

APPLICATIONS DE L'ANALYSE FRACTALE DANS L'EXAMEN ANATOMOPATHOLOGIQUE DES PROCESSUS TUMORAUX

RESUME

Mots clé: analyse fractale, dimension fractale, traitement des images numériques, microscopie virtuelle, diagnostic oncologique, pronostic, réseaux neuronaux artificiels, médecine basée sur les preuves

La recherche oncologique se trouve à la conjonction de plusieurs domaines qui passent, à présent, par des changements spectaculaires. La pratique médicale clinique se réorganise progressivement conformément aux exigences comprises dans le concept de la *Médecine Basée sur les Preuves*. La génomique et la biologie moléculaire génèrent en permanence de nouveaux modèles explicatifs pour maintes étapes de la carcinogenèse, ayant un impact sur des éléments thérapeutiques et de diagnose. Les techniques d'examen, de l'imagerie non-invasive jusqu'au déchiffrement au niveau moléculaire et génique des preuves biologiques, offre à la recherche des instruments si puissants qu'il est au présent techniquement possible d'avancer rapidement en presque n'importe quelle direction. Mais, en effet, le plus difficile est de choisir la bonne direction. Les technologies de l'information se trouvent dans une étape de changement du paradigme euristique et opérationnelle, puisque les progrès de la microélectronique ont rendu accessibles le stockage et le traitement d'un volume énorme de données. Toutefois, le cancer, étudié intensivement pendant les 60 dernières années, reste un sujet où chaque progrès confirmé de la recherche apporte au moins tant de nouvelles questions, que de réponses aux anciennes questions. Une approche qui est en train de gagner du terrain ces dernières années considère l'oncologie par la perspective des systèmes dynamiques non linéaires, qui peuvent avoir des manifestations spontanées d'auto-organisation. Ainsi, le cancer refléterait une manifestation de perturbation au sens de «l'intelligence distribuée» ou «l'intelligence d'essaim», (*swarm intelligence*), celle qui, dans l'état que nous définissons *normale*, fait que la population énorme de cellules somatiques travaille ensemble dans l'organisme pluricellulaire. Cette vision unificatrice met en évidence une liaison de base entre la **carcinogenèse**, et **l'analyse fractale** – une science qui s'est développée en principal comme un instrument de modelage des systèmes dynamiques non linéaires et les **réseaux neuronaux artificiels** - qui sont un des plus documentés exemples de *swarm intelligence* du monde inventé par l'homme.

L'analyse fractale permet d'obtenir certains indicateurs, qui sont représentés par des nombres quantifiant la complexité non-périodique, tout à fait caractéristiques pour les structures biologiques, notamment aux échelles de grandeur dans lesquelles se manifeste la vie. Le présent travail de recherche a comme but l'analyse de la possibilité d'inclure l'analyse fractale, appliquée aux images microscopiques histopathologiques ou cytopathologiques, parmi les instruments utilisés pour le diagnostic des tumeurs aux animaux. Par la suite, nous

avons testé l'introduction de la dimension fractale entre les facteurs de pronostique oncologique. Dans ce but, nous avons élaboré des modèles statistiques et des modèles du type « *réseau neuronal artificiel RNA* » pour la durée de survivance, en incluant la dimension fractale dans l'ensemble de données d'entrée, en tant que ces modèles s'appliquent aux patients avec diagnostic oncologique confirmé.

