



HAL
open science

Intérêt de la microscopie confocale ex vivo en mode combiné et coloration digitale dans la caractérisation préopératoire des carcinomes basocellulaires

Blanche Bergeret

► **To cite this version:**

Blanche Bergeret. Intérêt de la microscopie confocale ex vivo en mode combiné et coloration digitale dans la caractérisation préopératoire des carcinomes basocellulaires. Médecine humaine et pathologie. 2020. dumas-03041123

HAL Id: dumas-03041123

<https://dumas.ccsd.cnrs.fr/dumas-03041123>

Submitted on 4 Dec 2020

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.



Distributed under a Creative Commons Attribution - NonCommercial - ShareAlike 4.0 International License

UNIVERSITE DE MONTPELLIER
FACULTE DE MEDECINE MONTPELLIER-NIMES

THESE

Pour obtenir le titre de

DOCTEUR EN MEDECINE

Présentée et soutenue publiquement

Par

Blanche BERGERET

Le 06 Octobre 2020

INTERET DE LA MICROSCOPIE CONFOCALE EX VIVO EN MODE COMBINE
ET COLORATION DIGITALE DANS LA CARACTERISATION PREOPERATOIRE
DES CARCINOMES BASOCELLULAIRES

Directeur de thèse : Professeur Pierre-Emmanuel STOEBNER

JURY

Président : M. Pierre-Emmanuel STOEBNER	Professeur
Asseseurs :	
M. Laurent MEUNIER	Professeur
M. Pascal ROGER	Professeur
Mme Farzaneh MASSET	Docteur
Membre invité :	
M. Thierry LAVABRE-BERTRAND	Professeur

UNIVERSITE DE MONTPELLIER
FACULTE DE MEDECINE MONTPELLIER-NIMES

THESE

Pour obtenir le titre de
DOCTEUR EN MEDECINE

Présentée et soutenue publiquement

Par

Blanche BERGERET

Le 06 Octobre 2020

INTERET DE LA MICROSCOPIE CONFOCALE EX VIVO EN MODE COMBINE
ET COLORATION DIGITALE DANS LA CARACTERISATION PREOPERATOIRE
DES CARCINOMES BASOCELLULAIRES

Directeur de thèse : Professeur Pierre-Emmanuel STOEBNER

JURY

Président : M. Pierre-Emmanuel STOEBNER	Professeur
Assesseurs :	
M. Laurent MEUNIER	Professeur
M. Pascal ROGER	Professeur
Mme Farzaneh MASSET	Docteur
Membre invité :	
M. Thierry LAVABRE-BERTRAND	Professeur

ANNEE UNIVERSITAIRE 2019 - 2020

PERSONNEL ENSEIGNANT

Professeurs Honoraires

ALLIEU Yves	CALLIS Albert	JAFFIOL Claude	NAVRATIL Henri
ALRIC Robert	CANAUD Bernard	JANBON Charles	OTHONIEL Jacques
ARNAUD Bernard	CHAPTAL Paul-André	JANBON François	PAGES Michel
ASTRUC Jacques	CIURANA Albert-Jean	JARRY Daniel	PEGURET Claude
AUSSILLOUX Charles	CLOT Jacques	JOURDAN Jacques	PELISSIER Jacques
AVEROUS Michel	COSTA Pierre	LAFFARGUE François	POUGET Régis
AYRAL Guy	D'ATHIS Françoise	LALLEMANT Jean Gabriel	PUJOL Henri
BAILLAT Xavier	DEMAILLE Jacques	LAMARQUE Jean-Louis	RABISCHONG Pierre
BALDET Pierre	DESCOMPS Bernard	LAPEYRIE Henri	RAMUZ Michel
BALDY-MOULINIER Michel	DIMEGLIO Alain	LE QUELLEC Alain	RIEU Daniel
BALMES Jean-Louis	DUBOIS Jean Bernard	LESBROS Daniel	ROCHFORT Henri
BALMES Pierre	DUJOLS Pierre	LOPEZ François Michel	ROUANET DE VIGNE LAVIT Jean Pierre
BANSARD Nicole	DUMAS Robert	LORIOT Jean	SAINT AUBERT Bernard
BAYLET René	DUMAZER Romain	LOUBATIERES Marie Madeleine	SANCHO-GARNIER Hélène
BILLIARD Michel	ECHENNE Bernard	MAGNAN DE BORNIER Bernard	SANY Jacques
BLARD Jean-Marie	FABRE Serge	MARY Henri	SEGNARBIEUX François
BLAYAC Jean Pierre	FREREBEAU Philippe	MATHIEU-DAUDE Pierre	SENAC Jean-Paul
BLOTMAN Francis	GALIFER René Benoît	MEYNADIER Jean	SERRE Arlette
BONNEL François	GODLEWSKI Guilhem	MICHEL François-Bernard	SOLASSOL Claude
BOURGEOIS Jean-Marie	GRASSET Daniel	MION Charles	THEVENET André
BRUEL Jean Michel	GUILHOU Jean- Jacques	MION Henri	VIDAL Jacques
BUREAU Jean-Paul	HERTAULT Jean	MIRO Luis	VISIER Jean Pierre
BRUNEL Michel	HUMEAU Claude	NAVARRO Maurice	

Professeurs Emérites

ARTUS Jean-Claude	MARES Pierre
BLANC François	MAUDELONDE Thierry
BOULENGER Jean-Philippe	MAURY Michèle
BOURREL Gérard	MILLAT Bertrand
BRINGER Jacques	MONNIER Louis
CLAUSTRES Mireille	MOURAD Georges
DAURES Jean-Pierre	PREFAUT Christian
DAUZAT Michel	PUJOL Rémy
DAVY Jean-Marc	RIBSTEIN Jean
DEDET Jean-Pierre	SCHVED Jean-François
ELEDJAM Jean-Jacques	SULTAN Charles
GROLLEAU RAOUX Robe	TOUCHON Jacques
GUERRIER Bernard	UZIEL Alain
GUILLOT Bernard	VOISIN Michel
LANDAIS Paul	ZANCA Michel

Professeurs des Universités - Praticiens Hospitaliers

PU-PH de classe exceptionnelle

ALBAT Bernard	Chirurgie thoracique et cardiovasculaire
ALRIC Pierre	Chirurgie vasculaire ; médecine vasculaire (option chirurgie vasculaire)
BACCINO Eric	Médecine légale et droit de la santé
BASTIEN Patrick	Parasitologie et mycologie
BLAIN Hubert	Médecine interne ; gériatrie et biologie du vieillissement, médecine générale, addictologie
BONAFE Alain	Radiologie et imagerie médicale
CAPDEVILA Xavier	Anesthésiologie-réanimation et médecine péri-opératoire
CHAMMAS Michel	Chirurgie orthopédique et traumatologique
COLSON Pascal	Anesthésiologie-réanimation et médecine péri-opératoire
COMBE Bernard	Rhumatologie
COTTALORDA Jérôme	Chirurgie infantile
COUBES Philippe	Neurochirurgie
COURTET Philippe	Psychiatrie d'adultes ; addictologie
CRAMPETTE Louis	Oto-rhino-laryngologie
CRISTOL Jean Paul	Biochimie et biologie moléculaire
DE LA COUSSAYE Jean Emmanuel	Médecine d'urgence
DE WAZIERES Benoît	Médecine interne ; gériatrie et biologie du vieillissement, médecine générale, addictologie
DELAPORTE Eric	Maladies infectieuses ; maladies tropicales
DEMOLY Pascal	Pneumologie ; addictologie
DOMERGUE Jacques	Chirurgie viscérale et digestive
DUFFAU Hugues	Neurochirurgie
ELIAOU Jean François	Immunologie
FABRE Jean Michel	Chirurgie viscérale et digestive
FRAPIER Jean-Marc	Chirurgie thoracique et cardiovasculaire
HAMAMAH Samir	Biologie et Médecine du développement et de la reproduction ; gynécologie médicale

HERISSON Christian	Gynécologie-obstétrique ; gynécologie médicale
JABER Samir	Médecine physique et de réadaptation
JEANDEL Claude	Anesthésiologie-réanimation et médecine péri-opératoire
JONQUET Olivier	Médecine interne ; gériatrie et biologie du vieillissement, médecine générale, addictologie
JORGENSEN Christian	Médecine intensive-réanimation
KOTZKI Pierre Olivier	Thérapeutique ; médecine d'urgence ; addictologie
LABAUGE Pierre	Biophysique et médecine nucléaire
LARREY Dominique	Neurologie
LEFRANT Jean-Yves	Gastroentérologie ; hépatologie ; addictologie
LUMBROSO Serge	Anesthésiologie-réanimation et médecine péri-opératoire
MARTY-ANE Charles	Biochimie et Biologie moléculaire
MERCIER Jacques	Chirurgie thoracique et cardiovasculaire
MESSNER Patrick	Physiologie
MONDAIN Michel	Cardiologie
MORIN Denis	Oto-rhino-laryngologie
PAGEAUX Georges-Philippe	Pédiatrie
PUJOL Pascal	Gastroentérologie ; hépatologie ; addictologie
QUERE Isabelle	Biologie cellulaire
RENARD Eric	Chirurgie vasculaire ; médecine vasculaire (option médecine vasculaire)
REYNES Jacques	Endocrinologie, diabète et maladies métaboliques ; gynécologie médicale
RIPART Jacques	Maladies infectieuses, maladies tropicales
ROUANET Philippe	Anesthésiologie-réanimation et médecine péri-opératoire
SOTTO Albert	Cancérologie ; radiothérapie
TAOUREL Patrice	Maladies infectieuses ; maladies tropicales
VANDE PERRE Philippe	Radiologie et imagerie médicale
YCHOU Marc	Bactériologie-virologie ; hygiène hospitalière
	Cancérologie ; radiothérapie

PU-PH de 1^{re} classe

AGUILAR MARTINEZ Patricia	Hématologie ; transfusion
ASSENAT Éric	Gastroentérologie ; hépatologie ; addictologie
AVIGNON Antoine	Nutrition
AZRIA David	Cancérologie ; radiothérapie
BAGHDADLI Amaria	Pédopsychiatrie ; addictologie
BEREGI Jean-Paul	Radiologie et imagerie médicale
BLANC Pierre	Gastroentérologie ; hépatologie ; addictologie
BORIE Frédéric	Chirurgie viscérale et digestive
BOULOT Pierre	Gynécologie-obstétrique ; gynécologie médicale
CAMBONIE Gilles	Pédiatrie
CAMU William	Neurologie
CANOVAS François	Anatomie
CAPTIER Guillaume	Anatomie
CARTRON Guillaume	Hématologie ; transfusion
CAYLA Guillaume	Cardiologie
CHANQUES Gérard	Anesthésiologie-réanimation et médecine péri-opératoire
CORBEAU Pierre	Immunologie
COSTES Valérie	Anatomie et cytologie pathologiques
COULET Bertrand	Chirurgie orthopédique et traumatologique
CYTEVAL Catherine	Radiologie et imagerie médicale
DADURE Christophe	Anesthésiologie-réanimation et médecine péri-opératoire
DAUVILLIERS Yves	Physiologie
DE TAYRAC Renaud	Gynécologie-obstétrique, gynécologie médicale
DE VOS John	Histologie, embryologie et cytogénétique
DEMARIA Roland	Chirurgie thoracique et cardio-vasculaire

DEREURE Olivier	Dermatologie - vénéréologie
DROUPY Stéphane	Urologie
DUCROS Anne	Neurologie
DUPEYRON Arnaud	Médecine physique et de réadaptation
FESLER Pierre	Médecine interne ; gériatrie et biologie du vieillissement, médecine générale, addictologie
GARREL Renaud	Oto-rhino-laryngologie
GENEVIEVE David	Génétique
HAYOT Maurice	Physiologie
KLOUCHE Kada	Médecine intensive-réanimation
KOENIG Michel	Génétique
LAFFONT Isabelle	Médecine physique et de réadaptation
LAVABRE-BERTRAND Thierry	Histologie, embryologie et cytogénétique
LAVIGNE Jean-Philippe	Bactériologie-virologie ; hygiène hospitalière
LE MOING Vincent	Maladies infectieuses ; maladies tropicales
LECLERCQ Florence	Cardiologie
LEHMANN Sylvain	Biochimie et biologie moléculaire
MARIANO-GOULART Denis	Biophysique et médecine nucléaire
MATECKI Stéfan	Physiologie
MEUNIER Laurent	Dermato-vénéréologie
MOREL Jacques	Rhumatologie
NAVARRO Francis	Chirurgie viscérale et digestive
NOCCA David	Chirurgie viscérale et digestive
PETIT Pierre	Pharmacologie fondamentale ; pharmacologie clinique ; addictologie
PERNEY Pascal	Médecine interne ; gériatrie et biologie du vieillissement, médecine générale, addictologie
PRUDHOMME Michel	Anatomie
PUJOL Jean Louis	Pneumologie ; addictologie
PURPER-OUAKIL Diane	Pédopsychiatrie ; addictologie

TOUITOU Isabelle

Génétique

TRAN Tu-Anh

Pédiatrie

VERNHET Hélène

Radiologie et imagerie médicale

PU-PH de 2ème classe

BOURDIN Amaud

Pneumologie ; addictologie

CANAUD Ludovic

Chirurgie vasculaire ; médecine vasculaire (option chirurgie vasculaire)

CAPDEVIELLE Delphine

Psychiatrie d'Adultes ; addictologie

CLARET Pierre-Géraud

Médecine d'urgence

COLOMBO Pierre-Emmanuel

Cancérologie ; radiothérapie

COSTALAT Vincent

Radiologie et imagerie médicale

CUVILLON Philippe

Anesthésiologie-réanimation et médecine péri-opératoire

DAIEN Vincent

Ophtalmologie

DORANDEU Anne

Médecine légale et droit de la santé

FAILLIE Jean-Luc

Pharmacologie fondamentale ; pharmacologie clinique ; addictologie

FUCHS Florent

Gynécologie-obstétrique ; gynécologie médicale

GABELLE DELOUSTAL Audrey

Neurologie

GAUJOUX Viala Cécile

Rhumatologie

GODREUIL Sylvain

Bactériologie-virologie ; hygiène hospitalière

GUILLAUME Sébastien

Psychiatrie d'adultes ; addictologie

GUILPAIN Philippe

Médecine Interne, gériatrie et biologie du vieillissement; addictologie

GUIU Boris

Radiologie et imagerie médicale

HERLIN Christian

Chirurgie plastique, reconstructrice et esthétique, brulologie

HOUEDE Nadine

Cancérologie ; radiothérapie

JACOT William

Cancérologie ; Radiothérapie

JUNG Boris

Médecine intensive-réanimation

KALFA Nicolas

Chirurgie infantile

KOUYOUMDJIAN Pascal	Chirurgie orthopédique et traumatologique
LACHAUD Laurence	Parasitologie et mycologie
LALLEMANT Benjamin	Oto-rhino-laryngologie
LE QUINTREC DONNETTE Moglie	Néphrologie
LETOUZEY Vincent	Gynécologie-obstétrique ; gynécologie médicale
LONJON Nicolas	Neurochirurgie
LOPEZ CASTROMAN Jorge	Psychiatrie d'Adultes ; addictologie
LUKAS Cédric	Rhumatologie
MAURY Philippe	Chirurgie orthopédique et traumatologique
MILLET Ingrid	Radiologie et imagerie médicale
MORANNE Olivier	Néphrologie
MURA Thibault	Biostatistiques, informatique médicale et technologies de la communication
NAGOT Nicolas	Biostatistiques, informatique médicale et technologies de la communication
PANARO Fabrizio	Chirurgie viscérale et digestive
PARIS Françoise	Biologie et médecine du développement et de la reproduction ; gynécologie médicale
PASQUIE Jean-Luc	Cardiologie
PELLESTOR Franck	Histologie, embryologie et cytogénétique
PEREZ MARTIN Antonia	Chirurgie vasculaire ; médecine vasculaire (option médecine vasculaire)
POUDEROUX Philippe	Gastroentérologie ; hépatologie ; addictologie
RIGAU Valérie	Anatomie et cytologie pathologiques
RIVIER François	Pédiatrie
ROGER Pascal	Anatomie et cytologie pathologiques
ROSSI Jean François	Hématologie ; transfusion
ROUBILLE François	Cardiologie
SEBBANE Mustapha	Médecine d'urgence
SIRVENT Nicolas	Pédiatrie
SOLASSOL Jérôme	Biologie cellulaire



STOEBNER Pierre	Dermato-vénéréologie
SULTAN Ariane	Nutrition
THOUVENOT Éric	Neurologie
THURET Rodolphe	Urologie
VENAIL Frédéric	Oto-rhino-laryngologie
VILLAIN Max	Ophtalmologie
VINCENT Denis	Médecine interne ; gériatrie et biologie du vieillissement, médecine générale, addictologie
VINCENT Thierry	Immunologie
WOJTUSCISZYN Anne	Endocrinologie-diabétologie-nutrition

PROFESSEURS DES UNIVERSITES

1^{re} classe :

COLINGE Jacques (Cancérologie, Signalisation cellulaire et systèmes complexes)

2^{ème} classe :

LAOUDJ CHENIVESSE Dalila (Biochimie et biologie moléculaire)

VISIER Laurent (Sociologie, démographie)

PROFESSEURS DES UNIVERSITES - Médecine générale

1^{re} classe :

LAMBERT Philippe

2^{ème} classe :

AMOUYAL Michel

PROFESSEURS ASSOCIES - Médecine Générale

CLARY Bernard

DAVID Michel

GARCIA Marc

PROFESSEURS ASSOCIES - Médecine

BESSIS Didier (Dermato-vénéréologie)

MEUNIER Isabelle (Ophtalmologie)

MULLER Laurent (Anesthésiologie-réanimation et médecine péri-opératoire)

PERRIGAULT Pierre-François (Anesthésiologie-réanimation et médecine péri-opératoire)

QUANTIN Xavier (Pneumologie)

ROUBERTIE Agathe (Pédiatrie)

VIEL Eric (Soins palliatifs et traitement de la douleur)

Maîtres de Conférences des Universités - Praticiens Hospitaliers

MCU-PH Hors classe

BADIOU Stéphanie	Biochimie et biologie moléculaire
BOULLE Nathalie	Biologie cellulaire
CACHEUX-RATABOUL Valère	Génétique
CARRIERE Christian	Bactériologie-virologie ; hygiène hospitalière
CHARACHON Sylvie	Bactériologie-virologie ; hygiène hospitalière
FABBRO-PERAY Pascale	Epidémiologie, économie de la santé et prévention
GIANSILY-BLAIZOT Muriel	Hématologie ; transfusion
HILLAIRE-BUYS Dominique	Pharmacologie fondamentale ; pharmacologie clinique ; addictologie
PUJOL Joseph	Anatomie
RICHARD Bruno	Médecine palliative
RISPAIL Philippe	Parasitologie et mycologie
SEGONDY Michel	Bactériologie-virologie ; hygiène hospitalière

MCU-PH de 1^{re} classe

BERTRAND Martin	Anatomie
BOUDOUSQ Vincent	Biophysique et médecine nucléaire
BOURGIER Céline	Cancérologie ; Radiothérapie
BRET Caroline	Hématologie biologique
COSSEE Mireille	Génétique
GIRARDET-BESSIS Anne	Biochimie et biologie moléculaire
LAVIGNE Géraldine	Hématologie ; transfusion
LESAGE François-Xavier	Médecine et Santé au Travail
MATHIEU Olivier	Pharmacologie fondamentale ; pharmacologie clinique ; addictologie
MENJOT de CHAMPFLEUR Nicolas	Radiologie et imagerie médicale
MOUZAT Kévin	Biochimie et biologie moléculaire
OLIE Emilie	Psychiatrie d'adultes ; addictologie
PANABIERES Catherine	Biologie cellulaire
PHILIBERT Pascal	Biologie et médecine du développement et de la reproduction ; gynécologie médicale
RAVEL Christophe	Parasitologie et mycologie
SCHUSTER-BECK Iris	Physiologie
STERKERS Yvon	Parasitologie et mycologie
THEVENIN-RENE Céline	Immunologie
TUAILLON Edouard	Bactériologie-virologie ; hygiène hospitalière

MCU-PH de 2^{ème} classe

CHIRIAC Anca	Immunologie
DE JONG Audrey	Anesthésiologie-réanimation et médecine péri-opératoire
DU THANH Aurélie	Dermato-vénérologie
GOUZI Farès	Physiologie

HERRERO Astrid

Chirurgie viscérale et digestive

JEZIORSKI Éric

Pédiatrie

KUSTER Nils

Biochimie et biologie moléculaire

MAKINSON Alain

Maladies infectieuses, Maladies tropicales

PANTEL Alix

Bactériologie-virologie ; hygiène hospitalière

PERS Yves-Marie

Thérapeutique; addictologie

ROUBILLE Camille

Médecine interne ; gériatrie et biologie du vieillissement ;
addictologie

SZABLEWSKY

Anatomie et cytologie pathologiques

Maîtres de Conférences des Universités - Médecine Générale

MCU-MG de 1^{re} classe

COSTA David

MCU-MG de 2^{ème} classe

FOLCO-LOGNOS Béatrice

OUDE ENGBERINK Agnès

Maîtres de Conférences associés - Médecine Générale

LOPEZ Antonio

MILLION Elodie

PAVAGEAU Sylvain

REBOUL Marie-Catherine

SERAYET Philippe

Praticiens Hospitaliers Universitaires

BARATEAU Lucie	Physiologie
BASTIDE Sophie	Epidémiologie, économie de la santé et prévention
DAIEN Claire	Rhumatologie
GATINOIS Vincent	Histologie, embryologie et cytogénétique
GOULABCHAND Radjiv	Médecine interne ; gériatrie et biologie du vieillissement ; addictologie
LATTUCA Benoit	Cardiologie
MIOT Stéphanie	Médecine interne ; gériatrie et biologie du vieillissement ; addictologie
PINETON DE CHAMBRUN Guillaume	Gastroentérologie ; hépatologie ; addictologie
SOUCHE François-Régis	Chirurgie viscérale et digestive

REMERCIEMENTS

A mon directeur de thèse et Président du jury, Monsieur le Professeur Pierre-Emmanuel STOEBNER :

Merci pour tout Pierre, de m'avoir pris sous votre aile, de m'avoir fait confiance, de m'avoir offert la possibilité de faire un master 2, participer à des congrès, d'avoir dirigé cette thèse, mon mémoire, et de m'avoir proposé le poste de chef de clinique. Je vous en suis très reconnaissante. Merci pour votre accessibilité et votre disponibilité rassurante. Je suis très honorée de pouvoir travailler dans votre service d'ici quelques semaines.

A Monsieur le Professeur Laurent MEUNIER :

Merci pour votre gentillesse, votre disponibilité en tant que professeur et coordonnateur de DES. Vous avez accepté avec grande amabilité de siéger à mon jury de thèse. Permettez-moi de vous remercier et de vous témoigner respectueusement ma reconnaissance.

A Monsieur le Professeur Pascal ROGER :

Merci de m'avoir ouvert les portes du service d'anatomopathologie, je vous suis reconnaissante de l'attention que vous avez bien voulu porter à ma thèse et de faire partie du jury, je vous prie d'accepter mes remerciements.

A Madame le Docteur Farzaneh MASSET :

Merci pour votre investissement et votre contribution avisée et dévouée, sans lesquels je n'aurai jamais pu rendre ce travail, ce qui m'a permis en outre d'apprendre davantage en anatomopathologie. Je vous exprime toute ma reconnaissance pour votre aide précieuse, et je suis honorée que vous ayez accepté de faire partie du jury.

A Monsieur le Professeur Le Professeur Thierry LAVABRE-BERTRAND :

Vous me faites l'honneur de juger ce travail, je vous en remercie et vous assure, Monsieur, de mon profond respect.

