

**UNIVERSITE DE NANTES**

---

**FACULTE DE MEDECINE**

---

Année 2011

N° 127

**THESE**

pour le

**DIPLOME D'ETAT DE DOCTEUR EN MEDECINE**

(DES de Gastro-entérologie et Hépatologie)

par

**Nicolas Musquer**

né le 14 décembre 1982 à Nantes

---

Présentée et soutenue publiquement le 28 octobre 2011

---

**L'Endomicroscopie Confocale : Une nouvelle méthode  
d'analyse quantitative des cryptes coliques de patients sains  
ou atteints de maladie de Crohn**

---

Président : Monsieur le Professeur Stanislas Bruley Des Varannes

Directeur de thèse : Monsieur le Docteur Emmanuel Coron

# SOMMAIRE

<b>Lexique</b> .....	<b>4</b>
<b>1. Introduction</b> .....	<b>5</b>
1.1. La Maladie de Crohn.....	5
1.1.1. Définitions.....	5
1.1.2. Epidémiologie.....	5
1.1.3. Aspects cliniques.....	5
1.1.4. Explorations endoscopiques.....	6
1.1.5. Aspects histologiques.....	6
1.1.6. Maladie de Crohn et perméabilité.....	7
1.2. L'endomicroscopie.....	7
1.2.1. Définition et bref historique.....	7
1.2.2. Applications.....	9
1.2.3. Endomicroscopie et étude fonctionnelle.....	9
<b>2. Position de la problématique</b> .....	<b>10</b>
<b>3. Etude personnelle</b> .....	<b>11</b>
3.1. Patients & Méthodes.....	11
3.1.1. Patients.....	11
3.1.2. Procédure endoscopique.....	11
3.2. Analyse quantitative des images d'ECM.....	12
3.3. Analyse <i>ex vivo</i> de la structure cryptique.....	14
3.4. Analyse statistique.....	15
<b>4. Résultats</b> .....	<b>17</b>
4.1. Caractéristiques des échantillons.....	17
4.2. Analyse quantitative architecturale.....	18
4.2.1. Validation des mesures ECM.....	18
4.2.1.1. Taille des cryptes.....	19
4.2.1.2. Taille des lumières des cryptes.....	19
4.2.1.3. Distance intercrypte.....	20
4.2.2. Comparaisons intergroupes.....	21
4.2.2.1. Diamètre vasculaire.....	21
4.2.2.2. Taille des cryptes.....	22
4.2.2.3. Distance intercrypte.....	23
4.2.2.4. Taille des lumières des cryptes.....	23
4.3. Analyse quantitative fonctionnelle.....	24
4.4. Analyses complémentaires du critère DMI/dml.....	25
4.4.1. Analyse individuelle du rapport DMI/dml.....	25
4.4.2. Définition d'une valeur « cut-off ».....	27
4.5. Etude de sécurité de la procédure.....	28
<b>5. Discussion</b> .....	<b>29</b>
<b>6. Conclusion</b> .....	<b>33</b>
<b>Références</b> .....	<b>34</b>
<b>Annexes</b> .....	<b>41</b>

## Lexique

**BMBM:** Biopsies marquées au Bleu de Méthylène

**CDAI:** Crohn's Disease Activity Index

**CDEIS :** Crohn's Disease Endoscopic Index of Severity

**DMc/dmc:** rapport du diamètre maximum sur le diamètre minimum des cryptes

**DMI/dml:** rapport du diamètre maximum sur le diamètre minimum de la lumière des cryptes

**ECM :** Endomicroscopie Confocale par Minisonde

**MC :** Maladie de Crohn

**MC-IE :** Maladie de Crohn avec Inflammation Endoscopique

**MC-RE :** Maladie de Crohn en Rémission Endoscopique

**MICI :** Maladie Inflammatoire Chronique de l'Intestin

**PEG :** Polyéthylène Glycol

**RCH :** Rectocolite Hémorragique

**RIF :** Rapport d'Intensité de Fluorescence

**SES-CD :** Simple Endoscopic Score for Crohn's Disease

## **1. Introduction**

### 1.1. La Maladie de Crohn

#### *1.1.1. Définitions*

Observée depuis de plusieurs siècles mais décrite et définie seulement en 1932<sup>1</sup>, la maladie de Crohn (MC) est une maladie inflammatoire chronique de l'intestin (MICI) dont l'origine n'est pas encore tout à fait identifiée. Il est établi qu'elle résulte de la rencontre de susceptibilités génétiques, de modifications phénotypiques secondaires aux variations d'expression génique, et de nombreux facteurs environnementaux<sup>2,3</sup>. On retrouve parmi ceux-ci la situation géographique et le degré de développement du pays de résidence, le mode de vie, ainsi que l'ensemble des interactions entre le microbiote intestinal et la barrière épithéliale intestinale, en particulier les interconnexions avec le système immunitaire inné et acquis<sup>4</sup>. Ces facteurs sont responsables d'une réaction inflammatoire inappropriée de la paroi digestive, elle-même en cause dans les symptômes caractéristiques de la maladie.

#### *1.1.2. Epidémiologie*

L'incidence de la MC varie selon la région du globe considérée. En effet, il existe un gradient Nord-Sud mettant en lumière l'implication de facteurs environnementaux et génétiques dans la genèse de la MC. En Europe, l'incidence varie selon les études de 0,7 à 9,8/100000 par an avec une prévalence allant de 8,3 à 214/100000, ces chiffres étant comparables aux données statistiques américaines<sup>5</sup>.

Dans les pays de l'hémisphère Sud, l'incidence est nettement plus faible avec des taux maximum de 2,6/100000 par an pour la population blanche d'Afrique du Sud<sup>5</sup>. Un gradient Nord-Sud est également présent au sein même de l'Europe avec 80% de cas en plus au Nord d'une ligne passant par les Alpes<sup>6</sup>. L'incidence globale des pays à forte incidence a tendance à se stabiliser tandis que celle des pays à faible incidence continue d'augmenter. A contrario, la prévalence de la MC continue d'augmenter dans tous les pays même ceux de l'hémisphère Nord probablement du fait d'une meilleure prise en charge des malades et donc d'un allongement de leur espérance de vie<sup>5</sup>.

#### *1.1.3. Aspects cliniques*

La MC est responsable d'une atteinte inflammatoire transfixiante discontinue pouvant s'étendre sur l'ensemble du tube digestif, de la bouche jusqu'à l'anus.

Ses manifestations cliniques sont en premier lieu les diarrhées glairo-sanglantes, les douleurs abdominales, le syndrome de Koenig et la perte de poids. La MC peut s'accompagner d'atteintes extra-digestives (uvéite et iritis, cholangite sclérosante, spondylarthrite ankylosante,

pyoderma gangrenosum et érythème nodulaire) dont la prévalence est de l'ordre de 5,5%<sup>7</sup>.

Le *Crohn's Disease Activity Index* (CDAI) est un score essentiellement clinique établi à partir du recueil de symptômes (nombre de selles quotidiennes, douleur, bien être général, signes extra-digestifs, poids, ...). Une version abrégée de ce score a été récemment validée<sup>8</sup>. Lorsque sa valeur dépasse 150, il est, à ce jour, le seul marqueur clinique validé pour définir une maladie active en poussée ou en rechute selon les dernières recommandations européennes<sup>9</sup>.

#### 1.1.4. Explorations endoscopiques

L'exploration endoscopique d'un malade atteint de MC implique l'endoscopie traditionnelle, fibroscopie oeso-gastro-duodénale et coloscopie, mais aussi les nouvelles techniques endoscopiques telles que l'entéroscopie, la vidéocapsule<sup>10</sup> et probablement bientôt l'endomicroscopie confocale.

Les constatations habituelles varient d'une muqueuse d'aspect strictement normal à de larges ulcérations creusantes non confluentes compliquée de fistules ou sténoses plus ou moins inflammatoires ou cicatricielles<sup>9</sup>. Deux scores endoscopiques ont été établis et validés : le *Crohn's Disease Endoscopic Index of Severity* (CDEIS)<sup>11</sup> et son homologue le *Simple Endoscopic Score for Crohn's Disease* (SES-CD)<sup>12</sup>(Annexe 1). Ces scores, comparables<sup>13</sup>, restent peu utilisés en pratique courante du fait de leur complexité mais permettent d'harmoniser les résultats pour la recherche clinique.

#### 1.1.5. Aspects histologiques

L'intérêt de l'étude anatomopathologique dans la MC est multiple. D'une part, elle permet de contribuer fortement au diagnostic lorsqu'elle identifie la présence de granulomes dans la paroi digestive associés à des modifications architecturales<sup>14</sup> et d'autre part elle est primordiale pour le diagnostic des lésions dysplasiques ou néoplasiques développées chez des patients atteints de MC<sup>9</sup>.

L'appréciation du degré d'inflammation est réalisable. En effet, plusieurs scores de sévérité histologique ont été proposés<sup>15</sup> mais aucun n'a pour le moment été validé compte tenu de la difficulté à apprécier un degré d'inflammation globale à l'aide de quelques biopsies éparses dans le cadre d'une maladie elle-même segmentaire par définition.

Enfin, l'intérêt pronostic de l'examen anatomopathologique n'a été étudié que par de rares travaux qui ont mis en évidence quelques facteurs prédictifs histologiques d'évolution non péjorative de la MC comme l'infiltration lymphocytaire de la lamina propria, l'atrophie cryptique et l'absence d'infiltration lymphocytaire épithéliale. Ces 3 facteurs combinés ayant une sensibilité de 67% et une spécificité de 83% pour prédire l'absence d'évolution sténosante ou fistulisante<sup>16</sup>.

Les principales lésions élémentaires histologiques regroupent granulomes épithélioïdes,

distorsion cryptiques et infiltrats inflammatoires focaux<sup>9,17</sup>.

L'explication physiopathologique responsable des constatations anatomopathologiques pourrait être la suivante : l'attraction des polynucléaires neutrophiles au sein de la lamina propria leur permet de se mêler à la population habituelle immunitaire (éosinophiles, lymphocytes, histiocytes...) située dans sa portion la plus haute. Cet infiltrat inflammatoire se majore pour gagner l'ensemble de la lamina propria. Tandis que certaines cryptes sont détruites par le processus inflammatoire, l'épithélium cryptique réagit sous forme d'une prolifération épithéliale, garantissant une régénération épithéliale et responsable d'une distorsion des cryptes. La destruction cryptique s'accompagne d'une destruction de la muscularis mucosae qui serait responsable de la perte des villosités, et d'une fibrose<sup>18</sup>.

#### *1.1.6. Maladie de Crohn et perméabilité*

Il est maintenant clairement établi que les patients présentant une MC ont une perméabilité intestinale augmentée<sup>19</sup> ou au moins plus sensible à l'environnement digestif<sup>20</sup>. Plusieurs travaux ont démontré que cette hyperperméabilité tendait à précéder la réaction inflammatoire secondairement responsable des signes cliniques, histologiques et endoscopiques de la MC<sup>21</sup>. Ces troubles de perméabilité para- et transcellulaires sont induits au moins en partie par un contexte génétique favorisant (mutation NOD2, Altération expression des protéines des jonctions serrées), par des agents endoluminaux comme la flore intestinale, et par l'environnement immunologique digestif<sup>21,22</sup>.

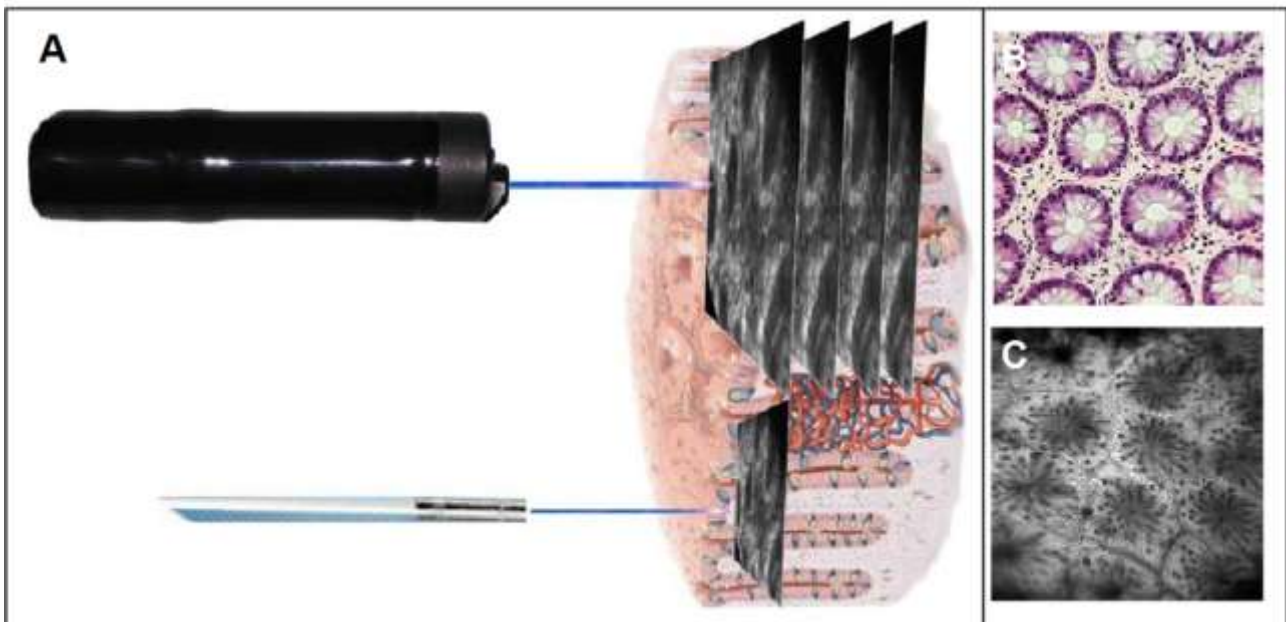
L'intérêt de la mesure de la perméabilité intestinale chez des patients atteints de MC (calcul d'excrétion urinaire du rapport lactulose/mannitol ou lactulose/rhamnose, ou excrétion du Cr-51 EDTA) a fait l'objet de quelques études. Parmi elles, 6 ont montré un risque relatif de 3 à 18 de récurrence de la maladie dans l'année suivante lorsqu'il existait une perméabilité augmentée par rapport au seuil défini à l'aide d'une population témoin<sup>23</sup>. D'où l'intérêt suscité par l'étude de la perméabilité chez des patients atteints de MC, potentiel facteur prédictif de l'évolution de la maladie et du risque de rechute. Reste que ces techniques de mesures, bien qu'intéressantes, ne sont pas validées en pratique courante.

