Exploration de l'organisation interne des tissus tumoraux par imagerie volumétrique, méthodes numériques et apprentissage profond

Florian Robert

▶ **To cite this version:**

Florian Robert. Exploration de l'organisation interne des tissus tumoraux par imagerie volumétrique, méthodes numériques et apprentissage profond. Bio-informatique [q-bio.QM]. Université de Bordeaux, 2025. Français. ⟨NNT : 2025BORD0187⟩. ⟨tel-05351521⟩

HAL Id: tel-05351521

https://theses.hal.science/tel-05351521v1

Submitted on 6 Nov 2025

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

HAL Authorization

université de BORDEAUX

université de BORDEAUX

THÈSE PRÉSENTÉE

POUR OBTENIR LE GRADE DE

DOCTEUR
DE L'UNIVERSITÉ DE BORDEAUX

ECOLE DOCTORALE DE MATHÉMATIQUES ET D'INFORMATIQUE

SPÉCIALITÉ : INFORMATIQUE

Par **Florian Robert**

Exploration de l'organisation interne des tissus tumoraux par imagerie volumétrique, méthodes numériques et apprentissage profond

Sous la direction de : **Baudouin Denis de Senneville**
Co-directeur : **Christophe F. Grosset**

Soutenue le 29 septembre 2025

Membres du jury :

Mme. Karin Pernet Gallay	Ingénieure de Recherche, Université de Grenoble Alpes	Rapporteuse
M. Charles Kervrann	Directeur de Recherche, Université de Rennes	Rapporteur
Mme. Nataliya Sokolovska	Professeure des Universités, Sorbonne Université	Présidente
Mme. Christèle Etchegaray	Chargée de Recherche, Université de Bordeaux	Examinatrice
M. Baudouin Denis de Senneville	Directeur de Recherche, Université de Bordeaux	Directeur
M. Christophe F. Grosset	Directeur de recherche, Université de Bordeaux	Co-Directeur

Exploration de l'organisation interne des tissus tumoraux par imagerie volumétrique, méthodes numériques et apprentissage profond.

Résumé :

L'un des enjeux majeurs en oncologie pédiatrique est de concevoir des traitements plus efficaces, en particulier pour les formes métastatiques, récidivantes ou résistantes, tout en réduisant les effets secondaires. Pour y parvenir, une meilleure compréhension des mécanismes biologiques et du fonctionnement des tissus tumoraux est essentielle. Parmi les pistes actuellement explorées, l'organisation morphologique interne des tissus tumoraux pourrait jouer un rôle important dans la réponse des cellules aux traitements et, par conséquent, dans leur efficacité. C'est dans ce contexte que s'inscrit cette thèse, qui porte sur l'étude de l'organisation bioarchitecturale des tissus d'hépatoblastome, la tumeur hépatique maligne la plus fréquente chez l'enfant.

Les récentes avancées en imagerie tridimensionnelle offrent de nouvelles opportunités pour caractériser en détail les structures cellulaires et subcellulaires au sein des tissus biologiques. En particulier, la microscopie électronique à balayage de blocs en série permet d'acquérir des images volumétriques anisotropes à haute résolution, bien adaptées à l'étude de tissus de grande taille. L'objectif de ce travail est de transformer ces données complexes en une représentation numérique fidèle du tissu tumoral, à travers la construction d'un jumeau numérique.

Cette construction repose sur deux étapes complémentaires. La première partie de ma thèse consiste à développer des outils de segmentation automatisés pour identifier et individualiser les structures biologiques d'intérêt au sein du volume, notamment les cellules, les noyaux, les nucléoles, les réseaux mitochondriaux, les gouttelettes lipidiques, les capillaires sanguins et les zones hémorragiques. La seconde partie vise à exploiter cette segmentation pour analyser l'organisation interne du tissu à travers l'extraction de paramètres bioarchitecturaux. Mon travail de thèse a permis d'introduire 35 paramètres regroupés en cinq grandes catégories que sont la taille, la forme, les distances entre structures, l'orientation et la texture. L'analyse de ces données de grande dimension repose sur des méthodes d'apprentissage automatique non supervisé, permettant d'identifier des motifs d'organisation complexes et non triviaux au sein des tissus tumoraux.

L'ensemble de ces travaux s'inscrit dans une démarche de modélisation numérique de l'architecture tumorale à l'échelle cellulaire et subcellulaire. Cette approche permet d'explorer les comportements individuels et les interactions entre structures, dans le but de formuler, confirmer ou infirmer les hypothèses biologiques qui sous-tendent ces phénomènes tumoraux. Elle constitue un cadre méthodologique complet pour l'exploration automatisée, quantitative et interprétable des tissus biologiques d'intérêt. En offrant un accès inédit à l'organisation interne des tissus, elle a le potentiel de contribuer à une meilleure compréhension des tumeurs, d'améliorer le diagnostic, d'affiner le protocole thérapeutique, et, à terme, d'optimiser la prise en charge des enfants atteints de cancer.

Mots-clés : Microscopie électronique à balayage, Jumeau numérique, Segmentation, Exploration non supervisée

---

Institut de Mathématiques de Bordeaux, IMB

UMR5251 Université de Bordeaux, 351 cours de la Libération, Talence, F-33400, France.

Exploring the internal organization of tumor tissue through volumetric imaging, numerical methods, and deep learning.

Abstract: One of the major challenges in pediatric oncology is to design more effective treatments, particularly for metastatic, recurrent, or resistant forms, while reducing side effects. To achieve this, a better understanding of the biological mechanisms and the functioning of tumor tissues is essential. Among the avenues currently being explored, the internal morphological organization of tumor tissues could play an important role in how cells respond to treatments and, consequently, in their effectiveness. It is in this context that this thesis is situated, focusing on the study of the bioarchitectural organization of hepatoblastoma tissues, the most common malignant liver tumor in children.

Recent advances in three-dimensional imaging offer new opportunities to characterize in detail the cellular and subcellular structures within biological tissues. In particular, serial block-face scanning electron microscopy makes it possible to acquire anisotropic volumetric images at high resolution, well suited to the study of large tissue samples. The objective of this work is to transform these complex data into an accurate digital representation of the tumor tissue, through the construction of a digital twin.

This construction is based on two complementary steps. The first part of my thesis consists in developing automated segmentation tools to identify and individualize the biological structures of interest within the volume, notably cells, nuclei, nucleoli, mitochondrial networks, lipid droplets, blood capillaries, and hemorrhagic areas. The second part aims to exploit this segmentation to analyze the internal organization of the tissue through the extraction of bioarchitectural parameters. My thesis work made it possible to introduce 35 parameters grouped into five main categories: size, shape, distances between structures, orientation, and texture. The analysis of these high-dimensional data relies on unsupervised machine learning methods, making it possible to identify complex and non-trivial patterns of organization within tumor tissues.

All of this work is part of a digital modeling approach to tumor architecture at the cellular and subcellular scales. This approach makes it possible to explore the individual behaviors and interactions between structures, with the aim of formulating, confirming, or refuting the biological hypotheses underlying these tumor phenomena. It constitutes a complete methodological framework for the automated, quantitative, and interpretable exploration of relevant biological tissues. By offering unprecedented access to the internal organization of tissues, it has the potential to contribute to a better understanding of tumors, to improve diagnosis, to refine therapeutic protocols, and, ultimately, to optimize the care of children with cancer.

Keywords: Scanning electron microscopy, Digital twin, Segmentation, Unsupervised exploration

---

Institut de Mathématiques de Bordeaux, IMB
UMR5251 Université de Bordeaux, 351 cours de la Libération, Talence, F-33400, France.

Remerciements

Ça y est, c'est la fin du chapitre. Enfin, pour vous, c'est peut-être le début de la lecture de ce manuscrit, mais pour moi, ce sont les dernières pages d'une aventure scientifique, humaine et personnelle, vécue intensément pendant trois riches années.

Mes premières pensées vont naturellement à mon directeur de thèse, **Baudouin Denis de Senneville**, que je remercie profondément pour la confiance qu'il m'a accordée dès le début. Ton accompagnement bienveillant et stimulant a été déterminant dans la réussite de ce travail. Ton exigence scientifique, ta rigueur méthodologique et ta capacité à ouvrir de nouvelles perspectives ont été des sources d'inspiration constantes. Merci pour tes nombreuses relectures, tes conseils toujours pertinents pour renforcer l'impact des travaux, et pour toutes les connaissances que tu m'as transmises au fil de nos échanges.

Je tiens également à remercier très sincèrement mon co-directeur de thèse, **Christophe Grosset**. Merci pour ta confiance, pour ta patience, ta bienveillance, ta pédagogie et ta capacité à rendre la biologie compréhensible pour un mathématicien. Nos échanges n'ont pas toujours été simples : parler un langage commun entre biologie et mathématiques n'allait pas de soi, mais tu as toujours su faire preuve d'écoute et de curiosité pour construire ce pont entre nos disciplines. Tes relectures ont toujours permis de clarifier et enrichir la portée biologique des travaux, et je t'en suis profondément reconnaissant.

Je remercie sincèrement mes deux rapporteurs, **Karin Pernet-Gallay** et **Charles Kervrann**, d'avoir accepté de passer du temps à lire et évaluer mes travaux de thèse. Je vous remercie pour vos retours bienveillants et très pertinents qui m'ont permis d'améliorer ce manuscrit. J'ai été très honoré par votre présence lors de ma soutenance et les échanges intéressants que nous avons pu avoir. J'ai une pensée toute particulière pour **Nataliya Sokolovska**, qui m'a initié à l'analyse des données biomédicales et au *machine learning* lors de mon Master 2. Merci pour votre patience, votre bienveillance, et pour m'avoir transmis une partie de votre passion dans ce domaine. Merci également à **Christèle Etchegaray** d'avoir accepté d'évaluer mes travaux, pour le temps consacré à leur lecture attentive, ainsi que pour l'intérêt porté à ce travail interdisciplinaire.

Je souhaite ensuite témoigner ma reconnaissance à l'ensemble de notre consortium, **OncoNA**. Ce fut un véritable plaisir de participer aux réunions mensuelles et de pouvoir partager avec vous l'avancement de mes travaux. Un grand merci à **Etienne Gontier** pour ton écoute, ta pédagogie, la qualité de tes retours critiques et tes encouragements. Merci à **Fanny Decoeur** pour ton expertise en microscopie électronique ainsi que les bons moments et connaissances partagées à Oxford. Merci à **Laurent Facq** pour ton aide indispensable face aux nombreux défis tech-

niques, en particulier sur notre serveur de calcul : ta disponibilité et ta réactivité ont été déterminantes pour l'aboutissement de ces travaux. Merci à **Luc Laffite** d'assurer la continuité du projet et de t'atteler à rendre accessibles ces nombreuses lignes de code aux biologistes. Enfin, un immense merci à **Alexia Calovoulos** pour tes segmentations manuelles, longues et fastidieuses, que tu as réalisées malgré une charge de travail déjà conséquente. Merci également pour ton partage généreux de connaissances en biologie et en microscopie électronique.

Je remercie chaleureusement l'**Inserm** et l'**Inria** pour le financement de cette thèse dans le cadre du programme Santé Numérique, ainsi que l'**Institut National du Cancer** pour le soutien via le projet PLBIO n° 2023-156.

J'ai eu la chance de faire partie de l'équipe formidable **MONC** au sein de l'Institut de Mathématiques de Bordeaux. **Catherine**, merci sincèrement pour ton aide précieuse lors de mes nombreuses missions au cours de cette dernière année. Il n'a pas toujours été simple de saisir pleinement les contraintes de ton côté, et je te remercie pour ta patience, ta bienveillance et ta capacité à expliquer avec clarté et pédagogie. **Simone**, merci pour les rires et pour m'avoir initié à l'italien (même si ma progression reste discutable). **Simon**, merci pour nos discussions sportives, en particulier sur l'athlétisme, et bravo pour tes performances que j'ai suivies avec enthousiasme. **Virginie**, merci pour nos échanges, nos moments de découragement partagés et nos nombreux fous rires. **Kylian**, merci pour ta bonne humeur communicative, tes conseils pour améliorer mon anglais et les conférences que nous avons vécues ensemble récemment.

Un immense merci à l'ensemble de la cellule informatique. Je pense en particulier à **Sylvain**, **Thomas** et **Sandrine**, pour votre disponibilité constante, votre réactivité exemplaire et votre bienveillance face à mes nombreuses demandes techniques, parfois urgentes ou complexes. Sans votre soutien, aucun de ces travaux n'aurait pu aboutir.

Je tiens à remercier **Jean-François Aujol** et **François Dufour** pour m'avoir accordé leur confiance en me confiant des heures de TD. Merci pour nos échanges bienveillants et enrichissants.

Je tiens à exprimer ma profonde gratitude envers l'équipe **MIRCADE**, qui m'a accueilli avec bienveillance malgré ma présence parfois irrégulière. Ce fut un réel plaisir d'échanger avec vous et de partager de bons moments. Je pense en particulier à mes co-bureaux, **Guillaume** et **Hélène**. Un grand merci également à **Patrick** et **Chloé**, toujours fidèles au rendez-vous pour venir me saluer et discuter, que ce soit de science ou de tout autre chose.

Un grand merci à l'**équipe pédagogique de l'Institut de Mathématiques de Bordeaux**, que j'ai eu la chance de côtoyer tout au long de mon parcours universitaire. Vous m'avez transmis non seulement des savoirs, mais aussi une passion pour les mathématiques. Je pense notamment à **Arnaud Jehanne**, **Karim Kellay**, **Christine Bachoc**, **Michel Bonnefont**, **Marc Arnaudon**, **Renaud Coulangeon**, **Florent Jouve**, **Pierre Mounoud** et **Adrien Richou**. Quitter cet établissement après tant d'années – et notamment cette année intense de préparation à l'agrégation en 2019-2020 – ne se fait pas sans émotion.

Je remercie également les membres de mon comité de suivi, **Marc Landry** et **Pascal Desbarats**, pour la qualité de vos retours, votre regard toujours pertinent

et les échanges stimulants que nous avons eus lors de nos rendez-vous annuels. Ces moments ont toujours été pour moi un véritable plaisir, à la fois pour la richesse des discussions et pour la bienveillance avec laquelle vous avez accompagné mes avancées.

Je souhaite exprimer ma profonde reconnaissance à **mes amis**, qui ont contribué à rendre ces années de thèse plus légères et joyeuses. Quel plaisir d'avoir retrouvé **Adrien** pour quelques années supplémentaires à l'IMB. Merci pour ton aide précieuse, ton humour constant et ta bonne humeur communicative. Je repense à nos innombrables soirées passées à la BU pendant le Master, entre rigueur et éclats de rire. Merci à **Romain** pour nos échanges, parfois désespérés, et pour ce suivi mutuel de nos thèses respectives. Et surtout, merci pour ces semaines de ski dans les Alpes – il y en a au moins une que l'on n'est pas près d'oublier. Merci **TPH**, pour tes appels, pour ta présence simple et réconfortante, et ces très bons moments partagés. Tu as toujours su écouter avec attention, sans jugement, et ça compte énormément. Merci **Zizi** d'être là, super sympa. Enfin, une pensée toute particulière pour mes amis de très longue date, **Mathias** et **Tanguy** : c'est toujours un bonheur de se retrouver autour d'un verre (ou de plusieurs) et de se rappeler les vieux souvenirs.

J'ai une pensée tendre et reconnaissante pour **ma famille**, qui m'a toujours soutenu dans chacun de mes projets, sans condition. Merci à ma **maman**, pour ton amour indéfectible et ton soutien constant. Tu es toujours là pour me conseiller avec douceur et lucidité – même si je n'écoute pas toujours, j'entends souvent. Merci aussi d'avoir pris le temps de relire ce manuscrit avec attention, traquant les fautes que je ne voyais plus à force de relectures. Merci à mon **papa**, pour ton soutien, ta compréhension calme, et pour tous ces moments où tu as su m'extraire de la thèse avec humour et légèreté. Un grand merci à mon frère et mes sœurs, **Lucas**, **Manon** et **Anne**, pour votre indulgence et votre patience. Je sais que je n'ai pas été très présent ces dernières années, mais je crois que vous comprendrez pourquoi. Les week-end passés ensemble, les vacances ou ferias partagées m'ont permis de souffler, de décrocher un peu, pour mieux repartir. Je pense aussi avec affection à **Tonton Gilles**, à toutes ces sessions de surf, de ski, ces repas animés toujours accompagnés d'un bon vin – et surtout à ces éclats de rire et ces instants qui restent gravés. Je tiens également à remercier **Tonton Paco** pour la qualité de nos échanges, ton écoute toujours attentive, ta compréhension bienveillante et tes conseils aussi justes que précieux. Nos discussions m'ont souvent permis de prendre du recul, de voir les choses sous un autre angle, et m'ont été d'un grand soutien tout au long de cette aventure. Merci aussi à **Rémi**, pour tous ces repas partagés. La distance nous a éloignés géographiquement, mais jamais dans le cœur. Je pense avec émotion à **Emma** et **Franck** : votre amour inconditionnel, votre présence bienveillante depuis si longtemps sont une vraie force. Merci pour votre écoute, toujours ouverte, toujours sans jugement. Merci également à mes grands-parents, **Gérard**, **Arlette** et **Danielle** – j'ai beaucoup de chance de vous avoir, même si je ne prends pas toujours le temps de vous appeler aussi souvent que je le devrais. Et puis, une pensée toute particulière pour **Mario**, qui, j'en suis sûr, serait si fier de ce manuscrit, là où il est. Merci à **Billie**, qui m'a poussé à sortir de chez moi, pour ces balades ressourçantes en forêt ou au bord du lac – sans toi, j'aurais sans doute oublié de m'accorder ces moments d'air et de calme. À vous tous, je voulais simplement dire : je vous aime très fort.

Pour conclure – car on garde souvent le meilleur pour la fin –, j'adresse une pensée amoureuse à **Cécile**. Tu as su me soutenir, me comprendre, m'encourager, et parfois me forcer à lever le pied après de trop longues journées de travail. Je ne saurais te dire à quel point je t'en suis reconnaissant. Ta relecture attentive de ce manuscrit a permis d'éliminer les dernières fautes qui s'y étaient glissées, et je t'en remercie sincèrement. Et parce que tu sais que je suis toujours en quête de nouveaux défis, merci de m'accompagner avec enthousiasme dans toutes mes aventures. Merci de m'aimer comme tu le fais, chaque jour, et pour ta joie de vivre qui illumine mon quotidien.

Après trois mois de rédaction intense, l'aventure de la thèse s'achève ici. Ces derniers mots referment un chapitre de trois années rythmées par l'étude, le travail, mais aussi les rires, les bons moments, et les rencontres exceptionnelles – sur les plans professionnel comme personnel. Dès demain, une nouvelle aventure commencera. Mais avant cela, je profite de ces ultimes lignes pour remercier **ceux que j'ai oubliés**, et qui n'en sont pas moins essentiels.

Cette thèse commence ici pour les **lecteurs courageux**, que je tiens, enfin, à remercier chaleureusement.

Table des matières

Remerciements **1**

Liste des Acronymes **9**

Productions scientifiques liées à la thèse **11**

1 Introduction **13**
1.1 Fondements biologiques du cancer et enjeux de l'analyse de l'architecture tumorale . . . 14
1.1.1 Cancer pédiatrique : spécificités biologiques et enjeux cliniques 15
1.1.2 Hépatoblastome : de la clinique à l'architecture tumorale . . . 16
1.1.3 Microscopie électronique : un outil essentiel pour étudier l'architecture des tissus . . . 20
1.1.4 Jumeau numérique : de la segmentation à l'analyse bioarchitecturale . . . 25
1.2 Approches méthodologiques pour notre jumeau numérique du tissu tumoral . . . 29
1.2.1 Stratégies et limites de la segmentation des organites . . . 29
1.2.2 Segmentation des cellules : de la segmentation 2D des contours à la reconstruction 3D des cellules . . . 30
1.2.3 Analyse bioarchitecturale : quantifier l'organisation spatiale des tissus . . . 32
1.2.4 Vers une lecture quantitative et automatisée des architectures tissulaires . . . 33
1.3 Organisation détaillée du manuscrit de thèse . . . 33

2 Obtention d'un jumeau numérique : de l'échantillon à la segmentation des structures biologiques **37**
2.1 De l'échantillon biologique à la donnée numérique . . . 40
2.1.1 Acquisition des tissus : du prélèvement à l'image . . . 40
2.1.2 Pré-traitement et standardisation des données brutes . . . 41
2.2 Méthodes de segmentation en imagerie . . . 48
2.2.1 Approches classiques basées sur des caractéristiques manuellement extraites . . . 49
2.2.2 Approches variationnelles : équilibre entre fidélité aux données et régularité de la solution . . . 50

2.2.3 Méthodes par patchs : entre modélisation locale et apprentissage statistique . . . 51
2.2.4 Perceptron multicouche : apprentissage profond des représentations . . . 52
2.2.5 Réseau de neurones convolutifs : prise en compte de la structure spatiale des images . . . 54
2.2.6 U-Net : une localisation fine des structures d'intérêt . . . 55
2.3 Reconstruction numérique des structures tissulaires par segmentation 57
2.3.1 Capillaires sanguins et zones hémorragiques : un repérage facilité par leur morphologie . . . 57
2.3.2 Organites cellulaires : une extraction automatique des structures plus complexes . . . 58
2.3.3 Segmentation cellulaire : les limites des approches existantes . 61
Conclusion du chapitre . . . 63

3 Segmentation des cellules : de la segmentation des contours à la segmentation par instance 2D 65
3.1 Méthodes pour la reconstruction de régions manquantes dans une image 68
3.1.1 Opérateurs morphologiques : approche historique simple basée sur les éléments structurants . . . 68
3.1.2 Approches variationnelles : reconstruction par diffusion inspirée de modèles physiques . . . 70
3.1.3 Approches basées sur l'apprentissage profond : détection et reconstruction automatique des régions manquantes . . . 72
3.2 Fermeture des contours cellulaires 2D par apprentissage profond . . . 73
3.2.1 Opérateur de fermeture des contours cellulaires proposé (COp-Net) . . . 74
3.2.2 Simulation et enrichissement des données d'entrainement pour l'opérateur de fermeture COp-Net . . . 75
3.3 Validation expérimentale de l'opérateur de fermeture (COp-Net) . . . 84
3.3.1 Données utilisées pour l'entraînement, la validation et le test de l'opérateur de fermeture (COp-Net) . . . 84
3.3.2 Métriques d'évaluation de la fermeture des contours cellulaires 86
3.3.3 Sélection des hyperparamètres pour la simulation des dégradations locales d'information . . . 88
3.3.4 Comparaison avec des approches de l'état de l'art . . . 88
3.3.5 Évaluation et comparaison de l'opérateur de fermeture . . . 89
Conclusion du chapitre . . . 94

4 Segmentation par instance 3D des cellules à partir de résultats 2D 97
4.1 Segmentation par instance 3D à partir de résultats 2D coupe par coupe 100
4.1.1 Cohérence inter-coupes des labels : une méthode d'instanciation peu généralisable . . . 100
4.1.2 Composantes connexes : instanciation basée sur la connexité topologique . . . 101

4.1.3 Algorithme de partage des eaux : instanciation limitée par des erreurs résiduelles locales . . . 102
4.2 Approche proposée : segmentation par instance 3D à partir de sous-ensembles de résultats 2D fiables . . . 103
4.2.1 Contrôle qualité pour une sélection automatisée d'un sous-ensemble de segmentations 2D . . . 104
4.2.2 Revue des méthodes de propagation 3D des segmentations à partir d'un sous-ensemble d'annotations 2D . . . 105
4.2.3 Approche proposée pour la propagation 3D d'un sous-ensemble d'annotations 2D . . . 109
4.3 Validation expérimentale de la méthode proposée pour la segmentation par instance 3D des cellules . . . 109
4.3.1 Métriques d'évaluation . . . 110
4.3.2 Évaluation et comparaison de la méthode proposée . . . 111
Conclusion du chapitre . . . 114

5 Étude de l'architecture interne des échantillons 117
5.1 Définition de paramètres bioarchitecturaux pour la quantification systématique de l'organisation tissulaire interne . . . 120
5.1.1 Revue des paramètres d'analyse d'images pertinents pour la quantification de l'organisation tissulaire . . . 120
5.1.2 Vers une formalisation et une catégorisation des paramètres bioarchitecturaux . . . 122
5.2 Exploration des données bioarchitecturales par des approches inférentielles . . . 124
5.2.1 Aperçu des approches inférentielles pour l'exploration de données bioarchitecturales . . . 125
5.2.2 Prospection exploratoire préliminaire guidée par des hypothèses biologiques . . . 127
5.3 Exploration des données bioarchitecturales par des approches d'apprentissage non supervisé . . . 135
5.3.1 Aperçu des approches non supervisées pour l'exploration de données en grande dimension . . . 136
5.3.2 Exploration non supervisée pour révéler l'organisation interne des tissus tumoraux d'hépatoblastome . . . 138
Conclusion du chapitre . . . 141

Conclusion générale et perspectives 143

Bibliographie 149

A Deux cas d'études supplémentaires pour la validation de l'opérateur de fermeture (COp-Net) 173
A.1 Suivi temporel des cellules sur lame 2D . . . 173
A.1.1 Conditions expérimentales . . . 174
A.1.2 Résultats et comparaison des performances de l'opérateur de fermeture (COp-Net) . . . 174

A.2 Segmentation par instance dans les images d'histopathologie 176
A.2.1 Conditions expérimentales 176
A.2.2 Résultats des performances de l'opérateur de fermeture (COp-Net) 177

B Mise à disposition du code source et reproduction des résultats de l'opérateur de fermeture proposé (COp-Net) 181

C Ressources informatiques utilisées et détails d'implémentation 185

Liste des Acronymes

clDice *centerline Dice*. 86, 89–92, 172, 175

CNN réseaux de neurones convolutifs. 27, 29–31, 37, 54, 55, 59, 61, 63, 72, 73, 87, 88, 106, 142

EDP équation aux dérivées partielles. 30, 34, 70, 75, 76, 78, 84, 87–91, 93, 94, 104, 107, 170, 171, 173, 174, 177, 178

FIB-SEM microscopie électronique par sonde d'ions focalisés. 25

GAN réseau génératif adversarial. 31, 34, 47, 75, 79, 87–90, 93

GLCM matrice de co-occurrence des niveaux de gris. 119

HB hépatoblastome. 16–20, 24, 31, 32, 40–42, 58–60, 121, 125–131, 142

IRM imagerie à résonance magnétique. 119

MEB microscopie électronique à balayage. 21–25, 27, 29–31, 33, 62, 77, 81, 82, 89, 100, 110, 119

MET microscopie électronique en transmission. 21, 22, 40

MLP perceptron multicouche. 37, 52, 53, 63

NLM *non-local means*. 44–46

NSD distance surfacique normalisée. 86, 89–92, 172, 175

OMS Organisation Mondiale de la Santé. 14

PCA analyse en composantes principales. 120, 121

PDX dérivés de xénogreffes de patients. 31, 32, 40, 41, 58

SAM *Segment Anything Model*. 102, 106

SBF-SEM microscopie électronique à balayage de blocs en série. 22–26, 29, 31–34, 37, 40–43, 45, 46, 49, 57–65, 68, 73, 77, 81, 82, 84, 88–90, 93, 96, 100, 102, 104, 105, 107–112, 115, 118, 125, 126, 128–131, 137, 141, 173

SEM scanning electron microscopy. 21

SGD descente de gradient stochastique. 54

SNR rapport signal sur bruit. 41, 43–45, 63

TEP tomographie par émission de positrons. 119

ViT *Vision Transformer*. 102, 106

Productions scientifiques liées à la thèse

Journal Papers

[1] Florian Robert, Alexia Calovoulos, Laurent Facq, Fanny Decoeur, Etienne Gontier, Christophe F. Grosset et Baudouin Denis de Senneville. "Enhancing cell instance segmentation in scanning electron microscopy images via a deep contour closing operator". In : *Computers in Biology and Medicine* 190 (mai 2025), p. 109972. issn : 0010-4825. 10.1016/j.compbiomed.2025.109972.

Conference Proceedings

[2] Florian Robert, Alexia Calovoulos, Laurent Facq, Fanny Decoeur, Etienne Gontier, Christophe F. Grosset et Baudouin Denis de Senneville. "3D Semantic Cell Segmentation via Propagation of 2D Results and Integration of Intercellular Priors". In : *2025 IEEE 38th International Symposium on Computer-Based Medical Systems (CBMS)*. IEEE, juin 2025, p. 276-279. 10.1109/cbms65348.2025.00062.

[3] Florian Robert, Alexia Calovoulos, Laurent Facq, Fanny Decoeur, Etienne Gontier, Christophe F. Grosset et Baudouin Denis de Senneville. "A Comprehensive Framework for Unsupervised Deep Analysis of Tissue Bioarchitecture". In : *2025 IEEE 38th International Symposium on Computer-Based Medical Systems (CBMS)*. IEEE, juin 2025, p. 77-80. 10.1109/cbms65348.2025.00024.

[4] Florian Robert, Alexia Calovoulos, Laurent Facq, Fanny Decoeur, Etienne Gontier, Christophe F. Grosset et Baudouin Denis de Senneville. "Improving Cell Instance Segmentation in Scanning Electron Microscopy via Semantic Image Synthesis". In : *2025 IEEE 22nd International Symposium on Biomedical Imaging (ISBI)*. IEEE, avr. 2025, p. 1-5. 10.1109/isbi60581.2025.10980968.

Communications orales

— *3D semantic cell segmentation via propagation of 2D results and integration of intercellular priors*, **International Symposium on Computer-Based Medical Systems**, Madrid - Espagne (Juin 2025)
— *A comprehensive framework for unsupervised deep analysis of tissue bioarchitecture*, **International Symposium on Computer-Based Medical Systems**, Madrid - Espagne (Juin 2025)
— *Exploration spatiale de la bioarchitecture des tissus d'hépatoblastome par imagerie volumétrique, IA et mathématiques appliquées*, **Workshop IA**, Bordeaux - France (Mai 2025)
— *Spatial exploration of hepatoblastoma tissue bioarchitecture by volumetric imaging, AI and applied mathematics*, **Volume EM technology forum**, Oxford - United Kingdom (Octobre 2024)
— **MARGAUx PhD Days**, Poitiers - France (Mai 2023)

Communications orales invitées

— *Un aperçu de l'intelligence artificielle et son application à l'imagerie SBF-SEM pour l'étude architecturale des tissus tumoraux*, **Journées du Réseau Imageries en Microscopie Électronique**, Bordeaux - France (Mai 2024)
— *Etude de l'architecture des tissus tumoraux par imagerie volumétrique et intelligence artificielle*, **Assises Juridiques de la Santé et des biotechnologies**, Paris - France (Juin 2023)

Posters

— *Improving cell instance segmentation in scanning electron microscopy via semantic image synthesis*, **International Symposium on Biomedical Imaging**, Houston - USA (Avril 2025)
— *Study of hepatoblastoma tissue internal organization by applied mathematics and AI*, **Al & imaging for Cell and developmental biology : insights, limits and perspectives**, Paris - France (Septembre 2024)

Chapitre 1

Introduction

Sommaire

1.1 Fondements biologiques du cancer et enjeux de l'analyse de l'architecture tumorale 14

1.1.1 Cancer pédiatrique : spécificités biologiques et enjeux cliniques 15

1.1.2 Hépatoblastome : de la clinique à l'architecture tumorale 16

1.1.3 Microscopie électronique : un outil essentiel pour étudier l'architecture des tissus 20

1.1.4 Jumeau numérique : de la segmentation à l'analyse bioarchitecturale 25

1.2 Approches méthodologiques pour notre jumeau numérique du tissu tumoral 29

1.2.1 Stratégies et limites de la segmentation des organites . . . 29

1.2.2 Segmentation des cellules : de la segmentation 2D des contours à la reconstruction 3D des cellules 30

1.2.3 Analyse bioarchitecturale : quantifier l'organisation spatiale des tissus 32

1.2.4 Vers une lecture quantitative et automatisée des architectures tissulaires 33

1.3 Organisation détaillée du manuscrit de thèse 33

1.1 Fondements biologiques du cancer et enjeux de l'analyse de l'architecture tumorale

L'oncologie est la spécialité de médecine qui se consacre à l'étude, au diagnostic et au traitement des cancers. Ce domaine englobe une grande variété de pathologies qui dépendent de la localisation de la tumeur et de ses caractéristiques spécifiques. Le cancer est une pathologie complexe caractérisée par une prolifération cellulaire incontrôlée, résultant d'altérations génétiques et épigénétiques accumulées au fil du temps. Il représente l'une des principales causes de mortalité dans le monde, avec environ 10 millions de décès en 2020 selon l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS).

Au cœur de la maladie, les cellules cancéreuses présentes dans les tissus sains perturbent l'équilibre délicat de l'organisme. Dans un tissu fonctionnant normalement, les cellules travaillent dans un environnement régulé, adhérant à des contrôles stricts qui dictent leur croissance, leur division et leur mort. Cet équilibre permet aux tissus de conserver leur structure et de fonctionner efficacement, contribuant ainsi au bien-être général de l'organisme.

Mais parfois, une cellule, initialement semblable à ses voisines, subit une mutation dans son ADN bouleversant son comportement et l'émancipant des contrôles biologiques. Ainsi, cette cellule prolifère de manière excessive, échappe au système immunitaire et ignore les instructions d'apoptose, le mécanisme de mort programmée qui élimine les cellules défectueuses. Peu à peu, les cellules cancéreuses commencent à dominer, à se multiplier rapidement et à envahir les tissus sains environnants. Elles perturbent l'architecture et le fonctionnement des organes, créant une masse croissante, appelée tumeur, qui consomme des ressources et de l'énergie au détriment de la santé de l'organisme. Le danger ne s'arrête pas là. Certaines cellules acquièrent la capacité de migrer, de s'échapper du foyer tumoral pour se disséminer à travers le système sanguin ou lymphatique. Ce processus, la métastase, marque souvent un tournant dans l'évolution de la maladie, rendant son traitement plus complexe et impactant sévèrement le pronostic vital des patients.

Pour classifier cette progression, la médecine s'appuie sur un système de stade, allant de I à IV. Aux premiers stades, la tumeur est encore localisée et peu invasive. Aux stades avancés, l'envahissement des tissus environnants et la dissémination métastatique compliquent les options thérapeutiques. Longtemps fondé sur des critères anatomiques, ce système évolue désormais pour intégrer des facteurs propres au patient, tels que l'âge ou le profil génétique, soulignant la complexité d'une maladie où chaque cas est unique.

Ainsi, le développement du cancer n'est pas simplement une prolifération désordonnée de cellules. C'est une réécriture des règles fondamentales du vivant, une rupture avec l'ordre biologique établi, où l'interaction entre les cellules tumorales et leur micro-environnement joue un rôle essentiel dans la progression de la maladie, influençant la réponse aux traitements et les perspectives thérapeutiques.

Ces tumeurs malignes peuvent se développer dans presque tous les tissus de l'organisme et sont généralement classées en fonction de leur origine cellulaire et tissulaire. Parmi elles, les carcinomes, issus des cellules épithéliales, sont les plus fréquents chez l'adulte. Toutefois, chez l'enfant, le spectre des cancers diffère nota-

blement, tant dans leur nature que dans leur origine biologique. Les cancers pédiatriques regroupent des pathologies rares, souvent issues de cellules embryonnaires ou de tissus en développement, et présentent des particularités cliniques, histologiques et moléculaires qui les distinguent fondamentalement des cancers de l'adulte.

1.1.1 Cancer pédiatrique : spécificités biologiques et enjeux cliniques

Cette thèse s'inscrit dans le champ des cancers pédiatriques, qui constituent une priorité scientifique et médicale. Ce choix s'explique par l'orientation de l'équipe "Méthodes et Innovations pour la Recherche sur les Cancers de l'Enfant" (MIRCADE) du *Bordeaux Institute of Oncology* au sein de laquelle ce travail a été mené. Cette équipe est fortement impliquée dans la recherche sur les cancers de l'enfant car ces tumeurs représentent une porte d'entrée stratégique pour le développement de nouvelles approches en oncologie. Contrairement à une simple déclinaison des cancers adultes chez des patients plus jeunes, les cancers pédiatriques forment un ensemble de pathologies aux caractéristiques biologiques, cliniques et thérapeutiques spécifiques, qui appellent une approche différenciée tant sur le plan de la recherche que de la prise en charge médicale.

Sur le plan épidémiologique, le cancer reste une maladie rare chez l'enfant, représentant environ 1 à 2% de l'ensemble des cancers. En France, on recense chaque année près de 2500 nouveaux cas de cancers chez les enfants de moins de 15 ans, et environ 800 chez les adolescents de 15 à 19 ans. Malgré sa rareté, le cancer est la deuxième cause de mortalité chez l'enfant après les accidents domestiques, ce qui souligne l'importance d'une prise en charge précoce et adaptée. Grâce aux progrès réalisés en oncologie pédiatrique au cours des dernières décennies, le taux de survie à cinq ans dépasse aujourd'hui 80% dans les pays développés. Toutefois, ce chiffre global masque de fortes disparités selon le type de cancer et le contexte du patient [130].

Contrairement à l'adulte, chez qui les cancers résultent fréquemment d'expositions environnementales cumulées et de mutations somatiques acquises avec l'âge, les cancers pédiatriques sont souvent liés à des altérations génétiques précoces, survenant pendant le développement embryonnaire ou les premières années de vie. De ce fait, les tumeurs de l'enfant sont majoritairement d'origine embryonnaire ou mésenchymateuse, et comprennent des entités telles que les neuroblastomes, les leucémies aiguës, les lymphomes, les tumeurs du système nerveux central, ou encore les tumeurs hépatiques [96].

Les défis posés par le cancer pédiatrique sont nombreux. Sur le plan diagnostique, son caractère inattendu chez l'enfant rend la détection plus difficile : cette population ne fait généralement pas l'objet d'une surveillance spécifique, sauf en cas d'antécédents familiaux de cancer. Sur le plan thérapeutique, les traitements doivent être suffisamment agressifs pour éradiquer la tumeur, tout en limitant les effets secondaires à long terme sur un organisme en pleine croissance. Les enfants exposés à la chimiothérapie ou à la radiothérapie peuvent en effet développer des séquelles à long terme, affectant leur croissance, leur fertilité, leur fonction cardiaque, leur neurodéveloppement ou encore le développement cognitif. Un autre enjeu majeur réside

dans le manque de traitements spécifiquement développés pour les enfants. La majorité des protocoles thérapeutiques utilisés en oncologie pédiatrique sont dérivés de ceux conçus pour les adultes, avec des ajustements empiriques liés au poids ou à l'âge. Or, cette transposition est loin d'être optimale, compte tenu des différences biologiques fondamentales entre les tumeurs pédiatriques et adultes. Par ailleurs, le désintérêt relatif des compagnies pharmaceutiques pour les cancers pédiatriques s'explique en grande partie par leur faible incidence, qui en fait un marché restreint et peu rentable aux yeux de l'industrie. Fondés sur une logique de retour sur investissement, les efforts de recherche et développement se concentrent majoritairement sur des pathologies plus fréquentes. Cette réalité freine non seulement le développement de traitements spécifiques adaptés à l'enfant, mais complique également la mise en place d'essais cliniques dédiés, limitant ainsi l'accès des jeunes patients à des innovations thérapeutiques ciblées.

Dans ce contexte, une meilleure compréhension des spécificités biologiques des cancers pédiatriques est essentielle pour développer des stratégies diagnostiques et thérapeutiques personnalisées. Par la suite, nous nous intéresserons à l'étude de la tumeur hépatique maligne la plus fréquente chez l'enfant, l'hépatoblastome.

1.1.2 Hépatoblastome : de la clinique à l'architecture tumorale

L'hépatoblastome (HB) est une tumeur hépatique rare de l'enfant, représentant environ 1% de l'ensemble des cancers pédiatriques, mais constituant près de 80% des tumeurs hépatiques malignes dans cette population [3]. Elle survient principalement chez les enfants de moins de 4 ans, avec un âge médian au diagnostic d'environ 18 mois [101]. Son incidence annuelle est estimée entre 1 et 1,5 cas par million d'enfants de moins de 15 ans aux États-Unis et en Europe. En France, cela correspond à environ 10 à 15 nouveaux cas diagnostiqués chaque année. Une légère prédominance masculine est observée, avec un ratio de 1,5 à 2 garçons pour une fille. Par ailleurs, l'incidence de l'HB chez l'enfant a augmenté d'environ 3% par an entre 1992 et 2015 [100, 49].

Le principal facteur de risque identifié est le faible poids à la naissance. L'augmentation du taux de survie des nouveau-nés prématurés présentant un poids faible (moins de 2500g) ou très faible (moins de 1500g) coïncide avec la hausse de l'incidence de l'HB observée au cours des dernières décennies [105] (Figure 1.1). Il a également été rapporté que les cas d'HB survenant chez des enfants ayant un poids de naissance très faible sont plus fréquemment diagnostiqués à un stade avancé de la maladie [74].

D'autres étiologies ont été identifiées, bien que la majorité des cas restent sporadiques. Certains sont associés à des syndromes génétiques tels que la polypose adénomateuse familiale (liée à des mutations du gène APC), le syndrome de Beckwith-Wiedemann ou encore la trisomie 18 [170, 192]. Concernant le rôle du tabagisme parental, les données sont contradictoires : certaines études suggèrent une association possible, tandis que d'autres ne retrouvent aucun lien significatif [115, 66]. Ces résultats divergents ne permettent pas, à ce jour, de tirer de conclusion définitive.

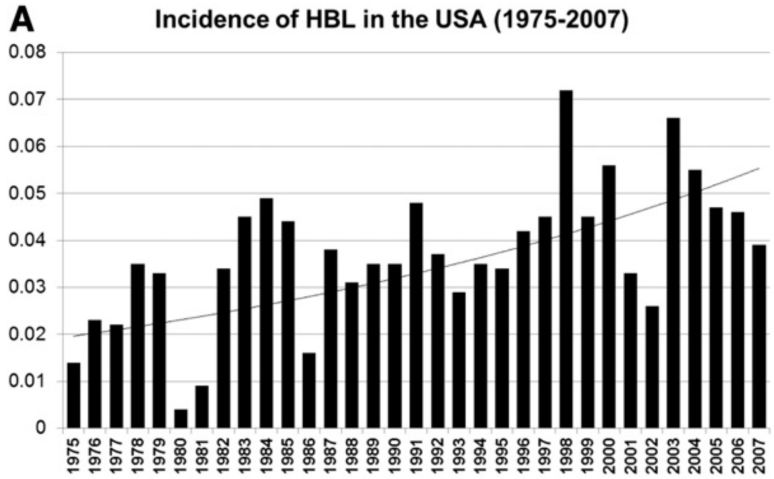


Figure 1.1 – Incidence de l'HB dans la population pédiatrique de 1975 à 2007. Reproduit avec l'autorisation de l'éditeur à partir de [37]. © Elsevier. Licence obtenue via le Copyright Clearance Center pour un usage académique non commercial.

Traitements de l'HB : limites actuelles et nouvelles pistes thérapeutiques

Le traitement de première intention contre l'HB repose principalement sur une chimiothérapie à base de cisplatine, un médicament anticancéreux très utilisé pour son efficacité à bloquer la prolifération des cellules tumorales. Ce traitement est généralement administré en deux temps : en phase néo-adjuvante, c'est-à-dire avant la chirurgie pour réduire la taille de la tumeur, puis en phase adjuvante, après l'intervention, pour éliminer les éventuelles cellules cancéreuses restantes. Lorsqu'il est associé à une chirurgie de résection du foie ou, dans certains cas, à une greffe hépatique, ce protocole permet d'atteindre une survie globale à cinq ans d'environ 82% [117].

Cependant, environ 20% des patients présentent des métastases pulmonaires au moment du diagnostic, et beaucoup développent des tumeurs étendues affectant plusieurs segments du foie, ce qui complique considérablement l'intervention chirurgicale [62]. Chez ces enfants atteints d'un HB dit « à haut risque », les traitements intensifs à base de cisplatine ont une efficacité limitée. En plus d'être très toxiques – avec des effets secondaires sévères et fréquents – ces traitements ne garantissent pas la survie. Environ 12% des patients rechutent après un traitement initial, et dans ces cas, les options thérapeutiques disponibles manquent, avec un taux de survie inférieur à 50% [47]. Cette faible efficacité en cas de rechute s'explique en grande partie par l'absence de traitements de seconde intention bien établis.

Par ailleurs, même lorsque le traitement parvient à éradiquer la tumeur, les enfants traités par chimiothérapie lourde ont un risque accru de développer de graves séquelles à long terme, notamment auditives, rénales ou neurologiques. Ainsi, l'un des grands enjeux actuels en oncologie pédiatrique est de proposer des traitements plus efficaces, notamment pour les formes métastatiques ou résistantes, tout en limitant les effets secondaires délétères [62, 70]. Le développement de nouvelles thérapies reste toutefois complexe, notamment en raison du faible nombre de patients concernés, ce qui complique la mise en place d'essais cliniques à grande échelle.

Dans cette optique, une molécule appelée irinotécan a suscité un intérêt croissant. L'irinotécan est un agent génotoxique, c'est-à-dire qu'il agit en endommageant l'ADN des cellules cancéreuses, ce qui peut entraîner leur mort. Il est déjà utilisé dans le traitement de plusieurs cancers, comme ceux du côlon ou du poumon [171]. Cette molécule a été récemment évaluée chez des patients atteints d'HB dans le cadre d'essais cliniques de phase I et II [85, 131]. Bien que des résultats encourageants aient été observés chez certains patients, l'efficacité de l'irinotécan reste très hétérogène. Cette variabilité empêche, à ce jour, son utilisation systématique comme traitement de seconde intention.

Dans ce contexte, l'identification de biomarqueurs prédictifs de la sensibilité tumorale à l'irinotécan pourrait fournir des éléments clés pour guider son emploi. Toutefois, malgré deux décennies de recherche, les mécanismes biologiques à l'origine de la résistance à l'irinotécan chez certains patients atteints d'HB demeurent encore mal compris. Une des hypothèses avancées est que l'organisation morphologique des tissus tumoraux pourrait moduler la réponse des cellules d'HB à l'irinotécan, influençant ainsi l'efficacité du traitement. Parmi les mécanismes potentiels impliqués, l'activation de la voie de signalisation Wnt/β-caténine – fréquemment observée dans l'HB – joue un rôle clé dans la réponse aux traitements et constitue donc une piste particulièrement pertinente pour étudier les phénomènes de résistance à l'irinotécan.

Voie de signalisation Wnt/β-caténine : un acteur clé de la tumorigenèse hépatique

Les voies de signalisation cellulaires sont des réseaux complexes de communication cellulaire qui permettent à une cellule de percevoir des signaux extérieurs – tels que des hormones, des facteurs de croissance ou des molécules environnementales – et d'y répondre par une cascade d'événements intracellulaires. Ces signaux, relayés par une succession de réactions biochimiques, régulent des fonctions essentielles telles que la prolifération, la différenciation, la migration ou encore la mort cellulaire.

Parmi ces voies, la voie de signalisation Wnt/β-caténine est particulièrement importante. Hautement conservée au cours de l'évolution, elle joue un rôle clé dans de nombreux processus physiologiques, notamment la régulation de l'expression génique, la prolifération et le métabolisme cellulaire [145]. En l'absence de signal Wnt, la β-caténine est phosphorylée par un complexe de dégradation, puis dirigée vers le protéasome pour y être dégradée (Figure 1.2a). En revanche, lorsque le ligand Wnt est présent, ce complexe est recruté à la membrane plasmique, empêchant ainsi la dégradation de la β-caténine. Cette dernière peut alors s'accumuler dans le cytoplasme, migrer vers le noyau et s'associer aux facteurs de transcription de la famille TCF/LEF pour activer la transcription de gènes cibles (Figure 1.2b).