A mes amies de l'école, du collège et du lycée :

A Sophie C, Chloé, Sophie M, Flore, merci pour toutes ces années de joie, de parties de rire, de week-ends chez les unes chez les autres : À Sophie C que je connais depuis le berceau et où nous nous sommes retrouvées au collège, fondation de notre amitié qui maintenant me permet de savoir que je peux compter sur toi en chaque instant surtout en cette période si...délicate. Merci à Richard de combler Sophie, que vous êtes beaux tous les trois avec Roman (le premier de notre troupe !) qui illumine vos vies de jour en jour. A Chloé dont j'ai été le souffre-douleur pendant toutes ces années de collège ;) où nous passions des vacances à Nice aux granges à rire non-stop sauf quand j'attendais que tu te réveilles de tes longues grasses mat', merci Chloé pour ta gentillesse ton écoute ton humour et ta connaissance musicale qui m'impressionnera toujours, vous faites bien la paire avec Benoit ! A Sophie M que j'ai rencontré en seconde et où nous avons renforcé notre amitié en P1, cela me paraît loin tous ces moments à faire la queue le matin devant les amphithéâtres, merci pour ta douceur, ta perspicacité, et ta bonne humeur toujours présente et merci à Romain le meilleur brasseur de bière de Bourgogne même si ça fait très très longtemps que je n'en ai pas goûté là! Merci à Flore pour ton sens de l'humour, ton honnêteté et ta culture en cinoche, merci à Vincent de te rendre heureuse merci à ton papa avec qui j'avais pu aller en consultation en gastro, ça remonte à lonngtemps!

Que je suis contente Virginie qu'on ait réussi à maintenir un lien depuis la maternelle (à distance depuis de longues années), merci à toi pour ces coups de fils réguliers. Je te souhaite du courage pour la suite de la grossesse, l'attente est longue mais tu verras le jeu en vaut la chandelle !

A mes amis de l'externat :

A Clotilde, tati Clot', Clot', enfin maintenant à nouveau tati Clot'. Que serai-je devenue en début de deuxième année si je ne t'avais pas rencontrée dans le bus qui montait à la fac ? Je ne serai certainement pas celle que je suis maintenant. Merci Clot' pour tout ce que tu m'as apporté pendant ces 5 années, pour ces parties de fou rires (Madame jecassemontalondansl'esacallierdelaBU), de shopping à DijonCity, de gossips un peu quand-même, et pour cette amitié profonde simple et sincère. Merci à Antoine de rendre heureuse ma Clot' qui le mérite !!

Merci à Flora, pour ta gentillesse, ta bonne humeur et ta ponctualité légendaire qui nous fait sentir nous toujours à l'heure ;) pour ces vacances de ski aux Gets trop cool, nos moments décompression pendant l'externat, la Tour du Pin où on a passé de formidables journées.

Merci à Marie Battault pour ton écoute, discuter, analyser, décrypter avec toi est toujours un plaisir et un moment d'amitié profonde. Nous n'aurions jamais fait le 4L trophy si nos motivations mutuelles ne nous avaient pas entraîné dans cette inoubliable aventure ! Merci aussi pour avoir permis de goûter à la dolce vita Belle-Iloise et ces supers vacances en Thaïlande avec Guillaume et Tong. Un grand bravo à Ludo d'avoir réussi à te faire supporter la vie Stéphanoise pendant quelques temps.

Merci à Valou, ta force de caractère m'impressionnera toujours, tu es une amie sur qui on peut compter, je pense notamment à la Malaisie, ou lors des coups de mou de révisions ou de footing! Vous formez un très beau couple marié avec Carlo.

Merci à Mel, quelle belle famille vous formez avec Karim, Amine et la petite Sofia trop mimi. Merci à Kek, pour avoir en chaque situation le mot pour rire et pour les colles en D4 qui restaient toujours un moment agréable. Merci à Etienne pour nous avoir accueilli quasi toute l'année pour ces colles.

Merci à Carole et aux stages qui m'ont permis de te rencontrer, on se soutenait mutuellement puis on s'est suivi à Montpellier ce qui était mine de rien bien rassurant.

A mes co-internes de stage :

Par ordre chronologique je me dois de commencer par Simon, on s'est parlé pour la première fois au WEI, savoir que l'on allait passer 6 mois au fin fond du MIG2 à Perpignan nous a rapproché et cela m'a permis de rencontrer Elodie et vous êtes maintenant un couple d'ami précieux en plus spécialisé en dessert ce qui n'est pas pour me déplaire !

Merci à Marie Du Cailar, je suis heureuse d'avoir pu faire ta connaissance en CMF et merci de m'avoir fait découvrir Blacksad, j'espère qu'on aura l'occasion de repasser du temps ensemble.

Merci à Gabriel, pour ta gentillesse, c'était très agréable de travailler avec toi et merci de rendre Valentine F heureuse.

Merci à Seb, je suis contente qu'on ait réussi à garder un lien malgré le fait que tu sois partis dans des « contrées lointaines », passer du temps avec toi est toujours un moment convivial et très sympa.

A mes co-internes de dermato :

Entrer dans la dermato team, ce n'est pas rien, il faut s'y préparer et ne pas avoir froid aux yeux mais on s'amuse bien. Qu'est-ce qu'on a pu rigoler en préparant la revue de PES.

Je me rappelle de ce premier jour d'accueil où Monsieur Dereure nous a expliqué comment se passe la dermato à Montpellier. Nous étions tout timides les uns les autres, Sarah je me rappelle que tu rentrais de justesse d'Indonésie je crois ? Vous n'aviez pas récupéré vos valises avec Eliott, donc tu t'étais acheté des vêtements à l'arrache juste avant de venir. Je suis heureuse d'avoir partagé le bureau d'HC en dermato à Nîmes pendant 3 mois, où l'on a appris à se connaître, merci pour ton soutien indéfectible et les moments drôles et cocasses qu'on a pu avoir. Notre amitié s'est ensuite prolongée notamment lors des repas pique-nique le midi quand j'étais en master 2. Discuter avec toi est toujours facile et enrichissant. Il me tarde de voir votre maison avec Eliott qui j'en suis sûre va être aménagée et décorée dans un goût qui vous correspond et qu'on enviera tous ! Merci à Camille, pour ta gentillesse, ton humour et ton honnêteté, j'apprécie vraiment les moments qu'on passe ensemble, je regrette qu'il y en ait trop peu tout comme je regrette de n'avoir jamais été stage avec toi. J'ai hâte de voir nos fils jouer ensemble, merci à Yann de rendre Camille heureuse, elle le mérite !! Merci Alex, pour ton franc-parler, tu aurais pu être notre porte-parole pendant toutes ces années d'ailleurs, vous formez une très belle famille tous les trois avec Chloé et la petite Lucie trop mimi. Et puis merci à Emilie, la plus courageuse de nous 5, le temps

passer vite tu as déjà fait 6 mois de chefferie bravo, je t'admire pour tout ce que tu arrives à faire, exceller dans ton métier, danser plusieurs soirs dans la semaine, aller à la piscine, être présente pour ta famille et pour Max.

Merci à Séverin et Quentin, je ne sais pas ce que j'aurai fait sans vous en HdJ à Montpellier, merci pour votre soutien. Merci à toi Séverin pour tes bons conseils, ta légèreté et ta façon de relativiser qui me permettait de décompresser, je suis heureuse de pouvoir te compter parmi mes amis. Merci à Quentin pour ta motivation au travail sans relâche communicative, ta disponibilité et tes supers playlists dans le bureau d'HdJ les après-midis.

Merci à tous mes autres co-internes de dermato avec qui j'ai pu être en stage, Méloche pour ta gentillesse et ta spontanéité, à Hugo, Léo-Paul, Laura, Marion qui m'a été d'une aide précieuse lorsque j'ai découvert le monde de la consultation en dermatologie. Merci à Agathe, j'aurai aimé être en stage avec toi, ta douceur, ta gentillesse et ton écoute n'ont pas d'égal.

Merci à mes chefs :

Michel, Myriam, Monsieur Dereure, Monsieur Guillot, Didier, Céline, Aurélie, Justine, Anne-So, Vincent pour vos savoirs et vos enseignements. Je suis très heureuse de pouvoir travailler avec toi Myriam par la suite et apprendre encore à tes côtés. Merci à toi Bernadette pour ta gentillesse ta volonté d'apprentissage ta disponibilité sans faille, et ta motivation permanente à faire des biopsies pour ma thèse ! C'était un réel plaisir d'avoir pu être ton interne. Merci à toi François, pour ton enseignement, tes conseils, ta rigueur exemplaire dans le travail et de m'avoir autant aidé pour mon mémoire.

A mes futures co-chefs, Annelies et Clothilde, en tant que chefs vous étiez trop chouettes, je pense que ça va être encore mieux en tant que co-chefs! Merci à toi Annelies pour tous tes conseils de Maman et merci à toi Clothilde pour ta capacité à relativiser à m'avoir appris à dire NON.

Julie chef et amie, je pense bien à toi dans votre Canada lointain avec Jerem', j'espère pouvoir vous y retrouver avec Pierre-Emmanuel et Camille, on ne fera pas traverser l'Atlantique à Romy malheureusement... c'était vraiment un régal de t'avoir comme chef avec les mercredis aprem qui se prolongeaient en conversation sans forcément avoir de rapport avec la dermato.

Merci à tout le service de dermato de Nîmes, pour votre gentillesse, votre patience, et votre sympathie à mon égard. C'est un réel plaisir d'avoir pu travailler avec vous et que cela se prolonge. Merci à toutes les secrétaires, à toi Marie-O pour ton humour et tes façons bien à toi de recadrer les internes, à Annick pour ton franc-parler, à Cathy, pour tous ces trajets que l'on fait ensemble et qui me permet de te connaître de plus en plus, à Soraya pour ta douceur et ta gentillesse, à Cécile pour ton enthousiasme, travailler avec toi est un régal. Merci à Magali, pour ta motivation et ton envie d'apprendre qui rend le travail avec toi facile, merci à toi Françoise pour ton écoute et ton empathie, je suis certaine que tu vas t'épanouir en algologie. Merci à Aurélie, une seconde Maman, pour ton soutien et ton sixième sens qui détecte nos coups de mou. Merci à Clara pour ta bienveillance et ta gentillesse à l'égard des patients et des internes qui j'en suis sûre t'en sont extrêmement reconnaissants, merci à Manon pour ton efficacité et à Astrid pour tes supers connaissances qui rendent le travail plus simple et rapide. Merci à toi Magali B, j'aurai aimé pouvoir travailler davantage avec toi, je trouvais qu'on faisait une chouette

équipe de plaies et cicatrisations, je suis cependant heureuse que tu aies trouvé un poste qui te plait et te convient plus. Merci pour ta douceur, travailler avec toi était un réel plaisir, j'espère que l'on va arriver à garder contact.

Merci au groupe des Copains :

Sans Pierre-Emmanuel, je n'aurai jamais pu autant vous connaître. Merci à toi Marie Du Cheyron, que je suis heureuse de te compter parmi mes amies. J'ai été sincèrement honorée et flattée d'avoir été invitée à ton EVJF, même si finalement je n'y étais que par la pensée. Merci pour ton empathie, ton humour, ton enthousiasme, j'adore pouvoir discuter avec toi, c'est toujours un moment agréable et enrichissant. Merci à toi Bastien, vous faites un très beau couple tous les deux, et quelle belle surprise vous nous avez fait en nous annonçant votre mariage, on hâte de pouvoir le célébrer avec vous le 02/01/2021. Merci à Valentine Fehr, j'adore ton humour, merci pour ton écoute et ton attention. Merci à toi Constance, pour prendre de mes nouvelles régulièrement, pendant le confinement et puis après, merci pour ta douceur. Merci à Joanna et bravo à toi de supporter Nicolas, je plaisante, vous formez un beau couple tous les deux complémentaires. Merci à toi Marielle pour ta délicatesse et tes attentions. Merci à TibouChou d'être un aussi bon copain pour Pierre-Emmanuel, tu es vraiment le plus gentil, j'espère que tu vas continuer à nous offrir des cadeaux souvenirs de tes vacances et sache qu'il faudra en ramener un pour Camille dorénavant. Un seul regret, que tu n'aies pas été sélectionné pour Koh Lanta. Merci à Bastien J, Mathilde B, Grégoire, Clément, Pierre G, Mathilde Z, Carine, Miceal, Valentine W, Marie C, Isabel et à tous les autres Copains.

Merci à toi Claire, sans Pierre-Emmanuel, je pense que je n'aurais pas pu autant te connaître, ce qui aurait été un grand regret. Tu es une amie précieuse sur qui je peux compter. Les moments que l'on passe tous les quatre avec Thomas et Pierre-Emmanuel sont à chaque fois réjouissants et plaisants. Merci d'avoir patienté pour venir me rendre visite à la maternité en semi-fraude, une jolie preuve d'amitié.

A mes supers colocs :

A la villa, le premier jour n'était pas facile en commençant direct par une garde aux urgences le soir-même où je t'ai rencontré Camille, je t'avais appelé pour un de mes patients qui devaient certainement avoir un trouble ionique... j'avais trouvé ça rassurant de me dire que toi aussi tu étais de garde tout comme Martin d'ailleurs et Chloé. Merci à toi Camille, tu es un exemple pour tous et sur tous les plans, merci pour ton empathie à mon égard surtout quand Martin m'embête, pour ce super week-end à Tamariu que tu avais organisé à l'occasion de mon anniversaire mais pas que puisqu'on y avait fait une super chasse aux chocolats pour Pâques. Tu es une vraie amie sur qui l'on peut compter. Merci à toi Martin pour tes conseils, ta façon de voir les choses qui est parfois à mille lieues de la mienne ce qui me permet de relativiser et de dédramatiser, j'apprécie vraiment nos parties de jeux surtout quand tu perds (c'est tellement rare donc je m'en délecte !) merci pour ces moments passés à Pont d'Hérault ou chez vous à Montpellier. J'ai hâte de découvrir votre nouveau foyer à Bompas, comme j'ai hâte que bébé Camille puisse avoir un/une copine avec qui jouer quand on y sera... Merci à toi Cécile, la plus rapide de nous tous, ton écoute, ta sérénité, ta façon de simplifier les situations qui paraissent compliquées, tu es un exemple d'efficacité et de ponctualité. J'ai adoré avoir pu être ta colloc pendant 1 an. Merci à toi Emma, pour ton franc-parler, sans trop de retenue, c'est toujours un plaisir de discuter avec toi et je suis

impressionnée par tes connaissances botaniques. Merci à toi Chloé, pour tes supers goûts en termes de céréales, pour ta gentillesse.

A l'appartement de l'Amour à Perpi, Merci à toi Charlotte, quelle heureuse rencontre, le hasard fait bien les choses parfois. Il n'y en a pas deux comme toi. Merci pour toutes ces discussions qu'on a pu avoir, tous les lundis apéros avec Cécile, et toute cette vie de coloc à trois harmonieuse et géniale. Et un énorme merci pour avoir été une parfaite entremetteuse, Charlotte, sans toi je ne sais pas si j'aurais pu rencontrer Pierre-Emmanuel. Merci ensuite pour la coloc à deux à Nîmes qui a aussi renforcé notre amitié. Je suis heureuse de te compter parmi mes plus proches amies. Merci à toi Lorenzo, je pense qu'on peut dire la même chose, il n'y en a pas deux comme toi. C'est toujours un réel plaisir de passer du temps avec toi et merci de rendre Charlotte heureuse.

A Montpellier, Louna et Thomas vous m'avez accueilli chaleureusement je vous en remercie, merci à toi Louna pour ton organisation et la gestion de la vie courante, merci à Marine et Jess', j'ai vraiment apprécié passer ces 6 mois avec vous tous.

A ma belle-famille :

Merci à Sabine pour votre gentillesse, votre disponibilité et vos bons conseils, merci pour ces trois jours passés à Vergèze où vous nous avez bien soulagés et aidés, ce qui m'a permis de me détendre et ce n'était pas une mince affaire ! Merci à Christophe, Anne-Cécile, Nicolas, Aude, Delphine, Thomas, Claire, Alexandre et tous les petits-enfants. Vous m'avez accueilli si gentiment dans votre famille, vous m'avez fait me sentir à l'aise dès le début. Encore bravo pour cette reprise mémorable des inconnus pour nos fiançailles. Je suis heureuse que Camille puisse avoir une famille Giroudoudou aussi bienveillante et aimante avec pleins de cousins avec qui jouer.

A ma famille :

Merci à toi Rapha de m'avoir suivi pendant toutes ces années d'étude, tu m'as toujours prodigué des conseils avisés, merci pour ton écoute et tes mots toujours bien choisis, j'ai hâte que tu puisses rencontrer bébé Camille.

Merci à Jaja, pour ta présence, ta force de caractère et ton courage, tu es un exemple pour tous. Merci pour ces semaines douces et joyeuses à Coudrée qui débutaient les vacances d'été, je les attendais ces vacances.

Merci à Cécile et Ombeline, pour votre soutien dès le début de l'internat, je n'aurais pas choisi Montpellier si vous n'aviez pas été là, j'en suis vraiment heureuse parce que cela nous a permis de nous rapprocher. Merci pour votre disponibilité surtout au début où j'étais un peu perdue, j'étais rassurée de savoir que j'avais un port d'attache familial et familial sur lequel je pouvais compter.

A mes sœurs chéries, merci pour tout, vous m'avez été d'une aide plus que précieuse et d'un grand secours pendant ces longues années d'étude. Qu'est-ce que j'ai pu vous bassiner avec mes états d'âmes, mais vous avez toujours répondu avec patience, attention et tendresse. Merci à toi Marion de m'avoir accueilli pendant 1 an chez toi en P1, grâce à l'environnement que tu m'as offert pendant cette année, j'ai pu travailler comme je le souhaitais, ce qui a payé. Merci pour ces repas autour du monde, ta présence et ton soutien. Je souhaite que tu t'épanouisses dans ton activité professionnelle, dont j'aimerai bien profiter d'une séance au moins une fois... Merci à toi Alicette Coquillet, tu es rentrée dans nos vies en 2013, c'est là que j'ai pris conscience de

la définition du mot famille, et de la joie quand celle-ci s'agrandit. Merci à toi Claire, Maitre Glaire maintenant, que je suis fière de toi, tu le mérites plus que tout. Merci à toi pour ta disponibilité, tes conseils avisés dans tous les domaines de la vie parce que rappelons-le tu sais presque tout, et ta façon de me recadrer quand je dévie un peu. Merci à toi Jeanne, pour le bonheur que tu apportes à ta Maman et ton Papa ainsi qu'au reste de ta famille. Merci à toi Alexandre de rendre Claire heureuse, tu es un soutien indispensable pour elle, merci d'avoir accueilli Pierre-Emmanuel aussi bien, tu es un beau-frère hors pair.

Merci à mes parents, vous êtes tout. Sans votre entrain, votre soutien permanent et rassurant, votre bienveillance et votre amour je n'en serai pas là où j'en suis actuellement. Vous êtes un modèle pour moi de couple, d'éducation et de vie en général, je vous admire. Merci à toi Maman pour toutes les fois où je t'ai appelée en pleurs, tu as toujours su me réconforter et me calmer. Que j'aime rentrer à la maison, foyer doux et chaleureux grâce à toi Maman. Merci à toi Papa pour ton analyse et ta psychologie fine des gens et de la vie. Tu as toujours le mot qu'il faut pour chaque situation, j'adore pouvoir passer des moments rien que tous les deux, moments de partage et de discussion facile et instructive.

Merci à toi, mon grand Amour (puisque maintenant il y a aussi mon petit Amour). Tu es ma famille, mon ancre, mon roc. Tu es profondément bon et avenant. J'admire ton calme lors des situations compliquées, ta culture, tes néologismes plus imaginatifs les uns des autres, le fait que tu puisses me supporter (comme le disent certains). J'admire le fait que l'on ait pu construire autant de belles choses tous les deux entre la maison, ce foyer que nous choyons de jour en jour et une vraie vie de famille avec le bébé, le chien et la scénic. Plus concrètement, merci de m'avoir aidé à remplir les tableaux avec les résultats de ma thèse, relu les abstracts, les dossiers progressifs, le mémoire et j'en passe. Merci pour ton soutien et tes mots réconfortants, merci pour avoir géré toute l'intendance lors du retour de la maternité. Merci de t'occuper aussi bien de ta famille entre Camille, RomyChou et moi.

Et puis merci à toi Camille, ma petite merveille, mon crapaud-poulet, que j'ai attendu et chéri pendant 9 mois + 1 jour. Que n'ai-je pas été déçu lorsque je t'ai vu, tu m'as inondé de bonheur et d'amour d'un coup. Tu es parfait à mes yeux et tu l'as été dès le début en restant bien sage et me permettant de travailler. J'espère pouvoir être la maman que tu mérites, j'espère plus que tout pouvoir être à la hauteur.

SOMMAIRE

INTRODUCTION	Page 23
Caractérisations épidémiologiques des carcinomes basocellulaires	
Caractéristiques cliniques et histopathologiques des carcinomes basocellulaires	
Stratégies thérapeutiques et dépenses liées à la prise en charge des carcinomes basocellulaires	
Nouvelles technologies pour l'imagerie du carcinome basocellulaire	
MATERIELS ET METHODES	Page 35
1) <u>Population étudiée</u>	Page 35
2) <u>Préparation des échantillons</u>	Page 35
3) <u>Microscope Confocal Ex Vivo</u>	Page 38
4) <u>Manipulation et analyse des données</u>	Page 39
5) <u>Analyse statistique</u>	Page 42
RESULTATS	Page 43
1) <u>Caractéristiques démographiques et cliniques des patients et de leurs lésions</u>	Page 43
2) <u>Détection des foyers de carcinomes basocellulaires</u>	Page 43
3) <u>Identification des sous-types histologiques</u>	Page 45
4) <u>Identification du niveau de profondeur tumorale selon la classification de Clark</u>	Page 47
5) <u>Identification de la couche tissulaire la plus profonde</u>	Page 49
DISCUSSION	Page 58
Préparation technique des prélèvements et appréhension du microscope confocal	
Lecture et interprétation des images	
CONCLUSION	Page 70
ANNEXE	Page 71
BIBLIOGRAPHIE	Page 72

INTRODUCTION

Caractérisations épidémiologiques des carcinomes basocellulaires (CBC)

Les CBC et les carcinomes épidermoïdes (CE) sont des tumeurs cutanées non mélanocytaires qui se développent à partir des kératinocytes soit au niveau de la couche basale (pour les CBC) soit au niveau des couches plus superficielles (pour les CE). Les CBC sont les plus fréquents avec un ratio de 2/3 et ce sont les cancers les plus répandus tout type confondu, à travers le monde. Ils surpassent la prévalence de tous les autres types de cancers. De plus, de nombreuses études ont montré que l'incidence mondiale augmentait d'année en année. En effet, en Europe, des études rapportent que la fréquence des CBC s'élève chaque année depuis 40 ans avec une augmentation de l'incidence de 5,5% par an (1). Une mise à jour récente des recommandations allemandes dans le diagnostic et la prise en charge des CBC définit l'incidence actuelle à 200 nouveaux patients pour 100000 habitants par an (2). L'Amérique du Nord semble avoir la même tendance que l'Europe avec une incidence aux Etats-Unis augmentant annuellement de 4 à 8% (1). L'incidence des CBC en Australie est plus élevée que dans le reste du monde avec un taux de 884/100000 habitants par an en 2002 (soit 10 fois les chiffres enregistrés aux Royaume-Unis) (3). En France, les données épidémiologiques sont parcellaires. En effet, l'estimation du nombre de cas diagnostiqués de CBC est difficile car peu sont recensés dans les registres de cancers (n'ayant pas tous une analyse histologique sur biopsie ou sur pièce opératoire). Cependant, les données d'activité hospitalière permettent d'estimer à plus de 70 000 le nombre de nouveaux cas annuels de carcinomes cutanés (CBC et CE) diagnostiqués selon l'Institut National du Cancer en 2011. Inversement, le taux de mortalité est exceptionnellement bas par rapport aux autres cancers (2,3), par exemple, au Danemark, il approche les 0,02 pour 100000 habitants (4).

