

**Évaluation d'une méthode de tri
cellulaire par réseau neuronal dans
les produits d'épanchements pleuraux
pour la détection précoce de cellules
mésothéliales atypiques.**

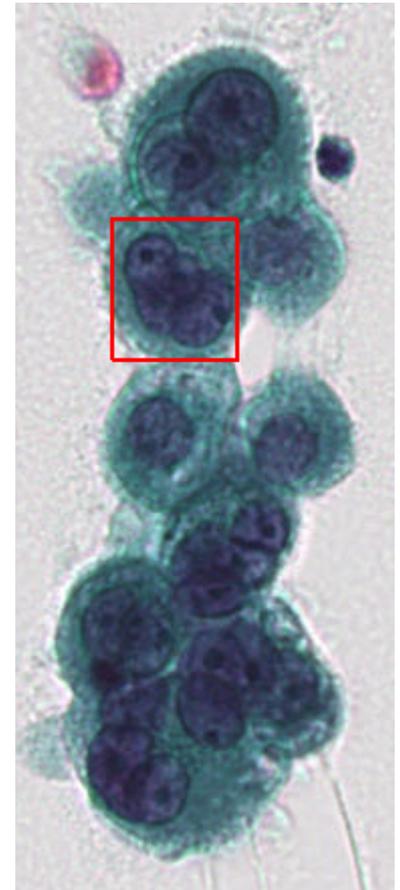
**Soutenance de thèse pour l'obtention du grade de docteur en médecine
Le 8 octobre 2013, Gaétane Planchard**

Cytologie pleurale: généralités

- Épanchement pleural révélateur de nombreuses pathologies pleurales ou non, tumorales ou inflammatoires
- Examen de routine
- Pas de standardisation des pratiques: colorations (Papanicolaou, MGG) et étalements (étalements, cytopspin, milieu liquide)
- Culot d'inclusion: études IHC et BM

Cytologie du MME

- Épanchement pleural inaugural (54 à 89 %)
- Sensibilité: 32 à 76 %
- Hypercellularité, amas, nucléoles
- Difficultés diagnostiques:
 - MME vs métastase carcinome
 - MME vs HM réactionnelle
- Place controversée



Savic S *et coll.* Fluorescence in situ hybridization in the definitive diagnosis of malignant mesothelioma in effusion cytology. *Chest.* 2010 Jul;138(1):137-44.

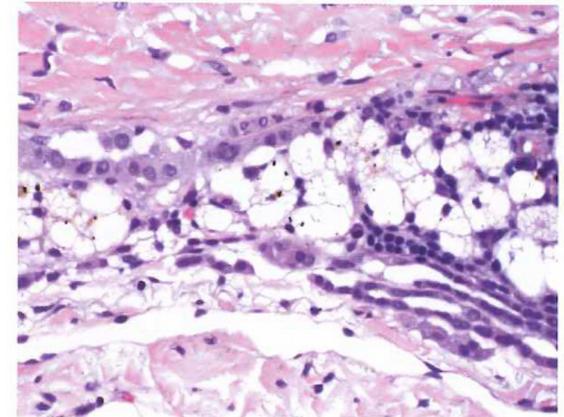
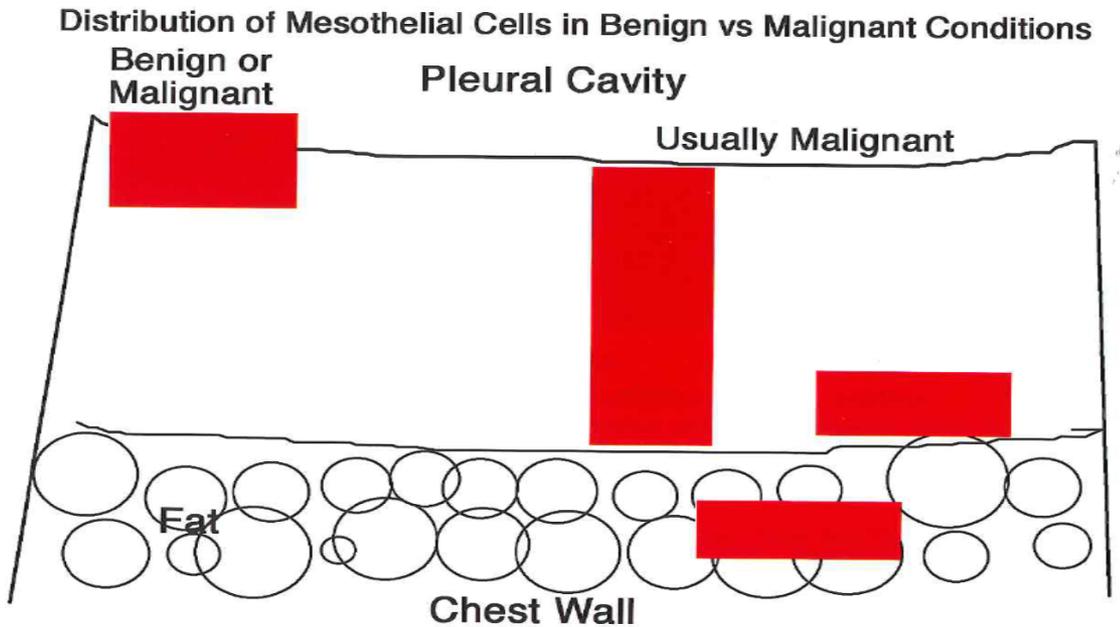
Mésothéliome malin (1)