Une dérégulation de cette voie peut conduire à des anomalies majeures du développement et est impliquée dans plusieurs cancers. Dans le cas de l'HB, on observe une sur-activation de la voie Wnt/β-caténine, principalement due à des mutations activatrices du gène *CTNNB1*, présentes dans 76 à 89% des cas, ou à des mutations inactivatrices des gènes *AXIN1* ou *APC*, retrouvées dans 5 à 6% des cas [198]. Par ailleurs, des travaux récents ont montré que cette activation s'accompagne de pro-

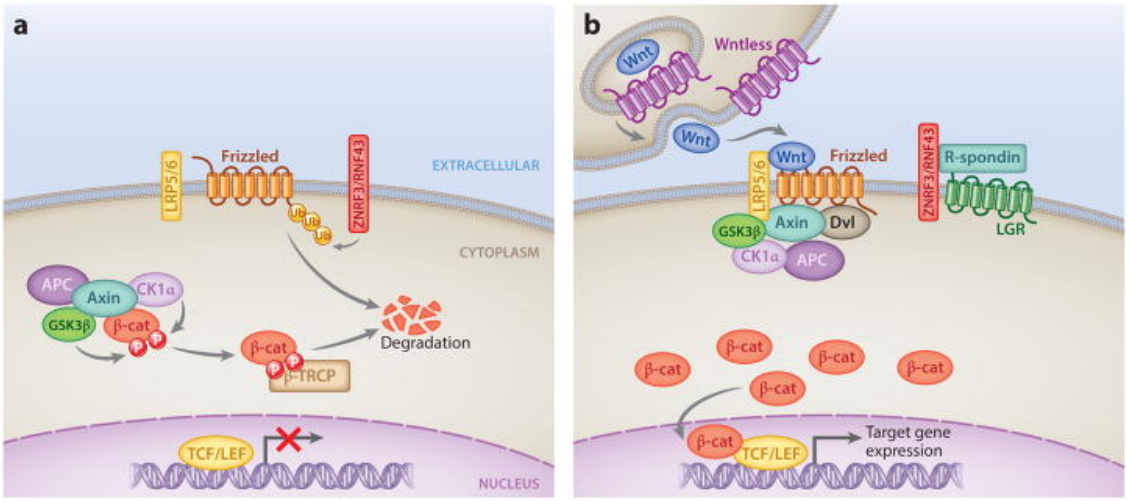


Figure 1.2 – La voie canonique de signalisation Wnt/β-caténine. (a) : En absence de Wnt, la β-caténine est phosphorylée par un complexe de dégradation (incluant *APC*, *Axin* et *GSK3*β), ce qui conduit à sa dégradation. (b) : En présence de Wnt, ce complexe est recruté à la membrane plasmique, empêchant la dégradation de la β-caténine. Cette dernière migre vers le noyau et active la transcription de gènes cibles via son interaction avec des facteurs de transcription de la famille TCF/LEF. Cette image est extraite de [145] et reproduite avec la permission de Annual Review of Pathology : Mechanisms of Disease, Volume 13 © 2018 by Annual Reviews (`http://www.annualreviews.org`).

fonds remaniements moléculaires et cellulaires au sein des tumeurs d'HB, notamment une augmentation de la taille et de la densité cellulaire. Ces observations renforcent l'idée que certaines voies de signalisation, telles que Wnt/β-caténine, pourraient modifier l'organisation des tissus tumoraux en contrôlant la croissance et le métabolisme des cellules malignes, ce qui pourrait influencer leur réponse aux traitements [200, 57].

Architecture du tissu tumoral : interactions et organisation spatiale

Le tissu tumoral est composé non seulement de cellules tumorales, mais également d'un ensemble complexe de cellules saines, de cellules immunitaires infiltrantes, de structures vasculaires et de composants de la matrice extracellulaire. Cette dernière désigne un réseau tridimensionnel de macromolécules (protéines, polysaccharides...) qui entoure les cellules et leur fournit un support structurel, tout en jouant un rôle essentiel dans la communication cellulaire, la migration et la différenciation. Les interactions entre ces différents éléments du microenvironnement tumoral influencent directement la croissance de la tumeur, sa capacité à envahir les tissus voisins et sa réponse aux traitements.

Parmi les cellules immunitaires présentes dans les tumeurs, les macrophages occupent une place importante. Ce sont des cellules du système immunitaire normalement chargées d'éliminer les débris cellulaires et les agents pathogènes. Cependant, dans le contexte tumoral, ces macrophages associés aux tumeurs peuvent être détournés par la tumeur et contribuer à sa progression. Ils favorisent alors la prolifération des cellules cancéreuses en sécrétant des facteurs de croissance et en remodelant la

matrice extracellulaire, facilitant ainsi l'invasion dans les tissus environnants [186, 187, 133].

D'autre part, la vascularisation de la tumeur est cruciale à sa survie. En effet, les cellules cancéreuses ont besoin d'un apport constant en nutriments et en oxygène, fourni par les capillaires sanguins. La formation de nouveaux capillaires (un processus appelé angiogenèse) est donc un aspect central de la pathologie [52, 16, 13, 59]. La proximité des cellules tumorales avec les capillaires, ainsi que leurs interactions structurales et fonctionnelles, peut fortement influencer leur capacité à se disséminer dans l'organisme.

Un autre aspect fondamental réside dans l'organisation des composants cellulaires et subcellulaires au sein de la masse tumorale. La morphologie nucléaire, la polarité cellulaire – c'est-à-dire l'orientation asymétrique des cellules dans l'espace, qui reflète souvent leur fonction et leur interaction avec l'environnement – et la distribution du réseau mitochondrial sont des indicateurs clés de la reprogrammation métabolique et du taux de prolifération des cellules cancéreuses [111, 81, 201, 63, 118]. Ainsi, une étude exhaustive de l'organisation 3D des tissus tumoraux d'HB permettrait de fournir des marqueurs morphologiques et de les associer à l'activation de certains gênes ou voies de signalisation, influençant l'efficacité de traitements tels que l'irinotécan.

Malgré les efforts et la variété de modèles 3D développés ces dernières années, notre connaissance actuelle sur l'architecture biologique des tumeurs et la distribution spatiale des cellules dans ces tissus est pauvre et descriptive. De fait, la plupart des recherches sont menées en utilisant la microscopie 2D, sans considérer l'organisation 3D des tissus tumoraux. Pour mener de telles études, il est essentiel de disposer d'acquisitions volumétriques à haute résolution permettant d'analyser la structure fine des tissus dans leur contexte tridimensionnel. Bien que certaines techniques d'imagerie optique avancée puissent offrir des représentations globales intéressantes, elles n'ont souvent pas la résolution nécessaire pour visualiser les détails subcellulaires avec précision. C'est pourquoi la microscopie électronique s'impose comme une approche de choix. Certaines technologies permettent de reconstruire en 3D les tissus avec une résolution nanométrique, offrant un accès unique à l'organisation des organites, des cellules et de leur environnement.

1.1.3 Microscopie électronique : un outil essentiel pour étudier l'architecture des tissus

La microscope électronique, inventée en 1931 par les ingénieurs Ernst Ruska et Max Knoll, utilise un faisceau d'électrons pour illuminer un échantillon et en créer une image très agrandie. Cette invention repose sur une propriété fondamentale de la mécanique quantique : les électrons, bien qu'étant des particules, se comportent aussi comme des ondes. Selon le physicien Louis de Broglie, toute particule en mouvement est associée à une longueur d'onde λ, appelée longueur d'onde de De Broglie, reliée à sa quantité de mouvement p par la relation suivante :

$$\lambda = \frac{h}{p}, \text{ où } h \text{ designe la constante de Planck.} \tag{1.1}$$

Autrement dit, plus une particule est rapide, plus sa longueur d'onde est courte. Les électrons accélérés dans un microscope électronique ont donc une longueur d'onde beaucoup plus petite que celle des photons de lumière visible utilisés dans les microscopes optiques. Cela permet d'obtenir des images avec une résolution bien plus élevée, atteignant des grossissements allant jusqu'à 2 millions de fois, contre environ 2500 fois pour les microscopes optiques. Cette avancée majeure dans la microscopie a valu à Ernst Ruska le prix Nobel de physique en 1986.

Le cœur de l'appareil est un canon à électrons qui émet un faisceau d'électrons accélérés dans une colonne maintenue sous vide, évitant ainsi toute interaction parasite avec les molécules de gaz [93]. Un ensemble de lentilles électromagnétiques façonne et dirige ce faisceau vers l'échantillon, où les électrons interagissent avec la matière. Ces interactions génèrent des contrastes qui révèlent des variations locales de composition chimique ou de densité et sont traduites en image par les lentilles objectifs. L'image formée est ensuite agrandie et projetée sur un détecteur, produisant une visualisation en niveaux de gris qui offre des informations détaillées sur la topographie et l'organisation interne de l'échantillon. Grâce à cette approche, la microscopie électronique est devenue un outil incontournable pour l'étude des matériaux et des systèmes biologiques à l'échelle subcellulaire. Dans la suite, nous décrivons les trois techniques principales de microscopie électronique, ce qui nous permettra de justifier celle qui a été utilisée pour générer les résultats présentés dans cette thèse.

Microscopie électronique à transmission : visualiser à très haute résolution

La microscopie électronique en transmission (MET) repose sur la transmission d'un faisceau d'électrons à travers une coupe ultrafine de l'échantillon, généralement d'une épaisseur d'environ 100nm. Les électrons transmis à travers l'échantillon sont détectés pour former une image (Figure 1.3).

L'utilisation de la MET permet de voir les colonnes d'atomes présentes dans les échantillons cristallins et les complexes moléculaires à l'intérieur des cellules. Elle permet de visualiser et d'analyser des échantillons avec des grossissements élevés, allant de l'échelle du micromètre au nanomètre (Figure 1.4). Cependant, cette technologie de microscopie est limitée par l'épaisseur de l'échantillon car les électrons ne peuvent pas facilement pénétrer dans des sections d'une épaisseur supérieure à 200nm. Dans ce cas, la microscopie électronique à balayage (MEB) est une alternative intéressante.

Microscopie électronique à balayage : révéler les reliefs et surfaces

A l'inverse, la microscopie électronique à balayage (MEB) ou *scanning electron microscopy (SEM)* est utilisée pour examiner la topographie et la morphologie de la surface des échantillons. Plutôt que de traverser l'échantillon, le faisceau d'électrons vient le balayer point par point, induisant l'émission d'électrons secondaires et rétrodiffusés, qui sont ensuite collectés par des détecteurs (Figure 1.5). L'écran de visualisation est balayé en synchronisation avec le faisceau sur l'échantillon dans une relation bijective entre les points sur l'échantillon et les points sur l'écran de

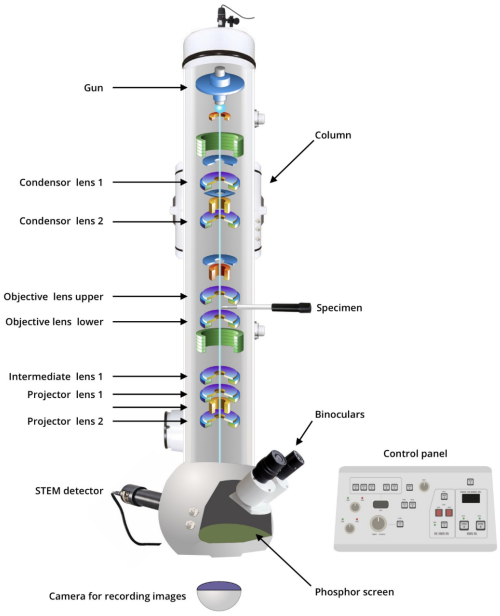


Figure 1.3 – Illustration schématique du MET montrant ses principales composantes. Les composants d'un MET sont disposés dans une longue colonne avec le canon à électrons au sommet. Le faisceau d'électrons généré par le canon à électrons descend la colonne à travers une série de lentilles électromagnétiques et traverse l'échantillon jusqu'à un collecteur d'images situé à la base. Cette image est partagée par Microscopy Australia grâce à une licence internationale Creative Commons Attribution-ShareAlike 4.0 sur leur site web MyScope (`https://myscope.training/TEM_Instrument_design`).

visualisation de l'image. L'intensité du signal varie en fonction de la composition et de la topographie de la surface de l'échantillon, générant une image 2D en niveaux de gris avec une profondeur de champ plus élevée que la MET (Figure 1.6). Cependant, cette approche permet uniquement d'analyser les couches superficielles de l'échantillon, justifiant la mise en place de technologie de MEB en 3D.

Microscopie électronique à balayage tridimensionnelle : reconstruire l'architecture tissulaire en profondeur

L'intérêt croissant pour la compréhension de l'organisation 3D des tissus ne pouvant être pleinement satisfait par la MEB seule, de nouvelles approches ont été développées pour permettre la reconstruction de la troisième dimension [28]. Ce n'est qu'au cours des 20 dernières années que les approches manuelles ont été remplacées par des approches automatiques, avec notamment la microscopie électronique à balayage de blocs en série.

Introduite dans les années 2000, la microscopie électronique à balayage de blocs en série (SBF-SEM) ou *serial block face-scanning electron microscopy* a révolutionné l'analyse des structures biologiques à l'échelle nanométrique en permettant l'acquisition automatisée de volumes d'échantillons grâce à un système de coupe intégré [41]. Son principe repose sur l'utilisation d'un ultramicrotome à l'intérieur de la chambre du MEB, qui réalise des coupes successives ultrafines de l'échantillon, généralement inclus en résine. Après chaque coupe, la nouvelle surface exposée est imagée par

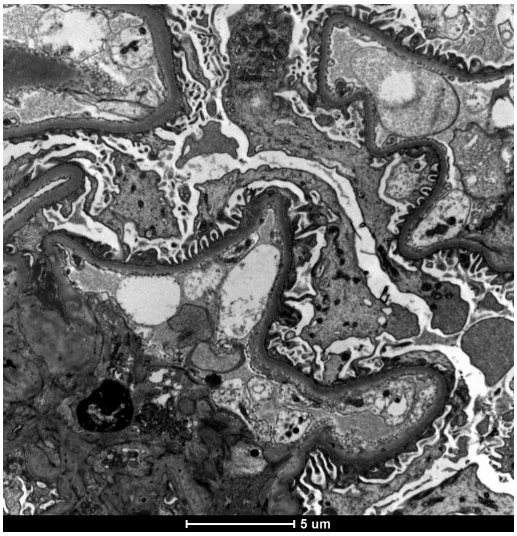


Figure 1.4 – Image acquise par MET avec un grossissement élevé. Cette image est extraite du site web MyScope de Microscopy Australia avec autorisation (`https://myscope.training/TEM_What_the_TEM_can_do`).

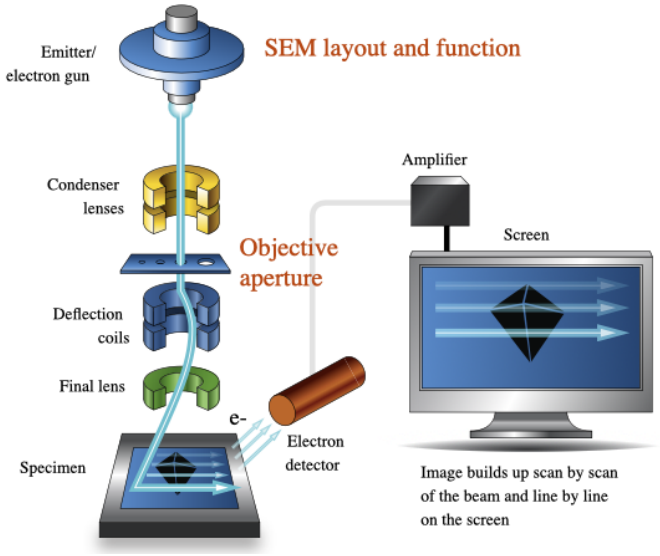


Figure 1.5 – Illustration schématique du MEB montrant ses principales composantes. Les électrons générés par le canon sont retrodiffusés sur l'échantillon, collectés par un détecteur, convertis en photons via un scintillateur, amplifiés dans un photomultiplicateur et convertis en signaux électriques utilisés pour moduler l'intensité de l'image sur l'écran de visualisation. Cette image est partagée par Microscopy Australia grâce à une licence internationale Creative Commons Attribution-ShareAlike 4.0 sur leur site web MyScope (`https://myscope.training/SEM_Structure_of_an_SEM`).

MEB. L'accumulation de ces images en série permet de fournir une imagerie volumétrique anisotrope de haute résolution (Figure 1.7), particulièrement adaptée aux échantillons biologiques de grande taille [73]. Cette capacité de haute résolution impose un compromis entre la capture de détails structurels fins et l'étude de régions tissulaires plus vastes. Néanmoins, la SBF-SEM permet la reconstruction

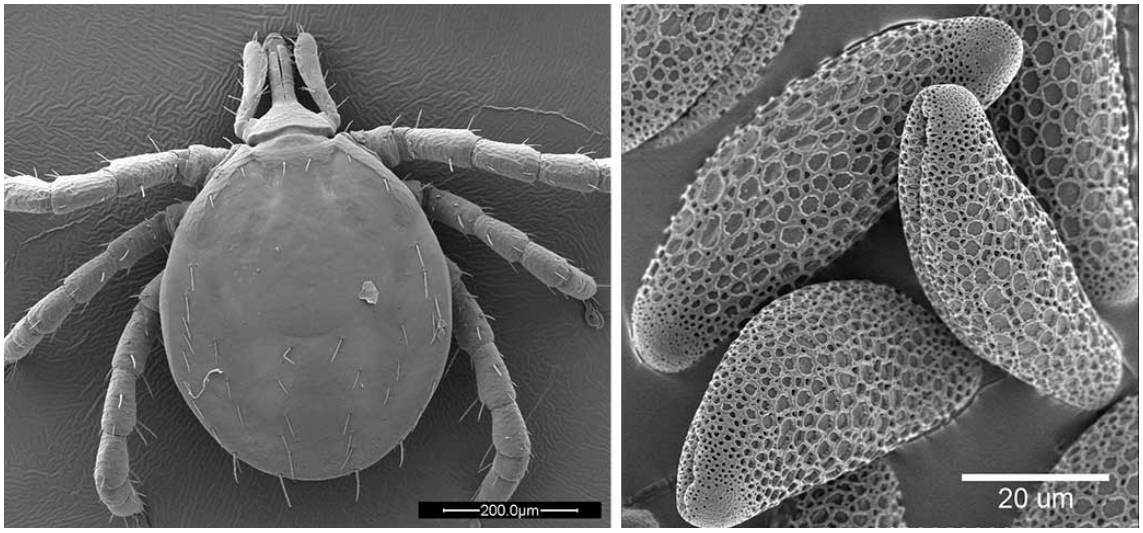


Figure 1.6 – Images acquises par MEB. (a) : Image d'une tique, (b) : Image du pollen de Bilbergia. Ces images sont partagées par Microscopy Australia grâce à une licence internationale Creative Commons Attribution-ShareAlike 4.0 sur leur site web MyScope (`https://myscope.training/SEM_Applications_and_uses_of_SEM`).

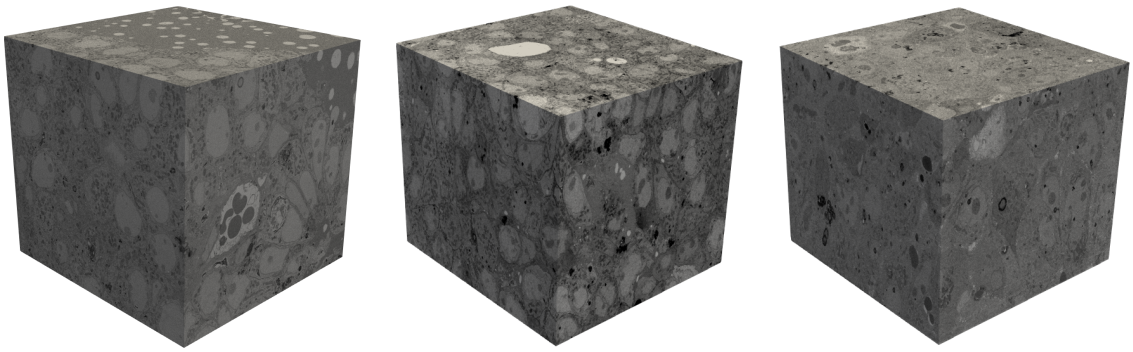


Figure 1.7 – Trois échantillons privés d'HB de 1000 coupes acquis par SBF-SEM.

3D de structures tissulaires complexes, y compris les cellules, les organites (noyaux, nucléoles, réseaux mitochondriaux) et les composants de la matrice extracellulaire. C'est précisément cette technique d'imagerie SBF-SEM qui a été utilisée dans le cadre de cette thèse pour générer les jeux de données analysés et permettre une exploration fine de l'organisation tissulaire d'échantillons d'HB en 3D.

Place de la microscopie électronique dans les stratégies d'acquisition d'image

D'autres modalités d'imagerie pourraient également être envisagées en fonction des objectifs biologiques visés. Par exemple, les techniques de microscopie optique en fluorescence, comme la microscopie confocale [123, 147] ou la microscopie à feuille de lumière, permettent d'imager de plus grands volumes tissulaires, avec des protocoles de marquage ciblant des structures ou des protéines d'intérêt. Ces approches sont cependant limitées par leur résolution (environ 200nm en xy, plusieurs centaines en z),

qui reste insuffisante pour capturer les détails subcellulaires observés en microscopie électronique.

Des variantes de la MEB 3D existent également, telles que la microscopie électronique par sonde d'ions focalisés (FIB-SEM), offrant une résolution plus fine mais sur des volumes plus restreints [92, 136, 157], ou la tomographie électronique, extrêmement précise mais limitée à quelques microns cubes [55, 58]. Ainsi, le choix de la SBF-SEM dans ce travail se justifie par la nécessité de couvrir des volumes représentatifs à l'échelle cellulaire tout en conservant une finesse suffisante pour l'analyse bioarchitecturale des structures subcellulaires.

La richesse et la complexité des données générées par la SBF-SEM soulèvent cependant des défis importants en termes de traitement et d'interprétation. La compréhension de l'architecture des tissus et l'étude de processus biologiques clés tels que les interactions cellule-cellule, le remodelage des tissus et la progression des maladies exigent le développement de méthodes robustes de segmentation, d'identification et de caractérisation [135, 67, 80].

1.1.4 Jumeau numérique : de la segmentation à l'analyse bioarchitecturale

À l'issue de l'acquisition d'images 3D à haute résolution par microscopie électronique, une nouvelle phase cruciale commence : celle de la transformation de ces données en une représentation numérique fidèle du tissu biologique. Cette étape, résolument portée par les sciences du numérique, constitue le cœur de cette thèse et vise à construire un modèle numérique détaillé de la tumeur, intégrant son organisation tissulaire à l'échelle cellulaire et subcellulaire, afin de restituer avec précision la complexité architecturale des tissus tumoraux observés. À terme, ce modèle pourrait permettre de **suivre l'évolution de la tumeur**, de **détecter d'éventuels dysfonctionnements** et de **simuler l'effet de traitements *in silico***, sans risque pour le patient.

Compte tenu de ces ambitions, ce modèle s'inscrit pleinement dans la logique d'un **jumeau numérique**, c'est-à-dire une réplique numérique d'un objet ou d'un système physique réel, intégrant ses caractéristiques structurelles et fonctionnelles, pour simuler, analyser, surveiller et optimiser ses performances dans un environnement virtuel [60]. Ce concept, initialement développé dans les domaines de l'ingénierie ou de l'industrie, s'étend aujourd'hui à de nombreux champs, y compris la santé, où il peut désigner par exemple un modèle numérique personnalisé d'un organe, d'un patient ou d'un tissu [174, 29, 191].

Dans le cadre de cette thèse, la construction de notre jumeau numérique s'appuie sur deux étapes complémentaires. La première consiste en une reconstruction 3D exhaustive et interprétable de l'organisation des structures biologiques – cellules, noyaux, capillaires, organites – obtenue par la segmentation par instance précise des volumes d'images issus de la microscopie électronique. Cette étape permet de délimiter, d'identifier et d'individualiser chaque structure d'intérêt au sein du volume, offrant un accès inédit à une base de données riche en informations morphologiques et spatiales complexes. La seconde étape dépasse la simple visualisation ou quantification locale. Grâce à l'analyse bioarchitecturale, il devient possible d'extraire des

paramètres quantitatifs caractérisant l'organisation spatiale, la forme et les relations entre les structures. Ces paramètres permettent alors d'explorer, de corroborer ou d'infirmer des hypothèses biologiques, posant les bases d'une compréhension intégrative et systémique de l'organisation tumorale.

Méthodes de segmentation pour la construction du jumeau numérique

La segmentation des structures biologiques est une étape cruciale et critique car elle conditionne la qualité et la fiabilité des analyses sur l'architecture cellulaire et tissulaire. En fonction des besoins, de la complexité des données et des ressources disponibles, plusieurs approches peuvent être envisagées, allant de la segmentation manuelle à des méthodes entièrement automatiques.

Segmentation manuelle : un point de départ indispensable pour la modélisation La segmentation manuelle consiste à annoter manuellement, coupe par coupe, les structures biologiques d'intérêts à l'aide d'une tablette et de logiciels spécialisés tels que ITK-SNAP, Slicer3D ou Fiji [193, 89, 149]. Bien qu'exigeante en temps, peu reproductible et fortement dépendante de l'expertise de biologistes ou de microscopistes, cette approche reste indispensable dans les contextes où aucune annotation préalable n'est disponible et où les outils automatiques sont inexistants ou inadaptés.

Elle constitue alors un point de départ essentiel pour amorcer le développement de méthodes numériques plus évoluées. En pratique, la segmentation manuelle est principalement mobilisée pour annoter un nombre restreint de structures ou pour produire des jeux de données de référence permettant d'entraîner, de calibrer ou d'évaluer des approches semi- ou entièrement automatiques.

Segmentation semi-automatique : un compromis entre contrôle et efficacité La segmentation semi-automatique a pour objectif de réduire la charge de travail en combinant l'intervention humaine avec des outils algorithmiques. Des approches classiques incluent l'utilisation de seuillages, d'interpolation, de contours actifs, de croissance à partir de graines [193, 89]. Des approches plus récentes utilisent des algorithmes de flux optique [194] ou des réseaux de neurones profonds [91, 134, 6, 184]. L'utilisateur peut, par exemple, initialiser manuellement certaines structures, que l'algorithme propage ensuite automatiquement sur l'image ou dans les images voisines. Ces approches permettent de gagner du temps et de réduire la pénibilité de la segmentation tout en conservant un certain contrôle sur les résultats. Cependant, elles sont sensibles à la qualité de l'imagerie et aux artéfacts présents sur les images, notamment en cas de débris lors des coupes par la SBF-SEM.

Segmentation automatique : des méthodes classiques aux approches par apprentissage profond La segmentation automatique repose sur des algorithmes capables d'identifier les structures d'intérêt sans intervention humaine directe. Si les approches les plus récentes reposent majoritairement sur l'apprentissage profond, elles s'inscrivent dans une tradition plus ancienne d'algorithmes déterministes.

Parmi ces méthodes classiques, les algorithmes de ligne de partage des eaux (ou *watershed*) ont été largement et longtemps utilisés. Inspiré par la topographie, cet algorithme interprète l'image comme une surface en relief où les intensités définissent les altitudes, puis simule une inondation progressive pour séparer les bassins versants. Il permet de segmenter efficacement des structures bien contrastées comme les noyaux ou les mitochondries [12]. Bien que classée comme méthode automatique, cette approche nécessite souvent des étapes préalables de seuillage ou de marquage manuel, la plaçant à l'interface entre segmentation automatique et semi-automatique. Son usage reste aujourd'hui marginal, principalement dans des pipelines simples ou lorsque peu de données annotées sont disponibles.

Ces dernières années, les méthodes basées sur l'apprentissage profond, en particulier les réseaux de neurones convolutifs (CNN), ont transformé le paysage de la segmentation. Des architectures comme le U-Net et ses variantes [140, 75, 76] permettent d'apprendre à segmenter directement à partir d'ensembles annotés, en exploitant la richesse des contextes spatiaux et morphologiques. Adaptables aux images 2D ou 3D, ces modèles offrent une segmentation rapide, reproductible et évolutive, même sur des structures biologiques complexes. Leur efficacité peut encore être renforcée par des stratégies telles que l'augmentation de données, la normalisation d'intensité ou l'introduction de modules d'attention [75, 76, 176]. Dans certaines situations, des étapes de post-traitement sont nécessaires pour affiner les résultats, notamment pour séparer des objets adjacents ou corriger des erreurs de fragmentation. L'ensemble des méthodes mentionnées ici ne constituent qu'un aperçu des stratégies existantes et seront décrites plus précisément dans les sections ultérieures de cette thèse.

Malgré les avancées considérables dans le domaine, la segmentation des données de MEB 3D reste un défi majeur. Les méthodes manuelles et semi-automatiques souffrent d'un manque de reproductibilité et ne sont pas adaptées à l'analyse de grands ensembles de données, notamment dans le cadre de l'imagerie 3D. Les méthodes automatiques basées sur l'apprentissage profond, quant à elles, nécessitent des jeux de données annotées de qualité pour l'entraînement, ce qui peut constituer un réel frein. De plus, la complexité des structures, la variabilité des contrastes, la présence d'artéfacts liés à la préparation des échantillons ou à l'acquisition, ainsi que le caractère anisotrope des données peuvent fortement perturber les performances des algorithmes.

Analyse bioarchitecturale des tumeurs

Une fois les structures d'intérêt segmentées avec précision, il devient possible d'exploiter pleinement le potentiel des données volumétriques issues de la MEB 3D en procédant à une analyse bioarchitecturale approfondie. Cette étape vise à caractériser l'organisation tissulaire en extrayant des paramètres morphologiques et spatiaux directement interprétables, en lien avec des hypothèses biologiques. L'objectif est de construire des représentations quantitatives fiables – appelées paramètres bioarchitecturaux – permettant l'exploration des données à l'aide de méthodes d'analyse statistique ou d'apprentissage non supervisé. Contrairement aux approches d'apprentissage profond, qui apprennent automatiquement des représentations à partir

des images ou des segmentations mais rendent difficile l'identification des éléments discriminants, notre démarche repose sur des paramètres guidés par la biologie. Cette approche favorise l'interprétabilité, facilite la comparaison entre échantillons, et permet de formuler et tester des hypothèses sur l'organisation des tissus.

Quels paramètres pour quantifier l'organisation tumorale ? De nombreux paramètres ont été définis dans la littérature pour décrire de manière quantitative l'organisation des tissus biologiques à partir d'images segmentées. Les plus couramment utilisés sont les paramètres morphologiques des noyaux et des cellules, tels que le volume, la sphéricité, l'allongement, la compacité ou encore l'orientation des axes principaux [40, 107]. D'autres métriques s'intéressent aux relations spatiales entre différentes structures, comme la distance entre les noyaux cellulaires et les capillaires, ou encore la proximité des organites, tel que le réseau mitochondrial ou les nucléoles, par rapport à l'enveloppe nucléaire [40, 63, 78]. À un niveau plus global, des mesures de connectivité avec des graphes de voisinages permettent d'explorer l'organisation tissulaire dans son ensemble, notamment dans les environnements à forte densité cellulaire [78]. Ces marqueurs bioarchitecturaux offrent une description quantitative fine de l'organisation des tissus, et sont essentiels pour comparer différents échantillons, détecter des altérations pathologiques ou encore étudier les processus biologiques sous-jacents.

Explorer et interpréter les données issues du jumeau numérique Une fois les paramètres extraits, diverses méthodes d'analyse non supervisée et fouille de données en grande dimension peuvent être mobilisées pour comparer des conditions expérimentales – par exemple entre tissus sains et tumoraux, entre régions distinctes au sein d'une même tumeur (analyse intra-tumorale), ou encore entre patients (analyse inter-tumorale). Sans prétendre à l'exhaustivité, certaines différences entre groupes peuvent être mises en évidence à l'aide de tests statistiques classiques, tels que le test de Student [164], dont les utilisations seront détaillées ultérieurement dans cette thèse. L'analyse de la distribution des paramètres peut également s'appuyer sur des méthodes de classification supervisée, comme les forêts aléatoires [69], ou de *clustering* non supervisé, telles que les *k-means* [160], pour identifier des sous-populations cellulaires ou faire émerger des motifs organisationnels récurrents. Enfin, la visualisation des paramètres dans l'espace offre une lecture plus intuitive des résultats, en particulier pour les biologistes ou cliniciens, et facilite la formulation d'hypothèses biologiques à partir des représentations quantitatives issues du jumeau numérique.

Malgré leur richesse considérable, les analyses bioarchitecturales existantes présentent plusieurs limitations majeures qui freinent leur pleine exploitation dans les études biomédicales. Tout d'abord, la diversité des éléments biologiques pris en compte est souvent restreinte, se limitant à quelques structures comme les noyaux, les nucléoles ou les mitochondries [106, 182, 63]. Cette approche parcellaire ne permet pas de saisir toute la complexité des tissus ni d'explorer finement les interactions entre les différents compartiments cellulaires et extracellulaires. Ensuite, les analyses quantitatives reposent fréquemment sur un nombre réduit d'échantillons, ce qui limite la robustesse des comparaisons statistiques et la généralisation des résultats à d'autres tissus [40, 80]. Ces deux aspects – la segmentation limitée à certains

organites et le nombre réduit d'échantillons utilisés – constituent des verrous méthodologiques que nous nous proposons de lever à travers les différentes contributions présentées dans cette thèse.

1.2 Approches méthodologiques pour notre jumeau numérique du tissu tumoral

Maintenant que nous avons présenté un panorama des principales méthodes d'analyse des données de MEB 3D, ainsi que leurs limites actuelles, nous allons détailler les développements méthodologiques que nous avons apportés dans ce domaine. Ils s'inscrivent dans une démarche globale visant à **améliorer la segmentation et l'analyse quantitative des structures biologiques** pour la conception de notre **jumeau numérique du tissu tumoral à l'échelle cellulaire et subcellulaire**. Dans les sections suivantes, nous décrivons les approches développées pour la segmentation des organites, la segmentation des cellules, ainsi que les méthodes mises en place pour l'analyse bioarchitecturale des tissus. Ces contributions s'appuient à la fois sur des développements méthodologiques, des implémentations techniques et une validation sur des cas biologiques concrets.

1.2.1 Stratégies et limites de la segmentation des organites

Notre première contribution porte sur le développement de méthodes pour la segmentation des organites à partir de volumes issus de la SBF-SEM. Nous nous sommes principalement intéressés à l'**identification** et à l'**individualisation** de **structures intracellulaires** et **extracellulaires** telles que les cellules, les noyaux, les nucléoles, les réseaux mitochondriaux, les gouttelettes lipidiques, ainsi que les capillaires sanguins et les zones hémorragiques.

Dans un premier temps, les capillaires sanguins et les zones hémorragiques ont été segmentés de manière semi-automatique. Grâce à leur morphologie caractéristique, cette tâche est relativement peu laborieuse et a permis de reconstituer leur structure en 3D. Dans un second temps, des travaux préliminaires ont permis d'obtenir des segmentations complètes et précises des noyaux, nucléoles, réseaux mitochondriaux et cellules au sein d'un échantillon [40]. Des annotations manuelles complémentaires ont été réalisées pour les gouttelettes lipidiques. Ces jeux de données annotées ont ensuite servi à l'entraînement de CNN, dans le but d'automatiser complètement la segmentation de ces structures plus complexes.

Au cours de ces développements, nous avons observé une forte dépendance des performances des modèles aux caractéristiques biologiques et techniques des tissus, en particulier lorsque les échantillons proviennent de patients différents. Les variations inter-tumeurs, les protocoles de fixation ou encore les différences dans les conditions d'acquisition peuvent en effet altérer l'aspect des structures d'intérêt et réduire la robustesse des modèles. Pour pallier à cela, des corrections manuelles ont été apportées à certains échantillons supplémentaires afin de les intégrer dans l'ensemble d'entraînement, dans une logique d'augmentation de la diversité et de l'amélioration de la généralisation.

Cependant, la **correction manuelle des segmentations cellulaires** s'est révélée bien **trop fastidieuse** pour être envisagée à grande échelle. De fait, dans les tissus tumoraux, les cellules sont souvent extrêmement compactes en raison des fortes pressions mécaniques intra-tumorales. Par ailleurs, les membranes cellulaires sont parfois difficilement discernables par les biologistes, en fonction des méthodes de fixation des tissus et des paramètres d'acquisition du microscope utilisés. Ces difficultés limitent considérablement la précision des segmentations automatiques des cellules. Cela souligne la nécessité de développer de nouvelles approches, plus robustes, afin d'améliorer significativement la qualité des segmentations, notamment pour les structures aux contours peu marqués telles que les cellules.

1.2.2 Segmentation des cellules : de la segmentation 2D des contours à la reconstruction 3D des cellules

Notre deuxième contribution porte sur le développement de nouvelles méthodes pour améliorer la segmentation des cellules dans les volumes issus de la MEB 3D. Compte tenu des difficultés mentionnées précédemment – notamment la forte compacité cellulaire et la faible visibilité des membranes – il s'avère plus pertinent de cibler en priorité la segmentation des contours cellulaires plutôt que les cellules directement.

En pratique, les **corrections résiduelles pour les biologistes consistent principalement à combler des discontinuités dans les contours cellulaires segmentés** (Figure 1.8). Nous avons donc abordé cette problématique en deux étapes. Dans un premier temps, nous nous sommes focalisés sur l'amélioration des segmentations en 2D, coupe par coupe, en développant des outils permettant de **raffiner les segmentations des contours cellulaires** de manière plus fiable et entièrement automatique. Dans un second temps, nous avons exploré des stratégies d'extension le long de l'axe z, afin de **reconstituer la forme 3D de chaque cellule à partir des résultats 2D**, tout en garantissant la cohérence inter-coupes.

Amélioration 2D des contours cellulaires

La première étape de cette approche vise à améliorer la qualité des segmentations 2D en se concentrant sur la **fermeture des contours cellulaires**, souvent incomplets ou altérés dans les segmentations initiales. Pour cela, nous avons conçu un opérateur de fermeture original, appelé **COp-Net** (*Cell Contour Closing Operator Network*), inspiré du comportement d'un biologiste expert corrigeant manuellement les contours à l'aide d'un stylet sur une tablette graphique. Ce module, basé sur un CNN, est entraîné pour identifier les discontinuités dans les contours segmentés et les refermer automatiquement, mimant ainsi l'action du biologiste dans un processus de correction itératif.

Afin d'entraîner ce modèle à reconnaître et corriger des altérations réalistes, nous avons développé deux méthodes de simulation de dégradations locales à partir de contours correct :

— Le première repose sur la **résolution d'une équation aux dérivées partielles (EDP) de diffusion**, permettant de simuler des pertes d'information

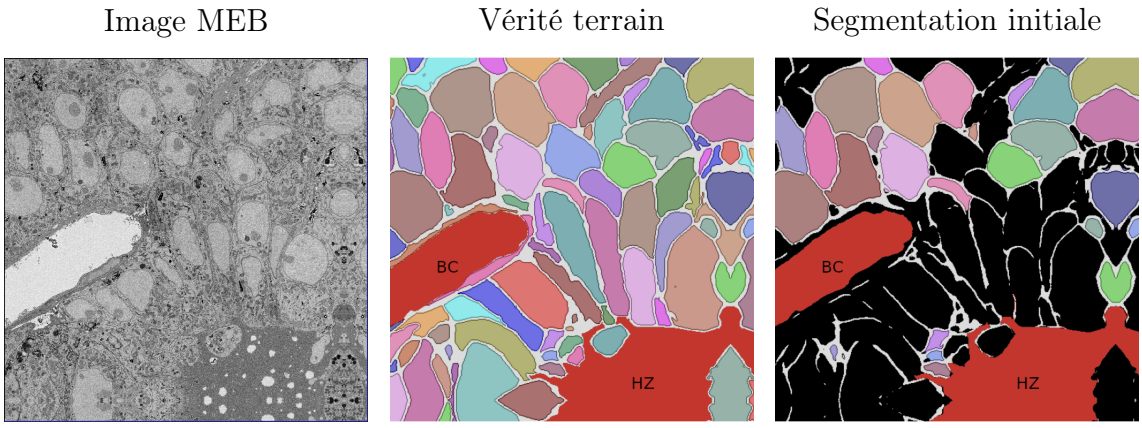


Figure 1.8 – Visualisation des discontinuités dans les segmentations initiales des contours cellulaires. (a) : Coupe acquise par SBF-SEM. (b-c) : La couleur blanche représente les contours cellulaires, la couleur rouge représente le capillaire sanguin (BC) et la zone hémorragique (HZ) obtenus par segmentation semi-automatique, les cellules colorées représentent les cellules étiquetées avec précision par rapport à la vérité de terrain (b), et la couleur noire indique les erreurs par rapport à la vérité terrain.

localisées dans les contours.

— La seconde s'appuie sur un **réseau génératif adversarial (GAN) conditionnel** pour générer des segmentations dégradées visuellement proches de celles observées dans les segmentations initiales.

Nos évaluations, menées à la fois sur des jeux de données publics et sur des jeux de données privés issus d'échantillons tumoraux d'HB dérivés de xénogreffes de patients (PDX) acquis par SBF-SEM, montrent que le COp-Net améliore significativement la segmentation par instance des cellules. L'approche permet non seulement de renforcer la précision des contours, mais aussi de réduire substantiellement le besoin de corrections manuelles par les biologistes experts, ce qui constitue un gain considérable en temps et en fiabilité.

Reconstruction 3D des cellules

L'extension des méthodes de segmentation à la 3D représente un défi majeur. Bien que les CNN 3D soient couramment utilisés pour ce type de tâche, leur mise en œuvre reste limitée par plusieurs facteurs : la nécessité de disposer de volumes annotés de manière exhaustive, ainsi que les coûts élevés en mémoire et en temps de calcul. Pour surmonter ces limitations, nous proposons une approche entièrement automatisée pour **générer des segmentations 3D précises des cellules** à partir d'images de MEB 3D, en s'appuyant sur une **stratégie de propagation des segmentations 2D**. Cette méthode exploite les résultats produits par notre pipeline de segmentation 2D, enrichis d'un module de contrôle qualité qui identifie automatiquement un sous-ensemble de coupes avec des segmentations fiables pour chaque cellule. Ces résultats de confiance sont ensuite propagés le long de l'axe z pour reconstruire individuellement chaque cellule en 3D.

Notre approche a été évaluée sur un jeu de données privé acquis par SBF-SEM à partir de tissus tumoraux d'HB PDX. Les résultats montrent une augmentation notable du nombre de cellules correctement segmentées par rapport aux approches existantes, tout en réduisant la nécessité de corrections manuelles. Par ailleurs, nous démontrons que l'**intégration d'*a priori* intercellulaires au sein des images** améliore la qualité et la robustesse de la reconstruction 3D.

Ces développements méthodologiques constituent les fondations nécessaires à la construction de notre jumeau numérique de chaque échantillon biologique pour l'analyse bioarchitecturale. En rendant possible la détection, l'individualisation et la reconstruction tridimensionnelle des structures d'intérêt, ils permettent d'accéder à une copie numérique riche et structurée du tissu. Cette digitalisation ouvre la voie à une nouvelle phase d'analyse – notre troisième contribution – qui vise à extraire des paramètres bioarchitecturaux quantitatifs, décrivant les relations spatiales, morphologiques et fonctionnelles entre les différentes structures segmentées.

1.2.3 Analyse bioarchitecturale : quantifier l'organisation spatiale des tissus

La troisième contribution de cette thèse porte sur l'analyse bioarchitecturale des échantillons biologiques volumiques, une étape clé pour extraire de la représentation numérique une compréhension fine de l'organisation cellulaire et subcellulaire. Cette analyse repose sur deux axes principaux : la **définition rigoureuse de paramètres bioarchitecturaux** pertinents caractérisant les structures segmentées, et leur **exploration non-supervisée** afin de mettre en évidence des relations, des motifs organisationnels ou des hétérogénéités au sein des tissus analysés.

Définition et catégorisation de paramètres bioarchitecturaux

Afin de tirer pleinement parti de la copie digitale 3D obtenue, nous avons défini un ensemble de paramètres permettant de quantifier l'organisation spatiale des tissus biologiques à l'échelle cellulaire et subcellulaire. Ces paramètres, que nous appelons paramètres bioarchitecturaux, visent à capturer la diversité morphologique des structures identifiées, ainsi que leurs relations dans l'espace.

Nous avons regroupé ces paramètres en **cinq grandes catégories complémentaires** : taille, forme, distance entre les structures, orientation et texture. Au total, nous avons **défini et extrait 35 paramètres bioarchitecturaux** à partir de nos volumes segmentés. L'ensemble de ces paramètres constitue une base robuste pour l'analyse quantitative des tissus, en permettant non seulement la comparaison de différents volumes, mais aussi la mise en évidence de motifs organisationnels à l'intérieur d'un même échantillon.

Exploration non-supervisée : révéler l'organisation des tissus

Afin d'exploiter pleinement la richesse des paramètres bioarchitecturaux définis précédemment, nous avons développé une approche d'exploration non-supervisée des données issues de la copie digitale d'un échantillon. Cette stratégie vise à révéler,

sans hypothèses préalables, des relations structurelles, des motifs organisationnels et des marqueurs cellulaires caractéristiques au sein des tissus analysés.

Dans un premier temps, nous avons étudié **les redondances et les complémentarités entre les paramètres**, tant au sein d'une même catégorie qu'entre catégories différentes, afin d'évaluer leur cohérence et leur portée descriptive. Nous avons ensuite identifié les **paramètres les plus discriminants pour différencier les cellules endothéliales des cellules tumorales**, en nous appuyant sur des méthodes d'apprentissage machine non-supervisé. Cette analyse permet d'identifier les paramètres bioarchitecturaux porteurs d'une information structurelle unique, tout en révélant les groupes de paramètres corrélés partageant une variance commune. Ces regroupements apportent un éclairage sur la redondance ou la complémentarité des paramètres, ainsi que sur leur signification biologique et leur potentiel interprétatif.

1.2.4 Vers une lecture quantitative et automatisée des architectures tissulaires

L'ensemble de ces contributions s'inscrit dans la démarche globale de la construction d'un jumeau numérique du tissu à l'échelle cellulaire et subcellulaire. En combinant des outils robustes de segmentation des organites et des cellules à partir d'images MEB 3D, et des méthodes d'analyse bioarchitecturale adaptées à la complexité des données, cette thèse propose un cadre méthodologique complet pour l'exploration automatisée et interprétable de l'architecture des tissus biologiques à l'échelle microscopique.

1.3 Organisation détaillée du manuscrit de thèse

Ce manuscrit peut être lu comme le récit structuré et chronologique des développements méthodologiques réalisés au cours de cette thèse, depuis la numérisation tridimensionnelle d'un échantillon biologique jusqu'à l'analyse quantitative de son organisation interne, comme illustré par la Figure 1.9. Chaque chapitre s'appuie sur les résultats des précédents pour construire un cadre complet, automatisé et reproductible. Ce cheminement progressif aboutit à la création de notre **copie digitale 3D fidèle de l'échantillon biologique**, sur laquelle reposent nos analyses bioarchitecturales.

Le chapitre 2 est consacré à l'étape de segmentation, qui constitue un préalable essentiel à toute analyse morphométrique ou topologique. Après l'acquisition des données par SBF-SEM, nous mettons en œuvre des algorithmes de segmentation issus de l'état de l'art pour extraire automatiquement les principales structures biologiques. Nous abordons dans un premier temps les entités plus facilement identifiables, telles que les capillaires sanguins ou les zones hémorragiques, caractérisées par des morphologies et des contrastes bien définis. Le chapitre s'attarde ensuite sur la segmentation d'organites intracellulaires plus complexes – noyaux, nucléoles, réseaux mitochondriaux et gouttelettes lipidiques – nécessitant l'usage de méthodes d'apprentissage profond entièrement automatiques. Enfin, nous montrons que ces

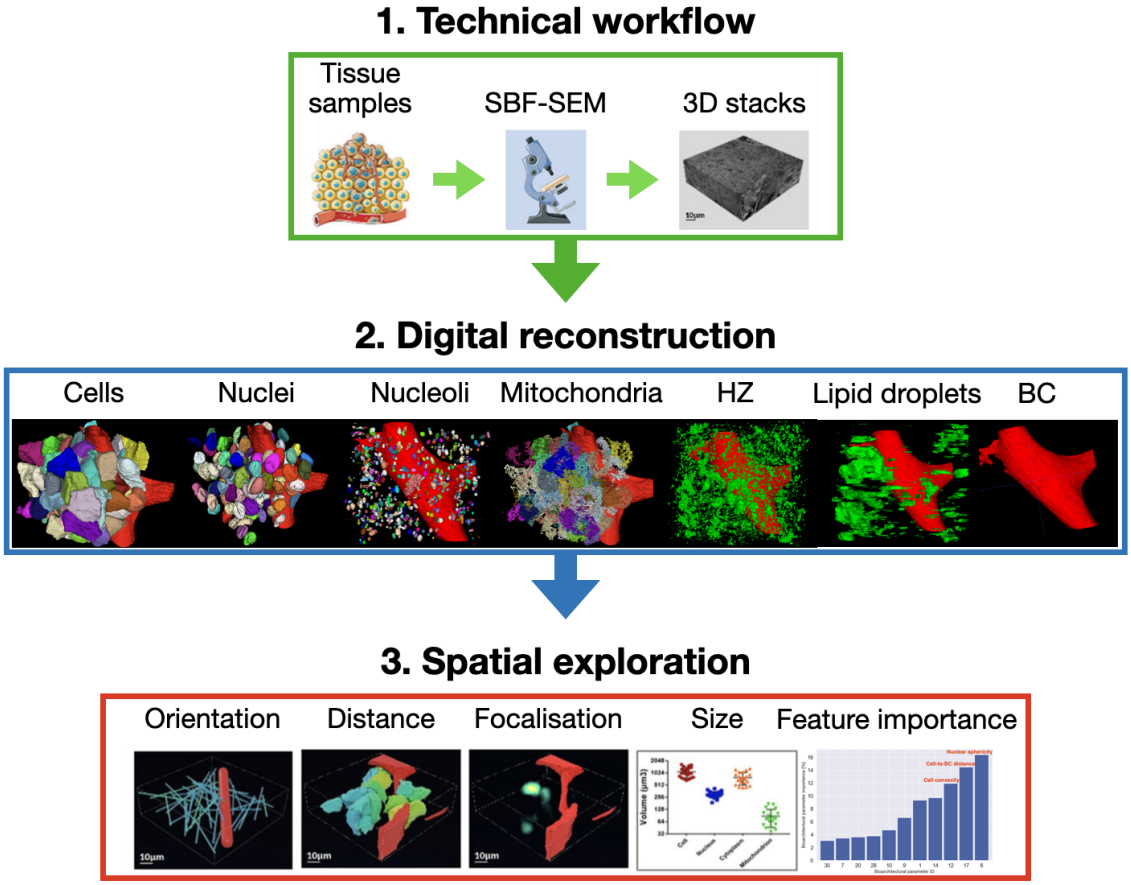


Figure 1.9 – Illustration schématique des principales étapes méthodologiques développées dans ce manuscrit. Celles-ci se structurent en trois volets : (1) l'acquisition de volumes 3D d'échantillons tissulaires par SBF-SEM ; (2) la reconstruction numérique des structures biologiques d'intérêt à l'aide d'approches de segmentation semi-automatique, automatique « *end-to-end* » et de modules complémentaires dédiés ; (3) l'analyse bioarchitecturale de l'organisation interne des tissus. HZ : Zone hémorragique. BC : Capillaire sanguin. Illustration adaptée de [40], sous licence internationale Creative Commons Attribution 4.0.

méthodes restent limitées pour la délinéation des cellules entières, en raison de la complexité de leur morphologie, de la forte compacité tissulaire et de la faible visibilité des membranes. Cette dernière tâche constitue un verrou méthodologique nécessitant des corrections manuelles particulièrement chronophages pour les biologistes, ce qui motive le développement de nouvelles approches dédiées dans le chapitre suivant.

