

Laboratoire de Neuropathologie Ultrastructurale (Ultrastructurele Neuropathologie, LUN)

Prof. dr. C. Ceuterick – de Grootte

BIOBANK IBB – Task-force 1 (maladies neuromusculaires)

Prof. dr. C. Ceuterick – de Grootte

Prof. hon. J-J. Martin (consultant scientifique)

INSTITUUT BORN-BUNGE (IBB) -Universiteit Antwerpen (UA)

Campus Drie Eiken

Gebouw T (bâtiment T ; rez-de-chaussée, locaux : 0.02 et 0.04)

Parking 4; Universiteitsplein 1

B-2610 Wilrijk; FAX – IBB : (03) 265. 26. 69 ; TEL : voir plus loin

Demande d'étude *morphologique de :*

Muscle – nerf – peau- et/ ou conjonctive

Maladies neuromusculaires :

Une *biopsie musculaire* peut être adressée pour examen histopathologique exclusivement lorsqu'il s'agit de :

- myopathies congénitales
- dystrophies musculaires
- myopathies métaboliques
- myopathies inflammatoires (polymyosite, dermatomyosite, « inclusion body myositis »)

Pour ce qui concerne la *biopsie de nerf* et les neuropathies périphériques, nous examinons les amyloïdoses et les vasculites. Pour les neuropathies héréditaires avec examen d'ADN préalable, prière de contacter le Pr. Peter De Jonghe (03 821 33 45).

Personnes de contact:

Biopsies réalisées à l'hôpital universitaire d'Antwerpen, UZAntwerpen :

- Uniquement sur rendez-vous par l'intermédiaire du Centre de Référence

Neuromusculaire de l'UZA (Neuromusculair Refereer Centrum-UZA) avec

- Mme Iris Smouts (infirmière sociale) 03 821 45 08
- Pr. Peter De Jonghe 03 821 33 45

Biopsies envoyées directement au laboratoire : à condition de :

- Prévenir avec indications préalables motivant une biopsie : Pr. C. Ceuterick-de Grootte (03 265 25 96), au moins une semaine à l'avance.
- En cas d'absence : les laboratoires : 03 265 26 12 (Mme L. De Wit, Mme K. Sterck ou Mme E. Peeters)

Protocole d'envoi :

Lorsque la biopsie est réalisée, prière d'avertir les laboratoires de l'envoi.

Afin de faciliter l'examen histopathologique, nous vous prions de:

- Envoyer un **rapport médical synthétique** + examens complémentaires.
- Suivre rigoureusement les directives techniques des laboratoires.
- Préciser le lieu de la biopsie (par exemple: Muscle jambier antérieur droit; Nerf sural gauche)
- Mentionner le nom et l'adresse des personnes qui souhaitent recevoir une réponse.
- Fournir **une vignette** avec numéro de matricule et d'inscription, mutuelle, date de naissance et adresse du patient.
- Remettre les biopsies à l'adresse suivante :

Laboratoire de Neuopathologie Ultrastructurale (+ Morphologie neuromusculaire)

Bâtiment T- UA; rez-de-chaussée: locaux : 0.02 ou 0.04

Campus Drie Eiken (parking 4)

Universiteit Antwerpen, Universiteitsplein 1, 2610 WILRIJK

- Mentionner : parking 4 sur l'envoi si la biopsie est transportée par Taxipost.

- Ne pas remettre au service d'anatomopathologie ni à l'hôpital (= UZA)!

BIOPSIE MUSCULAIRE

Intervention:

- sous anesthésie sous-cutanée à la xylocaïne ou novocaïne
- dimensions du fragment musculaire:

(1) pour l'étude en microscopie photonique:

longueur: 2 cm

largeur: 1 cm

(2) pour l'étude en microscopie électronique:

longueur: 1 cm

largeur: 2 mm

Dissection et isolement:

- suivre le sens des fibres
- éviter toute traction sur les fibres (source d'artefacts gênant l'interprétation des lésions)
- isoler le fragment musculaire
- manipuler le fragment à ses extrémités
- utiliser de préférence une pince de Duval modifiée (sans barres horizontales parallèles) pour

le prélèvement destiné à la microscopie électronique et plonger la pince dans la solution de glutaraldéhyde durant 5 minutes pour assurer une fixation isométrique. Ouvrir ensuite la pince et placer le fragment dans le pot de fixateur. Les extrémités du muscle, pincées, seront éliminées au laboratoire et seule la partie centrale sera conservée.