## 1.2. L'endomicroscopie

### *1.2.1. Définition et bref historique*

L'endomicroscopie confocale résulte de la rencontre entre la microscopie confocale, utilisée depuis plusieurs années au sein des laboratoires scientifiques, et l'endoscopie, en somme un exemple de technologie que l'on pourrait qualifier de « bench to bedside ». Elle correspond au

couplage d'un endoscope avec une sonde de microscopie confocale soit de façon indépendante, l'Endomicroscopie Confocale par Minisonde (ECM) (Cellvizio<sup>®</sup>, Mauna Kea Technologies), soit de manière solidaire (Endomicroscope Pentax) (Figure 1). L'ensemble est relié à un générateur permettant l'acquisition en temps réel, *in vivo*, après perfusion intraveineuse de fluorescéine ou administration topique d'un agent de contraste, d'images quasi-histologiques de muqueuse digestive, ORL ou encore urothéliale.



**Figure 1:** (A) Comparaison des différentes techniques disponibles : En haut, endomicroscope Pentax (résolution latérale 0,7  $\mu\text{m}$ , épaisseur de coupe 7  $\mu\text{m}$ , Profondeur de coupe ajustable de 0 à 250  $\mu\text{m}$ , 0,8 à 1,6  $\mu\text{m}$  images/seconde) ; et en bas, Cellvizio<sup>®</sup>, Mauna Kea Technologies (résolution latérale 1 à 3,5 $\mu\text{m}$ , profondeur de coupe fixe à 60  $\mu\text{m}$  pour la sonde colique, 12 images/s). (B et C) Comparaison des images de cryptes obtenues par coupe histologique transversale(B) et par endomicroscopie(C).

L'endomicroscopie confocale est une technique d'imagerie relativement nouvelle. Les prémices de cette technique endoscopique apparaissent en 2001 en urologie avec une étude sur la détection des carcinomes *in situ* vésicaux<sup>24</sup>. La fluorescence était alors obtenue grâce l'acide 5-aminolevulinique administré sous forme d'un topique local. On différenciait les cellules tumorales des cellules vésicales normales par le degré de fluorescence, la muqueuse normale consommant moins de topique et donc étant moins fluorescente. Malheureusement la résolution des sondes était à l'époque un facteur limitant de la technique.

En 2003, un nouveau prototype de sonde de microscopie confocale permettait d'obtenir des images comparables à l'histologie traditionnelle pour l'étude de polypes coliques hyperplasiques, dysplasiques et d'adénocarcinome colique sur pièce de résection<sup>25</sup>. Ce sont les études endoscopiques

menées en particulier par l'équipe de Kiesslich<sup>26</sup> qui ont posé les bases de l'endomicroscopie et de son implication en gastro-entérologie.

### 1.2.2. Applications

Hormis les nombreuses publications dans le domaine de la cancérologie digestive<sup>27</sup>, d'autres champs d'application en gastro-entérologie sont étudiés: la maladie coeliaque<sup>28</sup>, l'endobrachyoesophage<sup>29,30</sup>, la réaction greffon versus hôte<sup>31</sup>, la colite collagène<sup>32</sup>, la mise en évidence d' *Helicobacter Pylori*<sup>33</sup>.

Concernant les MICI, la quasi-totalité des études traitent de son application dans la rectocolite hémorragique (RCH). Hormis quelques études descriptives princeps, une grande partie concerne, là encore, la détection de dysplasies et néoplasies développées sur MICI<sup>34</sup>. Concernant la MC, moins d'une dizaine d'études lui sont spécifiquement consacrées.

Récemment l'utilisation de traceurs a ouvert une nouvelle voie de recherche et d'applications à l'endomicroscopie. Ces peptides<sup>35</sup> ou anticorps<sup>36</sup> marqués à la fluorescéine, permettent de détecter endomicroscopiquement, de part leur fluorescence, une protéine, un récepteur avec lequel il présente une liaison spécifique. Les 2 études disponibles, toutes deux dans le domaine de la cancérologie, permettent d'envisager le développement d'une imagerie endomicroscopique moléculaire spécifique en recherche fondamentale mais utile aussi en pratique clinique.

### 1.2.3. Endomicroscopie et étude fonctionnelle

Très récemment, nous avons pu constater l'émergence d'une nouvelle modalité d'utilisation de l'endomicroscopie. Sa capacité à enregistrer des phénomènes physiologiques *in vivo* en fait un instrument d'étude dynamique et fonctionnelle unique. Seuls quelques travaux ont déjà exploité cette particularité par exemple pour l'étude de l'apoptose des hépatocytes *in vivo*<sup>37</sup>.

Dans le cadre des MICI, Li *et al.* ont montré que le degré d'activité inflammatoire histologique (Geboes Index) était corrélé à l'intensité de la fuite de fluorescéine mesurée au sein de la lumière des cryptes en cours d'endomicroscopie<sup>38</sup>.

Cette nouvelle voie de développement est prometteuse car elle pourrait permettre à l'endomicroscopie de fournir non seulement des données histologiques standards, mais aussi une information spécifique dynamique complémentaire de l'examen anatomo-pathologique.



## 2. Positionnement de la problématique

Les maladies inflammatoires intestinales au sens large sont caractérisées par des modifications de l'ultrastructure de la muqueuse, d'une simple irrégularité structurale jusqu'à l'ulcération<sup>9</sup>. Certaines de ces modifications, dans le cadre des MICI, sont corrélées au degré de sévérité de la maladie<sup>16</sup>. D'où l'intérêt de développer de nouvelles technologies endoscopiques suffisamment sensibles pour détecter ces modifications. Chez ces patients, pour lesquels l'évaluation endoscopique est régulière, l'endomicroscopie semble réunir les critères nécessaires pour atteindre cet objectif.

Le pit-pattern, outil de caractérisation de l'architecture muqueuse, défini par Kudo<sup>39</sup>, a été utilisé principalement dans le cadre de la détection et la classification des lésions dysplasiques et néoplasiques<sup>40</sup>. Utilisé en cours de chromo-endoscopie<sup>41</sup>, il a été montré que, couplé à une analyse automatisée quantitative, il augmentait la sensibilité de cette classification.

Dans le cas des MICI, les modifications architecturales observées peuvent être le reflet de l'inflammation muqueuse<sup>17</sup>. En effet, la distorsion cryptique observée chez les patients atteints de MICI résulte de l'infiltration de la lamina propria par les cellules inflammatoires (polynucléaires neutrophiles et cellules mononuclées)<sup>18</sup>, et du relargage local de cytokines pro-inflammatoires<sup>42</sup>.

Aucune étude n'a pour le moment cherché à évaluer quantitativement l'inflammation muqueuse par endomicroscopie en particulier chez des patients atteints de MC. Seule une étude a montré une corrélation entre la densité de la lumière cryptique en endomicroscopie et la sévérité de l'atteinte inflammatoire de patients atteints de RCH<sup>38</sup>.

Par ailleurs, les propriétés dynamiques de l'endomicroscopie peuvent en faire un outil intéressant pour l'étude fonctionnelle de la perméabilité des malades atteints de MC.

C'est pourquoi, les objectifs de notre étude étaient de valider la faisabilité de la mesure de critères endomicroscopiques architecturaux et fonctionnels caractérisant l'inflammation muqueuse parmi des témoins sains et des patients atteints de MC, puis secondairement de comparer les mesures obtenues chez nos 2 groupes de patients.

### 3. Etude personnelle

#### 3.1. Patients et méthodes

##### *3.1.1. Patients*

Dix patients atteints de MC et 6 patients témoins ont été inclus de façon prospective dans notre étude entre décembre 2009 et avril 2010 au sein du service d'hépatogastroentérologie du CHU de Nantes. Chaque patient recevait une information claire et loyale sur la procédure endomicroscopique (Annexe 2) et coloscopique. Les patients atteints de MC étaient tous en rémission clinique, soit un CDAI <150, au moment de l'inclusion. Les patients témoins n'avaient aucun antécédent personnel ou familial de MICI et étaient tous adressés pour une coloscopie de dépistage ou de surveillance du fait d'antécédents personnels ou familiaux de polypes ou de cancers coliques selon les recommandations actuelles<sup>43</sup>.

Les critères de non-inclusion étaient les suivants : refus ou incapacité de consentir à l'examen, patients mineurs au moment de l'inclusion, antécédent d'allergie à la fluorescéine, insuffisance rénale, grossesse ou allaitement. Les patients présentant une préparation colique insuffisante et risquant de gêner l'évaluation endoscopique de l'inflammation muqueuse étaient aussi exclus.

Un questionnaire dépistant la présence d'un syndrome de l'intestin irritable (Annexe 3) était réalisé avant inclusion. Les patients présentant un syndrome de l'intestin irritable étaient exclus du fait du risque de modification de la perméabilité membranaire<sup>44</sup>.

##### *3.1.2. Procédure endoscopique (Figure 2)*

La veille de la coloscopie, chaque patient était préparé par 4 litres de polyéthylène glycol (PEG). L'ensemble des procédures endoscopiques, conduites sous anesthésie générale au bloc opératoire, ont été réalisées par un seul endoscopiste expérimenté (Dr E. Coron, CHU de Nantes)

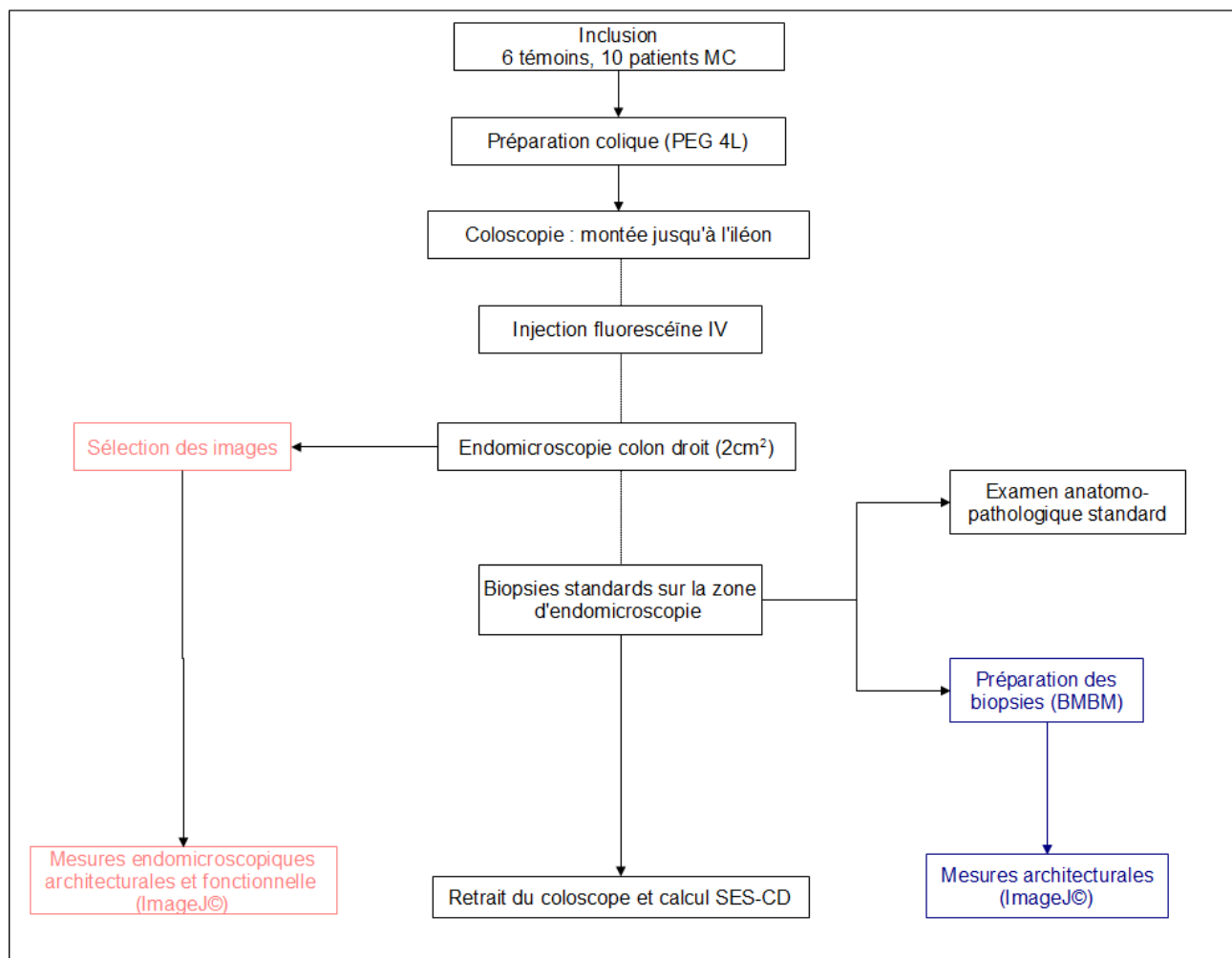
La première étape consistait à atteindre le cæcum et à cathétériser à l'aide de l'endoscope, la valvule de Bauhin afin de réaliser, pour les patients atteints de MC, une première partie de score SES-CD sur l'iléon terminal d'une part et sur le colon droit d'autre part.