Le chapitre 3 propose alors une solution originale à cette problématique en développant une méthode de correction automatique des segmentations 2D des contours cellulaires, centrée sur la fermeture de ces contours. Un module supplémentaire, appelé *COp-Net*, permet d'identifier et de combler les discontinuités présentes dans les délinéations initiales. Pour l'entraîner, nous présentons deux méthodes de générations de données synthétiques mimant les perturbations réelles observées : l'une basée sur une EDP de diffusion, l'autre sur une génération d'images conditionnelles par un GAN. Nous montrons que cette approche permet non seulement d'améliorer

de manière significative l'identification et l'individualisation des cellules, mais également de réduire de façon notable la charge de correction manuelle habituellement requise par les biologistes. Enfin, nous verrons que la généralisation de cette méthode pour obtenir des masques 3D pour chaque cellule n'est pas immédiate, une étape pourtant cruciale pour la digitalisation du tissu à l'échelle cellulaire et subcellulaire. Cela justifie les développements méthodologiques apportés dans le chapitre suivant.

Le chapitre 4 s'intéresse à l'individualisation 3D des cellules à partir des résultats 2D obtenus précédemment. Les approches classiques, qui reposent sur les segmentations 2D obtenues coupe par coupe, s'avèrent insuffisamment robustes pour garantir une individualisation fiable des cellules dans le volume. Pour améliorer ces résultats, nous proposons une méthode en deux étapes complémentaires. Dans un premier temps, pour chacune des cellules grossièrement individualisée en 3D, un module de contrôle qualité sélectionne automatiquement un sous-ensemble de segmentations 2D fiables. Dans un second temps, ces résultats de confiance servent de points d'ancrage pour une phase de propagation le long de l'axe z, visant à reconstituer chaque cellule de manière cohérente dans le volume. En intégrant des *a priori* intercellulaires au sein des images, cette approche améliore significativement la précision, la continuité et la robustesse des segmentations 3D obtenues, tout en réduisant les besoins en corrections manuelles.

Le chapitre 5 est dédié à l'analyse bioarchitecturale des tissus à partir des copies digitales obtenues. Nous y définissons un ensemble de 35 paramètres bioarchitecturaux, regroupés en cinq grandes familles (taille, forme, orientation, texture, distance) afin de quantifier l'organisation morphologique et spatiale des structures biologiques segmentées. Dans un premier temps, nous explorons les approches classiques de statistique inférentielle, couramment utilisées dans les analyses bioarchitecturales pour tester des hypothèses biologiques ciblées. Bien que pertinentes pour une première phase de prospection, ces méthodes se révèlent rapidement limitées face à la complexité et à la haute dimensionnalité des données extraites. Nous introduisons alors une démarche d'analyse non supervisée, plus adaptée à la fouille de données en grande dimension. Ces approches permettent d'identifier des motifs organisationnels, des relations structurelles ou des hétérogénéités tissulaires. Elles permettent également de repérer les paramètres les plus discriminants pour différencier certains types cellulaires, en mettant en lumière des corrélations biologiquement pertinentes et des signatures morphologiques interprétables sur le plan biologique.

Ce manuscrit se veut ainsi comme une **proposition méthodologique complète pour la conception d'un jumeau numérique des échantillons biologiques**, allant de la production de données numériques de haute qualité à leur interprétation biologique. Il offre un cadre rigoureux pour l'**étude automatisée et tridimensionnelle de l'architecture tissulaire**, avec des perspectives prometteuses pour la compréhension des tissus tumoraux et l'analyse du microenvironnement cellulaire.

Chapitre 2

Obtention d'un jumeau numérique : de l'échantillon à la segmentation des structures biologiques

Dans cette thèse, nous visons à construire un jumeau numérique fidèle du tissu biologique afin d'en analyser l'organisation morphologique et spatiale. Cette démarche repose en premier lieu sur la segmentation précise des structures biologiques d'intérêt, une étape fondamentale qui conditionne la qualité des analyses bioarchitecturales menées par la suite. Ce chapitre détaille les différentes approches méthodologiques mises en œuvre pour la segmentation des volumes d'images obtenus par SBF-SEM, et discute des principales limitations actuelles de ces approches.

Nous débutons par une description des protocoles d'acquisition et de traitements utilisés pour produire ces données volumétriques de haute résolution, indispensables à une analyse fine de l'organisation cellulaire et subcellulaire.

Nous retraçons ensuite l'évolution des approches de segmentation d'images, depuis les méthodes classiques fondées sur des caractéristiques manuellement extraites, jusqu'aux modèles d'apprentissage profond qui dominent aujourd'hui le domaine. Nous rappelons les concepts fondamentaux – perceptron multicouche (MLP), CNN, et architectures de type U-Net – en soulignant leurs contributions majeures et leurs limites dans le contexte de l'imagerie biomédicale. Cette mise en perspective nous permettra de motiver les choix méthodologiques opérés dans ce chapitre pour répondre aux défis spécifiques posés par la complexité et la nature des données acquises par SBF-SEM.

La dernière partie de ce chapitre est consacrée aux méthodes que nous avons mises en œuvre pour segmenter les différents types de structures biologiques identifiables dans nos volumes. Nous commençons par les structures les plus distinctes morphologiquement, comme les capillaires sanguins et les zones hémorragiques, avant d'aborder les organites plus complexes, tels que les noyaux, les nucléoles, les réseaux mitochondriaux et les gouttelettes lipidiques. Enfin, nous nous intéressons à la segmentation des cellules, une tâche particulièrement difficile en raison de la faible visibilité des membranes et de la compacité cellulaire. Nous verrons que, malgré les avancées permises par les approches actuelles, cette étape demeure partiellement satisfaisante. Elle justifie ainsi les développements méthodologiques que nous

présenterons dans le chapitre suivant, spécifiquement dédiés à l'amélioration de la segmentation des cellules coupe par coupe.

Sommaire

2.1 De l'échantillon biologique à la donnée numérique 40
2.1.1 Acquisition des tissus : du prélèvement à l'image 40
2.1.2 Pré-traitement et standardisation des données brutes . . . 41
2.2 Méthodes de segmentation en imagerie 48
2.2.1 Approches classiques basées sur des caractéristiques manuellement extraites 49
2.2.2 Approches variationnelles : équilibre entre fidélité aux données et régularité de la solution 50
2.2.3 Méthodes par patchs : entre modélisation locale et apprentissage statistique 51
2.2.4 Perceptron multicouche : apprentissage profond des représentations 52
2.2.5 Réseau de neurones convolutifs : prise en compte de la structure spatiale des images 54
2.2.6 U-Net : une localisation fine des structures d'intérêt . . . 55
2.3 Reconstruction numérique des structures tissulaires par segmentation 57
2.3.1 Capillaires sanguins et zones hémorragiques : un repérage facilité par leur morphologie 57
2.3.2 Organites cellulaires : une extraction automatique des structures plus complexes 58
2.3.3 Segmentation cellulaire : les limites des approches existantes 61
Conclusion du chapitre 63

2.1 De l'échantillon biologique à la donnée numérique

La conception de notre jumeau numérique pour l'analyse bioarchitecturale des tissus biologiques nécessite au préalable une acquisition d'image à très haute résolution, capable de restituer fidèlement l'organisation fine des structures cellulaires et subcellulaires. Dans le cadre de cette thèse, les données étudiées ont été obtenues par SBF-SEM, une technique d'imagerie tridimensionnelle particulièrement adaptée à l'étude volumique des tissus denses tels que les tumeurs solides.

Cette section est consacrée aux différentes étapes qui précèdent la segmentation : la préparation et l'acquisition des échantillons biologiques, puis le traitement initial des volumes bruts afin de standardiser les images pour les étapes de segmentation ultérieures.

2.1.1 Acquisition des tissus : du prélèvement à l'image

L'ensemble des travaux présentés dans cette thèse s'appuie sur des données d'imagerie issues de modèles biologiques reproduisant la tumeur humaine *in vivo*. Plus précisément, nous avons étudié cinq échantillons d'HB provenant de modèles dérivés de xénogreffes de patients (PDX). Ces modèles sont obtenus par greffe directe de fragments tumoraux humains sous la peau de souris immunodéficientes, ce qui permet de conserver les caractéristiques histologiques et génétiques de la tumeur d'origine, et d'étudier son organisation dans un environnement vivant contrôlé. Dans notre cas, bien que tous les patients aient reçu une chimiothérapie et appartiennent à un groupe de risque élevé, les caractéristiques cliniques et histologiques mettent en évidence la diversité des profils parmi les échantillons analysés, en termes d'âge, de type tumoral, de présence de métastases ou d'invasion vasculaire (Table 2.1). Pour chacun des PDX, deux zones d'intérêt ont été sélectionnées : une première contenant nécessairement un capillaire sanguin, et une seconde choisie de manière aléatoire dans la masse tumorale, afin d'obtenir une vision représentative de l'hétérogénéité tissulaire.

Pour réaliser cette sélection des régions d'intérêt à imager en 3D, une première exploration morphologique des échantillons a été réalisée à l'aide de la MET. Les tissus ont été sectionnés à l'ultramicrotome en coupes de 70 nm, déposées sur des grilles spécifiques (G150HEX-CU, diamètre 3.05 mm, Delta Microscopy), puis analysées avec un microscope Hitachi H7650.

Les échantillons sélectionnés ont ensuite été préparés pour l'imagerie volumique par SBF-SEM, à l'aide d'un microscope ZEISS Gemini SEM300 couplé au système 3ViewXP2 (Gatan Inc.). L'imagerie a été réalisée à une tension accélératrice de 1,2 kV où les électrons rétrodiffusés sont captés par un détecteur BSE spécifique (On point - Gatan Inc., Pleasanton, CA, USA). Chaque volume imagé correspond à un empilement de 1000 à 1500 coupes selon l'axe z, avec un *pixel time* de 5 µs, une résolution latérale de 15 nm, une épaisseur de coupe de 50 nm, et une taille d'image de 6000 × 6000 pixels. Au total, dix volumes tridimensionnels entre 405 pL ($90 \times 90 \times 50$ µm^3) et 607,5 pL ($90 \times 90 \times 75$ µm^3) ont ainsi été générés (Figure 2.1), constituant la base des analyses de segmentation et des explorations

	Sample 1	Sample 2	Sample 3	Sample 4
PDX ID	HB-316	HB-319	HB-312	HB-310
Age (months) > 3 years	Yes	No	Yes	No
Type of sample	Primary tumour	Primary tumour	Intrahepatic recurrence	Primary tumour
Sex	Female	Female	Female	Female
Vascular invasion	Yes	No	ND	Yes
Solitary/Multiple nodules	M	ND	ND	M
Metastasis	Yes	No	ND	No
Histology	Epithelial	Mixed	Epithelial	Mixed
Main epithelial component	Embryonal, Macro-trabecular	Embryonal, Macro-trabecular	Foetal	Embryonal
Small cells presence	ND	No	No	No
PRETEXT stage	III	ND	ND	III
Chemotherapy	Yes	Yes	Yes	Yes
High/Standard risk	High	High	ND	High
Serum AFP at diagnosis > 500,000 ng/mL	No	No	ND	ND

Table 2.1 – Résumé des caractéristiques cliniques et histopathologiques de quatre modèles PDX d'HB parmi les cinq étudiés. Cette table met en évidence la diversité des profils cliniques parmi les échantillons analysés, en termes d'âge, de type tumoral (récidive ou tumeur primitive), de présence de métastases ou d'invasion vasculaire, ainsi que de classification histologique. Certains champs, tels que la présence de nodules multiples ou la concentration de l'AFP ne sont pas disponibles (ND) pour tous les échantillons. Tous les patients ont reçu une chimiothérapie et appartiennent à un groupe de risque élevé, à l'exception de celui pour lequel l'information est manquante.

bioarchitecturales décrites dans la suite de ce manuscrit de thèse.

2.1.2 Pré-traitement et standardisation des données brutes

Les volumes d'images brutes obtenus par SBF-SEM présentent fréquemment des artéfacts et un bruit inhérent liés à l'acquisition, susceptibles de nuire à la qualité des segmentations. Afin de les conditionner optimalement aux algorithmes développés par la suite, une standardisation systématique a été appliquée à l'ensemble des volumes d'images. Celle-ci inclut notamment une normalisation des intensités, un redimensionnement des images guidé par une analyse du rapport signal sur bruit (SNR), un alignement des images le long de l'axe z (hors plan de coupe), ainsi qu'un contrôle qualité des images acquises. Ces différentes étapes sont décrites en détail dans les sections suivantes.

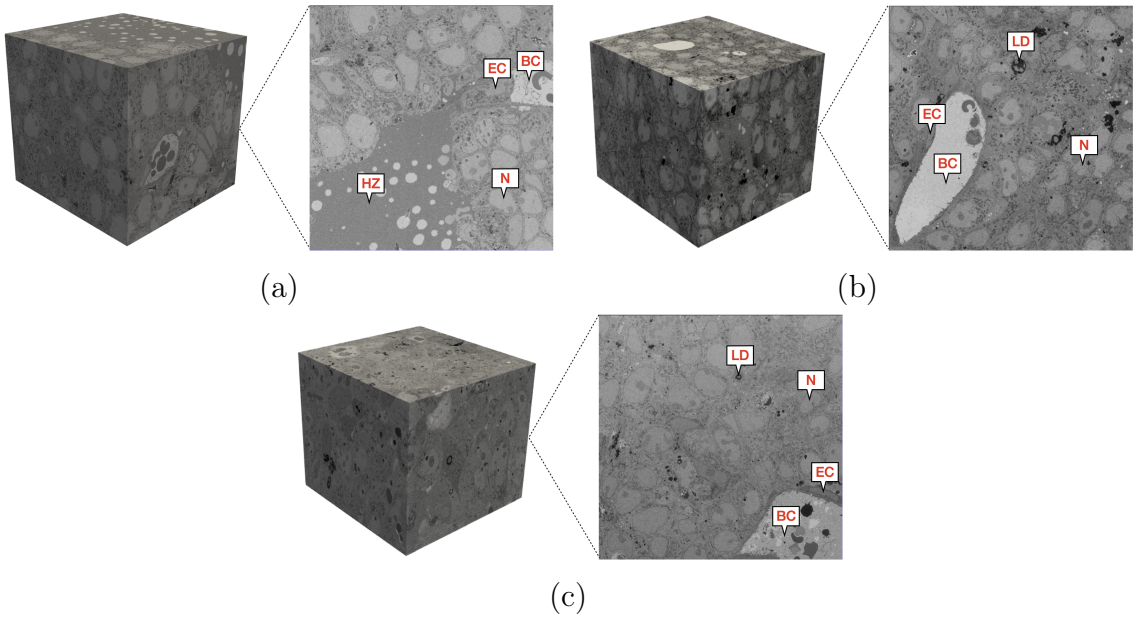


Figure 2.1 – Visualisation de trois échantillons différents d'HB de 1000 coupes acquis par SBF-SEM. (a–c) : Échantillons reconstruits en 3D accompagnés d'une coupe centrale. Les étiquettes désignent : capillaire sanguin (BC), cellule endothéliale (EC), noyau (N), gouttelette lipidique (LD) et zone hémorragique (HZ). Ces exemples illustrent la richesse et la diversité des structures cellulaires et vasculaires observées dans les échantillons, ainsi que les variations morphologiques entre les tissus.

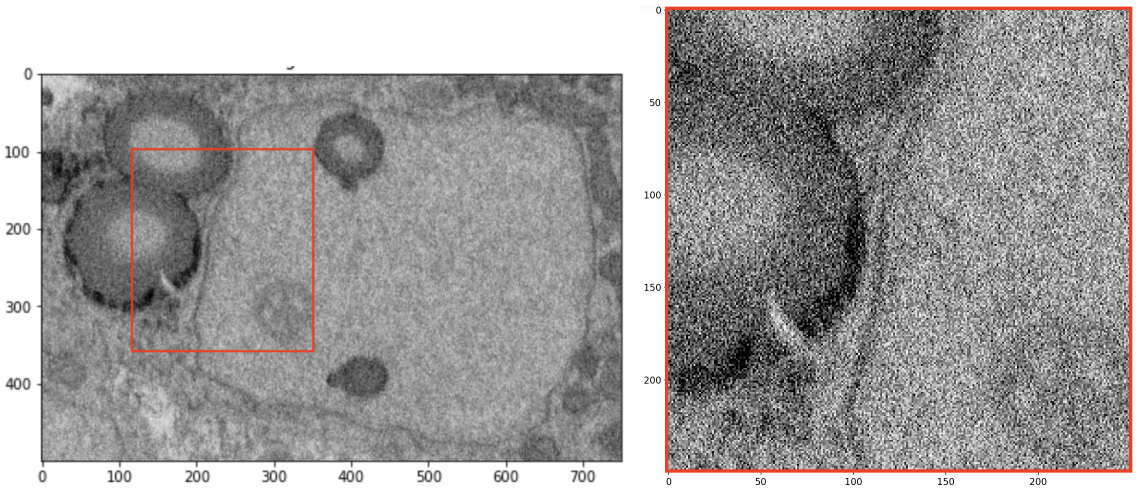
Normalisation du signal d'intensité

L'ajout de métaux lourds lors de la préparation des échantillons améliore le contraste des images en assombrissant les structures riches en lipides. Toutefois, la répartition hétérogène des lipides dans les tissus induit des variations d'intensité d'une coupe à l'autre au sein d'un même échantillon. Pour garantir la robustesse des algorithmes de segmentation, il est donc crucial d'homogénéiser le contraste entre les différentes coupes. Une telle standardisation permet de réduire les fluctuations d'intensité non biologiques, qui pourraient autrement compromettre la fiabilité des résultats.

Conscients que des techniques très évoluées sont investiguées dans la littérature pour différentes applications [77, 152, 154], nous appliquons ici une méthode de normalisation, volontairement simple, consistant à transformer individuellement chaque coupe selon un z-score avant de la convertir en image 8 bits (Eq. (2.1)). Cette transformation permet à la fois de centrer et réduire la distribution des intensités pour chaque coupe, et de limiter l'usage mémoire, facilitant ainsi la manipulation des volumes dans les étapes suivantes de notre approche.

$$Z_{(i,j)} = \min\left(\max\left(\frac{255}{2\alpha}\left(\frac{X_{(i,j)} - \mu}{\sigma} + \alpha\right); 0\right); 255\right) \tag{2.1}$$

où $X_{(i,j)}$ et $Z_{(i,j)}$ désignent respectivement l'intensité du pixel (i, j) dans l'image initiale et dans l'image normalisée, μ et σ sont la moyenne et l'écart-type des intensités de l'image initiale X, et α correspond au quantile d'ordre 0.995 de la loi normale



(a) (b)

Figure 2.2 – Illustration du bruit présent dans les images acquises par SBF-SEM. (a) : Vue globale d'une région d'intérêt contenant un noyau, une nucléole et des gouttelettes lipidiques. (b) : Zoom dans la zone rouge, où le bruit devient nettement visible.

centrée réduite $\mathcal{N}(0, 1)$.

La normalisation appliquée ne permet toutefois pas de corriger le bruit de fond important qui persiste dans les volumes SBF-SEM, issu du processus d'acquisition. Bien que peu perceptible à l'échelle globale, ce bruit devient évident dans les régions peu contrastées, comme illustré par la Figure 2.2, et peut interférer avec la détection des structures biologiques.

Débruitage et redimensionnement : une analyse du rapport signal/bruit

Pour affiner le prétraitement, une étude quantitative du rapport signal sur bruit (SNR) a été menée afin de mieux caractériser le bruit de fond et de guider les choix de filtrage et de redimensionnement. Le SNR est généralement défini comme :

$$SNR = 10 \log_{10} \left(\frac{\text{Puissance du signal}}{\text{Puissance du bruit}} \right) \tag{2.2}$$

où la puissance du signal et celle du bruit sont exprimés en watts et le SNR en décibels (dB). Cependant, dans le cadre de cette thèse, nous adoptons une définition plus adaptée au traitement d'images et largement utilisée dans la littérature [183] :

$$SNR = \frac{\mu(Z)}{\sigma(N)} \tag{2.3}$$

où $\mu(Z)$ est l'intensité moyenne de l'image et $\sigma(N)$ est l'estimation basée sur les ondelettes de l'écart-type du bruit de l'image [43].

Lors d'une étude antérieure [40], un échantillon avait été prétraité avec les filtres par défaut du plugin d'alignement d'images de Digital Micrograph (Gatan Inc., Pleasanton, CA, USA), combinant un filtre passe-bande et une fenêtre rectangulaire douce. Bien que ce traitement améliore l'apparence visuelle des images, on peut

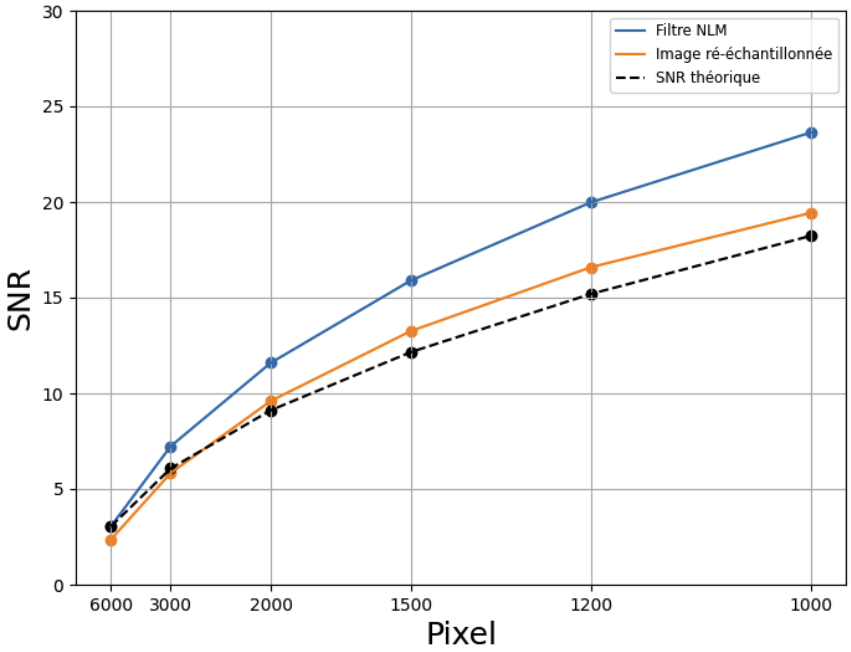


Figure 2.3 – Évolution du SNR en fonction du redimensionnement et d'un filtrage. Courbe orange : image uniquement ré-échantillonnée. Courbe bleue : image ré-échantillonnée puis traitée par un filtre *non-local means* (NLM) (détail des paramètres du filtre NLM fourni dans le corps de texte). Courbe noire : SNR théorique défini par l'équation (2.4) servant de référence.

craindre une forte dépendance des performances des algorithmes de segmentation à la présence de ce filtrage. Ainsi, dans un objectif de généralisation, ce type de filtrage doit donc être évité autant que possible.

Par la suite, une image provenant d'un des volumes acquis selon notre procédure actuelle, sans filtrage initial (Figure 2.1a), a permis d'évaluer l'impact isolé du redimensionnement et d'un filtrage *non-local means* (NLM) [17]. Bien que la littérature propose de nombreuses méthodes de débruitage avancées [33, 15, 116, 138, 157], nous avons délibérément opté pour une version volontairement simple du filtre NLM [17]. Ce filtre a été appliqué avec une taille de *patch* de 3, une distance de recherche de 5, et une distance de coupure fixée à $0.8\sigma_{\text{est}}$, où σ_{est} représente l'estimation basée sur les ondelettes de l'écart-type du bruit de l'image [43].

D'une part, le redimensionnement à lui seul entraîne une amélioration notable du SNR (Figure 2.3, courbe orange), en accord avec l'estimation théorique suivante (Figure 2.3, courbe noire) :

$$SNR_{\text{redim}} = \alpha \cdot SNR_{\text{initial}} \tag{2.4}$$

où α désigne le facteur de redimensionnement (par exemple, $\alpha = 2$ pour une réduction de moitié en largeur et hauteur). En effet, soit Z l'image de taille (M, M), supposons que pour tout pixel $(i, j) \in [\![0, M-1]\!]$, on ait : $Z_{(i,j)} = Y_{(i,j)} + N_{(i,j)}$ où $N_{(i,j)}$ représente le bruit indépendant et identiquement distribué (iid) et $Y_{(i,j)}$ l'image débruitée. Lors d'un redimensionnement par un facteur α, l'image et le bruit redimensionnés sont respectivement définis pour tout $(i, j) \in [\![0, M/\alpha - 1]\!]$ par :

$$\tilde{Z}_{(i,j)} = \frac{1}{\alpha^2} \sum_{k=0}^{\alpha-1} \sum_{l=0}^{\alpha-1} Z_{(\alpha i+k, \alpha j+l)} \tag{2.5}$$

$$\tilde{N}_{(i,j)} = \frac{1}{\alpha^2} \sum_{k=0}^{\alpha-1} \sum_{l=0}^{\alpha-1} N_{(\alpha i+k, \alpha j+l)} \tag{2.6}$$

Ainsi, nous obtenons :

$$\mu(\tilde{Z}) = \frac{1}{(M/\alpha)^2} \sum_{i,j=0}^{M/\alpha-1} \frac{1}{\alpha^2} \sum_{k=0}^{\alpha-1} \sum_{l=0}^{\alpha-1} Z_{(\alpha i+k, \alpha j+l)} = \frac{1}{M^2} \sum_{i,j=0}^{M-1} Z_{(i,j)} = \mu(Z) \tag{2.7}$$

et :

$$\begin{aligned} \sigma(\tilde{N}) &= \frac{1}{\alpha^2} \sqrt{Var(\sum_{k=0}^{\alpha-1} \sum_{l=0}^{\alpha-1} N_{(\alpha \cdot +k, \alpha \cdot +l)})} \\ &= \frac{1}{\alpha^2} \sqrt{\alpha^2 Var(N)} \quad \text{car le bruit } N \text{ est iid} \\ &= \frac{1}{\alpha} \sigma(N) \end{aligned} \tag{2.8}$$

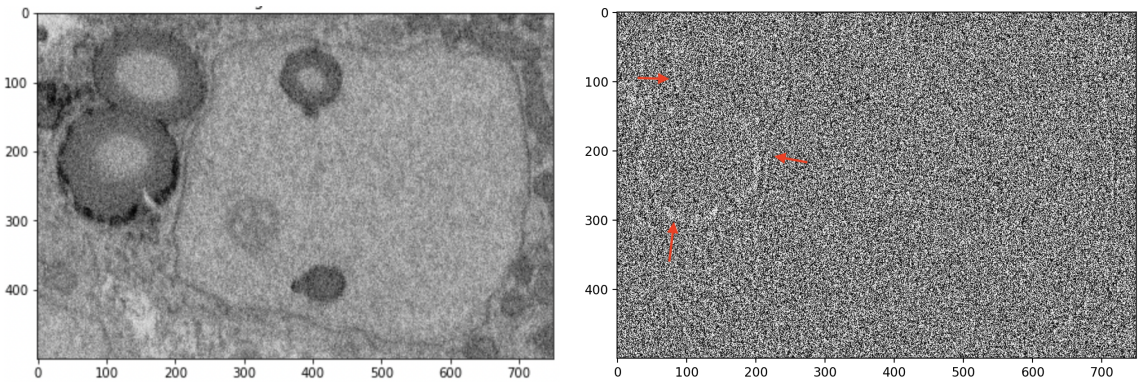
d'où découle l'équation (2.4). Autrement dit, cette amélioration du SNR s'explique par le fait que le redimensionnement repose sur une moyenne pondérée sur un voisinage : chaque nouveau pixel résulte d'une moyenne des pixels originaux qu'il recouvre. Ainsi, ce processus réduit l'écart-type du bruit plus rapidement que l'intensité du signal. Il en résulte une meilleure conservation de l'information structurelle tout en réduisant les bruits inhérents à l'acquisition, ce qui améliore nettement le SNR.

D'autre part, le traitement par un filtrage NLM après le redimensionnement permet une amélioration supplémentaire du SNR (Figure 2.3, courbe bleue), mais celle-ci reste marginale comparée au gain apporté par le redimensionnement seul. Ainsi, l'impact bénéfique du redimensionnement sur le SNR s'avère nettement supérieur à celui du filtrage NLM. Par ailleurs, comme illustré par la Figure 2.4, le filtrage NLM tend à atténuer certains contours biologiques d'intérêt, tels que ceux des gouttelettes lipidiques ou des membranes nucléaires, ce qui pourrait introduire une dépendance des algorithmes de segmentation à la présence de ce prétraitement et, *in fine*, dégrader la qualité des segmentations produites.

En conséquence, nous avons retenu un redimensionnement systématique des images à une résolution de 1200×1200 pixels, correspondant à une taille de voxel de $75 \times 75 \times 50$ nm^3, sans filtrage supplémentaire, afin de préserver au mieux l'information structurelle utile aux tâches de segmentation.

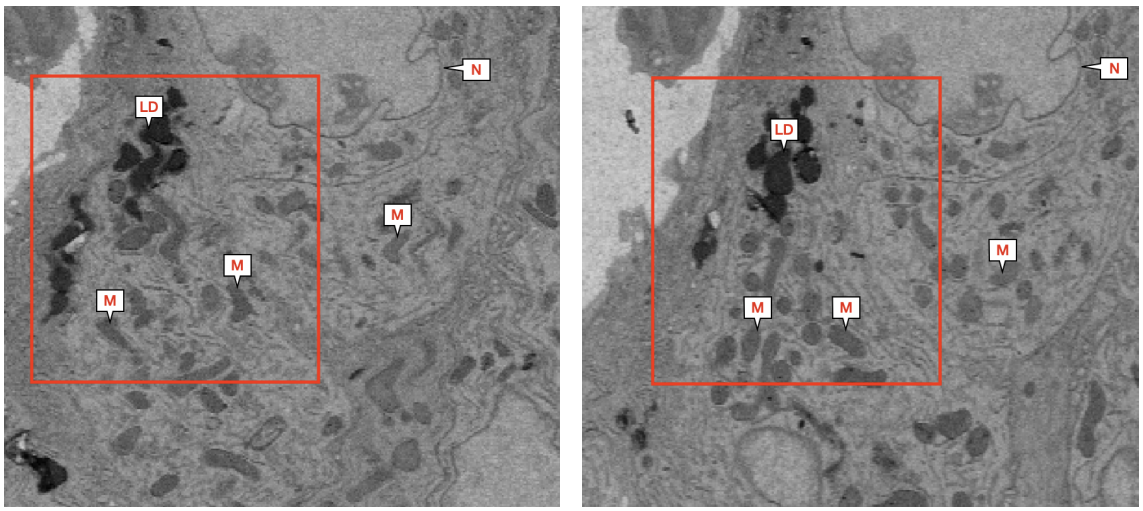
Alignement des images et restauration de la cohérence 3D

L'acquisition par SBF-SEM introduit des dérives spatiales entre les coupes successives, principalement dues aux déplacements mécaniques de l'ultramicrotome.



(a) (b)

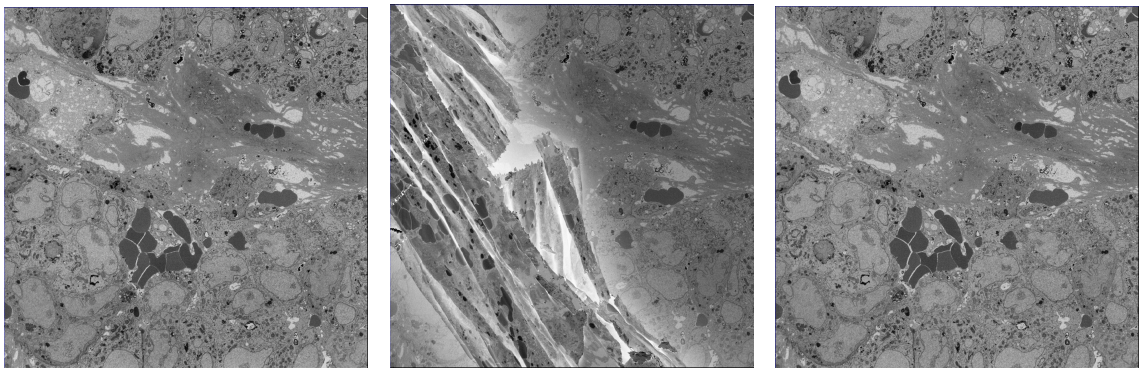
Figure 2.4 – Illustration de l'effet du filtre NLM sur une image acquise par SBF-SEM et normalisée par l'équation (2.1). (a) : Vue globale d'une région d'intérêt contenant un noyau, une nucléole et des gouttelettes lipidiques. (b) : Estimation du bruit par le filtrage NLM sur la région d'intérêt. Certains contours des gouttelettes lipidiques et du noyau sont identifiés en bruit (flèches rouges).



(a) (b)

Figure 2.5 – Illustration de l'effet de l'alignement sur le plan (xz). (a) : Avant l'alignement, les gouttelettes lipidiques (LD) et mitochondries (M) sont déformées (rectangle rouge) et la membrane nucléaire (N) présente des irrégularités. (b) : Après l'alignement, les structures biologiques retrouvent leur morphologie caractéristique, avec une nette amélioration visuelle de la continuité spatiale.

Ces translations latérales aléatoires compromettent la continuité des structures biologiques le long de l'axe z (hors plan de coupe), ce qui altère la qualité de la visualisation tridimensionnelle et peut fausser les résultats des algorithmes de segmentation et d'analyses bioarchitecturales (Figure 2.5a). Afin de restaurer cette cohérence inter-coupe, un réalignement intra-volume a été effectué, permettant de corriger les décalages latéraux et d'assurer une meilleure continuité spatiale des structures observées (Figure 2.5b).



(a) (b) (c)

Figure 2.6 – Exemple typique d'artéfacts causés par des débris lors des coupes avec l'ultramicrotome. (a) : Coupe i, (b) : Coupe $i+1$, (c) : Coupe $i+2$.

Pour cela, nous avons appliqué une méthode de recalage rigide (translation seule), en utilisant le module StackReg d'ImageJ [168]. Cet alignement a été effectué en prenant la coupe centrale de chaque volume comme image de référence, afin de limiter les pertes d'information. Contrairement aux approches habituelles où un *cropping* est appliqué à l'issu de l'alignement pour ne conserver que la zone commune à toutes les images, nous avons choisi de conserver l'intégralité du champ visuel initial afin de préserver un maximum de structures biologiques.

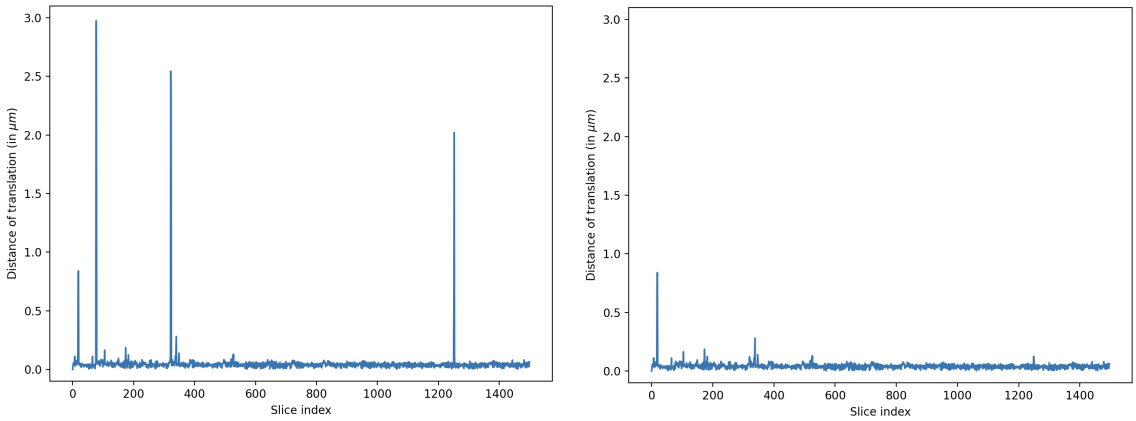
Comme illustré par la Figure 2.6, certaines images peuvent contenir des artéfacts importants causés par l'accumulation de débris résiduels. Cela justifie la mise en place d'un contrôle qualité rigoureux, détaillé ci-dessous.

Contrôle qualité et retrait des images altérées

La présence de ces artéfacts visuellement importants entraîne des erreurs d'alignement. Ils peuvent être identifiés en analysant la distance euclidienne entre les translations successives de ce dernier (Figure 2.7a). Bien qu'il existe des méthodes avancées pour détecter et restaurer automatiquement des artéfacts – telles que l'analyse de la corrélation inter-coupes, des techniques de restauration d'image dédiées ou des modèles basés sur les GAN [137, 159, 65] – nous avons fait le choix d'une stratégie simple et robuste. Grâce à la Figure 2.7a, les coupes responsables des sauts de translations les plus importants ont été détectées et supprimées manuellement. Cette intervention ciblée permet d'assurer un alignement cohérent du volume, comme illustré par la Figure 2.7b.

Notons que cette étape de contrôle qualité pourrait également être intégrée plus tôt dans la chaîne de traitement, par exemple directement après l'acquisition ou la normalisation des données. Cela permettrait d'anticiper les défauts d'alignement en amont du recalage, et d'envisager à terme une détection automatisée.

En résumé, ce processus de prétraitement – combinant normalisation, redimensionnement, alignement et contrôle qualité – constitue une étape clé pour garantir la qualité des volumes analysés. Ces données standardisées serviront de base aux étapes suivantes de segmentation. La section suivante explore les différentes approches utilisées pour la segmentation d'image, des méthodes classiques aux techniques récentes



(a) (b)

Figure 2.7 – Distance euclidienne de translation entre les coupes successives (µm). (a) : Avant correction, la présence de forts artéfacts d'acquisition induit des discontinuités importantes dans l'alignement, visibles sous forme de sauts dans la distance de translation. (b) : Après correction, la suppression manuelle des trois images responsables des plus fortes erreurs d'alignement permet de rétablir une continuité cohérente entre les coupes et d'assurer un alignement global fiable du volume.

d'apprentissage profond, en vue d'obtenir une digitalisation 3D fidèle du tissu biologique.

2.2 Méthodes de segmentation en imagerie

La segmentation d'image est une étape essentielle dans la conception d'une copie digitale du tissu biologique et vise à délimiter et identifier les structures d'intérêt. Elle peut être vue comme une classification affectant une étiquette à chaque pixel (ou voxel) d'une image. Selon l'application visée, on distingue généralement deux types de segmentation : la segmentation sémantique et la segmentation par instance. La première consiste à attribuer à chaque pixel une classe parmi un ensemble prédéfini (par exemple : noyau, fond), sans distinction entre les objets individuels appartenant à une même classe (Figures 2.8a,d). La seconde, plus fine, distingue chaque occurrence d'un objet : chaque noyau reçoit alors une étiquette unique (Figures 2.8b,e). Cette tâche plus exigeante repose souvent sur une première étape de segmentation sémantique, enrichie ensuite d'un module permettant d'individualiser et de séparer les différentes instances. Dans le cadre de cette thèse, notre objectif est d'obtenir une segmentation par instance de l'ensemble des structures biologiques d'intérêt, à l'image de celle illustrée pour les noyaux cellulaires en Figure 2.8e.

Dans cette section, nous retraçons l'évolution des approches de segmentation sémantique, des méthodes classiques aux modèles d'apprentissage profond les plus récents, en mettant l'accent sur leurs principes, leurs apports et leurs limites. Cela nous permettra de justifier les choix méthodologiques adoptés dans ce chapitre de thèse.

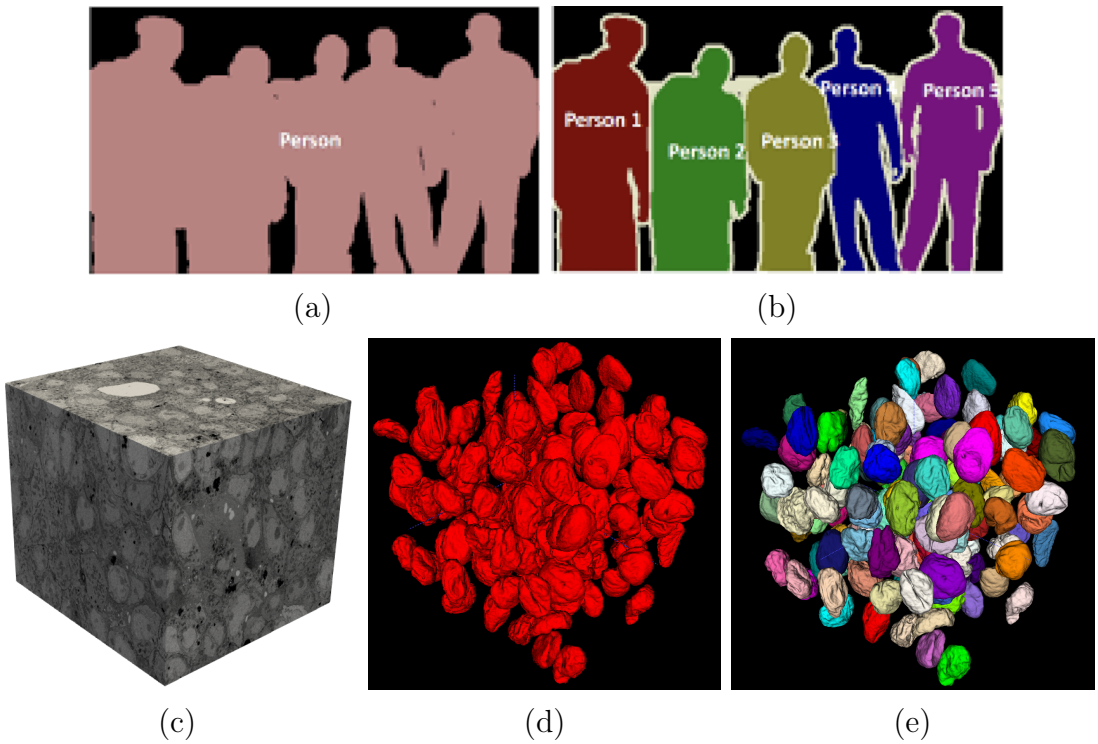


Figure 2.8 – Comparaison entre segmentation sémantique et segmentation par instance. (a) : Dans la segmentation sémantique, toutes les occurrences d'une même classe partagent la même étiquette. (b) : Dans la segmentation par instance, chaque objet est identifié individuellement. (c) : Échantillon volumique de 1000 coupes acquis par SBF-SEM. (d) : Segmentation sémantique des noyaux du volume (c). (e) : Segmentation par instance des noyaux du volume (c). Les sous-figures (a) et (b) sont extraites de [175]. © 2019 IEEE.

2.2.1 Approches classiques basées sur des caractéristiques manuellement extraites

Avant l'avènement de l'apprentissage profond, les méthodes de segmentation reposaient sur des techniques déterministes ou statistiques exploitant des caractéristiques manuellement extraites. Sans prétendre être exhaustif, nous pouvons noter les approches suivantes :

— **Le seuillage** qui consiste à segmenter l'image en définissant un ou plusieurs seuils d'intensité T tels que chaque pixel (i, j) d'intensité $Z_{(i,j)}$ soit classé comme appartenant à un objet ou à l'arrière-plan selon une règle du type :

$$f(i,j) = \begin{cases} 1 & \text{si } Z_{(i,j)} \leq T \\ 0 & \text{sinon} \end{cases} \tag{2.9}$$

— **La détection de contours** qui vise à localiser les discontinuités d'intensité dans l'image, généralement à l'aide d'opérateurs de gradient comme Sobel, Prewitt ou Canny [20]. Par exemple, les contours $C_{(i,j)}$ d'une image peuvent être obtenus à partir de la norme du gradient :

$$C_{(i,j)} = \|\nabla Z_{(i,j)}\| = \sqrt{\left(\frac{\partial Z}{\partial i}\right)^2 + \left(\frac{\partial Z}{\partial j}\right)^2} \tag{2.10}$$

— **Les contours actifs (ou *snakes*)** qui consistent à faire évoluer une courbe initiale pour qu'elle épouse les contours d'un objet dans l'image. Cette évolution est guidée par la minimisation d'une fonction d'énergie combinant des forces internes (assurant la régularité de la courbe) et des forces externes (attirant la courbe vers les discontinuités d'intensité). Par exemple, la position d'un contour $\mathbf{v}(s) = (x(s), y(s))$ est obtenue en minimisant une énergie de la forme [84] :

$$E_{\text{snake}} = \int_0^1 \left(\alpha(s) \left| \frac{\partial \mathbf{v}}{\partial s} \right|^2 + \beta(s) \left| \frac{\partial^2 \mathbf{v}}{\partial s^2} \right|^2 + E_{\text{image}}(\mathbf{v}(s)) \right) ds \tag{2.11}$$

où $\alpha(s)$ et $\beta(s)$ contrôlent la tension et la rigidité du contour, et E_{image} est une énergie dérivée de l'image qui attire le contour vers les bords de l'objet.

— **La croissance à partir de graines** part d'un ou plusieurs points initiaux, appelés graines, et agrège les pixels voisins en fonction d'un critère de similarité (intensité, texture, etc.), souvent basé sur une métrique de distance ou une contrainte de variance.

— **La ligne de partage des eaux (ou *watershed*)** considère l'image comme une surface topographique où les intensités définissent des altitudes [12]. Par exemple, en inondant progressivement le relief à partir des minimums locaux, on définit des lignes de crête séparant les bassins versants, qui correspondent aux frontières des objets. Mathématiquement, cela revient à segmenter l'image en régions R_k de minimum local (i_k, j_k) tels que :

$$R_k = \{(i,j) | (i,j) \to (i_k, j_k) \text{ par descente de gradient}\} \tag{2.12}$$

Bien que parfois efficaces pour des structures simples et bien contrastées, ces approches perdent rapidement en robustesse face à des images bruitées, hétérogènes ou contenant des morphologies complexes, motivant la recherche de solutions plus flexibles.

2.2.2 Approches variationnelles : équilibre entre fidélité aux données et régularité de la solution

Les approches variationnelles constituent une famille puissante de méthodes de segmentation, particulièrement bien adaptées aux images bruitées ou présentant des contours flous [88, 94, 36, 196, 189]. Parmi elles, le modèle de Mumford et Shah constitue l'une des approches fondamentales [119]. Son objectif est de segmenter une image en déterminant à la fois une approximation lisse de l'image et les contours qui délimitent les différentes régions. Le modèle original repose sur l'approximation de l'image d'entrée $f(x)$ par une fonction $u(x)$, supposée lisse à l'intérieur des régions homogènes, mais autorisée à être discontinue le long d'un ensemble de contours C. La segmentation est alors obtenue comme le résultat de la minimisation conjointe sur la fonction u et sur l'ensemble C, de la fonctionnelle suivante :

$$E(u, C) = \mu \text{Length}(C) + \lambda \int_\Omega (f(x) - u(x))^2 dx + \int_{\Omega \setminus C} |\nabla u(x)|^2 dx \tag{2.13}$$

où Ω désigne le domaine de l'image, μ et λ sont des paramètres qui contrôlent respectivement la longueur des contours et la fidélité à l'image d'origine. Le premier terme pénalise les contours trop irréguliers, favorisant des frontières lisses ; le second mesure l'écart entre l'image réelle et l'approximation u assurant l'attache aux données ; et le troisième impose la régularité de u à l'intérieur des régions homogènes, en limitant les variations rapides.