- Tumeur primitive de la plèvre la plus fréquente
- Rare, agressive, exposition à l'amiante
- Maladie professionnelle (tableau 30)
- Problème de Santé Publique (maladie à déclaration obligatoire depuis janvier 2013)
- ↑ incidence
- Traitement curatif limité
- Détection précoce

Mésothéliome malin (2)

- Diagnostic histologique
- Etude immunohistochimique
- 4 sous-types :
 - Épithélioïde : le plus fréquent, desquame
 - Biphase
 - Sarcomatoïde
 - Desmoplasique

Clés diagnostiques des proliférations mésothéliales



Hyperplasie mésothéliale atypique (1)

- = Prolifération mésothéliale de malignité indéterminée (PMMI)
- Prolifération mésothéliale de surface
- Assise unicellulaire cylindrique haute, strates, papilles
- Inclusions simples ou complexes
- Cellules mésothéliales volumineuses et épithélioïdes, noyau hyperchromatique, nucléole proéminent, mitoses

Hyperplasie mésothéliale atypique (2)

■ Étiologies:

- Épanchements pleuraux récidivants (processus inflammatoire ou tumoral)
- État précancéreux ou MM in situ
- Extension superficielle d'un MM

■ Évolution:

- Survenue secondaire d'un MM
- Survie à 3 ans de 60 % (données Panel International des Mésothéliomes)

Marqueurs de malignité

- IHC:
 - Positivité: EMA, p53, GLUT-1, X-linked inhibitor of apoptosis, IMP-3
 - Négativité: desmine
- Délétion homozygote de p16 (FISH)
- Aneuploïdie
- Nombre élevé d'AgNORs
- Morphométrie: densité optique élevée, chromatine texturée et marginée
- **Aucune méthode validée au titre du diagnostic individuel**

Objectif principal

- Étudier des produits d'épanchements pleuraux de PMMI
- Système de tri cellulaire par réseau de neurones (ARCTIC)
- Mettre en évidence des critères morphométriques permettant de distinguer les PMMI avec évolution de ceux sans évolution

Systeme Arctic: généralités (1)

- Logiciel expérimental
- Société Datexim
- Réseau neuronal avec classifieur MONNA développé par Pr O Lézoray (GREYC).
- Projet Valtricyt (GREYC image et service d'anapath du CHPC de Cherbourg):
 - VALidation du TRI Cellulaire en Cytologie Tumorale
 - Détection 98,5 % de cas malins en cytologie des séreuses

