

REVUE GÉNÉRALE

# LA MICROSCOPIE CONFOCALE APPLIQUÉE A L'ENDOSCOPIE THORACIQUE

*Probe based confocal laser endomicroscopy in thoracic endoscopy*

O. Bonhomme<sup>1</sup>, V. Heinen, R. Louis, J.-L. Corhay, B. Duysinx

*Pneumologues, CHU de Liège, 4000 Liège, Belgique*

**KEYWORDS:** *Microscopie confocale, Bronchoscopie, Thoracoscopie, Endosonographie, Confocal microscopy, Bronchoscopy, Thoracoscopy, Echo-endoscopy*

**Introduction.** — *La microscopie confocale laser endoscopique (pCLE) est une technologie récente d'imagerie endoscopique par mini sondes. Ces dernières peuvent être utilisées au travers du canal opérateur des endoscopes thoraciques. Une fois appliquée sur le tissu d'intérêt, elles permettent son étude à un niveau microscopique, en directe et de manière dynamique.*

**État de l'art.** — *Pour l'essentiel, dans le cadre de la pathologie pleuropulmonaire maligne, cette technique démontre son intérêt potentiel dans l'orientation des prélèvements biopsiques plus que dans le diagnostic histologique à proprement parler. Cela dit, ces résultats doivent être validés contre les procédures standards actuelles. Dans le cadre des pathologies interstitielles, les informations fournies par la technique semblent complémentaires des autres données (histologiques, biologiques, cliniques, radiologiques. . .). Son utilisation dans ce cadre doit néanmoins être validée lors d'études prospectives randomisées.*

**Perspectives et conclusion.** — *La pCLE permet par ailleurs l'évaluation des rapports anatomo-fonctionnels des structures pulmonaires notamment dans le cadre des maladies bronchiques obstructives. Des données récentes démontrent son intérêt potentiel dans le rejet cellulaire aigu de greffe pulmonaire. Les perspectives futures résident en la validation de ces résultats contre les techniques de référence actuellement disponibles. L'utilisation de fluorophores spécifiques de*

<sup>1</sup> \* Auteur correspondant : CHU-NDB, rue de Gaillarmont n° 600, 4030 Chênée, Belgique.

Adresse e-mail : [obonhomme@chuliege.be](mailto:obonhomme@chuliege.be) (O. Bonhomme).

*cibles moléculaires ouvre le champ de l'imagerie moléculaire optique endoscopique.*

**Introduction.** - Probe based confocal laser endomicroscopy (pCLE) is a new endoscopic imaging technology. It uses mini probes which can be introduced through the working channels of endoscopes. Whenever applied on the tissue of interest, they allow imaging of tissue at a cellular level.

**State of art.** - In the field of pleuropulmonary malignancies, pCLE showed mostly its ability to guide biopsies samplings. Those results need to be validated in larger prospective studies. In interstitial lung diseases, pCLE provides information complementary to other clinical and paraclinical data. The valuability of these informations need to be investigated further, prospectively in randomized trials. In obstructive pulmonary diseases, pCLE is able to investigate the structural and functional relationships between pulmonary structures. pCLE showed good ability in the identification of acute cellular rejection after lung transplantation.

**Perspectives and conclusion.** - For the time being, pCLE is not part of routine clinical practice. The data available need to be validated in larger randomized prospective trials, before it can be recommended as a guiding tool for biopsies or as a diagnostic tool for pathologic process. New fluorophores are now available. They are specific of some molecular sequences, allowing the enhancement of specific targets within the sample studied.

## Introduction

La microscopie confocale laser endoscopique par mini sonde (pCLE) est une technologie récente d'imagerie endoscopique. Elle emploie une mini sonde LASER composée de fibres optiques. Le faisceau LASER entraîne une excitation de certaines molécules au sein du tissu cible. Il en résulte l'émission d'une lumière fluorescente qui peut ensuite être analysée. Elle permet d'étudier les tissus in vivo, en directe, de manière dynamique (12 images/secondes) et à un niveau microscopique. Il peut arriver que le tissu étudié ne soit pas doté d'autofluorescence. Il est alors possible d'administrer un fluorophore topique ou systémique. L'image obtenue dépendra alors de la distribution de ce fluorophore au sein du tissu cible.

À titre d'exemple, la sonde Alvéoflex®, utilisée régulièrement dans le cadre de l'étude du parenchyme pulmonaire, possède une aire d'analyse de 1,13mm<sup>2</sup>, un plan confocal situé entre 0 et 50 µm par rapport à la surface de la sonde et une résolution latérale de 3µm. Elle mesure 1,2 mm de diamètre. Cette sonde émet un faisceau LASER dont la longueur d'onde est de 488nm (Cellvizio®, Mauna Kea Technologies® Paris, France). À cette longueur d'onde, au sein du système respiratoire, seules les fibres d'élastines émettent une lumière d'autofluorescence [1].

Ces fibres d'élastines sont localisées au sein du tissu conjonctif de l'arbre respiratoire : membrane basale de l'épithélium bronchique et bronchiolaire, la paroi des vaisseaux pulmonaires et l'interstitium péri alvéolaire. L'application de bleu de méthylène de façon topique, de distribution intracellulaire, permet de visualiser les cellules épithéliales de la muqueuse bronchique, pour autant que la sonde choisie émette un LASER à 660nm de longueur d'onde [2]. Réaliser une endoscopie confocale impose donc de sélectionner la sonde adéquate, selon le tissu que l'on souhaite étudier ainsi que de sélectionner un fluorophore adapté à l'étude que l'on souhaite mener, s'il est nécessaire. Le Tableau 1 reprend les différents fluorophores qui ont déjà été employés dans le domaine de la pneumologie.

Cet article de revue propose de résumer les données scientifiques actuellement disponibles au sujet de la microscopie confocale endoscopique appliquée au domaine de la pneumologie. Ces données sont résumées dans le Tableau 2. Le Tableau 3 décrit les différentes sondes de pCLE actuellement disponibles.

## État des connaissances de la microscopie confocale endoscopique en pathologie pleuropulmonaire

### LES MALADIES BRONCHIQUES OBSTRUCTIVES

L'étude des pathologies bronchiques obstructives suppose l'étude de la structure de l'arbre bronchique et des bronchioles. À ce titre, les fibres d'élastines situées dans le tissu conjonctif sous-épithélial sont dotées d'auto-fluorescence. Les structures histologiques bronchiques situées plus profondément dans la paroi (muscleuse, cartilage) ne sont pas accessibles à la pCLE.

L'étude de l'arbre respiratoire a démontré essentiellement 5 organisations différentes des fibres d'élastine selon que l'étude intéresse les bronches proximales ou les bronches et bronchioles distales. Cette organisation peut prendre, au sein de la trachée et des troncs principaux la forme d'un ensemble de fibres denses, compactes et épaisses, unidirectionnelles et orientées selon l'axe longitudinal de l'arbre bronchique (organisation lamellaire). Ces dernières peuvent être croisées perpendiculairement par des fibres plus minces. Elles prennent ensuite un aspect de fibres moins épaisses, moins dense et plus lâche, entrecroisées, parfois en toile d'araignée, au sein des bronches de plus petit calibre. Les bronchioles respiratoires démontrent une architecture en fibres élastiques typiquement hélicoïdale, en lien avec l'orientation axiale du tissu conjonctif sous-épithélial et péri alvéolaire à ce niveau [2].