Dans un deuxième temps, la mini-sonde de microscopie confocale (Coloflex UHD, Cellvizio<sup>®</sup>, Mauna Kea Technologies, Paris, France) était introduite dans le canal opérateur du coloscope puis approchée au contact de la muqueuse colique en la déprimant le moins possible sous contrôle endoscopique. Cinq millilitres de fluorescéine à 10% (Fluorescéine sodique 10%<sup>®</sup>, Novartis Pharma<sup>®</sup>, France), dose reconnue comme optimale<sup>45</sup>, étaient ensuite injectés par voie intraveineuse. L'enregistrement des séquences vidéos (une séquence par patient) à l'aide du Cellvizio<sup>®</sup> débutait au moment de l'injection et s'étendait sur les 5 minutes suivantes, afin d'obtenir

le meilleur contraste et donc la meilleure qualité d'image, comme en témoignent les études de pharmacocinétique<sup>46</sup>.

La mini-sonde était ensuite retirée pour réaliser plusieurs biopsies sur la zone d'étude d'endomicroscopie confocale, en particulier pour l'étude *ex vivo* et pour l'analyse anatomopathologique standard.

Enfin, le reste de la muqueuse colique était observé au retrait du coloscope selon les recommandations actuelles en n'omettant pas pour les sujets atteints de MC de poursuivre la cotation SES-CD sur les autres segments coliques.



**Figure 2 :** Schématisation de la procédure endoscopique

### 3.2. Analyse quantitative des images d'ECM

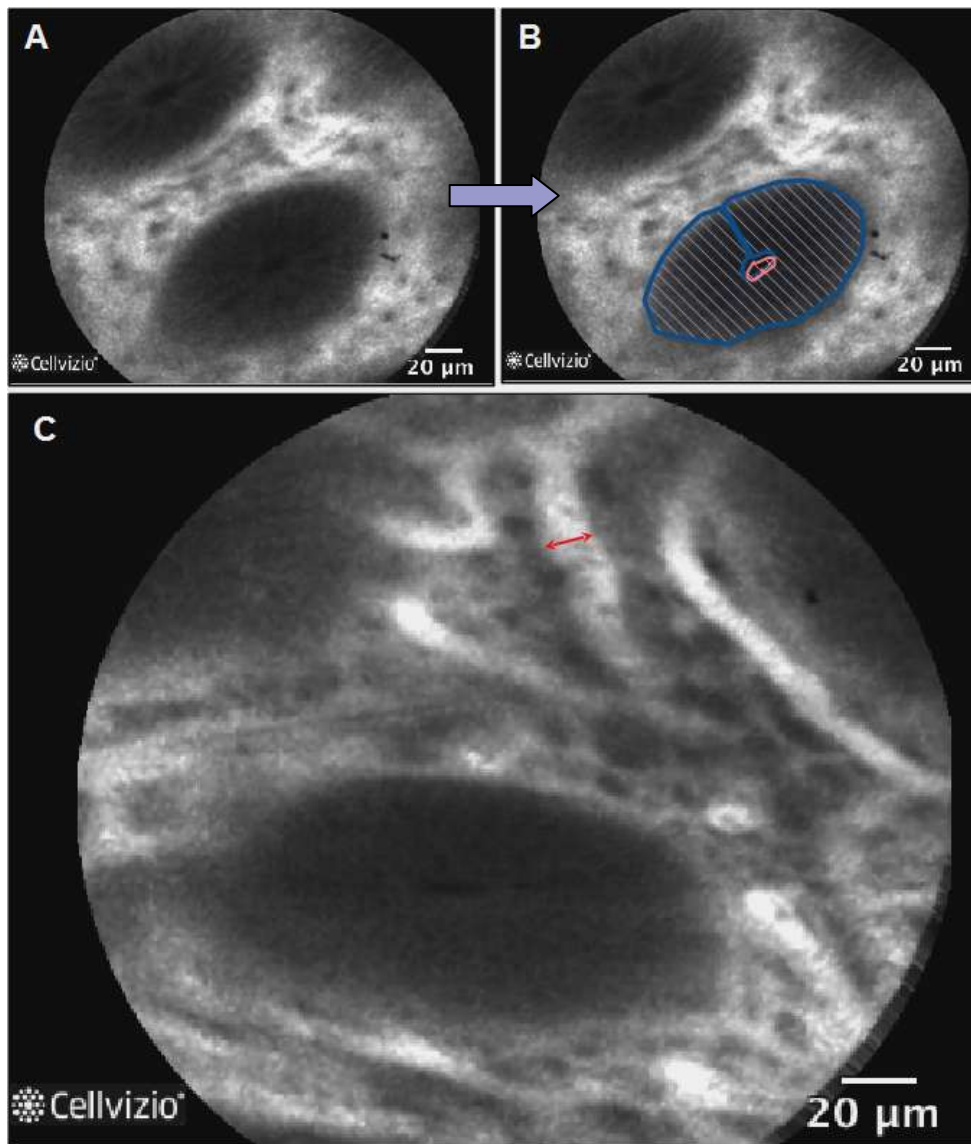
Suite à la procédure endoscopique, l'ensemble des images endomicroscopiques composant les séquences vidéos obtenues étaient extraites en prenant soin de conserver leur format d'origine (.png) afin de limiter toute compression des images synonyme de perte de qualité et donc de précision.

Après relecture, 15 images par séquence pour chaque patient étaient sélectionnées par

l'endoscopiste (Dr E. Coron). Ces images étaient extraites à intervalle de temps réguliers le long de la séquence vidéo. De façon aveugle, un relecteur indépendant (N. Musquer) a ensuite procédé à une évaluation quantitative de ces 240 images à l'aide du logiciel ImageJ<sup>®</sup> (version 1.42q, National Institute of Health, USA). Cette analyse se divisait en une analyse quantitative architecturale et une analyse quantitative fonctionnelle.

L'analyse quantitative architecturale, incluant mesures et comparaisons morphologiques des cryptes et de la lamina propria, comprenait: la mesure des diamètres maximum et minimum des cryptes (DMc et dmc respectivement, figure 4A), la mesure des diamètres maximum et minimum de la lumière des cryptes (DMI et dml respectivement, figure 4C), la mesure des diamètres vasculaires de la lamina propria (figure 3C), et la mesure des distances intercryptes (figure 4E).

De son côté, l'analyse fonctionnelle avait pour but l'étude de la perméabilité membranaire en cotant le rapport d'intensité de fluorescence (RIF) entre la lumière de la crypte et celle des cellules cryptiques (figure 3A et 3B).

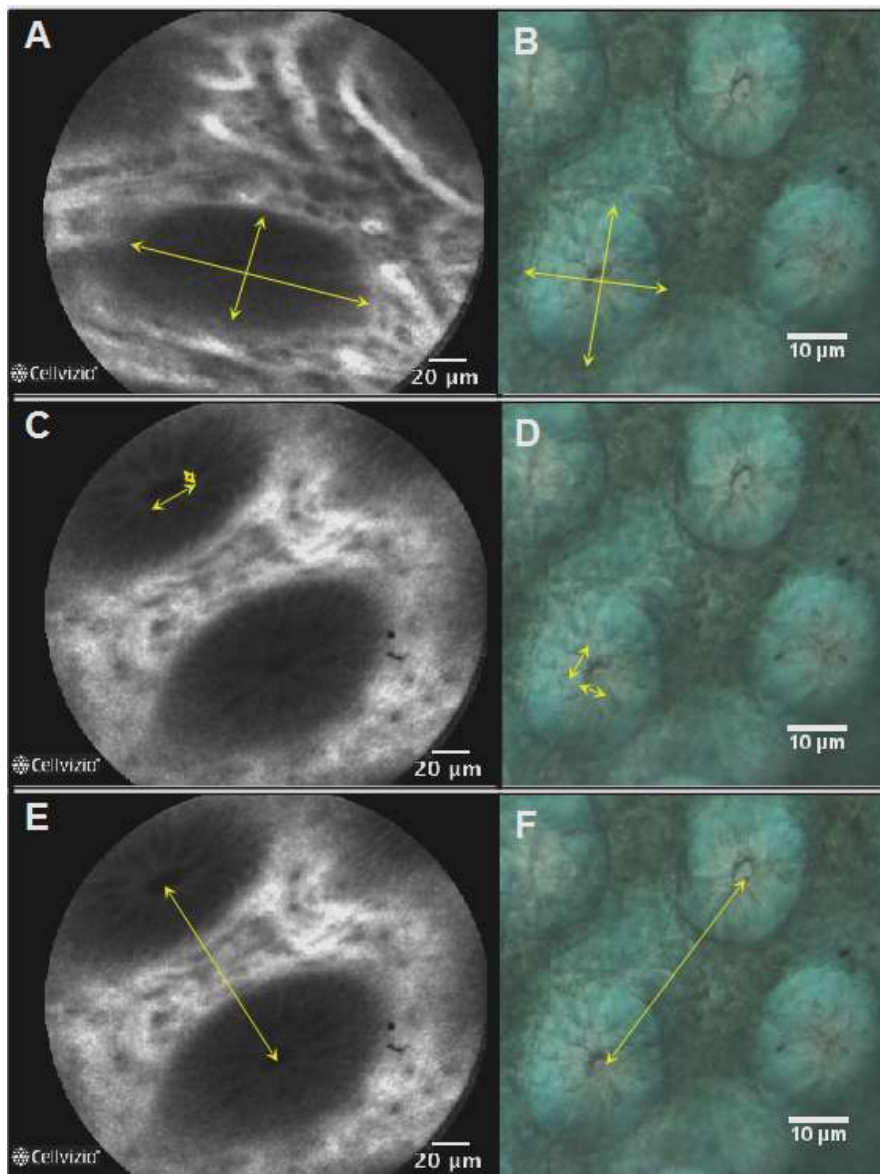


**Figure 3 :** (A et B) Exemple de mesure d'intensité de fluorescence au sein de la lumière cryptique (zone hachurée rose) et des cellules cryptiques (zone hachurée bleue). (C) Exemple de mesure d'un diamètre vasculaire au sein de la lamina propria (double flèche rouge).

### 3.3. Analyse *ex vivo* de la structure cryptique

Afin de s'assurer de la reproductibilité des résultats obtenus à partir des images d'ECM, l'ensemble de l'analyse quantitative architecturale a été reproduite *ex vivo* pour chaque patient sur l'une des biopsies réalisée sur la zone d'ECM. Les mêmes structures ont été mesurées (crypte, lumière des cryptes, distance intercrypte) à l'exception du diamètre vasculaire. Cette étape a été réalisée par le même relecteur (N. Musquer) indépendamment de l'identité des patients et des résultats des mesures endomicroscopiques. Les biopsies ont été préparées comme suit : immédiatement après leur réalisation, les biopsies ont été étirées avec précaution dans une boîte de Petri sous contrôle microscopique puis fixées à l'aide de paraformaldéhyde. Dans un second temps, elles ont été colorées au bleu de méthylène à 1%. Des photographies des biopsies ainsi préparées

ont été réalisées afin d'effectuer les mesures citées précédemment à l'aide du logiciel ImageJ<sup>®</sup> (figure 4B, 4D et 4F).



**Figure 4 :** Exemple de mesures à l'aide du logiciel ImageJ<sup>®</sup>. (A et B) Mesure des DMC et dmc sur image d'ECM et sur BMBM. (C et D) Mesure des DMI et dml sur image d'ECM et sur BMBM. (E et F) Mesure de la distance intercrypte sur image d'ECM et sur BMBM.

### 3.4. Analyse statistique

Du fait de la petite taille de nos échantillons, nous avons décidé d'utiliser pour l'ensemble de nos analyses statistiques des tests non paramétriques. Nous avons considéré comme significative une différence ayant un  $p < 0,05$  avec un intervalle de confiance à 95%.