Technique de fixation:

Le fragment destiné à l'étude en microscopie photonique (histoenzymologie et immunohistochimie) est placé immédiatement dans un récipient **vide** et fermé hermétiquement, reposant sur une couche de glaçons dans un thermos. Il doit être remis le plus rapidement possible au laboratoire (délai maximum souhaité: 1 heure)

Attention:

- **ne pas congeler le fragment musculaire dans l'azote liquide ou dans le CO₂**
- **le petit récipient doit rester sec (éviter l'infiltration de glace fondante)**
- **éviter le dessèchement)**

(2) Le fragment destiné à l'étude en microscopie électronique (10 mm x 2 mm) doit être fixé immédiatement en le plaçant dans une solution de glutaraldéhyde (voir préparation p. 8) à 4% à 4°C (pour une étude ultrastr. convention.). Pour un marquage immuno, contacter préalablement le laboratoire LUN.

Attention:

- **éviter le dessèchement et la congélation**
- **ne pas utiliser de solution physiologique**
- **mentionner le type de fixateur utilisé sur le récipient**
- **à remettre, sur couche de glaçons, dans un thermos, le plus rapidement au laboratoire (maximum 2 heures) ou sinon (voir plus loin p. 7)**

(3) Etude immunohistochimique en microscopie électronique: sur indication stricte et après discussion avec le Prof. dr. C. Ceuterick; demander les instructions spéciales de vive voix et, en général, une telle technique doit se réaliser *sous contrôle direct*, à l'Hôpital Universitaire d'Anvers.

BIOPSIE DE NERF PERIPHERIQUE

Cette biopsie concerne un nerf sensitif, le nerf sural (éventuellement le nerf fibularis superficialis ou une branche sensitive du nerf radial, mais sur indication stricte). Une biopsie de nerf ne doit être effectuée que pour des indications bien posées, car les dysesthésies post-biopsie et l'anesthésie permanente provoquées ne sont pas toujours négligeables.

Intervention:

Elle se fait en arrière et au-dessus de la malléole externe. Il faut opérer une distinction entre le nerf sural et la veine saphena parva qui le croise. En principe la coloration blanche nacré du nerf est différente de la couleur bleutée de la veine. Les branches de division du nerf se situent dans le prolongement du tronc nerveux tandis que les branches de la veine se jettent plus ou moins perpendiculairement sur cette dernière. Néanmoins si le nerf est démyélinisé ou la veine thrombosée, les repères peuvent changer. Il est conseillé d'infiltrer la partie proximale du nerf avec une aiguille fine avant de le sectionner afin d'éviter un sursaut du malade. Il ne faut cependant pas viser à une anesthésie complète du nerf car les dysesthésies atténuées ressenties lors de la section aideront à confirmer qu'il s'agit bien du nerf.

- sous anesthésie locale à la xylocaïne ou novocaïne
- dimensions du fragment: 2 1/2 cm à diviser en 2 fragments:
 - (1) pour l'étude en microscopie photonique: 3 cm
 - (2) pour l'étude en microscopie électronique: 2 cm
 - (3) éventuellement fragment congelé en tube stérile 1 cm (pr la génétique)

Prélèvement:

- au moyen d'une pince sans griffes
 - sectionner la partie proximale (après anesthésie), ensuite la partie distale
 - (a) une section complète du nerf est à conseiller
 - (b) une biopsie fasciculaire: entraîne plus de complications

Technique de fixation:

(1) Le fragment destiné à l'étude en microscopie photonique (histoenzymologie et immunohistochimie) est placé immédiatement dans un récipient **vide** et fermé hermétiquement, reposant sur une couche de glaçons dans un thermos. Il doit être remis le plus rapidement possible au laboratoire (maximum 1 heure)

Attention:

- ne pas congeler le fragment dans l'azote liquide ou dans le CO₂
 - le petit récipient doit rester sec (éviter l'infiltration de glace fondante)
 - éviter le dessèchement
- (2) Le fragment destiné à l'étude en microscopie électronique: 10 mm x 2 mm doit être **fixé** immédiatement en le plaçant dans

- une solution de glutaraldehyde à 4% (voir préparation p. 6) à 4°C (pour une étude ultrastructurale conventionnelle)

(3) Pour l'étude génétique : contacter préalablement le Pr V. Timmerman (03 265 10 24)

Attention:

- éviter le dessèchement et la congélation
- **ne pas utiliser de solution physiologique**
- mentionner le type de fixateur utilisé sur le récipient
- remettre, sur couche de glaçons, dans un thermos, le plus rapidement au laboratoire (maximum 2 heures) ou sinon (voir plus loin p. 6)

BIOPSIE DE PEAU et/ou de CONJONCTIVE

Prélèvement: technique de « punch »

Un fragment de **peau** (dimensions maximales: 1 mm x 1 mm x 5 mm) est prélevé généralement au niveau de l'épaule ou dans le creux axillaire (si l'examen des glandes sudoripares s'avère indispensable dans la maladie de Lafora ou une « polyglucosan body disease ») après anesthésie sous-cutanée à la xylocaïne 1%.

