

LE DOSSIER

Pathologies unguéales

Exploration de l'appareil unguéal en microscopie confocale *ex vivo* et *in vivo*

RÉSUMÉ : La microscopie confocale par réflectance (MCR) est une technique récente qui, grâce à un microscope confocal en temps réel, permet l'exploration soit directe de la peau ou des phanères (*in vivo*), soit indirecte sur des prélèvements (*ex vivo*).

Le principal intérêt de cette technique réside actuellement dans la pathologie tumorale du lit unguéal, dans l'exploration *in vivo* peropératoire des mélanonychies longitudinales permettant de guider le geste thérapeutique chirurgical ultérieur mais aussi, à terme, dans les carcinomes.

La microscopie confocale peut être également utile dans le diagnostic rapide d'une onychomycose.

Enfin, on commence à s'intéresser à ce que cette technique pourrait apporter à l'exploration de la pathologie inflammatoire.

Sa principale limite est le niveau de profondeur qu'elle permet d'explorer et la barrière que constitue la tablette unguéale dans l'exploration *in vivo* des pathologies du lit.



→ **B. FOUILLOUX, E. CINOTTI**
Hôpital Nord, CHU,
SAINT-ÉTIENNE.

L'étude de l'ongle en microscopie confocale

La microscopie confocale par réflectance (MCR) est une technique émergente qui, grâce à un microscope confocal, permet de traverser optiquement des tissus vivants à des niveaux de profondeurs variables, afin de saisir en temps réel des images des différentes couches de la peau, de la muqueuse et de l'appareil unguéal en utilisant la lumière réfléchie, sans besoin de coloration, *in vivo* et récemment aussi *ex vivo*.

>>> La MCR permet d'obtenir des images de haute résolution avec une sélection de la profondeur [1]. La particularité de la MCR est sa capacité de capter seulement la lumière réfléchie par le point observé. Dans un microscope confocal à balayage laser, un faisceau laser traverse un *pinhole* (sténopé) et fait l'objet d'une

mise au point par un objectif dans un petit volume focal du spécimen étudié. La préparation est balayée par le laser point par point suivant l'axe des X et l'axe des Y, grâce à des miroirs semi-réfléchissants. Le microscope va ensuite capter la lumière réfléchie par l'objet, d'où le nom de microscopie confocale "par réflectance". Cette lumière réfléchie est émise dans toutes les dimensions et dans les différents plans. Le *pinhole*, situé à l'entrée du photodétecteur, va permettre de ne récupérer que les photons provenant du plan focal. Ces photons vont être captés par le photodétecteur pour être amplifiés et transformés en signal électrique dont l'intensité est proportionnelle au nombre de photons reçus. Ce signal électrique va ensuite être numérisé en niveaux de gris.

Seule la lumière réfléchie à partir des structures biologiques dans le plan

sélectionné contribue à la formation de l'image. Comme la lumière et l'objectif du microscope sont concentrés sur le même plan focal spécifique, les structures situées au-dessus et au-dessous du plan n'interfèrent pas avec l'image formée [2].

>>> La MCR produit des images horizontales du tissu exploré avec une résolution à l'échelon cellulaire et sans altération du tissu. La peau et l'ongle sont des cibles de choix pour être étudiées par MCR car ce sont des tissus facilement accessibles. La profondeur à laquelle le microscope confocal peut pénétrer est limitée par la pénétration de la lumière à travers les tissus et par la réflectivité des structures observées; elle correspond à 200-300 µm dans le tissu cutané et 400-500 µm dans la tablette unguéale.

>>> Ainsi, la MCR dans la peau permet de distinguer les différentes couches de l'épiderme (couche cornée, granuleuse et épineuse), la jonction dermo-épidermique et le derme papillaire.

Corcuff [3], Lévêque [4] et Piérard [5] furent les premiers à utiliser la MCR pour une étude ultrastructurale de la peau, alors que Kaufman *et al.* [2] montre l'intérêt de la MCR dans l'exploration des capillaires du repli sus-unguéal et des ongles jusqu'aux couches les plus profondes de la tablette et au lit unguéal.