Systeme Arctic: généralités (2)

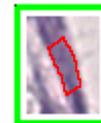
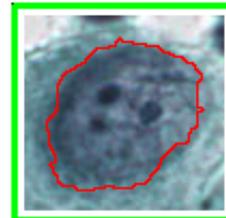
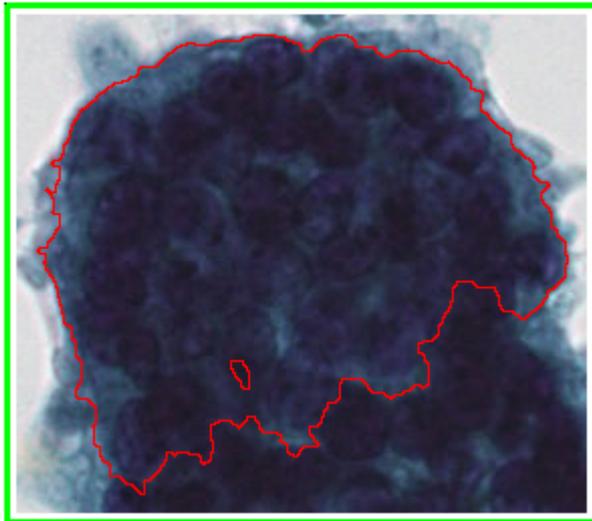
- Aide à la Recherche en Cytologie par le Tri Informatisé des Cellules
- Système informatique semi-automatisé de *screening*
- Lame de cytologie colorée au Papanicolaou numérisée sur plateforme de microscopie optique ou par scanner de lames

ARCTIC: fonctionnement

- Traitement préliminaire:
 - Élimination du bruit de fond → image de fond
 - Élimination des hématies → filtre rouge
- 3 étapes séquentielles:
 - Segmentation
 - Caractérisation
 - Classification

ARCTIC: segmentation

- Extraction d'objets à partir d'images couleur
- Méthode de « ligne de partage des eaux »