**Tableau 1** Les fluorophores utilisés en microscopie confocale endoscopique dans le domaine de la pneumologie.

Fluorophore	Longueur d'onde utilisée pour induire une fluorescence	Distribution au sein du système respiratoire	Applications déjà évaluées
Fluorescéine	488 nm	Intravasculaire et interstitium	— Arbre bronchique, parenchyme pulmonaire, plèvre — Pathologie tumorale endobronchique ou médiastinale — Nodule pulmonaire solitaire
Acridavine	488 nm	Intracellulaire et intranucléaire au sein des cellules épithéliales bronchiques	Tumeurs endobronchiques
Bleu de méthylène	660 nm	D. intracellulaire au sein des cellules épithéliales	Nodule pulmonaire solitaire
Pafolacianine (analogue du folate conjugué à un fluorophore)	774—776 nm	Fixation au $\alpha$ récepteur au folate (surface des cellules tumorales)	Nodule pulmonaire solitaire (ex vivo)

Dans l'asthme, peu de données sont actuellement disponibles. Une petite étude portant sur 16 patients (8 asthmatiques et 8 contrôles sains) décrivait une organisation semblable à celle exposée ci-dessus et similaire entre patients asthmatiques et contrôles. L'organisation lamellaire et l'organisation plus lâche de type « mixte » étaient cependant corrélées à un volume expiré maximal en une seconde (VEMS) plus faible tant chez les asthmatiques que chez les patients sains, contrairement à l'organisation moins dense et entremêlée de fibres plus minces [3].

Dans la bronchopneumopathie chronique obstructive (BPCO), l'organisation anarchique de faible densité était plus fréquemment retrouvée chez les BPCO que chez les patients sains, qu'ils soient ou non-fumeurs, sans qu'il n'y ait de lien direct entre le type d'organisation des fibres d'élastine et les paramètres fonctionnels. Le diamètre des canaux alvéolaires était significativement plus élevé chez les patients BPCO. Ce paramètre était inversement corrélé au VEMS, au rapport de Tiffeneau et à la diffusion du CO [4,5]. De même, le diamètre des vaisseaux extra-alvéolaire était corrélé au coefficient KCO [5]. De plus, l'intensité de l'autofluorescence, au

niveau alvéolaire, évaluée par spectrométrie, était inférieure à celle retrouvée dans la population saine. Ces mesures en pCLE étaient corrélées aux mesures scanographiques des zones de faible atténuation des rayons X, retrouvés dans le cadre d'un emphysème. Sur le plan fonctionnel, la mesure de l'intensité de l'autofluorescence était corrélée au VEMS, à la DLCO et au rapport VR/CPT des patients étudiés [4].

## Pathologie maligne bronchopulmonaire et médiastinale

La plupart des publications concernant l'exploration des lésions bronchopulmonaires suspectes concernaient initialement l'étude de l'architecture des fibres d'élastine lorsque la sonde était appliquée à la surface des zones cibles [2,6—9]. Ces études ont permis de démontrer que les fibres d'élastine, au sein des zones tumorales, présentaient une architecture anarchique, désorganisée, étaient entremêlées, parfois organisées en mottes ou encore un aspect mité par la présence de cellules tumorales, gênant la transmission de l'autofluorescence et formant des ombres sur l'image acquise. Cette technique ne permettant pas de visualiser directement les cellules tumorales, non douées d'autofluorescence, la distinction entre les zones cancéreuses et non cancéreuses est rendue difficile. En effet, une étude prospective sur 25 patients rapportait son incapacité à distinguer les zones dysplasiques des zones tumorales [7].

Compte tenu de ces difficultés, certains auteurs ont proposé d'utiliser des agents fluorophores de distribution intracellulaire et intranucléaire. En 2013, une étude évaluant les lésions endobronchiques par l'application topique d'acriflavine, un fluorophore mettant en évidence les noyaux cellulaires démontrait que la pCLE permettait de distinguer le tissu tumoral du tissu sain ou encore inflammatoire/régénératif avec une sensibilité de 96 % et une spécificité de 87 % [8]. Plus récemment, Wijmans et al. publiaient les résultats de leur étude visant à appliquer la microscopie confocale avec injection de fluorescéine à l'étude des tumeurs bronchiques centrales et médiastinales accessibles à un examen d'échographie transœsophagienne (EUS) [10,11]. Lors de cette étude de faisabilité, 22 patients ont été inclus. La sonde de CLE était pré-chargée dans l'aiguille de 19G de ponction à EUS (*needle based confocal laser endomicroscopy* ou nCLE). Une fois la lésion repérée et ponctionnée, la sonde de microscopie confocale était avancée au sein de la lésion pour y repérer des signes de malignité et orienter les biopsies. La sonde était alors retirée et les biopsies/aspirations réalisées dans un second temps. Cette étude a permis d'identifier des critères spécifiques de lésions cancéreuses (cellules pléomorphes, des amas sombres et un courant unidirectionnel de fuite des éléments cellulaires lorsque la sonde est avancée dans la lésion). Ces critères ont permis d'identifier 90 % des lésions cancéreuses et

89 % des ganglions métastatiques. Aucun événement indésirable n'était à déplorer. Si cette étude démontre la faisabilité de la technique, il reste bien entendu à démontrer sa pertinence clinique en termes de rendement diagnostique par rapport à un examen standard réalisé sans nCLE.

## Exploration du nodule pulmonaire solitaire

En 2015, Hassan et al. publiaient les trois premiers cas de nodules pulmonaires solitaires (SPN) étudiés par pCLE. Le nodule était atteint à l'aide d'un système de navigation bronchoscopique (superDimension™). L'arrivée sur la cible était confirmée par l'utilisation d'une sonde d'échographie endobronchique radiaire (r-EBUS). La pCLE permettait ensuite d'étudier la structure en fibres d'élastine de la lésion. De plus, en appliquant du bleu de méthylène localement, de distribution intracellulaire et en utilisant une sonde de microscopie confocale de longueur d'onde de 660 nm, les auteurs ont pu identifier des cellules d'allures malignes permettant de cibler les biopsies à la pince réalisées ensuite [12]. Un an plus tard, la même équipe publiait une série prospective de 48 patients atteints de néoplasies pulmonaires évalués selon la même technique mais sans bleu de méthylène. L'étude en pCLE avait été possible pour tous les nodules. Différents phénotypes d'architecture élastique ont été décrits durant cette étude : le phénotype dense (fibres d'élastine entremêlées, denses et compactes) ; la distorsion alvéolaire (architecture alvéolo-interstitielle élastique intacte mais de forme et de taille modifiée) ; la destruction du réseau alvéolo-interstitiel (architecture alvéolo-interstitielle non reconnaissable) ; La densification du réseau alvéolo-interstitiel (majoration du nombre de fibres d'élastine sans atteindre le phénotype dense).