Les CBC peuvent se développer tôt dans la vie soit de façon sporadique soit dû à des gènes dermatoses bien spécifiques. Toutefois, l'âge est un facteur de risque indépendant, et l'incidence des CBC double entre 40 et 70 ans (3). Bien qu'homme et femme soient affectés, les CBC semblent plus atteindre le sexe masculin. En effet, une large étude aux Etats-Unis stratifiée sur le sexe a montré qu'entre 1986 et 2006, l'incidence des CBC est passée de 519 à 1019 cas pour 100000 femmes par an versus 606 à 1488 cas pour 100000 hommes par an (1). Outre l'âge et le genre, la photoexposition est considérée comme étant un des facteurs de risque majeurs pour le développement des CBC telle que l'exposition chronique ou intermittente intense (coups de soleil ou cabine d'UV) (2). Les phototypes I et II selon la classification de Fitzpatrick (peau

claire, cheveux roux ou blonds, couleur d'yeux clairs, incapacité à bronzer et propension à développer des taches de rousseur) sont également des facteurs de risque. En effet, le phénotype cutané joue un rôle important dans la survenue des CBC lié aux expositions aux UV. Par exemple, aux Etats-Unis, le risque de développer un CBC au cours de la vie est estimé à 20% et en particulier 30% dans les populations à peau claires (1). Il existe également d'autres facteurs de risque : antécédent personnel de CBC, exposition chronique à l'arsenic, exposition aux radiations ionisantes, immunodépression sur une longue durée, syndromes génétiques (neavomatose basocellulaire, xeroderma pigmentosum,...) (2).

Caractéristiques cliniques et histopathologiques des CBC

Les CBC sont marqués par une hétérogénéité clinique sans symptomatologie spécifique (d'aucun symptôme à douloureux en passant par prurit ou sensibilité légère). Dans l'article de *Cameron et al.*, les auteurs définissent 8 sous-types cliniques avec leurs corrélations histopathologiques (tableau I) : nodulaire, superficiel, infundibulokystique, fibroépithélial, sclérodermiforme, infiltrant, micronodulaire, basosquameux(1). Les CBC sont essentiellement localisés sur les zones photoexposées mais peuvent aussi se développer sur la peau non exposée au soleil. Le sous-type le plus commun est le CBC nodulaire retrouvé à une fréquence de 50% à 80%. Le sous-type superficiel est le deuxième CBC le plus fréquent, entre 10 et 30%. Les 10 à 20% restant correspondent aux autres sous-types.

Sous-types	Localisation principale	Description clinique	Description histopathologique
Nodulaire	Tête et cou	Papule perlée, brillante ou nodule à surface lisse, bordures épaissies, télangiectasies arborescentes	Nids tumoraux de cellules basales dans le derme avec agencement palissadique en périphérie. Stroma +/- inflammatoire contenant des cellules organisées autour des nids tumoraux.
Superficiel	tronc	Plaque érythémato-squameuse bien circonscrite avec parfois un centre clair et des bordures légèrement épaissies.	Foyers multiples de cellules tumorales basaloides à agencement palissadique attachées à l'épiderme avec un aspect parfois d'infiltrat lichénoïde.
Infundibulokystique	Tête et cou des personnes âgées	Papule perlée bien circonscrite	Brins bien circonscrits de cellules basaloides et structures mal limitées à type de kyste infundibulaire.

Fibroépithélial	Tronc	Plaque érythémateuse sessile ou papulonodulaire	Multiples collections de fines travées de cellules tumorales basaloïdes arrangées selon un patron réticulaire au milieu du stroma
Sclérodermique	Tête et cou	Plaque infiltrée sclérodermique à bordures mal limitées et surface brillante	Les travées de cellules basaloïdes sont entourées d'un stroma scléreux riche en collagène. L'agencement palissadique est généralement absent.
Infiltrant trabéculaire		Plaque indurée, épaissie ou déprimée de couleur blanche, jaune ou rose pâle avec parfois croûtes, érosions, ulcérations sous-jacentes	Les travées de cellules tumorales basaloïdes sont enchâssées dans un stroma bien inflammatoire
Infiltrant micronodulaire		Macule ou papule érythémateuse	Multiples petits agrégats de cellules tumorales basaloïdes dans le derme avec agencement palissadique et fente de rétraction conservés
Métatypique ou basosquameux	Tête et cou		Patron histologique similaire aux sous-types nodulaire ou superficiel avec une composante invasive à type de carcinome épidermoïde

Tableau I Localisation, clinique et histopathologie des sous-types de CBC selon *Cameron et al.*

Le risque de récurrence et le caractère agressif permettent de définir les facteurs de mauvais pronostic des CBC, ils sont identifiés pour chaque tumeur diagnostiquée cliniquement et plus ou moins histologiquement, puisqu'en effet il existe des situations particulières où la biopsie n'est pas considérée comme nécessaire. Dans les autres cas, les biopsies cutanées à visée diagnostique sont obligatoires :

- ➔ Lorsque le diagnostic clinique n'est pas certain
- ➔ Lorsque le traitement choisi n'est pas chirurgical
- ➔ Pour les lésions avec des critères cliniques de mauvais pronostic
- ➔ Lorsque le geste chirurgical nécessite une reconstruction importante

La biopsie par incision ou punch doit être suffisamment profonde pour emporter le derme réticulaire afin de rechercher une éventuelle composante infiltrante et identifier au mieux le sous-type histologique.

Les facteurs de mauvais pronostic incluent des paramètres cliniques : taille, localisation (extrémité céphalique et zones péri-orificielles) (figure I), bordures mal ou bien limitées, antécédents du patient (récidive, antécédent personnel et familial de CBC, antécédent de radiothérapie sur le site tumoral, génodermatoses avec prédisposition à la prolifération de CBC) et les sous-types histologiques de mauvais pronostic (sclérodémifome, infiltrant, métatypique).

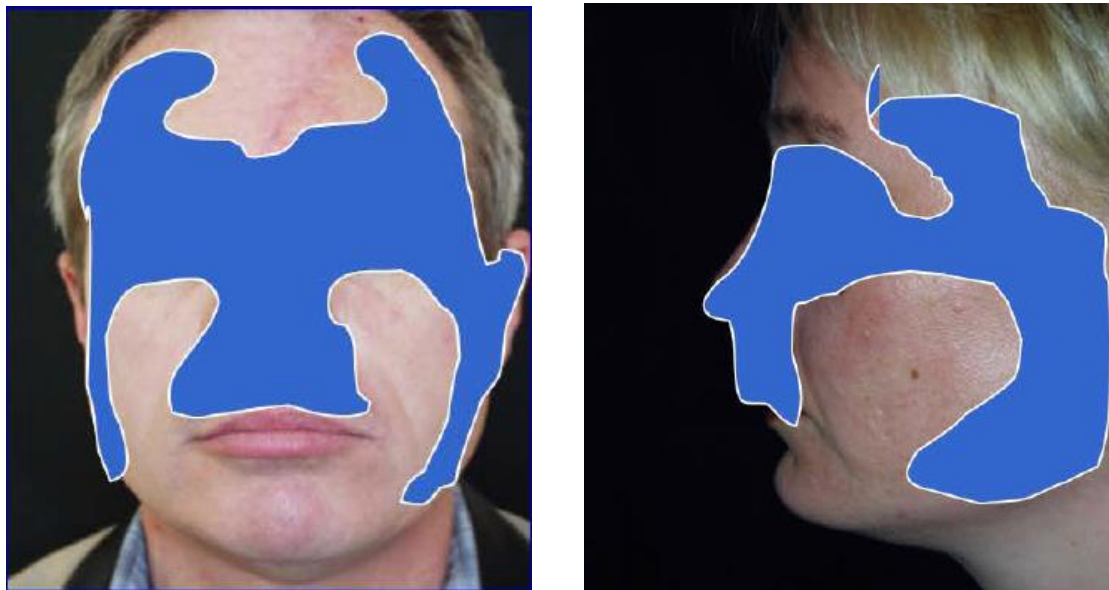


Figure I Localisation des zones à haut risque ou zone H en bleu (extrémité céphalique : zones péri-orificielles, tempes, nez et angles mandibulaires). Les localisations à risque intermédiaire sont le front, les joues, le menton, le cuir chevelu et le cou et les zones à bas risque sont le tronc et les membres.

On distingue ainsi 3 groupes pronostiques en fonction : du risque de récurrence, du risque d'envahissement local en cas de récurrence, de la difficulté de prise en charge thérapeutique en cas de récurrence (5):

· *Groupe de mauvais pronostic :*

- signes cliniques : sclérodémiforme ou mal limité ;
- histologie : sclérodémiforme, infiltrant, métatypique ;
- récurrence (sauf CBC superficiels) ;
- CBC nodulaires > 1 cm sur zone à haut risque de récurrence (nez et zones péri-orificielles de l'extrémité céphalique).

· *Groupe de bon pronostic :*

- CBC superficiels primaires et tumeur de Pinkus ;

- CBC nodulaires primaires :

< 1 cm sur zone à risque intermédiaire de récurrence (front, joue, menton, cuir chevelu et cou),

< 2 cm sur la zone à bas risque de récurrence (tronc et membres).

· *Groupe de pronostic intermédiaire :*

- CBC superficiels récidivés ;

- CBC nodulaires :

< 1 cm sur zone à haut risque de récurrence,

> 1 cm sur zone à risque intermédiaire de récurrence,

> 2 cm sur zone à bas risque de récurrence.

Le pronostic d'un CBC influence le choix du traitement : traitement local non invasif (photothérapie dynamique -PDT- , imiquimod, cryothérapie, radiothérapie) traitement local invasif (chirurgie standard avec des marges d'exérèse dépendant du pronostic du CBC, cryochirurgie, chirurgie micrographique), traitement systémique (thérapie ciblée, immunothérapie, chimiothérapie) (2).

Stratégie thérapeutique et dépenses liées à la prise en charge des CBC

De nombreux traitements sont disponibles selon le pronostic du CBC, les traitements déjà essayés et le terrain du patient (comorbidités, âge, ...) En France, l'efficacité thérapeutique est évaluée en fonction du risque de récurrence en analysant la survie à 5 ans. Par exemple, pour les tumeurs primaires, le taux de récurrence avoisine 1% avec la chirurgie micrographique de Mohs (CMM), 5 à 10% avec la chirurgie classique, la radiothérapie et la cryochirurgie. Pour les tumeurs récidivantes, le risque est de 5% avec la CMM et 10 à 20% avec la chirurgie standard et la radiothérapie (5) (figure II).

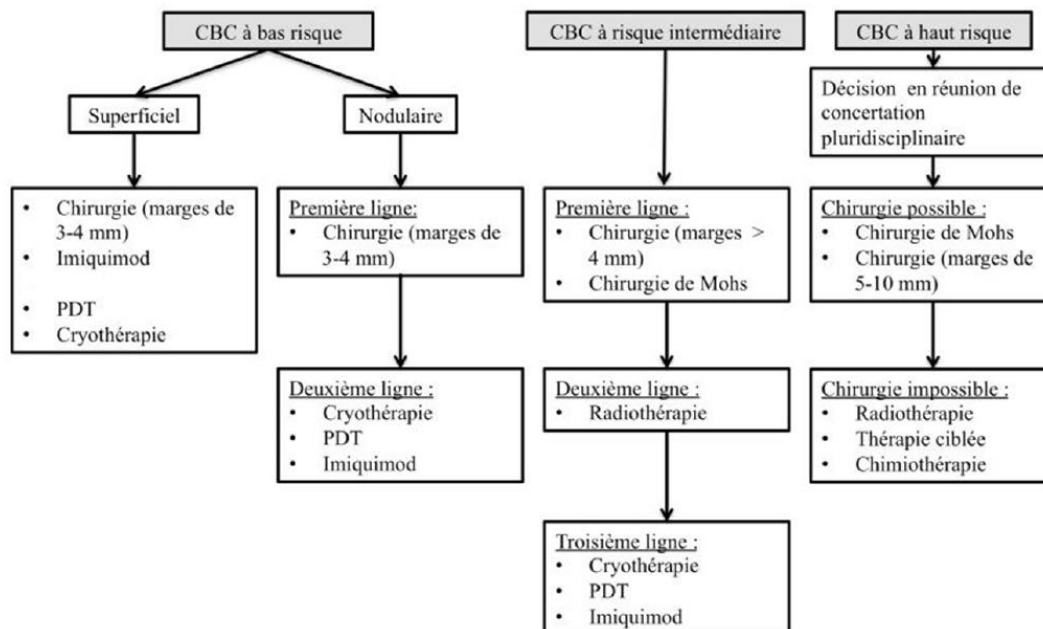


Figure II Schéma thérapeutique proposé lors de la mise à jour des recommandations européennes de prise en charge des CBC (7).

Toutes ces procédures ne sont pas sans coût et de manière concomitante à l'augmentation de l'incidence des CBC, la prise en charge financière a augmenté aussi. Par exemple, une étude a comparé aux Etats-Unis les dépenses médicales liées aux traitements des cancers cutanés entre 2002 et 2006 et 2007 et 2011. Tout d'abord, les auteurs ont noté que le nombre d'adultes traités pour un cancer cutané avait augmenté de 3,4 millions entre 2002 et 2006 et 4,9 entre 2007 et 2011 ($p < 0,001$). Pendant ces périodes, les coûts secondaires aux traitements des cancers cutanés avaient augmenté de 3,6 milliards à 8,1 milliards de dollars ($p = 0,001$) soit une augmentation de 126,2% alors que les coûts liés à la prise en charge des autres cancers avaient augmenté de 25,1%. Entre 2007 et 2011, près de 5 millions d'adultes par an ont été traités pour un cancer cutané avec une moyenne annuelle de dépenses de 8,1 milliards de dollars dont 4,8 milliards pour les carcinomes cutanés et 3,3 milliards pour les mélanomes (6). Les coûts de prise en charge dépendent du traitement choisi. Une étude américaine a calculé les coûts moyens de traitement pour un CBC localisé sur le visage au niveau de la joue incluant les frais liés à la biopsie, à la cicatrisation et reconstruction et le suivi. Les différents prix sont résumés dans le tableau suivant (tableau II) (7) :

Types de traitement		Prix (\$)
Curetage – électrocoagulation		471
Imiquimod topique		959
Exérèse en cabinet libéral	Avec réparation immédiate	1006
	Avec réparation lors d'un deuxième temps	1170
Chirurgie micrographique de Mohs		1263
Chirurgie au bloc opératoire		3085
Radiothérapie		2591-3460

Tableau II Moyenne des coûts des différents traitements des CBC aux Etats-Unis en 2008.

Ainsi, non seulement la phase thérapeutique est couteuse mais également le temps diagnostique lorsqu'une biopsie cutanée est réalisée. De plus, le diagnostic histologique nécessite un temps de préparation du tissu et d'interprétation qui décale d'autant la prise en charge thérapeutique.

Nouvelles technologies pour l'imagerie du carcinome basocellulaire

Outre la dermatoscopie utilisée au quotidien par les dermatologues, des nouvelles technologies d'imagerie ont émergé pour explorer le carcinome basocellulaire depuis une vingtaine d'années, fournissant une façon rapide de diagnostiquer et vérifier l'efficacité de traitement des CBC. Il y a, en effet, de nombreuses approches telles que la tomographie par cohérence optique (OCT), la spectroscopie Raman, la microscopie à laser multiphoton et la microscopie confocale in vivo et ex vivo. L'article de *Rossi et al.* explique en effet les modes de fonctionnement de ces différentes techniques d'imagerie (8) :

- La tomographie par cohérence optique est une technique d'imagerie non invasive et applicable ex vivo qui permet de visualiser l'épiderme et le derme papillaire jusqu'à une profondeur de 2mm en utilisant comme source lumineuse une lumière à faible cohérence. L'OCT exploite les propriétés de diffusion de la lumière des structures de la peau, ce qui permet de les visualiser. L'OCT peut être utilisée pour diagnostiquer des CBC et d'autres cancers cutanés. Ce dispositif d'imagerie visualise en effet les nids tumoraux des CBC superficiels et intradermiques qui sont séparés du tissu environnant par des zones d'ombres plus sombres. L'OCT a également été évaluée pour caractériser et différencier les sous-types histologiques des CBC (9).

- La spectroscopie Raman (SR) est un autre outil d'imagerie applicable ex vivo qui exploite les différences de diffusion de la lumière des structures cutanées. Chaque structure génère une énergie vibratoire différente correspondant à un pic spectral, le signal Raman. Ces spectres vibratoires sont sensibles aux structures moléculaires d'un prélèvement biologique, aux interactions et modifications chimiques qui pourraient avoir lieu dans un tissu cancéreux. En effet, il peut y avoir des altérations cellulaires telles qu'une augmentation du rapport nucléo-cytoplasmique, des désordres de la chromatine, et une augmentation de l'activité métabolique pouvant être détectés par la SR. Cette technologie est toutefois considérée comme chronophage. *Gniadecka et al.* ont rapporté l'utilisation de la SR pour détecter des CBC et les modifications biochimiques associées incluant des altérations lipidiques, protidiques telles que des changements des amides et du collagène (10).
- La microscopie à laser multiphoton est une technologie qui agit en excitant la fluorescence du prélèvement par l'absorption simultanée de deux photons ou plus en lumière infrarouge. Les images sont générées en deux dimensions en balayant la zone d'excitation à travers le spécimen. La résolution spatiale est considérée comme similaire à la résolution histopathologique. *Patalay et al.* ont rapporté l'utilisation du laser multiphoton pour détecter des CBC par rapport à la peau normale. Avec cette technique, diagnostiquer les CBC était possible avec une sensibilité de 79% et une spécificité de 93% (11).
- La microscopie confocale a été l'une des technologies les plus étudiées pour ses capacités diagnostiques haute résolution en particulier pour le CBC où une visualisation anatomopathologique de la tumeur est possible de façon non invasive et en temps réel. La microscopie confocale in vivo permet en effet de visualiser à l'échelle microscopique les couches cutanées proches de la surface (jusqu'à la partie superficielle du derme réticulaire) offrant ainsi de nouvelles possibilités pour diagnostiquer et évaluer la progression des lésions. La microscopie confocale peut aussi être utilisée en ex vivo en temps réel lors de la consultation avec le patient sur tissu fraîchement excisé mimant un échantillon congelé ou fixé dans du formol inclus dans de la paraffine sans altérer le tissu pour une préparation histopathologique classique ultérieure en vue d'une analyse au laboratoire. La microscopie confocale ex vivo (MCEV) a surtout été testée et utilisée en tant qu'outil thérapeutique pour le contrôle des marges d'exérèse des CBC opérés en CMM (12–14). En effet, des auteurs suggèrent que la MCEV pourrait évoluer comme un

moyen attractif supplémentaire voire alternatif à l'analyse extemporanée sur tissu congelé au cours de CMM (15).

Le tableau III issu de la revue de la littérature de *Malvey et al.* qui présente les applications techniques de la MCEV et positionne cette technologie parmi les autres dispositifs d'imagerie, explique les caractéristiques des différentes méthodes optiques utilisées à l'heure actuelle en pathologie chirurgicale ex vivo (16) :

Méthodes	Principe optique	Contrastes intrinsèque ou extrinsèque	Détails cellulaires	Images similaires à l'histopathologie conventionnelle en H&E	Appareils dans le commerce
OCT	Acquisition d'images par interférométrie mesurant le délai d'écho et l'intensité de la lumière rétrodiffusée par les tissus	Intrinsèque	Non	Non	Perimeter medical imaging, Toronto, Ontario Canada; LLTech, Paris, France
SR	Visualisation d'un contraste chimique créé par les propriétés vibratoires des molécules stimulées par des photons	Intrinsèque	Oui	Non	Invenio Imaging Inc, Santa Clara, Californie
Microscopie à laser multiphoton	Excitation de la fluorescence des tissus par l'absorption de photons	Intrinsèque et extrinsèque	Oui	Oui	DermaInspect, JenLab GmbH, Jena, Germany
MCEV	Un laser concentré par une lentille balaie la cible dans un plan focal conjugué au plan focal de l'objectif participant à la formation d'une image	Intrinsèque pour la réflectance, extrinsèque pour la fluorescence	Oui	Oui	VivaScope 2500, Caliber Imaging and Diagnostics, Inc Rochester, New York; Histology Scanner, SamanTree Medical SA, Switzerland

Tableau III Caractéristiques des différents dispositifs d'imagerie ex vivo dans le domaine de la dermatologie actuellement disponibles dans le commerce.

La MCEV travaille selon deux modes : réflectance et fluorescence. Une image numérique est formée via deux lasers qui émettent des rayons lumineux à deux longueurs d'onde différentes et pénètrent le tissu selon deux modes (réflectance et fluorescence simultanément). Le mode réflectance est obtenu via l'émission d'une longueur d'onde de 785 nm et met en évidence les différentes structures anatomiques d'un tissu donné grâce aux indices de réfraction naturels des unités sous-cellulaires. Les structures de la peau servent ainsi d'agents de contraste endogènes, en particulier la mélanine, les noyaux, le collagène et les fibres élastiques. Le contraste peut être acquis également avec des agents particuliers (acide acétique, chlorure d'aluminium, acide citrique). Le mode fluorescence est émis après stimulation par une longueur d'onde de 488 nm. Ce mode est basé sur l'utilisation de fluorochromes, agents de contraste exogènes tels que l'acridine orange, qui colorent les noyaux, et renforcent le contraste des kératinocytes, annexes, fibroblastes, cellules tumorales par rapport au tissu environnant (17). Ainsi, le mode combiné ou simultané (correspondant à l'association de ces deux modes) augmente l'observation de l'ensemble des détails nucléaires, cytoplasmiques et du stroma. Depuis ces dernières années, une nouvelle visualisation des images est également possible : il s'agit de la coloration digitale des images multimodales en pseudo-couleur mimant l'histopathologie classique avec hématoxyline et éosine (H&E) (18–22). Les couleurs violet et rose de ces deux colorations ont été adoptées pour optimiser la visualisation des structures cellulaires et non-cellulaires respectivement et ainsi refléter le mieux possible les images histologiques classiques. Le mode fluorescence peut être attribué à la couleur violet associée aux noyaux et aux tumeurs fortement nucléées alors que le mode réflectance peut correspondre à la couleur rose associée au cytoplasme et collagène dermique (23) (figure III).

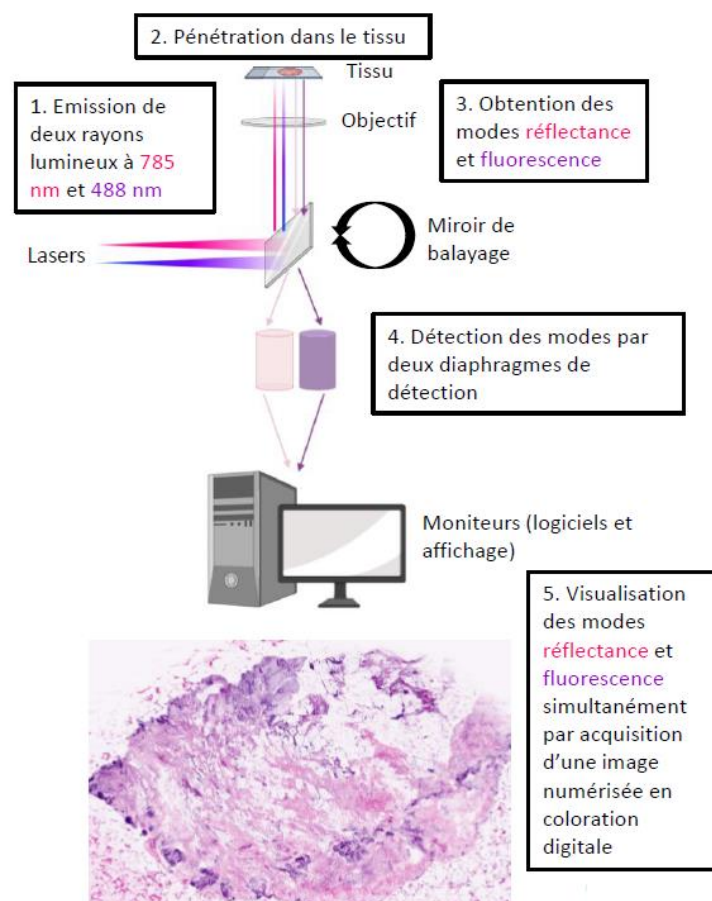


Figure III Schéma simplifié expliquant le mode de fonctionnement du microscope confocal ex vivo en mode combiné et coloration digitale.

Cette technologie a surtout été étudiée pour évaluer l'acuité diagnostique à détecter des CBC ou des CE sur des lésions opérées en CMM (22) ou pour contrôler les marges d'exérèse ce CBC opérés en CMM (21). Dans ce dernier article, les auteurs ont également évalué l'acuité diagnostique de la MCEV en mode fluorescence et coloration digitale pour détecter des CBC sur 22 punches biopsiques. Toutefois, à notre connaissance, la MCEV en mode combiné (fluorescence et réflectance) avec coloration digitale n'a jamais été testée en tant qu'outil diagnostique sur des lésions cliniquement suspectes de CBC.