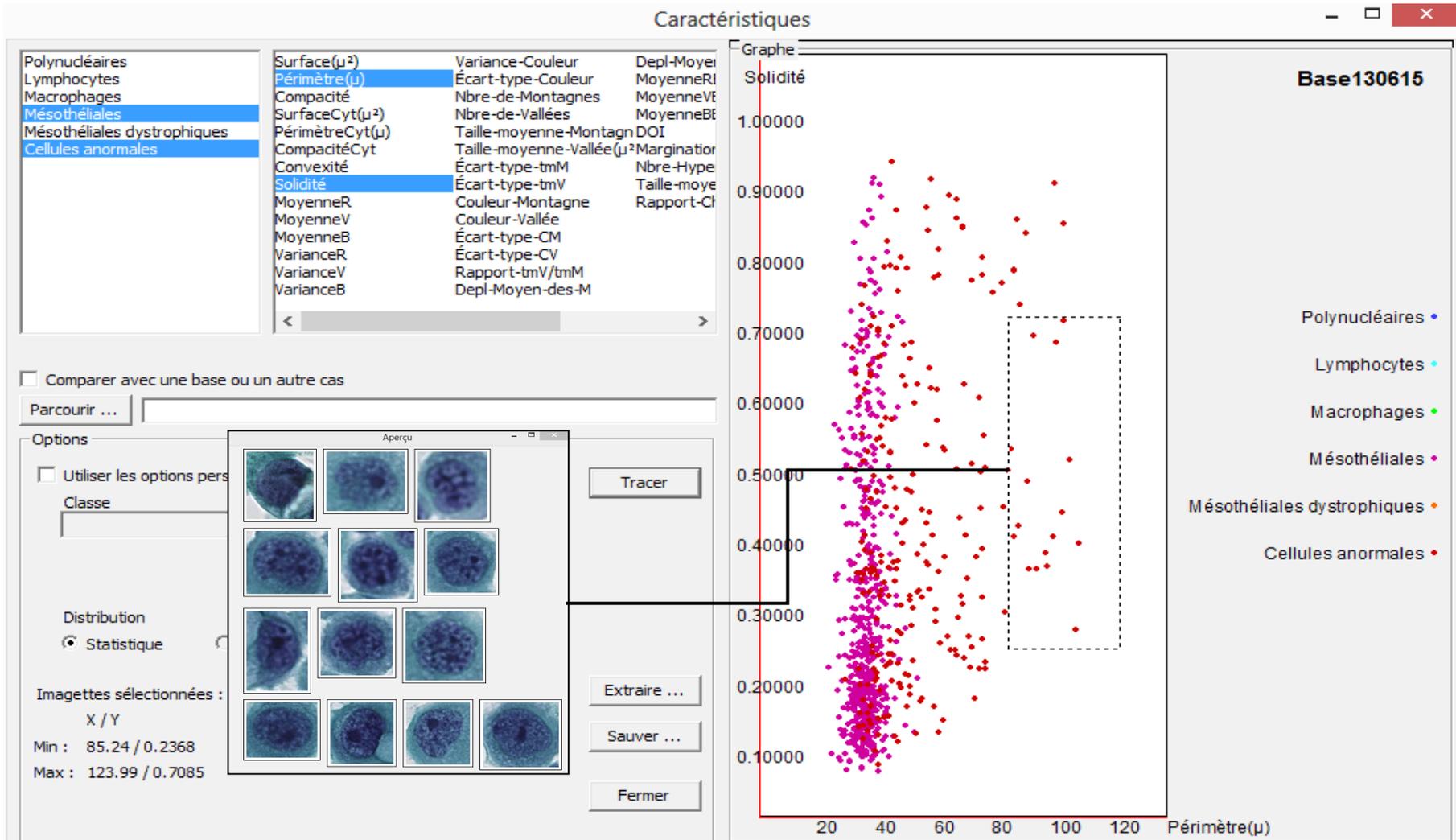
ARCTIC: caractérisation

- Fournit les attributs des objets extraits
- 31 caractéristiques nucléaires:
 - Taille
 - Forme
 - Couleur/niveaux de gris
 - Texture
 - Répartition spatiale de la chromatine

ARCTIC: classification

The screenshot displays the ARCTIC software interface. The main window is titled "Arctic - [BaseGP_new_modifie_sans_corbeille.app]". The menu bar includes "Fichier", "Édition", "Affichage", "Base", and "Fenêtre ?". The toolbar contains icons for file operations, editing, and navigation. The main area is titled "Cellules anormales" and contains a grid of 28 microscopic images of cells, arranged in four rows. The right-hand side features a "Gestion des imagerie" panel with a list of cell classes: Polynucléaires, Lymphocytes, Macrophages, Mésothéliales, Mésothéliales dystrophiques, and Cellules anormales. Below this list are buttons for "Reclasser", "Enregistrer", "Vider la corbeille", "Statistiques", "Sauver le buffer", "Charger le buffer", and "Caractéristiques". At the bottom of the panel, a list of "Classes de cellules de la base" includes "Cellules anormales" (highlighted), "Mésothéliales dystrophiques", "Mésothéliales", "Macrophages", "Lymphocytes", "Polynucléaires", and "Pas de groupe ou Corbeille". The status bar at the bottom shows "Prêt" on the left and "x = 151, y = 581" and "NUM" on the right.