**Tableau 2** Résumé des connaissances scientifiques en matière de microscopie confocale endoscopique appliquée à la pathologie bronchopulmonaire et pleurale

Compartiment exploré	Description des caractéristiques de microscopie confocale	Perspectives
<b>Aspect normal</b>		
Arbre bronchique	Gros troncs : aspect dense et compact de fibres d'élastine organisées selon l'axe longitudinal Bronches : organisation plus lâche, moins dense. Fibres longitudinales croisées par d'autres fibres plus minces Bronchioles :	Évaluation de l'arbre bronchique, du compartiment alvéolaire et vasculaire de façon dynamique autorisant une évaluation anatomofonctionnelle

	<p>aspect en réseau de fibres entrecroisées, parfois aspect de toile d'araignée</p> <p>Bronchioles respiratoires : fibres d'élastine organisée selon un axe hélicoïdal</p>	
Canaux alvéolaires et alvéoles	<p>Diamètre des bouches alvéolaires : 283 <math>\mu\text{m}</math> (nf) et 274 <math>\mu\text{m}</math> (f)</p> <p>Épaisseur des fibres d'élastine : 10,4 <math>\mu\text{m}</math> (nf) et 9,7 <math>\mu\text{m}</math>(f)</p> <p>Diamètre des microvaisseaux : 89 <math>\mu\text{m}</math> (nf) et 95 <math>\mu\text{m}</math> (f)</p>	
<b>Asthme</b>		
Carène	<p>Organisation des fibres d'élastine non différente entre les asthmatiques et les patients sains mais corrélation négative entre le VEMS et les organisations lamellaires (unique ou mixte) par rapport à une organisation plus lâche et entremêlée</p>	<p>Évaluation anatomofonctionnelle et dynamique</p> <p>Étude de la distribution de récepteurs ou de pharmacétique endobronchique</p>
<b>BPCO et emphysème</b>		
Bronches	<p>Organisation anarchique et de faible densité des fibres d'élastine mais sans corrélation fonctionnelle</p>	<p>Évaluation anatomofonctionnelle et dynamique</p> <p>Étude de la distribution de récepteurs ou de pharmacétique endobronchique</p>
Bronchioles respiratoires et canaux alvéolaires	<p>Diamètre des canaux alvéolaires significativement plus élevés que chez patients sains. Corrélation inverse au VEMS, au rapport de</p>	

	<p>Tiffeneau et à la diffusion</p> <p>Diamètre des vaisseaux extra-alvéolaire corrélé au KCO</p> <p>Intensité de la fluorescence évaluée par spectrométrie corrélée au volume pulmonaire et à la surface des zones de faible atténuation de rayons X au scanner. Corrélation positive avec le VEMS et la DLCO</p>	
<b>Pathologie maligne</b>		
Bronches et médiastin (dont ganglions)	<p>Sans fluorescéine, les tumeurs endobronchiques sont identifiables sous la forme de fibres d'élastines entremêlées, désorganisées, en mottes. . .</p> <p>Avec fluorescéine et après ponction de la lésion suspecte, les signes de malignité sont : cellules pléomorphes, des agrégats cellulaires sombres ou une fuite des éléments cellulaire dans une direction déterminée lorsque la sonde est avancée dans la lésion</p>	<p>La pCLE et la nCLE pourraient améliorer la sensibilité et la valeur prédictive négative des prélèvements biopsiques des nodules pulmonaires périphériques et des lésions médiastinales</p> <p>Imagerie moléculaire optique : les cellules tumorales sont mises en évidence par un fluorophore spécifique les marquant spécifiquement. (étude positive mais ex vivo actuellement)</p>
Parenchyme pulmonaire : nodule pulmonaire	<p>Sans fluorophore : fibres d'élastine entremêlées, en mottes (similaires aux tumeurs endobronchiques et médiastinales)</p> <p>Avec fluorescéine et après ponction de la lésion à l'aiguille, les signes de malignités sont similaires aux tumeurs endobronchiques et</p>	

	médiastinales	
Plèvre	<p>pCLE avec fluorescéine durant procédure de biopsie (chirurgicales, radiologiques, thoracoscopie. . .) identifie des zones infiltrées par des cellules pléomorphes, élargies, des agrégats sombres : tumorales</p> <p>pCLE avec fluorescéine durant pleuroscopie médicale. Zones cancéreuses identifiées par une architecture tissulaire aberrante et des vaisseaux dysplasiques. Haute VPN du « full chia seed sign »</p>	<p>Amélioration potentielle de la sensibilité des techniques de biopsies pleurales</p> <p>Intérêt potentiel d'intégrer la pCLE à des techniques de biopsies non (moins) invasives que la thoracoscopie.</p> <p>Évaluation peropératoire des marges de résection ou de l'atteinte pleurale viscérale</p>
<b>Pneumopathies infiltrantes diffuses</b>		
Bronchioles respiratoires et canaux alvéolaires	<p>Les caractéristiques pCLE évoquant un processus fibrosant sont plus fréquemment retrouvées dans l'asbestose, la fibrose pulmonaire idiopathique et les connectivites (présence de fibres septales, bouches alvéolaires de petite taille, épaissement des fibres élastiques axiales, réseau élastique dense, rigide et/ou désorganisé)</p> <p>Les critères pCLE évoquant un processus inflammatoire sont : la présence d'un infiltrat cellulaire bronchiolaire et/ou alvéolaire. Ils sont plus fréquemment rencontrés dans la</p>	<p>Participation des données de pCLE à la discussion multidisciplinaire pour aboutir à un diagnostic</p> <p>Participation aux techniques de biopsies par cryosonde afin d'en améliorer le rendement et en réduire les complications</p>

	sarcoïdose, les pneumopathies d'hypersensibilité ainsi que les connectivites	
<b>Rejet cellulaire aigu après greffe de poumon</b>		
	La présence d'un infiltrat cellulaire alvéolaire ou péri vasculaire. L'augmentation de la fluorescence alvéolaire ou encore l'index vasculaire sont des signes de rejet cellulaire aigu post greffe de poumon	Augmenter la sensibilité des BTB pour le diagnostic de rejet cellulaire aigu Réduire le nombre de biopsies nécessaires Réduire le taux de complication des BTB
BTB : biopsies transbronchiques ; F : fumeur ; nf : non-fumeur ; nCLE : <i>needle based confocal laser endomicroscopy</i> ; pCLE : <i>probe based confocal laser endomicroscopy</i> ; VPN : valeur prédictive négative.		

Cette étude permettait également d'évaluer la cellularité alvéolaire et l'éventuelle présence de clusters cellulaires. La présence de vaisseaux était également répertoriée. Au total, 79,2 % des lésions cancéreuses ont été identifiées suite aux biopsies réalisées durant cette procédure [13]. Néanmoins, l'analyse des SPN en pCLE, sans application de fluorophore complémentaire ne permet en rien d'en prédire sa malignité. En effet, en 2016, une étude prospective portant sur 91 patients démontrait que les données pCLE n'apportaient pas de *plus-value* aux algorithmes de prise en charge des nodules pulmonaires solitaires se basant sur des données cliniques et d'imagerie médicales [14]. Plus récemment, Kramer et al. ont voulu pallier aux écueils de l'étude précitée par deux solutions [15]. Premièrement, en utilisant un fluorophore (la fluorescéine) et deuxièmement en ponctionnant le nodule pulmonaire cible par une aiguille de 18G, selon la procédure de nLCE décrite plus haut. La lésion était préalablement repérée par une sonde de r-EBUS et guidage fluoroscopique. Vingt-six patients ont été inclus dans cette étude. Plusieurs ponctions étaient réalisées selon la même technique. Des images de bonne qualité étaient disponibles pour 24 patients sur les 26 (deux patients exclus de l'analyse pour ce motif). Vingt-deux cancers ont été identifiés sur les 23 qui étaient présents. Un patient souffrait de pneumonie organisée. Un faux négatif est à déplorer pour la CLE. Deux faux négatifs sont à déplorer pour l'analyse cytologique alors que les images de microscopie confocale confirmaient la suspicion de malignité. En décembre 2022, la même équipe publiait les résultats d'une étude construite de manière similaire mais qui employait, de plus, la navigation bronchoscopique robotisée, comme