Sattler *et al.* [6] ont récemment exploré des tablettes unguéales saines par MCR. Ils montrent qu'elle permet d'apprécier l'épaisseur des différentes couches et de visualiser les détails de structure. La MCR est capable de distinguer les différents cornéocytes et l'intégrité de leurs limites. La tablette unguéale peut être observée depuis sa surface jusqu'à la couche la plus profonde, juste au-dessus du lit unguéal. Trois différents niveaux peuvent être distingués par la MCR en fonction de l'intensité de la réflexion. La couche superficielle apparaît la plus brillante (fig. 1), suivie par une zone avec un signal un peu plus pauvre (fig. 2), sui-

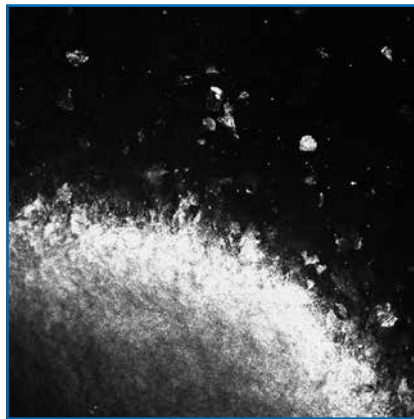


FIG. 1: Examen en microscopie confocale *in vivo* d'une tablette unguéale normale: couche superficielle brillante.

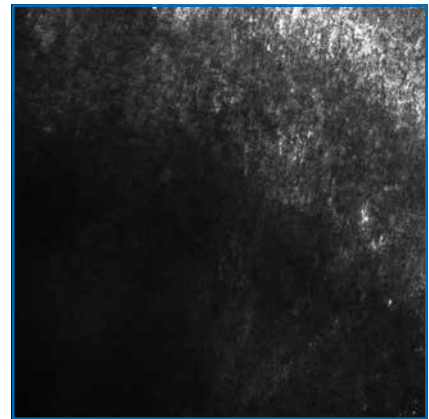


FIG. 2: Examen en microscopie confocale *in vivo* d'une tablette unguéale normale: couche intermédiaire peu réfléchissante.

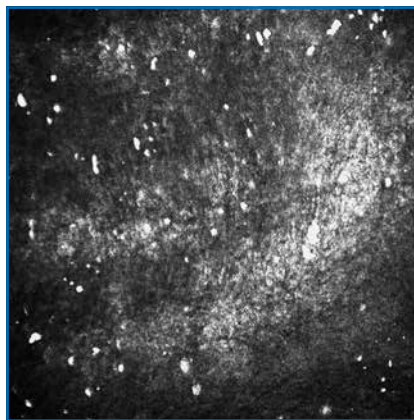


FIG. 3: Examen en microscopie confocale *in vivo* d'une tablette unguéale normale: couche profonde brillante.

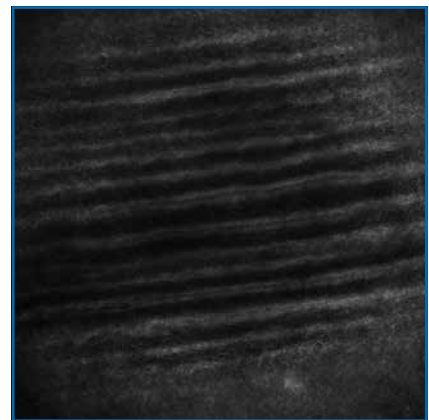


FIG. 4: Examen en microscopie confocale *in vivo* du lit de l'ongle normale: structures en ondes parallèles suivant l'axe principal du doigt.

vie encore par une zone plus brillante pour le niveau le plus profond (fig. 3). Le lit de l'ongle sous-jacent est visible seulement en cas de tablettes unguéales fines (< 500 µm) et se présente sous forme de structures en ondes parallèles suivant l'axe principal du doigt (fig. 4).