Pour l'analyse des caractéristiques de nos échantillons, nous avons utilisé le test de Mann et Whitney et le test du  $\chi^2$ . Les comparaisons entre mesures *in vivo* et *ex vivo* ont été réalisées à l'aide du test de Wilcoxon. Les corrélations entre mesures *in vivo* et *ex vivo* ont été réalisées à l'aide du

test de Spearman avec régression linéaire. Enfin l'analyse statistique des données architecturales et fonctionnelles a été réalisée à l'aide du test de Mann et Whitney et du test de Kruskal et Wallis suivi du test de Dunn.

Nous avons utilisé le logiciel statistique Graphpad Prism 5.00<sup>®</sup>(Graphpad Software Inc<sup>®</sup> USA) pour toutes nos analyses statistiques.

#### 4. Résultats

Il s'agissait d'une étude monocentrique prospective menée au CHU de Nantes. Au total 16 patients ont été inclus, 6 témoins sains et 10 patients atteints de MC.

A partir des SES-CD recueillis au sein du colon droit, nous avons subdivisé le groupe des patients atteints de MC en 2 sous-groupes : 6 patients étaient en rémission endoscopique nommés MC-RE (Maladie de Crohn en Rémission Endoscopique), les 4 autres patients, nommés MC-IE (Maladie de Crohn avec Inflammation Endoscopique), présentant des stigmates macroscopiques d'inflammation.

##### 4.1. Caractéristiques des échantillons

L'ensemble des données cliniques, biologiques et endoscopiques des différents groupes est regroupé dans les tableaux 1 et 2.

Les patients atteints de MC ne différaient significativement des témoins que par l'âge avec un âge médian de 39 ans contre 61 pour les témoins ( $p < 0,05$ ). On notait aussi plus de fumeurs dans le groupe de patients atteints de MC.

	Témoins (n=6)	Patients MC (n=10)	p
Age (années)*	61[57;69]	39[29;42]	<0.01
Sexe (n)			
Masculin	3	5	
Féminin	3	5	1
Tabagisme (n)	0	2	0.50
CRP (mg/l)*	3,9[1,5;2,4]	2,6[1,7;5,4]	0.91

\*Médiane [25<sup>e</sup> percentile;75<sup>e</sup> percentile]

**Tableau 1** : Caractéristiques des témoins sains et patients atteints de MC



	MC-RE (n=6)	MC-IE (n=4)	p
Age (années)*	41[39;44]	30[26;34]	0.13
Sexe (n)			
Masculin	2	3	
Féminin	4	1	0.55
Tabagisme (n)	2	0	0.47
CDAI*	15[3;27]	50[32;72]	0.13
Durée d'évolution de la MC (années)*	18,5[16,25;21,5]	15[11,25;20]	0,59
CRP (mg/l)*	1,9[1,5;2,4]	7,7[6,9;8,4]	0.17
SES-CD* colon droit	0	3.5±3.7	NC

\*Médiane [25<sup>e</sup> percentile;75<sup>e</sup> percentile]

NC : Non Calculé

**Tableau 2** : Caractéristiques des patients atteints de MC

Aucune différence significative n'a été mise en évidence parmi les caractéristiques des 2 sous-groupes de patients présentant une MC.

La plupart des patients atteints de MC prenaient un traitement spécifique (90%). 3 patients étaient traités par amino-salicylés oraux, 4 patients par azathioprine, 2 par anti-TNF $\alpha$  (REMICADE<sup>®</sup>). Parmi ces patients, 2 présentaient une atteinte extra-digestive : pour l'un une spondylarthrite ankylosante, pour l'autre une cholangite sclérosante primitive.

#### 4.2. Analyse quantitative architecturale

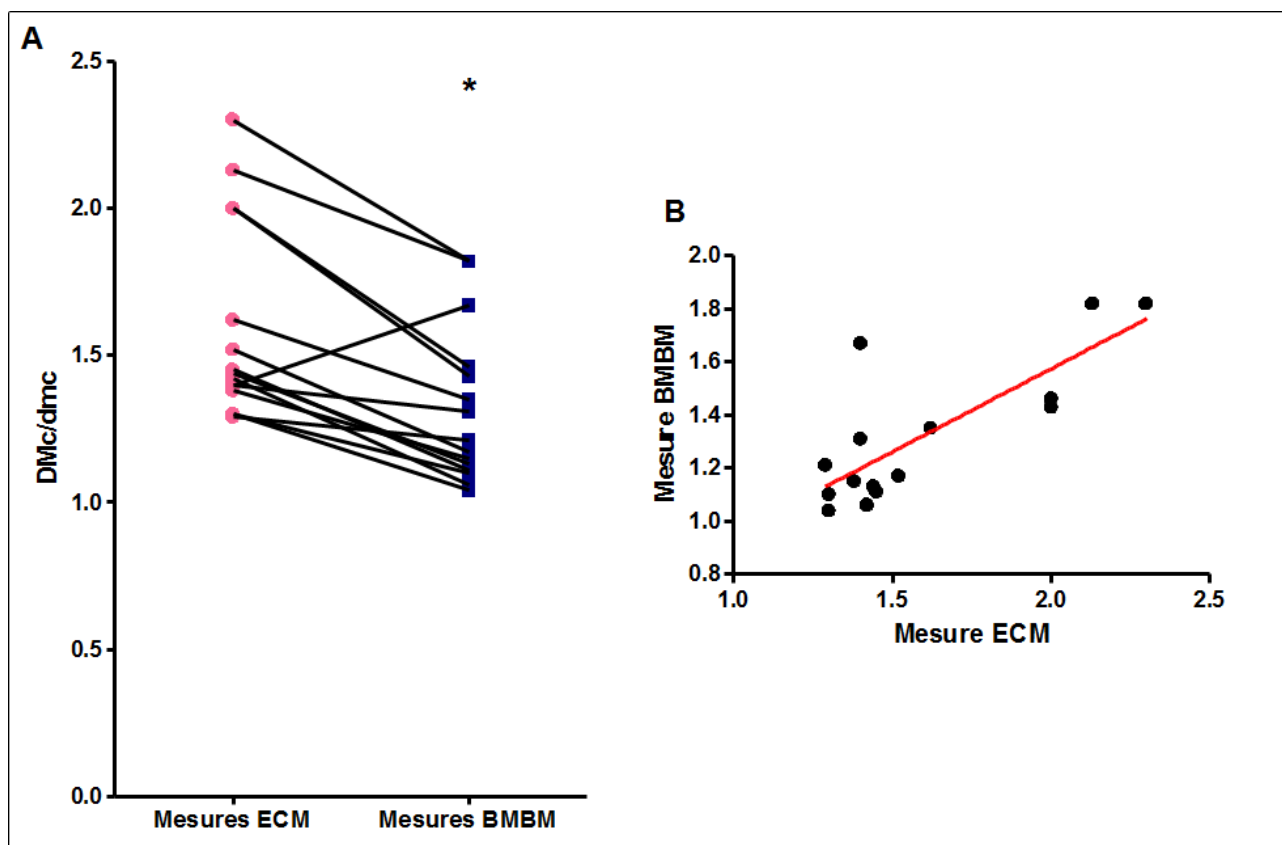
##### *4.2.1. Validation des mesures ECM*

En raison d'un défaut technique, la biopsie de l'un des patients atteints de MC n'a pas pu être marquée au bleu de méthylène. Pour ce patient, nous avons donc seulement effectué des mesures à partir des images d'ECM. Celui-ci n'a donc pas été pris en compte pour la recherche de corrélation entre les mesures *in vivo* et *ex vivo*.

Notre technique de préparation des biopsies ne nous permettant pas de visualiser les vaisseaux de la lamina propria et donc de les mesurer, nous n'avons pas fait d'étude comparative entre BMBM et ECM pour ce dernier critère.

#### 4.2.1.1. Taille des cryptes

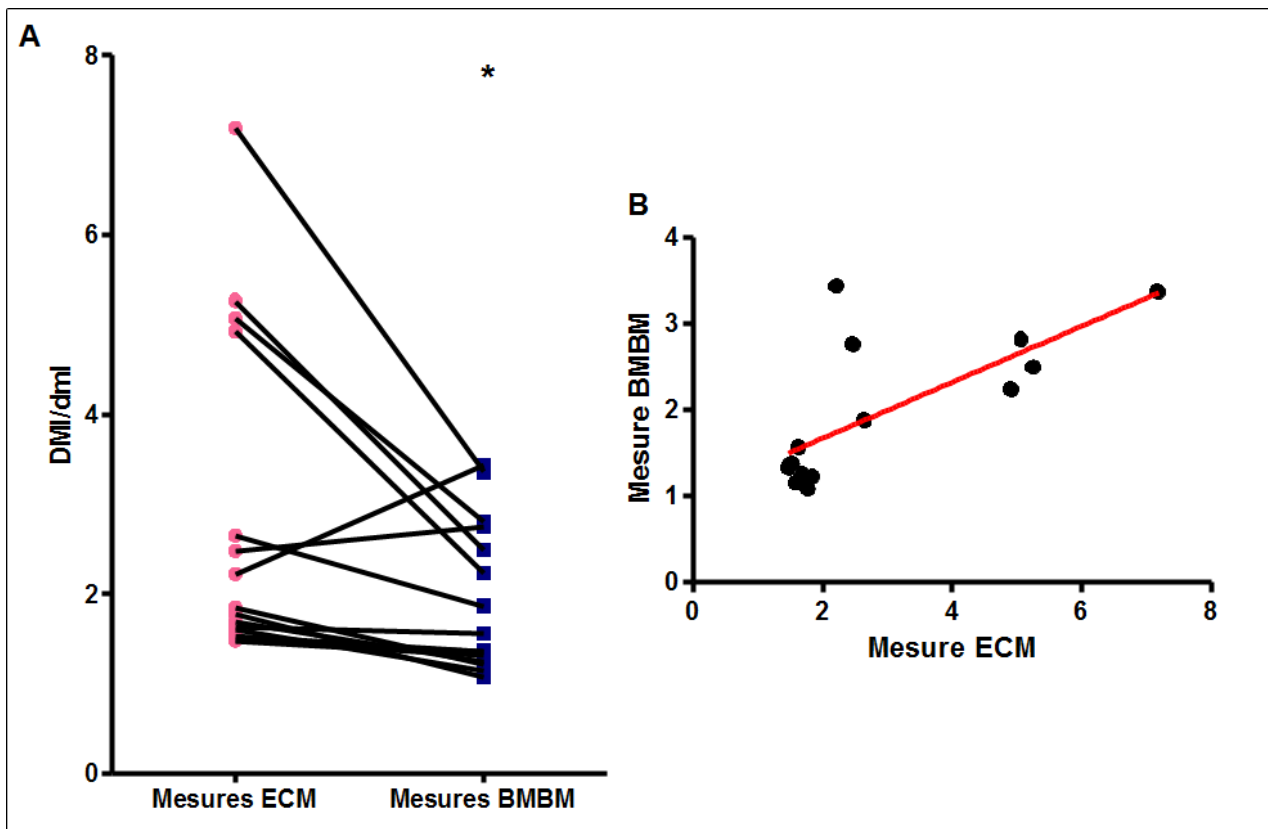
Après mesure des DMc et dmc, nous avons calculé le rapport DMc/dmc. Comparativement aux mesures effectuées sur les images d'ECM, les rapports DMc/dmc mesurés sur BMBM étaient significativement moins importants (Test Wilcoxon,  $p=0,03$ ) (figure 5A). Cependant il existe une corrélation significative entre les mesures obtenues avec chacune des 2 méthodes (Test Spearman,  $r=0,65$  ;  $p=0,009$ ) (figure 5B).



**Figure 5 :** (A) Comparaison des rapports DMc/dmc des cryptes calculés à partir des images ECM et des BMBM (\* $p<0,05$ ). (B) Résultats de l'étude de corrélation entre les 2 méthodes de mesure des rapports DMc/dmc.