C'est pourquoi, nous voulions explorer davantage les capacités de la MCEV en coloration digitale et mode combiné pour diagnostiquer des CBC sur des biopsies de lésions cliniquement suspectes avant prise en charge chirurgicale. Ainsi, la MCEV pourrait être utilisée en temps réel lors de la consultation avec le patient pour lui rendre à ce moment-là un diagnostic anatomopathologique.

L'objectif primaire de notre étude était d'évaluer l'acuité diagnostique de la MCEV pour détecter des foyers de CBC sur des biopsies de lésions suspectes cliniquement, grâce aux critères

élaborés par *Bennàssar et al.*(24), entre un interne de dermatologie, un dermato-pathologiste comparativement au gold standard (l'examen histologique au microscopique optique sur tissu fixé et coloré en H&E). Les objectifs secondaires étaient de déterminer le sous-type histologique comparé au gold standard, la profondeur tumorale selon les niveaux de Clark et le niveau de profondeur de la biopsie visualisé avec la MCEV comparé au gold standard.

MATERIELS ET METHODES

1) Population étudiée

Cette étude prospective descriptive monocentrique a inclus 66 patients avec 106 prélèvements entre le 11 Juillet et le 12 Novembre 2019 dans le service de dermatologie du Centre Hospitalo-Universitaire (CHU) de Nîmes après accord et signature d'un consentement écrit (cf Annexe). Les lésions suspectes de CBC ont été biopsiées avant traitement chirurgical.

La base de données CBC a été créée à partir d'un masque de saisie sur le logiciel Epidata[®]3.1, dans ce masque de saisie étaient renseignés les critères d'inclusion suivants : âge \geq 18 ans, lésions cutanées avec signes cliniques évocateurs de CBC relevant d'un traitement chirurgical. Les patients étaient exclus s'ils refusaient de participer à l'étude.

Les caractéristiques démographiques des patients (âge, sexe) ont été recueillies ainsi que les caractéristiques cliniques des lésions (localisation, statut primaire ou récidivant).

Toutes les procédures conduites dans cette étude impliquant des patients ont été réalisées après avis favorable du comité local d'Interface Recherche Bioéthique (IRB).

2) Préparation des échantillons

Les tissus provenaient de biopsies cutanées réalisées au punch sur des lésions cliniquement suspectes de CBC. La taille des échantillons variait de 2 à 4 mm selon le diamètre du punch utilisé. Les prélèvements étaient initialement préparés pour l'acquisition des images au microscope confocal ex vivo et puis dans un deuxième temps pour l'analyse histopathologique standard. La préparation des tissus et acquisition des images via la microscopie confocale étaient réalisées au sein du service de dermatologie juste après la biopsie cutanée où les échantillons étaient directement incubés dans une solution saline isotonique jusqu'au moment de la préparation pour la microscopie confocale ex vivo : les prélèvements étaient immergés dans de l'acide acétique dilué à 50% pendant 10 à 20 secondes, puis rincés au sérum physiologique pendant 20 secondes puis immergés dans l'acridine orange à 1mmol/L pendant 10 à 20 secondes également, selon le protocole de *Perez-Anker et al* (25) (figure IV). Le temps d'immersion dépendait de la taille de l'échantillon.

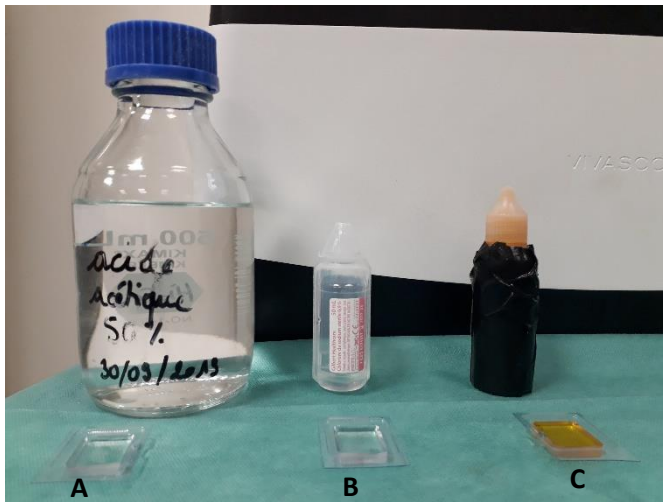


Figure IV Protocole de préparation des échantillons pour la MCEV :

- A. Immersion dans de l'acide acétique dilué à 50% -> 10 à 20 sec
 - B. Rinçage dans un sérum salé isotonique -> 20 sec
 - C. Immersion dans le colorant fluorescent, l'acridine orange -> 10 à 20 sec
- } ~40 sec-
1min

Ensuite, chaque prélèvement était disposé entre deux lames de façon bien étalée pour visualiser toute la hauteur de l'épiderme et du tissu sous-jacent. On pouvait s'aider d'une lame de bistouri pour faciliter l'étalement et de plaques de mousses plus ou moins épaisses pour aider à l'aplatissement homogène du prélèvement. On disposait par-dessus la mousse une seconde lame aimantée à la première renforçant l'aplatissement (figures V, VI et VII). Le principe était d'obtenir une surface en regard de la première lame (lame 1) la plus plane et homogène possible sans altérer la qualité du tissu. Pour les biopsies les plus volumineuses, on pouvait couper le prélèvement au centre de façon longitudinale afin d'obtenir deux échantillons à positionner sur les mêmes lames pour acquérir une meilleure visibilité de la partie interne de la biopsie cutanée. Les prélèvements étaient ensuite placés dans le microscope confocal pour être scannés.

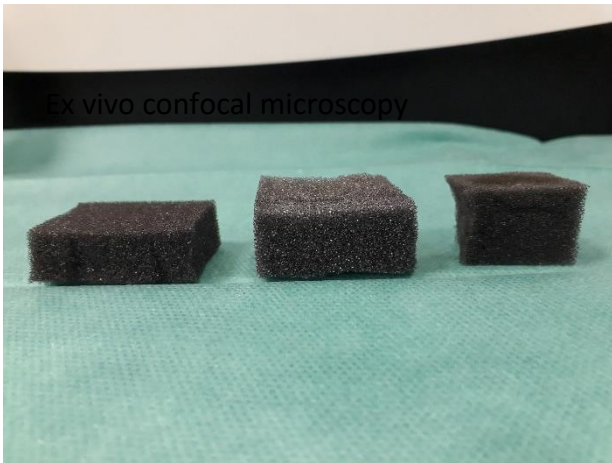


Figure V Panel des différentes épaisseurs et densité de mousse permettant d'aplatir le prélèvement sur la lame de verre.

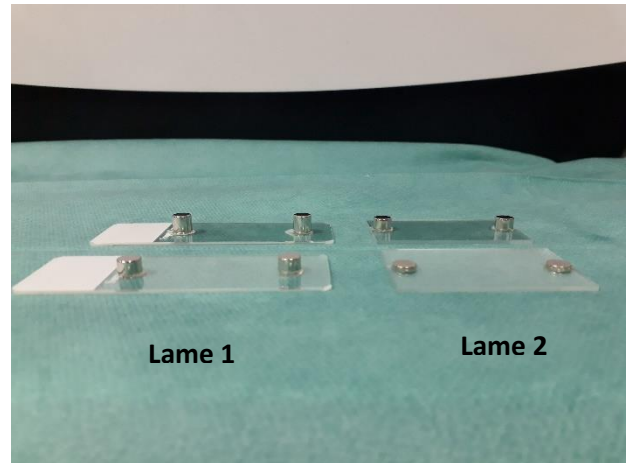


Figure VI Exemple de 2 paires de lames de verre aimantées. Les lames de gauche (lame 1) sont les lames sur lesquelles sont aplaties les échantillons, ensuite recouverts de plaques de mousse puis l'ensemble est fermé par les plus petites lames à droite (lame 2). La taille des aimants varie selon la taille et l'épaisseur de l'échantillon.

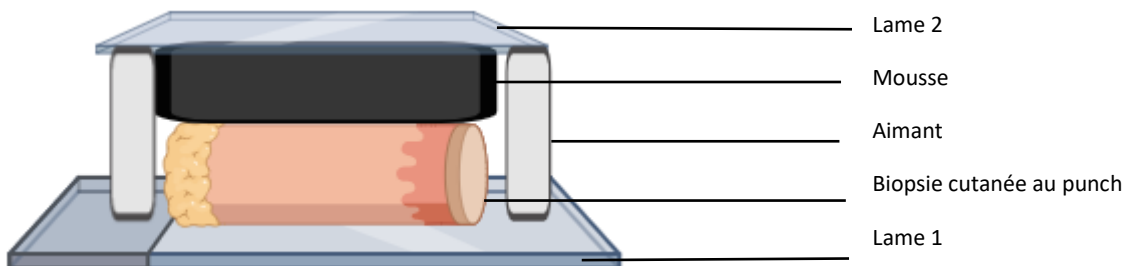


Figure VII Schéma simplifié montrant le montage des lames pour le positionnement du prélèvement dans le microscope confocal.

3) Microscope Confocal Ex Vivo

Les lames étaient placées dans le Vivascope 2500 4ème génération (MAVIG, GmbH, Munich) pour capturer des images de microscopie confocale selon les modes réflectance, fluorescence respectifs, combinés, et combinés avec coloration digitale (figure VIII).

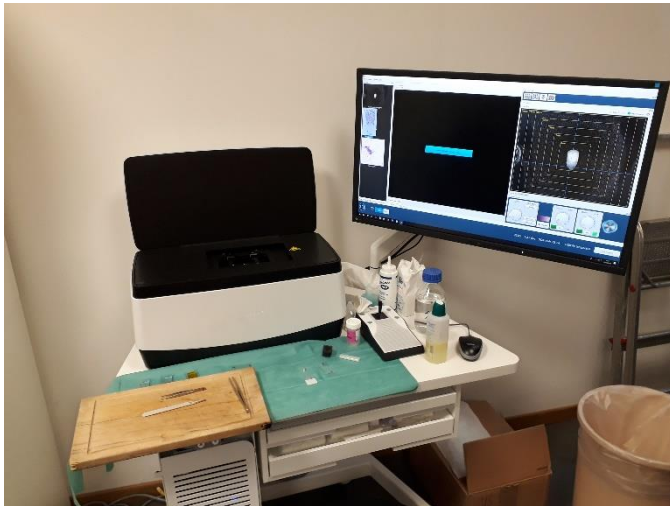


Figure VIII Dispositif d'installation du Vivascope 2500 4ème génération avec le matériel pour la préparation des tissus. L'appareil est ouvert pour pouvoir déposer les lames avec l'échantillon. L'écran montre à droite l'image macroscopique du prélèvement, à gauche sur la partie noire, c'est l'image en microscopie confocale qui sera affichée.

L'appareil utilise un laser émettant deux longueurs d'ondes différentes, 488 nm pour la fluorescence et 785 nm pour réflectance. La résolution d'image est de 1024x1024 pixels. Les images sont produites à une vitesse de 0.68 secondes/par image, ont une taille maximale de 550 x 550 μm et une profondeur de 200 μm . Les images sont ensuite automatiquement assemblées sous forme de mosaïque avec une taille maximale de 25x25 mm (figure VI). Ainsi la caméra digitale du VivaScope 2500M-G4 fournit une image à fond clair et permet de naviguer sur des zones localisées des prélèvements. A l'instar de la microscopie optique, l'objectif peut zoomer sur les images numériques, on peut ainsi soit afficher le prélèvement en entier soit obtenir un grossissement jusqu'à 550 fois.

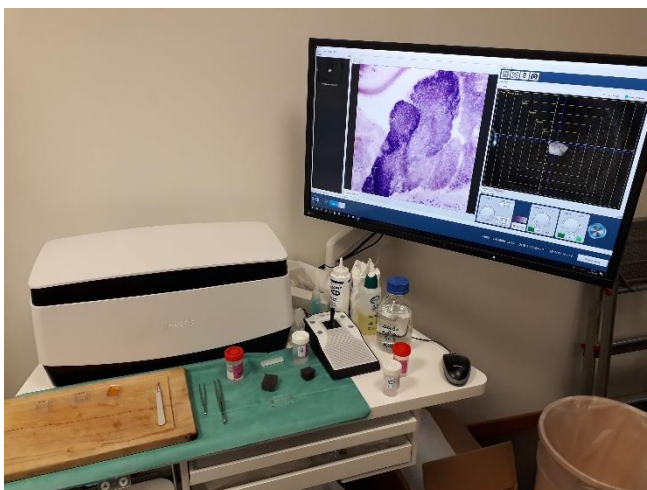


Figure IX Vivascope 2500 avec couvercle fermé pour permettre l'acquisition des images en microscopie confocale comme montré sur l'écran à gauche.

Chaque prélèvement était ensuite récupéré et incubé dans du formol pour être acheminé au laboratoire d'anatomopathologie en vue des préparations et analyses histopathologiques standards conformément aux méthodes de préparation tissulaire et d'interprétation actuelles en vigueur.

4) Manipulation et analyse des données

Toutes les images acquises en MCEV ont été conservées sur un disque dur externe dédié. Les données épidémiologiques et cliniques des patients ont été recueillies sur un tableau Excel sous forme anonymisée. Les images de microscopie confocale ont été évaluées séparément par un interne en dermatologie et par un médecin anatomopathologiste spécialisé en dermatologie. L'interne en dermatologie a eu une journée de formation à la MCEV auprès du Dr Perez-Anker, experte internationale en microscopie confocale ex vivo en particulier pour les prélèvements de type CBC (25–27).

La lecture et l'interprétation des images pour répondre aux objectifs primaire et secondaires étaient faites plusieurs semaines après la réalisation des biopsies cutanées et l'acquisition des images. Pour la détection des foyers tumoraux de CBC, et l'identification des sous-types anatomopathologiques en MCEV, nous nous sommes référés aux critères de classification définis par *Bennàssar et al* (24). En effet, les auteurs décrivent, évaluent et valident 8 critères de microscopie confocale en mode fluorescence pour d'une part diagnostiquer des CBC et d'autre part caractériser les principaux sous-types histologiques (superficiel, nodulaire et infiltrant) (tableau IV) :

- 1) **Fluorescence** : Lorsque des images blanches et brillantes sont observées sur l'écran, l'absence de fluorescence est vue comme un fond noir. Les cellules fluorescentes sont les cellules marquées par l'acridine orange (et donc sont blanches et brillantes). Il s'agit des cellules fortement nucléées et notamment les cellules tumorales.
- 2) **Contour tumoral** : Les formes des tumeurs sont divisées en deux catégories, mal délimitées lorsqu'une ligne peut difficilement séparer la tumeur du tissu environnant et bien délimitées lorsque cela est possible.
- 3) **Surpopulation nucléaire** : lorsque la densité nucléaire des cellules est plus élevée que celle du tissu épidermique environnant et des structures annexes.
- 4) **Agencement palissadique périphérique** : renforcement de la fluorescence des cellules à la périphérie des foyers tumoraux disposées de manière ordonnée et alignée.

- 5) **Fentes de rétraction** : espaces en demi-lune à fond noir sans fluorescence attachés aux masses tumorales et les séparant du tissu environnant.
- 6) **Pléomorphisme nucléaire** : déviation de la forme classique ronde ou ovale des noyaux des kératinocytes normaux.
- 7) **Augmentation du rapport nucléo-cytoplasmique (RNC)** : en tant que cellules tumorales, les cellules des CBC sont supposées avoir une augmentation du RNC comparé à des kératinocytes normaux. Ainsi en microscopie confocale mode fluorescence, les nids de CBC sont vus comme des masses cellulaires denses avec des points allongés et hétérogènes fluorescents (correspondant aux noyaux proéminents) et un cytoplasme quasi-absent.
- 8) **Le stroma péri-tumoral** : le derme autour des foyers de CBC se modifie. Le stroma est vu comme un tissu avec une densité nucléaire importante sous forme de points blancs fluorescents sur fond noir comme un « ciel étoilé » où les étoiles correspondent aux cellules inflammatoires et aux noyaux de fibroblastes activés.

	CBC superficiel	CBC nodulaire	CBC infiltrant
Fluorescence présente	+	+	+
Contours tumoraux bien délimités	-	+	-
Surpopulation nucléaire	-	+	+
Agencement palissadique périphérique	+	+	+
Fente de rétraction	+	+	-
Pléiomorphisme nucléaire	+	+	+
Augmentation du rapport nucléo-cytoplasmique	+	+	+
Stroma inflammatoire :			
Absent	-	-	-
< 50%	+	+	-
> 50%	-	-	+

Tableau IV Les différences entre les sous-types de CBC selon les critères de la MC mode fluorescence.

Les dernières recommandations françaises pour la prise en charge diagnostique et thérapeutique des CBC s'accordent également pour considérer que ces sous-types histologiques sont les plus fréquents et les plus classiques (5).

Nous avons de plus cherché à identifier le sous-type sclérodermiforme également décrits dans les recommandations françaises car il s'agit d'un sous-type agressif et de mauvais pronostic. Le reconnaître est par conséquent important pour adapter au mieux la prise en charge thérapeutique. Pour le caractériser, nous nous sommes référés à sa description histopathologique pure en l'adaptant à la MCEV en mode combiné et coloration digitale selon les critères de Bennàssar toujours (tableau V) :

	CBC sclérodermiforme
Fluorescence présente	+
Contours tumoraux bien délimités	-
Surpopulation nucléaire	+
Agencement palissadique périphérique	-
Fente de rétraction	-
Pléiomorphisme nucléaire	+
Augmentation du rapport nucléo-cytoplasmique	+
Stroma inflammatoire :	
Absent	+
< 50%	-
> 50%	-

Tableau V Adaptation des critères de Bennàssar pour identifier les CBC sclérodermiformes en MCEV mode combiné et coloration digitale.

Il est de plus à noter que les critères de *Bennàssar et al* ont été élaborés à partir d'un microscope confocal en mode fluorescence seul, que nous avons essayé d'adapter aux images acquises en MCEV mode combiné et coloration digitale.

Concernant l'évaluation de la profondeur tumorale via l'analyse en MCEV et l'analyse anatomopathologique classique, nous nous sommes référés à la classification de Clark qui permet de localiser la cellule tumorale la plus profonde par couche cutanée :

- Niveau I : les cellules tumorales sont confinées dans l'épiderme,
- Niveau II : le derme papillaire est envahi,
- Niveau III : la tumeur envahit toute la hauteur du derme papillaire sans atteindre le derme réticulaire,
- Niveau IV : le derme réticulaire est envahi,
- Niveau V : le tissu hypodermique sous-cutané est envahi.

Nous nous sommes également basés la classification de Clark légèrement modifiée pour identifier le niveau le plus profond des prélèvements en MCEV et en microscopie optique en décrivant la couche tissulaire visualisée à la partie inférieure du prélèvement : derme réticulaire, hypoderme, muscle, cartilage.

5) Analyse statistique

Le Logiciel SAS® Enterprise Guide V7.1 (SAS Institute, Cary, NC, USA) a été utilisé pour le nettoyage et l'analyse statistique des données de l'étude. Les résultats ont été présentés sous forme de moyennes \pm écarts-types pour les variables quantitatives et pour les variables qualitatives, les effectifs et les pourcentages associés ont été présentés. Les statistiques descriptives incluant moyennes, écart-type, médiane, limites supérieure et inférieure et fréquence relative ont été utilisées pour caractériser la population étudiée et les lésions cliniquement. Pour répondre aux objectifs fixés, nous avons comparé les diagnostics faits en MCEV de l'interne (observateur 1) et de l'anatomo-pathologiste (observateur 2) avec l'interprétation du gold standard (GS) pour tous les critères primaire (détection de CBC – présence ou absence) et secondaires (identification des sous-types histologiques, caractérisation du niveau de profondeur tumorale et de la couche tissulaire la plus profonde visualisée sur les prélèvements) en calculant les paramètres de performance (sensibilité, spécificité, valeurs prédictives positive et négative). Le coefficient de corrélation kappa de Cohen a également été calculé pour objectiver la concordance entre les deux observateurs (valeur entre 0 et 1 et degré respectif de concordance croissante de mauvaise à excellente). Le tableau VI donne un ordre d'idée généralement accepté de l'interprétation des valeurs de Kappa en fonction de l'intervalle dans lequel se situe la valeur calculée du coefficient (28).

Coefficient Kappa	Estimation du degré de concordance
0,8 à 1	Excellent
0,6 à 0,8	Bon
0,4 à 0,6	Moyen
0,2 à 0,4	Faible
0 à 0,2	Négligeable
< 0	Mauvais

Tableau VI Interprétation du coefficient de Kappa.

RESULTATS

1) Caractéristiques démographiques et cliniques des patients et de leurs lésions

106 lésions cutanées cliniquement suspectes de CBC provenant de 66 patients ont été étudiées. 47 Patients étaient des hommes (71%) et 19 des femmes (29%) avec une moyenne d'âge de 73 ans +/- 12 ans (40-93 ans). La plupart des lésions étaient localisées au niveau de la tête et du cou (n = 72 soit 68% des lésions) avec une prévalence plus importante pour le front (18 lésions – 17%), puis les oreilles (14 lésions – 13,2%) et les joues (13 lésions – 12,3%). 87% des lésions (n = 92) étaient des lésions primaires et les 13% restant (n=14) avaient reçu un traitement antérieur (tableau VII).

Age (années) Moyenne ± (Ecart-type)	73±12
Sexe, n (%) ♂ ♀	47 (71) 19 (29)
Localisation, n (%)	
Front	18 (17)
Oreille	14 (13,2)
Joue	13 (12,3)
Nez	12 (11,3)
Paupière	7 (6,6)
Menton	2 (1,9)
Cou	6 (5,7)
Membre Supérieur	14 (13,2)
Tronc	11 (10,4)
Membre Inférieur	9 (8,5)
Statut, n (%)	
Primaire	92 (87)
Récidive	14 (13)

2) Détection des foyers de carcinomes basocellulaires

Performance diagnostique de l'observateur 1 (O1) par rapport au gold standard (GS)

L'observateur 1 a diagnostiqué 83 lésions comme étant des CBC, et les 23 autres lésions comme n'étant pas des CBC alors qu'avec le gold standard, 73 lésions ont été identifiées CBC, et les 33 autres non CBC. Ainsi La sensibilité et la spécificité pour diagnostiquer des foyers tumoraux de CBC par l'O1 en MCEV étaient de 96% et 61% par rapport au GS avec des valeurs prédictives (VP) positives et négatives respectives de 84% et 87% (tableau VIII).

Tableau VIII : Comparaison des résultats entre l'observateur 1 avec la MCEV et le gold standard : sensibilité, spécificité, et rapports de vraisemblance positif / négatif.			
	Diagnostic selon le GS		
Diagnostic selon l'O1	Présence de CBC (n)	Absence de CBC (n)	
Présence de CBC (n)	VP=70	FP=13	VPP=0.84
Absence de CBC (n)	FN=3	VN=20	VPN=0.87
	Sensibilité=0.96 soit 96%	Spécificité=0.61 soit 61%	

Performance diagnostique de l'observateur 2 (O2) par rapport au GS

L'observateur 2 a diagnostiqué 72 lésions/106 comme étant des CBC et 34 lésions comme n'étant pas des CBC réalisant ainsi une sensibilité et une spécificité de 96% et 94% par rapport au GS avec des valeurs prédictives positives et négatives de 97% et 91% (tableau IX).

Tableau IX : Comparaison des résultats entre l'observateur 2 avec la MCEV et le gold standard : sensibilité, spécificité, et rapports de vraisemblance positif ou négatif.			
	Diagnostic selon le GS		
Diagnostic selon l'O2	Présence de CBC (n)	Absence de CBC (n)	
Présence de CBC (n)	VP=70	FP=2	VPP=0.97
Absence de CBC (n)	FN=3	VN=31	VPN=0.91
	Sensibilité=0.96 soit 96%	Spécificité=0.94 soit 94%	

VP = vrais positifs, FP = faux positifs, FN = faux négatifs, VN = vrais négatifs, VPP = valeur prédictive positive, VPN = valeur prédictive négative.

Concordance diagnostique entre observateur 1 et observateur 2

La concordance entre l'O1 et l'O2 était considérée comme bonne pour diagnostiquer des foyers de CBC avec la MCEV, tout sous-type histologique confondu avec un coefficient de kappa de 0,64 [0,49-0,80] (tableau X).