La peau est soulevée au moyen d'une aiguille et découpée avec un bistouri. Aucune suture n'est nécessaire. La plaie est refermée à l'aide de "steristrips".

Après anesthésie locale la biopsie de **conjonctive** (quelques mm de grandeur) est effectuée à la pince et aux ciseaux. Aucune suture n'est nécessaire.

Technique:

Le fragment de peau ou de conjonctive est placé *immédiatement* dans le **fixateur**: une solution de **glutaraldéhyde** (voir préparation p. 6) à 4% en tampon phosphate à 4°C. Il peut-être remis au laboratoire en-déans les 2 heures qui suivent l'intervention. Ne pas immerger la biopsie dans une solution physiologique!!

Aussinon:

Après 2 heures de fixation (à 4°C), découper* le tissu en plusieurs petits fragments (1 mm x 1 mm x 2 mm) que l'on laisse encore une fois 2 heures dans le fixateur.

Donc au total 4 heures de fixation.

Au laboratoire, le tissu est découpé perpendiculairement au moyen d'une lame de rasoir afin d'inclure simultanément dans un seul morceau l'épiderme, le derme et l'hypoderme.

Ensuite rincer les fragments en les plaçant dans une solution de tampon Millonig additionné de 270 mg-D-glucose pour 50 ml de tampon. L'on renouvelle cette solution de rinçage au bout de 24 heures. Les fragments peuvent y séjourner pendant quelques jours (maximum 3 semaines)

- à la température du réfrigérateur
- ou dans un thermos rempli de glaçons pour un éventuel transport

Immunohistochimie en microscopie électronique à convenir par avance avec Prof. Dr. C. Ceuterick

Préparation des solutions pour la microscopie électronique

Tampon Millonig 0.1 M; pH 7.4 (tampon PO₄) à conserver à 4°C.

Ce tampon est composé de:

1. solution A : 2.26 gr. NaH₂PO₄ 1H₂O/ 100 ml H₂O bidistil.
ou 2.546 gr. NaH₂PO₄ 2H₂O/ 100 ml H₂O bidistil.

2. solution B : 2.52 gr. NaOH/ 100 ml H₂O bidistil.

tampon : 83 ml solution A
+ 17 ml solution B

100 ml tampon Millonig à pH 7.4

Ce tampon doit être ajusté à pH 7.4 avec l'une ou l'autre des 2 solutions

Fixateur glutaraldéhyde = gluta (GA) à conserver à 4°C.

ampoule de 2 ml de gluta 70% à diluer dans
----- 4%
33 ml de tampon Millonig 0.1 M

Vérifier le pH; si nécessaire ajuster avec l'une ou l'autre solution du tampon Millonig.
La gluta se conserve environ 2 semaines à condition de revérifier le pH.

Fixateur paraformaldéhyde (PF) à conserver à 4°C.

Préparer 4 gr. de paraformaldéhyde pour 100 ml de tampon Millonig sur plaque chauffante avec un agitateur magnétique.

Si la solution n'est pas limpide:

ajouter quelques gouttes de NaOH 0.1N + 0.7 ml glutaraldéhyde à 70%

La solution doit être ajustée à pH 7.4

La Glutaraldéhyde peut être commandée au:

Comptoir Scientifique Belge pvba CSB Veldstraat 20B-1860 Meise TEL: 02/ 269. 26. 93

Glutaraldéhyde de LADD: réf. 20100 cfr Ladd catalog

concentration 70% ampoules de 2ml dans une boîte de 10 ampoules

En résumé

Une biopsie de muscle et/ ou de nerf doit comprendre 2 ou 3 fragments:

1 fragment "à sec" dans un récipient vide pour **étude histoenzymologique et immunohistochimique**. Donc ne pas congeler le fragment ou ne pas l'immerger dans un fixateur ou sérum physiologique.

1 fragment pour étude en microscopie électronique. Fixer immédiatement en glutaraldéhyde. Ne pas utiliser de solution physiologique.

Dans certains cas particuliers, une étude immunohistochimique peut être réalisée en microscopie électronique sur un troisième fragment. Puisqu'il s'agit d'une technique très délicate et que les indications sont très précises, il faut s'informer directement auprès du Prof. Dr. C. Ceuterick

Envoi des résultats

Biopsie avec histoire clinique complète, formulaire de demande d'examen et vignette administrative (patient/e):

- 1. Protocole d' étude histoenzymologique: endéans les 8 jours qui suivent la réception de la biopsie (en dehors des périodes classiques de vacances).**
 - 2. Protocole d' étude immunohistochimique: endéans les 15 jours qui suivent la réception de la biopsie (en dehors des périodes classiques de vacances).**
 - 3. Protocole d'étude en microscopie électronique: délai de 3 à 6 mois en fonction des résultats en microscopie photonique et/ou des indications cliniques.**
-