystrophine , protéine du cytosquelette qui assure la cohésion entre la mb plasmique et les myofibrilles . Au niveau de la biopsie après coloration standard , on ne voit que du tissu adipeux . Presque ttes les cellules muscu ont été remplacées par du gras . C'est dc une maladie gravissime , les enfants perdent la marche a 10 ans et décèdent a l'age de 20 ans par insuffisance respi car cette maladie touche tous les muscles de l'organisme y compris le diaphragme .

Diapo 28 : Il s'agit ici de coupes transversales de muscle congelé . Au niveau du tissu muscu normal les fibres muscu ont pratiquement toutes la meme tailles et st cohésives , alors qu'au niveau du tissu muscu malade on voit que les fibres muscu st tres variées ds leur taille et ds leur forme avec un tissu conjonctif très majoritaire associé a une fibrose >> muscle très anormal >> myopathie .

Diapo 29 : Ici c'est une coloration de trichrome . Ce dernier nous colore le tissu conjonctif qui est très augmenté avec des cellules très variées .

Diapo 30 : Bcp de dystrophies muscu ont le meme aspect physio mais avec des protéines incriminées différentes . La dystrophine est associée a ttes les autres protéines (sarcoglycanes , microfilaments d'actine etc..) grace a l'immunohistochimie on va essayer de trouver quelle protéine est anormale .

Diapo 31 : Par des techniques enzy on va diriger spécifiquement des anticorps contre la dystrophine et contre chacune des autres protéine et on va voir laquelle est manquante .

Diapo 32 : Dystrophine témoin » Avec un anticorps specifiq anti-dystro on voit que la dystrophine s'est colorée en brun surtout en péripherie (logique puisqu'elle se trouve en périph des cellules et forme ainsi un « cadre marron ») de plus toutes les cellules ont été coloriées .

Dystrophine de duchenne » Il y a très peu de coloration brune car il n'y a pratiquement pas de dystrophine
Sarcoglycane de duchenne » On a utilisé ici un autre Ac contre une des sarcoglycanes (car il y en a plusieurs) on voit que cette sarcoglycane est présente mais qu'elle est diminuée .

Diapo 33 : Il est important de chercher la mutation du gene de la dystrophine au niveau du kr X et de dépister ainsi les femmes hétérozygotes » importance lors du conseil génétique .

Chez les porteuses de duchenne on peut voir sur une biopsie de muscle qu'il existe des territoires ou la dystrophine n'est pas présente » anomalie en mosaïque

Diapo 34 : la myopath de duchenne peut exister dans certains cas rares chez des femmes .

Diapo 36 : La myosite est une myopath inflammatoire idiopathique , la csq est que les cellules muscu ont une antigénécité modifiée , elles expriment un antigène qu'elles ne devraient pas normalement exprimer (HLA de classe 1) .

Les lymphocytes et les macrophages vont necroser les cellules . Avec l'IHC on peut mettre en évidence et différencier les LB des LT alors qu'avec l'HE on peut juste distinguer un foyer inflammatoire sans pouvoir faire le diagno de myosite surtout formé de LT et de macrophages avec peu de LB .

KJ.