Structure de la thèse. La Thèse de doctorat „**Applications de l'analyse fractale dans l'examen anatomopathologique des processus tumorales**” est organisée en deux parties principales. Dans la **Première Partie** «**Etude bibliographique**», sont passés en revue, de manière succincte, les principaux résultats publiés lors des dernières années concernant l'analyse fractale en anatomie pathologique réalisée en Roumanie, mais aussi dans d'autres pays, et notamment dans le domaine de la médecine humaine. En même temps sont présentés, d'une manière synthétique, les performances rapportées aux certains paramètres fractals, et en particulier pour la dimension fractale des éléments extraites des images histologiques ou cytologiques, d'être des facteurs de pronostique pour les patients oncologiques. Nous avons mis en évidence les modèles qui ont été utilisés au niveau international, afin de formuler tel prédictions – notamment en ce qui concerne les modèles statistiques et les modèles utilisés dans l'intelligence artificielle, et particulièrement les réseaux neuronaux artificiels. La **Seconde Partie** de l'ouvrage, désigné «**Recherche originale**», commence avec la présentation des objectifs et de l'organisation du travail de recherche, du support théorique utilisé, des logiciels et des moyens techniques utilisés, de la casuistique incorporée dans l'étude, essentiellement des populations d'images microscopiques analysées. Les principaux paquets de logiciels utilisés sont : **Olympus Cell^B** pour la capture d'image, **CorelPHOTO-PAINT®** pour le traitement préliminaire des images, **FracLab 2.05** pour l'analyse fractale, **StatsDirect 3.0** pour l'analyse statistique et représentation graphique des résultats, **Epi Info 7™** pour l'évidence des patients et des informations, **EasyNN® plus 14.0g** pour le développement de réseaux neuronaux artificiels RNA. La capture des images histologiques et cytologiques, ainsi que le diagnostic anatomopathologique, ont été réalisés pour la plupart des cas dans le **Laboratoire d'anatomie pathologique** de **FMV-USAMV** Bucarest. De façon exceptionnelle, certains examens anatomopathologiques ont été effectués à **S.C. Histovet s.r.l.** et au **Laboratoire d'anatomo-pathologie de l'Hôpital d'urgence „Prof.dr. Dimitrie Gerota”** de Bucarest. Ensuite, six études, qui ont représenté des étapes procédurales et chronologiques dans le déroulement de la recherche sont présentées, en chapitres séparés.

Première Etude : Recherches préliminaires - Comparaison entre l'analyse fractale et la morphométrie classique en examens histopathologiques et cytopathologiques. L'étude a vérifié la performance de l'analyse fractale, par comparaison avec la morphométrie nucléaire classique, en ce qui concerne la capacité de fournir des paramètres quantitatifs corrélés avec la présence / absence de certaines modifications pathologiques sur des images histologiques ou cytologiques. Dans cette partie de la recherche nous avons aussi évalué la possibilité d'utiliser des paquets de logiciels, sélectionnés pour l'analyse fractale d'une image microscopique histologique ou cytologique. Nous avons analysé de manière rétrospective 88 images histopathologiques (objectif $\times 40$ et $\times 100$, coloration hématoxyline éosine HE), provenant d'une étude antérieure, réalisée à FMV-USAMV sur rats Walker 256 avec un cancer iatrogène, en cherchant à refléter en images les modifications morphologiques microscopiques du foie sous l'action de deux agents toxiques (cytostatiques) et de certaines substances ayant un