Microscopie confocale et mélanonychies

C'est dans l'exploration des pigmentations mélaniques unguéales et dans son utilité pour la décision chirurgicale et donc la prise en charge thérapeutique que la MCR est en train d'acquiescer

une place incontournable. Devant une mélanonychie longitudinale, trouver des arguments permettant de trancher entre nævus et mélanome sous-unguéal constitue un challenge pour le clinicien.

>>> Ronger *et al.* [7] publièrent en 2002 la plus large série de mélanonychies longitudinales examinées en dermatoscopie. Elle montre que celle-ci pouvait aider à établir le diagnostic différentiel entre les causes malignes et bénignes de pigmentation unguéale.

On savait que la MCR était utile pour distinguer les lésions mélanocytaires bénignes et malignes dans la peau.

LE DOSSIER

Pathologies unguéales

Toutefois, il ne s'agit pas d'une technique appropriée pour l'exploration *in vivo* de la matrice unguéale en raison de ses limites en termes de pénétration à 200-300 µm. Dans les cas douteux de mélanonychie, la conduite à tenir préconise une biopsie matricielle. Si l'examen histopathologique confirme la nature maligne de la pigmentation (mélanome sous-unguéal), une exérèse chirurgicale doit être ensuite effectuée. L'amputation de la phalange distale constitue le traitement classique du mélanome sous-unguéal. Néanmoins, de nombreuses études confirment l'intérêt d'un traitement conservateur se limitant à l'exérèse de la matrice et de l'appareil unguéal dans les cas de mélanome *in situ*.

>>> Sureda *et al.* [8] confirment que le traitement conservateur procure un meilleur résultat fonctionnel sans augmenter le taux des récurrences. Cependant, même le traitement conservateur est agressif et douloureux. Une technique permettant de confirmer le diagnostic de mélanome sous-unguéal en peropératoire pourrait donc être très utile.

Actuellement, on ne dispose pas de méthode précise pour confirmer le diagnostic de mélanome sous-unguéal en peropératoire. L'examen histopathologique de la matrice unguéale n'est pas possible en extemporané en raison de la petite taille du spécimen et de la nécessité de pratiquer des immunomarquages pour confirmer le diagnostic. Des études récentes [9, 10] montrent que l'éponychium peut être récliné avant la biopsie unguéale de façon à mieux visualiser la source pigmentaire matricielle et d'effectuer en peropératoire des examens en dermoscopie et MCR.

>>> Hirata *et al.* [10] ont publié une étude au sujet de la dermoscopie peropératoire de la matrice et du lit unguéal dans des cas de mélanonychies longitudinales. Les auteurs décrivent quatre patrons dermoscopiques peropératoires qui disposent d'une meilleure sensibilité et d'une meilleure spécificité que les patrons