En pratique, cette minimisation conjointe est un problème difficile, non convexe, qui nécessite des outils mathématiques avancés pour être résolu [129, 21]. Une approche classique consiste à introduire une formulation approchée de la fonctionnelle, comme celle proposée par Ambrosio et Tortorelli, qui remplace l'ensemble de discontinuités C par une fonction auxiliaire lisse tendant vers la fonction caractéristique $\chi_{\Omega \setminus C}$ [5]. Cela permet d'utiliser des méthodes variationnelles standard (comme la descente de gradient [142]) pour approximer la solution.

Malgré sa complexité, ce modèle est puissant et interprétable : il segmente une image en recherchant le meilleur compromis entre fidélité aux données, régularité des régions, et simplicité des contours. Il a été utilisé dans de nombreuses applications biomédicales où l'on cherche à extraire des structures ayant une certaine homogénéité tout en respectant leur géométrie fine [45, 79, 19]. Toutefois, son usage dans des contextes automatisés à grande échelle est limité par sa sensibilité à l'initialisation et par le succès des méthodes par apprentissage, détaillées dans les sections suivantes.

2.2.3 Méthodes par patchs : entre modélisation locale et apprentissage statistique

Les méthodes basées sur les patchs constituent une classe d'approches intermédiaires entre les techniques classiques et l'apprentissage profond. Plutôt que d'analyser l'image dans sa globalité, ces méthodes s'appuient sur une analyse locale, en la découpant en petits blocs de taille fixe, appelés *patchs*. Chaque patch est ensuite comparé à une base de motifs connus ou traité à l'aide d'algorithmes exploitant les redondances locales présentes dans l'image.

Ces approches ont été largement utilisées dans des tâches telles que la segmentation, la restauration ou la classification d'image [1, 87, 31, 32, 8]. Parmi ces approches, le *patch-matching* supervisé repose sur la comparaison directe entre un patch inconnu et un dictionnaire de patchs annotés, issus d'un jeu d'apprentissage. Chaque patch est alors associé à une ou plusieurs étiquettes en fonction de sa similarité avec les patchs du dictionnaire, selon une règle de pondération souvent inspirée du filtrage non local [15, 34]. Pour cela, on attribue à chaque patch $P(i,j)$ centré au pixel (i,j) une distribution de poids basée sur la distance aux patchs $\tilde{P}(k,l)$ du dictionnaire, typiquement de la forme [34] :

$$w((i,j),(k,l)) = \exp\left(\frac{-\|P(i,j) - \tilde{P}(k,l)\|^2}{h(i,j)}\right) \tag{2.14}$$

où $h(i,j)$ joue le rôle d'un paramètre de température. Un élément clé de ces méthodes est l'adaptation de $h(i,j)$. En présence de patchs très similaires dans le dictionnaire, il est souhaitable de réduire h afin d'accentuer la contribution des correspondances

fiables. À l'inverse, lorsque le patch étudié ne trouve aucun voisin proche, il est préférable d'augmenter h pour assouplir la sélection. Cette stratégie adaptative peut être implémentée en définissant h par [34] :

$$h(i,j) = \min_{k,l} \|P(i,j) - \tilde{P}(k,l)\|^2 + \epsilon \tag{2.15}$$

où ϵ est une constante pour assurer la stabilité numérique dans le cas où le patch considéré est contenu dans le dictionnaire.

Les approches par patchs ont joué un rôle essentiel dans l'évolution des méthodes de traitement d'images, en introduisant des concepts-clés tels que l'apprentissage local, l'extraction automatique de représentations pertinentes ou encore le partage de motifs fréquents dans les données. Elles ont ainsi constitué un pont méthodologique entre les modèles déterministes traditionnels et les architectures de réseaux de neurones modernes. Toutefois, ces méthodes ont rapidement été surpassées en performance et en généralisation avec l'essor de l'apprentissage profond, rendu possible par l'accès à de grandes bases de données annotées, l'augmentation considérable de la puissance de calcul (notamment grâce aux GPU), et le développement de bibliothèques logicielles dédiées. Dans les sections suivantes, nous présentons les fondements et les applications de ces réseaux de neurones, aujourd'hui devenus incontournables dans les tâches de segmentation.

2.2.4 Perceptron multicouche : apprentissage profond des représentations

Inspirés du fonctionnement des neurones biologiques, le perceptron multicouche (MLP), aussi appelé réseau de neurones entièrement connecté, est constitué de couches de neurones artificiels comme illustré dans la Figure 2.9 [141]. Chaque neurone artificiel réalise une opération simple mais fondamentale : il reçoit un vecteur d'entrées $\mathbf{x} = (x_1, x_2, \ldots, x_n)$, applique un produit scalaire avec un vecteur de poids $\mathbf{w} = (w_1, w_2, \ldots, w_n)$, ajoute un biais b, puis applique une fonction d'activation non-linéaire f. Mathématiquement, la sortie d'un neurone est donnée par :

$$y = f\left(\sum_{i=1}^{n} w_i x_i + b\right) = f(\mathbf{w}^\intercal \mathbf{x} + b) \tag{2.16}$$

Parmi les fonctions d'activation classiques, nous retrouvons la fonction sigmoïde $f(x) = \frac{1}{1+e^{-x}}$, la tangente hyperbolique $f(x) = \tanh(x)$, ou encore la fonction ReLU (*Rectified Linear Unit*) définie par $f(x) = \max(0, x)$, très utilisée dans les réseaux profonds modernes.

L'empilement de plusieurs couches de ce type – dites couches cachées – permet au réseau d'apprendre des représentations de plus en plus abstraites et hiérarchiques des données d'entrée. En particulier, dans le cadre d'images, les premières couches peuvent extraire des motifs simples (bords, textures), tandis que les couches plus profondes capturent des structures plus complexes ou des caractéristiques sémantiques.

L'apprentissage du réseau consiste à ajuster les poids $\mathbf{w}$ et les biais b de tous les neurones afin de minimiser l'erreur entre les sorties produites par le réseau et les

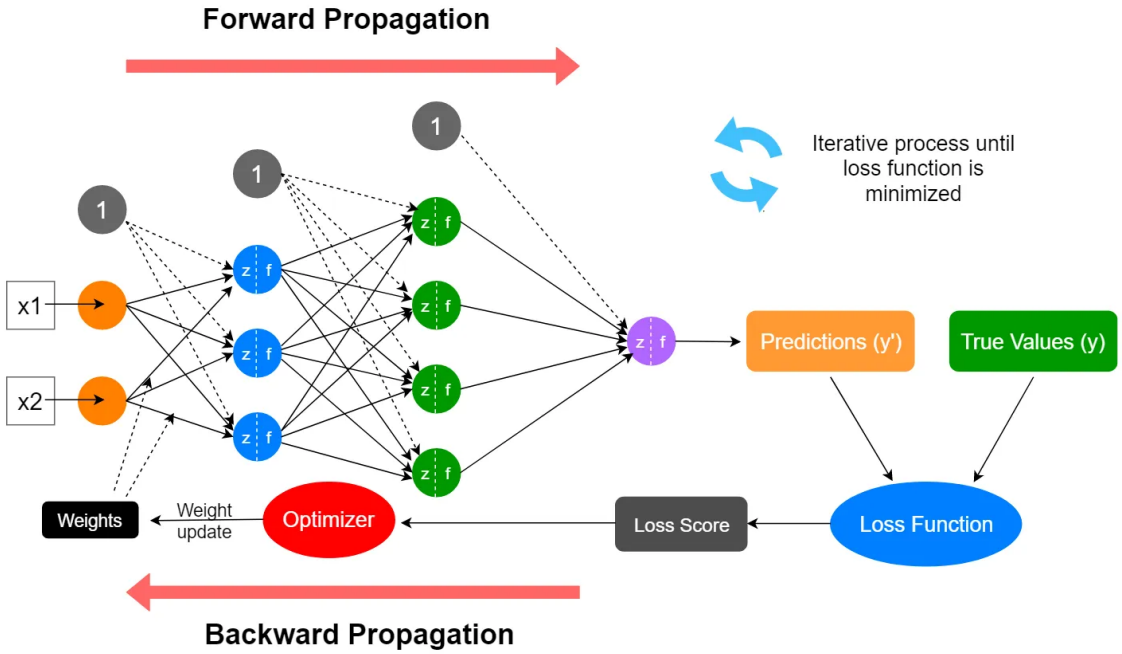


Figure 2.9 – Schéma d'un MLP et du processus d'apprentissage supervisé par rétro-propagation. Cette illustration est extraite d'un article Medium avec l'autorisation de l'auteur (`https://medium.com/data-science-365/overview-of-a-neural-networks-learning-process-61690a502fa`).

cibles attendues, appelées vérité terrain. Cette erreur est quantifiée à l'aide d'une fonction de coût $L(y', y)$, où y' désigne la sortie du réseau et y la vérité terrain. Selon la tâche (régression, classification, segmentation), la nature de la sortie y' et la fonction de coût utilisée varient. Dans les tâches de classification et de segmentation, il est essentiel de distinguer les *logits* (valeurs brutes en sortie du réseau) et les probabilités (valeurs comprises entre 0 et 1 obtenues après application d'une fonction d'activation sigmoïde ou softmax). Des fonctions de coût typiques incluent :

— l'erreur quadratique moyenne utilisée pour des problèmes de régression :

$$L(y', y) = \frac{1}{N} \sum_{i=1}^{N} (y_i - y'_i)^2, \tag{2.17}$$

où y' est la sortie *logits* du modèle (sans activation),

— l'entropie croisée pour la classification binaire :

$$L(y', y) = -\frac{1}{N} \sum_{i=1}^{N} \left[y_i \log(y'_i) + (1 - y_i) \log(1 - y'_i) \right], \tag{2.18}$$

où $y' \in [0, 1]$ est la sortie probabiliste du modèle (après activation),

— le coût de Dice couramment utilisé pour la segmentation, car elle compense le déséquilibre entre classes (notamment fond vs. objet) :

$$L(y', y) = 1 - \frac{2 \sum_{i=1}^{N} y_i y'_i + \varepsilon}{\sum_{i=1}^{N} y_i + \sum_{i=1}^{N} y'_i + \varepsilon}, \tag{2.19}$$

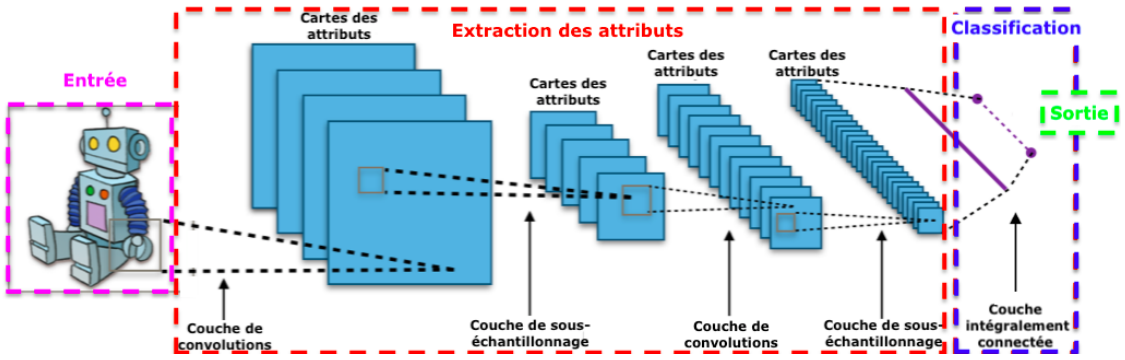


Figure 2.10 – Schéma d'un réseau de neurones convolutifs. Cette illustration est partagée grâce à une licence internationale Creative Commons Attribution-ShareAlike 4.0 sur le site web Wikipedia (`https://fr.wikipedia.org/wiki/Réseau_neuronal_convolutif`).

où $y' \in [0, 1]$ est la sortie probabiliste du modèle (après activation) et ε est un terme de régularisation pour éviter une division par zéro.

Le processus d'optimisation repose sur la rétropropagation du gradient (Figure 2.9) [185, 144], qui applique la règle de dérivation des fonctions composées pour calculer efficacement les gradients de la fonction de coût par rapport à tous les paramètres du réseau. Une fois ces gradients obtenus, les poids sont mis à jour par la descente de gradient [142] :

$$w^{(t+1)} = w^{(t)} - \eta \frac{\partial L}{\partial w} \tag{2.20}$$

où η désigne le taux d'apprentissage. Plusieurs variantes de cette méthode de mise à jour existent, appelées *optimizers*, comme la descente de gradient stochastique (SGD) [4], Adam [90], RMSProp [68], ou AdaGrad [46], chacune introduisant des stratégies pour améliorer la convergence du réseau de neurones.

Malgré leur efficacité dans des tâches de classification d'images simples, les réseaux de neurones entièrement connectés présentent une limitation majeure lorsqu'ils sont appliqués à des images de haute résolution. De fait, les connexions denses ne tiennent pas compte de la structure 2D ou 3D des images, traitant chaque pixel comme une entité indépendante et entrainant une perte d'information spatiale. Ces limites rendent ce type de réseau inadapté aux tâches de segmentation d'image, où l'on cherche à associer à chaque pixel (ou voxel) une classe sémantique tout en respectant la structure spatiale de l'image. Pour répondre à ces besoins spécifiques, les réseaux de neurones convolutifs ont été développés plus récemment.

2.2.5 Réseau de neurones convolutifs : prise en compte de la structure spatiale des images

Pour les tâches de traitement d'images, les réseaux de neurones convolutifs (CNN), introduits par Yann Le Cun, se sont imposés comme l'architecture de référence. Leur force réside dans leur capacité à exploiter la structure spatiale des images grâce à l'utilisation de filtres convolutifs appliqués de manière locale et glissante sur l'image [98].

Un filtre convolutif (ou noyau de convolution) est une petite matrice de poids, généralement de taille 3×3 ou 5×5, qui est apprise pendant l'entraînement. Ce filtre est appliqué sur l'ensemble de l'image par une opération de convolution. À chaque position, le produit scalaire entre le filtre et la région locale est calculé, produisant un score d'activation. Ce score est ensuite transformé par une fonction d'activation non linéaire (comme ReLU) et inscrit dans une nouvelle image appelée carte des attributs (Figure 2.10). Ainsi, un filtre peut être vu comme un détecteur de motif qui balaye toute l'image, ce qui permet de repérer un motif donné (comme un bord vertical, un point, une texture...) indépendamment de sa position. Chaque filtre génère une carte des attributs, et l'empilement de plusieurs filtres produit un ensemble de cartes reflétant différents aspects visuels de l'image.

Il est important de noter que, contrairement aux réseaux de neurones classiques où chaque neurone possède ses propres poids pour chaque pixel d'entrée, ici, un même filtre est appliqué à toutes les régions de l'image – c'est ce qu'on appelle le partage des poids. Cela permet au CNN d'avoir la propriété d'**invariance de traitement par translation**, ce qui signifie que la capacité du réseau à reconnaître une caractéristique (par exemple, un contour ou une texture) ne dépend pas de sa position dans l'image.

Pour réduire la taille des représentations intermédiaires tout en conservant les informations essentielles, les CNN utilisent des couches de sous-échantillonnage (ou *pooling*). Par exemple, le max-pooling de taille 2×2 sélectionne le maximum dans chaque région non chevauchante de l'image, divisant ainsi sa taille par deux dans chaque dimension (Figure 2.10). Cela permet de rendre le modèle plus robuste aux petites variations de position tout en réduisant la complexité computationnelle.

Ces opérations de sous-échantillonnage permettent aux couches profondes de capturer des représentations plus sémantiques et plus globales, mais induisent une perte de résolution spatiale. Pour les tâches de classification, un réseau de neurones avec des couches entièrement connectées telle que décrites dans la section précédente est ensuite généralement utilisé. Tandis que pour des tâches comme la segmentation, où l'on souhaite produire une sortie pixel à pixel, des architectures symétriques comme les U-Net réintroduisent progressivement la résolution spatiale grâce à des blocs de sur-échantillonnage, permettant une localisation fine des structures d'intérêt dans l'image.

2.2.6 U-Net : une localisation fine des structures d'intérêt

L'architecture U-Net, illustrée dans la Figure 2.11 et introduite dans [140], a marqué un tournant dans le domaine de la segmentation. Le U-Net repose sur une structure en U composée de deux branches principales :

— L'encodeur applique des couches convolutives suivies de sous-échantillonnage (typiquement via du max-pooling). Il permet d'extraire des représentations de plus en plus abstraites et globales de l'image tout en réduisant progressivement sa résolution spatiale.

— Le décodeur réalise des opérations de sur-échantillonnage, souvent à l'aide d'interpolations ou de convolutions transposées, afin de reconstruire une carte de segmentation de même taille que l'image d'origine.

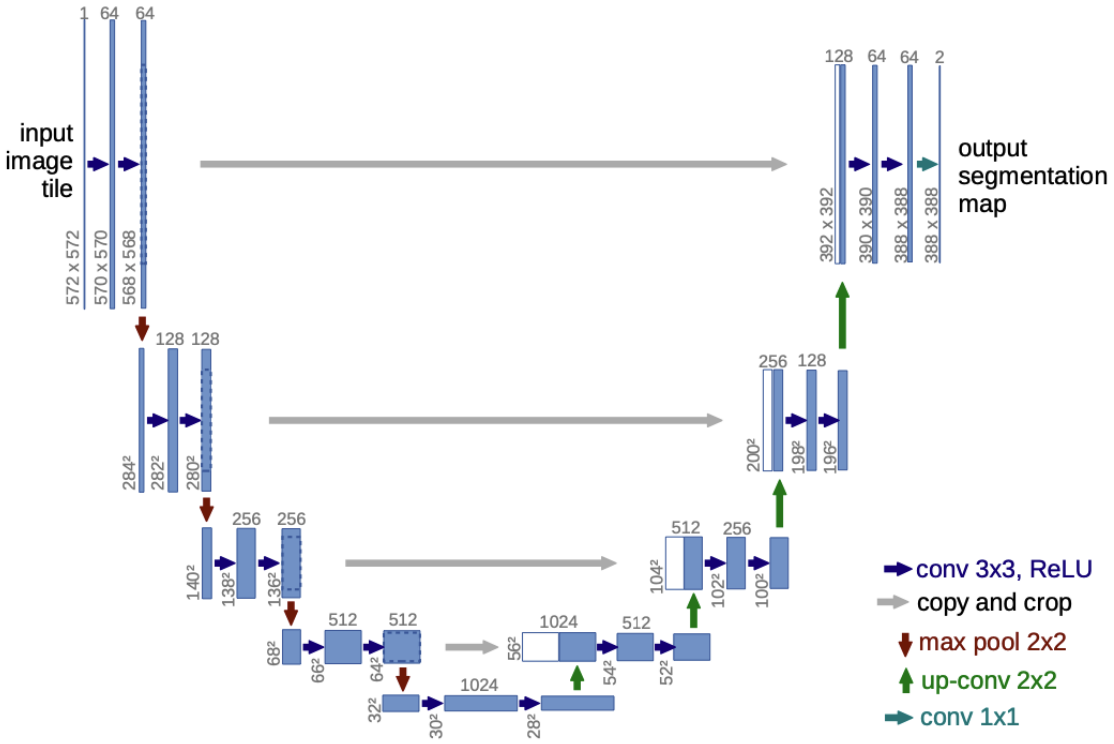


Figure 2.11 – Schéma de l'architecture U-Net. Il est composé des branches d'encodage et de décodage, reliées par des *skip connections* transmettant les résultats entre les couches correspondantes. Cette image est extraite de [140]avec autorisation de l'auteur.

Un élément clé du U-Net est l'utilisation de *skip connections*, qui relient directement certaines couches de l'encodeur à la couche correspondante du décodeur, au même niveau de profondeur. Ces connexions permettent d'injecter des informations spatiales fines, issues des premières couches, dans les étapes de reconstruction. Cela compense la perte de précision induite par les étapes de compression successives dans l'encodeur, et améliore significativement la localisation des contours et la finesse des segments.

Il a servi de fondation à de nombreuses variantes, parmi lesquelles le nnU-Net représente aujourd'hui l'un des algorithmes les plus performants et robustes du domaine [75, 76]. Plutôt qu'une simple architecture fixe, le nnU-Net (pour *no-new-U-Net*) se présente comme un cadre auto-adaptatif qui configure automatiquement tous les éléments critiques du pipeline de segmentation en fonction des caractéristiques des données : prétraitement, architecture du réseau (taille et nombre de filtres, profondeur du réseau), stratégie d'entraînement, post-traitement, etc. Cette capacité d'adaptation rend l'approche particulièrement efficace et généraliste, sans nécessiter d'ajustements manuels spécifiques à chaque nouvelle base de données.

Le nnU-Net intègre également une stratégie d'augmentation de données très complète (déformations élastiques, rotations, bruits, changements d'intensité, etc.), qui améliore la robustesse du modèle tout en compensant le manque de données annotées. Il s'appuie sur une combinaison de fonction de coût (Dice et entropie croisée) et une stratégie d'entraînement soignée, incluant la normalisation des intensités,

le ré-échantillonnage des résolutions et la gestion automatique des déséquilibres de classes.

De façon notable, le nnU-Net a surpassé des approches bien plus complexes, y compris celles intégrant des modules d'attention telles que les Transformers [176], dans de nombreuses compétitions de segmentation biomédicale [76]. Ces résultats soulignent qu'un pipeline complet et optimisé capable de s'adapter automatiquement aux caractéristiques des données peut surpasser des approches plus sophistiquées, sans nécessiter de modifications manuelles spécifiques à chaque jeu de données. Dans le cadre de ce chapitre de thèse, nous faisons ainsi le choix de nous concentrer sur l'utilisation du nnU-Net [75, 76], en raison de sa robustesse, de sa simplicité d'adaptation et de ses excellentes performances en segmentation d'images biomédicales.

2.3 Reconstruction numérique des structures tissulaires par segmentation

La construction de notre jumeau numérique fidèle aux échantillons biologiques repose sur la digitalisation précise des structures tissulaires via des méthodes de segmentation adaptées. Cette étape est essentielle, car elle conditionne directement la qualité des analyses morphologiques et spatiales menées dans une perspective biomédicale.

Dans cette section, nous présentons les méthodes de segmentation mises en œuvre pour extraire plusieurs structures d'intérêt à partir des volumes acquis par SBF-SEM. Nous débutons par les structures facilement identifiables, telles que les capillaires sanguins et les zones hémorragiques, pour lesquelles des approches semi-automatiques sont suffisantes. Nous abordons ensuite la segmentation de structures plus nombreuses ou morphologiquement complexes, comme les organites cellulaires, pour lesquelles des techniques automatiques plus élaborées, appelées « *end-to-end* », sont nécessaires et généralement efficaces. Enfin, nous montrons que certains cas, notamment la segmentation des cellules, présentent des défis particuliers qui nécessitent le développement de méthodes spécifiques, qui seront détaillées dans le chapitre suivant.

2.3.1 Capillaires sanguins et zones hémorragiques : un repérage facilité par leur morphologie

Les capillaires sanguins et les zones hémorragiques jouent un rôle central dans l'étude des tumeurs, car leur présence, leur désorganisation ou leur rupture peuvent refléter une vascularisation anormale, souvent associée à une croissance tumorale agressive [52, 16, 13]. Les zones hémorragiques, résultant vraisemblablement de la fragilité ou de la rupture de capillaires, modifient localement la structure du tissu, créant des microenvironnements caractérisés par une pression mécanique altérée et une rigidité tissulaire accrue, susceptibles de favoriser l'invasion cellulaire et le développement de métastases. Ces structures vasculaires se distinguent notamment par leur morphologie particulière, ce qui rend leur identification manuelle relativement rapide et généralisable à grande échelle, bien que répétitive.

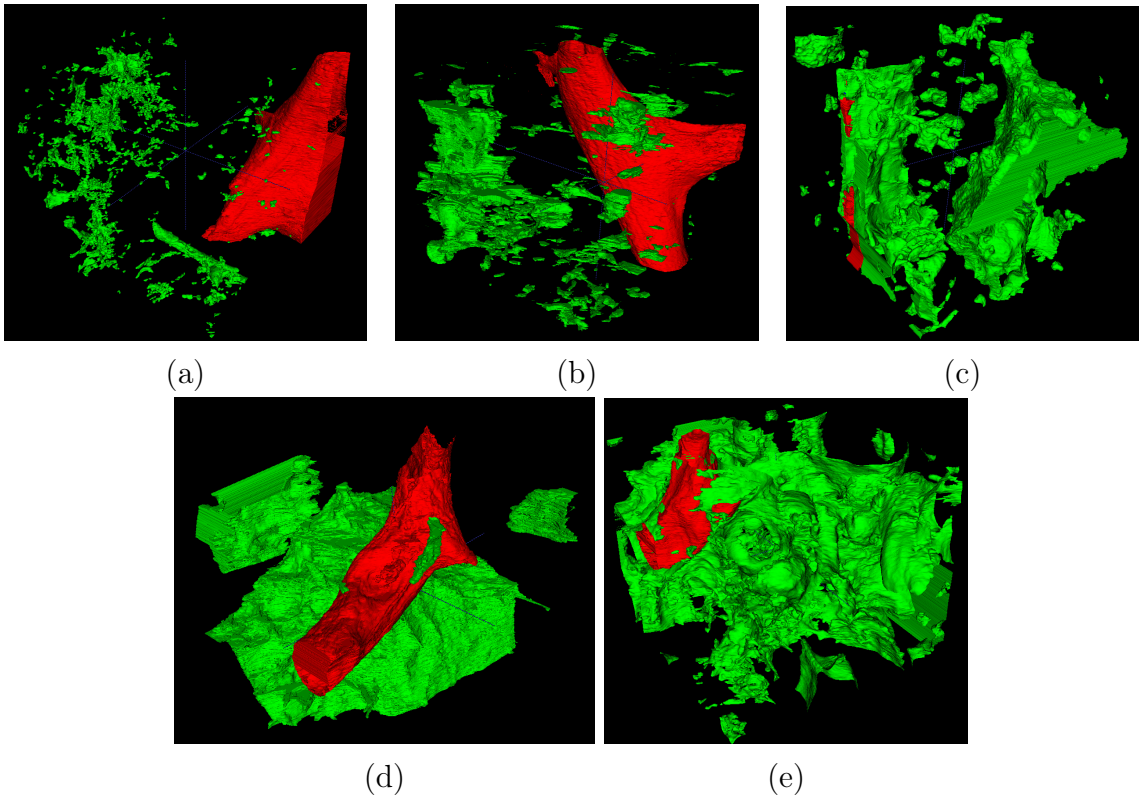


Figure 2.12 – Exemples typiques de segmentation des capillaires sanguins (rouge) et zones hémorragiques (vert) dans 5 échantillons de tissus tumoraux d'HB issus de patients différents.

Afin d'accélérer ce processus tout en garantissant une qualité de segmentation suffisante, nous avons mis en place une approche semi-automatique. Concrètement, les capillaires sanguins et les zones hémorragiques ont été segmentés manuellement une coupe sur cent pour chaque échantillon. Pour chaque tissu, deux nnU-Net 2D spécialisés ont été entraînés séparément : l'un pour les capillaires sanguins, l'autre pour les zones hémorragiques, à partir de leurs annotations respectives. Les inférences réalisées sur les coupes intermédiaires ont permis une propagation des segmentations le long de l'axe z (Figure 2.12). Enfin, un biologiste expert a validé et corrigé les résultats, garantissant la fiabilité des reconstructions 3D obtenues.

2.3.2 Organites cellulaires : une extraction automatique des structures plus complexes

Les organites cellulaires tels que les noyaux, nucléoles, réseaux mitochondriaux et gouttelettes lipidiques présentent une plus grande variabilité morphologique et une densité bien plus élevée que les structures vasculaires. Ces caractéristiques rendent les approches semi-automatiques inadaptées pour une segmentation fiable et reproductible à grande échelle.

Afin de surmonter ces difficultés, nous nous sommes appuyés sur des travaux préliminaires ayant permis d'obtenir des segmentations précises des noyaux, nucléoles et cellules sur un volume acquis par SBF-SEM d'un tissu tumoral d'HB PDX [40].

(a) (b) (c)

Figure 2.13 – Exemple typique de segmentation par instance des noyaux (b) et des nucléoles (c) dans un échantillon d'un tissu tumoral d'HB acquis par SBF-SEM (a).

En complément, des annotations manuelles ont été réalisées pour les gouttelettes lipidiques sur environ 10% d'un volume, en raison de leur importance potentielle dans l'étude des processus métaboliques et des mécanismes biologiques associés au microenvironnement tumoral. Concernant les réseaux mitochondriaux, dont la complexité morphologique et la densité rendent l'annotation particulièrement laborieuse, seuls les réseaux des cellules complètes ont été annotés manuellement.

Ces volumes annotés ont ensuite servi à l'entraînement de CNN 3D, basés sur l'architecture nnU-Net, avec un modèle spécialisé pour chaque type de structure biologique [75]. Comme détaillé précédemment, ces modèles permettent d'automatiser la segmentation sémantique des organites sur l'ensemble des échantillons. Dans le cas d'annotations partielles telles que pour les mitochondries, nous avons exploité la capacité du nnU-Net à intégrer plusieurs *channels* en entrée. Un canal supplémentaire a été utilisé pour indiquer les cellules pour lesquelles les mitochondries ont été annotées, ce qui permet de concentrer l'apprentissage sur ces régions d'intérêt. En phase d'inférence, ce canal a été renseigné de manière approximative pour guider la prédiction du modèle dans les cellules d'intérêt. Cette stratégie multi-canale permet ainsi d'exploiter au mieux les annotations disponibles, tout en limitant le coût d'annotation exhaustive.

Toutefois, nous avons constaté une forte sensibilité des performances des modèles aux variations inter-individuelles, notamment lorsque les données proviennent de patients différents. Pour renforcer leur robustesse et améliorer leur capacité de généralisation, nous avons adopté une approche itérative : des corrections manuelles ont été apportées à des volumes supplémentaires, puis intégrées dans le jeu d'entraînement. Cette stratégie a permis d'enrichir la diversité morphologique et texturale des données d'apprentissage.

À ce stade, les segmentations produites distinguent les classes d'organites mais pas leurs instances individuelles. L'objectif est d'aller au-delà de la simple classification pixel à pixel, en identifiant chaque occurrence distincte des objets biologiques. Cette segmentation par instance est cependant soumise à plusieurs limitations. En particulier, la capacité à séparer individuellement les instances dépend fortement de la résolution des images et des caractéristiques propres à chaque structure. Par

exemple, les noyaux et les nucléoles sont suffisamment distincts pour permettre une séparation efficace des instances via un simple algorithme de composantes connexes appliqué à la prédiction sémantique (Figure 2.13). Cette opération consiste à attribuer une étiquette unique à chaque région connexe détectée dans le volume segmenté. En revanche, avec nos paramètres d'acquisition actuels (taille de voxel de $15 \times 15 \times 50\text{nm}^3$), il n'est pas possible de discerner les différentes mitochondries et gouttelettes lipidiques, ce qui rend leur séparation par instance difficile (Figure 2.14). Nous considérons donc dans ce cas des entités globales : le réseau mitochondrial est analysé comme une structure continue au sein de chaque cellule, et les gouttelettes lipidiques sont regroupées en amas.

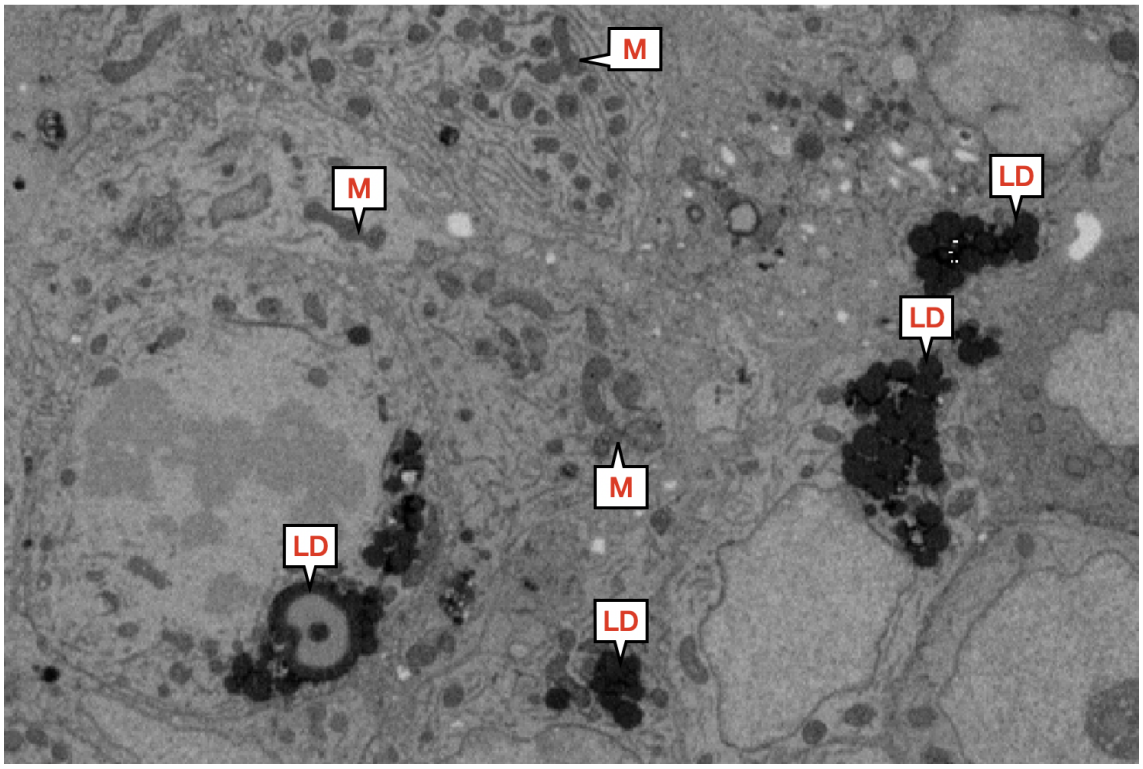


Figure 2.14 – Zoom sur une région d'intérêt d'une image acquise par SBF-SEM d'un tissu tumoral d'HB montrant la complexité de séparation des mitochondries (M) et des gouttelettes lipidiques (LD). Avec une résolution d'acquisition de $15\times15\times50\text{nm}^3$, les mitochondries forment un réseau dense et connecté, tandis que les gouttelettes lipidiques apparaissent souvent agglomérées, rendant difficile une séparation individuelle fiable. Ces structures sont donc analysées respectivement comme un réseau mitochondrial global et des amas de gouttelettes lipidiques.

Enfin, la segmentation par instance des cellules demeure une tâche particulièrement complexe. Contrairement aux noyaux, les cellules sont en contact direct les unes avec les autres, rendant leur séparation difficile. Cette difficulté est exacerbée par la faible visibilité des membranes cellulaires dans les images acquises par SBF-SEM. En effet, l'épaisseur typique d'une membrane cellulaire est de l'ordre de 9nm, soit légèrement inférieure à la résolution d'acquisition utilisée, ce qui la rend parfois indiscernable. Par ailleurs, la forte densité cellulaire des tissus tumoraux accentue les ambiguïtés et limite l'efficacité des approches classiques de segmentation. Ces limites sont discutées plus en détail dans la section suivante, où nous mettons en évidence

les principaux verrous méthodologiques et introduisons les pistes développées dans le chapitre suivant.

2.3.3 Segmentation cellulaire : les limites des approches existantes

La segmentation des cellules constitue une étape cruciale mais particulièrement complexe en SBF-SEM. Contrairement à la segmentation des noyaux, relativement bien maîtrisée, la segmentation cellulaire se heurte à de nombreuses limitations, tant structurelles que méthodologiques. Bien que la littérature propose de nombreuses approches basées sur des architectures de deep learning innovantes et performantes, les résultats obtenus dans notre contexte d'imagerie restent insuffisants.

Dès l'introduction de l'architecture U-Net, l'intégration de cartes de poids dans la fonction de perte a été proposée pour mieux capturer les détails des contours cellulaires [140]. Cette stratégie a ensuite été enrichie par l'utilisation de cartes pondérées fondées sur les caractéristiques géométriques des cellules, améliorant la segmentation par instance [61]. Plus récemment, l'algorithme Cellpose [163, 125, 162] a apporté une avancée majeure en proposant une représentation vectorielle particulière des images. En prédisant cette représentation vectorielle à l'aide d'un réseau de neurones, puis en appliquant une ascension de gradient depuis chaque pixel pour identifier les points de convergence, le Cellpose permet une attribution automatique d'étiquettes à chaque cellule.

Bien que les algorithmes de segmentation récents aient démontré d'excellentes performances sur de nombreux jeux de données en microscopie, avec différents marqueurs fluorescents et types cellulaires, leur efficacité reste très limitée lorsqu'ils sont appliqués à nos images issues de la SBF-SEM. Cette baisse de performance s'explique principalement par les caractéristiques spécifiques de ces images : les contours cellulaires y sont peu marqués, en raison d'une résolution planaire insuffisante et d'un contraste faible au niveau des membranes [107]. Ces conditions rendent les frontières entre cellules voisines floues, voire indiscernables, et compromettent la capacité des méthodes classiques à bien séparer les cellules.

Face à ces limitations, une des contributions spécifiques de mon travail consiste à exploiter au maximum l'information portée par les contours cellulaires, essentielle pour correctement identifier et individualiser les cellules elles-mêmes. Nous avons ainsi mis en place une première approche, schématisée en Figure 2.15, reposant sur un CNN entraîné à partir d'annotations manuelles des contours cellulaires collectées lors de travaux préliminaires [40]. Comme pour les organites étudiés précédemment, nous nous appuyons ici sur l'architecture 3D du nnU-Net [75, 76], qui s'est révélée particulièrement performante dans différents contextes biomédicaux. À partir de la prédiction des contours cellulaires, une segmentation par instance est obtenue simplement en appliquant un algorithme de composantes connexes sur chaque coupe 2D, attribuant une étiquette unique à chaque région fermée identifiée.

Cette stratégie permet effectivement d'identifier un grand nombre de membranes, comme le montre la Figure 2.16. Toutefois, les résultats sont fortement fragmentés : les contours segmentés présentent de nombreuses discontinuités, empêchant l'identification correcte des cellules. Il devient alors nécessaire de combler manuellement

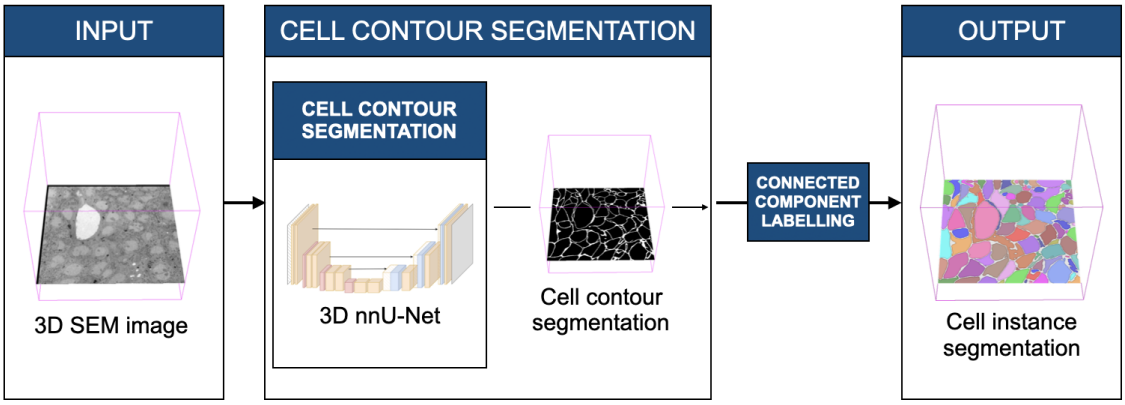


Figure 2.15 – Schéma du processus de segmentation par instance des cellules à partir de la prédiction des contours cellulaires. Un réseau de neurones segmente les contours cellulaires à partir d'un volume 3D acquis par SBF-SEM. Un algorithme de composantes connexes est ensuite appliqué pour identifier individuellement les cellules et générer la segmentation par instance.

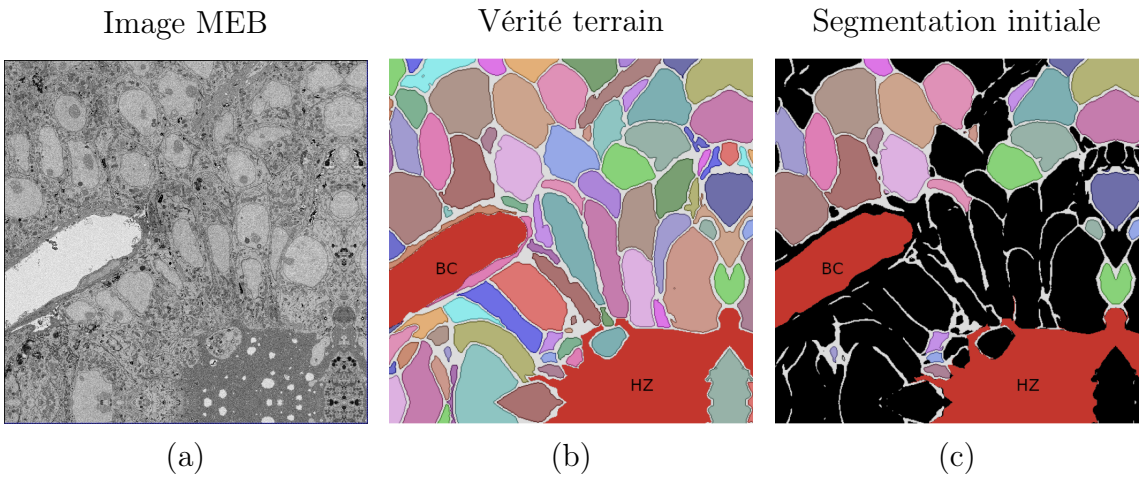


Figure 2.16 – Visualisation des discontinuités dans les segmentations initiales des contours cellulaires. (a) : Coupe acquise par SBF-SEM, (b-c) : la couleur blanche représente les contours cellulaires, la couleur rouge représente le capillaire sanguin (BC) et la zone hémorragique (HZ) obtenus par segmentation semi-automatique, les cellules colorées représentent les cellules correctement identifiées par rapport à la vérité de terrain (b), et la couleur noire indique les erreurs par rapport à la vérité terrain.

ces lacunes, une tâche fastidieuse, chronophage et difficile à reproduire d'un biologiste à l'autre. Ce besoin de correction manuelle constitue un obstacle majeur à l'automatisation du processus de segmentation cellulaire.

Ces constats mettent en lumière les limites des approches actuelles lorsqu'elles sont appliquées à des données SBF-SEM, et motivent le développement d'une méthode spécifique visant à améliorer la continuité des contours segmentés. En observant le comportement des biologistes lors de la correction manuelle – notamment avec un stylet et une tablette graphique (Cintiq Pro 5, Wacom) pour compléter intuitivement les portions manquantes – nous proposons d'imiter ce processus en développant une approche automatique de détection et de comblement des discon-

tinuités, capable de raffiner la segmentation 2D des contours cellulaires sans intervention humaine. Les développements méthodologiques associés à cette approche automatique seront détaillés dans le chapitre suivant.

Conclusion du chapitre

Dans ce chapitre, nous avons présenté les fondements méthodologiques nécessaires à la construction de notre jumeau numérique fidèle pour l'analyse bioarchitecturale du tissu biologique à partir d'images obtenues par SBF-SEM.

Cette démarche s'est d'abord appuyée sur une étape essentielle de préparation des données, visant à standardiser les volumes pour les tâches de segmentation. Après avoir appliqué une procédure de normalisation des intensités, nous avons étudié le SNR en fonction de la résolution des images pour déterminer un redimensionnement optimal des volumes. Cette étape a permis de mettre en avant l'efficacité limitée des filtres de débruitage classiques comparés aux redimensionnements seuls. Nous avons ensuite mis en place un algorithme d'alignement automatique des coupes, afin de corriger les décalages inter-coupes inhérents au processus d'acquisition. Cette étape est cruciale pour préserver la continuité spatiale des structures tridimensionnelles, condition indispensable à une analyse bioarchitecturale fiable des volumes. Enfin, les images présentant des artéfacts majeurs, responsables de perturbations dans l'alignement, ont été identifiées et retirées du volume afin de garantir la cohérence de la reconstruction.

À partir de ces volumes standardisés, nous avons retracé l'évolution des approches de segmentation, depuis les méthodes classiques jusqu'aux techniques les plus récentes basées sur l'apprentissage profond, en passant par les approches variationnelles et fondées sur les patchs. Après un rappel des concepts fondamentaux de l'apprentissage automatique – MLP, CNN, et architectures de type U-Net –, nous avons porté une attention particulière au nnU-Net, qui s'est imposé comme la référence actuelle pour la segmentation automatique dans des contextes biomédicaux variés. Ce cadre auto-adaptatif ajuste automatiquement son architecture, son prétraitement et ses stratégies d'entraînement aux données d'entrée, ce qui en fait un outil particulièrement adapté à nos volumes hétérogènes et complexes acquis par SBF-SEM.

Nous avons ainsi entraîné et appliqué le nnU-Net sur nos acquisitions, avec des résultats très satisfaisants pour les structures bien définies morphologiquement, telles que les structures vasculaires, les noyaux ou encore les nucléoles. Nous avons également vu que ce réseau *end-to-end* classique pouvait être adapté simplement pour prendre en compte des annotations partielles comme pour les mitochondries. Dans le cas des noyaux et des nucléoles, le modèle a démontré sa capacité à produire des segmentations sémantiques robustes, cohérentes et généralisables à grande échelle, à partir desquelles les différentes instances peuvent être extraites facilement. En revanche, pour des structures plus petites, comme les mitochondries ou les gouttelettes lipidiques, la séparation des différentes instances n'est pas réalisable de manière fiable, en raison des limitations intrinsèques de la résolution des images. Ces structures doivent alors être abordées à un niveau plus global dans les analyses

bioarchitecturales.

Enfin, nous avons vu que la segmentation par instance des cellules constitue une étape particulièrement difficile et spécifique, qui ne peut pas se faire en adaptant un algorithme *end-to-end* existant. De fait, même les approches les plus récentes (Cellpose, nnU-Net 3D) se heurtent à la faible visibilité des membranes dans les images SBF-SEM et à la forte compacité des tissus tumoraux. Dans ce contexte, une des contributions spécifiques de mon travail consiste à exploiter au maximum l'information portée par les contours cellulaires. Cependant, les résultats actuels nécessitent des corrections manuelles bien trop fastidieuses et peu reproductibles pour être envisagées à grande échelle.

Pour pallier ces limitations, une méthode spécifique est nécessaire afin d'améliorer automatiquement la continuité des contours cellulaires. Nous nous sommes inspirés du comportement des biologistes lors de la correction manuelle sur tablette graphique pour concevoir une approche dédiée, capable de détecter et combler automatiquement les discontinuités, sans intervention humaine. Cette méthodologie sera introduite dans le chapitre suivant.

Chapitre 3

Segmentation des cellules : de la segmentation des contours à la segmentation par instance 2D

La construction de notre jumeau numérique fidèle pour l'analyse de l'organisation interne des tissus à l'échelle cellulaire et subcellulaire nécessite une identification précise des organites appartenant à chaque cellule – noyaux, réseaux mitochondriaux, nucléoles, amas de gouttelettes lipidiques, etc. Cela repose sur une segmentation par instance fiable des cellules, c'est-à-dire une méthode permettant non seulement d'identifier les régions occupées par les cellules, mais aussi de les individualiser les unes des autres. Une telle segmentation est indispensable pour mener une analyse bioarchitecturale de population à l'échelle cellulaire des tissus observés par SBF-SEM. Dans ce contexte, une des contributions spécifiques de mon travail consiste à exploiter l'information portée par les contours cellulaires, essentielle pour correctement identifier et individualiser les cellules elles-mêmes. Cette approche est directement inspirée de la pratique des biologistes qui, sur tablette graphique, tracent les contours visibles pour segmenter ou corriger les segmentations des cellules. Toutefois, comme nous l'avons souligné dans le chapitre précédent, les contours extraits par segmentation automatique présentent de nombreuses discontinuités, principalement dues à la faible visibilité des membranes cellulaires dans les images acquises par SBF-SEM. Ces défauts rendent les segmentations difficiles à exploiter telles quelles et nécessitent, en pratique, des corrections manuelles longues, fastidieuses et peu reproductibles, consistant principalement à combler les discontinuités pour reconstituer les contours cellulaires. Afin de répondre à cette problématique, nous proposons une approche visant à automatiser la détection et la reconstruction des contours cellulaires, dans le but de fournir une information exploitable, fiable et reproductible, permettant l'identification et l'individualisation des cellules. Ce chapitre est ainsi consacré aux développements méthodologiques réalisés pour identifier automatiquement les discontinuités dans les contours segmentés et les corriger afin d'obtenir une délimitation des cellules complète et précise sur chaque coupe 2D.