rôle protecteur hépatique (extraits phénoliques de plantes). Nous avons analysé, de même, 17 images cytopathologiques (objectif $\times 100$, coloration May-Grünwald-Giemsa), de certains échantillons obtenus par aspiration avec aiguille fine de lympho-nodules de chien, normale (4 images), et affectés par lymphome malin. L'examen morpho-métrique classique a déterminé des valeurs pour le périmètre nucléaire et l'aire nucléaire, établies par le contour manuel des nucléés sur les images microscopiques digitales. Avec l'analyse fractale nous avons utilisée la méthode de comptage en boîte (box counting method), pour calculer la dimension fractale de images intégrales – **DFII** et la dimension fractale des régions de chromatine **DFRC**. Pour les images d'échantillons histologiques de tissu hépatique, nous avons établi que la dimension fractale – tant des régions de chromatine **DFRC** que des images intégrales **DFII** – conduit à des performances nettement supérieures par rapport à la morphométrie nucléaire classique, en ce qui concerne la corrélation avec l'impact de l'administration d'agents toxiques, et même d'agents protecteurs pour le foie. Nous avons observées des dispersions réduites des résultats, qui mènent à des marges de confiance des valeurs statistiques de 95% (en moyenne) plus étroites et à des probabilités très petites ($P < 0,0001$, en certains cas) afin que les différences de moyenne entre les groupes analysées soient le résultat du hasard. Nous avons établi que la performance de l'analyse fractale comme instrument pour l'identification des lésions sur une image histologique dépend d'une manière critique du choix des éléments morphologiques de l'image extraite pour être soumise à l'évaluation de la dimension fractale: sur tissu hépatique, certains facteurs toxiques génèrent les lésions décelées de manière optimale par la dimension fractale des régions de chromatine **DFRC**, tandis que d'autres facteurs toxiques produisent des lésions mieux mises en évidence par la dimension fractale de l'image histologique intégrale **DFII**. Par voie de conséquence, y compris pour le même organe il est nécessaire d'évaluer plusieurs variantes de segmentation des images, afin d'établir la meilleure voie pour l'évaluation d'un certain type de lésion par l'analyse fractale. Dans le cas des images d'échantillons cytologiques, les méthodes de la morphométrie classique se sont montrées supérieures par rapport à l'analyse fractale, concernant les résultats de paramètres bien corrélés avec le diagnostic. Cette conclusion peut être considérée comme préliminaire, à cause du nombre relativement réduit d'images cytologiques inclus dans l'analyse.

Seconde Etude: Recherches préliminaires - Optimisation de la procédure et des paramètres pour l'application de l'analyse fractale dans le diagnostic anatomopathologique L'étude a été réalisée sur le même échantillon d'images utilisé pour la 1^{ère} Etude. Nous avons identifié les limites de fonctionnement des logiciels, au regard des formats des fichiers, des protocoles de transferts de données et des conventions de désignation des fichiers, afin d'assurer la compatibilité entre les logiciels utilisés dans les étapes successives de traitement des images, qui contiennent l'analyse fractale et l'analyse statistique. Nous avons transposé dans un logiciel (*Corel script*) la séquence d'opérations de traitement d'images digitales, afin d'assurer l'optimisation de la qualité de l'image (tant chromatique que dimensionnelle), et aussi, l'extraction des régions d'intérêt dans un format adéquat pour mettre en évidence et calculer la dimension fractale. Ce logiciel nous a permis, dans les études ultérieures, le traitement automatique d'un grand nombre d'images microscopiques. Nous avons établi, par essais successifs et par évaluations en utilisant la méthode ANOVA, les paramètres de travail pour des paquets de logiciels de traitement d'images et d'analyse fractale, qui nous ont conduit à établir la meilleure corrélation entre la

dimension fractale, calculée sur les images microscopiques traitées, et les données cliniques et anatomopathologiques associées aux échantillons - sources des images.

Troisième Etude: Utilisation de la dimension fractale pour la mise en évidence des tumeurs épithéliales. L'étude a été réalisée sur un nombre de 194 de images histologiques (objectif $\times 40$, coloration HE) de 19 chiens et de 5 chats, diagnostiqués avec tumeurs épithéliales bénignes et malignes: carcinome de glande mammaire, autres carcinomes, adénome de glande mammaire, épithélioma, seminome, fibroadénomatose mammaire, trichoblastoma, trichoépithélioma. Nous avons établi que lorsque sur l'image analysée sont présentes des éléments caractéristiques aux tumeurs épithéliales, la **dimension fractale des régions de chromatine (DFRC)** présente des augmentations significatives. La croissance est suffisamment importante pour permettre la formulation d'un test basé sur la **DFRC**, qui fasse la différence entre les images des tumeurs épithéliales et celles qui représentent un tissu non modifié tumoral. La performance du test (sensitivité et spécificité) augmente si les images sont organisées sur groupes de sexe et groupes d'âge. De même, entre les types de tumeurs épithéliales incluses dans l'étude, en ce qui concerne la meilleure corrélation entre la présence des modifications tumorales avec la **DFRC**, on a mentionné pour le carcinome de glande mammaire, l'aire sous la courbe ROC *Receiver Operating Characteristic* étant 0,869.