#### 4.2.1.2. Taille des lumières des cryptes

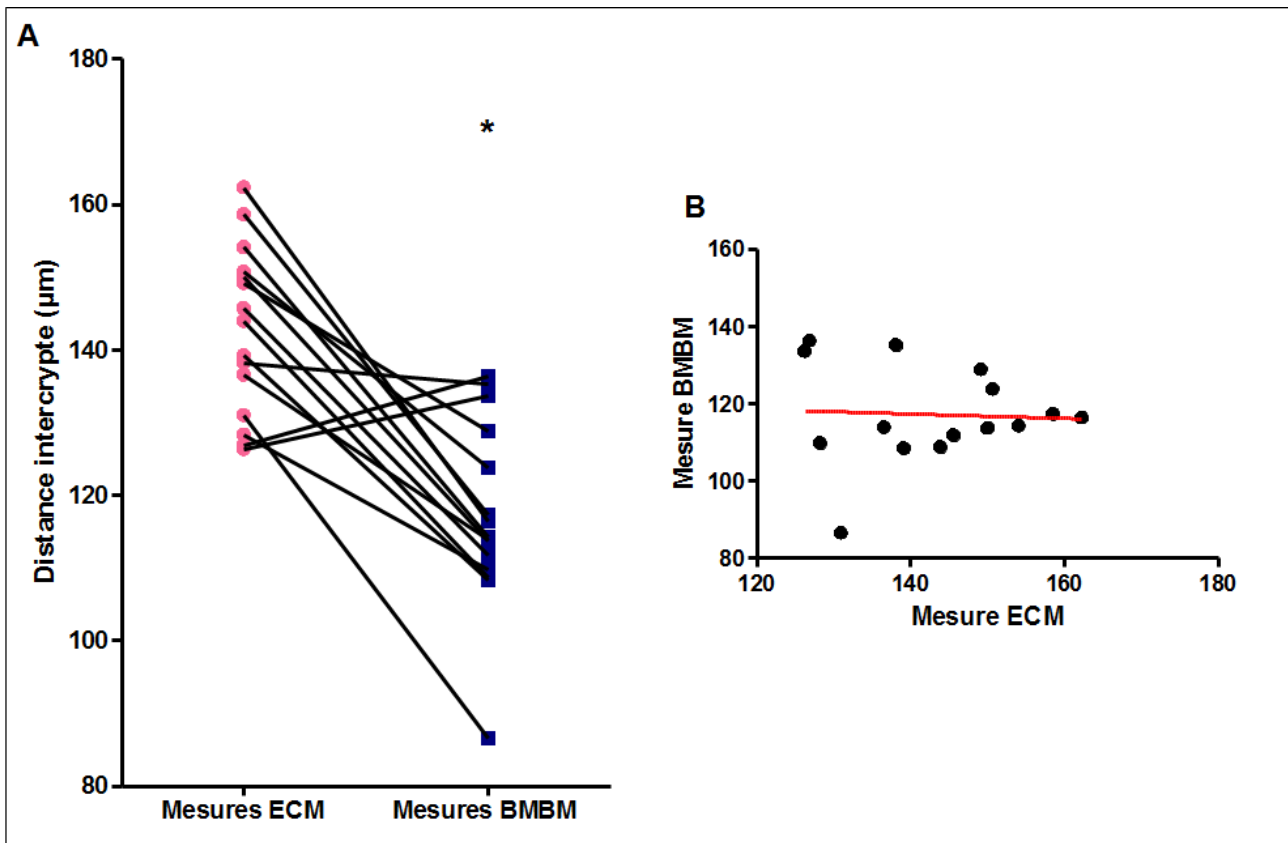
Nous avons mesuré le rapport DMI/dml. Comme pour le rapport DMc/dmc, le rapport DMI/dml est significativement moins important lorsque les mesures sont effectuées sur BMBM par rapport aux mesures en ECM ( $p=0,01$ ) (figure 6A). Néanmoins la corrélation entre les 2 types de mesures est significative ( $r=0,67$  ;  $p=0,006$ ) (figure 6B).



**Figure 6 :** (A) Comparaison des rapports de diamètres maximums et minimums des lumières des cryptes (DMI/dml) calculés à partir des images ECM et des BMBM (\* $p < 0,05$ ). (B) Résultats de l'étude de corrélation entre les 2 méthodes de mesure des rapports DMI/dml.

#### 4.2.1.3. Distance intercrypte

Les distances intercryptes, définies par la distance séparant les centres de 2 cryptes adjacentes, sont significativement moins longues lorsqu'elles sont mesurées sur les BMBM ( $p=0,0006$ ) (figure 7A). L'étude de corrélation est négative avec un coefficient de Spearman à 0,007 ( $p=0,98$ ) (figure 7B).



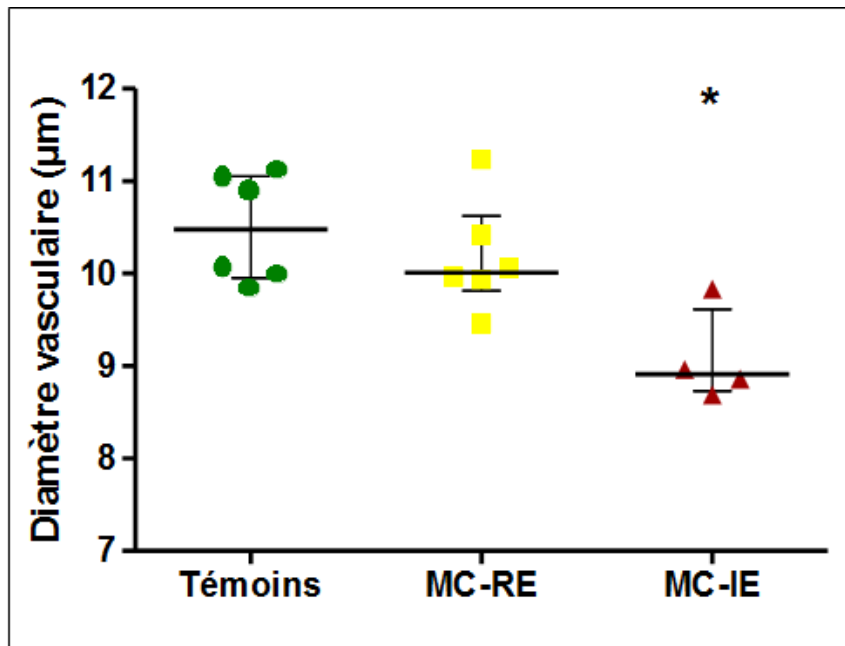
**Figure 7 :** (A) Comparaison des distances intercryptes calculées à partir des images d'ECM et des BMBM(A) (\* $p < 0,05$ ). (B) Résultats de l'étude de corrélation entre les 2 méthodes de mesure des distances intercryptes.

#### 4.2.2. Comparaisons intergroupes

Après cette première phase de validation et de comparaison des mesures obtenues en ECM et sur BMBM, nous avons souhaité comparer les mesures obtenues pour chacun des critères architecturaux entre les 3 groupes de patients : témoins sains, patients MC-RE et patients MC-IE.

##### 4.2.2.1. Diamètre vasculaire

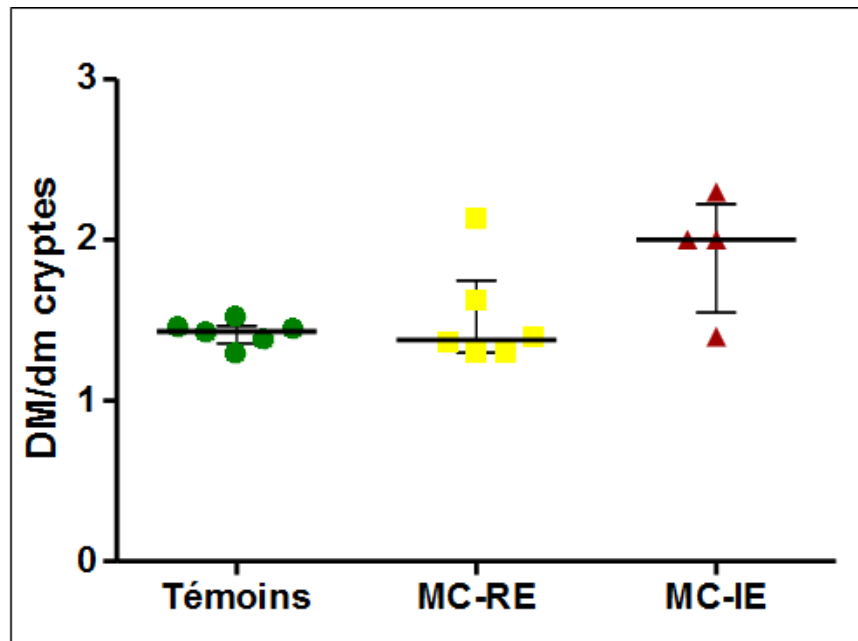
Une moyenne de  $48 \pm 10$  mesures par patients ont été réalisées. Bien que non validé par une étude de corrélation avec mesures sur BMBM, nous avons remarqué que les diamètres vasculaires de ses différents groupes étaient significativement différents (test de Kruskal & Wallis,  $p = 0,02$ ). La comparaison entre groupe a montré que les patients MC-IE présentaient des diamètres vasculaires moins importants que les patients témoins (test complémentaire de Dunn,  $p < 0,05$ ). Quant aux patients MC-RE, ils ne différaient statistiquement pas des 2 autres groupes par ce critère (figure 8).



**Figure 8 :** Comparaison des diamètres vasculaires par groupe (médianes et interquartiles) (\* $p < 0,05$ )

#### 4.2.2.2. Taille des cryptes

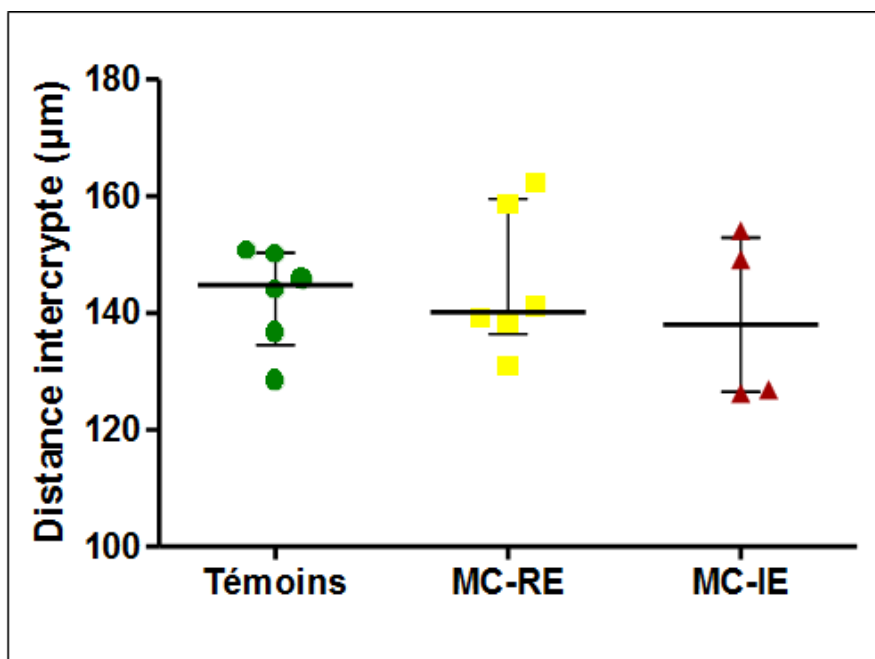
En moyenne,  $21 \pm 4$  cryptes par patients ont été mesurées. Les rapports DMc/dmc n'étaient pas différents entre les témoins sains et l'ensemble des patients atteints de MC ( $p = 0,49$ ). La mesure des rapports DMc/dmc n'était pas non plus différente entre les 3 groupes ( $p = 0,17$ ). Il était cependant noté une nette homogénéité parmi les témoins comme en témoigne la faible dispersion des valeurs des rapports de ces 6 patients (médiane =  $1,43 [1,39; 1,45]$ ) (figure 9).



**Figure 9 :** Comparaison des rapports DMc/dmc par groupe (médianes et interquartiles)

#### 4.2.2.3. Distance intercrypte

En moyenne,  $18 \pm 9$  distances intercryptes ont été mesurées par patient. Comme pour le critère précédent, la distance intercrypte n'était significativement pas différente entre témoins sains et patients atteints de MC ( $p=0,96$ ). Si nous considérons la comparaison entre les 3 groupes (figure 10), nous ne retrouvons pas non plus de différence significative ( $p=0,75$ ). La dispersion des valeurs étaient cependant plus importante et ce pour les 3 groupes.

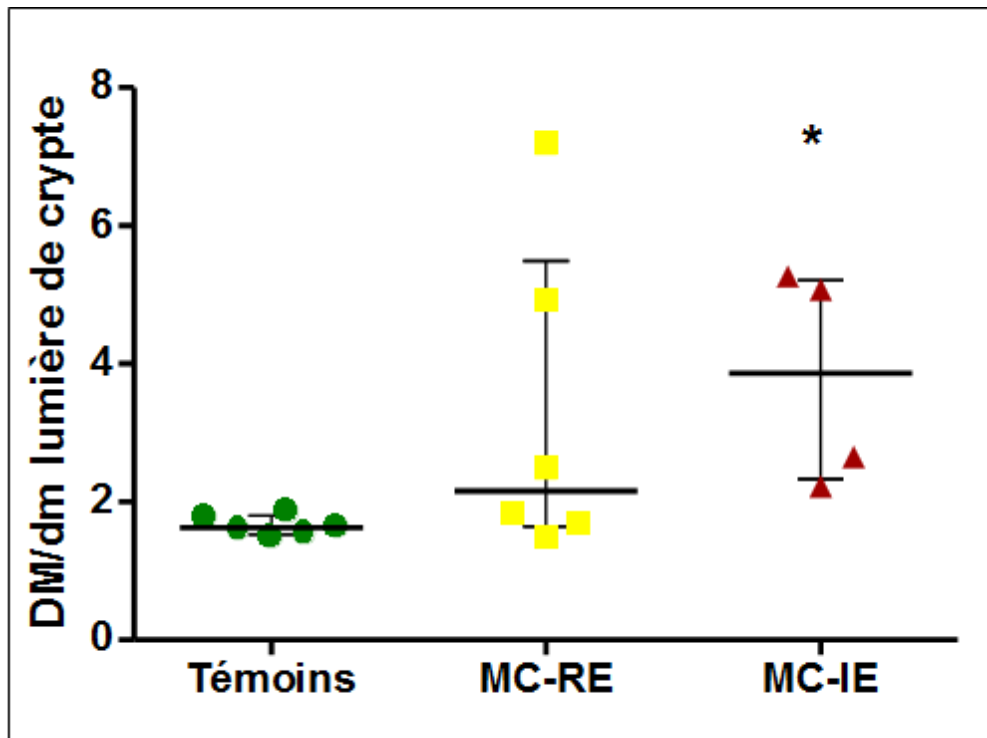


**Figure 10 :** Comparaison des distances intercryptes par groupe (médianes et interquartiles)

#### 4.2.2.4. Taille des lumières des cryptes

Une moyenne de  $21 \pm 4$  lumières de crypte par patient parmi les 15 images d'ECM a été mesurée. Comparativement à l'ensemble des témoins, l'ensemble des patients atteints de MC présentaient un rapport DMI/dml significativement plus important ( $p=0,016$ ). Il existait aussi une différence statistiquement significative entre les 3 groupes ( $p=0,03$ ). L'analyse complémentaire affirmait que le rapport DMI/dml des patients MC-IE était significativement plus élevé que celui des patients témoins. Celui des patients MC-RE n'était pas différent ni des témoins ni des patients MC-IE (figure 11).