Tableau X : comparaison des résultats entre l'observateur 1 et l'observateur 2 avec la MCEV : calcul de la valeur kappa et estimation du degré de concordance.				
	Lésions avec CBC selon O2 (n)	Lésions sans CBC selon O2 (n)	Valeur κ	Degré de concordance
Lésions avec CBC selon O1 (n)	70	13	0,64 [0,49-0,80]	Bonne
Lésions sans CBC selon O1 (n)	2	21		

Résumé des résultats de l'objectif principal

Détection des foyers de CBC	VP (n)	FP (n)	FN (n)	VN (n)	Se (%)	Sp (%)	VPP (%)	VPN (%)	Test de Kappa	Degré de concordance
O1/O2	70	13	2	21	97	62	84	91	0,64	Bon
O1/GS	70	13	3	20	96	61	84	87	0,61	Bon
O2/GS	70	2	3	31	96	94	97	91	0,89	Excellent

Tableau XI Tableau récapitulatif des résultats du critère primaire entre l'O1 et l'O2, l'O1 et le GS, l'O2 et le GS. VP = vrais positifs, FP = faux positifs, FN = faux négatifs, VN = vrais négatifs, Se = sensibilité, Sp = spécificité.

3) Identification des sous-types histologiques

Le sous-type nodulaire était le plus fréquemment décrit (41,5% chez l'O1, 31,1% chez l'O2 et 34,9% par le GS), le sous-type infiltrant a été rapporté dans 18% des cas avec l'O1, 20% des cas avec l'O2 et le GS, le sous-type superficiel était décrit dans 17%, 16% et 12,3% des lésions respectivement avec les O1,2 et le GS et le sous-type sclérodermique a été identifié dans 2 cas avec l'O1 et le gold standard et 1 fois par l'O2 (tableau XII).

	Observateur 1	Observateur 2	Gold standard
Superficiel	18 (17)	17 (16)	13 (12,3)
Nodulaire	44 (41,5)	33 (31,1)	37 (34,9)
Infiltrant	19 (17,9)	21 (19,8)	21 (19,8)
Sclérodermique	2 (1,9)	1 (0,9)	2 (1,9)
Non concerné	23 (21,7)	34 (32,1)	33 (31,1)
Total	106 (100)	106 (100)	106 (100)

Performance diagnostique de l'observateur 1 par rapport au gold standard

L'O1 a diagnostiqué correctement les sous-types histologiques de 52 lésions par rapport au gold standard de même qu'il a classé correctement 20 lésions non concernées par l'identification du sous-type histologique car n'étant pas des carcinomes basocellulaires, réalisant une sensibilité de 79%, une spécificité de 50%, des VP positives et négatives de 72% et 59% pour caractériser correctement les sous-types histologiques des 106 lésions comparé au gold standard (tableau XIII).

Tableau XIII : Comparaison des accords des sous types histologiques entre l'observateur 1 et Le gold standard : sensibilité, spécificité, et rapports de vraisemblance positif/ négatif.			
	Diagnostic sous type histologique selon Gold standard		
Diagnostic sous-type histologique selon observateur 1	Lésions avec sous- types histologiques identiques (n)	Lésions avec sous- types histologiques différents et non concernées (sans CBC) (n)	
Lésions avec sous- types histologiques identiques (n)	52	20	VPP=0.72
Lésions avec sous- types histologiques différents et non concernées (sans CBC) (n)	14	20	VPN=0.59
	Sensibilité=0.79 soit 79%	Spécificité=0.5 soit 50%	

Performance diagnostique de l'observateur 2 par rapport au gold standard

L'O2 a diagnostiqué correctement les sous-types histologiques de 52 lésions par rapport au gold standard de même qu'il a classé correctement 31 lésions non concernées par l'identification du sous-type histologique car n'étant pas des carcinomes basocellulaires, réalisant une sensibilité et une spécificité de 82%, et des VP positives et négatives de 89% et 72% pour caractériser correctement les sous-types histologiques des 106 lésions comparé au gold standard (tableau XIV).

Tableau XIV : Comparaison des accords des sous types histologiques entre l'observateur 2 et le gold standard : sensibilité, spécificité, et rapports de vraisemblance positif/ négatif.			
	Diagnostic sous type histologique selon Gold standard		
Diagnostic sous-type histologique selon observateur 2	Lésions avec sous- types histologiques identiques (n)	Lésions avec sous- types histologiques différents et non concernées (sans CBC) (n)	
Lésions avec sous- types histologiques identiques (n)	56	7	VPP=0.89
Lésions avec sous- types histologiques différents et non concernées (sans CBC) (n)	12	31	VPN=0.72
	Sensibilité= 0.82 soit 82 %	Spécificité=0. 82 Soit 82%	

Concordance diagnostique entre observateur 1 et observateur 2

La concordance entre l'O1 et l'O2 était considérée comme bonne pour identifier les sous-types histologiques des 106 lésions en MCEV, avec un coefficient de kappa à 0,74 [0,64-0,84]. Le sous-type infiltrant était celui pour lequel la concordance était la plus élevée car 18 lésions sur 19 (pour l'O1) et sur 21 (pour l'O2) ont été identifiées comme telles par les 2 observateurs, alors que pour le sous-type superficiel, les observateurs 1 et 2 se sont accordés sur 11 lésions sur 18 (pour l'O1) sur 17 (pour l'O2) pour les diagnostiquer en tant que CBC superficiel. Pour le sous-type nodulaire, les concordances diagnostiques semblaient correctes car 31 lésions ont été identifiées comme telles sur 44 pour l'O1 et sur 33 pour l'O2. L'observateur 2 a diagnostiqué une lésion comme étant un CBC sclérodermiforme alors que l'O1 en a identifié 2 (tableau XV).

Tableau XV : Comparaison des différents résultats des sous types histologiques de l'observateur 1 avec l'observateur 2.

Sous type histologique observateur 1	Sous type histologique observateur 2					Total
	Infiltrant	Nodulaire	Sclérodermiforme	Superficiel	Non concerné	
Infiltrant	18	0	0	1	0	19
Nodulaire	3	31	0	4	6	44
Sclérodermiforme	0	0	1	0	1	2
Superficiel	0	1	0	11	6	18
Non concerné	0	1	0	1	21	23
Total	21	33	1	17	34	106

-Coefficient de Kappa pondéré avec IC₉₅=0.74[0.64-0.84]

4) Identification du niveau de profondeur tumorale selon la classification de Clark

Le niveau de profondeur le plus fréquemment retrouvé pour l'ensemble des lésions était le niveau IV (envahissement du derme réticulaire) parmi les deux observateurs et le gold standard (44 lésions pour l'O1, 40 pour l'O2 et 43 pour le GS) puis le niveau II correspondant à l'envahissement du derme papillaire avec des valeurs respectives de 19,8%, 17% et 14,2% entre O1, O2 et GS (tableau XVI).

	Observateur 1	Observateur 2	Gold standard
Niveau II	21 (19,8)	18 (17)	15 (14,2)
Niveau III	15 (14,2)	12 (11,3)	11 (10,4)
Niveau IV	44 (41,5)	40 (37,7)	43 (40,6)
Niveau V	3 (2,8)	2 (1,9)	4 (3,8)
Non concerné	23 (21,7)	34 (32,1)	33 (31,1)
Total	106 (100)	106 (100)	106 (100)

Performance diagnostique de l'observateur 1 par rapport au gold standard

L'observateur 1 a identifié correctement les niveaux de profondeurs tumorales de 54 lésions/106 et écarté correctement 20 lésions, non concernées par ce critère car n'étant pas des CBC. Les valeurs intrinsèques et extrinsèques de l'observateur 1 pour identifier correctement le niveau de profondeur de chaque lésion par rapport au gold standard étaient de 89% et 44% pour la sensibilité et la spécificité et de 68% et 74% pour la VPP et la VPN (tableau XVII).

Diagnostic niveau de profondeur tumorale selon observateur 1	Diagnostic niveau de profondeur tumorale selon Gold standard		
	Lésions avec niveau tumoral identique (n)	Lésions avec niveau tumoral différent et non concernées (sans CBC) (n)	
Lésions avec niveau tumoral identique (n)	54	25	VPP=0.68
Lésions avec niveau tumoral différent et non concernées (sans CBC) (n)	7	20	VPN=0.74
	Sensibilité= 0. 89 Soit 89%	Spécificité=0.44 Soit 44%	

Performance diagnostique de l'observateur 2 par rapport au gold standard

L'observateur 2 a identifié correctement les niveaux de profondeurs tumorales de 55 lésions/106 et écarté correctement 31 lésions, non concernées par ce critère car n'étant pas des CBC. Les valeurs intrinsèques et extrinsèques de l'observateur 2 pour identifier correctement le

niveau de profondeur de chaque lésion par rapport au gold standard étaient de 90% et 69% pour la sensibilité et la spécificité et de 80% et 84% pour la VPP et la VPN (tableau XVIII).

Tableau XVIII : Comparaison des accords sur les niveaux de profondeur tumorale entre l'observateur 2 et le gold standard : sensibilité, spécificité, et rapports de vraisemblance positif/ négatif.			
	Diagnostic niveau de profondeur tumorale selon Gold standard		
Diagnostic niveau de profondeur tumorale selon observateur 2	Lésions avec niveau tumoral identique (n)	Lésions avec niveau tumoral différent et non concernées (sans CBC) (n)	
Lésions avec niveau tumoral identique (n)	55	14	VPP=0.80
Lésions avec niveau tumoral différent et non concernées (sans CBC) (n)	6	31	VPN=0.84
	Sensibilité= 0.90 soit 90%	Spécificité=0.69 Soit 69%	

Concordance diagnostique entre l'observateur 1 et l'observateur 2

La concordance entre l'O1 et l'O2 était considérée comme bonne pour caractériser les niveaux de profondeur tumorale des 106 lésions avec la MCEV, avec un coefficient de kappa à 0,70 [0,56-0,83] tout niveau de Clark confondu (tableau XIX).

Tableau XIX : Comparaison des différents résultats des niveaux de profondeur tumorale de l'observateur 1 avec l'observateur 2.						
	Stade histologique observateur 2					
Stade histologique observateur 1	StadeII	StadeIII	StadeIV	StadeV	Non concerné	Total
Niveau II	15	0	0	0	6	21
Niveau III	1	12	0	0	2	15
Niveau IV	1	0	38	0	5	44
Niveau V	0	0	1	2	0	3
Non concerné	1	0	1	0	21	23
Total	18	12	40	2	34	106
-Coefficient de Kappa pondéré avec IC ₉₅ =0.70[0.56-0.83]						

5) Identification de la couche tissulaire la plus profonde

Sur tous les prélèvements analysés, la couche tissulaire la plus profonde la plus fréquemment observée était l'hypoderme à des taux respectifs de 52%, 53% et 51% parmi l'O1,

l'O2 en MCEV et le GS puis on retrouvait du derme réticulaire en dernière couche dans 41% des lésions restantes par les deux observateurs et le gold standard. Enfin, on rapportait dans les derniers pourcentages du tissu musculaire et cartilagineux (tableau XX).

	Observateur 1	Observateur 2	Gold standard
Derme réticulaire	44 (41,5)	43 (40,6)	43 (40,6)
Hypoderme	55 (51,9)	56 (52,8)	56 (52,8)
Muscle	6 (5,7)	6 (5,7)	6 (5,7)
Cartilage	1 (0,9)	1 (0,9)	1 (0,9)
Total	106 (100)	106 (100)	106 (100)

Performance diagnostique de l'observateur 1 par rapport au gold standard

L'observateur 1 a identifié correctement la couche tissulaire la plus profonde de 103 lésions/106 par rapport au gold standard avec une sensibilité de 98% et une VPP de 98% (tableau XXI).

	Gold standard		
Observateur 1	Profondeurs biopsies identiques (n)	Profondeurs biopsies différentes (n)	
Profondeurs biopsies identiques (n)	103	1	VPP=0.98
Profondeurs biopsies différentes (n)	2	0	VPN=/
	Sensibilité= 0.98 soit 98%	Spécificité= /	

Performance diagnostique de l'observateur 2 par rapport au gold standard

L'observateur 2 a identifié correctement la couche tissulaire la plus profonde de 104 lésions/106 par rapport au gold standard avec une sensibilité de 99% et une VPP de 99% (tableau XXII).

Tableau XXII : Comparaison des accords sur les profondeurs de biopsies de l'observateur 2 et du gold standard : sensibilité, spécificité, et rapports de vraisemblance positif/négatif.			
	Gold standard		
Observateur 2	Profondeurs biopsies identiques (n)	Profondeurs biopsies différentes (n)	
Profondeurs biopsies identiques (n)	104	1	VPP=0.99
Profondeurs biopsies différentes (n)	1	0	VPN=/
	Sensibilité=0.99 Soit 99 %	Spécificité=/	

Concordance diagnostique entre l'observateur 1 et l'observateur 2

La concordance entre l'O1 et l'O2 était considérée comme excellente pour reconnaître de façon identique la couche tissulaire la plus profonde sur les 106 prélèvements en MCEV, avec un kappa à 0,98 [0,94-1], tout type de couche tissulaire confondu (tableau XXIII).

Tableau XXIII : Comparaison des différents résultats des profondeurs de biopsie de l'observateur 1 avec l'observateur 2.					
	Profondeur biopsie observateur 2				
Profondeur biopsie observateur 1	Cartilage	Hypoderme	Muscle	Réticulaire	Total
Cartilage	1	0	0	0	1
Hypoderme	0	55	0	0	55
Muscle	0	0	6	0	6
Réticulaire	0	1	0	43	54
Total	1	56	6	43	106
-Coefficient de Kappa pondéré avec IC ₉₅ =0.98 [0.94-1]					

Les figures X à XV montrent des exemples d'images numériques de MCEV comparées à l'histopathologie conventionnelle en H&E en reprenant les critères de l'étude. La légende suivante est commune à toutes les figures :

Epiderme : ★

Derme papillaire : }

Derme réticulaire : [

Hypoderme : ▲

Foyers tumoraux de CBC : →

Infiltrat inflammatoire : ☾

Annexes : ✨

MCEV : image numérique de microscopie confocale ex vivo en mode combiné et coloration digitale

H&E : lame d'histopathologie conventionnelle en coloration hématoxyline et éosine

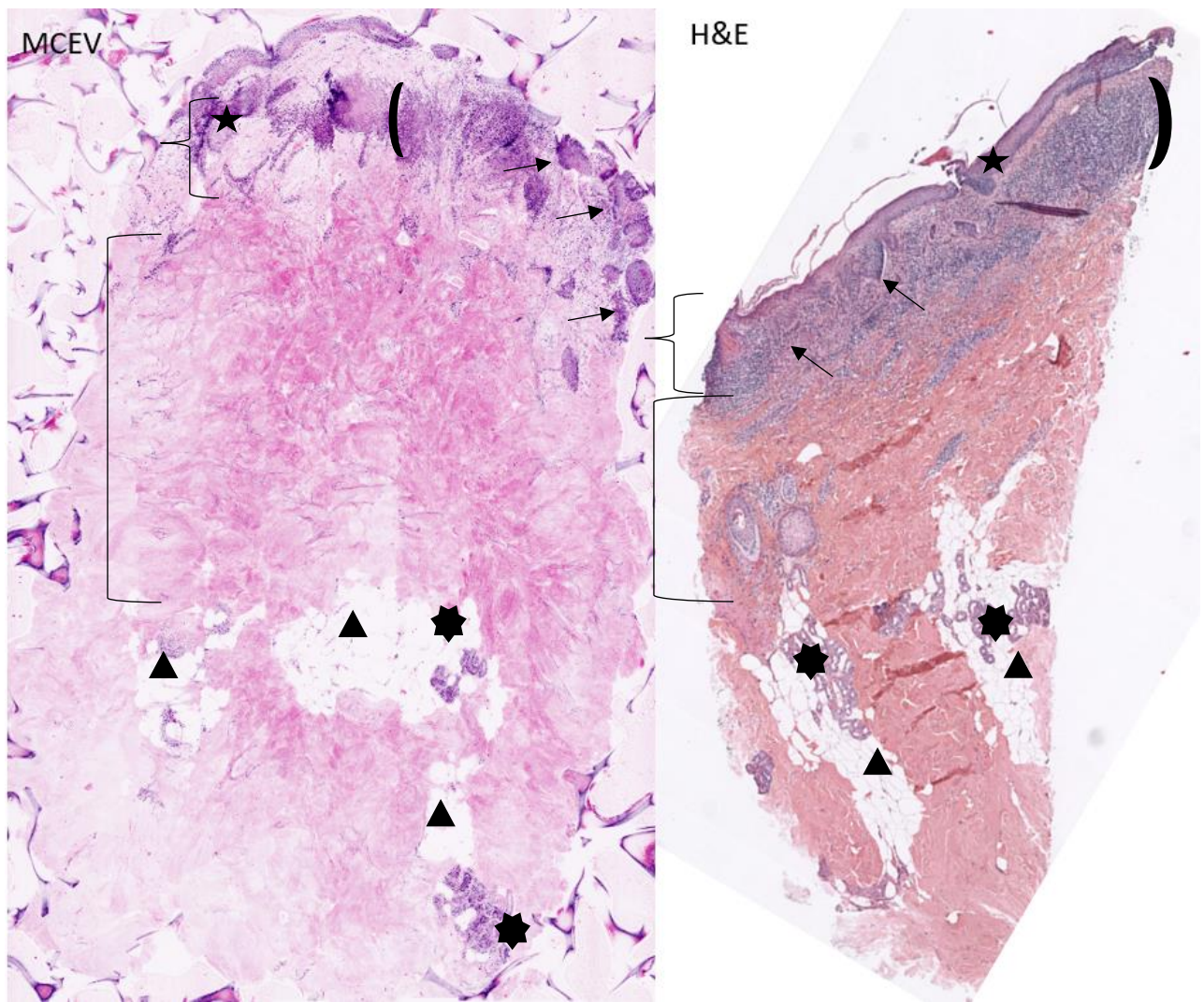


Figure X : Biopsie cutanée d'un CBC superficiel avec infiltrat inflammatoire important. Foyers tumoraux appendus à l'épiderme. Niveau de Clark II. Profondeur tissulaire : hypoderme. Les annexes ici sont des glandes sudoripares.

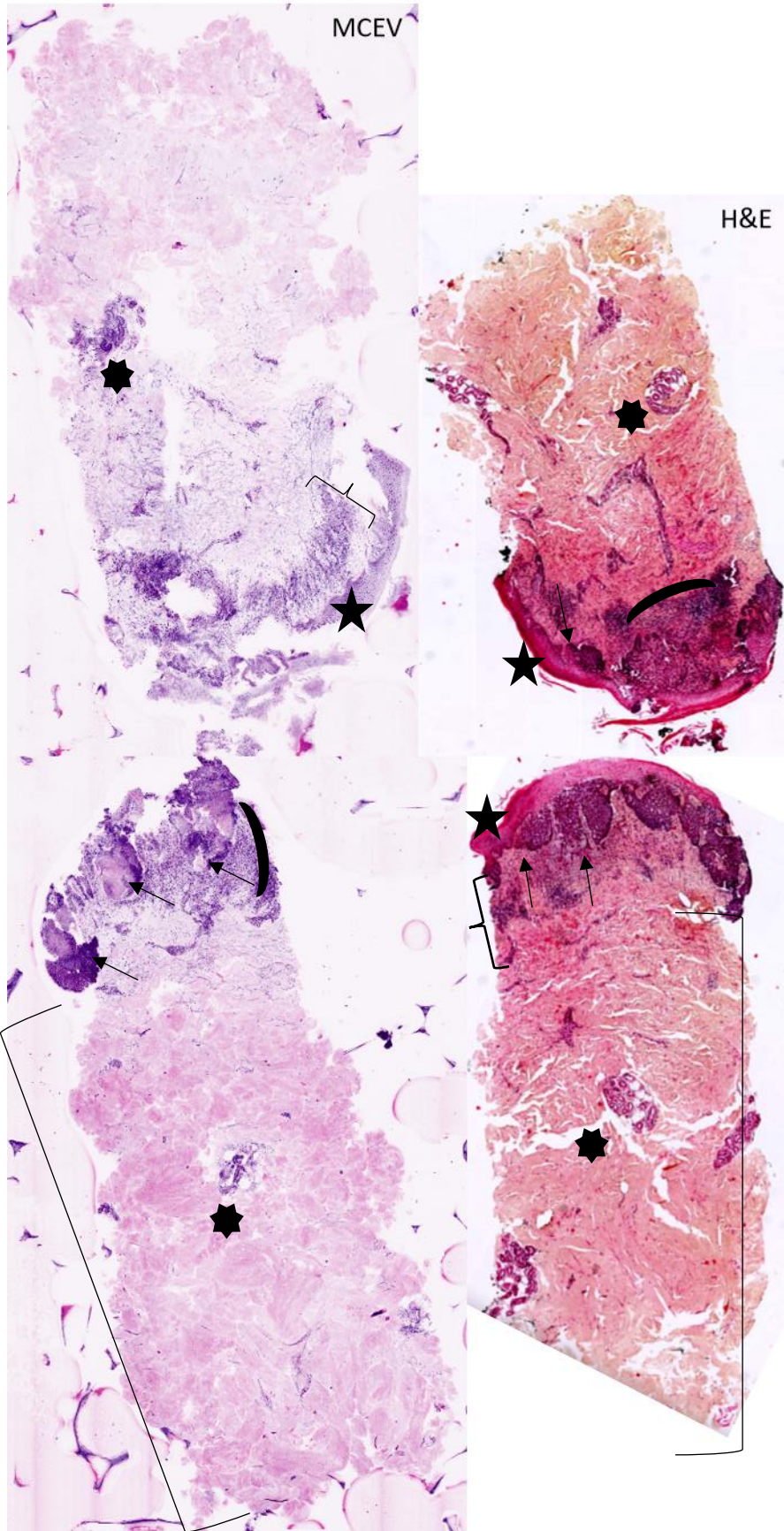


Figure XI : Biopsie cutanée d'un CBC superficiel coupée en deux en son milieu, avec présence d'un infiltrat inflammatoire. Foyers tumoraux appendus à l'épiderme. Niveau de Clark II. Profondeur tissulaire : derme réticulaire. Les annexes ici sont des glandes sudoripares.