Quatrième Etude: Utilisation de l'analyse fractale pour l'identification de certaines transformations tumorales dans la glande mammaire. Le but de l'étude a été de confirmer l'hypothèse selon laquelle la **dimension fractale des régions de chromatine (DFRC)** est corrélée de manière statistique avec la présence ou l'absence d'une tumeur dans une image histologique de la glande mammaire. Dans ce sens, notre recherche a comparé la **DFRC** pour des images histopathologiques du tissu mammaire caractérisées préalablement par anatomopathologie comme représentant du *tissu physiologique normal* / *adénome* / *carcinome* - pour chiens, et du *tissu physiologique normal* / *adénome* / *fibroadénomatose* / *carcinome* - pour chats. Nous avons inclus dans l'étude 1237 images histologiques (objectif $\times 40$, coloration HE) de 62 patients (30 chiens et 32 chats) soumis à la mastectomie sur diagnostic clinique de *suspicion de néoplasie au niveau de la glande mammaire*. Pour l'étude on a sélectionné seulement des images qui présentent le tissu mammaire normal ou modifié tumoral exclusivement au niveau des composantes épithéliales. On n'a pas inclus dans l'étude des images qui avaient un contenu mixte de caractères anatomopathologiques, comprenant la présence, en manière significative, de plusieurs types de lésions. Nous avons confirmé que **la dimension fractale des régions de chromatine DFRC a une variation significative, statistique ($P < 0,001$), en fonction de la présence ou de l'absence du carcinome de glande mammaire, dans les images histologiques**. Tant les valeurs de la dimension fractale **DFRC**, que le niveau élevé de corrélation statistique de celle-ci avec la présence des lésions malignes sont en bonne concordance avec des résultats rapportés dans l'oncologie humaine pour des carcinomes de glande mammaire, de prostate et de muqueuse buccale. Dans le cas des images de glande mammaire, si aux chiens la **DFRC** augmente de manière progressive entre les groupes d'images sans lésions – *adénome* – *tumeurs malignes*, dans le cas des chats, les modifications bénignes (adénome, fibroadénomatose) diminuent la **DFRC**, et celles malignes sont accompagnées d'une augmentation de la **DFRC**. Ce mode non-systématique de variation de la **DFRC** fait que le modèle statistique nécessaire pour que le test de malignité basé sur la **DFRC** soit plus