guidage jusqu'au SPN. Vingt patients ont été inclus. Le diamètre médian des nodules était de 14mm (8—28 mm). L'objectif principal était de déterminer la faisabilité et la sécurité de la technique et secondairement, de déterminer dans quelles proportions l'aiguille de ponction transbronchique devait être réajustée selon les données de repérages fournies par la nCLE. La procédure est faisable en sécurité. Un diagnostic a pu être proposé à 16 patients/20 au terme de la procédure combinée (3 patients non diagnostiqués se sont avérés cancéreux suite à d'autres techniques de prélèvement. Un patient n'a pas de diagnostic final). Chez 9 patients sur 20, l'acquisition nCLE indiquait un mauvais positionnement de l'aiguille qui a pu être repositionnée avec détection du nodule chez 8 patients sur 9 dans un second temps. Au total, la nCLE a pu confirmer le bon positionnement de l'aiguille dans 95 % des cas. La distinction entre les images de nCLE démontrant du parenchyme pulmonaire, de l'arbre bronchique ou des cellules malignes pouvait se réaliser avec une sensibilité et une spécificité de 91,9 % en combinant les interprétations de 5 évaluateurs [16].

**Tableau 3 :** Les sondes de microscopie confocale actuellement disponibles et leurs caractéristiques optiques.

Nom de la sonde	Canal opérateur minimal compatible	longueur	Utilisations maximales	Largeur de champ	Résolution	Profondeur de champ
GaStroFlex	≥ 2,8 mm	3 m	20	∅ 240 µm	1 µm	55 à 65 µm
AlveoFlex	≥ 1,9 mm	3 m	20	∅ 600 µm	3,25 µm	0 à 50 µm
CholangioFlex	≥ 10 mm	4 m	10	∅ 325 µm	3,25 µm	40 à 70 µm
AQ-Flex	≥ 0,91 mm (19G)	4 m	10	∅ 325 µm	3,25 µm	40 à 70 µm
CelioFlex UHD5	≥ 5 mm	3 m	20	∅ 240 µm	1 µm	55 à 65 µm
ColoFlex UHD	≥ 2,8 mm	4 m	20	∅ 240 µm	1 µm	55 à 65 µm
UroFLex	≥ 1 mm (3 fr)	3 m	10	∅ 325 µm	3,25 µm	40 à 70 µm
CystoFlex UHD	≥ 2,8 mm (8,4 fr)	2 m	20	∅ 240 µm	1 µm	55 à 65 µm

À l'heure actuelle, la plupart des biopsies de nodules pulmonaires solitaires sont réalisées par voie transthoracique, sous contrôle scanographique avec un rendement diagnostique > 90 %

[17]. Cette technique expose cela dit les patients aux complications hémorragiques et aux pneumothorax qui ont été décrits jusque dans 16 et 26 % des cas, respectivement [17]. Le développement de l'échoendoscopie radiaire, associée ou non aux techniques de navigations bronchoscopiques est grevée de moindre complications (5 % de pneumothorax et 1 % d'hémoptysies) mais d'un rendement diagnostique inférieur, dépendant de la taille du nodule en question et du système d'orientation ou de navigation employé [18]. Une méta analyse récente concluait que les techniques de navigation endobronchiques virtuelles combinées à l'échoendoscopie radiaire était probablement préférable au scanner sur les lésions > 2cm. En effet, dans ces circonstances, le rendement diagnostique est de 81 % avec un profil d'événement indésirable que l'on connaît meilleur à celui des biopsies sous scanner [17]. Le rendement diagnostique est donc encore perfectible. Par ailleurs, la valeur prédictive négative de telles biopsies n'est que de 56 % pour l'échographie endoscopique radiaire seule, et de 75 % pour la navigation bronchoscopique combinée à l'échographie radiaire endobronchique [18]. Dans ces circonstances, toute biopsie négative doit être interprétée avec précaution. Dans le cadre de la nCLE, la sonde de microscopie confocale se situe à l'intérieure même de l'aiguille creuse à cytoponction. Elle permet dès lors de contrôler que le tissu ponctionné correspond bel et bien au tissu cible préalablement aux prélèvements proprement dit. Cela distingue clairement la technique de l'EBUS radiaire qui, elle, doit être ôtée du canal opérateur afin de pouvoir y insérer la pince à biopsies. Il n'y a donc pas de contrôle direct du tissu ponctionné/biopsié. L'étude récente de Manley et al. indique que malgré les techniques de repérage et de navigation actuelles (navigation bronchoscopique robotisée et repérage lésionnel par r-EBUS), la nCLE permet de réorienter l'aiguille à biopsie dans 45 % des cas. Ces résultats doivent bien entendu être validés dans une cohorte plus importante de patient lors d'un essai randomisé contrôlé comparant la nCLE aux techniques standards actuelles : la biopsie transthoracique sous scanner ou la bronchoscopie avec rEBUS et navigation endoscopique et biopsies transbronchiques.

De manière très élégante, Kennedy et al. ont récemment publié leurs résultats d'étude ex vivo de nodules pulmonaires solitaires au sein de pièces opératoires. Ces nodules étaient préalablement marqués par l'administration intraveineuse (24 h préopératoire) d'un fluorophore exogène se fixant aux récepteurs au folate, surexprimés par les cellules tumorales (pafolacianine). En microscopie confocale, les cellules tumorales marquées apparaissent alors comme des taches extrêmement lumineuses. En postopératoire, le nodule était biopsié à l'aide d'une nCLE. Les séquences de microscopie confocale étaient ensuite comparées aux résultats biopsiques. Les tissus « sains » alentours étaient eux aussi étudiés et biopsiés (en guise de contrôle) par cette nCLE. Au total, 90 séquences microscopiques et leurs biopsies correspondantes ont été analysées pour 39 sites étudiés (18 zones normales et 21 zones

tumorales). La technique a permis d'identifier des cellules tumorales au sein des nodules pulmonaires solitaires et de les distinguer du parenchyme pulmonaire « sain » avec une sensibilité et une spécificité de respectivement 98 et 97 %. De plus, l'accord interobservateur était excellent ( $\kappa = 0,95$ ) [19]. Il s'agit là d'un exemple d'imagerie moléculaire optique.

## La pathologie pleurale maligne

Dans le cadre de l'exploration de la pathologie maligne, la thoracoscopie demeure l'examen de référence [20—23]. Elle est cela dit relativement invasive et loin d'être accessible et pratiquée par tous les centres de pneumologie. Par ailleurs, les techniques d'explorations moins invasives tels que : la thoracocentèse ou les biopsies pleurales à l'aiguille d'Abrams n'ont qu'une faible sensibilité pour le diagnostic de pathologie maligne (sensibilité de 60 % pour les ponctions pleurales répétées) [23,24]. Dès lors, il existe une place pour le développement de techniques moins invasives ayant un meilleur rendement.