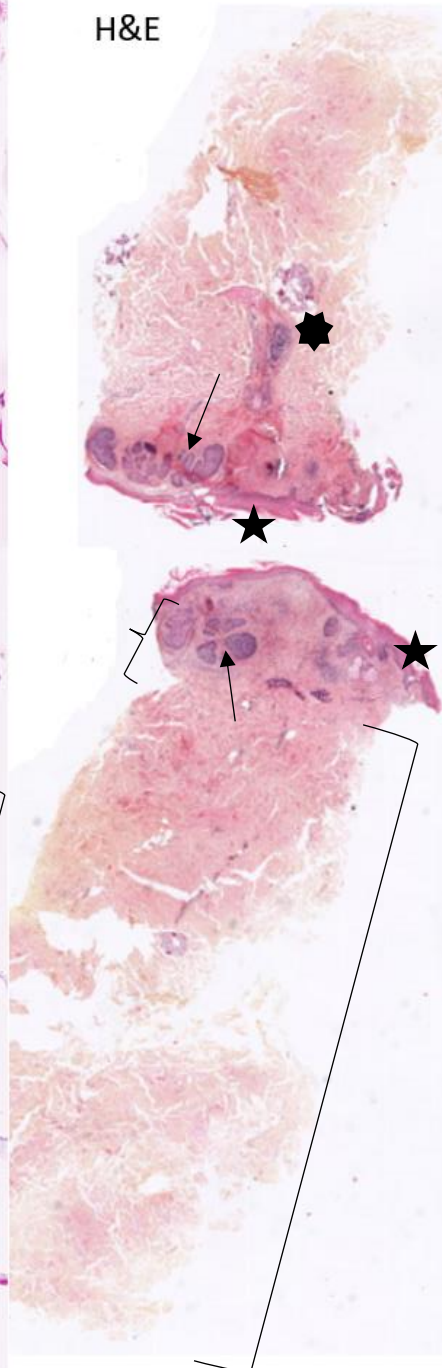
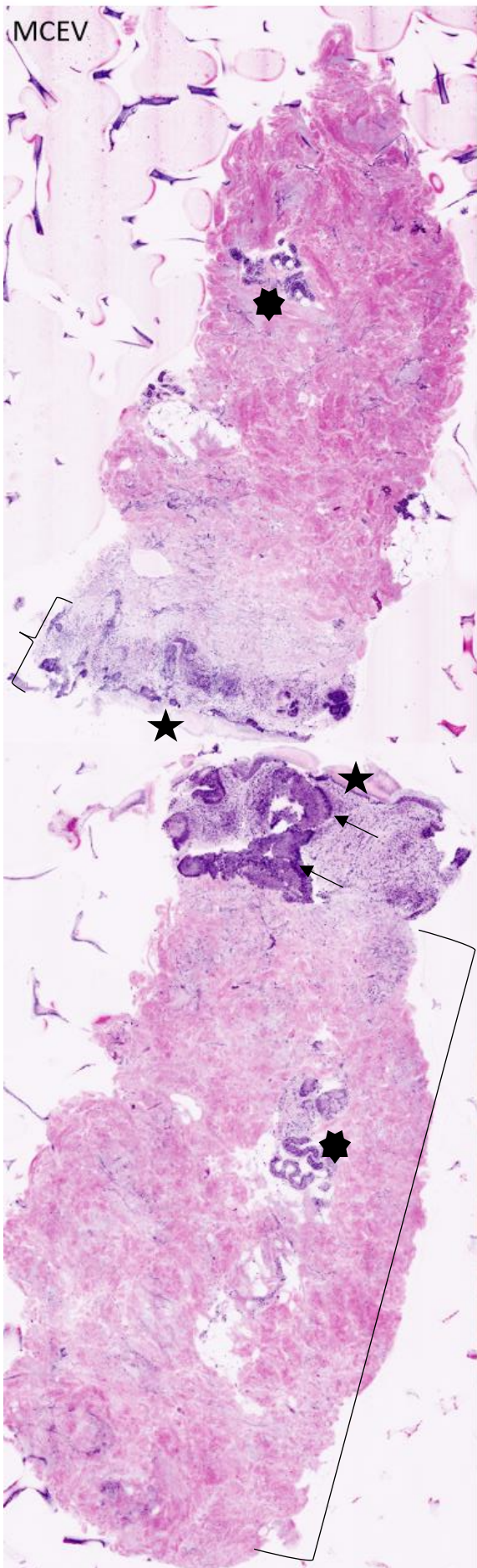


Figure XII : Biopsie cutanée d'un CBC nodulaire coupée en deux en son milieu. Foyers tumoraux non appendus à l'épiderme. Niveau de Clark III. Profondeur tissulaire : derme réticulaire. Les annexes ici sont des glandes sudoripares, follicules pilo-sébacés.

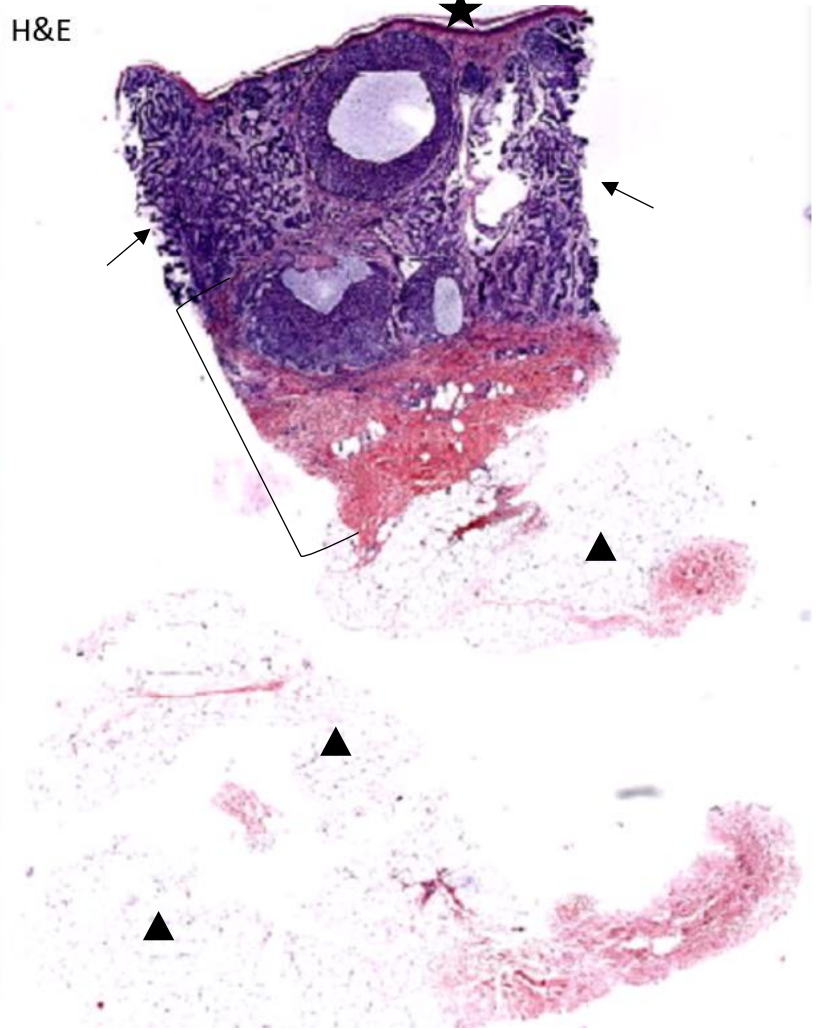
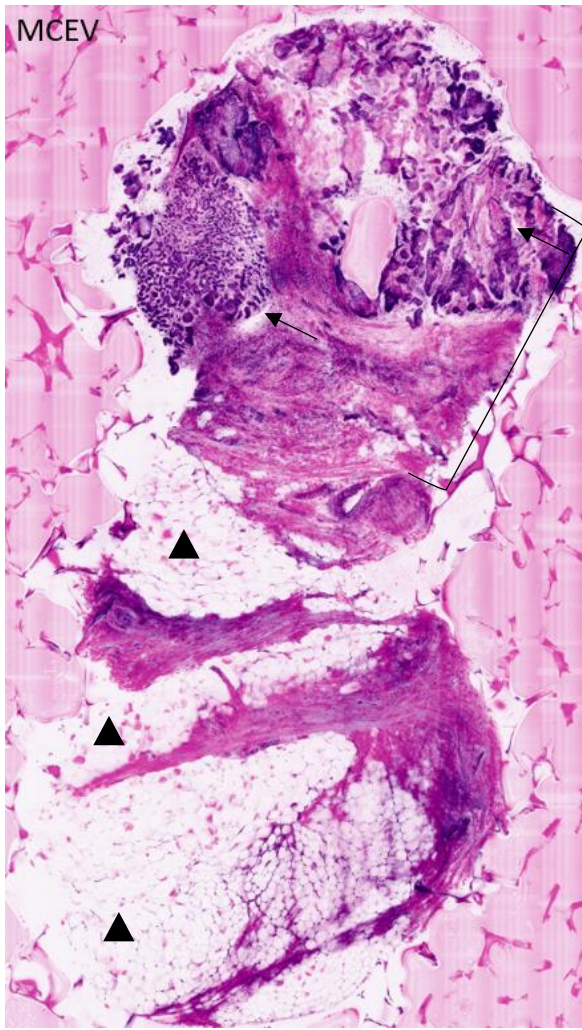


Figure XIII : Biopsie cutanée d'un CBC nodulaire. Niveau de Clark IV. Profondeur tissulaire : hypoderme.

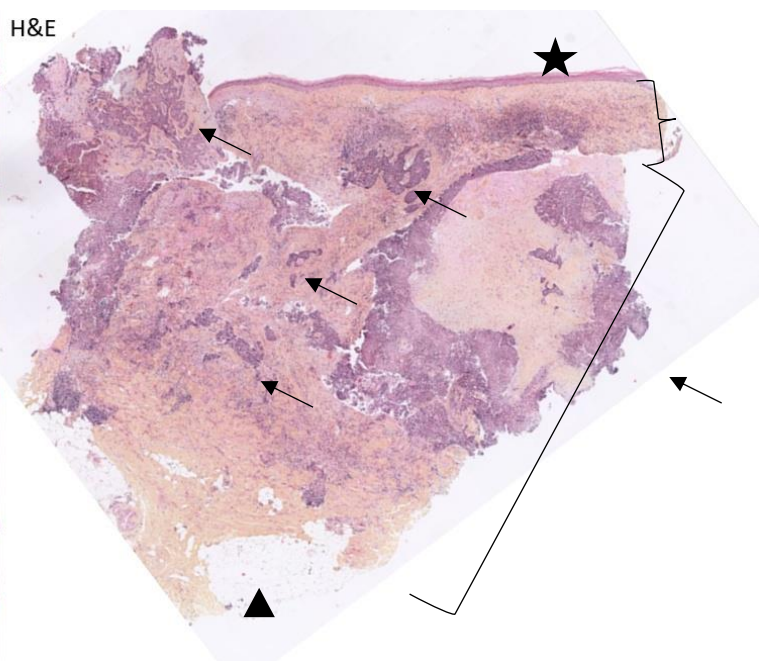
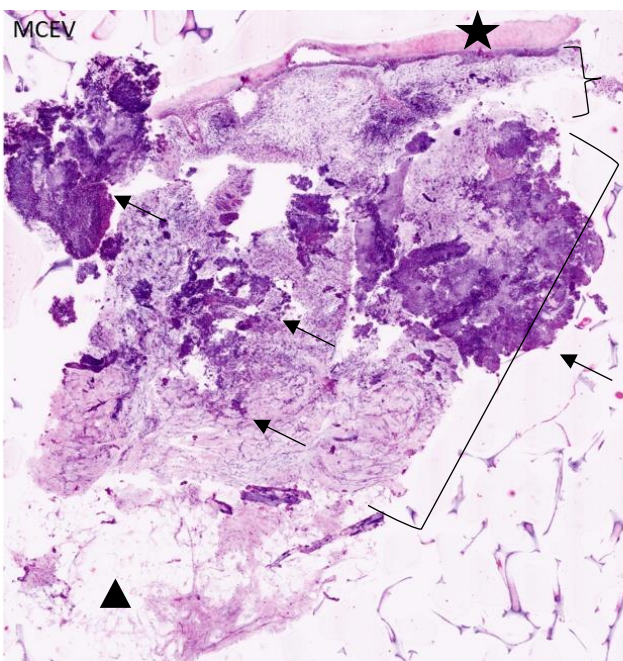


Figure XIV : Biopsie cutanée d'un CBC infiltrant trabéculaire. Niveau de Clark IV. Profondeur tissulaire : hypoderme.

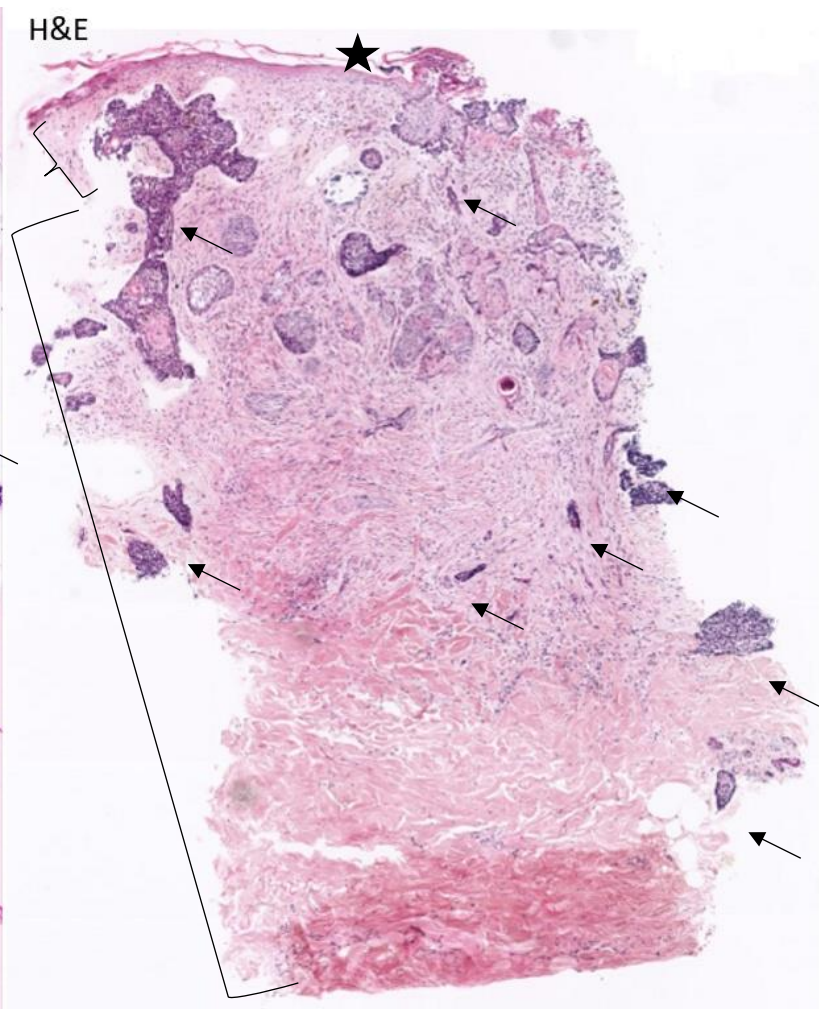
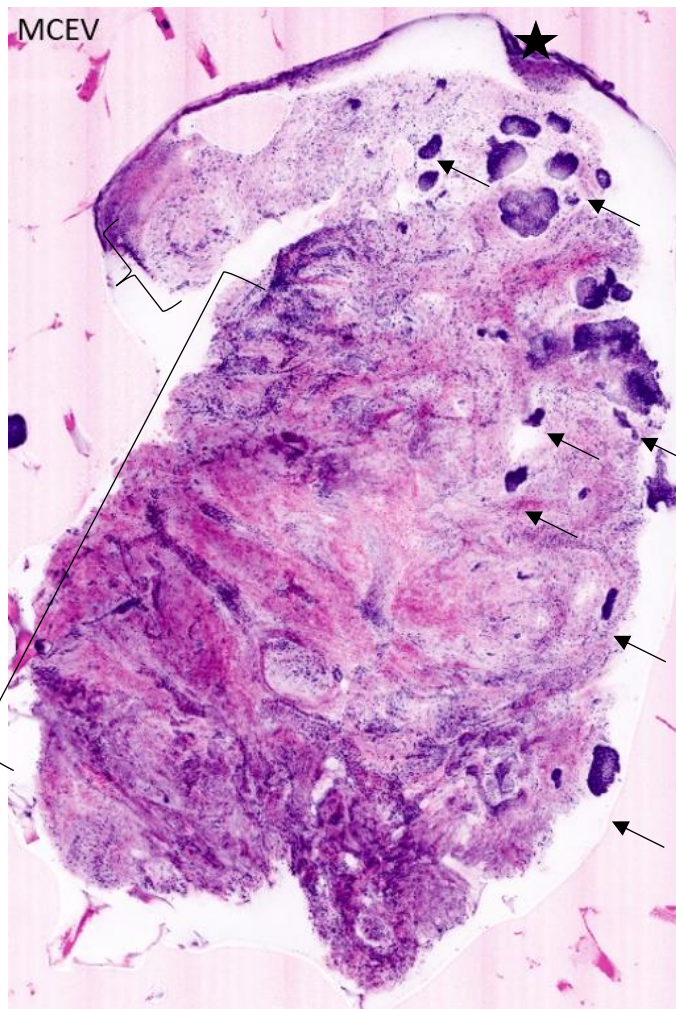


Figure XV : Biopsie cutanée d'un CBC infiltrant trabéculaire. Niveau de Clark IV. Profondeur tissulaire : derme réticulaire.

DISCUSSION

Cette étude prospective démontre la performance de la MCEV en mode combiné et coloration digitale pour diagnostiquer des CBC sur des punch-biopsies cutanées (de 3 à 4 mm) de lésions cliniquement suspectes. A notre connaissance une telle étude n'a jamais été menée jusqu'à présent. L'étude de *Peters et al.* qui évalue le processus d'acquisition et d'analyse des images de MCEV en mode fluorescence seul et coloration digitale ainsi que l'acuité diagnostique de détection des CBC analyse 22 prélèvements issus de biopsies cutanées sur 525 au total provenant pour le reste de chirurgie de Mohs. Dans ces conditions, la sensibilité et la spécificité pour les biopsies cutanées au punch était de 100% (29). Dans notre étude, sur 66 prélèvements analysés, la sensibilité et la spécificité de l'observateur 1 (interne en dermatologie ayant reçu une journée de formation à la MCEV) et de l'observateur 2 (dermatopathologiste non formé à la MCEV) étaient respectivement de 96% et 61% (pour l'O1) et 97% et 94% (pour l'O2) reflétant des concordances diagnostiques bonne et excellente par rapport au gold standard (l'analyse histopathologique conventionnelle en coloration H&E). L'observateur 1 a caractérisé les sous-types histologiques avec une sensibilité de 79% et une spécificité de 50%, alors que l'observateur 2 a identifié les sous-types avec une sensibilité et une spécificité de 82% par rapport au gold standard, montrant une bonne concordance diagnostique entre les deux observateurs. Les valeurs intrinsèques de l'O1 et l'O2 pour reconnaître le niveau de profondeur tumorale selon la classification de Clark étaient respectivement de 89 et 90% pour la sensibilité et 44 et 69% pour la spécificité réalisant une bonne concordance diagnostique. Enfin, on observait une concordance diagnostique excellente entre les observateurs pour définir la couche tissulaire la plus profonde sur les prélèvements par rapport à l'histopathologie.

Préparation technique des prélèvements et appréhension du microscope confocal

L'appareil Vivascope 2500M-4G était simple d'utilisation pour un novice dénué d'expérience en microscopie confocale ex vivo tant pour préparer les tissus que pour manipuler le microscope en lui-même et le logiciel d'acquisition des images. L'étape la plus délicate dans la préparation des prélèvements consistait en l'étalement homogène du tissu sur la lame de verre en regard de l'objectif. Il s'agissait effectivement de la partie la plus chronophage et celle qui nécessitait le plus de dextérité, c'est d'ailleurs ce qui est décrit dans d'autres études traitant de la MCEV avec cet appareil (25) où l'aplatissement complet du tissu comptait parmi les principaux facteurs interférant dans l'acquisition d'une image parfaite. Cet article présente les premières images de CBC avec ce microscope confocal ex vivo, dont l'objectif était de définir le protocole

de coloration le plus adapté pour l'acquisition d'images en mode combiné fluorescence et réflectance, à savoir la double coloration par acridine orange et acide acétique : immersion pendant 20 secondes avec de l'acridine orange à 1mmol/L puis rinçage dans une solution salée pendant 20 secondes et enfin immersion dans de l'acide acétique à 50% pendant 20 secondes. C'est, en effet, le protocole sur lequel nous nous sommes basés pour préparer les prélèvements. Le temps d'immersion dans les colorants variait entre 10 et 20 secondes selon la taille de la biopsie cutanée. L'article de *Peters et al.* qui évalue les performances diagnostiques de la MCEV comparé à l'histopathologie conventionnelle sur des CBC opérés en chirurgie de Mohs et issus de biopsies cutanées en utilisant un autre microscope (Histolog Scanner v1) évoque également la difficulté de l'étalement et du positionnement du tissu sur la lame de verre (29). La revue de la littérature de *Jain et al.* retraçant les avancées de la MCEV du stade d'essai au laboratoire à l'utilisation au bloc opératoire en vie réelle considère effectivement qu'il s'agit là d'une des limitations techniques à l'origine de diagnostics manqués de CBC (30). C'est pourquoi, des techniques ont été élaborées et testées pour palier à cette limite, telles que « la presse à tissu » développée par *Cinotti et al.* qui permet de corriger localement la distension tissulaire avant et/ou pendant l'examen au microscope (31) ou le dispositif de *Pérez-Anker et al.* utilisant un système d'aimants et de mousses de différentes tailles pour s'adapter au mieux à la dimension de l'échantillon (27) (dispositif que nous avons également repris pour lutter contre cette limite). Les auteurs expliquent également que l'on peut s'aider d'un scalpel pour séparer l'épiderme et le derme de la graisse et permettre le déroulement complet de l'épiderme sans retournement.

Voici quelques exemples d'images de MCEV où l'étalement du prélèvement n'est pas optimal lié à une visualisation incomplète de l'épiderme ou à la présence de bulles (figures XVI et XVII) :

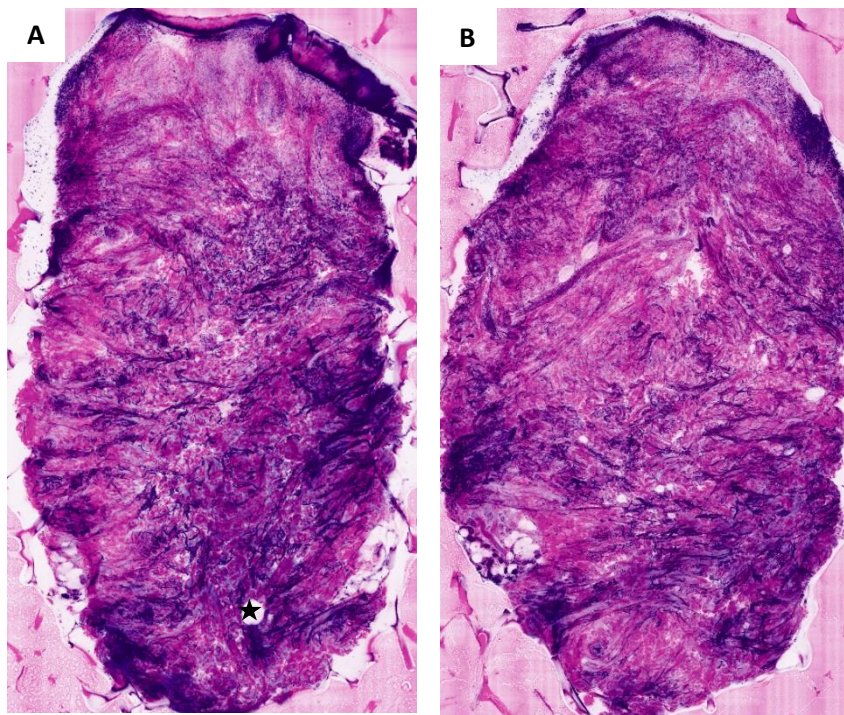


Figure XVI Biopsie cutanée d'une lésion de la cuisse droite diagnostiquée CBC superficiel antérieurement traitée par IMIQUIMOD. L'épiderme est donc indispensable à observer pour rechercher une récurrence de CBC superficiel. A : épiderme retourné sur son versant externe. B : épiderme retourné sur son versant interne.★ Présence d'une bulle.

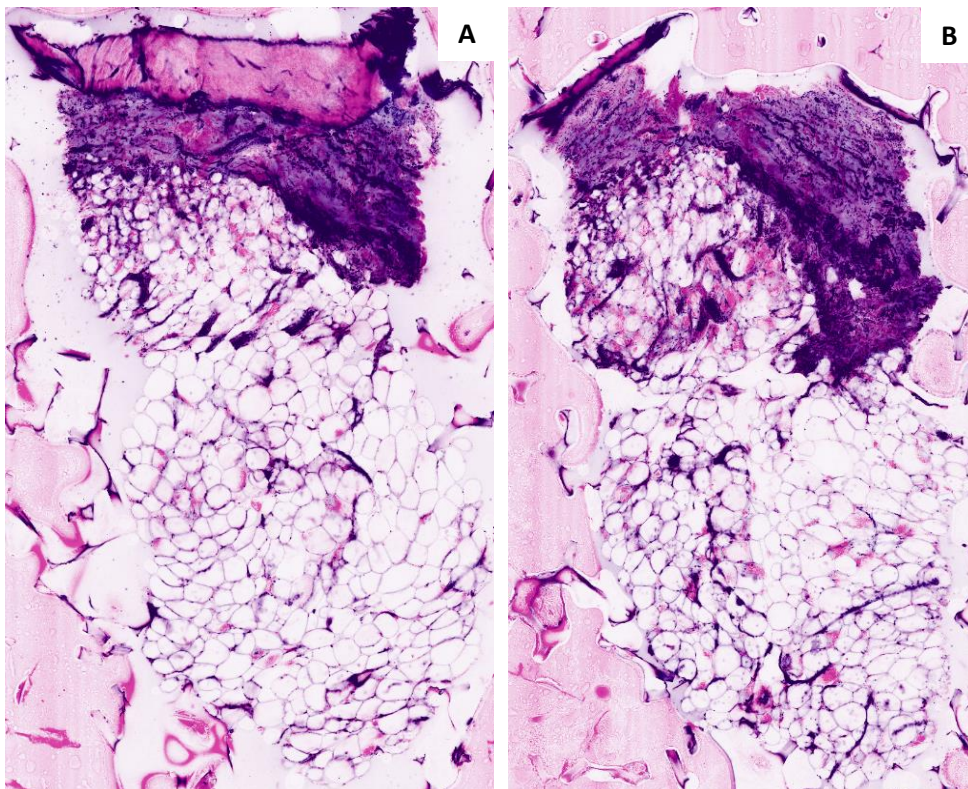


Figure XVII Biopsie cutanée d'une lésion de la jambe gauche. A : épiderme retourné sur son versant externe. B : prélèvement mieux positionné sur la lame à l'aide d'un scalpel qui a coupé l'épiderme sans perdre de tissu.