complexe pour des chats. Par l'évaluation ROC - *Receiver Operating Characteristic*, le test de malignité basé sur **DFRC** pour chien, qui décrit si une image histologique fait partie du groupe «carcinome» par rapport des ceux faisant partie de la groupe combinée «sans lésions ou adénome», a l'aire au dessous la courbe ROC 0,7725 (performance très bonne), et, à un choix équilibré de la valeur limite **DFRC** = 1,8214, le test a une chance du diagnostic correct de 5 : 1, une sensibilité de 0,76 et une spécificité de 0,66. De manière similaire, le test de malignité pour le chat, qui fait distinction entre images de la groupe «carcinome» par rapport des ceux faisant partie de la groupe combinée «sans lésions ou fibroadénomatose ou adénome», a l'aire au-dessous la courbe ROC 0,8513 (performance excellente), et pour la valeur limite **DFRC** = 1,7891, le test a une chance du diagnostic correcte de 16,8 : 1, une sensibilité de 0,88 et une spécificité de 0,70. Nous avons mis en évidence la possibilité de transposer directement ces conclusions dans une procédure qui, par l'analyse fractale d'une image histologique, évalue la probabilité que l'image contient des modifications tumorales. Cette probabilité, par inférence Bayésienne avec des données de statistique de la population étudiée, peut fournir une estimation des chances de diagnostic tumoral positif pour le patient de qui l'échantillon provienne. Pour la glande mammaire du chien, un paramètre utilisable directement comme possibilité d'évaluation de la probabilité de présence de lésions malignes dans une image pour laquelle on détermine la **DFRC** est la *valeur prédictive pour la présence de la lésion en cas de résultat positif du test (post-test likelihood of lesion)*, comme elle est fournie par le modèle ROC si on introduit dans celui-ci la valeur de test de la **DFRC** comme valeur limite. Nous avons créé aussi un **Indice Fractal pour Mettre en Evidance des Lésions (IFEL)**, dérivé du modèle statistique ROC, dont nous avons démontré qu'il offre une orientation robuste en ce qui concerne l'évaluation de la présence / absence dans une image histologique des caractères de malignité, tant en cas des chiens, que dans le cas des chats. **IFEL** est peut être utilisé directement dans les procédures de *screening*, pour sélectionner des régions d'intérêt des préparates ou pour sélectionner les images des échantillons qui entrent dans l'évaluation du spécialiste anatomo-pathologue pour diagnostic approfondi. De même, nous avons argumenté la possibilité d'appliquer des procédures de la présente étude pour évaluer par analyse fractale des images des échantillons immuno-histochimiques et des images résultant par la technique RCM (*Reflectance Confocal Microscopy*). L'étude n'a pas identifié un avantage certain découlant de l'utilisation séparée des composantes *structurelle* et *texturale* de la **DFRC**. Nous avons **confirmé** la corrélation entre *l'invasion tumorale des capillaires lymphatiques* et **DFRC** médian dans le cas de la glande mammaire du chat. Nous avons investigué et **confirmé** la corrélation entre le degré de malignité des lésions de carcinome mammaire et **DFRC** médian dans le groupe d'images histologiques réalisées sur les respectives lésions, tant pour les chiens que pour les chats. Tenant compte de la valeur reconnue de facteur de pronostique du degré de malignité, en corroborant avec les conclusions similaires de l'oncologie humaine concernant l'analyse fractale, les résultats de l'étude apportent des arguments en faveur de l'utilité **DFRC** comme facteur de pronostique pour les patients chiens et chats avec carcinome mammaire.

Cinquième Etude : Evaluation de la possibilité d'utiliser des *Réseaux Neuronaux Artificiels (RNA)*, pour formuler le pronostic en base d'un ensemble étendu de données cliniques et anatomopathologiques. L'étude a développé un modèle qui permet d'apprécier le pronostic basé sur des réseaux

neuronaux artificiels RNA, avec cette occasion étant testé avec succès l'environnement de programmation **EasyNN[®] plus 14.0g**, et aussi étant identifiés les problèmes opérationnels des RNA et les modalités pratiques pour surmonter ces problèmes. Des données de 39 chiens et chats diagnostiqués avec tumeurs de glande mammaire (18 cas), ostéosarcome, lymphome cutané, hémangiomes, tumeurs ovariennes, mélanomes malignes, histiocytomes, carcinomes de divers types et avec diverses localisations ont été utilisées. Un nombre de 27 facteurs de prédiction ont été quantifiés sur une échelle de 0 à 4, pour chaque patient: *critères cliniques* et *para cliniques* (rythme de croissance de la tumeur, le temps post-chirurgical sans tumeur, déviation du normal des analyses du sang, le temps de guérison de la plaie chirurgicale, l'âge, le score TNM à l'initiation du traitement), *critères anatomopathologiques macroscopiques* (grandeur de la tumeur au moment du diagnostic, la consistance – dureté, vascularisation, ulcérations), *critères histologiques* (degré de malignité, l'implication des lymphonœuds), *critères relatives à la thérapie* (traitement chirurgical, chimiothérapie adjuvante, stimulation de l'immunité, thérapie hormonale antérieure au diagnostic, thérapie avec anti-inflammatoires non stéroïdiennes AINS). La durée de survivance (en jours) du moment du diagnostic a été le seul paramètre d'interrogation du réseau neuronal. Nous avons établi que les plus efficaces moyens de dépasser la situation de blocage représentée par « *overfitting* » sont le clonage des nœuds (neurones) cachés performants, combinés avec la congélation adaptative (*adaptive freezing*) des poids et l'élimination des neurones et synapses faiblement performants (*pruning*).