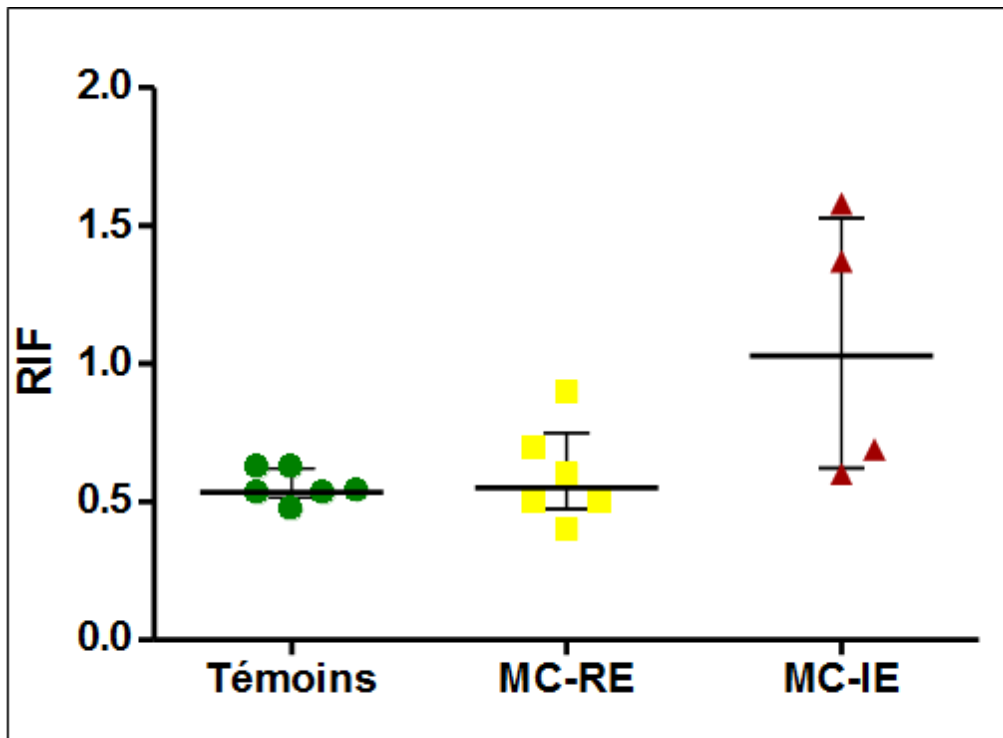
Le groupe témoin présentait une homogénéité de ses mesures comme en témoignent les paramètres statistiques de cette population (médiane :  $1,62[1,56;1,75]$ ). Cette homogénéité contrastait avec l'hétérogénéité des 2 autres groupes de patients ( $2,15[1,73;4,31]$  et  $3,86[2,54;5,12]$  pour les patients MC-RE et MC-IE respectivement) (figure 11).



**Figure 11 :** Comparaison des rapports DMI/dml par groupe (médianes et interquartiles) (\* $p < 0,05$ )

#### 4.3. Analyse quantitative fonctionnelle

En moyenne,  $21 \pm 3$  RIF par patient ont été calculés. Nous avons comparé les 3 groupes. Les résultats des tests statistiques concluaient à l'absence de différence entre les groupes. Comme pour les mesures des rapports DMc/dmc et DMI/dml, il existait là encore une nette homogénéité du groupe témoin (0,54[0,53;0,6]) tandis que les 2 groupes de patients atteints de MC semblaient plus hétérogènes (0,55[0,5;0,68] et 1,3[0,67;1,42]) (figure 12).



**Figure 12 :** Visualisation des RIF par groupe (médianes et interquartiles) (\* $p < 0,05$ )

#### 4.4. Analyses complémentaires du critère DMI/dml

Au vu de l'ensemble des résultats des critères architecturaux et fonctionnels étudiés, nous avons décidé d'approfondir l'étude du critère DMI/dml. En effet, celui-ci était significativement corrélé aux mesures sur BMBM. De plus l'analyse comparative intergroupe et en particulier la différence statistiquement démontrée entre témoins et patients MC-IE, et l'hétérogénéité du groupe MC-RE, en faisait le critère probablement le plus intéressant et le plus discriminant.

##### *4.4.1 Analyse individuelle du rapport DMI/dml*

Nous avons compilé les valeurs DMI/dml médianes de chaque patient. Nous les avons comparés individuellement aux valeurs de l'ensemble des patients témoins. Les résultats des comparaisons sont consignés dans le tableau 3.



	Patient	DMI/dml (Médiane)	p
Témoins	1	1,5	0.99
	2	1,7	0.32
	3	1,4	0.33
	4	1,5	0.29
	5	1,5	0.48
	6	1,6	0.90
MC-RE	7	1,6	0.90
	8	2,3	<b>0.01</b>
	9	1,4	0.16
	10	4,3	<b>&lt;0.0001</b>
	11	1,7	0.35
	12	3,6	<b>&lt;0.0001</b>
MC-IE	13	2,6	<b>&lt;0.0001</b>
	14	2,3	<b>0.02</b>
	15	2,1	<b>0.03</b>
	16	3,3	<b>&lt;0.0001</b>

**Tableau 3 :** Valeurs médianes individuelles et comparaison des valeurs individuelles des patients atteints de MC à l'ensemble des valeurs du groupe témoins (colonne p).

Les valeurs individuelles de DMI/dml des témoins n'étaient pas différentes des valeurs de l'ensemble des témoins. Au sein du groupe MC-RE, 50% (3/6) des patients présentaient une valeur significativement différente de la valeur médiane des témoins, contre 100% (4/4) au sein du groupe MC-IE.

#### 4.4.2. Définition d'une valeur « cut-off »

Dans un deuxième temps, nous avons cherché à établir une valeur cut-off au-dessus de laquelle nous pouvions considérer le patient comme ayant un rapport DMI/dml anormal. Nous avons donc calculé le 95<sup>ème</sup> percentile de la population témoin. Cette valeur correspondait à 1,7.

Ainsi parmi les 16 patients étudiés, aucun témoin, 50% des patients MC-RE et 100% des patients MC-IE pouvaient être considérés comme ayant un DMI/dml anormal. Soit au final, 70% (7/10) des patients atteints de MC. En comparaison, les résultats endoscopiques classaient 40% des patients atteints de MC comme inflammatoires.

Du point de vue histologique, 70% des patients atteints de MC étaient considérés comme porteur d'une inflammation histologique.

La corrélation entre inflammation endoscopique, inflammation histologique à l'examen anatomo-pathologique standard, et valeur DMI/dml anormale est résumée dans le tableau 4.

	Patient	SES-CD colon droit	Inflammation histologique colique droite (Oui/Non)	DMI/dml > 1,7 (Oui/Non)
Témoins	1		Non	Non
	2		Non	Non
	3		Non	Non
	4		Non	Non
	5		Non	Non
	6		Non	Non
MC-RE	7	0	Non	Non
	8	0	Tissu cicatriciel	Oui
	9	0	Non	Non
	10	0	Oui	Oui
	11	0	Oui	Non
	12	0	Oui	Oui
MC-IE	13	3	Oui	Oui
	14	5	Oui	Oui
	15	2	Oui	Oui
	16	4	Oui	Oui

**Tableau 4 :** Résultats comparatifs par patient des examens endoscopique, histologique et endomicroscopique

#### 4.5. Etude de sécurité de la procédure

L'innocuité de l'injection de fluorescéine IV en cours de procédure d'ECM a été démontrée<sup>47</sup>. Au cours de notre étude, aucun effet indésirable sévère n'a été observé. Un patient a présenté un épisode de bradycardie au moment de l'injection de la fluorescéine rapidement réversible par l'injection intraveineuse d'atropine.

## 5. Discussion

A notre connaissance, notre étude est la première à utiliser des données quantitatives afin de caractériser endomicroscopiquement l'architecture de la muqueuse colique. Parmi l'ensemble des critères architecturaux nous avons choisi d'approfondir l'étude du rapport DMI/dml. Ce choix est justifié parce qu'il s'appuie sur un critère endoscopique déjà validé auparavant à savoir le « pit-pattern ». Ce dernier a prouvé son efficacité dans la détection des modifications de la structure des cryptes coliques dans le cadre des lésions dysplasiques ou néoplasiques<sup>48</sup>. Notre étude montre une bonne corrélation entre les rapports DMI/dml mesurés par ECM et sur BMBM (ces dernières mimant les coupes transversales des cryptes obtenues par ECM), même si les valeurs obtenues à partir des images d'ECM étaient significativement plus élevées. Cette différence peut être expliquée par un artefact de rétraction lié à la fixation des BMBM par le paraformaldéhyde<sup>49</sup>.

L'application de cette nouvelle méthode d'étude quantitative aux patients atteints de MC en rémission clinique, a permis de confirmer sa capacité à discriminer ces malades de témoins sains et ce via l'utilisation d'une valeur dite « cut-off ». Contrairement à la rectocolite hémorragique (RCH), jusqu'à maintenant aucune étude n'a cherché à quantifier les modifications architecturales au cours de la MC par le biais de l'endomicroscopie. Seule une étude a réalisé une évaluation quantitative du « pit-pattern » par chromoendoscopie à l'aide d'endoscope de haute résolution. De façon intéressante, les auteurs retrouvaient, chez les patients présentant une muqueuse colique normale, une valeur moyenne de DMI/dml de 1,6<sup>41</sup>. Cette valeur est proche de celle retrouvée dans notre étude.

Parmi les patients atteints de MC considérés en rémission clinique selon les critères européens admis<sup>9</sup>, à savoir un CDAI < 150, 40% présentaient tout de même une inflammation endoscopique. Même si celle-ci restait modérée au vu du score SES-CD, notre étude tend à confirmer le manque de corrélation existant entre CDAI et scores endoscopiques (CDEIS et SES-CD)<sup>13,50</sup>.

Il a été clairement démontré que les patients présentant une inflammation muqueuse macroscopique sont plus à risque de rechute, non seulement après résection chirurgicale<sup>51</sup>, mais aussi lorsqu'ils sont en cours de traitement par immunosuppresseurs<sup>52</sup>. Dans notre travail, nous avons montré que les mesures endomicroscopiques, en particulier celle des lumières des cryptes, nous permettaient de distinguer les patients atteints de MC avec inflammation endoscopique des patients témoins. Elles n'ont pas permis de différencier les patients atteints de MC sans inflammation endoscopique des 2 autres groupes. Cependant, nous pensons que l'utilisation d'échantillons de taille plus importante permettrait certainement de mettre en évidence cette

différence. En effet, l'hétérogénéité constatée parmi les mesures endomicroscopiques (crypte et lumière des cryptes) peut nous laisser penser que parmi cette population de patients certains présentent un profil endomicroscopique comparable aux témoins tandis que d'autres ont un profil plus proche de celui de patients présentant une inflammation endoscopique. Cette hétérogénéité contraste avec les valeurs de la population témoin qui sont, a contrario, plutôt homogènes.

Cette différence de profil parmi cette population de MC est sous-tendue par les résultats présentés dans le tableau 3 où la moitié des patients MC-RE ont un rapport DMI/dml significativement supérieur à la moyenne des témoins. Ces patients sans inflammation endoscopique mais avec un profil endomicroscopique « anormal » seraient-ils à risque de rechute plus élevé par rapport aux autres patients du même sous-groupe ? Nishio *et al.* ont montré que chez des patients présentant une RCH, le pit-pattern rectal analysé sous coloscopie de haute résolution était un marqueur prédictif de rechute<sup>53</sup>. Une étude complémentaire de suivi pour l'endomicroscopie devra être menée pour nous permettre de savoir si le rapport DMI/dml est prédictif de l'évolution des patients atteints de MC.

La corrélation entre les résultats histologiques standards et les résultats endomicroscopiques est intéressante. Aucun de nos témoins ne présentait d'inflammation histologique et aucun n'avait de ratio DMI/dml significativement différent, tandis que tous les patients MC-IE avaient une inflammation histologique et un rapport DMI/dml significativement plus élevé. Pour ces 2 groupes le rapport entre anomalies histologiques et anomalies endomicroscopiques semble bon. Considérant les patients MC-RE, la corrélation histologie/endomicroscopie semble bonne bien qu'imparfaite. Effectivement, parmi les 3 patients présentant un DMI/dml significativement différent, 2 avaient une inflammation histologique, le troisième correspondant à un tissu cicatriciel. Il a été montré que des anomalies architecturales persistent malgré la disparition de l'infiltrat cellulaire inflammatoire<sup>54</sup> : ceci peut expliquer la présence d'anomalie architecturale endomicroscopique pour ce dernier patient sans stigmates histologique d'inflammation aiguë. La difficulté pour ce seul marqueur endomicroscopique à distinguer un tissu inflammatoire d'une muqueuse colique en voie de cicatrisation pourrait être une limite de l'application de l'endomicroscopie dans la MC.