Il est cependant à noter qu'en anatomopathologie classique, le positionnement sur lame des coupes de tissus fixés est parfois imparfait et les échantillons peuvent être totalement repliés sur eux-mêmes rendant très difficile la lecture convenable de la lame. Ce point est néanmoins à nuancer par le fait qu'une lame d'histopathologie conventionnelle contient systématiquement plusieurs coupes du même prélèvement (environ 8 pour une biopsie cutanée de 3 à 4mm), ainsi

en cas de coupe mal positionnée, on peut s'aider des autres sections de la lame pour avoir une vue du prélèvement. La figure XVIII montre des images d'histopathologie conventionnelle, où les coupes de biopsies cutanées se sont retournées lors du positionnement sur la lame de verre ne permettant pas de visualiser les sections en entier :



Figure XVIII 2 exemples de biopsies cutanées de lésions suspectes de CBC où les coupes se sont retournées lors du positionnement sur la lame.

Par ailleurs, il est à noter que le conditionnement des prélèvements et le temps d'acquisition des images sont nettement plus courts rapportés à l'histopathologie conventionnelle. Bien que ce critère n'ait pas été étudié dans notre étude, nous avons en effet pu constater la rapidité d'obtention d'une image en MCEV. C'est ce qui est souligné dans certaines études notamment celle de *Peters et al.* où le temps pour générer et évaluer une image de MCEV était de 2,05 minutes (min) minimum avec un temps médian de 5,17 min (29). Il est cependant précisé que plus le prélèvement est grand, plus le temps d'acquisition d'images est long car plusieurs images peuvent être nécessaires pour visualiser le prélèvement en entier, pouvant aller jusqu'à 20,17 min. Ce dernier point concerne les pièces opératoires entières non pas les biopsies à visée diagnostique notamment aux punches dont les diamètres les plus fréquents varient de 2 à 4 mm. Dans l'étude de *Bennassar et al.* qui a cherché à évaluer la sensibilité et la spécificité de la MCEV en mode fluorescence pour détecter des foyers résiduels de CBC sur pièces opératoires et calculer la temps diagnostique en MCEV et en extemporané classique sur tissus congelés, a montré un temps de 10,1 min +/- 1,22 min (par rapport à l'analyse extemporanée de 28,2 min +/- 2,2 min) (32). Dans l'article de *Ziefle et al.* comparant la MCEV à l'acquisition d'images histologiques en 3D pour diagnostiquer des résidus de CBC sur pièces

opérateurs a calculé un temps de préparation et de génération d'images de 7,5 minutes (33). Ainsi, la MCEV a le grand avantage de produire des images de tissus frais sans altérer l'examen histopathologique standard en coloration H&E ou pour tout autre processus d'immunohistochimie (IHC). La revue de la littérature de *Malvey et al.* compare d'ailleurs les étapes techniques de la MCEV par rapport à l'histopathologie conventionnelle sur tissus congelés et fixés dans du formol (tableau XXIV) soulignant la supériorité de la MCEV dans cet aspect-là (16) :

	MCEV (tissus frais)	Histologie (tissus congelés)	Histologie (tissus fixés dans du formol)
Personne	1	>2 (préparation du prélèvement et analyse)	>2 (préparation du prélèvement et analyse)
Matériel	Scalpel pour couper, étaler le prélèvement, liquides et récipients pour la coloration	Cryostat, microscope, colorants	Microtome, plaque de réfrigération, table d'allongement, bain d'eau, incubateur, microscope, colorant
Espace	Minimal (1,5m ²)	5 à 10m ²	5 à 15m ²
Méthode de coloration	Manuelle	Manuelle ou automatique	Manuelle ou automatique
Temps requis pour préparer le tissu	1 min pour le mode réflectance seul 3 à 7 min pour la fluorescence 2h pour l'IHC	45 min pour l'H&E manuelle 52 min pour l'H&E automatisée 1h45 pour l'IHC manuelle 2h30 pour l'IHC automatisée	17h38 pour l'H&E manuelle 17h45 pour l'H&E automatisée 18h55 pour l'IHC manuelle 19h45 pour l'IHC automatisée
Épaisseur de la lame	Le prélèvement en entier	8 à 10 µm	3 à 5 µm
Nouvelle préparation du prélèvement pour coloration supplémentaire	Oui	Non	Non
Documentation	Obtention directe d'images numérisées des prélèvements (télémédecine)	Caméra ou microscope numérique supplémentaire nécessaire.	Caméra ou microscope numérique supplémentaire nécessaire.

	immédiate ou lecture d'images en différents endroits de l'hôpital)	La télémedecine n'est pas possible d'emblée	La télémedecine n'est pas possible d'emblée
--	--	---	---

Tableau XXIV Comparaison technique de la microscopie confocale ex vivo et de l'histopathologie conventionnelle.

Lecture et interprétation des images

Les performances diagnostiques du dermato-pathologiste étaient globalement meilleures que celles de l'interne pour détecter la présence de CBC, identifier les sous-types histologiques ainsi que le niveau de profondeur tumorale par rapport au gold standard. En effet, bien que dénué d'expérience en MCEV, le pathologiste a pu plus facilement interpréter les images de MCEV en se basant notamment sur ses connaissances d'histopathologie conventionnelle. La lecture et l'analyse des images se faisaient en coloration digitale (violette pour le mode fluorescence et rose pour le mode réflectance) dont l'objectif était de mimer la coloration H&E classique, colorants classiques en dermatopathologie (hématoxyline de couleur violette ou bleue et éosine de couleur rose). Cet aspect est également évoqué dans l'étude de *Peters et al.* où les images générées en mode fluorescence haute résolution apparaissent dans une couleur violette avec la coloration numérique ressemblant aux lames H&E et pouvant ainsi faciliter l'analyse par un pathologiste, familier des images roses et bleues de la coloration H&E (29). Néanmoins et bien que ce critère n'ait pas été testé dans notre étude, on peut observer une courbe d'apprentissage positive pour interpréter les images de MCEV par des personnes non expérimentées initialement. Des études ont en effet évalué la courbe d'apprentissage pour manipuler et interpréter des images pathologiques de MCEV dans le domaine de la cancérologie cutanée ou autre (22,34,35). L'étude rétrospective de *Mu et al.* a évalué l'acuité et la précision diagnostique de 3 médecins avant et après entraînement pour l'évaluation des marges chirurgicales par la MCEV en coloration digitale dans le traitement des CBC et carcinomes épidermoïdes en chirurgie micrographique de Mohs (64 lésions au total). Les moyennes respectives de sensibilité et spécificité pour détecter ces cancers étaient de 90% et 79% avant entraînement et 99% et 93% après entraînement. La session d'entraînement impliquait de revoir 6 exemples de lames en 5 minutes (22). L'étude de *Talreja et al.* a évalué la capacité diagnostique de sténoses biliaires via l'endomicroscopie confocale avant et après entraînement, révélant une acuité diagnostique avant entraînement de 72% et après entraînement de 89% (34). L'article de *Bertoni et al.* a évalué la courbe d'apprentissage pour interpréter des images saines et cancéreuses de tissus

prostatiques et périprostatiques en MCEV par deux anatomopathologistes différents : l'acuité diagnostique était de 86% et 92% pour le premier et le deuxième médecins à la première lecture pour atteindre une acuité diagnostique de 95% pour les deux médecins à la deuxième lecture (35). Par ailleurs, la revue de la littérature de *Jain et al.* évoque le fait que quelques cliniciens maîtrisent à l'heure actuelle la lecture de la MCEV mais que si l'on souhaite étendre la manipulation de cette technologie, il faudrait augmenter le nombre d'interprètes. Des congrès portés sur ce thème ont déjà eu lieu, mais l'on pourrait envisager des cours et formations adressés aux internes de dermatologie, d'anatomopathologie et aux chirurgiens de Mohs facilitant l'accès et l'utilisation de la MCEV dans la pratique quotidienne (30) d'autant plus qu'une marge de progression significative semble assez rapide à acquérir.

Les résultats entre l'observateur 2 et le gold standard ne sont cependant pas parfaitement concordants puisqu'on obtient un test de kappa à 0.89 non pas à 1 pour la détection des foyers de CBC de même pour l'identification des sous-types histologiques et la caractérisation du niveau de profondeur tumorale où les performances diagnostiques ne sont pas de 100%. Ce constat peut s'expliquer entre autres par la superposition des images en MCEV qui n'est jamais exactement identique aux lames d'histopathologie conventionnelle y compris pour les premières coupes. Par définition, pour produire des coupes de tissus congelés ou inclus dans de la paraffine, il y a toujours un morceau du bloc tissulaire préalablement sectionné et qui n'est pas représenté sur les lames, alors que sur pièce fraîche, aucune zone n'est jetée. Dans ces conditions, il peut y avoir des faux négatifs lorsque les premiers foyers tumoraux ne sont pas visibles en MCEV et apparaissent en histopathologie lorsqu'une section tissulaire sans tumeur est réalisée ou alors des faux positifs lorsque des foyers sont visibles en MCEV et absents en histopathologie car coupés ou interrompus (29). L'étude de *Bennàssar et al.* observe également ce problème technique : en extemporané, à la différence de la MCEV, une fois que l'échantillon est congelé, le technicien de Mohs peut couper une certaine quantité de tissu avant d'obtenir une section optimale où la masse tumorale est bien visible et atteinte. Alors qu'avec la microscopie confocale, aucun tissu n'est coupé ni consommé, l'échantillon est directement appliqué sur la lame et scanné, et l'image obtenue est ainsi l'homologue réel du prélèvement initial (32).

Les figures XIX et XX montrent des images de MCEV et d'histopathologie où les premières lames H&E ne sont pas strictement superposables aux images digitales de MCEV.

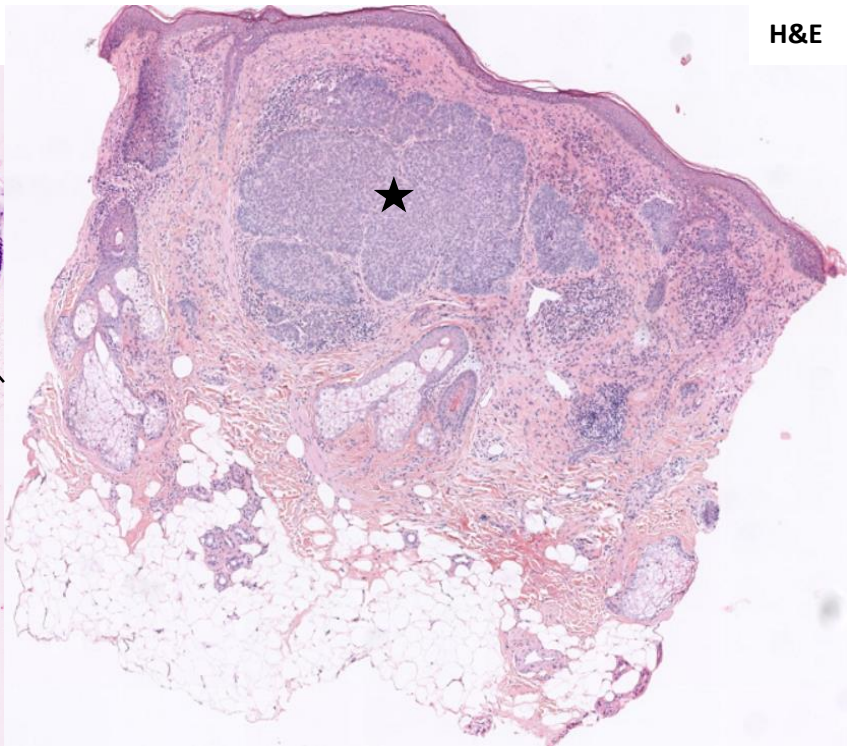


Figure XIX CBC étiqueté superficiel par les deux observateurs en MCEV du fait de la présence d'amas tumoral appendu à l'épiderme → mais diagnostiqué nodulaire en histopathologie (H&E) car l'on observe dès la première coupe des foyers nodulaires bien délimités et séparés de l'épiderme ★ .

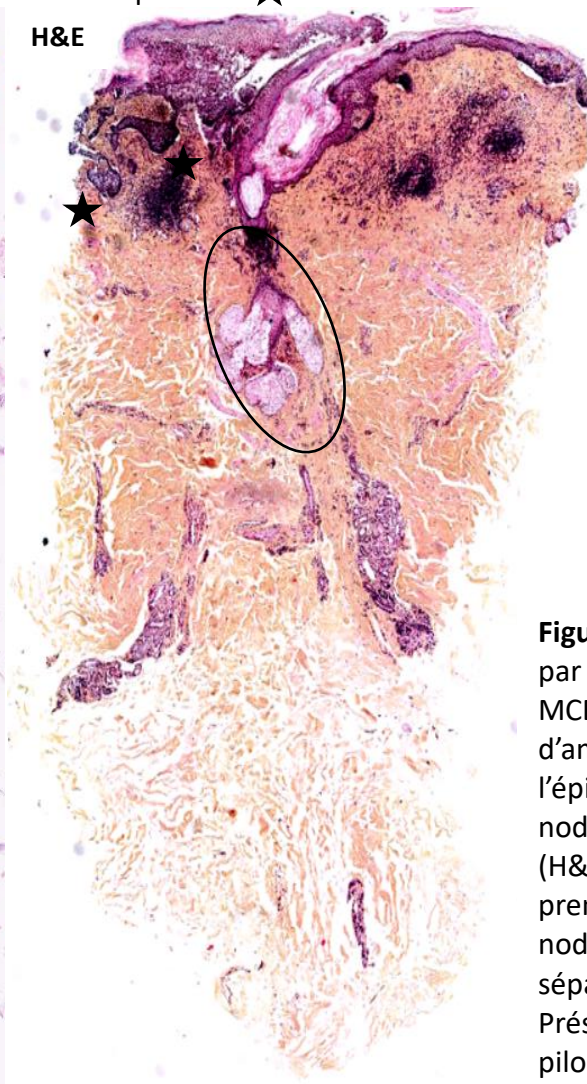
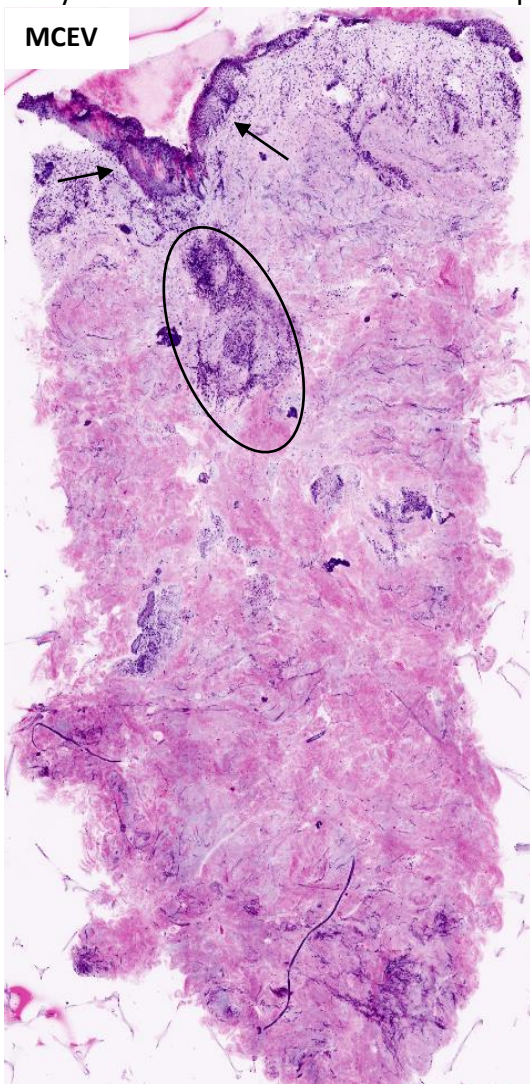


Figure XX CBC étiqueté superficiel par les deux observateurs en MCEV du fait de la présence d'amas tumoral appendu à l'épiderme → mais diagnostiqué nodulaire en histopathologie (H&E) car l'on observe dès la première coupe des foyers nodulaires bien délimités et séparés de l'épiderme ★ . Présence d'une annexe : follicule pilo-sébacé ○ .

En regardant les critères secondaires et notamment la caractérisation des sous-types histologiques, nous avons constaté qu'il y avait des différences de performance diagnostique entre les observateurs en fonction des sous-types. En effet, le sous-type superficiel était celui pour lequel les concordances diagnostiques semblaient les moins bonnes entre l'O1 et l'O2 (cf tableau VIII partie résultats). Le sous-type sclérodermiforme était, d'une part, sous-représenté (2 biopsies au total diagnostiquées CBC sclérodermiforme en H&E) et d'autre part sans concordance diagnostique entre les observateurs et le gold standard. L'étude préclinique de *Gareau et al.* qui a cherché à valider la précision diagnostique de la microscopie confocale en mode fluorescence par rapport à l'histopathologie classique de prélèvements congelés opérés en chirurgie de Mohs a observé que l'interprétation des images était facile pour les CBC nodulaires et micronodulaires, mais relativement plus compliquée pour les CBC superficiels et infiltrants. Les difficultés étaient notamment dues à une visualisation incomplète des marges épidermiques (pour les CBC superficiels), et la présence d'infiltrats inflammatoires denses qui peuvent obscurcir les foyers tumoraux (en particulier pour les CBC infiltrants) (15). De plus, les différences de diagnostics pouvaient parfois être liées à la difficulté de distinction des structures annexes (follicules pileux, glandes sébacées, sudoripares) avec les foyers tumoraux. Ce point a d'ailleurs fait l'objet d'une étude dont l'objectif était de fournir une terminologie diagnostique de la MCEV mode fluorescence pour caractériser la peau normale, les annexes et les CBC : 64 lésions de CBC ont été analysées, avec une sensibilité et une spécificité diagnostique de 94,9% et 96,8% en comparant les images de MCEV aux lames incluses en paraffine et colorées en H&E où dans 6 cas, la présence de glandes sébacées et d'un infiltrat inflammatoire intense pouvaient porter à confusion (14). Dans notre étude, bien que l'interprétation des images ait été réalisée a posteriori, en cas de doute diagnostique notamment entre une annexe et un foyer tumoral, nous avons la possibilité dans un premier temps de zoomer précisément sur cette zone (figure XXI) et dans un second temps d'acquérir des images dynamiques en temps réel en allant profondément dans le prélèvement jusqu'à 50-100 μm correspondant à 10 à 20 sections d'histopathologie classique. Cette acquisition d'image dynamique peut effectivement être réalisable avec le vivascope 2500 4ème génération grâce au mode « stack » qui permet dans un champ précis d'aller jusqu'à une profondeur de 200 μm .

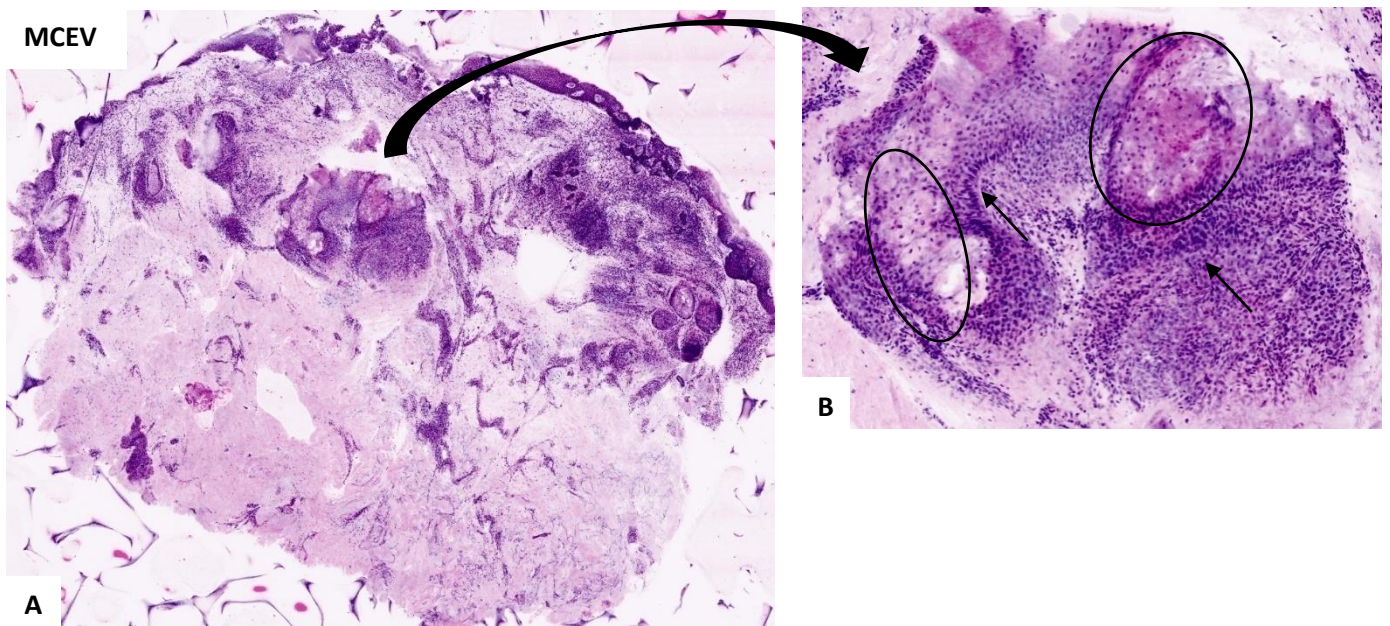


Figure XXI Image en MCEV d'une biopsie cutanée d'une lésion suspecte de CBC où l'on observe au milieu une zone suspecte (A) qui en zoomant semble être une glande sébacée \bigcirc engainée par des cellules tumorales (B), visibles avec une forte densité cellulaire et un agencement palissadique \blacktriangleleft .

En cas de doute diagnostique, l'anatomopathologiste peut, d'une part, couper le bloc tissulaire en entier si nécessaire pour répondre à la question posée, confirmer ou infirmer un diagnostic, ce qui n'est pas possible avec l'utilisation de la MCEV en temps réel où l'on peut tout au plus couper le prélèvement en deux et générer des images recto verso des prélèvements (augmentant par contre le temps d'acquisition des images). Il peut, d'autre part, réaliser facilement une coloration supplémentaire en IHC avec notamment le BerEp4 qui est toujours positif dans le CBC (36). L'équipe de *Hartmann et al.* a montré que l'IHC était également réalisable avec la MCEV en testant les anticorps PS100B, Melan-A et BerEp4 dont les positivités respectives étaient de 55,6, 66,7 et 85,7 % pouvant ainsi améliorer le diagnostic des tumeurs cutanées via la MCEV (37).