Affichage des caractéristiques



Constitution de la base d'apprentissage

- Étalements de liquides pleuraux du CHPC colorés au Papanicolaou
- 10 cas malins → cellules mésothéliales néoplasiques
- 10 cas bénins → cellules mésothéliales non néoplasiques, cellules inflammatoires
- 2623 cellules:
 - Cellules anormales : 9,3 %
 - Cellules mésothéliales dystrophiques : 7,3 %
 - Cellules mésothéliales normales : 22 %
 - Macrophages: 16,3 %
 - Lymphocytes : 21 %
 - PNN : 24 %

Populations étudiées

- 18 cas de PMMI répertoriés par Mésopath entre 1998 et 2010 :
 - 9 sans évolution
 - 9 avec évolution
- 18 cas bénins du CHU (témoins)
- 10 cas bénins du CHPC (tests)
- 18 cas de MME du CHU (témoins)
- 10 cas de MME du CHPC (tests)
- Témoins = cytopspin Tests = étalements



Diagnostic cytologique en fonction du diagnostic histologique

Diagnostic cytologique	Diagnostic histologique			
	MME	PMMI	PMMI avec évolution	PMMI sans évolution
Malin	10	5	3	2
MME	9	3	2	1
Métastase	1	2	1	1
HMA	2	4	1	2
Bénin	3	6	4	2
NS	1	1	0	1
NR	2	2	1	2
Total	18	18	9	9
Sensibilité	67%		37%	
IC95%	[38%; 88%]		[8%; 76%]	
Spécificité				33%
IC95%				[4%; 78%]

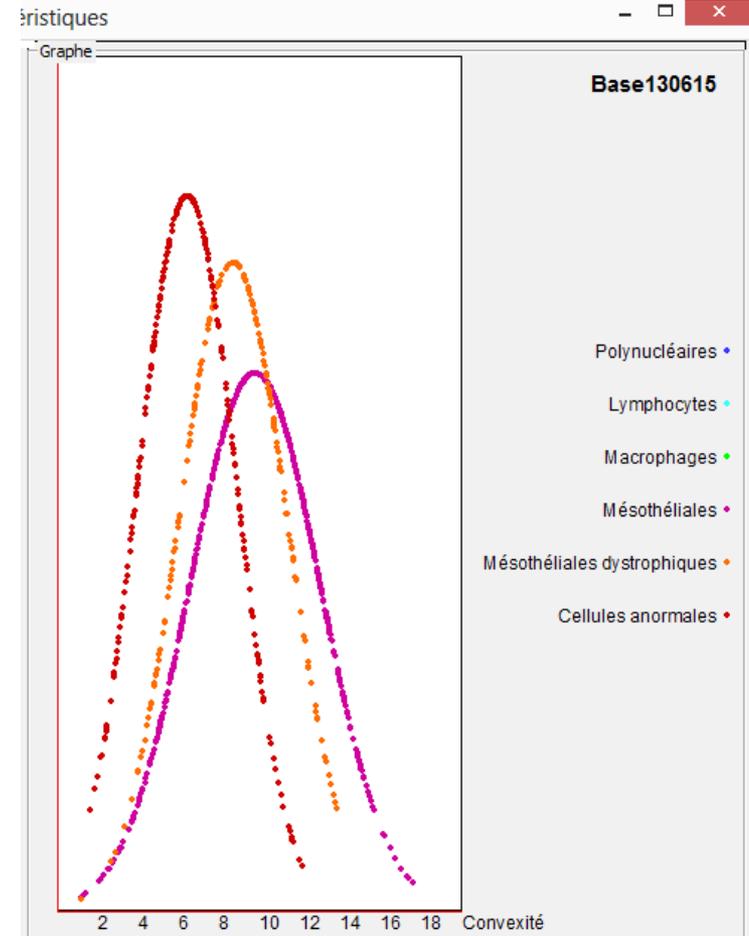
Comparaison entre AI et histologie

	MME test	MME témoin	Bénins test	Bénins témoin	PMMI avec évolution	PMMI sans évolution
AI +	8	7	4	4	5	3
AI -	2	1	2	14	3	6
NR	0	0	0	0	1	0
Total	10	8	6	18	9	9