En 2018, une équipe allemande publiait que la pCLE appliquée au liquide pleural et comparée à la cytologie standard permettait d'identifier les pleurésies cancéreuses avec une sensibilité de 87 % et une spécificité de 100 % [25].

En 2019, notre équipe publiait les trois premiers patients qui avaient pu bénéficier d'une exploration de la cavité pleurale par pCLE et administration systémique de fluorescéine durant un examen de pleuroscopie médicale [26].

La même année, une équipe hollandaise rapportait une série de 15 patients (20 procédures) [27] chez lesquels ils évaluaient la capacité de la CLE + fluorescéine à identifier les zones suspectes de malignité par rapport aux structures pleurales normales. Dans cette étude, la sonde de microscopie confocale était soit intégrée à une aiguille de biopsie transthoracique ( $n = 12$ ) guidée par scanner ou échographie (nCLE), soit la plèvre était ponctionnée (nCLE) durant une procédure de biopsie chirurgicale par thoracotomie ( $n = 3$ ), soit intégrée à une aiguille de biopsie transœsophagienne échoguidée (EUS, nCLE) ( $n = 1$ ). Lors des thoracoscopies, les zones étudiées étaient d'abord abordées en surface (pCLE) puis ponctionnées (nCLE) ( $n = 4$ ). Cette étude démontrait que la CLE avait la capacité de discriminer les zones cancéreuses des zones bénignes et qu'elle pouvait, dès lors, aider à guider les biopsies et à en améliorer le rendement diagnostique, en particulier, en présence d'une suspicion de mésothéliome. Cela reste bien entendu à démontrer dans un essai dédié, randomisé et contrôlé.

En 2021, notre équipe publiait une série prospective de 62 patients référés pour la réalisation d'une thoracoscopie médicale, toute indication confondue [28]. Ces 62 patients ont bénéficié d'une étude de la cavité pleurale à l'aide de la sonde de pCLE Alvéoflex après administration de fluorescéine intraveineuse 5 minutes avant le début de la procédure. Cette étude a permis de

décrire avec précision les caractéristiques de la plèvre bénigne et celles de la plèvre maligne. De plus, elle a identifié 4 critères discriminant envers les plèvres bénignes (*full chia seed sign*, homogénéité de forme des cellules) et malignes (architecture tissulaire aberrante, présence de vaisseaux dysplasiques). La présence de cellules mésothéliales sur l'ensemble du champ d'analyse (*full chia seed sign*) avait une sensibilité et une spécificité de respectivement 36 et 100 % pour l'identification des plèvres bénignes. La présence d'une architecture tissulaire aberrante avait une sensibilité de 100 % et une spécificité de 72 % pour l'identification des plèvres malignes. Cette technologie pourrait aider à orienter les biopsies pleurales réalisées en thoroscopie. En effet, les zones à biopsier ne sont pas toujours identifiables lors de l'examen de la plèvre pariétale à la lumière froide [29—31]. L'utilisation de la pCLE pour examen de la plèvre durant une thoracocentèse, en vue d'en accroître la sensibilité est en cours d'évaluation dans notre centre. À titre d'exemple, la Fig. 1 reprend une illustration de la plèvre normale et d'une carcinomatose pleurale métastatique.

La même année, Sawada et al. démontraient que la pCLE (Alvéoflex, sans fluorophore) lorsque utilisée en peropératoire d'une chirurgie du cancer du poumon, permettait d'identifier un envahissement de la plèvre viscérale [32]. En effet, la plèvre viscérale est constituée, en partie de fibres d'élastine, auto fluorescente. L'envahissement de la plèvre par des cellules tumorales entrave cette autofluorescence. Dans cette étude, l'absence de détection de structure auto fluorescente sur  $\geq 50$  % du champ d'analyse, lorsque la sonde était appliquée sur la plèvre viscérale du site tumoral, était interprétée comme un signe d'infiltration de la plèvre viscérale. Dans leur série de validation de 15 patients (3 avec envahissement pleural viscéral [PL1] et 12 sans envahissement pleural ([PL0]), cette technique permettait d'identifier les envahissements de la plèvre viscérale avec une sensibilité de 100 % et une spécificité de 83 %.

Bien qu'il y ait actuellement des arguments montrant que la pCLE peut identifier et discriminer les plèvres bénignes et malignes avec une bonne sensibilité et spécificité, la place qu'elle pourrait occuper dans les années à venir, comme outil de diagnostic ou de guide aux prélèvements histologiques, reste à déterminer.

## Les pneumopathies infiltrantes diffuses

La pCLE est capable d'étudier la structure des fibres d'élastine de l'arbre trachéobronchique et du compartiment alvéolaire. De plus, elle visualise la présence de macrophages alvéolaires chez les patients tabagiques. Certains auteurs ont dès lors, souhaité évaluer l'intérêt de la pCLE dans le cadre des pneumopathies infiltrantes diffuses (PID).

Les premières données étaient constituées de *case report* ou de série de très faible nombre et concernaient la protéinose alvéolaire, certaines pneumopathies infectieuses (aspergillose,

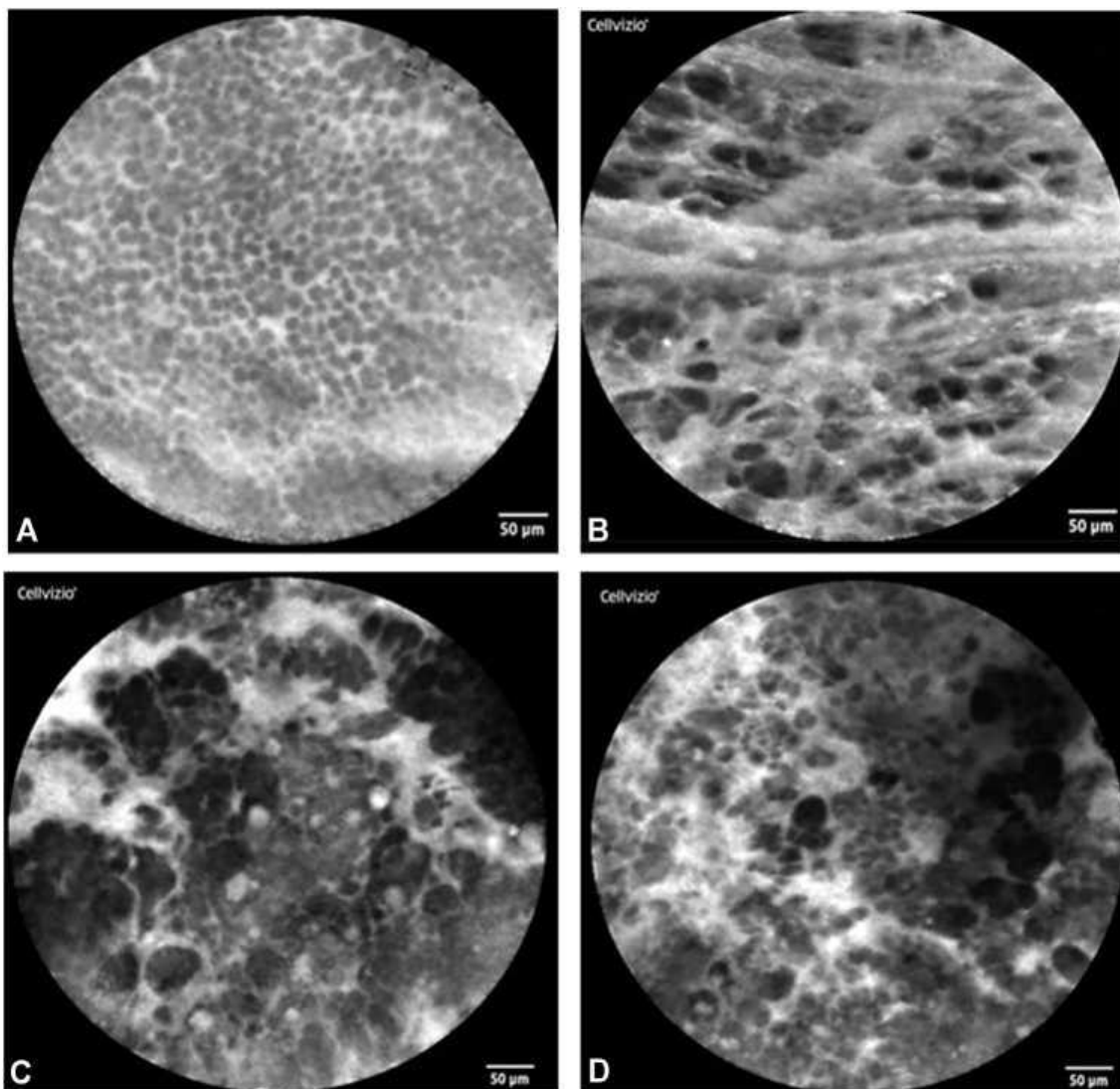
pneumocystose), la lymphangioliomyomatose. . . [33—36].