D'où l'intérêt de développer d'autres marqueurs endomicroscopiques différents des éléments histologiques habituellement recueillis comme l'étude fonctionnelle dynamique de la perméabilité muqueuse. Le RIF, marqueur fonctionnel, utilise directement les propriétés connues d'hyperperméabilité des MC en poussée. Cette hyperperméabilité précède dans certains cas une nouvelle poussée aiguë de la maladie<sup>19</sup>, rendant ce biomarqueur potentiellement prédictif. Malgré

des résultats non significatifs dans notre étude, la corrélation prouvée de l'intensité de fluorescence des lumières des cryptes au degré d'inflammation histologique dans la RCH<sup>38</sup> rend ce biomarqueur prometteur. L'émergence de traceurs spécifiques marqués à la fluorescéine pour l'endomicroscopie<sup>35,36</sup> est une voie de recherche considérable. Le couplage d'un marquage spécifique de protéines impliquées dans la perméabilité membranaire (ZO1,...) et d'une étude fonctionnelle apporterait une information particulièrement intéressante ajoutée aux données architecturales endomicroscopiques et anatomo-pathologiques.

L'étude de la distance intercrypte ne semble pas être un marqueur endomicroscopique pertinent au vu des résultats de notre étude. Alors qu'il est démontré qu'en période inflammatoire, la densité cryptique est réduite<sup>17</sup>, notre étude n'a pas montré de différence significative parmi l'ensemble des sous-groupes. Cette absence de différence conjuguée à une trop faible corrélation BMBM-endomicroscopie semble rendre cette mesure peu informative.

Le diamètre vasculaire, correspondant au réseau capillaire péricryptique, était significativement moins important chez les patients MC-IE par rapport aux témoins. Ces constatations semblent être en contradiction avec les travaux ayant étudié l'évolution du système microcirculatoire colique en cas de colite<sup>55</sup> où les auteurs montraient une augmentation significative du diamètre capillaire péricryptique en cas de colite aiguë. Deux explications peuvent être avancées. La néovascularisation induite par l'inflammation<sup>56</sup> pourrait permettre le développement de nombreuses ramifications capillaires présentant des diamètres moins importants que ceux des réseaux capillaires d'origine. D'autre part, la distinction des parois vasculaires des capillaires de la lamina propria en ECM pour la mesure du diamètre capillaire est rendue plus difficile en raison de l'infiltration cellulaire de cette dernière et de la fuite plus importante de fluorescéine dans le milieu paravasculaire en cas d'inflammation.

Notre étude n'est bien sûr pas exempte de limites. La première d'entre elles est le faible effectif de nos échantillons nous empêchant d'extrapoler nos résultats au reste de la population des patients atteints de MC.

D'autre part, nous avons observé que les patients témoins de notre étude étaient significativement plus âgés et présentaient une intoxication tabagique moins importante que les patients atteints de MC. Nous n'avons pas trouvé de données dans la littérature suggérant que l'âge influait sur la structure cryptique chez l'homme. Seule une étude chez le chien a montré que l'âge

semblait augmenter la longueur des cryptes<sup>57</sup>. Par ailleurs, contrairement à l'effet pro-inflammatoire du tabac chez les patients atteints de MC<sup>58</sup>, les 2 patients fumeurs ne présentaient pas un rapport DMI/dml significativement différent de la moyenne des témoins.

L'étude de la perméabilité colique grâce à l'utilisation fonctionnelle de l'endomicroscopie nécessiterait une validation par une technique dite « gold standard ». Ceci n'a pas été fait dans notre étude.

Nous avons limité notre étude à une portion du colon droit. Nous pensons nécessaire la réalisation d'une cartographie endomicroscopique à l'image de ce qui a déjà été réalisé dans la RCH<sup>59</sup>. Ceci limiterait les erreurs d'échantillonnage d'autant plus importantes dans le cas de la MC du fait du caractère discontinu de l'atteinte inflammatoire. En particulier, nous pouvons penser que les résultats concernant le RIF seraient peut-être plus significatifs en considérant une évaluation plus globale.

Enfin, la lecture et l'étude des images endomicroscopiques est longue et parfois fastidieuse. Certaines équipes ont mis au point des outils informatiques efficaces spécialement dédiés à la reconnaissance des structures cryptiques<sup>41,60</sup>. L'utilisation d'applications similaires adaptées à l'endomicroscopie permettrait d'une part une analyse en direct et des résultats instantanés, et d'autre part une exploration plus globale du tractus digestif.

## 6. Conclusion

L'analyse quantitative architecturale et fonctionnelle de la muqueuse colique et en particulier des cryptes coliques chez les patients sains comme chez les patients atteints de MC est réalisable. Elle montre des différences significatives en termes d'analyse architecturale entre les patients témoins et les malades atteints de MC. Le critère architectural semblant le plus prometteur est la mesure du rapport DMI/dml.

L'utilisation sur un mode fonctionnel de l'endomicroscopie est probablement une voie d'avenir car elle exploite sa particularité principale, celle d'une exploration en temps réel *in vivo*. La caractérisation de la perméabilité colique, même si notre étude ne l'a pas confirmé, est d'un intérêt particulier puisqu'elle est directement impliquée dans la physiopathologie de la MC.

La caractérisation de ces nouveaux biomarqueurs nécessitera des études de plus grande envergure, utilisant des mesures automatisées. Ceci permettra de mieux définir leur intérêt dans la prise en charge thérapeutique et le suivi des patients atteints de MC.



## Références

1. Crohn BB, Ginzburg L, Oppenheimer GD. Landmark article Oct 15, 1932. Regional ileitis. A pathological and clinical entity. By Burril B. Crohn, Leon Ginzburg, and Gordon D. Oppenheimer. *JAMA*. 1984;251(1):73-79.
2. Nguyen GC, Torres EA, Regueiro M, et al. Inflammatory bowel disease characteristics among African Americans, Hispanics, and non-Hispanic Whites: characterization of a large North American cohort. *Am. J. Gastroenterol.* 2006;101(5):1012-1023.
3. Gaya DR, Russell RK, Nimmo ER, Satsangi J. New genes in inflammatory bowel disease: lessons for complex diseases? *Lancet*. 2006;367(9518):1271-1284.
4. Baumgart DC, Carding SR. Inflammatory bowel disease: cause and immunobiology. *Lancet*. 2007;369(9573):1627-1640.
5. Loftus EV Jr. Clinical epidemiology of inflammatory bowel disease: Incidence, prevalence, and environmental influences. *Gastroenterology*. 2004;126(6):1504-1517.
6. Shivananda S, Lennard-Jones J, Logan R, et al. Incidence of inflammatory bowel disease across Europe: is there a difference between north and south? Results of the European Collaborative Study on Inflammatory Bowel Disease (EC-IBD). *Gut*. 1996;39(5):690-697.
7. Bernstein CN, Blanchard JF, Rawsthorne P, Yu N. The prevalence of extraintestinal diseases in inflammatory bowel disease: a population-based study. *Am. J. Gastroenterol.* 2001;96(4):1116-1122.
8. Thia K, Faubion WA Jr, Loftus EV Jr, et al. Short CDAI: development and validation of a shortened and simplified Crohn's disease activity index. *Inflamm. Bowel Dis.* 2011;17(1):105-111.
9. Van Assche G, Dignass A, Panes J, et al. The second European evidence-based Consensus on the diagnosis and management of Crohn's disease: Definitions and diagnosis. *J Crohns Colitis*. 2010;4(1):7-27.

10. Bourreille A, Ignjatovic A, Aabakken L, et al. Role of small-bowel endoscopy in the management of patients with inflammatory bowel disease: an international OMED-ECCO consensus. *Endoscopy*. 2009;41(7):618-637.
11. Mary JY, Modigliani R. Development and validation of an endoscopic index of the severity for Crohn's disease: a prospective multicentre study. Groupe d'Etudes Thérapeutiques des Affections Inflammatoires du Tube Digestif (GETAID). *Gut*. 1989;30(7):983-989.
12. Daperno M, D'Haens G, Van Assche G, et al. Development and validation of a new, simplified endoscopic activity score for Crohn's disease: the SES-CD. *Gastrointest. Endosc.* 2004;60(4):505-512.
13. Sipponen T, Nuutinen H, Turunen U, Färkkilä M. Endoscopic evaluation of Crohn's disease activity: comparison of the CDEIS and the SES-CD. *Inflamm. Bowel Dis.* 2010;16(12):2131-2136.
14. Tanaka M, Saito H, Fukuda S, et al. Simple mucosal biopsy criteria differentiating among Crohn disease, ulcerative colitis, and other forms of colitis: measurement of validity. *Scand. J. Gastroenterol.* 2000;35(3):281-286.
15. Sipponen T, Kärkkäinen P, Savilahti E, et al. Correlation of faecal calprotectin and lactoferrin with an endoscopic score for Crohn's disease and histological findings. *Aliment. Pharmacol. Ther.* 2008;28(10):1221-1229.
16. Bataille F, Klebl F, Rümmele P, et al. Histopathological parameters as predictors for the course of Crohn's disease. *Virchows Arch.* 2003;443(4):501-507.
17. Jenkins D, Balsitis M, Gallivan S, et al. Guidelines for the initial biopsy diagnosis of suspected chronic idiopathic inflammatory bowel disease. The British Society of Gastroenterology Initiative. *J. Clin. Pathol.* 1997;50(2):93-105.
18. Carpenter HA, Talley NJ. The importance of clinicopathological correlation in the diagnosis of inflammatory conditions of the colon: histological patterns with clinical implications. *Am. J. Gastroenterol.* 2000;95(4):878-896.

19. Benjamin J, Makharia GK, Ahuja V, Kalaivani M, Joshi YK. Intestinal permeability and its association with the patient and disease characteristics in Crohn's disease. *World J. Gastroenterol.* 2008;14(9):1399-1405.
20. Söderholm JD, Olaison G, Peterson KH, et al. Augmented increase in tight junction permeability by luminal stimuli in the non-inflamed ileum of Crohn's disease. *Gut.* 2002;50(3):307-313.
21. Arrieta MC, Bistriz L, Meddings JB. Alterations in intestinal permeability. *Gut.* 2006;55(10):1512-1520.
22. Silva MA. Intestinal dendritic cells and epithelial barrier dysfunction in Crohn's disease. *Inflamm. Bowel Dis.* 2009;15(3):436-453.
23. Vogelsang H. Do changes in intestinal permeability predict disease relapse in Crohn's disease? *Inflamm. Bowel Dis.* 2008;14 Suppl 2:S162-163.
24. Koenig F, Knittel J, Stepp H. Diagnosing cancer in vivo. *Science.* 2001;292(5520):1401-1403.
25. Sakashita M, Inoue H, Kashida H, et al. Virtual histology of colorectal lesions using laser-scanning confocal microscopy. *Endoscopy.* 2003;35(12):1033-1038.
26. Kiesslich R, Burg J, Vieth M, et al. Confocal laser endoscopy for diagnosing intraepithelial neoplasias and colorectal cancer in vivo. *Gastroenterology.* 2004;127(3):706-713.
27. Gómez V, Buchner AM, Dekker E, et al. Interobserver agreement and accuracy among international experts with probe-based confocal laser endomicroscopy in predicting colorectal neoplasia. *Endoscopy.* 2010;42(4):286-291.
28. Leong RWL, Nguyen NQ, Meredith CG, et al. In vivo confocal endomicroscopy in the diagnosis and evaluation of celiac disease. *Gastroenterology.* 2008;135(6):1870-1876.

29. Dunbar KB, Canto MI. Confocal laser endomicroscopy in Barrett's esophagus and endoscopically inapparent Barrett's neoplasia: a prospective, randomized, double-blind, controlled, crossover trial. *Gastrointest. Endosc.* 2010;72(3):668.
30. Wallace MB, Sharma P, Lightdale C, et al. Preliminary accuracy and interobserver agreement for the detection of intraepithelial neoplasia in Barrett's esophagus with probe-based confocal laser endomicroscopy. *Gastrointest. Endosc.* 2010;72(1):19-24.
31. Bojarski C, Günther U, Rieger K, et al. In vivo diagnosis of acute intestinal graft-versus-host disease by confocal endomicroscopy. *Endoscopy.* 2009;41(5):433-438.
32. Kiesslich R, Hoffman A, Goetz M, et al. In vivo diagnosis of collagenous colitis by confocal endomicroscopy. *Gut.* 2006;55(4):591-592.
33. Kiesslich R, Goetz M, Burg J, et al. Diagnosing Helicobacter pylori in vivo by confocal laser endoscopy. *Gastroenterology.* 2005;128(7):2119-2123.
34. Hlavaty T, Huorka M, Koller T, et al. Colorectal cancer screening in patients with ulcerative and crohn's colitis with use of colonoscopy, chromoendoscopy and confocal endomicroscopy. *Eur J Gastroenterol Hepatol.* 2011;23(8):680-689.
35. Hsiung P-L, Hardy J, et al. Detection of colonic dysplasia in vivo using a targeted heptapeptide and confocal microendoscopy. *Nat. Med.* 2008;14(4):454-458
36. Goetz M, Ziebart A, Foersch S, et al. In vivo molecular imaging of colorectal cancer with confocal endomicroscopy by targeting epidermal growth factor receptor. *Gastroenterology.* 2010;138(2):435-446.
37. Goetz M, Ansems JV, Galle PR, Schuchmann M, Kiesslich R. In vivo real time imaging of the liver with confocal endomicroscopy permits visualization of the temporospatial patterns of hepatocyte apoptosis. *American Journal of Physiology. Gastrointestinal and Liver Physiology.* 2011.