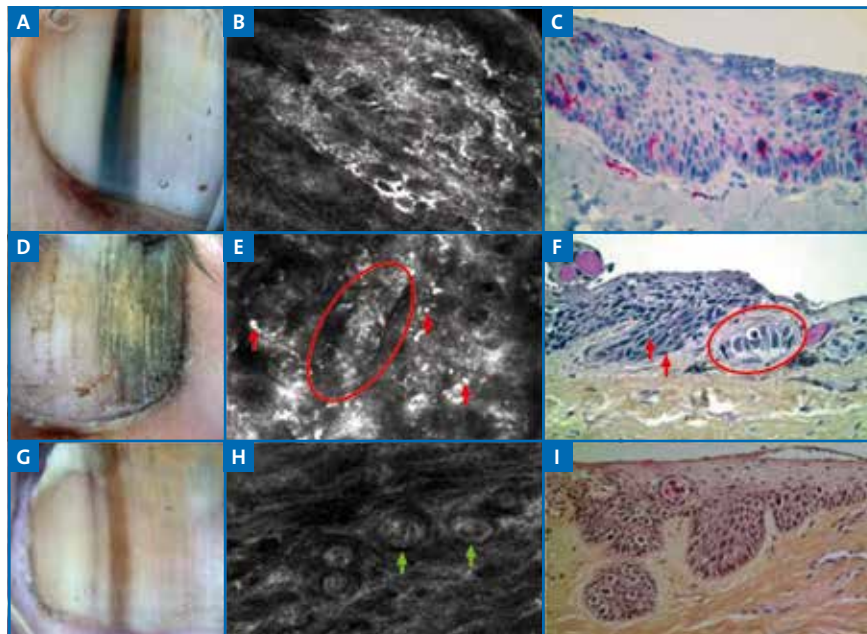


FIG. 5 : Patient 1. **A :** Dermatoscopie de la tablette unguéale montrant un signe de Hutchinson, un aspect irrégulier et triangulaire de la pigmentation; **B :** Examen par microscopie confocale par réflectance (MCR) *in vivo* montrant une prolifération mélanocytaire de jonction dermo-épithéliale; **C :** Marquage de coupes histologiques par Melan-A confirmant un mélanome débutant. Patient 2. **D :** Dermatoscopie de la tablette unguéale montrant un patron non spécifique mais la présence d'un signe de Hutchinson (légère pigmentation de l'hyponychium non vu sur la photographie); **E :** MRC *in vivo* montrant des cellules brillantes rondes à larges noyaux atypiques isolées (flèches rouges) ou groupées en thèques (cercles rouges); **F :** Coupes histopathologiques colorées par hématoxyline et éosine montrant une prolifération de mélanocytes atypiques isolés (flèches rouges) ou groupés en thèques (cercles rouges). Patient 3. **G :** Dermatoscopie de la tablette unguéale montrant l'irrégularité des épaisseurs et de la pigmentation des bandes, un signe de Hutchinson et une légère pigmentation de l'hyponychium; **H :** Examen par MCR *ex vivo* montrant des thèques de cellules à larges noyaux atypiques modérément rétractiles dans le derme papillaire (flèches vertes); **I :** Corrélations histopathologiques : projections épithéliales interpapillaires colonisées par des mélanocytes atypiques.

observés en dermoscopie conventionnelle préopératoire (à travers la tablette unguéale). Toutefois, quelques difficultés demeurent. Par exemple, le patron dit "en lignes brunes régulières" – classiquement associé à un nævus dans la série de Hirata – est aussi observé dans 2 cas de mélanomes débutants. Cela illustre les difficultés diagnostiques entre hyperplasie mélanocytaire bénigne et mélanome débutant. Ces difficultés diagnostiques sont bien connues en histopathologie, et on ne peut pas espérer que la dermoscopie, même effectuée en peropératoire, fasse preuve d'une meilleure spécificité que l'histopathologie.

>>> Debarbieux *et al.* [9] ont évalué la faisabilité de l'exploration peropératoire

de la matrice unguéale par MCR *in vivo* et *ex vivo*, et ont comparé les images obtenues à celles recueillies en histopathologie conventionnelle. Sur 9 patients examinés, porteurs de mélanonychies longitudinales suspectes, une biopsie fut effectuée au niveau de l'aire pigmentée de la matrice après l'avoir exposée par retrait de la tablette unguéale. La MCR est alors pratiquée *in vivo* sur l'aire pigmentée de la matrice, avant que ne soit pratiquée la biopsie, et suivie d'un examen par MCR *ex vivo* sur le prélèvement biopsique.

Dans la plupart des cas, les images obtenues tout à la fois en MCR *in vivo* et *ex vivo* sont assez fiables pour faire le diagnostic, et la légère perte de qualité parfois constatée *in vivo* n'a pas d'impact signi-

ficatif sur la valeur des caractéristiques observées. Les caractères architecturaux et les atypies cytologiques constatés en MCR postopératoire permettent d'aboutir avec précision au diagnostic final correct de mélanome. Une bonne corrélation entre la MCR et l'histopathologie a été démontrée : le mélanome sous-unguéal a été diagnostiqué en peropératoire dans 7 des 8 cas confirmés ultérieurement en histopathologie (fig. 5).