	Se[IC]	Spe[IC]	VPP[IC]	VPN[IC]	Concordance
PMMI	62% [24%; 92%]	67% [11%; 88%]			
Test	80% [44%; 98%]	33% [22%; 96%]	67% [35%; 90%]	50% [6%; 93%]	
Témoin	87% [47%; 100%]	78% [6%; 48%]	64% [31%; 89%]	93% [68%; 100%]	74% [58%; 86%]
Test + Témoin	83% [58%; 96%]	67% [44%; 84%]	65% [43%; 84%]	84% [60%; 97%]	

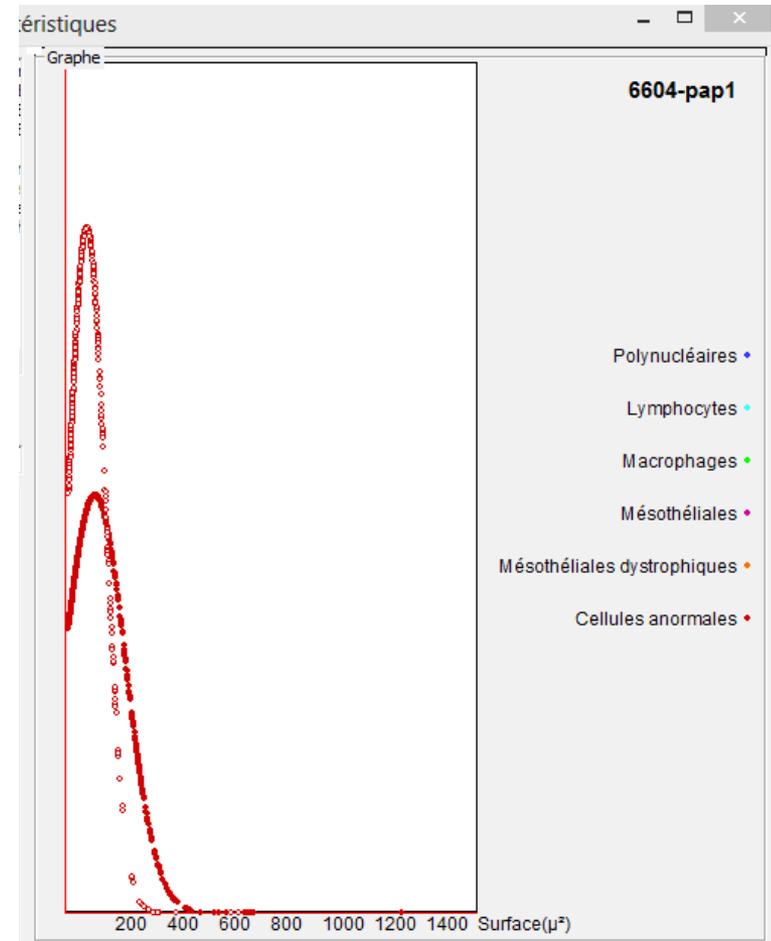
Résultats de l'étude des critères morphométriques de la base d'apprentissage

- Séparation des cellules mésothéliales bénignes vs malignes:
 - Taille
 - Forme
 - Texture :
 - montagnes/vallées
 - hypermottes
 - Répartition spatiale de la chromatine:
 - margination



Résultats de l'étude des critères morphométriques des PMMI

- Taille:
 - Surface
 - Périmètre
- Couleur:
 - Moyenne de rouge
- Texture:
 - Nombre des hypermottes
 - Taille moyenne des hypermottes
- Répartition spatiale de la chromatine:
 - Margination
 - Rapport chromatine / noyau



Conclusion

- ARCTIC: outil de dépistage performant pour le diagnostic de MME (Se: 83 %, VPN: 84 %)
- Outil supervisé (Spe: 67 %, VPP: 65 %)
- Il existe des critères morphométriques permettant de distinguer les PMMI avec évolution de ceux sans évolution
- Standardisation des techniques cytologiques
- Perspectives:
 - Corrélation entre résultat de la FISH p16 et l'AI
 - Enrichir ces nouvelles bases PMMI avec et sans évolution avec de nouveaux cas
 - Tester cet outil sur des liquides d'épanchements pleuraux de routine