En 2016, Meng et al. ont proposé la première évaluation prospective de pCLE dans le cadre de PID [37]. L'objectif de l'étude était de corrélérer les données de pCLE à celles du scanner et du diagnostic final retenu en concertation multidisciplinaire. Six caractéristiques pCLE ont été déterminées et évaluées de manière prospective : normal, augmentation du nombre de fibres, des fibres densément regroupées, hypercellularité, fibres épaissies, autre/non spécifique. Vingt-sept patients furent inclus dont 16 avec une pneumopathie chronique fibrosante et 11 avec une autre PID (Pneumopathie organisée cryptogénique (COP), bronchiolite, sarcoïdose, infections. . .).

Chez ces patients, les mesures morphométriques (diamètre des bouches alvéolaires, épaisseur des microvaisseaux, épaisseur des fibres d'élastine délimitant la bouche alvéolaire) n'étaient pas différentes entre les patients souffrant de pneumopathies chroniques fibrosantes et ceux souffrant d'autres PID.

Les caractéristiques pCLE des fibres densément regroupées étaient retrouvées de manière plus fréquente dans les pneumopathies fibrosantes chroniques que dans les autres pneumopathies mais sans atteindre la signification statistique. En ce qui concerne la corrélation avec le diagnostic final, la caractéristique pCLE « hypercellularité » était significativement plus fréquente dans les autres formes de PID que dans les formes fibrosantes chroniques. Il s'agit là de la seule caractéristique significativement discriminante dans cette étude.

**Figure 1.** Illustration de la microscopie confocale de la plèvre durant une procédure de thoracoscopie médicale, la sonde (Alvéoflex®) étant posée directement sur la surface pleurale. A. Illustration de la plèvre normale avec mise en évidence des cellules mésothéliales disposées en « œuf sur le plat ». Les cellules sont de taille et de forme homogène. Les limites cellulaires sont régulières et bien identifiables. B. Tissu conjonctif fibro-adipeux sous mésothélial de la plèvre normale tel qu'il peut être observé en appliquant la sonde à la surface de la plèvre ou, plus fréquemment, sur une zone déjà biopsiée. C, D. Illustrent une plèvre tumorale, métastatique d'un adénocarcinome pulmonaire. On ne remarque plus les caractéristiques de la plèvre normale. Celle-ci est remplacée par de larges agrégats irréguliers et pléomorphes. L'architecture tissulaire est aberrante.



En ce qui concerne la corrélation avec le diagnostic radiologique, seule l'hypercellularité était corrélée avec le profil inflammatoire du scanner. Le profil fibrotique ou de bronchiolite n'était pas identifiable.

En 2019, une équipe française comparait l'étude pCLE de patients sains non-fumeurs à celle de patients atteints de PID chroniques. Ils ont identifié 14 caractéristiques en pCLE chez les patients souffrant de PID qu'ils ont ensuite évalué de manière prospective chez 59 autres patients. Des 14 critères sélectionnés, 9 se sont avérés significativement plus fréquents dans au moins une des catégories de PID évaluées comparée à la fréquence retrouvée dans la population saine. Ces caractéristiques étaient : présence de cellules bronchiolaires ou alvéolaires fluorescente ; présence de nodules alvéolaires fluorescents ( $> 150 \mu\text{m}$ ) ; des fibres axiales  $>20 \mu\text{m}$  ; un réseau de fibres élastiques désorganisés ; une bouche alvéolaire de diamètre  $<200 \mu\text{m}$  ; une augmentation de la densité du réseau élastique acinaire ; un réseau élastique rigide et enfin, la présence de fibres septales. Chacune des PID incluses dans l'étude pouvait alors arborer une ou plusieurs des caractéristiques de manière variable. Il apparaît que les critères pCLE caractérisant un processus fibrotique (présence de fibres septales, des bouches alvéolaires de petite taille, épaissement des fibres élastiques axiales, un réseau élastique dense, rigide et désorganisé) sont rencontrés plus fréquemment dans les PID fibrosantes : la fibrose pulmonaire idiopathique, l'asbestose ou les PID liées aux connectivites. Les critères pCLE caractérisant un processus cellulaire/inflammatoire (cellules bronchiolaires et alvéolaires) étaient plus fréquemment rencontrés dans les pneumopathies d'hypersensibilité, la sarcoïdose et les PID liées aux connectivites [38]. Ces résultats sont corroborés par des études de moins grande ampleur parues en 2022 établissant de plus un lien entre les critères pCLE et les caractéristiques anatomopathologiques des PID [39,40].

Au terme de cette analyse, on peut conclure que la pCLE permet d'obtenir des renseignements complémentaires à ceux des données cliniques, iconographiques ou biologiques. Ces informations pourraient contribuer à établir le diagnostic final en concertation multidisciplinaire, au même titre que les autres éléments de l'évaluation. De plus, lorsqu'une biopsie pulmonaire est nécessaire, la pCLE pourrait aider à guider les prélèvements en ciblant les zones les plus rentables et en évitant les zones sources de complications (vaisseaux et plèvre) [41]. La place que peut occuper la pCLE dans la pratique clinique, à l'avenir, doit encore être validée dans des essais randomisés et contrôlés dédiés. Enfin, il est nécessaire que les « critères » d'analyse en pCLE soient standardisés afin que leur reproductibilité soit meilleure et que la comparaison entre les différentes études et équipes soit possible.