Nous débutons ce chapitre par un panorama des approches existantes pour la reconstruction de régions manquantes dans une image, plus communément appelées *inpainting* dans la communauté *computer vision*. Ces approches ont été regroupées

selon trois grandes catégories : les méthodes morphologiques, les méthodes variationnelles, et celles basées sur l'apprentissage profond. Ce tour d'horizon permet de poser les bases des choix méthodologiques retenus dans la suite du chapitre.

Nous introduisons ensuite une stratégie innovante de correction automatique des contours cellulaires segmentés. Elle repose sur un module de post-traitement dédié, entraîné à détecter et combler les discontinuités des contours cellulaires segmentés : l'opérateur de fermeture des contours cellulaires, COp-Net (*Cell Contour Closing Operator*). Pour entraîner ce réseau, nous proposons deux méthodes originales de simulation de dégradations locales d'information à partir de contours corrects, permettant de générer des jeux de données d'apprentissage riches et adaptés aux défauts fréquemment observés dans les segmentations réelles.

Enfin, nous évaluons les performances du COp-Net et les comparons à celles des approches de l'état de l'art, tant pour la segmentation par instance des cellules que pour le comblement des discontinuités. Nous montrons que cette approche permet non seulement d'améliorer significativement l'individualisation des cellules, mais également de réduire de façon notable la charge de correction manuelle habituellement requise par les biologistes. Nous verrons toutefois que, malgré les avancées obtenues, cette méthode ne permet pas, à elle seule, d'individualiser les cellules en 3D dans le volume – une étape essentielle à la digitalisation 3D de l'ensemble des cellules du tissu. Cela justifie les développements méthodologiques que nous présenterons dans le chapitre suivant, spécifiquement consacrés à la reconstruction 3D des cellules à partir des résultats 2D obtenus coupe par coupe.

Sommaire

3.1 Méthodes pour la reconstruction de régions manquantes dans une image 68
3.1.1 Opérateurs morphologiques : approche historique simple basée sur les éléments structurants 68
3.1.2 Approches variationnelles : reconstruction par diffusion inspirée de modèles physiques 70
3.1.3 Approches basées sur l'apprentissage profond : détection et reconstruction automatique des régions manquantes . . 72
3.2 Fermeture des contours cellulaires 2D par apprentissage profond 73
3.2.1 Opérateur de fermeture des contours cellulaires proposé (COp-Net) 74
3.2.2 Simulation et enrichissement des données d'entrainement pour l'opérateur de fermeture COp-Net 75
3.3 Validation expérimentale de l'opérateur de fermeture (COp-Net) 84
3.3.1 Données utilisées pour l'entraînement, la validation et le test de l'opérateur de fermeture (COp-Net) 84
3.3.2 Métriques d'évaluation de la fermeture des contours cellulaires 86
3.3.3 Sélection des hyperparamètres pour la simulation des dégradations locales d'information 88
3.3.4 Comparaison avec des approches de l'état de l'art 88
3.3.5 Évaluation et comparaison de l'opérateur de fermeture . . 89
Conclusion du chapitre 94

3.1 Méthodes pour la reconstruction de régions manquantes dans une image

Notre approche repose sur l'exploitation de l'information portée par les contours cellulaires, qui constitue un élément central pour la segmentation précise et l'individualisation des cellules. Toutefois, cette information est souvent altérée par la faible visibilité des membranes cellulaires à la résolution d'acquisition utilisée, en particulier dans les images obtenues par SBF-SEM. Cette limitation se traduit fréquemment par des discontinuités dans les contours produits par les méthodes de segmentation automatique, compromettant ainsi l'individualisation fiable des cellules ainsi que la qualité des analyses bioarchitecturales menées en aval. Pour remédier à cette difficulté, nous nous sommes inspirés du travail du biologiste lors de la correction manuelle des segmentations sur tablette graphique. Plutôt que de redessiner intégralement les cellules, l'expert cible les zones localement défectueuses coupe par coupe, en prolongeant les contours interrompus jusqu'à rétablir leur continuité. Ce geste précis, guidé par l'interprétation locale du contexte morphologique, nous a servi de base pour concevoir une approche algorithmique visant à automatiser cette correction. L'objectif est de reconstruire les contours cellulaires de manière fiable et reproductible, afin de fournir une information exploitable pour l'identification des cellules individuelles.

Ainsi, l'approche proposée s'inscrit dans le cadre plus général de la reconstruction de région manquante dans une image, appelée *inpainting* par la communauté *computer vision*, qui vise à reconstituer de manière cohérente les régions manquantes ou altérées d'une image. Dans notre cas, il s'agit de reconstruire les portions manquantes des contours cellulaires à partir du contexte local et de l'information disponible dans le masque de segmentation.

Dans cette section, nous présentons un panorama des approches existantes en les classant en trois grandes catégories : les méthodes morphologiques, les méthodes variationnelles et les approches basées sur l'apprentissage profond. Bien que présentées dans un cadre 2D, ces méthodes peuvent être généralisées à la 3D, sous réserve de disposer de bases de données adaptées pour les approches d'apprentissage. Cette revue critique permettra d'identifier les avantages et les limites de chaque famille de méthodes, et de motiver les choix méthodologiques retenus pour développer une stratégie adaptée à la correction des contours cellulaires dans notre contexte.

3.1.1 Opérateurs morphologiques : approche historique simple basée sur les éléments structurants

Les méthodes morphologiques sont parmi les approches les plus anciennes et les plus simples pour combler des objets segmentés discontinus [151]. Les opérations de traitement dans ce domaine reposent sur un objet clé : l'élément structurant. Il s'agit d'une petite forme géométrique, définie localement, utilisée pour sonder et modifier l'image au voisinage de chaque pixel. On peut voir l'élément structurant comme une sorte de pochoir que l'on déplace sur l'image afin d'appliquer une transformation locale. Il possède généralement un point central appelé point d'ancrage, autour duquel sont définis les autres points de sa structure.

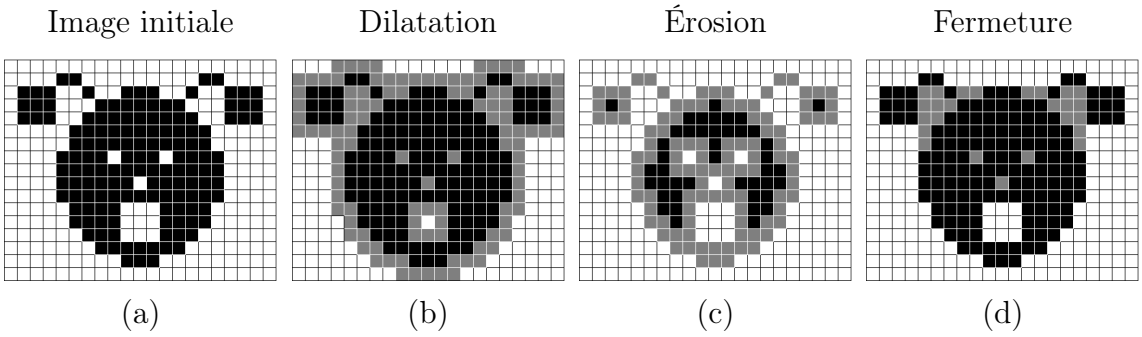


Figure 3.1 – Illustration des opérations morphologiques par un élément structurant carré de taille 3×3. (a) : Image originale (en noir : l'objet d'intérêt ; en blanc : le fond). (b) Dilatation où les pixels noirs et gris font partie de l'ensemble résultant. (c) Érosion où seuls les pixels noirs font partie de l'ensemble résultant. (d) : Fermeture où les pixels noirs et gris font partie de l'ensemble résultant. Ces illustrations sont partagées par Etienne Decencière grâce à une licence Creative Commons Attribution-ShareAlike 3.0 sur le site web Wikipedia (`https://fr.wikipedia.org/wiki/Morphologie_mathématique`).

L'élément structurant peut prendre des formes variées selon l'effet désiré : un carré ou un disque de petite taille permet d'agir de manière isotrope autour de chaque point, tandis qu'un élément structurant en forme de ligne horizontale ou verticale permet de cibler les discontinuités orientées dans une direction donnée. Des formes plus allongées, comme une ellipse inclinée, peuvent être utilisées pour combler des ruptures linéaires étroites.

Deux opérations fondamentales, appelées dilatation et érosion, permettent respectivement d'agrandir ou de réduire les structures présentes dans une image binaire (où les pixels d'intérêt valent 1, et l'arrière-plan vaut 0).

— **La dilatation** consiste à agrandir les régions d'intérêt de l'image (Figure 3.1b). Pour un élément structurant noté SE et une image Z, après dilatation, la nouvelle valeur d'un pixel est donnée par la valeur maximale des pixels sous l'élément structurant. Soit, pour tout (i, j) appartenant au domaine de l'image Ω, on a :

$$Z^{\text{dil}}_{(i,j)} = \max_{(k,l)\in SE} Z_{(i+k,j+l)} \tag{3.1}$$

— **L'érosion**, à l'inverse, consiste à réduire les régions d'intérêt (Figure 3.1c). Pour un élément structurant noté SE et une image Z, après érosion, la nouvelle valeur d'un pixel est donnée par la valeur minimale des pixels sous l'élément structurant. Soit, pour tout (i, j) appartenant au domaine de l'image Ω, on a :

$$Z^{\text{eros}}_{(i,j)} = \min_{(k,l)\in SE} Z_{(i+k,j+l)} \tag{3.2}$$

La combinaison successive d'une dilatation puis d'une érosion, connue sous le nom de **fermeture** morphologique, permet de combler les petites discontinuités dans les objets tout en restant fidèle à leur forme globale (Figure 3.1d). Appliquée à des contours segmentés, cette opération peut donc être naturellement utilisée pour corriger les ruptures locales dans les membranes cellulaires.

Le choix précis de la taille et de la forme de l'élément structurant est crucial : un

mauvais paramétrage peut conduire à des résultats très dégradés. Trouver les bons paramètres pour chaque image est une tâche délicate et peu généralisable, ce qui limite l'application de ces méthodes dans des pipelines automatiques à grande échelle. Ces approches montrent donc rapidement leurs limites dans notre contexte lorsque les discontinuités deviennent trop grandes, trop allongées, ou trop nombreuses. Dans ces cas, la fermeture morphologique a tendance à altérer excessivement la forme des cellules, en particulier dans les régions denses comme les tissus tumoraux.

3.1.2 Approches variationnelles : reconstruction par diffusion inspirée de modèles physiques

Les approches variationnelles s'inspirent de modèles physiques pour reconstruire les régions manquantes dans une image. Ces méthodes reposent sur la résolution d'EDP, souvent inspirées de phénomènes de diffusion. Par exemple, certains modèles s'appuient sur une équation de la chaleur anisotrope, qui permet de propager de manière contrôlée les informations de texture et de structure dans l'image [132]. D'autres reposent sur des variantes de l'équation de Cahn–Hilliard [11, 10, 14], initialement introduite pour modéliser la séparation de phases dans les matériaux.

Dans le cadre de l'inpainting binaire, considérons une image $f : \Omega \to \{0, 1\}$ définie sur un domaine $\Omega \subset \mathbb{R}^2$, et $D \subset \Omega$ la région à compléter. L'image restaurée $u : \Omega \times [0, T] \to \mathbb{R}$ peut alors être obtenue en résolvant l'EDP suivante :

$$\frac{\partial u}{\partial t} = -\Delta \left(\varepsilon \Delta u - \frac{1}{\varepsilon} W'(u) \right) + \lambda(x, y)(f - u) \tag{3.3}$$

avec

$$\lambda(x, y) = \begin{cases} 0 & \text{si } (x, y) \in D \\ \lambda_0 & \text{si } (x, y) \in \Omega \setminus D \end{cases} \tag{3.4}$$

Ici, $T > 0$ est un temps fixé, ε est un paramètre de régularisation contrôlant l'épaisseur des interfaces où les valeurs de u sont entre 0 et 1, et $W(u)$ est un potentiel non linéaire, typiquement défini par $W(u) = u^2(1-u)^2$ dans le cas binaire. Le terme d'attache aux données, pondéré par $\lambda(x, y)$, impose la cohérence avec les données connues en dehors de D. Lorsque $\lambda_0 = 0$, l'équation revient au modèle original de Cahn–Hilliard.

Cette formulation permet de compléter les régions manquantes de manière progressive et visuellement cohérente, en assurant la régularité des résultats et en respectant la structure de l'image. Elle a été généralisée avec succès au cas des images en niveaux de gris [14], et a montré de bonnes performances sur divers types de données, qu'il s'agisse de photographies anciennes, d'empreintes digitales dégradées ou de documents altérés.

Ces approches font partie intégrante des compétences de l'équipe de recherche "Modélisation en ONCologie" (MONC) de l'Inria, au sein de laquelle ce travail a été mené. Cette équipe est fortement investie dans la modélisation du cancer à l'aide de méthodes d'assimilation de données, d'approches variationnelles et de techniques d'apprentissage profond. Dans ce contexte, la généralisation de l'équation (3.3) [14] – dont le code source est librement accessible à l'adresse suivante : `http://epubs`

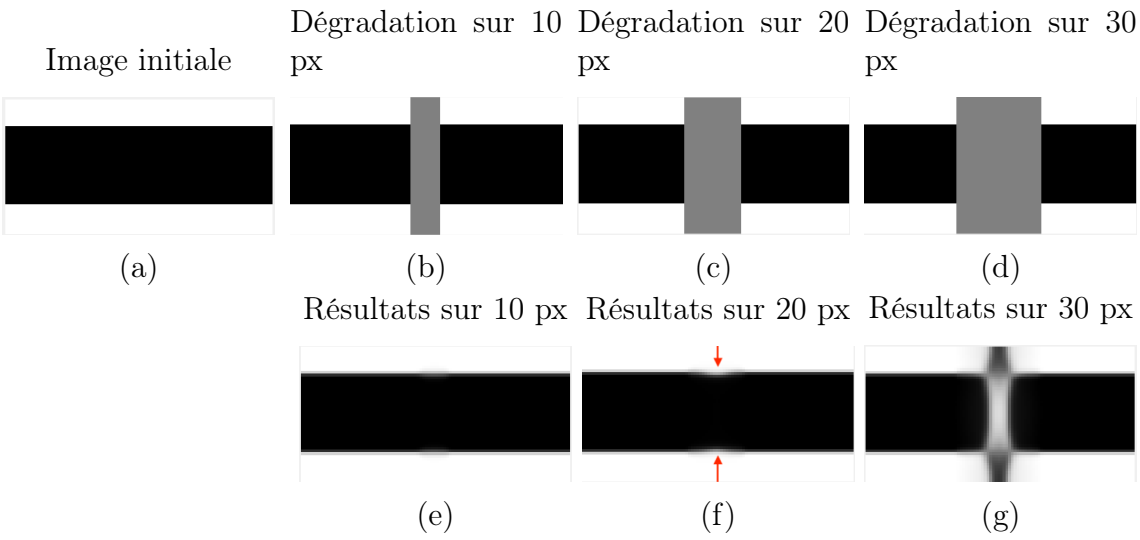


Figure 3.2 – Illustration de la restauration d'images dégradées à l'aide de l'équation (3.3) généralisée [14]. (a) : Image d'origine avec la structure centrale en noir. (b - d) : Versions dégradées de l'image d'origine où la région à compléter D est en gris. (e - g) : Résultats correspondants après restauration en fonction de la largeur de zone manquante. On observe (f) une légère altération (flèches rouges) pour une bande de 20 pixels, et (g) un échec de restauration pour une bande de 30 pixels.

`.siam.org/doi/suppl/10.1137/15M101405X/suppl_file/M101405_02.zip` – a fait l'objet d'expérimentations approfondies.

Nous avons notamment testé la robustesse de cette méthode face à des dégradations de tailles croissantes. Une image de référence 50×100 pixels contenant une structure noire centrale a été synthétisée (Figure 3.2a). Des bandes centrales de largeurs 10, 20 et 30 pixels ont ensuite été supprimées pour simuler des zones manquantes (Figures 3.2b–d). La restauration automatique par le modèle de Cahn–Hilliard a été appliquée à ces images altérées, produisant les résultats visibles en Figures 3.2e–g. Ces résultats révèlent une forte sensibilité à la largeur de la région à compléter : si la bande manquante est étroite (10 pixels), la restauration est satisfaisante, mais au-delà (20 ou 30 pixels), des altérations significatives apparaissent, allant jusqu'à l'échec de la reconstruction dans le cas le plus extrême. Cela limite l'applicabilité de cette méthode dans des cas plus complexes, comme la complétion des contours cellulaires, qui présentent des discontinuités de grande taille, de forte courbure, voire enchevêtrées, avec des finesses difficiles à restaurer par diffusion.

Un second obstacle important réside dans la nature même de ces méthodes : elles supposent une connaissance explicite de la région à compléter. Autrement dit, ces approches supposent que l'on connaisse à l'avance l'emplacement précis des discontinuités à combler. Dans le cas des segmentations des contours cellulaires, les ruptures sont souvent nombreuses, de tailles et de formes variées, et leur localisation automatique est précisément l'un des enjeux centraux.

En somme, bien que les approches variationnelles constituent un cadre rigoureux et prometteur pour la reconstruction de régions manquantes dans les images, elles nous sont apparues difficilement applicables à notre problématique de segmentation

des contours cellulaires. Ce constat justifie l'exploration, dans la section suivante, de solutions plus intégrées capables de détecter automatiquement les zones à corriger.

3.1.3 Approches basées sur l'apprentissage profond : détection et reconstruction automatique des régions manquantes

L'essor de l'apprentissage profond a éminemment transformé le domaine du traitement d'image, et les tâches de reconstruction de régions manquantes (*inpainting*) en ont largement bénéficié. Ces dernières années, de nouvelles architectures ont vu le jour pour corriger de manière automatique des images partiellement dégradées, y compris dans des contextes complexes où les zones manquantes sont nombreuses, irrégulières ou étendues.

Parmi ces avancées, les approches dites de *morphological deep learning* se distinguent en remplaçant les convolutions classiques des CNN par des filtres morphologiques non linéaires [122, 54]. Ces filtres permettent d'incorporer directement dans les réseaux des opérations issues de la morphologie mathématique, telles que la dilatation ou l'érosion, décrites précédemment. L'objectif est de rendre les modèles plus sensibles aux structures géométriques locales, et donc plus efficaces pour analyser et restaurer des formes complexes. D'autres travaux se concentrent sur l'*inpainting* d'images, en exploitant la capacité des CNN à apprendre les motifs caractéristiques d'un ensemble de données pour compléter de façon cohérente les parties manquantes [120, 190, 197]. Ces modèles ont montré des résultats impressionnants, y compris sur des images présentant des régions absentes très variées en taille, en forme ou en texture. Toutefois, à l'instar des méthodes morphologiques ou variationnelles, ces approches nécessitent généralement une indication explicite des zones à corriger, ce qui limite leur application dans les cas où ces zones sont nombreuses et difficilement identifiables *a priori*.

Les méthodes les plus performantes aujourd'hui détectent de manière automatique les régions à combler [148, 25, 26]. Certaines d'entre elles sont basées sur l'architecture U-Net et sont capables d'identifier automatiquement les discontinuités dans des traits fins, puis de les reconstruire avec un haut niveau de fidélité géométrique, en respectant notamment l'épaisseur et la courbure des traits attendus [25]. Cette capacité est particulièrement intéressante dans le contexte de la segmentation des contours cellulaires, où les discontinuités sont fréquentes, mais souvent trop complexes pour être corrigées à l'aide de règles simples.

Cependant, toute la force de ces approches repose sur un apprentissage supervisé, nécessitant des images d'entraînement localement dégradées avec les types d'erreurs que l'on souhaite corriger. L'efficacité du modèle dépend donc étroitement de la qualité et de la diversité de ces données. Si certains types de discontinuités ne sont pas représentés dans l'ensemble d'entraînement, le réseau peut échouer à les détecter ou proposer des corrections inappropriées. Il est donc essentiel de concevoir des stratégies permettant de simuler de manière réaliste les défauts de segmentation rencontrés en pratique, afin d'entraîner des modèles robustes.

En résumé, les récentes approches basées sur l'apprentissage profond offrent un cadre puissant pour la correction automatique des segmentations de contours cellu-

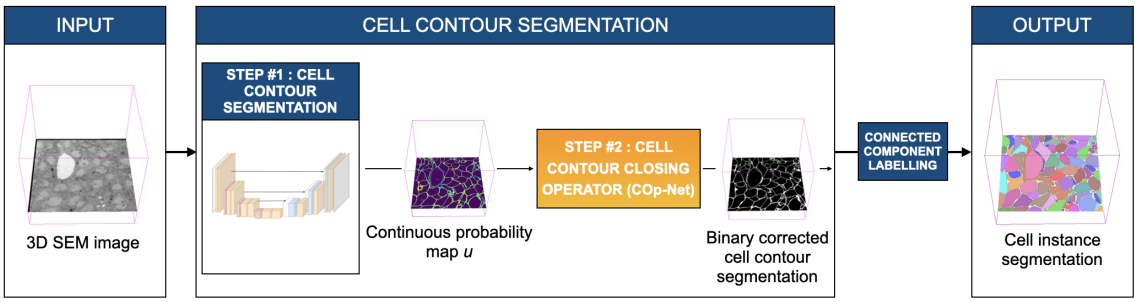


Figure 3.3 – Schéma de l'approche proposée pour la segmentation par instance des cellules. Un réseau de neurones génère d'abord une carte de probabilité u des contours cellulaires à partir d'un volume acquis par SBF-SEM (Step #1). Ensuite, l'opérateur de fermeture (COp-Net) proposé détecte et comble automatiquement les régions dont les informations sont insuffisantes ou manquantes (Step #2). Un algorithme de composantes connexes est finalement appliqué pour identifier individuellement les cellules et générer la segmentation par instance coupe par coupe.

laires, grâce à leur capacité à apprendre des formes complexes et à généraliser les régularités observées. Néanmoins, leur succès repose sur la mise en place de jeux de données adaptés et de stratégies d'entraînement soigneusement conçues. Dans la section suivante, nous introduisons le module, basé sur l'apprentissage profond, que nous avons développé pour détecter et combler automatiquement les discontinuités dans les contours segmentés, ainsi que deux stratégies complémentaires pour générer des erreurs réalistes servant à l'entraînement supervisé du modèle.

3.2 Fermeture des contours cellulaires 2D par apprentissage profond

Les contours cellulaires segmentés automatiquement à partir des images acquises par SBF-SEM présentent de nombreuses discontinuités, nuisant à la qualité de la délimitation et à l'individualisation fiable des cellules. Après avoir dressé dans la section précédente un état de l'art des méthodes de reconstruction de régions manquantes dans les images, nous introduisons ici une nouvelle stratégie conçue pour restaurer la continuité des contours cellulaires. Le pipeline générique que nous proposons, illustré dans la Figure 3.3, sera utilisé tout au long de ce chapitre et comprend deux étapes : une prédiction initiale des contours cellulaires à l'aide d'un réseau de segmentation, puis l'application d'un opérateur de fermeture dédié à la correction des discontinuités, inspiré des corrections manuelles réalisées par les experts biologistes.

Dans un premier temps (Step #1), une carte de probabilité des contours cellulaires, notée u, est générée par un CNN, entraîné à partir d'annotations manuelles collectées lors de travaux antérieurs [40]. Cette étape repose sur l'architecture auto-adaptative et performante du nnU-Net [75, 76], dont l'implémentation permet de produire une carte continue de probabilité sans seuillage final. Chaque voxel de cette carte encode ainsi la probabilité qu'il corresponde à un contour cellulaire, fournissant une information plus riche et exploitable qu'une segmentation binaire. À ce

stade, notre objectif est d'obtenir des cartes de probabilité des contours cellulaires sur chaque coupe 2D. Étant donné que le volume d'entrainement a été entièrement annoté manuellement, ces cartes de probabilité peuvent être produites par une architecture 3D, permettant de tirer parti de l'information inter-coupe et d'améliorer la cohérence locale des prédictions.

Dans un second temps (Step #2), les discontinuités dans les contours cellulaires sont détectées puis comblées à l'aide d'un opérateur de fermeture, que nous appelons **COp-Net** (*Cell Contour Closing Operator Network*), conçu pour imiter les corrections manuelles effectuées par les biologistes. Cette étape permet de restaurer la continuité des contours sans altérer leur finesse, propriété essentielle pour préserver la précision morphologique des structures biologiques. Enfin, un algorithme de composantes connexes est appliqué coupe par coupe pour identifier individuellement les cellules et générer une segmentation par instance.

Dans cette section, nous décrivons en détail le fonctionnement et l'implémentation de l'opérateur de fermeture, ainsi que les stratégies de simulation de dégradations locales utilisées pour entraîner le modèle de manière supervisée à partir de contours corrects.

3.2.1 Opérateur de fermeture des contours cellulaires proposé (COp-Net)

À ce stade, nous avons des cartes de probabilité des contours cellulaires notées u qui contiennent des pertes ou dégradations locales d'information. Pour corriger ces discontinuités, nous introduisons un opérateur de fermeture, appelé COp-Net, qui agit automatiquement sur ces cartes, comme illustré à la Figure 3.4.

Le COp-Net repose sur une architecture 2D du nnU-Net, choisie pour deux raisons principales. D'une part, cela permet une comparaison directe avec les approches concurrentes de l'état de l'art, généralement entraînées coupe par coupe. D'autre part, la quantité limitée de données annotées rend l'entraînement d'un modèle 3D moins pertinent à ce stade. Le réseau a été entraîné de manière supervisée en utilisant des cartes de contours dégradées en entrée pour prédire leur version correcte correspondante. Ces cartes de contours localement dégradées ont été générées à partir des segmentations manuelles correctes selon deux approches présentées dans la section suivante. Ainsi, le modèle apprend à détecter et combler les pertes d'information locales afin de restaurer des versions correctes des contours.

Une fois entraîné, le COp-Net est appliqué de manière itérative, coupe par coupe, sur les cartes de probabilité u. Cette stratégie permet une correction progressive des contours : à chaque itération, l'entrée est la carte de probabilité des contours cellulaires de l'itération précédente, qui évolue à mesure que les contours cellulaires sont progressivement affinés et remplis. Cela permet notamment de combler de grandes discontinuités qui n'auraient pas pu être entièrement résolues lors des itérations précédentes. Ce processus itératif se répète jusqu'à ce que le pourcentage de pixels modifiés entre deux itérations consécutives passe sous un seuil fixé. Nous utilisons typiquement un seuil de 0.1% pour interrompre l'inférence une fois la stabilisation atteinte.

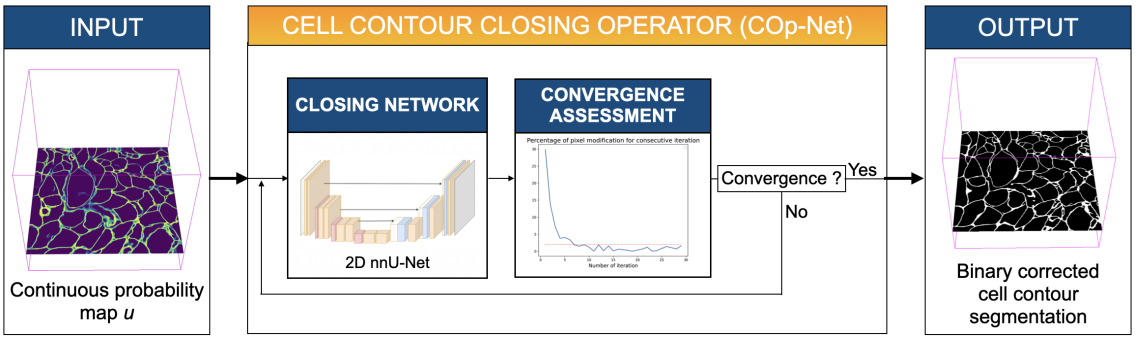


Figure 3.4 – Principe de l'opérateur de fermeture (COp-Net) proposé. À partir d'une carte de probabilité 2D des contours cellulaires obtenue lors de l'étape précédente (Step #1 dans la Figure 3.3), le COp-Net est appliqué de manière itérative pour détecter et corriger automatiquement les discontinuités locales. À chaque itération, le réseau affine progressivement les contours, jusqu'à convergence du processus de correction.

3.2.2 Simulation et enrichissement des données d'entrainement pour l'opérateur de fermeture COp-Net

Pour entraîner le COp-Net de manière supervisée, il est nécessaire de disposer de paires d'images contenant, d'une part, des contours cellulaires partiellement dégradés, et d'autre part, leurs versions complètes et correctes servant de vérité terrain. Toutefois, les pertes réelles d'information observées dans les cartes de probabilité présentent une variabilité trop importante et des divergences trop marquées par rapport aux contours de référence, ce qui empêche la fonction de coût du réseau de converger vers un minimum local satisfaisant. Pour garantir un apprentissage stable et efficace, il est donc crucial de contrôler précisément les types de perturbations que le modèle doit apprendre à corriger. L'objectif est alors de générer, de manière aléatoire, un très grand nombre de données synthétiques afin de pallier au manque de données annotées tout en assurant une diversité maîtrisée des dégradations.

Pour répondre à cet objectif, nous proposons deux stratégies complémentaires permettant de simuler, à partir de contours cellulaires corrects issus d'annotations manuelles, des altérations artificielles mais réalistes. Ces méthodes génèrent des exemples de dégradations et de pertes locales d'information représentatives des défauts couramment observés dans les cartes produites automatiquement par le réseau de segmentation (Step #1 dans la Figure 3.3). La première repose sur la résolution d'une EDP, permettant un effacement progressif et contrôlé des contours. La seconde s'appuie sur un GAN, entraîné à produire automatiquement des cartes de probabilité dégradées imitant les altérations typiques rencontrées en pratique.

Modélisation des pertes et dégradations locales d'information à l'aide d'une EDP

Pour simuler des dégradations et des pertes locales d'information dans les contours cellulaires, notre première approche repose sur la résolution d'une EDP dérivée de l'équation de la chaleur. L'idée est de modéliser un processus de diffusion qui atténue progressivement l'information présente dans les contours, tout en conservant un

contrôle sur l'ampleur et la localisation de cette dégradation.

Formulation du problème Notons $u_0(\mathbf{x})$ la segmentation manuelle des contours cellulaires, définie sur un domaine $\Omega \subset \mathbb{R}^2$. La version dégradée de cette segmentation, notée $u : \Omega \times [0, T] \to \mathbb{R}$, est obtenue en résolvant l'équation suivante :

$$\begin{cases} \dfrac{\partial u}{\partial t} = \alpha \Delta u - \beta u & \text{(EDP)} \\ u(\mathbf{x}, 0) = u_0(\mathbf{x}),\ \mathbf{x} \in \Omega & \text{(Initialisation)} \\ \vec{\nabla} u \cdot \vec{n} = 0,\ \text{sur } \partial\Omega & \text{(Condition au bord)} \end{cases} \tag{3.5}$$

$\partial\Omega$ représente le bord de l'image, $\mathbf{x} = (x, y) \in \Omega$ les cordonnées 2D des pixels dans le domaine de l'image, $\vec{n}(\mathbf{x})$ est le vecteur normal de u à la position $\mathbf{x}$. La condition au bord de Neumann homogène garantit que l'évolution des contours reste à l'intérieur du domaine et qu'aucun flux d'information ne traverse les bords du domaine.

La première contribution dans le membre de droite de l'équation (3.5) modélise une diffusion isotrope locale des contours cellulaires (Figures 3.5c,d), tandis que la seconde induit une perte d'information localisée (Figures 3.5c,e). Le premier mécanisme de perturbation est régi par la carte $\alpha : \Omega \to [d_{min}, d_{max}]$ définie pixel par pixel, où d_{min} et d_{max} sont des valeurs strictement positives prédéfinies représentants respectivement les coefficients de diffusion minimale et maximale. Le second mécanisme repose sur la carte $\beta : \Omega \to [0, 1]$, également définie pixel par pixel. Les deux cartes α et β sont générées aléatoirement selon les formules suivantes :

$$\begin{cases} \alpha(\mathbf{x}) = d_{min} + (d_{max} - d_{min}) \displaystyle\sum_{i=1}^{N_1} \max\left(0, 1 - \frac{\|\mathbf{x} - \mathbf{x}_i\|_2}{R_i}\right) \\ \beta(\mathbf{x}) = \displaystyle\sum_{i=N_1+1}^{N_1+N_2} \max\left(0, 1 - \frac{\|\mathbf{x} - \mathbf{x}_i\|_2}{R_i}\right) \end{cases} \tag{3.6}$$

où N_1 et N_2 désignent respectivement le nombre de régions de diffusion locale et de perte locale dans les contours cellulaires. Les perturbations sont appliquées dans des régions circulaires distinctes de rayon R_i, centrées en des positions aléatoires $\mathbf{x}_i$ appartenant à un contour cellulaire (Figure 3.6). Les rayons R_i sont tirés aléatoirement selon une loi uniforme $\mathcal{U}([R_{min}, R_{max}])$, où R_{min} et R_{max} sont fixés à l'avance.

Il convient de souligner que la méthode présentée pour simuler des altérations locales sur les contours cellulaires segmentés manuellement repose sur six hyperparamètres : N_1, N_2, $d_{\min}$, $d_{\max}$, $R_{\min}$ et $R_{\max}$. Certains de ces paramètres ont été fixés à des valeurs typiques, tandis que d'autres ont été ajustés par une recherche sur grille (*grid search*) afin d'optimiser les performances de l'opérateur de fermeture développé. Le détail des valeurs choisies, ainsi que la procédure d'optimisation employée, seront présentés dans une section dédiée plus loin dans ce chapitre.

Interprétation variationnelle L'équation (3.5) proposée peut être également interprétée comme la minimisation de la fonctionnelle suivante :

$$E[u] = \frac{1}{2} \int_\Omega |\vec{\nabla} u(\mathbf{x})|^2 + \frac{\beta(\mathbf{x})}{\alpha(\mathbf{x})} u^2(\mathbf{x}) d\mathbf{x} \tag{3.7}$$

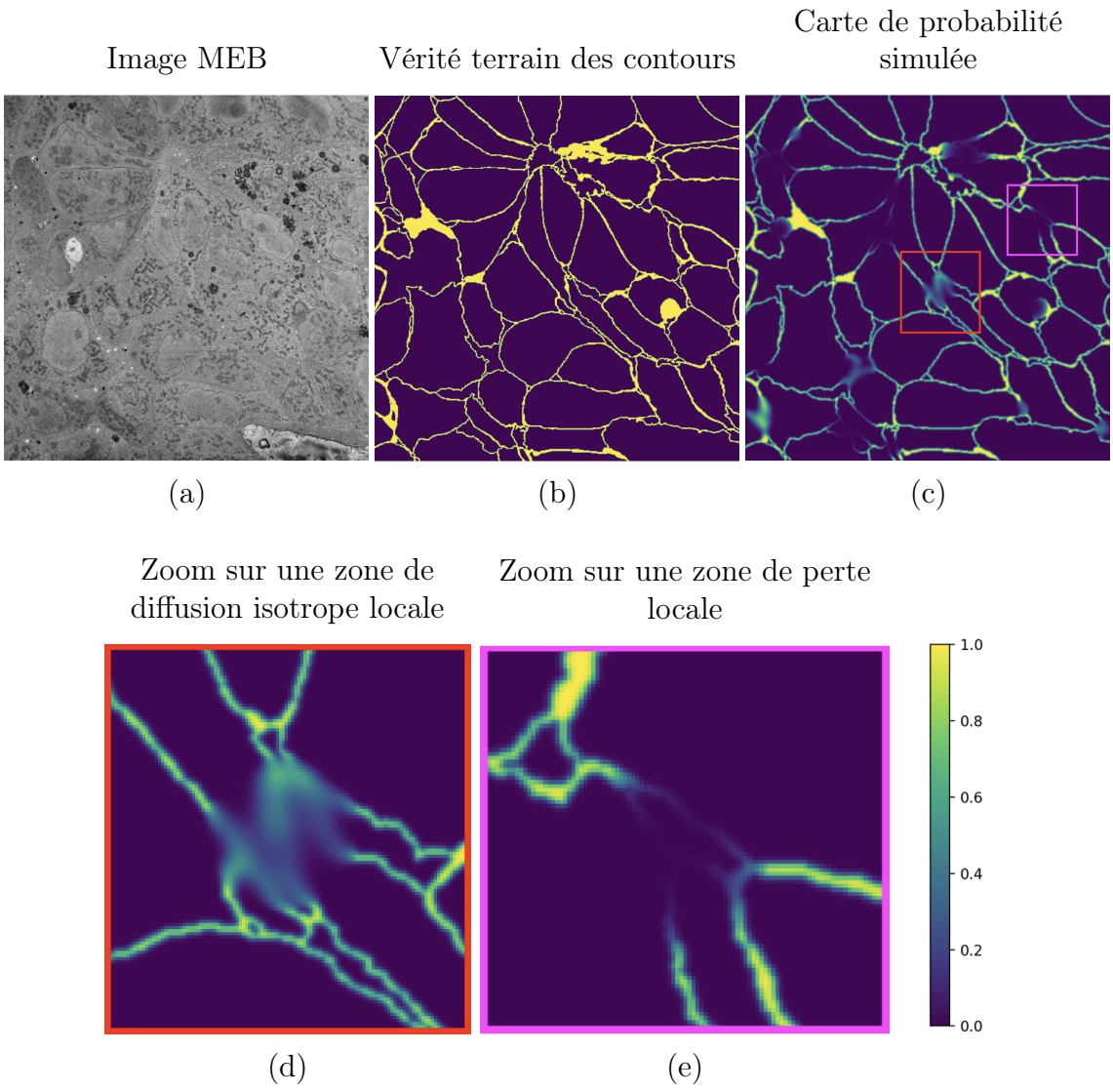


Figure 3.5 – Exemple typique de carte de probabilité avec des dégradations locales d'information simulées par l'équation (3.5) pour l'apprentissage du COp-Net. (a) : Coupe acquise par SBF-SEM. (b) : Contours cellulaires correspondants segmentés manuellement. (c) : Carte de probabilité des contours cellulaires simulés à partir de (b) à l'aide de l'équation (3.5). (d) : Zoom sur la zone rouge de (c), illustrant une diffusion isotrope globale et locale des contours. (e) Zoom sur la zone violette de (c), mettant en évidence une perte locale d'informations des contours cellulaires.

En effet, pour toute perturbation $v \in H^1(\Omega)$ et $\epsilon \in \mathbb{R}$, nous avons :

$$E[u + \epsilon v] = E[u] + \epsilon \int_\Omega \vec{\nabla} u(\mathbf{x}) \cdot \vec{\nabla} v(\mathbf{x}) + \frac{\beta(\mathbf{x})}{\alpha(\mathbf{x})} u(\mathbf{x}) v(\mathbf{x}) d\mathbf{x} + \epsilon^2 E[v] \tag{3.8}$$

Ainsi, la dérivée variationnelle de E selon la direction v est donnée par :

$$E'[u](v) = \int_\Omega \vec{\nabla} u(\mathbf{x}) \cdot \vec{\nabla} v(\mathbf{x}) + \frac{\beta(\mathbf{x})}{\alpha(\mathbf{x})} u(\mathbf{x}) v(\mathbf{x}) d\mathbf{x} \tag{3.9}$$

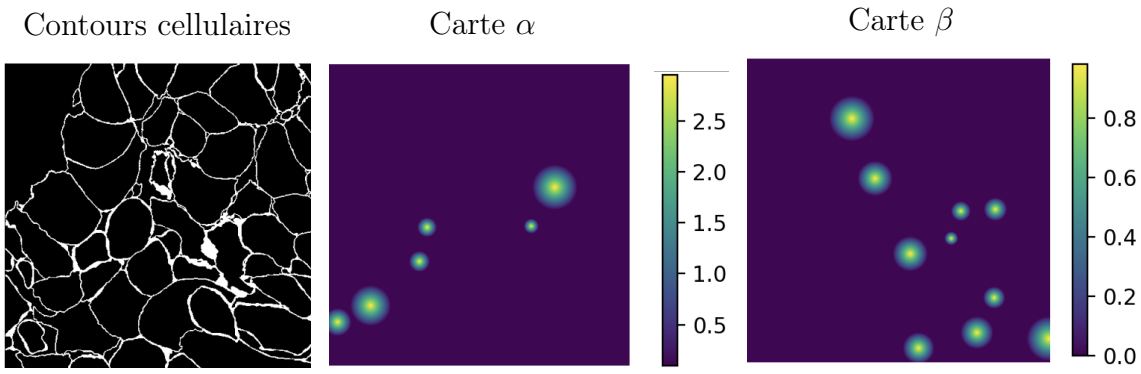


Figure 3.6 – Exemple typique des cartes α et β simulées par l'équation (3.6) où $R_{min} = 2\mu m$ et $R_{max} = 7\mu m$. (a) : Contours cellulaires segmentés manuellement (en noir : le fond ; en blanc : les contours cellulaires). (b) Carte α simulée avec les paramètres suivants : $d_{min} = 0.1\mu m^2 \cdot s^{-1}$, $d_{max} = 1\mu m^2 \cdot s^{-1}$, $N_1 = 6$ (c) Carte β simulée avec $N_2 = 10$.

Or, si $u \in H^2(\Omega)$, la formule d'intégration par partie de Green [161] et la condition au bord de Neumann homogène $\vec{\nabla} u \cdot \vec{n} = 0$ sur $\partial\Omega$ permettent d'obtenir :

$$\begin{aligned} \int_\Omega \vec{\nabla} u(\mathbf{x}) \cdot \vec{\nabla} v(\mathbf{x}) d\mathbf{x} &= -\int_\Omega \Delta u(\mathbf{x}) v(\mathbf{x}) d\mathbf{x} + \int_{\partial\Omega} \vec{\nabla} u \cdot \vec{n} v(\mathbf{x}) d\mathbf{x} \\ &= -\int_\Omega \Delta u(\mathbf{x}) v(\mathbf{x}) d\mathbf{x} \end{aligned} \tag{3.10}$$

D'où :

$$E'[u](v) = \int_\Omega -\Delta u(\mathbf{x}) v(\mathbf{x}) + \frac{\beta(\mathbf{x})}{\alpha(\mathbf{x})} u(\mathbf{x}) v(\mathbf{x}) d\mathbf{x} \tag{3.11}$$

En introduisant le produit scalaire pondéré :

$$\langle f, g \rangle_\alpha = \int_\Omega \frac{1}{\alpha(\mathbf{x})} f(\mathbf{x}) g(\mathbf{x}) d\mathbf{x} \tag{3.12}$$

où $\alpha(\mathbf{x}) > 0$ sur Ω car $d_{min} > 0$, nous obtenons alors la réécriture de la dérivée variationnelle de E suivante :

$$E'[u](v) = \langle -\alpha \Delta u + \beta u, v \rangle_\alpha \tag{3.13}$$

Ainsi, le gradient de E relativement à la métrique induite par $\langle \cdot, \cdot \rangle_\alpha$ est $\nabla_\alpha E = -\alpha \Delta u + \beta u$, et la descente de gradient :

$$\frac{\partial u}{\partial t} = -\nabla_\alpha E \tag{3.14}$$

coïncide avec l'équation (3.5). De plus, le calcul suivant montre que l'énergie décroît le long du flot.

$$\begin{aligned} \frac{d}{dt} E[u(t)] = E'[u](\partial_t u) &= \langle -\alpha \Delta u + \beta u, -\nabla_\alpha E \rangle_\alpha \\ &= -\langle \nabla_\alpha E, \nabla_\alpha E \rangle_\alpha = -\|\nabla_\alpha E\|_\alpha^2 \leq 0 \end{aligned} \tag{3.15}$$

Comportement asymptotique Comme $E[u]$ est minorée et décroit le long du flot, la solution $u(t)$ converge vers un point critique de E lorsque t tend vers $+\infty$. Celui-ci satisfait nécessairement l'équation stationnaire associée :

$$-\alpha(\mathbf{x})\Delta u_\infty(\mathbf{x}) + \beta(\mathbf{x})u_\infty(\mathbf{x}) = 0 \quad \text{dans } \Omega. \tag{3.16}$$

Étant donné que β est nul sur un sous-ensemble de mesure non nulle, la solution asymptotique est non triviale et est gouvernée par les régions où $\beta(\mathbf{x}) = 0$ (diffusion isotropique) et où $\beta(\mathbf{x}) > 0$ (perte de signal).

Résolution numérique de l'EDP Ce paragraphe détaille la méthode mise en œuvre pour la résolution numérique de l'équation (3.5). Pour ce faire, nous avons utilisé le schéma implicite de Crank-Nicolson défini par la formule suivante [35] :

$$\frac{u_{i,j}^{n+1} - u_{i,j}^{n}}{\Delta t} = \frac{1}{2}\left[F_{i,j}^{n+1}(u) + F_{i,j}^{n}(u)\right] \tag{3.17}$$

où $u_{i,j}^n = u(i\Delta x, j\Delta y, n\Delta t)$ avec Δx, Δy et Δt les pas de discrétisation spatiaux et temporel respectivement. Le terme $F_{i,j}^n(u)$ est donné par :

$$F_{i,j}^{n}(u) = \alpha_{i,j}\Delta u_{i,j}^{n} - \beta_{i,j}u_{i,j}^{n} \tag{3.18}$$

où $\alpha_{i,j} = \alpha(i\Delta x, j\Delta y)$ et $\beta i, j = \beta(i\Delta x, j\Delta y)$. L'opérateur de laplacien discret utilisé dans cette expression est approximé par différences finies :

$$\Delta u_{i,j}^{n} = \frac{u_{i+1,j}^{n} - 2u_{i,j}^{n} + u_{i-1,j}^{n}}{\Delta x^2} + \frac{u_{i+1,j}^{n} - 2u_{i,j}^{n} + u_{i-1,j}^{n}}{\Delta y^2} \tag{3.19}$$

En supposant que $\Delta x = \Delta y$, l'équation de Crank-Nicolson se réécrit alors :

$$\begin{aligned}
&\left(1 + \frac{\Delta t}{2\Delta x^2}(4\alpha_{i,j} + \beta_{i,j})\right) u_{i,j}^{n+1} - \frac{\Delta t}{2\Delta x^2}\alpha_{i,j}(u_{i+1,j}^{n+1} + u_{i-1,j}^{n+1} + u_{i,j+1}^{n+1} + u_{i,j-1}^{n+1}) \\
&= \left(1 - \frac{\Delta t}{2\Delta x^2}(4\alpha_{i,j} + \beta_{i,j})\right) u_{i,j}^{n} + \frac{\Delta t}{2\Delta x^2}\alpha_{i,j}(u_{i+1,j}^{n} + u_{i-1,j}^{n} + u_{i,j+1}^{n} + u_{i,j-1}^{n})
\end{aligned} \tag{3.20}$$

Ce schéma implicite conduit, à chaque itération temporelle, à la résolution d'un système linéaire de grande dimension. Pour cela, les images 2D u^n, u^{n+1}, α et β ont été vectorisées, et le problème a été reformulé sous forme matricielle : $BU^{n+1} = AU^n$. Le système creux résultant a ensuite été résolu de manière efficace à l'aide de la méthode du gradient conjugué. Le code que j'ai développé, permettant de résoudre l'équation (3.5) selon l'approche présentée ici, est disponible en ligne à l'adresse suivante : `https://github.com/Florian-40/CellSegm` (Annexe B).

Cependant, les perturbations modélisées à l'aide d'une EDP restent contraintes par le formalisme mathématique sous-jacent, ce qui ne garantit pas qu'elles reproduisent fidèlement la diversité et la complexité des altérations observées dans les données réelles. Dans cette perspective, il m'est apparu naturel d'explorer une approche complémentaire, reposant cette fois sur des réseaux génératifs, afin de modéliser des perturbations plus variées et potentiellement plus représentatives des erreurs effectivement rencontrées lors de la segmentation.

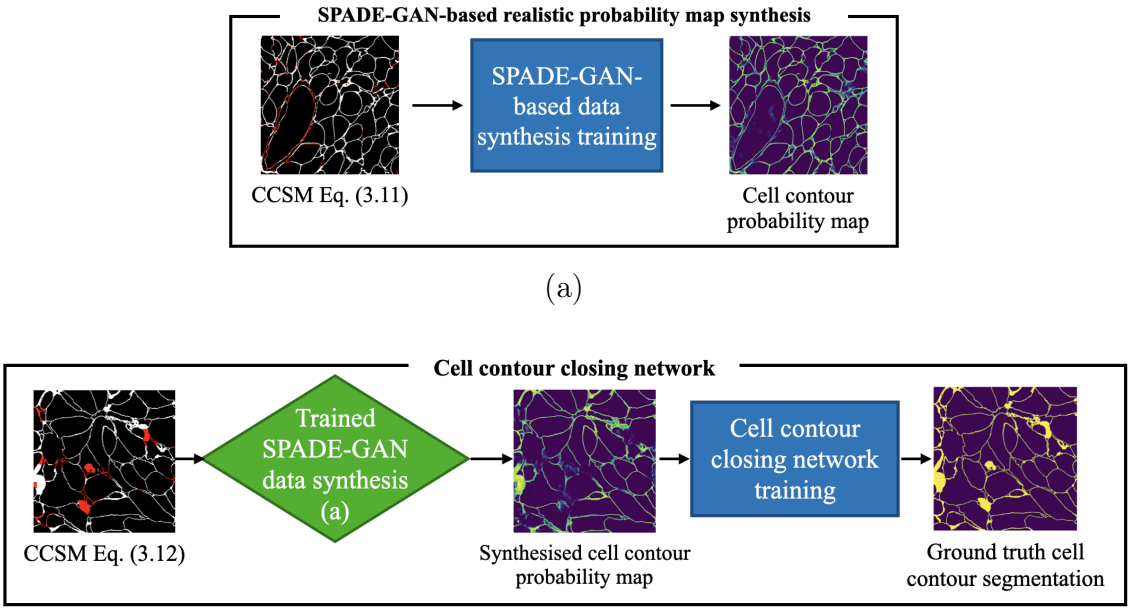


Figure 3.7 – Schéma de l'approche complète combinant (a) l'entraînement du SPADE-GAN et (b) la génération de nouvelles cartes de probabilité à partir de CCSM aléatoires, utilisées pour entraîner le COp-Net. Les rectangles bleus représentent les réseaux en phase d'apprentissage, tandis que le losange vert indique le réseau utilisé pour l'inférence.