38. Li C-Q, Xie X-J, Yu T, et al. Classification of inflammation activity in ulcerative colitis by confocal laser endomicroscopy. *Am. J. Gastroenterol.* 2010;105(6):1391-1396.
39. Kudo S, Hirota S, Nakajima T, et al. Colorectal tumours and pit pattern. *J. Clin. Pathol.* 1994;47(10):880-885.
40. Huang Q, Fukami N, Kashida H, et al. Interobserver and intra-observer consistency in the endoscopic assessment of colonic pit patterns. *Gastrointest. Endosc.* 2004;60(4):520-526.
41. Takemura Y, Yoshida S, Tanaka S, et al. Quantitative analysis and development of a computer-aided system for identification of regular pit patterns of colorectal lesions. *Gastrointest. Endosc.* 2010;72(5):1047-1051.
42. Amasheh M, Grotjohann I, Amasheh S, et al. Regulation of mucosal structure and barrier function in rat colon exposed to tumor necrosis factor alpha and interferon gamma in vitro: a novel model for studying the pathomechanisms of inflammatory bowel disease cytokines. *Scand. J. Gastroenterol.* 2009;44(10):1226-1235.
43. Endoscopie digestive basse : indications en dehors du dépistage en population. HAS 2004.
44. Camilleri M, Gorman H. Intestinal permeability and irritable bowel syndrome. *Neurogastroenterol. Motil.* 2007;19(7):545-552.
45. Becker V, van den Broek FJ, Buchner AM, et al. Optimal fluorescein dose for intravenous application in miniprobe-based confocal laser scanning microscopy in pigs. *J Biophotonics.* 2011;4(1-2):108-113.
46. Becker V, von Delius S, Bajbouj M, et al. Intravenous application of fluorescein for confocal laser scanning microscopy: evaluation of contrast dynamics and image quality with increasing injection-to-imaging time. *Gastrointest. Endosc.* 2008;68(2):319-323.
47. Wallace MB, Meining A, Canto MI, et al. The safety of intravenous fluorescein for confocal laser endomicroscopy in the gastrointestinal tract. *Aliment. Pharmacol. Ther.* 2010;31(5):548-552.

48. Kudo S, Tamura S, Nakajima T, et al. Diagnosis of colorectal tumorous lesions by magnifying endoscopy. *Gastrointest. Endosc.* 1996;44(1):8-14.
49. Nakamura F. Biochemical, electron microscopic and immunohistological observations of cationic detergent-extracted cells: detection and improved preservation of microextensions and ultramicroextensions. *BMC Cell Biol.* 2001;2:10.
50. Regueiro M, Kip KE, Schraut W, et al. Crohn's disease activity index does not correlate with endoscopic recurrence one year after ileocolonic resection. *Inflamm. Bowel Dis.* 2011;17(1):118-126.
51. Rutgeerts P, Geboes K, Vantrappen G, et al. Predictability of the postoperative course of Crohn's disease. *Gastroenterology.* 1990;99(4):956-963.
52. Baert F, Moortgat L, Van Assche G, et al. Mucosal healing predicts sustained clinical remission in patients with early-stage Crohn's disease. *Gastroenterology.* 2010;138(2):463-468; quiz e10-11.
53. Nishio Y, Ando T, Maeda O, et al. Pit patterns in rectal mucosa assessed by magnifying colonoscopy are predictive of relapse in patients with quiescent ulcerative colitis. *Gut.* 2006;55(12):1768-1773.
54. D'haens G, Van Deventer S, Van Hogezaand R, et al. Endoscopic and histological healing with infliximab anti-tumor necrosis factor antibodies in Crohn's disease: A European multicenter trial. *Gastroenterology.* 1999;116(5):1029-1034.
55. Ravnic DJ, Konerding MA, Huss HT, et al. Murine microvideo endoscopy of the colonic microcirculation. *J. Surg. Res.* 2007;142(1):97-103.
56. Deban L, Correale C, Vetrano S, Malesci A, Danese S. Multiple pathogenic roles of microvasculature in inflammatory bowel disease: a Jack of all trades. *Am. J. Pathol.* 2008;172(6):1457-1466.

57. De Conto C, Oevermann A, Burgener IA, Doherr MG, Blum JW. Gastrointestinal tract mucosal histomorphometry and epithelial cell proliferation and apoptosis in neonatal and adult dogs. *J. Anim. Sci.* 2010;88(7):2255-2264.
58. Cosnes J. Tobacco and IBD: relevance in the understanding of disease mechanisms and clinical practice. *Best Pract Res Clin Gastroenterol.* 2004;18(3):481-496.
59. Kiesslich R, Goetz M, Lammersdorf K, et al. Chromoscopy-guided endomicroscopy increases the diagnostic yield of intraepithelial neoplasia in ulcerative colitis. *Gastroenterology.* 2007;132(3):874-882.
60. Ficsor L, Varga VS, Tagscherer A, Tulassay Z, Molnar B. Automated classification of inflammation in colon histological sections based on digital microscopy and advanced image analysis. *Cytometry A.* 2008;73(3):230-237

**Annexe 1 : SES-CD (D'après Daperno *et al.*)**

Variable	Simple Endoscopic Score for Crohn's Disease values			
	0	1	2	3
Size of ulcers	None	Aphthous ulcers ( $\varnothing$ 0.1 to 0.5 cm)	Large ulcers ( $\varnothing$ 0.5 to 2 cm)	Very large ulcers ( $\varnothing$ >2 cm)
Ulcerated surface	None	<10%	10-30%	>30%
Affected surface	Unaffected segment	<50%	50-75%	>75%
Presence of narrowings	None	Single, can be passed	Multiple, can be passed	Cannot be passed

$\varnothing$ , Diameter.





**Annexe 3 : Questionnaire colopathie fonctionnelle Rome III**

IBS Module		
1. In the last 3 months, how often did you have discomfort or pain anywhere in your abdomen?	<input type="radio"/> Never → <input type="radio"/> Less than one day a month <input type="radio"/> One day a month <input type="radio"/> Two to three days a month <input type="radio"/> One day a week <input type="radio"/> More than one day a week <input type="radio"/> Every day	<i>Skip remaining questions</i>
2. For women: Did this discomfort or pain occur only during your menstrual bleeding and not at other times?	<input type="radio"/> No <input type="radio"/> Yes <input type="radio"/> Does not apply because I have had the change in life (menopause) or I am a male	
3. Have you had this discomfort or pain 6 months or longer?	<input type="radio"/> No <input type="radio"/> Yes	
4. How often did this discomfort or pain get better or stop after you had a bowel movement?	<input type="radio"/> Never or rarely <input type="radio"/> Sometimes <input type="radio"/> Often <input type="radio"/> Most of the time <input type="radio"/> Always	
5. When this discomfort or pain started, did you have more frequent bowel movements?	<input type="radio"/> Never or rarely <input type="radio"/> Sometimes <input type="radio"/> Often <input type="radio"/> Most of the time <input type="radio"/> Always	
6. When this discomfort or pain started, did you have less frequent bowel movements?	<input type="radio"/> Never or rarely <input type="radio"/> Sometimes <input type="radio"/> Often <input type="radio"/> Most of the time <input type="radio"/> Always	
7. When this discomfort or pain started, were your stools (bowel movements) looser?	<input type="radio"/> Never or rarely <input type="radio"/> Sometimes <input type="radio"/> Often <input type="radio"/> Most of the time <input type="radio"/> Always	
8. When this discomfort or pain started, how often did you have harder stools?	<input type="radio"/> Never or rarely <input type="radio"/> Sometimes <input type="radio"/> Often <input type="radio"/> Most of the time <input type="radio"/> Always	
9. In the last 3 months, how often did you have hard or lumpy stools?	<input type="radio"/> Never or rarely <input type="radio"/> Sometimes <input type="radio"/> Often <input type="radio"/> Most of the time <input type="radio"/> Always	Alternative scale: <input type="radio"/> Never or rarely <input type="radio"/> About 25% of the time <input type="radio"/> About 50% of the time <input type="radio"/> About 75% of the time <input type="radio"/> Always, 100% of the time
10. In the last 3 months, how often did you have loose, mushy or watery stools?	<input type="radio"/> Never or rarely <input type="radio"/> Sometimes <input type="radio"/> Often <input type="radio"/> Most of the time <input type="radio"/> Always	Alternative scale: <input type="radio"/> Never or rarely <input type="radio"/> About 25% of the time <input type="radio"/> About 50% of the time <input type="radio"/> About 75% of the time <input type="radio"/> Always, 100% of the time

## **C1. Irritable Bowel Syndrome**

### **Diagnostic Criteria\***

Recurrent abdominal pain or discomfort\*\* at least 3 days/month in last 3 months associated with two or more of criteria #1 - #3 below:

*Pain or discomfort at least 2-3 days/month (question 1>2)*

*For women, does pain occur only during menstrual bleeding? (question 2=0 or 2)*

1. Improvement with defecation

*Pain or discomfort gets better after BM at least sometimes (question 4>0)*

2. Onset associated with a change in frequency of stool

*Onset of pain or discomfort associated with more stools at least sometimes (question 5>0), OR*

*Onset of pain or discomfort associated with fewer stools at least sometimes (question 6>0)*

3. Onset associated with a change in form (appearance) of stool

*Onset of pain or discomfort associated with looser stools at least sometimes (question 7>0), OR*

*Onset of pain or discomfort associated with harder stools at least sometimes (question 8>0)*

\* Criteria fulfilled for the last 3 months with symptom onset at least 6 months prior to diagnosis

*Yes. (question 3=1)*

\*\*"Discomfort" means an uncomfortable sensation not described as pain.

*In pathophysiology research and clinical trials, a pain/discomfort frequency of at least two days a week is recommended for subject eligibility.*

*Pain or discomfort more than one day per week (question 1>4)*

### **Criteria for IBS-C**

*(question 9>0) and (question 10=0)*

### **Criteria for IBS-D**

*(question 9=0) and (question 10>0)*

### **Criteria for IBS-M**

*(question 9>0) and (question 10>0)*

### **Criteria for IBS-U**

*(question 9=0) and (question 10=0)*

**Titre de Thèse** : L'endomicroscopie confocale : une nouvelle méthode d'analyse quantitative des cryptes coliques de patients sains ou atteints de maladie de Crohn.

---

## RESUME

**Contexte** : L'endomicroscopie confocale utilise des critères subjectifs, qualitatifs pour décrire les anomalies inflammatoires de la muqueuse digestive.

**Objectifs** : Evaluer la faisabilité d'une étude quantitative architecturale des cryptes coliques et fonctionnelle de perméabilité de la muqueuse colique par endomicroscopie et comparer les résultats obtenus entre témoins sains et patients atteints de maladie de Crohn (MC).

**Patients et méthodes** : 10 patients atteints de MC et 6 témoins sains ont été inclus. 15 images par patients ont été sélectionnées pour la réalisation de mesures architecturales (Rapport de diamètre maximal et minimal des cryptes, nommé DMc/dmc, et de la lumière des cryptes, nommé DMI/dml, distance intercrypte, diamètre vasculaire) et fonctionnelle (rapport d'intensité de fluorescence, RIF). Les mesures architecturales des cryptes étaient comparées à des mesures réalisées sur biopsies marquées au bleu de méthylène (BMBM).

**Résultats** : Il existait une corrélation significative entre les DMI/dml et les DMc/dmc mesurés endomicroscopiquement et ceux mesurés sur BMBM ( $r=0,67$ ;  $p=0,006$  /  $r=0,65$ ;  $p=0,009$  respectivement). Les patients atteints de MC présentaient un DMI/dml significativement plus grand ( $p=0,016$ ). Individuellement, 50% des patients en rémission endoscopique avaient un DMI/dml anormal par rapport à la médiane des témoins. Les mesures de distance intercrypte ne différaient pas entre les groupes. Les diamètres vasculaires étaient plus petits chez les patients avec inflammation endoscopique ( $p=0,02$ ). Les RIF étaient plus importants chez les patients avec inflammation endoscopique mais de façon non significative.

**Conclusion** : Un rapport DMI/dml supérieur à 1,7 semblerait être un bon marqueur d'inflammation colique mais doit être validé sur de plus grandes cohortes. Le développement de mesures automatisées et de l'étude fonctionnelle sont probablement à développer en endomicroscopie.

---

## MOTS-CLES

**Endomicroscopie, Maladie de Crohn, Crypte, Perméabilité**