## LE REJET CELLULAIRE AIGU APRES GREFFE PULMONAIRE

En 2014, Yserbyt et al. étudiaient la capacité de la pCLE à diagnostiquer le rejet cellulaire aigu post greffe de poumon [42]. Cette étude a été réalisée chez 62 patients et incluait 96 procédures analysables. Elle démontrait que l'association de la présence d'un infiltrat cellulaire alvéolaire, de l'augmentation de la fluorescence alvéolaire et l'augmentation de l'index vasculaire (signe d'inflammation vasculaire), lorsque identifiés en pCLE, avaient une sensibilité de 93 % et une spécificité de 83 % pour diagnostiquer les rejets cellulaires aigus par rapport aux biopsies transbronchiques, gold standard actuel. En 2019, une étude prospective, de moindre ampleur réalisée chez 20 patients n'identifiait pas la cellularité alvéolaire comme étant corrélée au diagnostic de rejet cellulaire aigu. Le critère souffrait, de plus, d'une faible reproductibilité inter observateur. Il faut toutefois remarquer que la méthodologie pour l'évaluation de ce critère souffrait davantage de subjectivité dans l'étude présente. Par ailleurs, cette étude mentionnait que l'identification d'une cellularité périvasculaire était, quant à elle, corrélée au diagnostic de rejet cellulaire aigu ( $p = 0,79$ ), de meilleure reproductibilité et jouissait d'une sensibilité, d'une spécificité et d'une exactitude diagnostique de chacune 75 % après consensus entre 4 observateurs. De surcroît, il existait, une forte corrélation ( $p = 0,8$ ) entre le nombre de vaisseaux présentant un infiltrat périvasculaire/patient et le degré d'activité histologique du rejet cellulaire aigu [43].

## Conclusion et perspectives futures

La microscopie confocale endoscopique permet l'étude microscopique en direct et in vivo de l'arbre respiratoire, du parenchyme pulmonaire et de la plèvre. Les données scientifiques à son sujet sont encore peu nombreuses, ce qui explique qu'elle ne soit réalisée, à l'heure actuelle, que dans le cadre de protocoles d'études [44]. Bien que souvent comparée à l'analyse histologique standard, cette technologie lui est avant tout complémentaire, d'une part en permettant des études in vivo et dynamiques, d'autre part en permettant l'étude de paramètres inaccessibles suite aux procédés de fixation inhérent à l'histologie standard (flux vasculaires, microorganismes, étude dynamique. . .) [45—48]. Elle permet également de cibler les prélèvements histologiques avec comme conséquence potentielle une réduction des taux de faux négatifs et une amélioration de la sensibilité de ces procédures. Ce faisant, la pCLE pourrait permettre de réaliser moins de prélèvements biopsiques et ainsi réduire le nombre de complications procédurales [42,49]. Ces résultats prometteurs doivent bien entendu être validés lors d'essais randomisés et contrôlés contre les techniques de référence actuellement disponibles. Sans ces études, il est impossible de démontrer l'intérêt clinique de la technique et d'en justifier le coût. Deux études sont actuellement en cours aux États-Unis dans le cadre des nodules pulmonaires solitaires.

Il existe de plus des perspectives d'amélioration de la technique. Premièrement, grâce aux technologies d'intelligence artificielles qui pourraient permettre une analyse automatisée des images acquises ou aider à la sélection des séquences pertinentes. Deuxièmement dans le cadre de l'utilisation de fluorophores spécifiques qui pourraient permettre la mise en évidence de cibles diagnostiques, thérapeutiques ou spécifiques de processus biologiques à caractériser [49,50].

#### **Déclaration de liens d'intérêts**

Les auteurs déclarent ne pas avoir de liens d'intérêts.

## **References**

1. Thiberville L, Salaün M, Lachkar S, et al. Human in vivo fluorescence microimaging of the alveolar ducts and sacs during bronchoscopy. *Eur Respir J* 2009;33:974—85.
2. Thiberville L, Moreno-Swirc S, Vercauteren T, et al. In Vivo imaging of the bronchial wall microstructure using fibered confocal fluorescence microscopy. *Am J Respir Crit Care Med* 2007;175:22—31.
3. Yick CY, von der Thüsen JH, Bel EH, et al. In vivo imaging of the airway wall in asthma: fibered confocal fluorescence microscopy in relation to histology and lung function. *Respir Res* 2011;12:85.
4. Yserbyt J, Dooms C, Janssens W, et al. Endoscopic advanced imaging of the respiratory tract: exploring probe- based confocal laser endomicroscopy in emphysema. *Thorax* 2018;73:188—90.
5. Cosio BG, Shafiek H, Fiorentino F, et al. Structure-function relationship in COPD revisited: an in vivo microscopy view. *Thorax* 2014;69:724—30.
6. Wellikoff AS, Holladay RC, Downie GH, et al. Comparison of in vivo probe-based confocal laser endomicroscopy with histopathology in lung cancer: a move toward optical biopsy. *Respirology* 2015;20:967—74.
7. Shah PL, Kemp Sv, Newton RC, et al. Clinical correlation between real-time endocytoscopy, confocal endomicroscopy, and histopathology in the central airways. *Respiration* 2017;93:51—7.
8. Fuchs FS, Zirlik S, Hildner K, et al. Confocal laser endo-microscopy for diagnosing lung cancer in vivo. *Eur Respir J* 2013;41:1401—8.
9. Filner JJ, Bonura EJ, Lau ST, et al. Bronchoscopic fibered confocal fluorescence microscopy image characteristics and pathologic correlations. *J Bronchology Interv Pulmonol* 2011;18:23—30.
10. Wijmans L, de Bruin DM, Meijer SL, et al. Needle based confocal laser endomicroscopy for mediastinal lesions, an in vivo pilot-study. In: 14 Interventional Pulmonology [Internet]. *Eur Respir J* 2016:OA3015. Available from: <https://erj.ersjournals.com/content/48/suppl60/OA3015>.
11. Wijmans L, Yared J, de Bruin DM, et al. Needle-based confocal laser endomicroscopy for real-time diagnosing and staging of lung cancer. *Eur Respir J* 2019;53 [1801520].
12. Hassan T, Piton N, Lachkar S, et al. A novel method for in vivo imaging of solitary lung nodules using navigational bronchoscopy and confocal laser microendoscopy. *Lung* 2015;193:773—8.
13. Hassan T, Thiberville L, Hermant C, et al. Assessing the feasibility of confocal laser endomicroscopy in

solitary pulmonary nodules for different part of the lungs, using either 0.6 or 1.4 mm probes. Hasan B, editor. PLoS One 2017;12 [e0189846].