Modélisation des pertes et dégradations locales d'information à l'aide d'un réseau de génération d'images

Notre seconde approche vise à générer automatiquement des cartes de probabilité de contours cellulaires altérées mais plus réalistes que celles obtenues précédemment. Cela repose sur la génération de cartes sémantiques synthétiques et grossièrement dégradées, appelées *Cell Contour Semantic Maps* (CCSM). Ces CCSM offrent un moyen simple et contrôlable de produire un grand nombre de données en spécifiant uniquement la localisation et l'ampleur des perturbations à simuler. A partir de ces CCSM, l'objectif est d'avoir un modèle capable de reproduire les erreurs typiques observées en sortie de la première étape de segmentation des contours cellulaires (Step #1 dans la Figure 3.3). Pour ce faire, nous utilisons un réseau de neurones de type GAN, et plus précisément l'architecture SPADE (*SPatially-Adaptative (DE)normalization*), spécialement conçue pour la synthèse d'image conditionnelle à partir de carte sémantique [126].

Cette approche se déroule en deux étapes principales, illustrées à la Figure 3.7 et détaillées dans la suite de cette section : (a) l'entraînement du SPADE-GAN à partir de paires CCSM/cartes de probabilité réelles, et (b) la génération de nouvelles cartes de probabilité à partir de CCSM aléatoires, utilisées ensuite pour entraîner le COp-Net. La mise en œuvre de ces deux étapes nécessite la création de jeux de données spécifiques, dont nous détaillons ci-après les modalités de génération.

Entrainement du SPADE-GAN Pour entraîner le réseau SPADE-GAN, nous avons constitué un jeu de données supervisé composé des paires entrée/cible. Les cibles sont des cartes de probabilité réelles des contours cellulaires $u : \Omega \to [0, 1]$, définies sur un domaine $\Omega \subset \mathbb{R}^2$. Ces cartes ont été obtenues à partir de l'étape de segmentation initiale (Step #1 dans la Figure 3.3).

À partir de ces cartes, nous avons généré des cartes sémantiques de contours cellulaires grossièrement dégradées (CCSM) en combinant l'information des cartes de probabilité u et des vérités terrains u_0, représentant les contours manuellement annotés. La génération des CCSM suit la formule suivante :

$$CCSM(u_0, u)(\mathbf{x}) = u_0(\mathbf{x}) \left(1 + \mathbb{1}_{u(\mathbf{x})<0.5}(\mathbf{x})\right) \tag{3.21}$$

où $\mathbf{x} \in \Omega$ représente les coordonnées 2D des pixels dans le domaine de l'image. Ainsi, un label sémantique est affecté à chaque pixel des contours cellulaires selon le niveau de confiance de la segmentation initiale u. Lorsque la confiance est supérieure à 0.5, le pixel est conservé comme contour fiable (label 1). Lorsque la confiance est inférieure à 0.5, le pixel est considéré comme contour peu fiable (label 2). Cette transformation permet de produire une carte CCSM qui encode à la fois l'emplacement des contours cellulaires et les incertitudes associées à leur détection. La Figure 3.8 illustre un exemple typique de ce processus.

Le réseau SPADE-GAN est ensuite entraîné de manière supervisée : les CCSM servent d'images d'entrée, tandis que les cartes de probabilité réelles associées constituent les cibles à prédire. Le réseau apprend ainsi à générer, à partir de cartes sémantiques grossières, des cartes de probabilité de contours réalistes imitant les défauts couramment observés dans les segmentations.

Génération de nouvelles cartes de probabilité à partir de CCSM aléatoires Une fois le réseau SPADE-GAN entraîné, il peut être utilisé pour générer des cartes de probabilité réalistes à partir de cartes sémantiques grossières simulées aléatoirement (CCSM). Ces cartes sont créées directement à partir des contours manuellement segmentés u_0, selon la formule suivante :

$$CCSM(u_0)(\mathbf{x}) = u_0(\mathbf{x}) \left(1 + \sum_{i=1}^{N} \mathbb{1}_{\|\mathbf{x}-\mathbf{x}_i\|_1 \leq R_i}(\mathbf{x})\right) \tag{3.22}$$

où $\mathbf{x} \in \Omega$ représente les coordonnées 2D des pixels dans le domaine de l'image et N le nombre de régions à dégrader. Les perturbations grossières sont appliquées dans des régions carrées distinctes de côté R_i et centrées autour d'un point $\mathbf{x}_i$ choisi aléatoirement sur un contour cellulaire. Les côtés R_i sont tirés aléatoirement selon une loi uniforme $\mathcal{U}([R_{min}, R_{max}])$, où R_{min} et R_{max} sont fixés à l'avance. Les CCSM synthétiques obtenues par cette méthode contiennent ainsi trois types de pixels : des pixels de fond (label 0), des pixels appartenant à des contours cellulaires intacts (label 1), et des pixels de contour aléatoirement affectés par des dégradations locales simulées (label 2).

Le SPADE-GAN peut ensuite exploiter ces CCSM comme entrées pour produire des cartes de probabilités réalistes, en imitant les défauts typiques appris durant l'entraînement. La Figure 3.9 illustre un exemple typique de carte sémantique générée par l'équation (3.22) et de carte de probabilité réaliste générée par le SPADE-GAN.

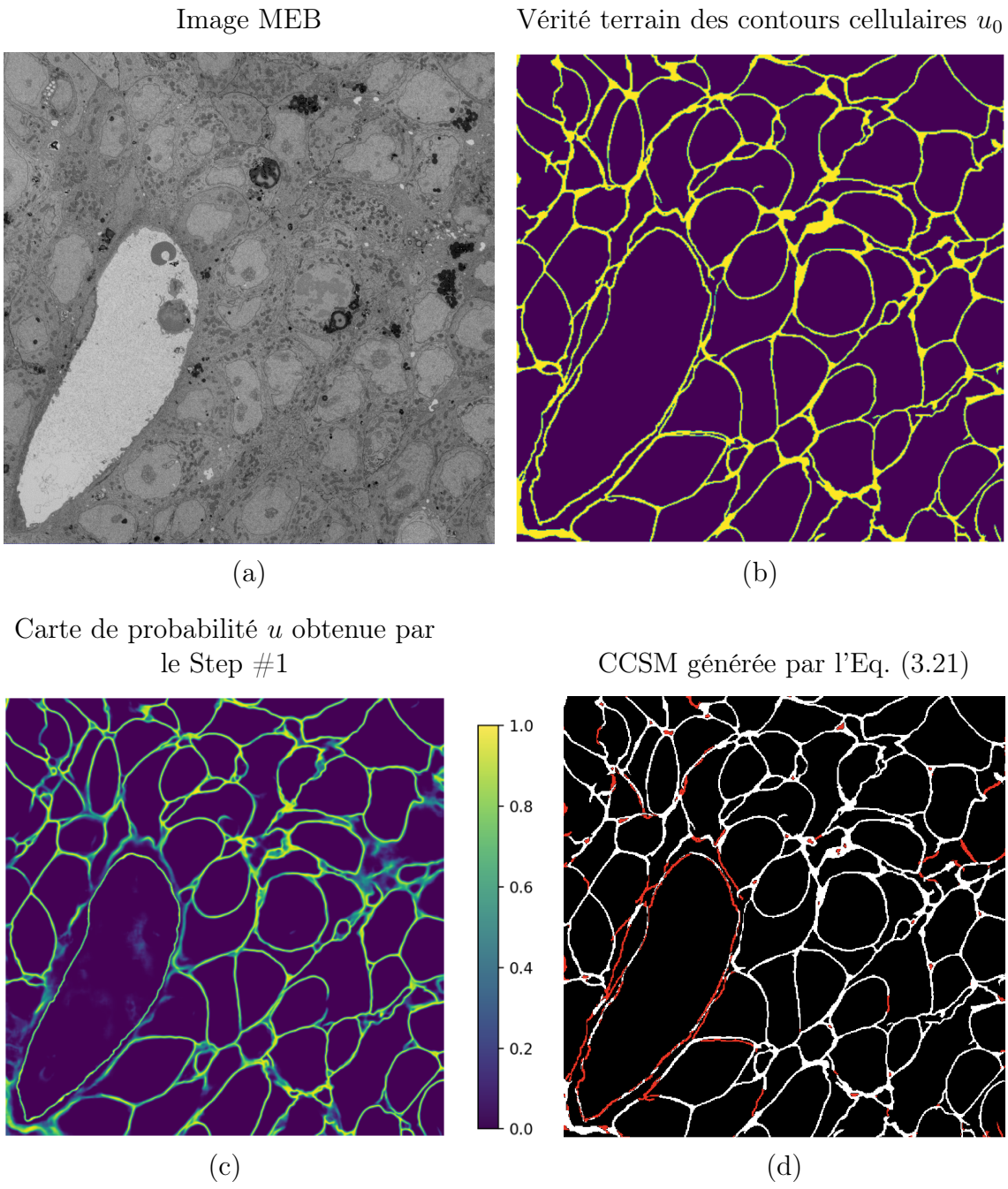


Figure 3.8 – Exemple typique de carte sémantique des contours cellulaires grossièrement dégradées par l'équation (3.21) pour l'apprentissage du SPADE-GAN. (a) : Coupe acquise par SBF-SEM. (b) : Contours cellulaires correspondants segmentés manuellement. (c) : Carte de probabilité des contours cellulaires obtenue par une segmentation initiale (Step #1 dans la Figure 3.3). (d) : Carte sémantique générée à partir de (b) et (c) par l'équation (3.21) (fond=pixels noirs/label 0, contours cellulaires fiables=pixels blancs/label 1, contours cellulaires peu fiables=pixels rouges/label 2).

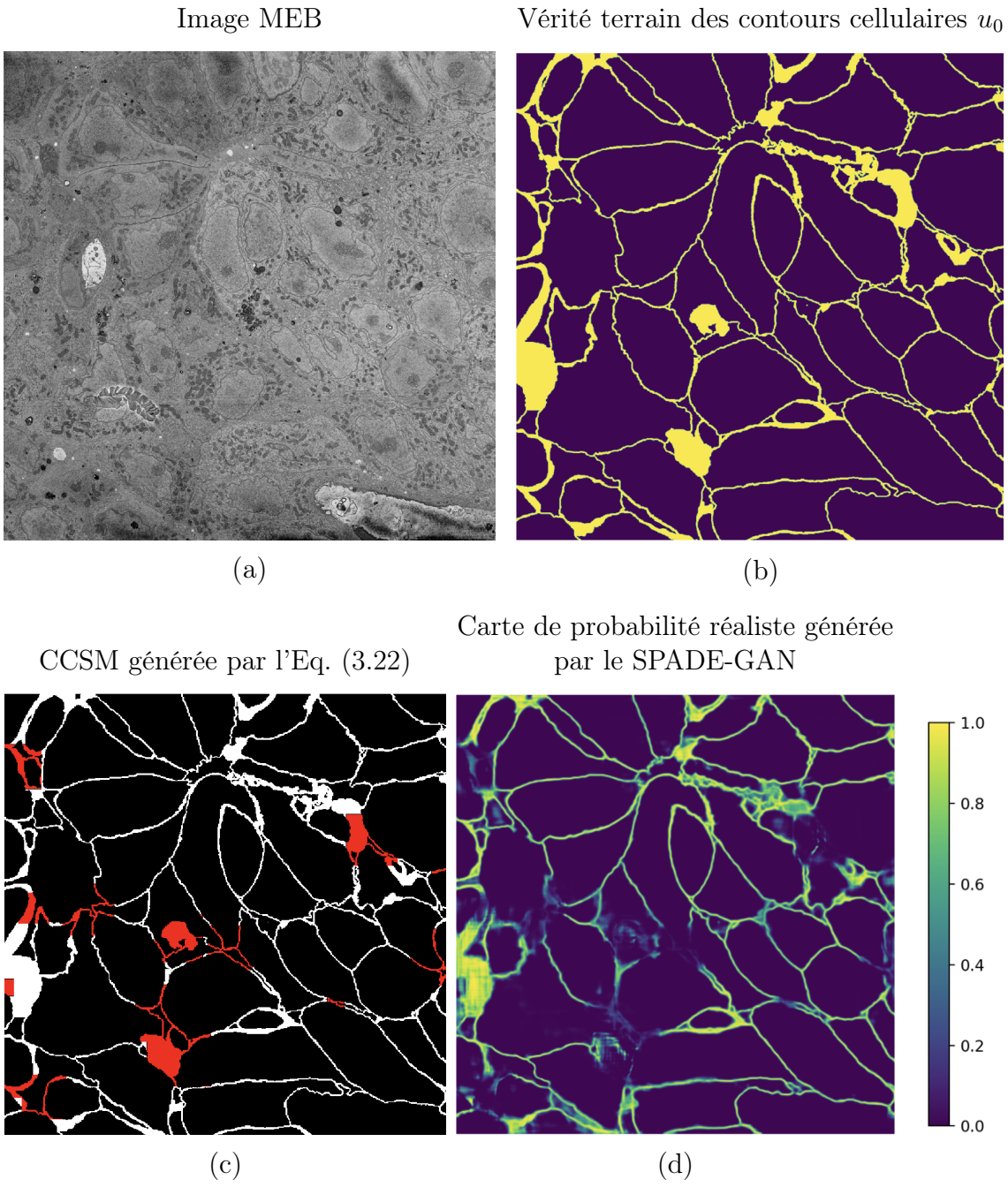


Figure 3.9 – Exemple typique de carte sémantique des contours cellulaires générée par l'équation (3.22) pour générer les données d'entrainement du COp-Net. (a) : Coupe acquise par SBF-SEM. (b) : Contours cellulaires correspondants segmentés manuellement. (c) : Carte sémantique générée à partir de (b) par l'équation (3.22) (fond=pixels noirs/label 0, contours cellulaires=pixels blancs/label 1, zones aléatoires de contours cellulaires affectés par des dégradations locales simulées=pixels rouges/label 2). (d) : Carte de probabilité des contours cellulaires simulée par le SPADE-GAN à partir de (c). Nous pouvons observer que les régions dégradées sur cette image correspondent aux zones rouges (label 2) sur la CCSM (c).

Il convient de souligner que la méthode présentée pour simuler des CCSM repose sur trois hyperparamètres : N, $R_{\min}$ et $R_{\max}$. Ces paramètres ont été fixés à des valeurs typiques pour garantir le réalisme des cartes de probabilité synthétisées par le SPADE-GAN. Le détail des valeurs choisies sera présenté dans une section dédiée plus loin dans ce chapitre.

3.3 Validation expérimentale de l'opérateur de fermeture (COp-Net)

Après avoir détaillé les principes de conception, les méthodes de simulation de données pour l'entraînement de notre opérateur de fermeture des contours cellulaires (COp-Net), nous abordons à présent son évaluation comparative. L'objectif est de mesurer dans quelle mesure ce module complémentaire améliore la qualité des segmentations par instance des cellules, étape indispensable à la construction de notre jumeau numérique pour l'analyse bioarchitecturale des tissus biologiques à l'échelle cellulaire et subcellulaire.

Dans un premier temps, nous détaillons les différents jeux de données mobilisés pour l'entrainement, la validation et le test de l'opérateur présenté. Dans un second temps, nous introduisons les métriques retenues pour évaluer la performance de l'individualisation cellulaire et la précision des contours segmentés. Ces métriques, à la fois théoriques et empiriques, permettent une évaluation rigoureuse de la qualité des résultats obtenus. Ensuite, nous décrivons les conditions expérimentales dans lesquelles notre approche et les approches concurrentes ont été testées, qu'il s'agisse de méthodes de segmentation par instance ou de techniques de comblement des discontinuités dans les contours. Cette comparaison s'inscrit dans un cadre équitable, permettant d'isoler les apports spécifiques du COp-Net. Nous montrons ensuite que notre approche permet non seulement d'améliorer significativement la qualité des segmentations par instance des cellules en renforçant la continuité et la précision des contours cellulaires. Par ailleurs, elle réduit fortement la charge de correction manuelle généralement requise par les biologistes, rendant le processus plus rapide, reproductible et accessible. Enfin, malgré ces avancées, nous soulignons que cette correction 2D des contours ne suffit pas, à elle seule, à reconstituer correctement les cellules en 3D dans le volume. Cette limite justifie les développements méthodologiques du chapitre suivant, consacrés à la reconstruction volumique des cellules à partir des résultats 2D ainsi obtenus.

3.3.1 Données utilisées pour l'entraînement, la validation et le test de l'opérateur de fermeture (COp-Net)

Maintenant que les aspects méthodologiques liés à l'opérateur de fermeture et aux stratégies de modélisation de perturbations utilisées pour son entraînement ont été exposés, nous présentons ici les différents jeux de données mobilisés pour l'entraînement, la validation et le test de cet opérateur (Figure 3.10). En raison de la difficulté à obtenir des vérités terrains précises pour les contours cellulaires, seuls certains volumes annotés parmi les dix volumes disponibles dans cette thèse ont pu

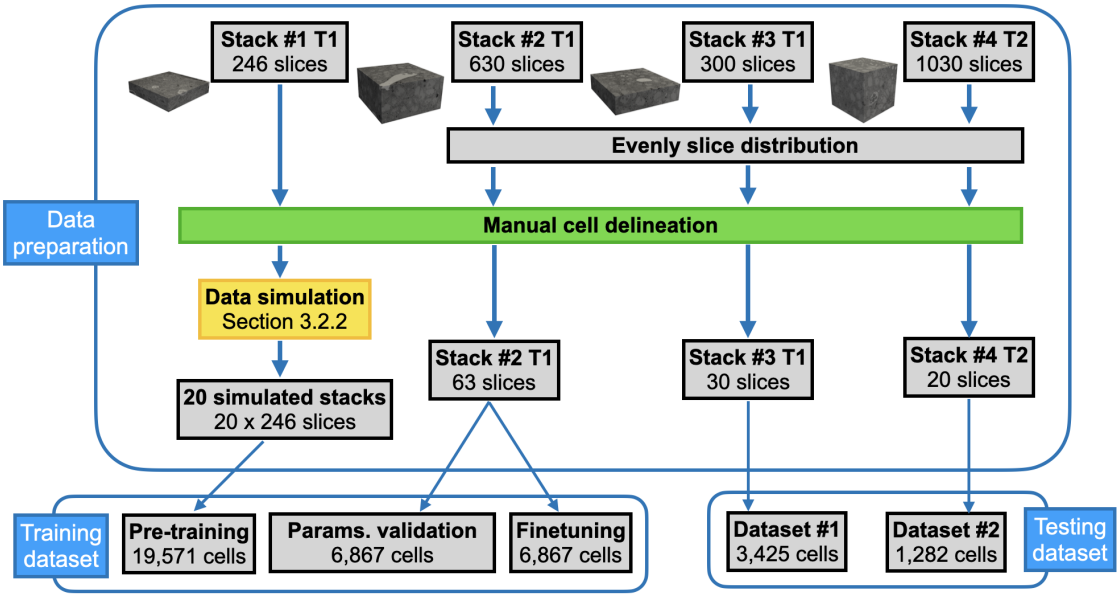


Figure 3.10 – Préparation et distribution des volumes acquis par SBF-SEM utilisés pour entrainer, valider et tester le COp-Net et les méthodes de simulation de cartes de probabilité. T1 et T2 représentent deux échantillons issus de tissus tumoraux PDX différents. Le nombre de délimitations cellulaires est spécifié pour les différents jeux de données.

être exploités à cette étape. Par ailleurs, afin de réduire les temps de calcul, toutes les images ont été redimensionnées en 512×512 pixels, correspondant à une taille de voxel de $176 \times 176 \times 50$ nm^3, en complément des étapes de prétraitement détaillées dans le chapitre précédent.

Données synthétiques pour l'entrainement initial de l'opérateur de fermeture

Un total de 246 coupes segmentées manuellement lors d'un travail préliminaire [40] a servi de base pour simuler des cartes de probabilité avec les deux approches aléatoires développées précédemment. Pour chaque coupe, 20 versions dégradées ont été générées à partir de la modélisation par EDP ou par le SPADE-GAN, conduisant à un jeu de données de 20×246 paires d'images. Ces paires associent une carte de probabilité dégradée des contours cellulaires à sa version corrigée. Elles ont ensuite été utilisées pour pré-entraîner l'opérateur de fermeture (COp-Net) à détecter et combler automatiquement les discontinuités dans les contours cellulaires.

Données réelles pour l'entrainement des méthodes de simulations et le *finetuning*

Les 630 premières coupes d'un second volume, issu du même tissu que celui utilisé pour l'entraînement initial, ont été exploitées. Ce volume a été acquis et traité conformément à la procédure décrite au chapitre précédent. Une segmentation initiale des contours cellulaires (Step #1 dans la Figure 3.3) a été réalisée, puis un expert biologiste a corrigé manuellement une coupe sur dix, de façon régulière

sur l'ensemble du volume. Les 63 paires ainsi obtenues, constituées des cartes de probabilité issues de la segmentation initiale et de leurs corrections manuelles, ont été utilisées pour l'entrainement du SPADE-GAN via l'équation (3.21), l'optimisation d'hyperparamètres de l'équation (3.5) et le *finetuning* de l'opérateur COp-Net sur des données réelles.

Données de test pour l'évaluation de l'opérateur de fermeture

Deux volumes indépendants ont été utilisés pour évaluer l'approche proposée. Le premier contient les 300 dernières coupes du volume mentionné précédemment (même tissu mais région différente). Une coupe sur dix a été segmentée manuellement, soit un total de 30 coupes. Le second provenant d'un autre patient est composé de 1030 coupes et a également été acquis et prétraité selon la même procédure. Une coupe sur 50 a été segmentée manuellement, soit 20 coupes en tout. Ces deux ensembles permettent de valider la robustesse du modèle, à la fois sur une région différente du tissu utilisé à l'entraînement, et sur un tissu indépendant issu d'un autre patient.

3.3.2 Métriques d'évaluation de la fermeture des contours cellulaires

L'évaluation de l'efficacité du COp-Net repose sur deux axes complémentaires, reflétant les objectifs principaux de cet opérateur dans le cadre de la segmentation par instance des cellules. D'une part, nous analysons sa capacité à améliorer l'individualisation des cellules, c'est-à-dire à permettre l'assignation d'un label unique et cohérent à chaque cellule au sein du volume analysé. D'autre part, nous évaluons dans quelle mesure le COp-Net contribue à renforcer la continuité des contours cellulaires segmentés, réduisant ainsi les discontinuités fréquentes qui compromettent la qualité des segmentations automatiques.

Ces deux aspects sont essentiels : le premier garantit une segmentation exploitable pour les analyses bioarchitecturales, tandis que le second vise à limiter le recours aux corrections manuelles longues, fastidieuses et peu reproductibles effectuées par les biologistes experts. Les métriques retenues dans cette section permettent de quantifier ces deux dimensions de manière rigoureuse et reproductible.

Individualisation des cellules

Pour évaluer la qualité de la segmentation par instance, nous avons calculé le pourcentage de cellules correctement identifiées individuellement. Une cellule est considérée comme correctement segmentée si le recouvrement entre son masque prédit et le masque de référence (vérité terrain) dépasse 85%. Cette métrique fournit une indication globale sur la capacité du modèle à délimiter précisément les cellules.

Afin de caractériser plus finement les erreurs de segmentation, nous distinguons deux types de cas fréquents : (i) les cellules regroupées à tort, souvent dues à des contours absents ou discontinus, correspondant à des faux négatifs ; et (ii) les cellules

séparées par erreur, causées par des contours superflus ou introduits à tort, correspondant à des faux positifs. Le pourcentage de cellules affectées par ces erreurs est également reporté afin de mieux comprendre les limites des approches comparées.

Segmentation des contours cellulaires

Pour évaluer la qualité de la segmentation des contours cellulaires, nous avons utilisé deux métriques recommandées par un cadre d'évaluation [110] : la distance surfacique normalisée (NSD) (*normalized surface distance*) [121] et le coefficient *centerline Dice* (clDice) [153]. Le NSD quantifie le chevauchement des contours de deux éléments A et B tout en intégrant une marge d'erreur τ afin d'en assurer la robustesse. Il est défini par :

$$\mathrm{NSD}(A,B)_\tau = \frac{|S_A \cap \mathcal{B}_B^{(\tau)}| + |S_B \cap \mathcal{B}_A^{(\tau)}|}{|S_A| + |S_B|} \tag{3.23}$$

où S_A et S_B désignent respectivement les contours de A et B, tandis que $\mathcal{B}_A^{(\tau)}$ et $\mathcal{B}_B^{(\tau)}$ désignent leur régions de bord de largeur τ. Dans notre cas, nous avons calculé cette métrique pour chaque coupe avec $\tau = 2$, en comparant le masque de segmentation sémantique des cellules avec le masque de référence (vérité terrain).

Le clDice évalue, quant à lui, le recouvrement des structures de forme tubulaire en intégrant deux notions fondamentales : la précision topologie T_{prec} et la sensibilité topologique T_{sens} définies par :

$$\begin{aligned} T_{\mathrm{prec}}(S_{\mathrm{Pred}}, \mathrm{Ref}) &= \frac{|S_{\mathrm{Pred}} \cap \mathrm{Ref}|}{|S_{\mathrm{Pred}}|} \\ T_{\mathrm{sens}}(S_{\mathrm{Ref}}, \mathrm{Pred}) &= \frac{|S_{\mathrm{Ref}} \cap \mathrm{Pred}|}{|S_{\mathrm{Ref}}|} \end{aligned} \tag{3.24}$$

où S_{Pred} et S_{Ref} désignent respectivement le squelette de la prédiction Pred et de la vérité terrain Ref. Le clDice est ensuite défini par leur moyenne harmonique :

$$\mathrm{clDice}(\mathrm{Ref}, \mathrm{Pred}) = \frac{2 \times T_{\mathrm{prec}}(S_{\mathrm{Pred}}, \mathrm{Ref}) \times T_{\mathrm{sens}}(S_{\mathrm{Ref}}, \mathrm{Pred})}{T_{\mathrm{prec}}(S_{\mathrm{Pred}}, \mathrm{Ref}) + T_{\mathrm{sens}}(S_{\mathrm{Ref}}, \mathrm{Pred})} \tag{3.25}$$

Mesure de l'efficacité pratique

Pour estimer l'apport concret de notre approche dans un cadre applicatif réel, un expert biologiste a mesuré le temps nécessaire pour tracer ou corriger les contours cellulaires à l'aide d'une tablette graphique (Cintiq Pro 5, Wacom). Ces mesures ont été réalisées sur un ensemble de coupes sélectionnées aléatoirement ($n > 10$) au sein du jeu de test Dataset #2 (Figure 3.10). Trois situations distinctes ont été comparées : d'une part, la segmentation manuelle complète des cellules, sans assistance algorithmique ; d'autre part, la correction des contours prédits automatiquement par le nnU-Net seul (Step #1 dans la Figure 3.3) ; et enfin, la correction des contours après application de notre opérateur de fermeture COp-Net supplémentaire (Step #1 + Step #2 dans la Figure 3.3). Cette comparaison permet de quantifier la réduction effective du temps de correction grâce à notre méthode, et ainsi d'évaluer son impact pratique en terme de gain de temps et de confort pour les utilisateurs finaux.

3.3.3 Sélection des hyperparamètres pour la simulation des dégradations locales d'information

Nous rappelons que les méthodes proposées pour la simulation de cartes de probabilité théoriques reposent sur plusieurs hyperparamètres. En particulier, l'approche fondée sur l'EDP en comporte six, tandis que celle basée sur le SPADE-GAN n'en utilise que trois. Parmi ces hyperparamètres, les plus influents sont les paramètres N_1 et N_2 de l'équation (3.5), qui contrôlent respectivement le nombre de régions de diffusion locale et de suppression locale dans les cartes de probabilité des contours cellulaires. Afin de déterminer des valeurs optimales, une recherche par grille (*grid search*) a été réalisée sur le domaine $\{0, 6, 12\} \times \{0, 10, 20\}$. Concrètement, l'opérateur de fermeture COp-Net a été entraîné avec des données simulées issues du Stack #1 (Figure 3.10) pour chaque couple (N_1, N_2), puis évalué à l'aide des différentes métriques présentées précédemment sur le Stack #2 (Figure 3.10). Les résultats détaillés dans la suite de ce chapitre ont conduit à sélectionner par défaut le couple d'hyperparamètres $(N_1, N_2) = (6, 10)$, utilisé dans l'ensemble des expériences menées.

Les autres hyperparamètres de l'équation (3.5) ont été déterminés empiriquement à partir d'observations visuelles, en adoptant les valeurs typiques suivantes : $R_{min} = 2\mu m$, $R_{max} = 7\mu m$, $d_{min} = 0.1\mu m^2 \cdot s^{-1}$ et $d_{max} = 1\mu m^2 \cdot s^{-1}$. Ces valeurs ont ensuite été adaptées pour les paramètres de l'équation (3.22) en fixant $N = 15$, $R_{min} = 2\mu m$ et $R_{max} = 14\mu m$.

3.3.4 Comparaison avec des approches de l'état de l'art

Afin d'évaluer rigoureusement les performances de l'opérateur de fermeture COp-Net, nous l'avons comparé à plusieurs approches représentatives de l'état de l'art. Cette comparaison couvre les deux dimensions centrales abordées dans ce chapitre : d'une part, la segmentation par instance des cellules, et d'autre part, la reconstruction de contours discontinus. Les méthodes sélectionnées incluent des algorithmes reconnus pour leur efficacité dans des contextes variés, permettant ainsi de situer les performances de notre approche dans un cadre de référence solide et de valider ses apports méthodologiques.

Algorithme Cellpose

Nous avons comparé notre approche au modèle Cellpose, un algorithme de référence pour la segmentation par instance des cellules à partir d'images de natures variées, régulièrement mis à jour et optimisé [163, 125, 162]. Le Cellpose repose sur une architecture 2D de CNN, produisant deux cartes de flux (horizontal et vertical) combinées à une carte indiquant la probabilité pour chaque pixel d'appartenir à une cellule. L'identification des différentes cellules est obtenue en appliquant une ascension de gradient sur les cartes de flux à partir des pixels pour lesquels la probabilité est supérieure à 0.5. Les pixels convergeant vers le même point fixe sont ainsi regroupés et considérés comme appartenant à la même cellule.

Pour garantir une comparaison équitable avec notre méthode, le modèle cyto3 de Cellpose a été *finetuné* en utilisant les annotations manuelles issues des coupes

du Stack #1 et Stack #2 (Figure 3.10). De plus, afin d'évaluer spécifiquement la qualité de segmentation des contours cellulaires, nous avons extrait des contours à partir des cartes de probabilité produites par le Cellpose à l'aide d'une fonction de la bibliothèque SimpleITK [104].

Opérateur de fermeture binaire

Nous avons également comparé notre opérateur de fermeture à une approche d'apprentissage profond proposée dans la littérature en 2018 et spécifiquement conçue pour la détection et le comblement de discontinuités dans les segmentations binaires [25]. Ce modèle repose sur une architecture 2D de type CNN intégrant des *skip connections*, plus communément appelée U-Net.

Le réseau étant conçu pour être appliqué sur des images binaires, nous avons adapté la génération de données d'entraînement afin d'assurer une comparaison pertinente. Plus précisément, des discontinuités ont été introduites dans les segmentations manuelles du Stack #1 (Figure 3.10). Pour cela, les contours cellulaires ont été supprimés dans 16 régions circulaires de rayon R_i, centrées en des positions aléatoires appartenant à un contour cellulaire. Les rayons R_i, en µm, sont tirés aléatoirement selon une loi uniforme $\mathcal{U}[1, 3.5]$. Cette procédure a permis de générer 20×246 paires image/cible utilisées pour un pré-entraînement du réseau. Celui-ci a ensuite été *finetuné* sur les segmentations du Stack #2 (Figure 3.10).

3.3.5 Évaluation et comparaison de l'opérateur de fermeture

Maintenant que l'ensemble de l'approche méthodologique a été détaillé, cette section présente une évaluation rigoureuse des performances de notre méthode sur des images acquises par SBF-SEM. Pour ce faire, deux jeux de données acquis dans le cadre de cette thèse ont été utilisés : le premier (Dataset #1 dans la Figure 3.10) provient d'une région tissulaire différente de celle ayant servi à l'entrainement de l'opérateur de fermeture, tandis que le second (Dataset #2 dans la Figure 3.10) est issu d'un patient distinct. Pour compléter cette analyse, deux cas d'études supplémentaires sur des données publiques ont été explorés afin d'évaluer la robustesse et la reproductibilité de notre approche (Annexe A).

La Figure 3.11 propose une comparaison visuelle des résultats obtenus sur le Dataset #2. Nous y retrouvons l'image acquise par SBF-SEM (Figure 3.11a), la segmentation manuelle de référence (Figure 3.11b), ainsi que les résultats des approches concurrentes et de notre méthode. Nous pouvons observer que si le Cellpose (Figure 3.11c) et le nnU-Net seul (Figure 3.11d) permettent de détecter un nombre non négligeable de cellules, ces résultats souffrent respectivement d'une segmentation imprécise des contours et d'un important regroupement erroné des cellules. L'ajout d'une méthode classique de comblement des discontinuités (Figure 3.11e) améliore légèrement la détection mais reste insuffisant pour séparer les cellules regroupées par erreur. En revanche, nos deux variantes du COp-Net, entraînées selon les approches EDP ou GAN, apportent un net gain en qualité : les contours cellulaires sont plus précis et les cellules mieux individualisées (Figures 3.11f,g). Ces améliorations, particulièrement notables sur le Dataset #2, démontrent la capacité de notre approche

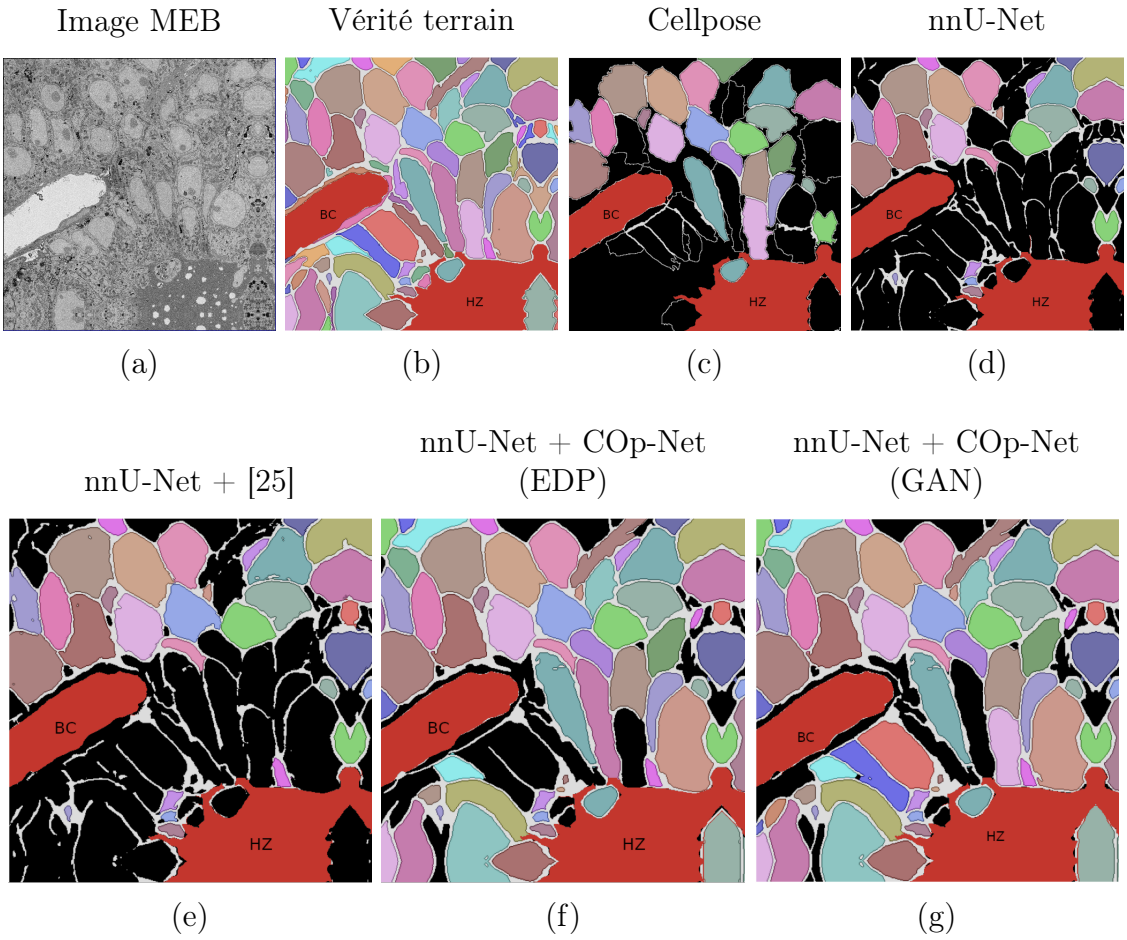


Figure 3.11 – Comparaison visuelle des résultats obtenus sur le jeu de données de test Dataset #2. (a) : Coupe acquise par SBF-SEM. (b-g) : la couleur blanche représente les contours cellulaires, la couleur rouge représente un capillaire sanguin (BC) et une zone hémorragique (HZ) obtenus par segmentation semi-automatique, les cellules colorées représentent les cellules correctement identifiées par rapport à la vérité terrain (b), et la couleur noire indique les erreurs par rapport à la vérité terrain. (c) : Les contours cellulaires ont été obtenus en utilisant la carte de probabilité générée par le Cellpose et une fonction de contour classique.

à se généraliser à d'autres types de données issues de patients différents.

Ces observations visuelles ont été confirmées sur les deux jeux de données de test (Dataset #1 et #2) dans la Table 3.1. Notre méthode permet d'atteindre un taux de cellules correctement identifiées supérieur à 70% sur les deux jeux de test, là où les méthodes concurrentes restent bien en deçà, notamment sur Dataset #2 où elles peinent à dépasser 30%. De plus, le COp-Net augmente de façon notable le NSD et le clDice, et réduit significativement la proportion de cellules regroupées par erreur, traduisant une meilleure séparation des structures avec seulement une légère hausse de la proportion de cellules séparées par erreur. Si l'on compare les métriques d'identification et de segmentation obtenues avec le nnU-Net seul (Step #1 dans la Figure 3.3) dans les deux jeux de données de test, il est évident que la généralisation de cette étape est un défi, en particulier pour les images acquises à partir de différents tissus. De fait, l'algorithme de segmentation s'appuie sur des

Table 3.1 – Évaluation et comparaison de l'approche proposée sur les deux jeux de données de tests (#1=3425 délimitations cellulaires, #2=1282). Des pourcentages plus élevés de cellules correctement identifiées indiquent une meilleure performance, tandis que des pourcentages plus faibles de cellules regroupées ou séparées de manière erronée reflètent moins d'erreurs. En outre, les scores NSD et clDice les plus élevés correspondent à une meilleure qualité de segmentation des contours. Les meilleurs résultats sont indiqués en caractères gras, et * indique les résultats de notre COp-Net qui démontrent une amélioration significative par rapport au nnU-Net seul (Step #1 dans la Figure 3.3) (test asymétrique de Mann-Whitney [188], $p < 0.05$).

	Métriques d'identification			**Métriques de segmentation**	
	Cellules correctement identifiées [%]	**Cellules regroupées par erreur** [%]	**Cellules séparées par erreur** [%]	**NSD** [A.U.]	**clDice** [A.U.]
Cellpose					
Dataset #1	42.8 ± 4.4	20.5 ± 4	36.8 ± 4.4	$0.81 \pm .01$	$0.37 \pm .03$
Dataset #2	29.2 ± 6.1	31 ± 6.6	39.7 ± 9.3	$0.66 \pm .05$	$0.34 \pm .04$
nnU-Net					
Dataset #1	61.6 ± 4.1	21.7 ± 4.4	$\mathbf{16.7 \pm 3.3}$	$0.94 \pm .01$	$0.9 \pm .01$
Dataset #2	24 ± 9.1	73.5 ± 9.5	$\mathbf{2.5 \pm 2.5}$	$0.81 \pm .05$	$0.80 \pm .04$
nnU-Net + [25]					
Dataset #1	64.3 ± 4.1	16.7 ± 4.2	19.1 ± 3.4	$0.94 \pm .01$	$0.89 \pm .01$
Dataset #2	30.7 ± 8.8	64.2 ± 9	5 ± 3	$0.82 \pm .04$	$0.80 \pm .04$
nnU-Net + COp-Net (EDP) (1ère itération)					
Dataset #1	70.3 ± 3.7	11.5 ± 3.3	18.2 ± 3.1	$0.96 \pm .01$	$0.91 \pm .01$
Dataset #2	59.9 ± 13.5	31.1 ± 12.8	8.9 ± 3.7	$0.93 \pm .02$	$0.90 \pm .03$
nnU-Net + COp-Net (EDP) (Convergence complète)					
Dataset #1	$\mathbf{72^* \pm 3.6}$	$\mathbf{8.3^* \pm 2.9}$	19.7 ± 3.4	$\mathbf{0.96 \pm .01}$	$\mathbf{0.91 \pm .01}$
Dataset #2	$\mathbf{71.6^* \pm 9.1}$	$\mathbf{17.9^* \pm 7.8}$	10.5 ± 4.5	$\mathbf{0.93^* \pm .02}$	$\mathbf{0.91^* \pm .03}$
nnU-Net + COp-Net (GAN) (Convergence complète)					
Dataset #1	71.4 ± 4	8.5 ± 2.6	20.1 ± 3.6	$0.96 \pm .01$	$0.91 \pm .01$
Dataset #2	70.8 ± 9.4	19.9 ± 7.9	9.3 ± 4.8	$0.93 \pm .02$	$0.91 \pm .03$

images en niveaux de gris et sur le contenu appris, ce qui le rend sensible à de légères variations, même avec des paramètres d'acquisition identiques. Notre proposition du COp-Net (Step #2 dans la Figure 3.3) présente une meilleure généralisation car elle ne dépend pas des images en niveaux de gris obtenues par SBF-SEM. Au lieu de cela, elle utilise des cartes de probabilité continues, ce qui permet d'obtenir des performances plus cohérentes sur les ensembles de données testés. Par ailleurs, il est important de noter que les deux méthodes utilisées pour simuler des dégradations locales des contours cellulaires ont donné des performances comparables, surpassant les méthodes concurrentes de comblement des discontinuités et de segmentation par instance des cellules. Un léger avantage a été obtenu pour l'opérateur de fermeture entrainé à partir des données simulées par l'EDP (équation (3.5)). La suite de cette section se concentre donc sur l'évaluation des performances obtenues par ce dernier.

Les méthodes proposées pour la simulation de dégradations locales des contours cellulaires ont permis d'augmenter les données d'entrainement du COp-Net. De fait, 246 images 2D annotées manuellement ont été utilisées pour générer un total de 20×246 cartes de probabilité. Ainsi, l'augmentation de données du COp-Net est influencée par deux facteurs : d'une part, l'intensité des dégradations locales appliquées aux contours cellulaires corrects, via les équations (3.5) et (3.22) ; d'autre part, les transformations globales issues des stratégies d'augmentation de données

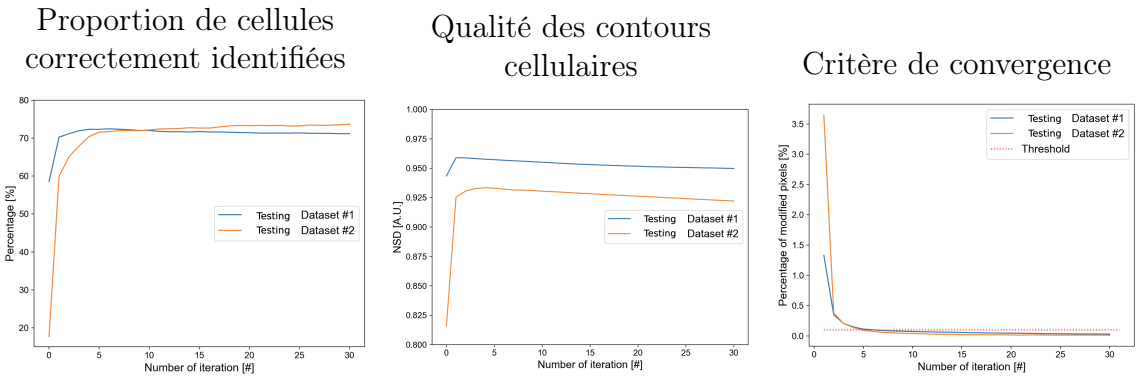


Figure 3.12 – Évolution des résultats en fonction du nombre d'itération d'inférence du COp-Net, entrainé sur les données simulées par l'EDP (3.5). L'approche proposée a été évaluée jusqu'à 30 itérations sur les jeux de données de test Dataset #1 (bleu) et Datset #2 (orange). (a) : Proportion de cellules correctement identifiées en fonction du nombre d'itération d'inférence. (b) : NSD pour évaluer la qualité des contours cellulaires. (c) : Critère de convergence avec le seuil de 0.1% (ligne pointillée rouge) pour les deux jeux de données de test.

intégrées au nnU-Net, telles que les rotations, l'échantillonnage spatial, l'ajout de bruit gaussien, le floutage ou encore les symétries. Nous avons observé que ces deux types de perturbations ont un effet antagoniste : plus les dégradations locales sont marquées, moins les transformations globales ont d'impact, et inversement. En explorant différentes tailles de jeu de données, nous avons constaté qu'un nombre trop faible ou trop élevé de cartes de probabilité simulées entraîne une diminution des performances du modèle en termes de segmentation et d'identification. Par exemple, les proportions de cellules correctement identifiées atteignent 67.2% et 68.9% avec respectivement 1×246 et 40×246 cartes de probabilités simulées (clDice = 0.90 dans les deux cas), contre 71.6% pour 20×246 cartes de probabilités simulées (clDice = 0.91) (Table 3.1).

La Figure 3.12 illustre l'évolution des métriques d'évaluation au cours des inférences itératives de l'opérateur de fermeture sur les deux jeux de données de test (Dataset #1 et #2). La proportion de cellules identifiées correctement s'améliore principalement lors des premières itérations (Figure 3.12a) et n'augmente que faiblement par la suite. Avec l'inférence itérative du COp-Net, elle passe de $61.6 \pm 4.1\%$ (sans itération) à $72 \pm 3.6\%$ (à convergence, $9^{\text{ème}}$ itération) sur le Dataset #1. Pour le Dataset #2, elle progresse de $24 \pm 9.1\%$ sans itération à $71.6 \pm 9.1\%$ après cinq itérations. Cette amélioration s'accompagne toutefois d'une dégradation de la précision des contours, comme l'illustre la baisse du NSD (Figure 3.12b). Il est donc essentiel d'optimiser le nombre d'itérations afin de trouver un compromis entre détection des cellules et précision des contours cellulaires. Dans nos expérimentations, l'adoption d'un seuil de convergence de 0.1% permet d'atteindre 71.6% de cellules correctement identifiées pour le Dataset #2, et 74.7% pour les données publiques (voir Annexe A.1), avec des valeurs de NSD respectives de 0.93 et 0.63. Ces résultats s'approchent des performances maximales observées, qui s'élèvent à 73.9% (Dataset #2) et 76.6% (données publiques, Annexe A.1), avec des valeurs de NSD de 0.93

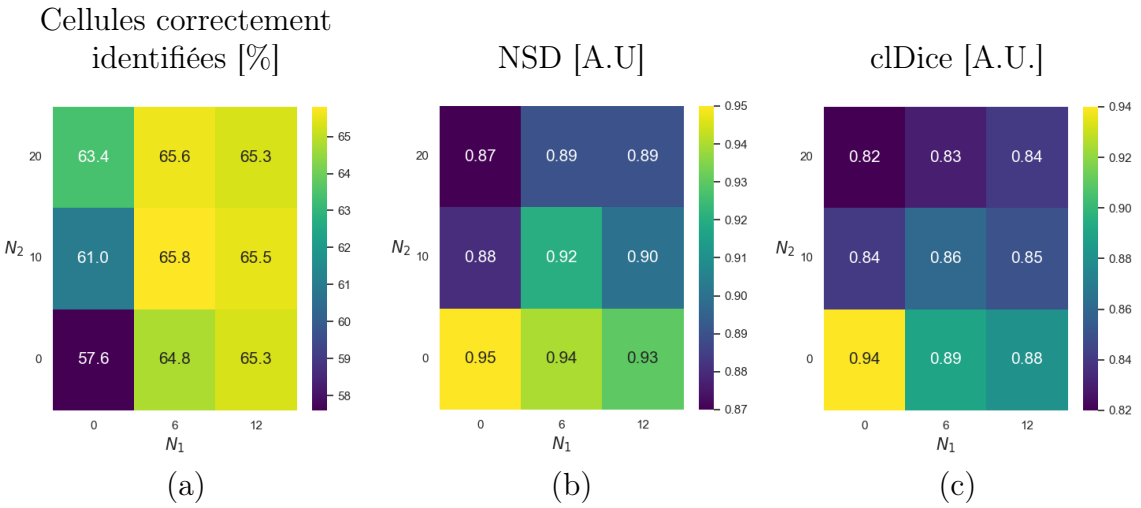


Figure 3.13 – Évaluation des performances selon différentes valeurs des hyperparamètres N_1 (nombre de régions de diffusion locale) et N_2 (nombre de régions de suppression locale) dans les cartes de probabilité des contours cellulaires simulées. (a) : Pourcentage de cellules correctement identifiées, (b) : NSD (unité arbitraire), (c) : clDice (unité arbitraire).

et 0.64, respectivement. Ces observations soutiennent donc l'utilisation du seuil de 0.1%, recommandé et adopté dans ce travail (Figure 3.12c).