Sixième Etude : L'Analyse fractale et les réseaux neuronaux artificiels appliqués dans l'évaluation du pronostic des patients malades de cancer. L'étude a conduit à la réalisation du modèle **OncoVetNeuralNet**, qui permet d'estimer la durée de survivance pour des chiens et chats avec carcinome mammaire, tant en base d'un modèle statistique (analyse Kaplan-Meier et régression Cox), que à l'aide d'un réseau neuronal artificiel – RNA. Un nombre de 74 patients de la clinique ORTOVET ont été inclus dans l'étude, 41 chiens et 33 chats, diagnostiqués avec carcinome de glande mammaire, entre les années 2002 et 2014. 22 facteurs de pronostic / prédiction ont été inclus dans l'étude: données générales concernant le patient (espèce, âge au diagnostic, âge quand la tumeur a été observée), données cliniques (statut macroscopique des lymphonœuds, présence des métastases, présence des récurrences), données anatomopathologiques (type et degré histologique, implication des lymphonœuds, dimension fractale des régions de chromatine – la **DFRC** – valeur maximale pour les images histologiques des échantillons du patient), paramètres sanguins en date du diagnostic (nombre/niveau pour leucocytes, neutrophiles, monocytes, éosinophiles, phosphatase alcaline, alanin-transaminase, aspartat-transaminase, créatinine, urée, glucose), données concernant la thérapie (statut gonadal, chimiothérapie, chirurgie d'excision, AINS). La composante RNA du modèle **OncoVetNeuralNet** a permis de tirer la conclusion que la **DFRC – la dimension fractale des régions de chromatine est un facteur de pronostic important** (se situant dans les premières trois positions entre les 22 prédicteurs) pour les chiens et les chats avec diagnostic de cancer. L'étude a établi que l'âge au diagnostic, la grandeur de la tumeur, le nombre / niveau dans le sang pour leucocytes, neutrophiles, alanin-transaminase et créatinine au moment du diagnostic sont des *facteurs de pronostic* déterminants pour l'estimation du temps de survivance. De même, le traitement avec AINS et l'ovariectomie sont des *facteurs de prédiction* avec impact favorable sur le temps

de survivance.

Conclusions générales et recommandations sont incluses dans le chapitre final du présent travail. Ici sont mentionnées aussi, de manière succincte, certaines applications élargies des résultats de la présente recherche, en tenant compte du fait que les procédures pour le traitement des images et leur analyse fractale développées dans l'*Etude 1* et l'*Etude 2* ont devenues, par le temps, des instruments opérationnels de recherche dans le *Laboratoire d'anatomie pathologique de FMV-USAMV* de Bucarest. Par conséquent, du niveau de cet laboratoire ont été communiquées les derniers ans des résultats de l'application de l'analyse fractale dans l'étude de la transition épithéliale-mésenchymateuse, de la fibrose hépatique, des adipocytes et du tissu adipeux, et aussi dans l'identification de la modalité par laquelle on a réalisé la préparation thermique de la viande destinée à la nourriture humaine.

Première Partie Etude bibliographique a 28 pages, représentant 15,5 % de l'ouvrage.

Seconde Partie Recherches originales comprise 153 pages, représentant 84,5 % de l'ouvrage. Est formé de 8 chapitres : **Matériaux et méthodes**, 6 chapitres comprenant les 6 études de la recherche, et le chapitre de **Conclusions générales et recommandations**.

Dans les deux parties de l'ouvrage sont incluses 82 figures (dont 7 sont reproduites des ouvrages de la bibliographie) et 30 tableaux.

La Bibliographie contient 216 titres d'ouvrages.

Les Annexes contiennent des détails concernant les droits de reproduction pour les 7 figures obtenues des ouvrages de la bibliographie, la liste des travaux publiés par le doctorant, son *Curriculum Vitae* et son mémoire d'activité.

L'ouvrage a un total de 250 pages (**Résumé** en roumain/anglais/français, **Contenu** en roumain/anglais/français, **Introduction** en roumain/anglais, **Partie I, Partie II, Bibliographie, Annexes**).