L'étude de *Kadouch et al.* qui a évalué l'efficacité diagnostique de la microscopie confocale in vivo mode fluorescence pour diagnostiquer des lésions suspectes de CBC par rapport à la biopsie cutanée standard a également constaté que la concordance d'identification des sous-types histologiques variait d'un expert à un autre par rapport à la biopsie cutanée : la concordance variait en effet de 50% pour les experts avec moins d'1 an d'expérience en MCIV à 85% pour les experts ayant plus de 10 ans d'expérience en MCIV. Les auteurs soulignent là aussi la nécessité de formations supplémentaires, recommandations et protocoles pour diagnostiquer et définir les sous-types histologiques correctement avec la microscopie confocale (38). La revue

de la littérature de *Malvey et al.* résume dans le tableau XXV les limites et les causes expliquant le manque de corrélation, parfois inhérent à la MCEV, avec l’histopathologie conventionnelle (16) :

Faux positifs en MCEV	Faux négatifs en MCEV
<ul style="list-style-type: none"> ➤ Les follicules pileux, les glandes eccrines, les glandes sébacées peuvent parfois être confondues avec des foyers tumoraux de CBC ➤ Résolution limite des microscopes de première génération pour distinguer des travées tumorales d’un stroma inflammatoire 	<ul style="list-style-type: none"> ➤ Artéfact de mauvais étalement du prélèvement sur la lame de verre ➤ Visualisation en MCEV directe du prélèvement frais tel quel non sectionné à la différence de la préparation en histopathologie classique

Tableau XXV Limites et raisons pour le manque de corrélation avec l’histopathologie conventionnelle.

Concernant la comparaison des niveaux de profondeur tumorale, bien qu’il ne soit pas spécifiquement précisé dans les comptes-rendus anatomopathologiques standards des CBC, nous avons estimé que ce critère pouvait être pertinent pour montrer que les images de biopsies de CBC acquises en MCEV mode combiné et coloration digitale reflétaient au mieux une lame d’anatomopathologie en coloration H&E. Dans notre étude, nous observons une bonne concordance diagnostique entre l’observateur 1 et l’observateur 2 pour caractériser les niveaux de profondeur tumorale de chaque lésion avec des performances diagnostiques respectives de 89% et 44% et 90% et 69% pour la sensibilité et la spécificité par rapport au gold standard. Ce critère n’a jamais été évalué dans ce contexte, la corrélation topographique en profondeur a déjà été étudiée selon l’indice de Breslow (non pas la classification de Clark) pour des tumeurs mélanomateuses (non pas des CBC) dans l’étude pilote de *Hartmann et al.* par rapport à l’analyse histopathologique standard. Sur 10 lésions étudiées, le coefficient de corrélation entre l’épaisseur tumorale histopathologique et l’épaisseur tumorale confocale était de 1 (39). En revanche, l’OCT, autre technologie d’imagerie en dermatologie (cf tableau III partie introduction) considérée comme plus précise pour mesurer la profondeur des prélèvements (visualisation jusqu’à 2mm avec une résolution de 7µm) a fait l’objet étude combiné à la MCEV pour évaluer les marges d’exérèse latérale et profonde de CBC nodulaires et superficiels sur pièces opératoires. Sur 20 spécimens, la marge d’erreur de l’OCT était de 50µm pour les CBC nodulaires et 20µm pour les CBC superficiels par rapport à la profondeur tumorale définie en histologie (40). Les auteurs envisagent d’ailleurs de tester cette combinaison technologique pour guider les choix thérapeutiques chirurgical et non chirurgical.

Pour finir, nous avons cherché à caractériser la couche tissulaire la plus profonde observée sur chaque prélèvement entre MCEV et histopathologie. Nous avons observé une concordance excellente entre les observateurs 1, 2 et le gold standard confirmant ainsi qu'une biopsie cutanée correctement étalée sur la lame de verre en regard de l'objectif du microscope confocal est aussi informative que la lame d'histopathologie standard sous le microscope optique pour visualiser un prélèvement sur toute sa hauteur. Ainsi, en cas d'identification du sous-type histologique sur la biopsie cutanée observée sur toute sa hauteur, nous pouvons envisager que la MCEV pourrait guider plus rapidement le choix du traitement le plus adapté (traitement local, exérèse chirurgicale avec des marges définies, chirurgie micrographique,...). Cette hypothèse nécessite d'être explorée par une étude de plus grande ampleur avec un nombre d'échantillons tissulaires plus importants et une meilleure représentativité de chaque sous-type histologique.

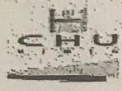
CONCLUSION

Notre étude montre que la MCEV en mode combiné (fluorescence, réflectance) et coloration digitale peut être prometteuse pour caractériser les CBC sur biopsies cutanées en préopératoire, du sous-type histologique au niveau de profondeur tumorale, en s'assurant de visualiser le prélèvement sur toute sa hauteur.

Cependant, avant de pouvoir affirmer que la MCEV peut remplacer l'histopathologie conventionnelle, certains paramètres doivent être améliorés tels que l'étalement homogène des prélèvements sur la lame de verre ou le développement de formations et de méthodes d'apprentissage à la lecture des images de MCEV par les cliniciens. Une des observations majeures de notre étude est effectivement la supériorité diagnostique de l'anatomopathologiste, même sans expérience en microscopie confocale, par rapport au clinicien, pour détecter les foyers de CBC, caractériser les sous-types histologiques, et les niveaux de profondeur tumorale. De plus, notre étude manque de puissance du fait d'un nombre faible d'échantillons et d'une insuffisance de CBC sclérodermiformes (2/106 prélèvements) avec une concordance diagnostique nulle entre les observateurs et le gold standard. Or, ce sous-type aurait été pertinent à étudier, car agressif et de mauvais pronostic, il compte parmi les CBC nécessitant un diagnostic histologique préalable à toute décision thérapeutique. Par ailleurs, l'interprétation des images de MCEV s'est réalisée, dans notre étude, a posteriori non pas en extemporané au moment de la génération des images, ne nous permettant pas d'évaluer le critère temps de préparation, acquisition, interprétation des images qui semble être un des points forts de la MCEV mis en avant dans de nombreuses études. C'est pourquoi, avant de pouvoir considérer la MCEV comme un outil d'imagerie alternatif à l'histologie pour une prise en charge diagnostique et thérapeutique accélérée des CBC, une étude de plus grande ampleur (augmentation du nombre d'échantillons avec meilleure représentativité de tous les sous-types histologiques) doit être menée avec une amélioration des points techniques et une interprétation en temps réel des images. Du fait de l'augmentation croissante des patients atteints de CBC, il est effectivement convenable d'envisager d'autres stratégies de prises en charge diagnostique en étudiant d'autres critères pertinents en vie réelle tels que le temps écoulé entre le diagnostic et le traitement, les effets directs des outils diagnostiques sur la santé, ou encore le coût de ces tests.

En attendant, cette technologie nous paraît plus abordable pour les anatomopathologistes concernant l'interprétation et la lecture fine des images par rapport aux cliniciens via par exemple un accès à distance dans le cadre de la télémédecine.

ANNEXE

 Pôle Biologies Pathologie	Instruction <i>Formulaire de consentement éclairé du patient</i>	Doc. N°: ECRB010 - V 4 Date d'application : 2016-09-08
		Page 1 sur 1

Référence au Processus : Gestion des activités de la Biothèque

Consentement éclairé pour le don d'éléments du corps humain et d'informations biomédicales à des fins de recherche pour la Biothèque du CHRU de Nîmes

Je confirme que j'ai été informé des modalités de gestion des collections dans le cadre de la Biothèque du CHRU de Nîmes (Place du Professeur Robert Debré 30029 Nîmes Cedex 09). J'ai pu poser toutes les questions à l'équipe médicale. J'ai bien compris que ma participation était volontaire et que je suis libre de modifier ou révoquer mon consentement à tout moment sans aucune justification, sans que cela n'ait de conséquence sur mon suivi médical. Mon consentement ne décharge pas la Biothèque du CHRU de Nîmes de sa responsabilité et je conserve tous mes droits garantis par la loi.

Je donne mon accord pour que les échantillons et produits dérivés, prélevés lors de mes différentes consultations et/ou hospitalisations, ainsi que les données biocliniques associées, puissent être gérés de façon anonyme par la Biothèque du CHRU de Nîmes afin qu'ils puissent être :

- utilisés à des fins de recherche fondamentale.
- utilisés à des fins de toute autre recherche scientifique sous contrôle de la pertinence scientifique de l'utilisation par la Biothèque du CHRU de Nîmes.
- inclus dans des recherches de marqueurs génétiques sans que les résultats ne permettent d'identifier ma personne.
- utilisés pour le développement de produits qui pourraient être commercialisés, sans qu'aucun bénéfice financier ne puisse me revenir.

J'ai bien conscience que :

- je peux demander à tout moment la destruction de mes échantillons conservés en le demandant à la Biothèque du CHRU de Nîmes.
- je n'aurai aucun retour financier et aucun bénéfice direct ne peut être attendu des recherches scientifiques qui pourront être faites grâce à mes échantillons.
- je pourrai obtenir des informations globales sur les activités de la Biothèque du CHRU de Nîmes et les avancées de la recherche en m'adressant au Responsable du CRB.
- j'accepte que la Biothèque du CHRU de Nîmes puisse recontacter mon médecin, Dr _____, si des informations importantes pour mon suivi médical sont obtenues lors des recherches.

Je reconnais en particulier que le droit de me faire assister par une personne de confiance de mon choix m'a été communiqué.

J'accepte que les prélèvements biologiques et les données associées me concernant puissent être utilisés à des fins de recherche.

Je m'oppose à ce que les prélèvements biologiques et les données associées me concernant puissent être utilisés à des fins de recherche.

Partie réservée au patient donnant son consentement	Partie réservée au médecin ayant donné l'information
Nom, prénom : _____	Nom : _____
Date de naissance : _____	Etablissement/service : _____
Fait à : _____	_____
Le : _____	Signature : _____
Signature : _____	

Formulaire de consentement écrit signé par chaque patient souhaitant participer à l'étude, au moment de l'inclusion.

BIBLIOGRAPHIE

1. Cameron MC, Lee E, Hibler BP, Barker CA, Mori S, Cordova M, et al. Basal cell carcinoma. *J Am Acad Dermatol*. févr 2019;80(2):303-17.
2. Lang BM, Balermipas P, Bauer A, Blum A, Brölsch GF, Dirschka T, et al. S2k Guidelines for Cutaneous Basal Cell Carcinoma – Part 1: Epidemiology, Genetics and Diagnosis. *JDDG J Dtsch Dermatol Ges*. 2019;17(1):94-103.
3. Lomas A, Leonardi-Bee J, Bath-Hextall F. A systematic review of worldwide incidence of nonmelanoma skin cancer. *Br J Dermatol*. 2012;166(5):1069-80.
4. Leiter U, Keim U, Eigentler T, Katalinic A, Holleczek B, Martus P, et al. Incidence, Mortality, and Trends of Nonmelanoma Skin Cancer in Germany. *J Invest Dermatol*. 1 sept 2017;137(9):1860-7.
5. Agence Nationale d'Accréditation et Evaluation en Santé (ANAES). [Recommendations for the diagnostic and therapeutic management of basal cell carcinoma in adults]. *Ann Pathol*. oct 2004;24(5):460-72.
6. Guy GP, Machlin SR, Ekwueme DU, Yabroff KR. Prevalence and costs of skin cancer treatment in the U.S., 2002-2006 and 2007-2011. *Am J Prev Med*. févr 2015;48(2):183-7.
7. Rogers HW, Coldiron BM. A relative value unit-based cost comparison of treatment modalities for nonmelanoma skin cancer: effect of the loss of the Mohs multiple surgery reduction exemption. *J Am Acad Dermatol*. juill 2009;61(1):96-103.
8. Rossi AM, Sierra H, Rajadhyaksha M, Nehal K. Novel approaches to imaging basal cell carcinoma. *Future Oncol Lond Engl*. nov 2015;11(22):3039-46.
9. Maier T, Braun-Falco M, Hinz T, Schmid-Wendtner MH, Ruzicka T, Berking C. Morphology of basal cell carcinoma in high definition optical coherence tomography: en-face and slice imaging mode, and comparison with histology. *J Eur Acad Dermatol Venereol*. 2013;27(1):e97-104.
10. Gniadecka M, Wulf HC, Nielsen OF, Christensen DH, Hercogova J. Distinctive Molecular Abnormalities in Benign and Malignant Skin Lesions: Studies by Raman Spectroscopy. *Photochem Photobiol*. 1997;66(4):418-23.
11. Patalay R, Talbot C, Alexandrov Y, Lenz MO, Kumar S, Warren S, et al. Multiphoton multispectral fluorescence lifetime tomography for the evaluation of basal cell carcinomas. *PLoS One*. 2012/09/11. 2012;7(9):e43460-e43460.
12. Rajadhyaksha M, Menaker G, Flotte T, Dwyer PJ, González S. Confocal Examination of Nonmelanoma Cancers in Thick Skin Excisions to Potentially Guide Mohs Micrographic Surgery Without Frozen Histopathology. *J Invest Dermatol*. nov 2001;117(5):1137-43.
13. Chung VQ, Dwyer PJ, Nehal KS, Rajadhyaksha M, Menaker GM, Charles C, et al. Use of ex vivo confocal scanning laser microscopy during Mohs surgery for nonmelanoma skin cancers. *Dermatol Surg Off Publ Am Soc Dermatol Surg Al*. déc 2004;30(12 Pt 1):1470-8.

14. Longo C, Rajadhyaksha M, Ragazzi M, Nehal K, Gardini S, Moscarella E, et al. Evaluating ex vivo fluorescence confocal microscopy images of basal cell carcinomas in Mohs excised tissue. *Br J Dermatol*. sept 2014;171(3):561-70.
15. Gareau DS, Karen JK, Dusza SW, Tudisco M, Nehal KS, Rajadhyaksha M. Sensitivity and specificity for detecting basal cell carcinomas in Mohs excisions with confocal fluorescence mosaicing microscopy. *J Biomed Opt*. juin 2009;14(3):034012.
16. Malveyh J, Pérez-Anker J, Toll A, Pigem R, Garcia A, Alos LL, et al. Ex vivo confocal microscopy: revolution in fast pathology in dermatology. *Br J Dermatol*. 5 mars 2020;
17. Cinotti E, Perrot JL, Labeille B, Cambazard F, Rubegni P. Ex vivo confocal microscopy: an emerging technique in dermatology. *Dermatol Pract Concept*. 30 avr 2018;8(2):109-19.
18. Schüürmann M, Stecher MM, Paasch U, Simon JC, Grunewald S. Evaluation of digital staining for ex vivo confocal laser scanning microscopy. *J Eur Acad Dermatol Venereol JEADV*. 15 nov 2019;
19. Bini J, Spain J, Nehal K, Hazelwood V, DiMarzio C, Rajadhyaksha M. Confocal mosaicing microscopy of human skin ex vivo: spectral analysis for digital staining to simulate histology-like appearance. *J Biomed Opt*. juill 2011;16(7):076008.
20. Gareau DS, Jeon H, Nehal KS, Rajadhyaksha M. Rapid screening of cancer margins in tissue with multimodal confocal microscopy. *J Surg Res*. déc 2012;178(2):533-8.
21. Peters N, Schubert M, Metzler G, Geppert J-P, Moehrle M. Diagnostic accuracy of a new ex vivo confocal laser scanning microscope compared to H&E-stained paraffin slides for micrographic surgery of basal cell carcinoma. *J Eur Acad Dermatol Venereol*. 2019;33(2):298-304.
22. Mu EW, Lewin JM, Stevenson ML, Meehan SA, Carucci JA, Gareau DS. Use of Digitally Stained Multimodal Confocal Mosaic Images to Screen for Nonmelanoma Skin Cancer. *JAMA Dermatol*. 01 2016;152(12):1335-41.
23. Gareau DS. The feasibility of digitally stained multimodal confocal mosaics to simulate histopathology. *J Biomed Opt*. 2009;14(3):034050.
24. Bennàssar A, Carrera C, Puig S, Vilalta A, Malveyh J. Fast evaluation of 69 basal cell carcinomas with ex vivo fluorescence confocal microscopy: criteria description, histopathological correlation, and interobserver agreement. *JAMA Dermatol*. juill 2013;149(7):839-47.
25. Pérez-Anker J, Ribero S, Yélamos O, García-Herrera A, Alos L, Alejo B, et al. Basal cell carcinoma characterization using fusion ex vivo confocal microscopy: a promising change in conventional skin histopathology. *Br J Dermatol*. févr 2020;182(2):468-76.
26. Pérez-Anker J, Malveyh J, Moreno-Ramírez D. Ex Vivo Confocal Microscopy Using Fusion Mode and Digital Staining: Changing Paradigms in Histological Diagnosis. *Actas Dermosifiliogr*. 17 janv 2020;

27. Pérez-Anker J, Puig S, Malveyh J. A fast and effective option for tissue flattening: Optimizing time and efficacy in ex vivo confocal microscopy. *J Am Acad Dermatol*. 28 juin 2019;
28. Fuhrman C, Chouaïd C. [Concordance between two variables: numerical approaches (qualitative observations - the kappa coefficient-; quantitative measures)]. *Rev Mal Respir*. févr 2004;21(1):123-5.
29. Peters N, Schubert M, Metzler G, Geppert J-P, Moehrle M. Diagnostic accuracy of a new ex vivo confocal laser scanning microscope compared to H&E-stained paraffin slides for micrographic surgery of basal cell carcinoma. *J Eur Acad Dermatol Venereol*. 2019;33(2):298-304.
30. Jain M, Rajadhyaksha M, Nehal K. Implementation of fluorescence confocal mosaicking microscopy by « early adopter » Mohs surgeons and dermatologists: recent progress. *J Biomed Opt*. 01 2017;22(2):24002.
31. Cinotti E, Grivet D, Labeille B, Solazzi M, Bernard A, Forest F, et al. The 'tissue press': a new device to flatten fresh tissue during ex vivo confocal microscopy examination. *Skin Res Technol*. 2017;23(1):121-4.
32. Bennàssar A, Vilata A, Puig S, Malveyh J. Ex vivo fluorescence confocal microscopy for fast evaluation of tumour margins during Mohs surgery. *Br J Dermatol*. 2014;170(2):360-5.
33. Ziefle S, Schüle D, Breuninger H, Schippert W, Moehrle M. Confocal Laser Scanning Microscopy vs 3-Dimensional Histologic Imaging in Basal Cell Carcinoma. *Arch Dermatol*. 16 août 2010;146(8):843-7.
34. Talreja JP, Turner BG, Gress FG, Ho S, Sarkaria S, Paddu N, et al. Pre- and post-training session evaluation for interobserver agreement and diagnostic accuracy of probe-based confocal laser endomicroscopy for biliary strictures. *Dig Endosc Off J Jpn Gastroenterol Endosc Soc*. juill 2014;26(4):577-80.
35. Bertoni L, Puliatti S, Reggiani Bonetti L, Maiorana A, Eissa A, Azzoni P, et al. Ex vivo fluorescence confocal microscopy: prostatic and periprostatic tissues atlas and evaluation of the learning curve. *Virchows Arch Int J Pathol*. 6 janv 2020;
36. Cribier B. Les difficultés du diagnostic : du carcinome basocellulaire aux tumeurs trichoblastiques. *Ann Dermatol Vénéréologie*. 1 nov 2018;145:VS3-11.
37. Hartmann D, Krammer S, Vural S, Bachmann MR, Ruini C, Sárdy M, et al. Immunofluorescence and confocal microscopy for ex-vivo diagnosis of melanocytic and non-melanocytic skin tumors: A pilot study. *J Biophotonics*. 2018;11(3):e201700211.
38. Kadouch DJ, Leeflang MM, Elshot YS, Longo C, Ulrich M, van der Wal AC, et al. Diagnostic accuracy of confocal microscopy imaging vs. punch biopsy for diagnosing and subtyping basal cell carcinoma. *J Eur Acad Dermatol Venereol*. oct 2017;31(10):1641-8.
39. Hartmann D, Krammer S, Ruini C, Ruzicka T, von Braunmühl T. Correlation of histological and ex-vivo confocal tumor thickness in malignant melanoma. *Lasers Med Sci*. 1 juill 2016;31(5):921-7.

40. Iftimia N, Peterson G, Chang EW, Maguluri G, Fox W, Rajadhyaksha M. Combined reflectance confocal microscopy-optical coherence tomography for delineation of basal cell carcinoma margins: an ex vivo study. *J Biomed Opt.* janv 2016;21(1):16006.

SERMENT

- *En présence des Maîtres de cette école, de mes chers condisciples et devant l'effigie d'Hippocrate, je promets et je jure, au nom de l'Être suprême, d'être fidèle aux lois de l'honneur et de la probité dans l'exercice de la médecine.*
- *Je donnerai mes soins gratuits à l'indigent et n'exigerai jamais un salaire au-dessus de mon travail.*
- *Admis (e) dans l'intérieur des maisons, mes yeux ne verront pas ce qui s'y passe, ma langue taira les secrets qui me seront confiés, et mon état ne servira pas à corrompre les mœurs, ni à favoriser le crime.*
- *Respectueux (se) et reconnaissant (e) envers mes Maîtres, je rendrai à leurs enfants l'instruction que j'ai reçue de leurs pères.*
- *Que les hommes m'accordent leur estime si je suis fidèle à mes promesses. Que je sois couvert (e) d'opprobre et méprisé (e) de mes confrères si j'y manque.*

Intérêt de la microscopie confocale ex vivo en mode combiné et coloration digitale dans la caractérisation préopératoire des CBC

Introduction : Il est recommandé en France de faire une biopsie avant d'opérer un carcinome basocellulaire (CBC) sauf si ce dernier est de diagnostic très probable, de bon pronostic, et lorsque le geste chirurgical ne nécessite pas de reconstruction complexe. La microscopie confocale ex vivo en mode combiné (réflectance et fluorescence) et coloration digitale (MCEVd) permet aujourd'hui une analyse histologique immédiate de biopsies sans fixation ni coupe. Nous avons évalué l'efficacité de la MCEVd à diagnostiquer, classer histologiquement les CBC, déterminer leur niveau d'invasion ainsi que la couche tissulaire la plus profonde visualisée sur chaque prélèvement.

Matériels et Méthodes : Des punch-biopsies (3 mm) préopératoires de lésions suspectes de CBC ont été prospectivement analysés de juillet à novembre 2019 en MCEVd (Vivascope 2500 4ème génération, Mavig, Allemagne) par un interne de dermatologie formé à cette technique (O1) et par un dermato-pathologiste (O2). L'examen de référence anatomo-pathologique traditionnel (gold standard -GS-) était fait en aveugle de ces analyses. Le critère de jugement principal était la confirmation du diagnostic de CBC. Les critères de jugement secondaires étaient la classification en sous-types histologiques, le niveau d'invasion tumorale et le niveau de profondeur de la biopsie. La sensibilité (Se), la spécificité (Sp) et les valeurs prédictives positives (VPP) ou négatives (VPN) de la MCEVd ont été déterminées par rapport au GS. La concordance des diagnostics était évaluée avec le coefficient Kappa de Cohen.

Résultats : 106 punch-biopsies étaient réalisés chez 66 patients dont 73 correspondaient à des CBC avec le GS (13 superficiels, 37 nodulaires, 21 infiltrants et 2 sclérodermiformes). La MCEVd permettait une analyse en profondeur, par les deux observateurs, similaire au GS. Sur l'ensemble de ces prélèvements, les Se et Sp de la MCEVd pour le diagnostic de CBC étaient respectivement pour l'O1 de 96% et 61% et pour l'O2 de 96% et 94% avec une VPP et VPN respectives de 84% et 87% pour l'O1 et 97% et 91% pour l'O2. La concordance d'identification du sous-type histologique était bonne entre l'O1 et l'O2 (coefficient de kappa pondéré avec IC95 = 0,74 [0,64-0,84]) avec une Se et Sp respectives de 79% et 50% pour l'O1 et 82% et 82% pour l'O2 par rapport au GS. La concordance d'évaluation de l'invasion tumorale était bonne entre l'O1 et l'O2 (coefficient de kappa pondéré avec IC95 = 0,70 [0,56-0,83]) avec une Se et Sp respectives de 89% et 44% pour l'O1 et 90 et 69% pour l'O2 par rapport au GS.

Discussion : Les performances diagnostiques de la MCEVd pour confirmer la présence de foyers tumoraux de CBC sont élevées. Son acquisition par l'anatomopathologiste est facilitée par la coloration digitale mimant la coloration H&E. La MCEVd permet d'analyser les punch-biopsies sur toute leur hauteur comme le GS et de bien apprécier le niveau d'invasion tumorale et le sous-type histologique.

Conclusion : Notre étude montre que la MCEVd permet une caractérisation extemporanée préopératoire complète des CBC ouvrant la voie à une prise en charge diagnostique et thérapeutique accélérée de ces tumeurs.

Mots-clefs : carcinome basocellulaire, diagnostic, microscopie confocale ex vivo