La Figure 3.13 illustre les résultats obtenus lors de la recherche par grille des hyperparamètres N_1 et N_2 de l'équation (3.5), qui contrôlent respectivement le nombre de régions de diffusion locale et de suppression locale dans les cartes de probabilité des contours cellulaires. Lorsque les données d'entraînement contiennent trop peu de perturbations (valeurs faibles de N_1 ou N_2), les données simulées contiennent un nombre insuffisant de perturbations, ce qui limite l'exposition du réseau aux cas d'intérêt et l'empêche d'apprendre efficacement à corriger les discontinuités (Figure 3.13a). À l'inverse, un excès de perturbations (valeurs élevées de N_1 ou N_2) rend la tâche d'apprentissage trop complexe, en introduisant des cas extrêmes peu représentatifs des erreurs réelles observées en pratique, ce qui nuit également à la performance du modèle (Figure 3.13b). Un équilibre satisfaisant a été obtenu pour les valeurs $(N_1, N_2) = (6, 10)$, qui offrent un bon compromis entre diversité des perturbations et réalisme des données simulées. Ce couple de paramètres a donc été retenu par défaut pour l'ensemble des expériences présentées dans ce chapitre, justifiant également la valeur de N fixée à 15 dans l'équation (3.22).

Par ailleurs, nous avons estimé que le temps moyen pour un expert biologiste pour segmenter manuellement les cellules est de 34 minutes par coupe (avec une plage de 28 à 38 minutes), de 20 minutes par coupe (17 à 24 minutes) lorsque les contours cellulaires sont générés par le nnU-Net et de seulement 10 minutes par coupe (8 à 15 minutes) lorsque nous ajoutons l'opérateur de fermeture proposé (nnU-Net + COp-Net). Le temps d'inférence du COp-Net sur notre serveur est d'environ une minute par coupe, ce qui représente un coût de calcul négligeable au regard de la réduction substantielle du temps de correction manuelle.

Ces résultats démontrent l'efficacité de notre méthode dans le cas d'image 2D, tant pour la segmentation par instance des cellules que pour la réduction de l'effort

de correction manuelle. Nous avons effectivement montré que notre approche surpasse les méthodes concurrentes de l'état de l'art, tant sur des volumes 3D acquis par SBF-SEM que sur deux cas d'études supplémentaires (Annexe A). D'une part, une approche récente pour le comblement de discontinuités a été utilisée pour référence dont nous nous distinguons par : (i) l'utilisation de cartes de probabilité en entrée au lieu de cartes binaires ; (ii) l'intégration de dégradations locales aléatoires des contours cellulaires corrects avec une EDP ou un GAN ; et (iii) une stratégie d'inférence itérative facile à implémenter et ne nécessitant aucune modification du code du nnU-Net. D'autre part, deux algorithmes de segmentation de l'état de l'art ont servi de référence pour évaluer notre approche. Le premier est le nnU-Net, l'actuel standard pour les tâches de segmentation en biologie ou en médecine [75, 76]. Le second est le Cellpose, la référence lorsque l'on s'intéresse à la segmentation des cellules par instance. Toutefois, une des principales limitations du Cellpose est son manque de robustesse face à la grande variabilité de la taille des cellules, ce qui a conduit à des performances étonnamment faibles lorsque l'on applique cette méthode sur des images 2D extraites de volumes 3D, chaque coupe pouvant contenir des cellules de taille hétérogène.

L'extension de ces résultats à la segmentation par instance des cellules en 3D pose cependant des défis non triviaux. Une première voie naturelle consisterait à adapter l'opérateur de fermeture développé à un traitement 3D. Cela impliquerait la définition d'un schéma de simulation de discontinuités en 3D ainsi que la résolution d'une EDP dans l'espace volumique. Si cette approche est théoriquement envisageable, elle se heurte à plusieurs obstacles pratiques, notamment une augmentation significative des besoins en mémoire et en temps de calcul, ainsi que la nécessité de disposer de vérités terrains 3D pour *finetuner* le modèle, limitant ainsi la réutilisation directe des résultats obtenus en 2D. Une autre piste intuitive consisterait à exploiter des cartes de probabilités 2.5D en appliquant l'approche proposée sur les plans orthogonaux supplémentaires x-z et y-z. Cependant, nos tentatives dans cette direction se sont révélées peu concluantes, principalement en raison des interpolations requises pour compenser l'anisotropie marquée des voxels dans la direction hors plan (résolution latérale x-y de 176 nm contre une épaisseur de coupe de 50 nm). Le chapitre suivant présentera les approches que nous avons développées pour la segmentation par instance 3D des cellules à partir des résultats de la segmentation 2D, sans nécessiter le réapprentissage des modèles.

Conclusion du chapitre

Dans ce chapitre nous avons abordé une problématique essentielle pour la construction de notre jumeau numérique pour l'analyse bioarchitecturale des tissus à partir d'images acquises par SBF-SEM : la segmentation par instance fiable et automatique des cellules. Comme démontré dans le chapitre précédent, les résultats bruts issus de l'étape initiale de segmentation souffrent fréquemment de discontinuités dans les membranes, rendant les contours incomplets et compromettant la qualité de la délimitation cellulaire. Afin de remédier à ces limitations, nous avons proposé un ensemble d'approches méthodologiques innovantes, articulées autour de deux

contributions principales.

La première repose sur la conception d'un opérateur de fermeture des contours cellulaires, le COp-Net, entraîné à détecter et combler automatiquement les discontinuités dans les contours segmentés. Ce module de post-traitement repose sur un réseau de neurones entraîné de manière supervisée, et intègre un schéma itératif permettant une correction progressive des contours. La seconde contribution réside dans la conception de deux stratégies originales de simulation de perturbations réalistes à partir de contours corrects. La première méthode repose sur une modélisation variationnelle des discontinuités par la résolution d'une EDP, simulant la diffusion et la perte locale d'information. La seconde méthode exploite un réseau de génération d'image conditionnel de type SPADE-GAN pour produire automatiquement des cartes de probabilité réalistes à partir de cartes sémantiques grossières (*Cell Contour Semantic Maps*, CCSM). Ces jeux de données simulés, variés et contrôlés, permettent d'exposer le COp-Net à un large éventail de perturbations représentatives des erreurs rencontrées dans les segmentations réelles.

Nous avons ensuite démontré, à travers une évaluation rigoureuse sur des jeux de données indépendants, que le COp-Net améliore significativement la qualité des segmentations par instance des cellules. L'opérateur renforce la continuité des contours, améliore la précision de l'individualisation des cellules en 2D, et surtout réduit considérablement le temps de correction manuelle nécessaire, tel que mesuré par des experts biologistes. Comparé à des méthodes de l'état de l'art, notre approche s'est montrée plus performante pour corriger les erreurs structurelles liées à la discontinuité des contours cellulaires, tout en offrant un cadre reproductible et généralisable à divers contextes.

Une manière naturelle de généraliser ces résultats pour obtenir des masques 3D individualisés pour chaque cellule consisterait à adapter l'opérateur de fermeture développé à un traitement tridimensionnel. Toutefois, cette approche nécessiterait la disponibilité de données annotées en 3D, dont l'acquisition est particulièrement coûteuse et chronophage. Dans le chapitre suivant, nous présenterons les méthodes que nous avons conçues pour contourner cette difficulté, en permettant la segmentation par instance 3D des cellules sans nécessiter le réapprentissage des modèles et en s'appuyant exclusivement sur les segmentations 2D déjà obtenues.

Chapitre 4

Segmentation par instance 3D des cellules à partir de résultats 2D

Au fil des chapitres précédents, nous avons montré que l'un des principaux défis dans la construction de notre jumeau numérique tissulaire pour l'analyse bioarchitecturale réside dans la segmentation par instance des cellules, c'est-à-dire une identification des régions occupées par les cellules, mais aussi leur individualisation avec un masque unique pour chacune d'entre elles. Jusqu'à présent, nos efforts méthodologiques se sont concentrés sur l'amélioration de la segmentation par instance des cellules en 2D, en particulier grâce au développement de l'opérateur de fermeture COp-Net. Ce dernier a permis d'améliorer significativement la précision et la continuité des contours cellulaires sur chaque coupe, facilitant ainsi une individualisation fiable des cellules en 2D. Cependant, la généralisation de ces méthodes pour obtenir des masques 3D individualisés pour chaque cellule n'est pas immédiate. Cela nécessiterait d'avoir des annotations volumétriques précises, laborieuses à obtenir, pour réentraîner les modèles proposés. Cette dépendance aux vérités terrains 3D limite fortement la réutilisation des résultats 2D, pourtant déjà fiables et riches en information. Ce chapitre marque ainsi une nouvelle étape dans notre pipeline de segmentation par instance des cellules, en s'attaquant à leur individualisation 3D à partir des résultats 2D précédemment obtenus, sans nécessiter le réapprentissage des modèles.

Nous débutons ce chapitre par une exploration non-exhaustive des approches susceptibles de produire une segmentation par instance 3D à partir des segmentations 2D complètes obtenues coupe par coupe. Nous montrons que ces méthodes ne permettent pas, en l'état, une individualisation suffisamment fiable des cellules en 3D, principalement en raison des discontinuités résiduelles dans les contours cellulaires de certaines coupes. Pour améliorer les résultats de cette individualisation 3D initiale et grossière des cellules, nous proposons d'enrichir notre approche par deux étapes supplémentaires.

Dans un premier temps, pour chacune des cellules grossièrement individualisée en 3D, nous identifions un sous-ensemble de segmentations sémantiques 2D de confiance. Pour ce faire, nous proposons un module de contrôle qualité automatisé qui évalue, de manière objective et reproductible, la fiabilité de chaque segmentation 2D, cellule par cellule. Ce contrôle qualité constitue une étape clé de notre approche,

garantissant que seules les coupes les plus fiables sont retenues pour l'étape suivante.

Dans un second temps, ces segmentations 2D de confiance servent de points d'ancrage pour propager la segmentation de chacune des cellules le long de l'axe z, afin d'aboutir à une segmentation par instance 3D des cellules. Pour cela, nous commençons par une revue critique des approches de la littérature permettant une telle propagation 3D des segmentations. Nous distinguons les approches classiques fondées sur des méthodes variationnelles, telles que l'utilisation d'algorithme de recalage d'images pour propager des régions d'intérêts entre des images, et les approches plus récentes issues de l'apprentissage profond. L'étude de ces approches nous permettra de mettre en lumière leurs avantages et limites respectifs, et de motiver le choix méthodologique retenu pour cette étape.

Nous montrons que les deux étapes supplémentaires que nous proposons permettent une augmentation notable du nombre de cellules correctement segmentées par rapport aux approches existantes, réduisant la nécessité de corrections manuelles. Par ailleurs, l'intégration d'*a priori* intercellulaires au sein des images acquises par SBF-SEM améliore la qualité et la robustesse de la segmentation par instance 3D des cellules.

Ce chapitre constitue ainsi une avancée majeure vers la construction de notre représentation digitale des cellules, en fournissant une représentation 3D cohérente et exploitable des cellules à partir de segmentations 2D. À court terme, cette approche ouvre la voie à une analyse bioarchitecturale fine des tissus tumoraux que nous aborderons dans le chapitre suivant. À plus long terme, l'objectif est de constituer une base d'apprentissage 3D suffisamment dense pour permettre le développement de méthodes pleinement tridimensionnelles, s'affranchissant des contraintes liées à la segmentation 2D.

Sommaire

4.1 Segmentation par instance 3D à partir de résultats 2D coupe par coupe 100
4.1.1 Cohérence inter-coupes des labels : une méthode d'instanciation peu généralisable 100
4.1.2 Composantes connexes : instanciation basée sur la connexité topologique 101
4.1.3 Algorithme de partage des eaux : instanciation limitée par des erreurs résiduelles locales 102
4.2 Approche proposée : segmentation par instance 3D à partir de sous-ensembles de résultats 2D fiables 103
4.2.1 Contrôle qualité pour une sélection automatisée d'un sous-ensemble de segmentations 2D 104
4.2.2 Revue des méthodes de propagation 3D des segmentations à partir d'un sous-ensemble d'annotations 2D 105
4.2.3 Approche proposée pour la propagation 3D d'un sous-ensemble d'annotations 2D 109
4.3 Validation expérimentale de la méthode proposée pour la segmentation par instance 3D des cellules 109
4.3.1 Métriques d'évaluation 110
4.3.2 Évaluation et comparaison de la méthode proposée 111
Conclusion du chapitre 114

4.1 Segmentation par instance 3D à partir de résultats 2D coupe par coupe

Au fil des chapitres précédents, nous avons mis en évidence que l'un des principaux défis dans la digitalisation 3D des tissus biologiques réside dans la segmentation par instance des cellules, c'est-à-dire une identification des régions occupées par les cellules, mais aussi leur individualisation avec un masque unique pour chacune d'entre elles. À ce stade, les méthodes que nous avons présentées dans le chapitre précédent permettent désormais d'obtenir une segmentation par instance 2D précise des cellules, en particulier grâce au développement de l'opérateur de fermeture COp-Net. Cependant, l'objectif final de cette thèse étant la construction d'un jumeau numérique fidèle du tissu tumoral pour l'analyse bioarchitecturale, il est indispensable d'obtenir une segmentation par instance 3D des cellules.

Une première approche naturelle consisterait à étendre l'opérateur de fermeture COp-Net à un traitement en 3D. Toutefois, une telle généralisation soulèverait plusieurs défis techniques. D'une part, elle impliquerait une augmentation significative des besoins en mémoire et en temps de calcul, rendant son application difficile sur des volumes de grande taille. D'autre part, elle nécessiterait la disponibilité d'annotations 3D précises pour réentraîner les modèles, ce qui représenterait un investissement considérable en temps et en ressources humaines. Enfin, cette approche limiterait fortement la réutilisation directe des segmentations 2D déjà obtenues de manière fiable, ce qui va à l'encontre de notre objectif de tirer pleinement parti des résultats existants.

Dans cette section, nous examinons plusieurs approches visant à obtenir une segmentation par instance 3D des cellules à partir des segmentations 2D obtenues coupe par coupe dans le chapitre précédent. L'objectif est d'analyser les forces et les limites de chaque méthode afin de mettre en évidence les principaux enjeux associés à cette transition dimensionnelle, et de motiver les choix méthodologiques retenus dans la suite du chapitre.

4.1.1 Cohérence inter-coupes des labels : une méthode d'instanciation peu généralisable

Une stratégie intuitive consiste à exploiter les segmentations par instance 2D des cellules obtenues pour chaque coupe dans le chapitre précédent, en s'appuyant sur la cohérence spatiale des labels d'une coupe à l'autre pour individualiser les cellules en 3D. Cette méthode repose sur l'hypothèse suivante : si deux labels issus de segmentations par instance 2D se recouvrent sur des coupes consécutives le long de l'axe z, alors ils représentent la même cellule. Concrètement, cela revient à calculer, pour chaque label identifié dans une coupe donnée, le degré de recouvrement avec les labels présents dans la coupe précédente ou suivante. Si le recouvrement dépasse un certain seuil, les deux régions sont associées au même objet 3D, et donc à une même cellule.

Bien que séduisante dans son principe, cette méthode s'est révélée limitée dans nos expériences. Elle ne parvient pas à gérer de manière satisfaisante plusieurs situations biologiques ou techniques courantes. Par exemple, une cellule peut se ra-

mifier ou se diviser le long de l'axe z, rendant son individualisation ambigüe. Dans d'autres cas, une cellule peut disparaître progressivement tandis qu'une autre apparaît presque au même endroit dans la coupe suivante, ce qui complique l'individualisation des deux cellules. Enfin, certaines cellules présentent des variations morphologiques importantes d'une coupe à l'autre – en taille, forme ou position – réduisant fortement l'aire de recouvrement, même si elles correspondent à la même entité biologique. Ces situations nécessitent l'introduction de règles spécifiques (gestion de seuils, heuristiques de suivi, traitement des conflits), qui rendent la méthode rapidement complexe, difficile à calibrer, et surtout fortement dépendante du jeu de données considéré.

En résumé, bien que cette approche par recouvrement puisse fonctionner dans des cas simples, elle reste fragile dès que l'on sort d'un scénario idéal. Elle ne constitue donc pas une solution robuste et généralisable pour une individualisation automatique des cellules en 3D à partir de résultats 2D complets. Dans la suite de cette section, nous nous tournons vers une autre classe de méthodes, fondée sur l'exploitation des segmentations sémantiques 2D complètes également obtenues pour chaque coupe dans le chapitre précédent, afin de proposer une stratégie plus fiable pour l'individualisation des cellules en 3D.

4.1.2 Composantes connexes : instanciation basée sur la connexité topologique

Une première approche, simple et directe, pour obtenir une segmentation par instance 3D à partir de segmentations sémantiques 2D complètes consiste à appliquer un algorithme de composantes connexes sur l'ensemble du volume 3D, plutôt que coupe par coupe. Pour cela, il existe des approches strictes – telles que la fonction `ConnectedComponent` de la librairie SimpleITK [104] – qui se basent sur la définition mathématique de la connexité.

Mathématiquement, un objet est dit connexe s'il est fait d'un seul « morceau ». Lorsqu'un objet n'est pas connexe, il peut être décomposé en plusieurs sous-ensembles disjoints mais chacun connexe, formant ce que l'on appelle des composantes connexes. Dans le contexte de l'analyse d'images, cette opération revient à obtenir une segmentation par instance : chaque composante connexe identifiée correspond à une entité distincte de la segmentation sémantique.

Cette approche s'est révélée pertinente dans certains cas, notamment pour l'individualisation des noyaux ou des nucléoles, qui apparaissent généralement bien séparés dans nos images (voir chapitre 2). Toutefois, appliquée à la segmentation des cellules, elle se heurte à une forte sensibilité aux imperfections des contours cellulaires : une discontinuité même minime – quelques pixels manquants sur une coupe – suffit à rompre la connexité et à regrouper, à tort, plusieurs cellules en une seule entité.

Pour atténuer cette sensibilité excessive, il est possible de recourir à des variantes légèrement plus souples, comme celle utilisée pour l'individualisation des cellules en 2D dans le pipeline présenté à la Figure 3.3 et dont l'implémentation est disponible à l'adresse suivante : `https://github.com/Florian-40/CellSegm` (Annexe B). Cette variante introduit une tolérance aux petites interruptions des contours. Toutefois,

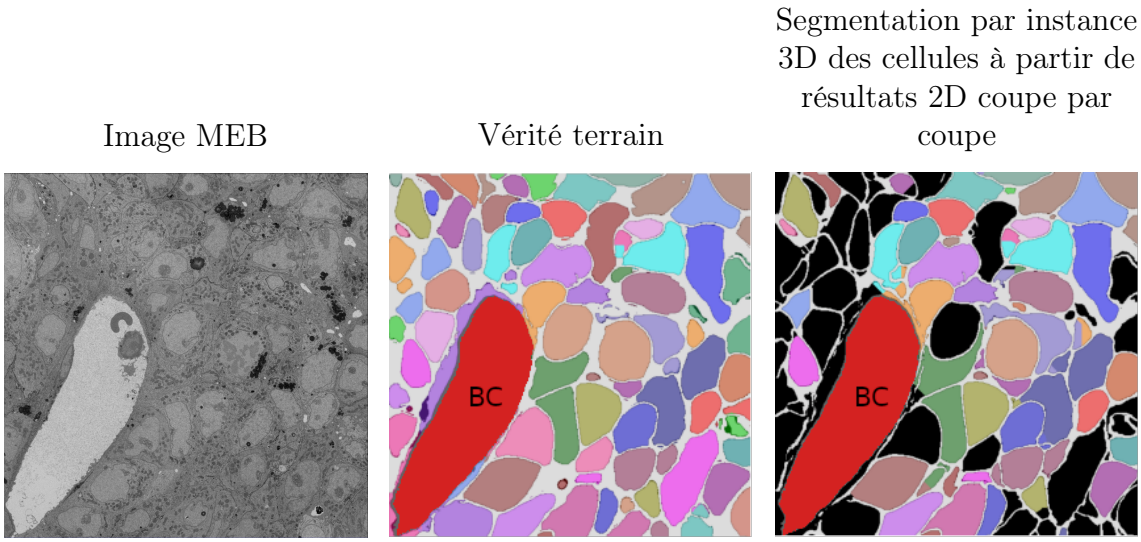


Figure 4.1 – Résultats de la segmentation par instance 3D des cellules par l'algorithme de séparation volumique par ligne de partage des eaux basée sur des graines (*seeded watershed*) et à partir des segmentations 2D complètes obtenues coupe par coupe dans le chapitre précédent. (a) : Coupe acquise par SBF-SEM. (b-c) : la couleur blanche représente les contours cellulaires, la couleur rouge représente le capillaire sanguin (BC) obtenu par segmentation semi-automatique, les cellules colorées représentent les cellules correctement identifiées et individualisées en 3D par rapport à la vérité terrain (b), et la couleur noire indique les erreurs par rapport à la vérité terrain. Environ 65% des cellules sont correctement identifiées et individualisées en 3D, ce qui constitue un résultat prometteur et souligne la nécessité de poursuivre les efforts pour améliorer davantage la précision et la robustesse de l'individualisation 3D.

même avec cet ajustement, l'extension à la 3D montre rapidement ses limites. De fait, la complexité des structures cellulaires, la densité des tissus et la présence d'erreurs résiduelles rendent cette approche peu adaptée à une individualisation fiable et généralisable en 3D.

En somme, la forte sensibilité aux erreurs locales rend les approches d'individualisation basées sur la connexité peu robustes dans un contexte d'imagerie réaliste, où le bruit, les artéfacts d'acquisition et les variations biologiques sont fréquents. Ces limitations appellent au développement de stratégies plus flexibles, capables de tolérer des imperfections ponctuelles tout en assurant une individualisation précise et cohérente des cellules à travers l'ensemble du volume.

4.1.3 Algorithme de partage des eaux : instanciation limitée par des erreurs résiduelles locales

Une approche plus souple pour obtenir une segmentation par instance 3D à partir de résultats sémantiques 2D complets obtenus pour chaque coupe consiste à utiliser l'algorithme de séparation volumique par ligne de partage des eaux (*watershed*). Ce dernier interprète les images comme des surfaces topographiques où les intensités définissent des altitudes [12]. En identifiant les minimums locaux comme sources

d'inondation, l'algorithme permet de séparer les régions de manière cohérente en 3D. Contrairement aux méthodes basées sur les composantes connexes, cette approche ne détecte pas explicitement les composantes connexes : elle les génère implicitement au fil du processus de séparation, en suivant une logique de connectivité locale. Pour mieux contrôler le nombre et la localisation des objets segmentés, nous avons exploré une variante dite *seeded watershed*, dans laquelle des graines explicites sont fournies pour initier l'inondation. Dans notre cas, ces graines sont issues de la segmentation par instance des noyaux obtenue dans le chapitre 2, supposée refléter fidèlement la position des cellules dans le volume.

La Figure 4.1 offre une visualisation des résultats de cette approche sur une coupe extraite d'un volume entièrement corrigé manuellement pour cette expérimentation. Nous pouvons en particulier observer que certaines cellules apparaissent en noir dans la segmentation par instance 3D des cellules (Figure 4.1c), bien qu'aucune erreur ne semble être visible par rapport à la vérité terrain. Cela suggère que des erreurs sont localisées dans le volume, empêchant la segmentation par instance 3D de certaines cellules. De manière quantitative, seules 64.77% des cellules sont correctement identifiées en 3D par rapport à la vérité terrain, ce qui met en évidence la non-trivialité de l'extension d'une approche 2D vers une individualisation robuste en 3D.

Ces résultats soulignent l'impact considérable des discontinuités résiduelles présentes dans les contours cellulaires de certaines coupes, compromettant l'individualisation des cellules en 3D. Afin d'améliorer les résultats de cette individualisation initiale et grossière, nous proposons d'enrichir notre pipeline de segmentation par instance 3D des cellules par deux étapes supplémentaires, visant à renforcer la robustesse et la cohérence de l'individualisation des cellules en 3D. La section suivante détaille ces développements méthodologiques et leur mise en œuvre.

4.2 Approche proposée : segmentation par instance 3D à partir de sous-ensembles de résultats 2D fiables

À ce stade, nous avons vu que la segmentation par instance 3D des cellules, réalisée à partir de résultats 2D obtenus coupe par coupe, demeure limitée par la présence de discontinuités résiduelles dans les contours cellulaires de certaines coupes. Ces irrégularités compromettent la qualité de l'individualisation 3D des cellules et, par conséquent, la fiabilité des analyses bioarchitecturales 3D que nous souhaitons mener. Pour améliorer cette individualisation 3D initiale et grossière (Step #2 dans la Figure 4.2), nous proposons d'enrichir notre pipeline de segmentation par instance 3D des cellules par deux étapes supplémentaires (Step #3 - #4 dans la Figure 4.2), visant à renforcer la robustesse et la cohérence de l'individualisation des cellules en 3D.

La première étape (Step #3 dans la Figure 4.2) consiste à sélectionner automatiquement, pour chaque cellule, un sous-ensemble de segmentations sémantiques 2D fiables, en s'appuyant sur un module de contrôle qualité dédié. Ce module permet d'évaluer, de manière objective et reproductible, la qualité de la segmentation 2D

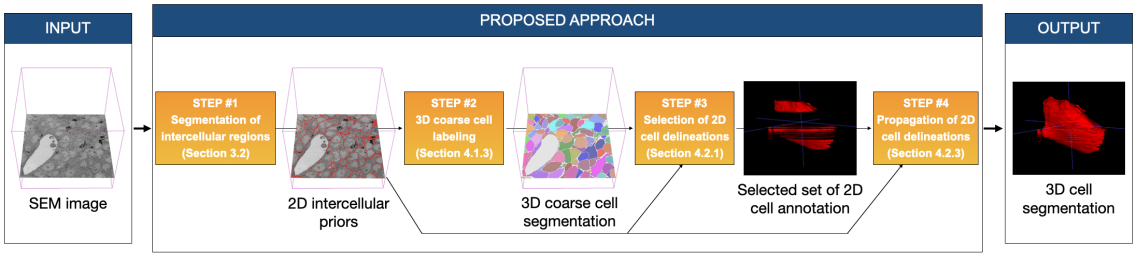


Figure 4.2 – Schéma complet de l'approche proposée pour la segmentation par instance des cellules en 3D. Step #1 : Segmentation des contours cellulaires coupe par coupe à l'aide du nnU-Net suivi de l'opérateur de fermeture COp-Net (voir chapitre précédent). Step #2 : Segmentation par instance 3D des cellules à partir de résultats 2D coupe par coupe par l'algorithme de séparation volumique *seeded watershed* (voir section 4.1.3). Step #3 : Pour chaque cellule, sélection automatique d'un sous-ensemble de segmentations sémantiques 2D fiables grâce à un module de contrôle qualité. Step #4 : Segmentation par instance 3D des cellules à partir des sous-ensembles de segmentations 2D fiables par un algorithme de propagation 3D.

de chaque cellule, coupe par coupe, en comparant les résultats obtenus à ceux d'une méthode de référence. Ce contrôle qualité constitue une étape cruciale du pipeline, en garantissant que seules les coupes les plus fiables alimentent l'étape suivante. La seconde étape (Step #4 dans la Figure 4.2) utilise ce sous-ensemble de segmentations 2D de confiance comme point d'ancrage pour propager, cellule par cellule, la segmentation sémantique le long de l'axe z. En nous appuyant uniquement sur ces résultats 2D de confiance, nous visons à améliorer la cohérence et la précision de la segmentation par instance 3D des cellules.

L'objectif de cette section est de décrire ces deux étapes supplémentaires, qui reposent sur une variante du modèle de fondation *Segment Anything Model* (SAM), appelée micro-SAM, spécifiquement conçue pour les images de microscopie [91, 134, 6]. Dans le cadre de nos travaux, nous utilisons la version la plus performante actuellement disponible de ce modèle, fondée sur l'architecture *Vision Transformer* (ViT)-H.

4.2.1 Contrôle qualité pour une sélection automatisée d'un sous-ensemble de segmentations 2D

Afin de sélectionner automatiquement, pour chaque cellule, un sous-ensemble de segmentations 2D fiables, nous avons développé un module de contrôle qualité, illustré dans la Figure 4.3. Ce module repose sur une analyse individuelle de chaque cellule, coupe par coupe. Pour chaque coupe, la segmentation sémantique 2D d'une cellule est comparée à une version alternative générée par le modèle de fondation micro-SAM, spécifiquement adapté aux images de microscopie [6]. Plus précisément, pour chaque coupe de chaque cellule, deux informations sont utilisées en entrée comme illustré par la Figure 4.3 : l'image acquise par SBF-SEM et la segmentation sémantique 2D initiale de la cellule en question. Afin de contraindre le micro-SAM à l'intérieur des cellules, l'intensité de tous les voxels appartenant à un contour cellulaire a été fixée à zéro au préalable dans les images acquises par SBF-SEM (*2D intercellular priors* dans la Figure 4.3).

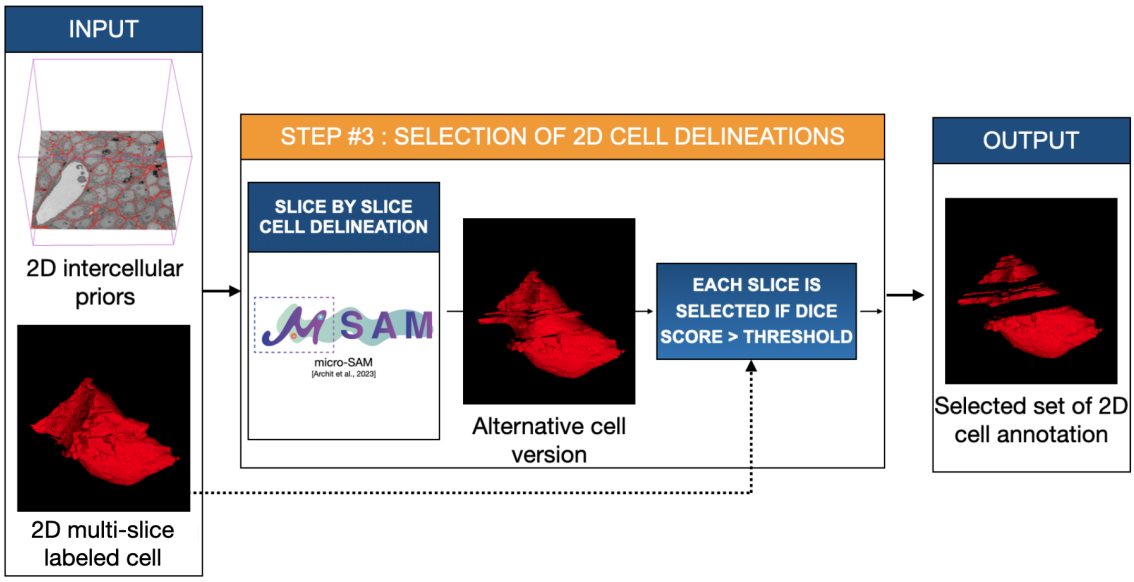


Figure 4.3 – Schéma du module de contrôle qualité permettant de sélectionner automatiquement un sous-ensemble de segmentations sémantiques 2D fiables pour chaque cellule. Pour chaque coupe de chaque cellule, la segmentation sémantique 2D initiale est comparée à une version alternative générée par le micro-SAM, contraint à rester à l'intérieur du contour initial (pixels rouges dans *2D intercelular priors*). La coupe est conservée si la similarité entre les deux masques dépasse un seuil donné (mesurée par le score de Dice [42, 155]).

Une fois la segmentation alternative générée par le micro-SAM, nous comparons les deux résultats à l'aide du coefficient de Dice [42, 155]. Si la similarité dépasse un seuil prédéfini (typiquement fixé à 0.9 dans nos travaux), la segmentation 2D est jugée fiable et est conservée comme point de référence pour la propagation le long de l'axe z.

Cette stratégie permet d'extraire, de manière robuste, reproductible et automatique, un sous-ensemble de segmentations sémantiques 2D de haute confiance pour chaque cellule. Un nouveau défi se pose alors : propager ces résultats fiables le long de l'axe z, afin de reconstruire chaque cellule de façon cohérente dans le volume et ainsi obtenir une segmentation par instance 3D de l'ensemble des cellules. Dans la suite, nous passons en revue les principales approches de la littérature permettant une telle propagation 3D à partir d'un sous-ensemble d'annotations 2D. Nous présentons ensuite en détail la méthode que nous avons développée, visant à produire une segmentation par instance 3D des cellules à la fois précise et cohérente, à partir des résultats 2D fiables identifiés par notre module de contrôle qualité.

4.2.2 Revue des méthodes de propagation 3D des segmentations à partir d'un sous-ensemble d'annotations 2D

Cette problématique de propagation s'inscrit plus largement dans un cadre fréquent en imagerie biomédicale, où les annotations disponibles sont souvent restreintes à un sous-ensemble de coupes 2D, en raison du coût élevé et du temps requis pour obtenir des annotations manuelles exhaustives. Un enjeu central réside

alors dans la conception de méthodes capables d'exploiter ces annotations partielles pour étendre la segmentation à l'ensemble du volume tout en respectant la cohérence spatiale et morphologique des structures biologiques.

Les principales stratégies de la littérature permettant la propagation d'un sous-ensemble de segmentations sémantiques 2D fiables aux coupes voisines peuvent être regroupées en deux grandes catégories. Les approches variationnelles reposent sur des principes physiques ou géométriques assurant une continuité spatiale entre les coupes, tandis que les approches fondées sur l'apprentissage profond exploitent la capacité des réseaux de neurones à apprendre des représentations complexes et à prédire des reconstructions réalistes à partir de données partielles.

L'objectif de la revue menée dans cette section est double : d'une part, identifier les forces et les limites propres à chaque type d'approche dans le contexte spécifique des données acquises par SBF-SEM, et d'autre part, motiver les choix méthodologiques retenus dans la suite de cette section pour la reconstruction 3D de chacune des cellules à partir d'un sous-ensemble d'annotations 2D fiables, extraites par le module de contrôle qualité proposé.

Approches variationnelles

Les approches variationnelles constituent une classe méthodologique classique pour modéliser des transformations continues entre images voisines, en particulier lorsqu'il s'agit de garantir la cohérence spatiale à travers des données bruitées, incomplètes ou partiellement annotées. Dans le contexte de la segmentation 3D à partir d'un sous-ensemble d'annotations 2D, elles offrent des cadres formels pour propager des informations d'une coupe à l'autre, tout en assurant une régularité du résultat dans le volume.

Parmi ces approches, les méthodes fondées sur des modèles de déformation – qu'ils soient élastiques ou fluides – occupent une place centrale. Elles considèrent la transformation entre deux images comme un champ de déformation continu, régularisé par des contraintes physiques inspirées de la mécanique. Par exemple, l'algorithme *Demons* [169], fréquemment utilisé en imagerie médicale, simule un fluide visqueux pour effectuer un recalage non rigide entre volumes. Ce type de méthode permet de transférer une annotation ou une segmentation connue d'un volume source vers un volume cible, et peut donc être adapté à la propagation de segmentations 2D dans un volume 3D, à condition que les transformations soient suffisamment douces.

Une autre classe d'approches repose sur la résolution d'EDP souvent en lien avec les méthodes de flux de niveau (*level set*). Celles-ci modélisent l'évolution d'une frontière dans l'espace comme le résultat de la minimisation d'une énergie, prenant en compte à la fois la géométrie locale (comme la courbure moyenne) et des contraintes d'attache aux données [124]. Ces techniques permettent de faire évoluer une surface initiale à travers les coupes, tout en assurant une régularité spatiale, et sont naturellement capables de gérer des événements topologiques complexes comme la fusion ou la séparation de structures.

Enfin, une troisième famille d'approches, initialement développée pour le traitement de séquences vidéo, repose sur l'estimation locale du déplacement apparent entre les images successives. Ces approches, connues sous le nom de flot optique

(*optical flow*) [71, 53], visent à modéliser un champ de mouvement pixel par pixel entre deux images. Le principe consiste à estimer, pour chaque pixel, un vecteur de déplacement en minimisant une fonctionnelle d'énergie qui concilie deux objectifs : l'adéquation aux données et la régularité du champ estimé. En supposant que les structures évoluent de manière continue le long de l'axe z et que l'intensité des pixels est conservée entre les coupes, le champ de mouvement $\mathbf{v} = (v_x, v_y)$ entre deux coupes adjacentes peut être estimé en minimisant une énergie de la forme [194] :

$$E(\mathbf{v}) = \iint_{\Omega} \left[\left(\frac{\partial I}{\partial x} v_x + \frac{\partial I}{\partial y} v_y + \frac{\partial I}{\partial z} \right)^2 + \lambda \left(\|\nabla v_x\|_2^2 + \|\nabla v_y\|_2^2 \right) \right] dxdy \tag{4.1}$$

où $I(x, y, z)$ représente l'intensité du voxel de coordonnées $(x, y, z) \in \Omega \subset \mathbb{R}^3$ et $\lambda > 0$ un paramètre de régularisation défini par l'utilisateur qui pondère le terme d'attache aux données (premier terme dans l'intégrale de l'équation (4.1)) et la régularité du champ de mouvement estimé (deuxième terme dans l'intégrale de l'équation (4.1)).

Dans notre contexte, cette approche permet d'estimer le déplacement entre deux coupes successives le long de l'axe z, afin de projeter les segmentations disponibles sur les coupes voisines et ainsi reconstituer une segmentation cohérente en 3D. Cette méthode a été appliquée dans une étude préliminaire [40], en exploitant les annotations d'un sous-ensemble de coupes pour étendre automatiquement la segmentation à l'ensemble du volume acquis par SBF-SEM.

Si cette méthode permet, dans certains cas, de maintenir la cohérence entre les coupes, elle présente plusieurs limitations majeures. Premièrement, elle repose sur l'hypothèse de conservation de l'intensité des pixels entre les coupes [39], ce qui est fréquemment mis en défaut dans les images acquises par SBF-SEM en raison de variations de contraste ou d'artéfacts propres à cette technique de microscopie électronique. Deuxièmement, elle suppose généralement que les structures se déforment de manière douce et continue d'une coupe à l'autre, ce qui n'est pas toujours réaliste dans les tissus biologiques complexes, notamment en présence de fortes variations morphologiques ou d'un espacement inter-coupes important [103].

Ces limitations réduisent considérablement la robustesse et la généralisation de ces approches dans des volumes hétérogènes de grande taille. Pour dépasser ces contraintes, nous explorons dans la suite de cette section des méthodes fondées sur l'apprentissage profond, capables de s'affranchir de certaines hypothèses trop strictes en apprenant directement, à partir des données, des représentations complexes et abstraites plus adaptées à la nature des images et à la variabilité biologique observée.

Approches par apprentissage profond

Les approches basées sur l'apprentissage profond jouent aujourd'hui un rôle central dans les stratégies de segmentation en raison de leur capacité à apprendre des représentations abstraites et à généraliser efficacement à partir de données complexes et hétérogènes. Contrairement aux méthodes variationnelles, ces approches n'imposent pas de contraintes explicites sur la régularité inter-coupes, mais s'appuient sur l'apprentissage automatique des structures visuelles et des patterns morphologiques observés dans les données.

Une première stratégie consiste à entrainer un CNN de manière supervisée à partir d'un sous-ensemble d'annotations 2D. Une fois entraîné, le réseau peut être utilisé pour propager ces résultats fiables le long de l'axe z afin de reconstituer la segmentation sémantique dans le volume. Cette approche est conceptuellement proche de la segmentation semi-automatique des capillaires sanguins et zones hémorragiques décrite au chapitre 2. Toutefois, elle présente une difficulté supplémentaire liée à notre contexte d'application : le nombre de coupes séparant deux segmentations 2D fiables peut varier au sein d'une même cellule, ou entre les différentes cellules. Cela limite la possibilité d'un entraînement générique et pourrait nécessiter de concevoir un réseau dédié pour chaque cellule, ce qui s'avère irréaliste dans des volumes contenant plusieurs centaines de cellules.

Une alternative plus souple et prometteuse repose sur l'utilisation de modèles de fondation conçus pour la segmentation semi-automatique générique, comme le *Segment Anything Model* (SAM) développé par Meta AI [91, 134]. Ce type de modèle s'appuie sur des architectures de type ViT et est capable de générer des masques de segmentation à partir d'instructions visuelles simples : point d'intérêt, boîte englobante, ou contour grossier. Une déclinaison légère nommée micro-SAM adapte cette approche aux images de microscopie biomédicale, permettant des segmentations précises sans étape d'entraînement spécifique sur le jeu de données cible [6].

Dans notre contexte, micro-SAM présente un avantage décisif : il permet une propagation guidée d'une segmentation 2D à travers le volume. Ainsi, à partir d'une annotation 2D fiable sur une coupe donnée, le modèle peut générer automatiquement une segmentation sur une coupe adjacente. En itérant ce processus coupe par coupe, on peut progressivement reconstruire la segmentation sémantique en 3D. Cette approche ne nécessite aucun apprentissage supervisé supplémentaire, se montre robuste aux variations d'apparence entre les coupes et s'adapte à des structures biologiques diverses. Néanmoins, sa fiabilité dépend fortement de la régularité visuelle des cellules dans le volume, et elle peut échouer en présence de ruptures morphologiques marquées ou de contours peu contrastés.

En conclusion, les approches par apprentissage profond, et notamment les modèles de fondation comme micro-SAM, offrent un cadre flexible et puissant pour la propagation des segmentations issues d'un sous-ensemble de coupes 2D. Dans la suite, nous proposons une stratégie de propagation guidée par micro-SAM, conçue pour reconstruire efficacement une segmentation sémantique 3D complète et cohérente de chaque cellule à partir du sous-ensemble de segmentations 2D fiables identifié par notre module de contrôle qualité. Cette approche ne nécessite ni annotations volumétriques supplémentaires, ni phase de réentraînement, ce qui en fait une solution particulièrement adaptée aux contextes où les annotations 3D sont rares ou coûteuses. Elle permet ainsi de produire, à partir de sous-ensembles de segmentations 2D fiables, une segmentation par instance 3D des cellules à la fois robuste et biologiquement interprétable.

4.2.3 Approche proposée pour la propagation 3D d'un sous-ensemble d'annotations 2D

Maintenant qu'un sous-ensemble de segmentations sémantiques 2D fiables a été identifié pour chaque cellule par notre module de contrôle qualité, l'objectif est de propager ces segmentations de confiance le long de l'axe z afin de reconstruire, de manière continue et cohérente, une segmentation sémantique 3D complète. Cette étape appliquée à chacune des cellules permet d'aboutir à la segmentation par instance 3D des cellules, en assurant leur individualisation volumique.

À la lumière de l'aperçu méthodologique présenté précédemment, nous avons retenu le modèle de fondation micro-SAM pour réaliser cette tâche de propagation. Ce modèle permet une segmentation guidée en exploitant l'information d'une coupe adjacente déjà segmentée pour générer la segmentation de la coupe suivante. La propagation est ainsi effectuée de manière itérative entre deux coupes de référence : les segmentations sont transmises progressivement d'une coupe à l'autre jusqu'à couvrir l'ensemble des coupes intermédiaires, assurant ainsi une continuité spatiale. Afin de contraindre la prédiction à rester localisée à l'intérieur des contours cellulaires déjà identifiés (*2D intercellular priors* dans la Figure 4.2), tous les voxels situés à l'intérieur de ces contours ont été artificiellement mis à zéro dans les images acquises par SBF-SEM, comme lors de l'étape du contrôle qualité (Step #3 dans la Figure 4.2).

Cette stratégie de propagation guidée permet de tirer parti à la fois de la précision des segmentations 2D du sous-ensemble sélectionné par notre module de contrôle qualité et de la capacité du modèle micro-SAM à capturer des représentations complexes et abstraites des images. En ne nécessitant aucun apprentissage supplémentaire, cette méthode s'adapte aux variations inter-coupes et se généralise aux différentes structures biologiques complexes, tout en garantissant une reconstruction cohérente à l'échelle volumique. Dans la suite de ce chapitre nous décrivons la démarche de validation et les résultats obtenus par l'approche proposée pour la segmentation par instance 3D des cellules dans les volumes de tissus acquis par SBF-SEM dans le cadre de cette thèse.

4.3 Validation expérimentale de la méthode proposée pour la segmentation par instance 3D des cellules

Après avoir exposé nos contributions méthodologiques pour la segmentation par instance 3D des cellules, nous consacrons cette section à l'évaluation expérimentale des performances de l'approche proposée. Pour cela, nous nous appuyons sur l'un des dix volumes acquis par SBF-SEM dans le cadre de cette thèse. Dans le chapitre précédent, ce volume, composé de 1050 coupes, avait été séparé en deux sous-volumes de 630 et 300 coupes afin de permettre la validation, le *fine-tuning* et l'évaluation de l'opérateur de fermeture COp-Net (Stack #2 et Stack #3 dans la Figure 3.10). Dans le cadre de ce chapitre, le COp-Net, préalablement entrainé sur les données synthétiques générées à l'aide de l'EDP, a été *finetuné* sur 105 coupes uniformément réparties dans le volume et corrigées manuellement. Une fois cet entraînement ef-

fectué, la segmentation des contours cellulaires et la segmentation par instance 3D initiale et grossière des cellules à partir des résultats 2D coupe par coupe (Step #1 – #2 dans la Figure 4.2) ont été appliquées à l'ensemble du volume. Un expert biologiste a ensuite procédé à une correction manuelle exhaustive, fournissant ainsi une vérité terrain fiable pour évaluer la précision et la robustesse de l'approche proposée.

Dans cette section, nous commençons par introduire les métriques retenues pour évaluer la qualité de la segmentation par instance 3D. Celles-ci incluent à la fois des indicateurs spécifiques à l'individualisation correcte des cellules en 3D, ainsi qu'une métrique de segmentation de référence, le score de Dice, permettant de comparer finement les masques 3D de segmentation des cellules reconstruites avec leur version corrigée manuellement. Nous montrons ensuite que l'approche développée dans ce chapitre permet une augmentation notable du nombre de cellules correctement segmentées par rapport aux approches existantes, réduisant la nécessité de corrections manuelles. Par ailleurs, l'intégration d'*a priori* intercellulaires au sein des images acquises par SBF-SEM – en fixant notamment à zéro l'intensité des voxels à l'intérieur des contours cellulaires connus – améliore significativement la qualité et la robustesse de la segmentation par instance 3D.

4.3.1 Métriques d'évaluation

L'évaluation des performances de l'approche proposée repose sur deux axes complémentaires, permettant d'appréhender à la fois la justesse de l'individualisation 3D des cellules et la qualité globale de la segmentation des cellules dans le volume reconstruit.

D'une part, nous analysons la capacité du pipeline à individualiser correctement chaque cellule en 3D, c'est-à-dire à reconstruire des instances cellulaires cohérentes, continues et fidèles aux structures biologiques attendues. D'autre part, nous évaluons la précision géométrique des reconstructions à l'aide d'une métrique de recouvrement classique, le score de Dice, afin de quantifier la concordance entre les volumes segmentés et les annotations de référence.

Calcul des cellules correctement identifiées et individualisées en 3D

Pour évaluer la qualité de la segmentation par instance, nous avons calculé le pourcentage de cellules correctement identifiées individuellement en 3D. De manière similaire au chapitre précédent, une cellule est considérée comme correctement identifiée si le recouvrement entre son masque reconstruit en 3D et le masque de référence (vérité terrain) dépasse 85%. Cette métrique fournit une indication globale sur la capacité du modèle à individualiser de manière précise les cellules.