La MCR s'affirme ainsi comme un outil prometteur pour le diagnostic peropératoire des mélanonychies car elle combine les avantages de la dermoscopie (examen non invasif de la totalité de l'aire intéressée sans altération de la surface épithéliale) et de l'histopathologie (résolution à l'échelle cellulaire).

Au total, la MCR permet d'obtenir de bons contrastes entre les mélanocytes et les structures voisines, et contribue à la visualisation des caractéristiques architecturales et cytologiques de la prolifération mélanocytaire. L'examen *ex vivo* peut être utilisé soit seul, soit en complément de l'examen *in vivo*.

Microscopie confocale et onychomycoses

Les méthodes les plus largement utilisées pour confirmer le diagnostic clinique d'onychomycose ont soit un rendement médiocre (comme par exemple l'examen microscopique direct), soit un délai d'obtention des résultats trop long (comme par exemple les cultures mycologiques).

>>> Les premiers, Hongcharu *et al.* [11], ont rapporté l'utilisation possible de la MCR au diagnostic des onychomycoses. La MCR donne des images de haute résolution et reste une méthode non invasive. Les ongles peuvent être observés dans leur état naturel à un haut niveau de résolution et de contraste sans fixation, ni coupe ni coloration.

>>> Hongcharu *et al.* ont comparé les observations collectées en MCR et les résultats obtenus avec des examens microscopiques directs. Au terme de cette étude, ils estiment que la MCR est plus rapide et plus précise que l'examen microscopique direct, classiquement utilisé pour le diagnostic des onychomycoses.

Devant un aspect clinique évocateur d'onychomycose, on procède à la fois à un examen microscopique confocal *in vivo* et *ex vivo* sur l'ongle atteint. La mise au point du microscope confocal dans la tablette unguéale permet d'obtenir des coupes virtuelles *in vivo*. Pour l'examen *ex vivo*, des fragments des ongles atteints sont prélevés et observés sans aucune préparation. On observe des réseaux de filaments ramifiés tout à la fois avec les images confocales *in vivo* juste en dessous de la surface de l'ongle (fig. 6) et avec les images confocales *ex vivo* jusqu'à la base de l'ongle. L'examen microscopique direct des prélèvements similaires à ceux observés en microscopie confocale est aussi effectué et confirme la présence de filaments.

Le traitement des onychomycoses fait habituellement appel à des traitements antifongiques par voie orale. Ces traite-

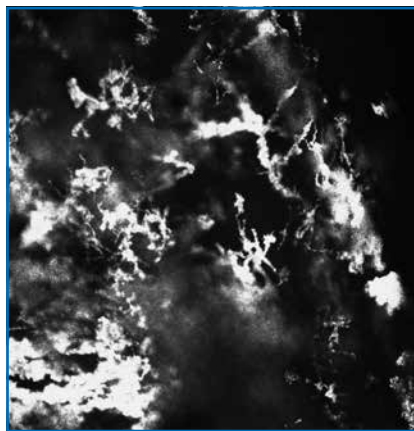


Fig. 6 : Examen en microscopie confocale *in vivo* d'une onychomycose : des structures linéaires en serpentins sont visibles à l'intérieur de la tablette unguéale, correspondant à des filaments fongiques.

ments antifongiques durent plusieurs mois et peuvent entraîner des effets secondaires graves. Cela justifie l'isolement et l'identification du champignon responsable avant de débiter le traitement. L'examen microscopique direct donne souvent des faux négatifs, et la culture fongique nécessite plusieurs semaines. La MCR constitue un outil supplémentaire qui peut être utilisée dans ces cas.

Dans un essai prospectif portant sur 50 patients [12], la MCR est comparée aux techniques de référence (culture, coloration au PAS et PCR) comme outil diagnostique dans les onychomycoses. Elle fait la preuve d'une meilleure sensibilité (79 % *versus* 74 %) et d'une meilleure spécificité (81 % *versus* 76 %) que l'examen microscopique direct.