14. Seth S, Akram AR, McCool P, et al. Assessing the utility of autofluorescence-based pulmonary optical endomicroscopy to predict the malignant potential of solitary pulmonary nodules in humans. *Sci Rep* 2016;6:31372.
15. Kramer T, Wijmans L, De Bruin M, et al. Bronchoscopic needle-based confocal laser endomicroscopy (nCLE) as a real-time detection tool for peripheral lung cancer. *Thorax* 2022;77:370—7.
16. Manley CJ, Kramer T, Kumar R, et al. Robotic bronchoscopic needle-based confocal laser endomicroscopy to diagnose peripheral lung nodules. *Respirology* 2023;28:475—83.
17. Han Y, Kim HJ, Kong KA, et al. Diagnosis of small pulmonary lesions by transbronchial lung biopsy with radial endobronchial ultrasound and virtual bronchoscopic navigation versus CT-guided transthoracic needle biopsy: a systematic review and meta-analysis. *PLoS One* 2018;13 [e0191590].
18. Eberhardt R, Anantham D, Ernst A, et al. Multimodality bronchoscopic diagnosis of peripheral lung lesions: a randomized controlled trial. *Am J Respir Crit Care Med* 2007;176: 36—41.
19. Kennedy GT, Azari FS, Bernstein E, et al. Targeted detection of cancer cells during biopsy allows real-time diagnosis of pulmonary nodules. *Eur J Nucl Med Mol Imaging* 2022;49: 4194.
20. Deschuyteneer EP, De Keukeleire T. Diagnostic value and safety of thoracoscopic pleural biopsies in pleural exudative effusions of unknown origin, including follow-up. *BMJ Open Respir Res* 2022;9 [e001161].
21. Kindler HL, Ismaila N, Armato SG, et al. Treatment of malignant pleural mesothelioma: American society of clinical oncology clinical practice guideline. *J Clin Oncol* 2018;36:1343—73.
22. Galbis JM, Mata M, Guijarro R, et al. Clinical-therapeutic management of thoracoscopy in pleural effusion: a ground-breaking technique in the twenty-first century. *Clin Transl Oncol* 2011;13:57—60.
23. Loddenkemper R. Thoracoscopy-state of the art. *Eur Respir J* 1998;11:213—21.
24. Prakash Ubs, Reiman Hm. Comparison of needle biopsy with cytologic analysis for the evaluation of pleural effusion: analysis of 414 Cases. *Mayo Clin Proc* 1985;60:158—64.
25. Zirlik S, Hildner K, Rieker RJ, et al. Confocal laser endomicroscopy for diagnosing malignant pleural effusions. *Med Sci Monit* 2018;24:5437—47.
26. Bonhomme O, Duysinx B, Heinen V, et al. First report of probe based confocal laser endomicroscopy during medical thoracoscopy. *Respir Med* 2019;147:72—5.
27. Wijmans L, Baas P, Sieburgh TE, et al. Confocal laser endomicroscopy as a guidance tool for pleural biopsies in malignant pleural mesothelioma. *Chest* 2019;156:754—63.
28. Bonhomme O, Heinen V, Detrembleur N, et al. Probe-based confocal laser endomicroscopy for pleural malignancies diagnosis. *Respirology* 2021;26:188—95.
29. Ellayeh M, Bedawi E, Banka R, et al. Objective thoracoscopic criteria in differentiation between benign and malignant pleural effusions. *Respiration* 2022;101:46—56 [cited 2023].
30. Hallifax RJ, Corcoran JP, Psallidas I, et al. Medical thoracoscopy: survey of current practice-How successful are medical thoracoscopists at predicting malignancy? *Respirology* 2016;21:958—60.
31. Porfyridis I, Georgiadis G, Michael M, et al. Rapid on-site evaluation with the hemacolor rapid staining

method of medical thoracoscopy biopsy specimens for the management of pleural disease. *Respirology* 2016;21:1106—12.

32. Sawada T, Takizawa H, Aoyama M, et al. Diagnosis of visceral pleural invasion using confocal laser endomicroscopy during lung cancer surgery. *J Thorac Dis* 2021;13:4742—52.
33. Danilevskaya O, Averyanov A, Lesnyak V, et al. Confocal laser endomicroscopy for diagnosis and monitoring of pulmonary alveolar proteinosis. *J Bronchology Interv Pulmonol* 2015;22:33—40.
34. Salaün M, Roussel F, Bourg-Heckly G, et al. In vivo probe-based confocal laser endomicroscopy in amiodarone-related pneumonia. *Eur Respir J* 2013;42:1646—58.
35. Yserbyt J, Alamé T, Dooms C, et al. Pulmonary alveolar micro- lithiasis and probe-based confocal laser endomicroscopy. *J Bronchology Interv Pulmonol* 2013;20:159—63.
36. Danilevskaya O, Averyanov A, Klimko N, et al. The case of diagnostics of invasive pulmonary aspergillosis by in vivo probe-based confocal laser endomicroscopy of central and distal airways. *Med Mycol Case Rep* 2014;5:35—9.
37. Meng P, Tan GL, Low SY, et al. Fibred confocal fluorescence microscopy in the diagnosis of interstitial lung diseases. *J Tho- rac Dis* 2016;8:3505—14.
38. Salaün M, Guisier F, Dominique S, et al. In vivo probe-based confocal laser endomicroscopy in chronic interstitial lung diseases: Specific descriptors and correlation with chest CT. *Respirology* 2019;24:783—91.
39. Silbernagel E, Stacher-Priehse E, Dinkel J, et al. Bronchoscopic probe-based confocal laser endomicroscopy to diagnose diffuse parenchymal lung diseases. *Sarcoidosis Vasc Diffuse Lung Dis* 2022;39 [2022016].
40. Wijmans L, Kalverda K, de Bruin D, et al. Bronchoscopic journey of in vivo real-time microscopic imaging in ILD: a case series. *Respiration* 2022;101:1006—14.
41. Wijmans L, Bonta PI, Rocha-Pinto R, et al. Confocal laser endomicroscopy as a guidance tool for transbronchial lung cryobiopsies in interstitial lung disorder. *Respiration* 2019;97:259—63.
42. Yserbyt J, Dooms C, Decramer M, et al. Acute lung allograft rejection: diagnostic role of probe-based confocal laser endo-microscopy of the respiratory tract. *J Heart Lung Transplant* 2014;33:492—8.
43. Keller CA, Khor A, Arenberg DA, et al. Diagnosis of acute cellular rejection using probe-based confocal laser endomicroscopy in lung transplant recipients: a prospective, multicenter trial. *Transplantation* 2019;103:428—34.
44. Goorsenberg A, Kalverda KA, Annema J, et al. Advances in optical coherence tomography and confocal laser endomicroscopy in pulmonary diseases. *Respiration* 2020;99:190—205.
45. Napoleon B, Palazzo M, Lemaistre A, et al. Needle-based confocal laser endomicroscopy of pancreatic cystic lesions: a prospective multicenter validation study in patients with definite diagnosis Authors. *Endoscopy* 2019;51:825—35.
46. Fumex F, Napoleon B, Lucidarme D, et al. A novel approach to the diagnosis of pancreatic serous cystadenoma: needle-based confocal laser endomicroscopy. *Endoscopy* 2015;47:26—32.
47. Moussata D, Goetz M, Gloeckner A, et al. Confocal laser endomicroscopy is a new imaging modality for recognition of intramucosal bacteria in inflammatory bowel disease in vivo. *Gut* 2011;60:26—33.

48. Gruber S, Spielauerl, Bohme S, et al. Real-time in-vivo imaging of pulmonary capillary perfusion using probe-based confocal laser scanning endomicroscopy in pigs. *Eur J Anaesthesiol* 2015;32:392—9.
49. Uno K, Koike T, Hatta W, et al. Development of advanced imaging and molecular imaging for Barrett's neoplasia. *Diagnostics (Basel)* 2022;12:2437.
50. Hsiung PL, Hsiung PL, Hardy J, et al. Detection of colonic dysplasia in vivo using a targeted heptapeptide and confocal microendoscopy. *Nat Med* 2008;14:454—8.