La MCR peut aussi évaluer la localisation et la densité du champignon, permettant ainsi de quantifier la "charge fongique" [13].

Microscopie confocale et pathologies inflammatoires

Il n'y a pas d'études sur le diagnostic par MCR des pathologies inflammatoires de l'appareil unguéal. L'examen de quelques cas personnels de psoriasis unguéal nous a permis d'observer une fragmentation de la tablette unguéale sur les berges et sur la surface avec des zones d'hyperkératose (fig. 7). Dans les cas de psoriasis unguéal ou de lichen unguéal, on peut s'attendre à trouver en MCR les mêmes changements au sein de la tablette unguéale que ceux précédemment décrits lors des examens histopathologiques comme l'infiltration neutrophilique, les croûtes et la parakératose dans le psoriasis et l'orthokératose avec des foyers de parakératose et des croûtes pour le lichen plan. Nous pouvons donc espérer que ces aspects soient aussi reconnaissables dans l'ongle. De plus, en présence d'une tablette unguéale fine avec un lit unguéal sous-jacent bien

LE DOSSIER

Pathologies unguéales

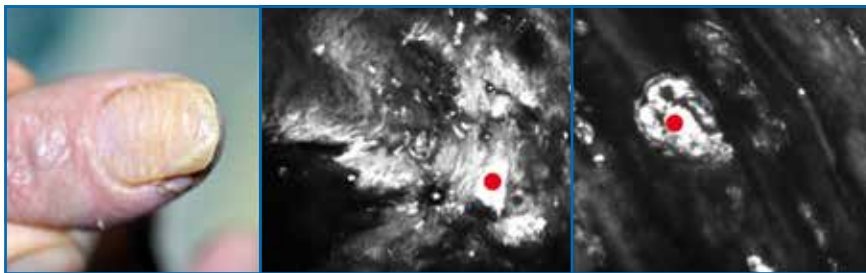


FIG. 7 : Ongle psoriasique (*gauche*) et examen en microscopie confocale *in vivo* de la partie superficielle (*centre*) et intermédiaire (*droite*) de la tablette unguéale psoriasique. Des structures irrégulières hyper-réflétantes correspondant à des zones d'hyperkératose et de densification de la kératine (*puce rouge*) sont présentes.

visible en MCR, nous pouvons espérer voir un infiltrat inflammatoire à la jonction dermo-épidermique dans les cas de lichen plan unguéal similaire à ce que l'on peut constater dans la peau.

Microscopie confocale *ex vivo*

La MCR *in vivo* est particulièrement intéressante pour le diagnostic des onychomycoses parce qu'elle permet un examen rapide et non invasif. Quand l'examen par MCR *in vivo* n'est pas suffisant et qu'une biopsie est nécessaire, la MCR *ex vivo* peut assister la chirurgie en peropératoire. La MCR *ex vivo* permet l'observation directe des caractères architecturaux et cytologiques des tissus à une résolution similaire à celle de l'histologie classique, sans la nécessité de fixer, congeler ou couper. Elle constitue un bon outil pour un diagnostic rapide en pathologie unguéale.

Notre expérience nous a convaincu que l'examen par MCR *ex vivo* des biopsies unguéales et des échantillons constitue une technique appropriée pour l'appareil unguéal et pourrait être potentiellement utile pour s'assurer que les berges étaient saines au cours de l'examen extemporané des prélèvements chirurgicaux (chirurgie micrographique). Dans notre expérience, les images obtenues par MCR *ex vivo* sont de très bonne qualité et bien corrélées avec les caractéristiques histologiques. En outre, l'examen peut être effectué à la fois sur les deux faces de la tablette unguéale, permettant

d'examiner les structures les plus profondes avec une résolution plus élevée que celle de la MCR *in vivo*.

Conclusion

Comme on l'a vu, la MCR *in vivo* et *ex vivo* constitue d'ores et déjà une méthode diagnostique de choix pour les mélanoonychies longitudinales et les onychomycoses. Elle devrait pouvoir être d'une même utilité pour les carcinomes du lit unguéal et face à toutes les lésions dyskératosiques (onychopapillome, kératome sous-unguéal) pouvant entretenir une ambiguïté diagnostique avec un carcinome débutant. Une fois le diagnostic posé, elle contribue en repérant les limites de l'exérèse au caractère complet de celle-ci. La MCR pourrait avoir une utilité dans le diagnostic des tumeurs glomiques, peut-être même dans le dépistage de tumeur glomique superficielle de petite taille.

Nous avons vu que l'on commence à s'intéresser aux pathologies inflammatoires de la tablette comme le psoriasis et du paronychium, et l'intérêt de cette technique pourrait s'étendre à la pathologie vasculaire (acrosyndrome, sclérodémie systémique).

À ce jour toutefois, seuls quelques aspects de la pathologie unguéale ont été étudiés par MCR, et d'autres études sont nécessaires pour décrire les caractéristiques des affections unguéales en MCR.

Bibliographie

1. NWANESHIUDU A, KUSCHAL C, SAKAMOTO FH *et al*. Introduction to confocal microscopy. *J Invest Dermatol*, 2012;132:e3. doi: 10.1038/jid.2012.429.
2. KAUFMAN SC, BEURMAN RW, GREER DL. Confocal microscopy: a new tool for the study of the nail unit. *J Am Acad Dermatol*, 1995;32:668-670.
3. CORCUFF P, BERTRAND C, LÉVÊQUE JL. Morphometry of human epidermis *in vivo* by real-time confocal microscopy. *Arch Dermatol Res*, 1993;285:475-481.
4. CORCUFF P, GONNORD G, PIÉARD GE *et al*. *In vivo* confocal microscopy of human skin: a new design for cosmetology and dermatology. *Scanning*, 1996;18:351-355.
5. PIÉARD GE. *In vivo* confocal microscopy: a new paradigm in dermatology. *Dermatology*, 1993;186:4-5. No abstract available.
6. SATTLER E, KAESTLE R, ROTHMUND G *et al*. Confocal laser scanning microscopy, optical coherence tomography and transonychia water loss for *in vivo* investigation of nails. *Br J Dermatol*, 2012;166:740-746.
7. RONGER S, TOUZET S, LIGERON C *et al*. Dermoscopic examination of nail pigmentation. *Arch Dermatol*, 2002;138:1327-1333.
8. SUREDA N, PHAN A, POULALHON N *et al*. Conservative surgical management of subungual (matrix derived) melanoma: report of seven cases and literature review. *Br J Dermatol*, 2011;165:852-858.
9. DEBARBIEUX S, HOSPOD V, DEPAEPE L *et al*. Perioperative confocal microscopy of the nail matrix in the management of *in situ* or minimally invasive subungual. *Br J Dermatol*, 2012;167:828-836.
10. HIRATA SH, YAMADA S, ENOKIHARA MY *et al*. Patterns of nail matrix and bed of longitudinal melanonychia by intraoperative dermatoscopy. *J Am Acad Dermatol*, 2011;65:297-303.
11. HONGCHARU W, DWYER P, ANDERSON RR. Confirmation of onychomycosis by *in vivo* confocal microscopy. *J Am Acad Dermatol*, 2000;42:214-216.
12. ROTHMUND G, SATTLER EC, KAESTLE R *et al*. Confocal laser scanning microscopy as a new valuable tool in the diagnosis of onychomycosis - comparison of six diagnostic methods. *Mycoses*, 2013;56:47-55.
13. ARRESE JE, QUATRESOOZ P, PIÉARD-FRANCHIMONT C *et al*. Nail histomycology Protean aspects of a human fungal bed. *Ann Dermatol Venerol*, 2003;130:1254-1259.

Les auteurs ont déclaré ne pas avoir de conflits d'intérêts concernant les données publiées dans cet article.

Avec tous nos remerciements aux Drs Bruno Labeille et Jean-Luc Perrot.