Afin de mieux caractériser les types d'erreurs, nous distinguons ici deux cas de figures fréquents, en lien avec la nature des déviations observées entre la prédiction et la vérité terrain. D'une part, les cellules sur-segmentées, dont le masque reconstruit présente un volume excessif, sont dues à des faux positifs dans des régions adjacentes à la cellule. D'autre part, les cellules sous-segmentées, dont le masque reconstruit est partiel ou incomplet, sont dues à des faux négatifs.

Le pourcentage de cellules affectées par ces erreurs est également reporté afin

d'estimer quantitativement la performance du modèle, mais aussi d'en interpréter les limites et les axes d'amélioration potentiels.

Qualité du masque de segmentation

En complément, nous évaluons la qualité du masque de segmentation 3D de chaque cellule en utilisant le score de Dice [42, 155], une métrique largement utilisée pour quantifier la similarité entre deux ensembles binaires. Le score de Dice est défini comme suit :

$$\text{Dice}(A, B) = \frac{2|A \cap B|}{|A| + |B|}, \tag{4.2}$$

où A désigne le masque 3D binaire d'une cellule prédit par notre approche, B le masque de la vérité terrain de la cellule correspondante, et $|\cdot|$ le nombre de voxels dans le masque donné.

Un score de Dice élevé (proche de 1) indique un bon recouvrement entre la segmentation prédite et la référence, tandis qu'un score faible révèle des erreurs de sous- ou de sur-segmentation. Cette métrique est particulièrement utile pour évaluer la qualité locale des cellules reconstruites, indépendamment de l'individualisation des instances.

4.3.2 Évaluation et comparaison de la méthode proposée

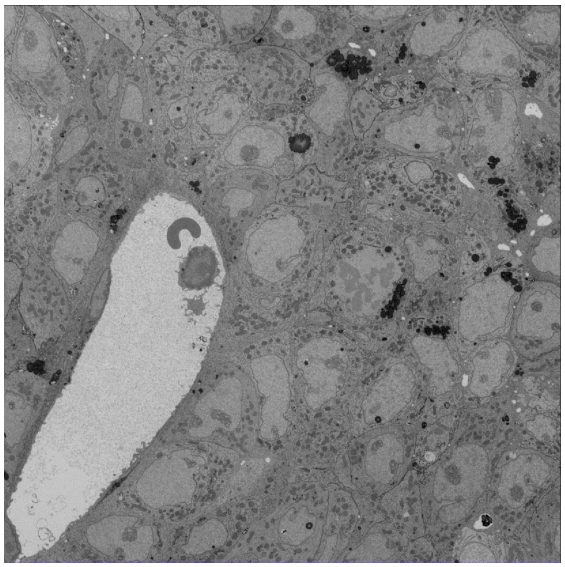
Après avoir détaillé l'ensemble des modules méthodologiques développés dans ce chapitre, cette section propose une évaluation rigoureuse des performances de notre approche de segmentation par instance des cellules en 3D (Step #1 - #4 dans la Figure 4.2), appliqué à un volume acquis par SBF-SEM contenant 1 050 coupes, entièrement corrigées manuellement.

La Figure 4.4 illustre des résultats représentatifs obtenus à deux étapes clés du pipeline : la segmentation par instance 3D des cellules obtenue à partir des résultats 2D coupe par coupe (Figure 4.4c), et la segmentation par instance 3D des cellules obtenue après la sélection automatique d'un sous-ensemble de segmentations 2D fiables et leur propagation guidée le long de l'axe z par le modèle micro-SAM (Figure 4.4d).

La visualisation 3D (Figure 4.5) met en évidence l'impact de la propagation guidée sur la cohérence morphologique et la précision des reconstructions. Nous pouvons observer une nette réduction du nombre de cellules mal identifiées après l'intégration du module de propagation basé sur micro-SAM, appliqué exclusivement aux sous-ensembles de segmentations 2D jugées fiables de chaque cellule.

Ces observations sont confirmées par les résultats quantitatifs reportés dans la Table 4.1. Tout d'abord, le nombre de cellules correctement identifiées reste pratiquement inchangé entre les segmentations 3D obtenues à partir des segmentations 2D coupe par coupe et celles issues de sous-ensembles fiables, en l'absence de contrainte intercellulaire explicite – c'est-à-dire sans forcer à zéro l'intensité des voxels correspondant aux contours cellulaires dans les images SBF-SEM. En revanche, l'introduction de cet *a priori* intercellulaire conduit à une amélioration notable des

Image MEB

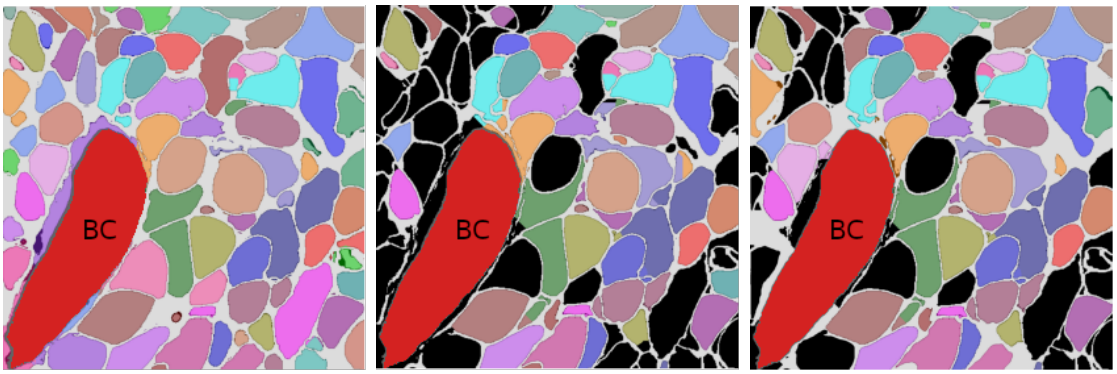


(a)

Vérité terrain

Segmentation par instance 3D des cellules à partir de résultats 2D coupe par coupe

Segmentation par instance 3D des cellules à partir de sous-ensembles de résultats 2D fiables (approche proposée)

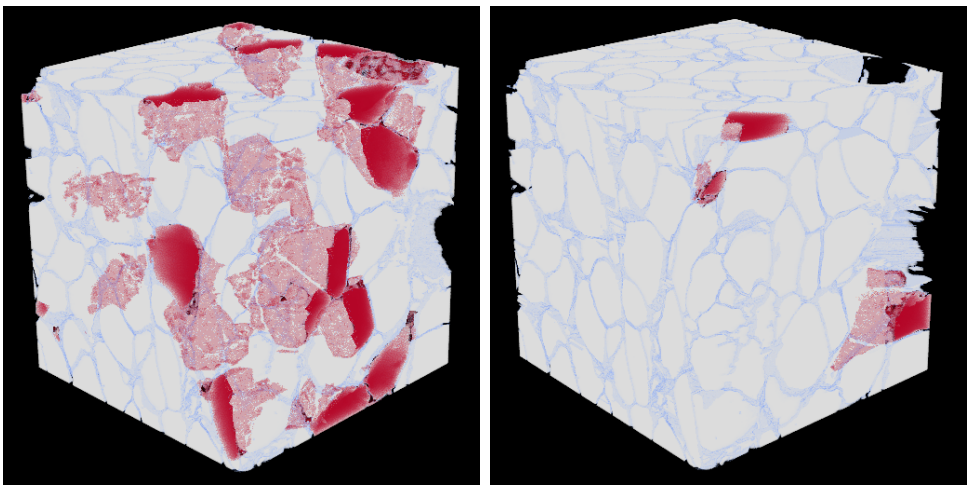


(b) (c) (d)

Figure 4.4 – Résultats typiques de la segmentation par instance 3D sur une coupe d'un volume acquis par SBF-SEM. (a) : Coupe acquise par SBF-SEM. (b-d) : La couleur blanche représente les contours cellulaires, la couleur rouge représente un capillaire sanguin (BC), les cellules colorées représentent les cellules correctement identifiées et individualisées par rapport à la vérité terrain (b), et la couleur noire indique les erreurs par rapport à la vérité terrain.

Segmentation par instance 3D des cellules à partir de résultats 2D coupe par coupe

Segmentation par instance 3D des cellules à partir de sous-ensembles de résultats 2D fiables (approche proposée)



(a) (b)

Figure 4.5 – Comparaison visuelle 3D des résultats obtenus pour la segmentation par instance 3D des cellules dans un volume acquis par SBF-SEM. (a) : Segmentation par instance 3D des cellules à partir de résultats 2D obtenus coupe par coupe (Step #1 - #2 dans la Figure 4.2). (b) : Segmentation par instance 3D des cellules à partir de sous-ensembles de résultats 2D fiables (Step #1 - #4 dans la Figure 4.2). Les cellules correctement identifiées et individualisées sont blanches, alors que les cellules contenant des erreurs sont en rouge. Pour faciliter la comparaison visuelle entre (a) et (b), les cellules contenant des erreurs avec les deux approches sont aussi en blanc.

performances, avec 20 cas de mauvaise individualisation en moins. Cette amélioration s'accompagne d'une réduction de la sur-segmentation, avec un impact modéré sur le nombre de cas de sous-segmentation.

Sur le plan de la qualité des masques 3D de segmentation, l'introduction des *a priori* intercellulaires entraîne une amélioration significative du score de Dice (test asymétrique de Mann-Whitney [188], $p < 0.01$), témoignant d'un recouvrement spatial plus précis entre les reconstructions obtenues et la vérité terrain.

Ces résultats démontrent que notre pipeline, intégrant une segmentation par instance 3D initiale des cellules à partir de résultats 2D obtenus coupe par coupe dans le chapitre précédent, une sélection automatique rigoureuse de sous-ensembles de segmentations 2D fiables et une propagation contrôlée de ces résultats partiels et fiables avec des *a priori* intercellulaires simples mais efficaces, permet une segmentation par instance 3D des cellules à la fois plus robuste, fidèle et interprétable. Cette amélioration réduit considérablement la nécessité de corrections manuelles *a posteriori*, ce qui en fait une solution pertinente pour les pipelines automatisés de segmentation par instance des cellules en 3D.

Table 4.1 – Évaluation de l'approche proposée pour l'individualisation des cellules en 3D (Figure 4.2). Des pourcentages plus élevés de cellules correctement identifiées indiquent une meilleure performance, tandis que des pourcentages plus faibles de cellules sur- et sous-segmentées reflètent moins d'erreurs. En outre, les scores de Dice les plus élevés correspondent à une meilleure qualité de reconstruction. Les meilleurs résultats sont indiqués en caractères gras.

	Métriques d'identification			**Métrique de segmentation**
	Cellules correctement identifiées [%]	**Cellules sur-segmentées** [%]	**Cellules sous-segmentées** [%]	**Dice** [A.U.]
Segmentation par instance 3D des cellules à partir de résultats 2D coupe par coupe	64.77	30.65	**7.72**	0.90 ± 0.11
Segmentation par instance 3D à partir de sous-ensembles de résultats 2D fiables sans fixer les voxels intercellulaires à 0 dans les images	63.61	27.51	17.19	0.88 ± 0.13
Segmentation par instance 3D à partir de sous-ensembles de résultats 2D fiables en fixant les voxels intercellulaires à 0 dans les images (approche proposée)	**70.49**	**22.06**	11.46	$\mathbf{0.91 \pm 0.11}$

Conclusion du chapitre

Dans ce chapitre, nous avons abordé une problématique essentielle pour la digitalisation 3D des tissus biologiques à partir d'images acquises par SBF-SEM : la segmentation par instance 3D des cellules, qui vise à obtenir des masques 3D avec un label individuel affecté pour chacune d'elles, à partir de résultats 2D. Jusqu'à présent, les méthodes développées dans cette thèse se concentraient sur l'amélioration des contours cellulaires en 2D coupe par coupe, notamment grâce à l'opérateur de fermeture COp-Net. Toutefois, nous avons pu voir que des discontinuités résiduelles persistent dans les contours cellulaires de certaines coupes, rendant la segmentation par instance 3D des cellules à partir de résultats 2D coupe par coupe difficile et insatisfaisante. Afin de remédier à ces limitations et améliorer ces résultats, nous avons proposé un ensemble d'approches méthodologiques innovantes, articulées autour de deux contributions principales.

La première étape repose sur un module de contrôle qualité visant à sélectionner automatiquement, pour chaque cellule individualisée de manière grossière en 3D, un sous-ensemble de segmentations sémantiques 2D considérées comme fiables. Ce filtrage est crucial pour éviter la propagation d'erreurs dans la suite du traitement. Dans un second temps, nous avons mis en œuvre une propagation guidée le long de l'axe z, en utilisant le modèle de fondation micro-SAM. Pour renforcer la robustesse de ces deux étapes, nous avons intégré des *a priori* intercellulaires simples mais efficaces, consistant à masquer les contours cellulaires déjà segmentés (tels que définis dans le chapitre précédent). Ce mécanisme a permis d'étendre progressivement le sous-ensemble de segmentations 2D fiables de chaque cellule à l'ensemble du volume, en assurant une segmentation par instance 3D des cellules précise et cohérente.

Les évaluations qualitatives et quantitatives réalisées sur un volume complet acquis par SBF-SEM ont mis en évidence les bénéfices de cette approche. Par rapport

à la segmentation par instance 3D à partir de résultats 2D coupe par coupe, notre approche améliore considérablement le nombre de cellules correctement identifiées, tout en limitant les erreurs de sur- et sous-segmentation. L'intégration d'*a priori* intercellulaires sur les images d'entrée s'est révélée particulièrement bénéfique, en améliorant la robustesse de la propagation sans nuire à la précision locale.

En somme, ce chapitre démontre qu'il est possible, à partir de résultats 2D fiables et d'un mécanisme de propagation bien conçu, de produire des segmentations par instance 3D des cellules précises, robustes et interprétables sans entrainer de nouveau modèle dédié. Cette capacité constitue une étape clé vers l'automatisation complète de la digitalisation 3D des tissus biologiques à l'échelle cellulaire et subcellulaire et est essentielle pour l'analyse bioarchitecturale des tissus, abordée dans le chapitre suivant.

Chapitre 5

Étude de l'architecture interne des échantillons

Les chapitres précédents se sont concentrés sur la conception et la validation d'une approche complète pour la digitalisation 3D des tissus biologiques acquis par SBF-SEM, reposant sur des segmentations précises et robustes des structures d'intérêt, tout en minimisant l'intervention humaine. À ce stade de la thèse, ces reconstructions 3D nous ont permis d'extraire facilement quelques premières informations biologiques intéressantes, comme le volume des cellules ou leur distance aux capillaires sanguins. Toutefois, ces analyses ciblées, bien qu'informatives, sont limitées : elles ne permettent ni une exploration exhaustive et automatisée de l'organisation tissulaire, ni une compréhension globale de l'architecture interne des tissus tumoraux. Ce chapitre s'attache à dépasser cette limite et constitue une première étape dans l'analyse bioarchitecturale complète et automatisée des tissus reconstruits. L'ambition n'est pas ici de proposer une analyse exhaustive de toutes les informations contenues dans les volumes 3D, mais plutôt d'initier une démarche structurée permettant d'exploiter pleinement les reconstructions 3D obtenues dans les chapitres précédents.

Dans un premier temps, nous dressons un état de l'art des principaux paramètres bioarchitecturaux définis dans la littérature, c'est-à-dire les paramètres géométriques, morphologiques et topologiques pour caractériser l'organisation spatiale des structures biologiques segmentées. Sur cette base, nous proposons une formalisation rigoureuse d'un ensemble de 35 paramètres, organisé en cinq grandes familles selon la nature de l'information capturée : taille, forme, distance, orientation et texture. Chacun de ces paramètres présente un intérêt biologique identifié, et contribue à quantifier les propriétés morphologiques et topologiques des structures observées, ainsi que leurs relations spatiales. À notre connaissance, il s'agit de la première tentative de structuration aussi complète et cohérente de ce type de paramètres pour une analyse bioarchitecturale à l'échelle cellulaire et subcellulaire.

Dans un second temps, nous entamons une phase de prospection exploratoire préliminaire fondée sur des approches de statistique inférentielle, afin d'évaluer le potentiel de ces paramètres pour révéler des tendances biologiques. La statistique inférentielle regroupe l'ensemble des techniques statistiques qui consistent à tirer des conclusions sur une population à partir d'un échantillon de données. Elle repose sur des méthodes probabilistes permettant d'estimer des paramètres inconnus, de tester

des hypothèses et de quantifier l'incertitude associée à ces inférences. Nous présentons les principales méthodes couramment mobilisées dans la littérature pour l'analyse bioarchitecturale, reposant notamment sur des tests statistiques, qu'ils soient paramétriques ou non paramétriques. Nous illustrons ensuite leur application à travers quelques résultats préliminaires remarquables, visant à affiner, corroborer ou infirmer certaines hypothèses biologiques et à identifier des tendances intéressantes au sein des données. Ces premières analyses mettent en évidence la richesse des informations disponibles et soulignent l'intérêt de recourir à des approches non supervisées, capables d'exploiter conjointement l'ensemble des paramètres bioarchitecturaux.

Dans cette optique, nous introduisons ensuite des méthodes plus avancées de fouille de données en grande dimension, issues de l'apprentissage non supervisé, conçues pour explorer, structurer et visualiser des données complexes. Nous illustrons ensuite le potentiel de ces approches à travers deux applications concrètes. La première s'attache à analyser les relations, les redondances et la complémentarité entre les différents paramètres bioarchitecturaux. La seconde explore la capacité discriminante de ces paramètres pour distinguer automatiquement deux types cellulaires au sein d'un même échantillon. Ces deux exemples démontrent que l'analyse bioarchitecturale, lorsqu'elle repose sur une quantification rigoureuse combinée à une exploration intelligente des données, offre des perspectives prometteuses pour l'interprétation fine de l'organisation tissulaire en contexte tumoral.

Ce chapitre marque ainsi une transition entre la phase de reconstruction fidèle des structures biologiques et leur interprétation quantitative à grande échelle, posant les bases d'une lecture automatisée, systématique et reproductible de l'architecture interne des tissus tumoraux. Ces premiers jalons visent à ouvrir la voie vers une véritable fouille de données en grande dimension, en s'appuyant sur des représentations numériques fidèles et interprétables.

Sommaire

5.1 Définition de paramètres bioarchitecturaux pour la quantification systématique de l'organisation tissulaire interne 120

5.1.1 Revue des paramètres d'analyse d'images pertinents pour la quantification de l'organisation tissulaire 120

5.1.2 Vers une formalisation et une catégorisation des paramètres bioarchitecturaux 122

5.2 Exploration des données bioarchitecturales par des approches inférentielles 124

5.2.1 Aperçu des approches inférentielles pour l'exploration de données bioarchitecturales 125

5.2.2 Prospection exploratoire préliminaire guidée par des hypothèses biologiques 127

5.3 Exploration des données bioarchitecturales par des approches d'apprentissage non supervisé 135

5.3.1 Aperçu des approches non supervisées pour l'exploration de données en grande dimension 136

5.3.2 Exploration non supervisée pour révéler l'organisation interne des tissus tumoraux d'hépatoblastome 138

Conclusion du chapitre 141

5.1 Définition de paramètres bioarchitecturaux pour la quantification systématique de l'organisation tissulaire interne

Grâce aux développements méthodologiques présentés dans les chapitres précédents, nous disposons désormais de reconstructions 3D fiables de structures biologiques complexes (cellules, noyaux, nucléoles, capillaires, réseaux mitochondriaux, etc.), obtenues à partir d'images acquises par SBF-SEM. Cette étape franchie, l'enjeu devient l'extraction quantitative et systématique d'informations biologiques à partir de ces reconstructions pour décrire, comparer et interpréter l'organisation interne des tissus étudiés. Cette section s'attache à formaliser cette étape, qui constitue l'ultime maillon dans la chaîne de construction de notre jumeau numérique pour l'analyse bioarchitecturale des tissus à l'échelle cellulaire et subcellulaire.

Nous présentons dans un premier temps les paramètres, appelés paramètres bioarchitecturaux, classiquement utilisés dans la littérature pour quantifier cette organisation 3D. Dans un second temps, nous proposons une extension rigoureuse de ces travaux, en définissant un ensemble cohérent de 35 paramètres bioarchitecturaux regroupés selon cinq grandes catégories : taille, forme, distance, orientation et texture. À notre connaissance, c'est la première fois qu'une telle formalisation est proposée, à la fois dans sa diversité, sa structuration et sa portée applicative.

5.1.1 Revue des paramètres d'analyse d'images pertinents pour la quantification de l'organisation tissulaire

L'analyse bioarchitecturale vise à quantifier l'organisation spatiale des structures biologiques à l'échelle cellulaire et subcellulaire. De nombreuses études ont introduit, dans des contextes spécifiques, un ensemble restreint de paramètres pour caractériser certaines structures ou relations.

Une première étude fondatrice [40] a ainsi proposé de quantifier le volume des cellules tumorales et leur distance au capillaire sanguin, ainsi que l'orientation de leur axe principal par rapport à un plan de référence calculé par la méthode des moindres carrés. Cette orientation est supposée être influencée par la direction locale du capillaire, traduisant une organisation tissulaire potentiellement gouvernée par la vascularisation.

D'autres travaux [78, 179] ont introduit des paramètres de forme plus avancés, notamment la sphéricité qui évalue la ressemblance avec une sphère parfaite :

$$\text{Sphéricité} = \frac{\pi^{1/3}(6 \times \text{Volume})^{2/3}}{\text{Aire 3D}}, \tag{5.1}$$

où l'aire 3D représente l'aire de la surface de la structure (*surface area*), la compacité définie comme :

$$\text{Compacité} = \frac{\text{Aire 3D}}{4\pi \times \text{Volume}^{2/3}}, \tag{5.2}$$

et l'*aspect ratio*, mesurant le rapport entre la plus longue et la plus courte dimension de la boîte englobante, qui croît avec l'allongement de la structure.

L'étude [107] a également proposé la convexité, paramètre reflétant le degré de concavité ou d'invagination d'une structure, définie par :

$$\text{Convexité} = \frac{\text{Volume}}{\text{Volume de l'enveloppe convexe}}, \tag{5.3}$$

où l'enveloppe convexe désigne le plus petit volume convexe contenant la structure. Dans le même travail, les auteurs ont étudié la position relative des nucléoles dans le noyau, via un indicateur de proximité à la membrane nucléaire :

$$\text{Proximité à la membrane} = \frac{d_{cc}}{d_{cc} + d_s}, \tag{5.4}$$

où d_{cc} est la distance entre le centre du noyau et celui de la nucléole, et d_s la distance minimale entre la nucléole et la membrane nucléaire. D'autres études ont abordé la relation entre l'enveloppe nucléaire et les mitochondries [63], en mesurant leur distance minimale, *via* la résolution d'un problème d'optimisation avec contraintes (multiplicateurs de Lagrange) pour étudier l'organisation des mitochondries dans le cytoplasme.

Enfin, certains travaux pionniers [107] ont exploré l'utilisation de paramètres de texture pour caractériser la distribution des intensités au sein des structures biologiques segmentées dans les images de microscopie électronique. Ces paramètres ont permis de quantifier des propriétés telles que l'hétérogénéité, l'entropie ou le contraste local, offrant ainsi un éclairage complémentaire sur les caractéristiques fines des tissus. Les paramètres de texture sont généralement classés en deux grandes catégories selon leur ordre. Les paramètres de premier ordre ne tiennent compte que de statistiques dérivées de l'histogramme des intensités – telles que la moyenne, l'écart-type, l'asymétrie ou l'entropie – indépendamment de la position relative des pixels ou voxels, tandis que les paramètres de second ordre, à l'inverse, capturent les relations spatiales entre les intensités à l'aide de matrices comme la matrice de co-occurrence des niveaux de gris matrice de co-occurrence des niveaux de gris (GLCM) [64], la matrice de longueur de course [56, 172] ou la matrice de dépendance des intensités [165]. Des paramètres plus complexes, dits perceptuels – tels que ceux issus de filtres de Gabor [24, 82], de transformées en ondelettes [22, 102] ou de modèles d'apparence [30] – permettent de capturer des caractéristiques visuelles plus subtiles, souvent difficiles à formaliser par des mesures classiques : variations locales de texture, directionnalité des structures, motifs répétitifs ou irrégularités fines. Leur intérêt est particulièrement marqué pour des tâches où la structure interne ou l'aspect visuel d'un objet est discriminant. L'ensemble de ces paramètres de texture est largement utilisé en radiologie, avec des modalités d'acquisition comme l'imagerie à résonance magnétique (IRM), le scanner ou la tomographie par émission de positrons (TEP), où ils permettent de révéler des signatures tissulaires subtiles et non perceptibles à l'œil nu. Dans le contexte de la MEB 3D, ces paramètres offrent un potentiel intéressant pour capturer la texture fine des structures biologiques, en particulier dans les tissus à forte densité ou aux contrastes subtils.

Néanmoins, il est important de souligner, qu'à notre connaissance, l'ensemble de ces analyses bioarchitecturales se limite en général à un petit nombre de paramètres, souvent motivées par des hypothèses biologiques précises. Ce cloisonnement empêche

une exploration globale et systématique de l'organisation tissulaire, et limite la mise en évidence de relations croisées entre les différentes structures ou échelles d'organisation. Dans la section suivante, nous proposons une formalisation rigoureuse de l'ensemble des paramètres bioarchitecturaux pertinents biologiquement, regroupés selon la nature de l'information qu'ils encodent.

5.1.2 Vers une formalisation et une catégorisation des paramètres bioarchitecturaux

À la lumière de l'état de l'art présenté précédemment, il apparaît que la plupart des études se limitent à un nombre restreint de paramètres morphologiques ou spatiaux, souvent définis pour peu de structures biologiques. Cette approche fragmentaire empêche une compréhension globale de l'organisation interne des tissus. Pour répondre à cette limite, nous proposons ici une formalisation rigoureuse de 35 paramètres bioarchitecturaux, définis à partir des reconstructions 3D des structures biologiques obtenues par segmentation, et classés selon la nature de l'information qu'ils capturent. Cette classification repose sur cinq grandes familles : taille, forme, distance inter-structures, orientation spatiale et texture intra-cellulaire. Chacune de ces familles est détaillée dans la suite de cette section et rassemble des paramètres pertinents d'un point de vue biologique, quantifiables de manière reproductible, et adaptés à une exploitation statistique ou algorithmique. Une synthèse de ces paramètres est présentée dans la Table 5.1, incluant leur définition biologique ainsi que les outils et méthodes utilisés pour leur calcul.

Taille des structures biologiques Cette première catégorie regroupe les paramètres mesurant le volume ou l'aire 3D (*surface area*) des structures segmentées. Nous avons défini les volumes (en μm^3) des noyaux (ID 1), nucléoles (ID 3) et cellules (ID 4), ainsi que l'aire 3D (en μm^2) de l'enveloppe nucléaire (ID 2), obtenue à l'aide de l'algorithme *marching cubes* au sein de la librairie Scikit-Image [99, 181]. Pour mieux caractériser le contenu intracellulaire, nous avons également mesuré le volume cumulé des gouttelettes lipidiques au sein du noyau (ID 5) et au sein de la cellule entière (ID 6), ainsi que le volume total du réseau mitochondrial dans chaque cellule (ID 7).

Forme des structures Les formes cellulaires et subcellulaires sont décrites à l'aide de paramètres dérivés de la géométrie 3D. La sphéricité nucléaire (ID 8) est calculée selon la formule (5.1). Cette mesure est complétée par l'élongation (ID 9 pour le noyau, ID 11 pour la cellule, ID 13 pour le réseau mitochondrial), estimée à partir du rapport de variance selon l'axe principal obtenu par analyse en composantes principales (PCA) [72]. La convexité (ID 10 pour le noyau, ID 12 pour la cellule) est quantifiée entre la structure d'origine et son enveloppe convexe par un indice de similarité (score de Dice défini par l'équation (4.2) [42, 155]).

Distances inter-structures Cette catégorie quantifie les relations spatiales entre les différentes structures biologiques. Nous avons mesuré la distance minimale du

Table 5.1 – Résumé des 35 paramètres bioarchitecturaux définis et analysés dans cette thèse, regroupés en cinq familles (taille, forme, distances inter-structures, orientation spatiale et texture intra-cellulaire). Chaque entrée indique l'identifiant, la définition biologique et l'outil ou la méthode de calcul employé.

ID	Définition biologique	Outil / Méthode
Taille des structures		
1	Volume des noyaux	Nb. de voxels × taille du voxel
2	Aire 3D de l'enveloppe nucléaire	Marching cubes (Scikit-Image)
3	Volume des nucléoles	Nb. de voxels × taille du voxel
4	Volume des cellules	Nb. de voxels × taille du voxel
5	Volume des gouttelettes lipidiques nucléaire	Nb. de voxels × taille du voxel
6	Volume des gouttelettes lipidiques cellulaire	Nb. de voxels × taille du voxel
7	Volume du réseau mitochondrial cellulaire	Nb. de voxels × taille du voxel
Forme des structures		
8	Sphéricité nucléaire	Formule (5.1)
9	Élongation du noyau	Rapport de variance (PCA [72])
10	Convexité du noyau	Similarité avec l'enveloppe convexe
11	Élongation de la cellule	Rapport de variance (PCA [72])
12	Convexité de la cellule	Similarité avec l'enveloppe convexe
13	Élongation du réseau mitochondrial	Rapport de variance (PCA [72])
Distances inter-structures		
14	Distance noyau – capillaire sanguin	Distance euclidienne (lib. `edt`)
15	Distance noyau – zone hémorragique	Distance euclidienne (lib. `edt`)
16	Distance nucléole – enveloppe nucléaire	Distance euclidienne (lib. `edt`)
17	Distance cellule – capillaire sanguin	Distance euclidienne (lib. `edt`)
18	Distance cellule – zone hémorragique	Distance euclidienne (lib. `edt`)
19	Distance réseau mitochondrial – enveloppe nucléaire	Distance euclidienne (lib. `edt`)
Orientation spatiale		
20	Angle noyau – axe capillaire sanguin	PCA [72] + orientation relative
21	Angle noyau – plan optimal	PCA [72] + moindres carrés
22	Angle cellule – axe capillaire sanguin	PCA [72] + orientation relative
23	Angle cellule – plan optimal	PCA [72] + moindres carrés
24	Angle mitochondries – axe capillaire sanguin	PCA [72] + orientation relative
25	Angle mitochondries – plan optimal	PCA [72] + moindres carrés
Texture intra-cellulaire		
26–30	Moyenne, écart-type, entropie, skewness, kurtosis nucléaires	Statistiques 1er ordre
31–35	Moyenne, écart-type, entropie, skewness, kurtosis cytoplasmiques	Statistiques 1er ordre

centre des noyaux aux capillaires sanguins (ID 14) et aux zones hémorragiques (ID 15), la distance minimale entre les nucléoles et l'enveloppe nucléaire (ID 16), ainsi que les distances minimales du centre des cellules aux capillaires (ID 17) et aux zones hémorragiques (ID 18). Enfin, la distance minimale entre le réseau mitochondrial et l'enveloppe nucléaire a également été considérée (ID 19). Les distances euclidiennes minimales ont été obtenues grâce à la librairie `edt` de Python, en tenant compte de l'anisotropie des voxels.

Orientation spatiale Les orientations spatiales relatives des organites sont capturées via l'angle entre leur axe principal (obtenu par PCA [72]) et deux référentiels : l'axe principal du capillaire sanguin et un plan 2D d'alignement optimal déterminé par la méthode des moindres carrés. Ces mesures sont obtenues pour les noyaux (ID 20 et ID 21), les cellules (ID 22 et ID 23), et les réseaux mitochondriaux (ID 24 et ID 25).

Texture intra-cellulaire Enfin, pour caractériser les variations d'intensité au sein des structures segmentées, cinq paramètres de texture de premier ordre ont été extraits dans les régions nucléaires (ID 26–30) et cytoplasmiques (ID 31–35). Ces paramètres sont : la moyenne, l'écart-type, l'entropie, l'asymétrie (*skewness*) et l'aplatissement (*kurtosis*) de la distribution des niveaux de gris. Nous avons choisi de nous restreindre à des paramètres de texture de premier ordre, afin de garantir une robustesse face au bruit et une interprétabilité d'un point de vue biologique.

Cette formalisation et catégorisation systématique constitue une base solide pour l'étude de l'organisation interne tissulaire en 3D. Elle rend désormais possible une analyse de l'architecture cellulaire et subcellulaire du tissu considéré, en combinant des dimensions jusqu'ici rarement explorées conjointement. Les 35 paramètres ainsi définis serviront de fondement aux analyses présentées dans la suite du chapitre, visant à extraire des connaissances biologiques à partir de ces représentations de grande dimension.

5.2 Exploration des données bioarchitecturales par des approches inférentielles

Notre étude de l'organisation interne des volumes d'échantillon d'HB a naturellement débuté par une phase de prospection fondée sur les approches statistiques inférentielles couramment mobilisées dans la littérature pour l'analyse bioarchitecturale. La statistique inférentielle regroupe l'ensemble des techniques qui consistent à tirer des conclusions sur une population à partir d'un échantillon de données. Elle repose sur des méthodes probabilistes permettant d'estimer des paramètres inconnus, de tester des hypothèses et de quantifier l'incertitude associée à ces inférences.

Cette section présente les principales méthodes inférentielles utilisées, reposant notamment sur des tests statistiques classiques, qu'ils soient paramétriques ou non paramétriques. Nous illustrons ensuite leur application à travers quelques résultats préliminaires remarquables. Ces premières analyses ont suscité des échanges stimulants au sein de notre consortium et ont permis d'étudier des hypothèses biologiques intéressantes et prometteuses. Elles ont ainsi posé les fondations du développement d'algorithmes de fouille de données plus avancés, intégrant des approches multivariées d'apprentissage non supervisé, qui seront détaillées dans la suite du chapitre.

5.2.1 Aperçu des approches inférentielles pour l'exploration de données bioarchitecturales

Les analyses bioarchitecturales se concentrent généralement sur un nombre restreint de paramètres, choisis en fonction d'hypothèses biologiques spécifiques. Pour évaluer la pertinence de ces hypothèses – les affiner, les corroborer ou les infirmer – la littérature s'appuie largement sur les outils de statistique inférentielle, qui permettent de tester la significativité des différences ou des relations observées.

Deux approches sont particulièrement répandues : la comparaison de la distribution d'un paramètre donné entre plusieurs groupes (par exemple : zones tumorales vs. saines, avant vs. après traitement ou exposition à un pathogène, etc.), et l'étude des corrélations bivariées, visant à évaluer les liens entre deux paramètres (comme la taille des cellules et leur proximité aux capillaires sanguins, ou la forme nucléaire et l'activité mitochondriale).

Dans cette section, nous rappelons, sans prétendre l'exhaustivité, les principales approches susceptibles d'être mobilisées dans le cadre de l'analyse bioarchitecturale, en fonction du type de données considérées et de la nature des hypothèses testées.

Comparaison de la distribution d'un paramètre donné entre plusieurs groupes

Lorsque des annotations biologiques sont disponibles (par exemple : zones tumorales vs. saines, avant vs. après traitement, régions issues de différents patients, ect.), des tests statistiques peuvent être employés pour comparer la distribution des paramètres bioarchitecturaux entre les groupes. Ces tests permettent de déterminer si certaines caractéristiques morphologiques ou topologiques présentent des différences statistiquement significatives selon la condition biologique étudiée.

Les tests paramétriques, tels que le test de Student (ou test t), sont couramment utilisés pour comparer les moyennes de deux groupes [164]. Ils reposent toutefois sur des hypothèses fortes, notamment la normalité des distributions et l'égalité des variances. Ces hypothèses sont rarement vérifiées dans le contexte biologique, en particulier pour des échantillons de taille modérée ou présentant des distributions asymétriques ou multimodales.

Pour pallier à ces limitations, les tests non paramétriques offrent une alternative plus souple. Le test de Mann–Whitney U [188] (aussi appelé Wilcoxon–Mann–Whitney) est l'un des plus utilisés pour comparer la distribution d'un paramètre entre deux groupes X et Y, sans faire d'hypothèse sur la loi sous-jacente. La version symétrique de ce test vérifie l'hypothèse nulle H_0 selon laquelle les deux groupes sont issus de distributions identiques. Plus précisément, il évalue si la probabilité qu'une observation de X soit strictement inférieure à une observation de Y est égale à la situation inverse :

$$H_0 : P(X < Y) = P(Y < X) \tag{5.5}$$

Lorsque $((X_1, Y_1), ...(X_n, Y_n)) \sim (\mathcal{P} \otimes \mathcal{Q})^{\otimes n}$ avec $\mathcal{P}$ et $\mathcal{Q}$ des lois de probabilités, sans atome sur $\mathbb{R}$, on définit la statistique de Mann-Whitney par [18] :

$$U_n = \sum_{i,j=1}^{n} \mathbb{1}_{X_i<Y_i} \tag{5.6}$$

qui dépend des rangs de l'échantillon global $(X_1, Y_1, ..., X_n, Y_n)$. Cette expression permet d'interpréter U_n comme la mesure du nombre de fois où les observations d'un groupe dominent celles de l'autre. Le test de Mann–Whitney est particulièrement adapté aux situations où les données présentent des distributions asymétriques ou des valeurs aberrantes (*outliers*), ce qui est souvent le cas dans les études bioarchitecturales. Sa robustesse et sa simplicité d'interprétation en font un outil de référence pour l'analyse inférentielle de paramètres morphologiques, topologiques ou spatiaux entre populations biologiques.

Dans le cas de plus de deux groupes, l'analyse de variance (ANOVA) est souvent utilisée pour tester si les moyennes d'un paramètre sont significativement différentes entre plusieurs conditions [50]. L'ANOVA repose également sur des hypothèses de normalité et d'homogénéité des variances, mais il existe des alternatives non paramétriques, comme le test de Kruskal–Wallis [95], qui généralisent le test de Mann–Whitney à plus de deux groupes.

Ces tests statistiques sont utiles pour identifier des paramètres discriminants entre groupes biologiques. Cependant, ils sont souvent appliqués indépendamment pour chaque paramètre, sans tenir compte des interdépendances entre variables, ni de la structure multivariée des données. Cette approche fragmentée, bien que répandue dans la littérature, limite l'exploration globale et automatisée de l'organisation tissulaire et peut passer à côté de combinaisons de paramètres informatives.

Étude des corrélations pour évaluer les liens entre deux paramètres

L'analyse des corrélations constitue une approche classique pour explorer les relations entre deux paramètres bioarchitecturaux. Elle permet d'identifier d'éventuelles associations entre des caractéristiques morphologiques, topologiques ou spatiales extraites à l'échelle cellulaire ou tissulaire. Cette méthode est particulièrement utile pour formuler ou tester des hypothèses biologiques simples, comme le lien entre la taille des cellules et leur proximité aux capillaires.

Le coefficient de corrélation de Pearson est le plus couramment utilisé pour évaluer la force et la direction d'une dépendance linéaire entre deux variables quantitatives [128]. Pour deux variables X et Y, d'observations $(x_i)_{i=1,...,n}$ et $(y_i)_{i=1,...,n}$, le coefficient de corrélation de Pearson est défini par :

$$\rho_{X,Y} = \frac{\mathrm{Cov}(X,Y)}{\sigma_X \sigma_Y} = \frac{\sum_{i=1}^{n}(x_i - \bar{x})(y_i - \bar{y})}{\sqrt{\sum_{i=1}^{n}(x_i - \bar{x})^2}\sqrt{\sum_{i=1}^{n}(y_i - \bar{y})^2}}, \tag{5.7}$$

où $\bar{x}$ et $\bar{y}$ sont les moyennes des observations, et σ_X, σ_Y leurs écarts-types. Un coefficient proche de 1 (ou -1) indique que l'une des variables est une fonction affine croissante (ou décroissante) de l'autre variable, tandis qu'un coefficient proche de 0 suggère que les variables ne sont pas corrélées linéairement, néanmoins elles peuvent être corrélées non-linéairement. Par ailleurs, le coefficient de corrélation de Pearson suppose également que les données aient une distribution normale.

Lorsque ces conditions – normalité des distributions et dépendance linéaire des variables – ne sont pas remplies, ce qui est fréquemment le cas dans les jeux de données biologiques hétérogènes, des alternatives non paramétriques sont préférables

telles que le coefficient de Spearman [156]. Pour deux variables X et Y, d'observations $(x_i)_{i=1,\dots,n}$ et $(y_i)_{i=1,\dots,n}$, le coefficient de corrélation de Spearman mesure la force d'une relation monotone en appliquant le coefficient de corrélation de Pearson aux variables de rang $rg(x_i)$ et $rg(y_i)$:

$$\rho_S = \frac{\mathrm{Cov}(rg(X), rg(Y))}{\sigma_{rg(X)} \cdot \sigma_{rg(Y)}} \tag{5.8}$$

De la même manière que le test de Mann-Whitney, en s'appuyant sur les rangs des observations plutôt que sur leurs valeurs, le coefficient de corrélation de Spearman est particulièrement adapté aux situations où les données présentent des distributions asymétriques non gaussiennes ou des valeurs aberrantes (*outliers*).

Ces corrélations sont souvent accompagnées de tests statistiques permettant de déterminer si la corrélation observée est significativement différente de zéro. Toutefois, une corrélation significative ne traduit pas nécessairement un lien causal entre les paramètres, mais peut refléter une co-variation liée à un troisième facteur non mesuré ou non comparé [86, 143].

L'étude des corrélations bivariées offre donc un outil simple mais puissant pour explorer les relations entre paramètres et guider des analyses plus complexes. Cependant, elle reste limitée à des relations deux-à-deux, sans prendre en compte les interactions multiples ou les effets combinés entre plusieurs variables.

5.2.2 Prospection exploratoire préliminaire guidée par des hypothèses biologiques

Maintenant que nous avons présenté les principales approches couramment mobilisées dans la littérature pour l'analyse bioarchitecturale des tissus, nous en illustrons l'application concrète à travers une phase de prospection exploratoire préliminaire. Guidée par des hypothèses biologiques pertinentes et prometteuses, cette étape vise à explorer différents aspects de l'organisation interne des tissus tumoraux à partir de nos données. Les résultats obtenus, exposés dans la suite de cette section, ont permis de mettre en évidence certaines tendances biologiquement interprétables, tout en soulignant les limites des approches statistiques inférentielles classiques, notamment en terme de prise en compte conjointe de plusieurs paramètres. Ces constats ont motivé le recours à des méthodes plus avancées de fouille de données en grande dimension, fondées sur des approches d'apprentissage non supervisé, qui seront développées dans la suite du chapitre.

Analyse du volume des structures biologiques en fonction de la distance au capillaire sanguin

Les régions vasculaires occupent une place centrale dans l'étude des tumeurs, car leur densité, leur organisation – ou au contraire leur désorganisation ou leur rupture – constituent autant d'indicateurs d'une vascularisation anormale, souvent corrélée à une croissance tumorale agressive. De plus, les cellules tumorales dépendent fortement de l'apport en nutriments et en oxygène fourni par les capillaires sanguins

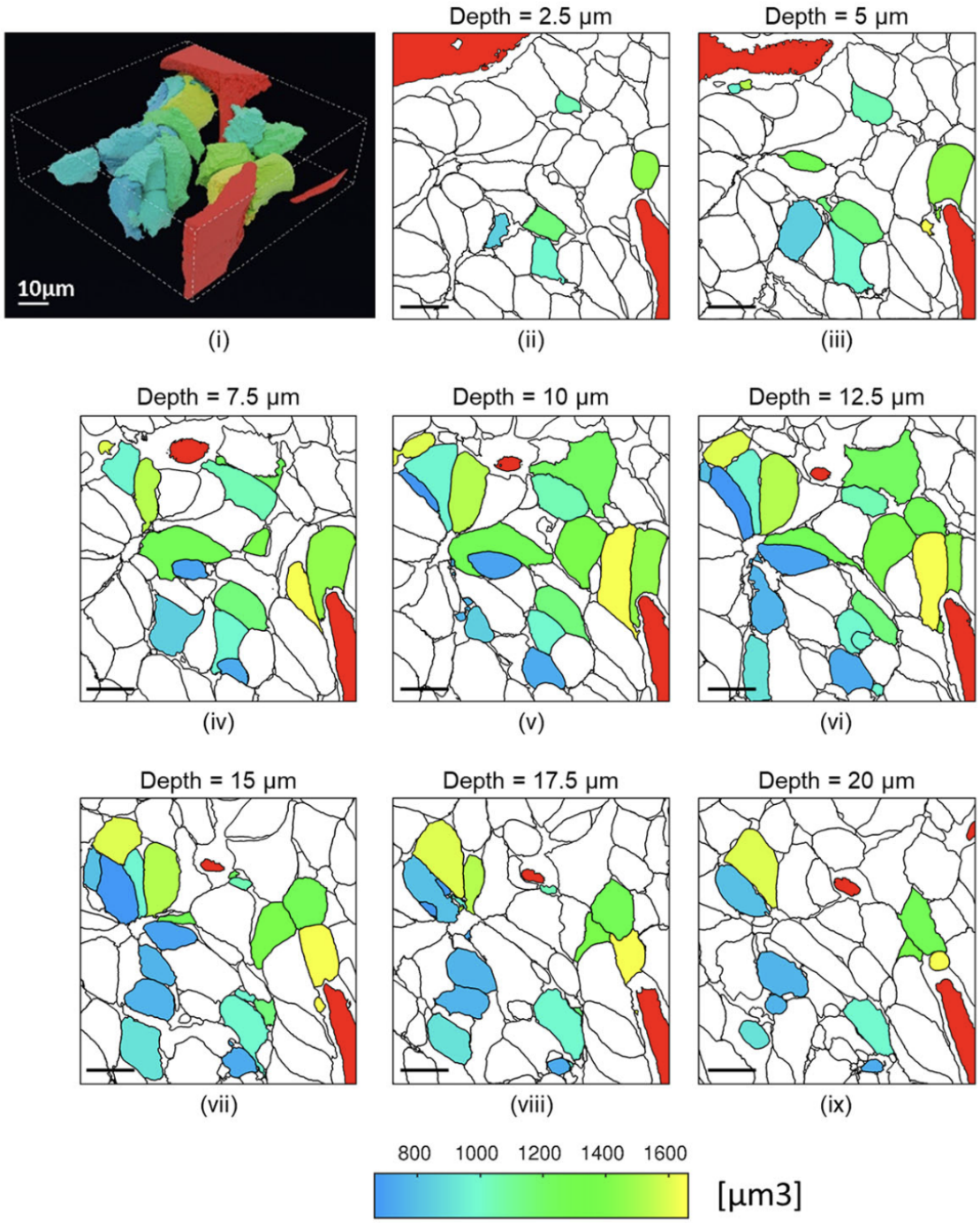
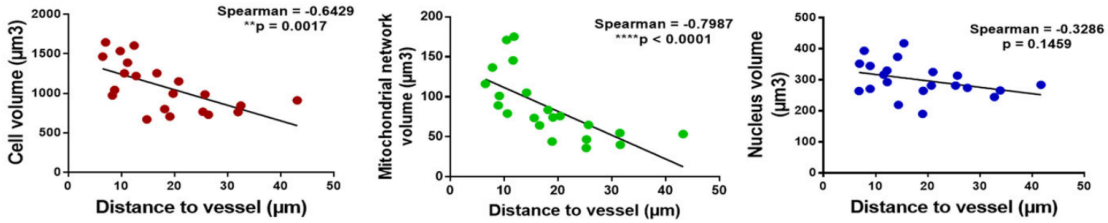


Figure 5.1 – Volume des cellules (paramètre ID 4) par rapport à la distance au capillaire sanguin (paramètre ID 17) dans un volume d'échantillon d'HB constitué de 246 images acquises par SBF-SEM, dans le cadre de travaux antérieurs menés au sein du consortium [40]. (i) : Reconstruction 3D des cellules et du capillaire sanguin. La couleur de chacune des cellules dépend de son volume. (ii-ix) : Coupe 2D avec une profondeur croissante le long de l'axe z. (i-ix) Le capillaire sanguin est identifié en rouge. Barre d'échelle $= 10$ µm. Illustration extraite de [40], sous licence internationale Creative Commons Attribution 4.0.



(a) (b) (c)

Figure 5.2 – Étude de la corrélation entre le volume des structures biologiques d'intérêt par rapport à la distance au capillaire sanguin dans un volume d'échantillon d'HB constitué de 246 images acquises par SBF-SEM, dans le cadre de travaux antérieurs menés au sein du consortium [40]. (a) : Volume des cellules (paramètre ID 4). (b) : Volume des réseaux mitochondriaux (paramètre ID 7). (c) : Volume des noyaux (paramètre ID 1). Graphiques extraits de [40], sous licence internationale Creative Commons Attribution 4.0.

pour maintenir leur activité métabolique [52, 16, 13, 59]. Une piste exploratoire intéressante consiste donc à évaluer l'influence de la proximité des capillaires sanguins sur le volume des cellules et des organites d'intérêt.

Une première analyse qualitative conduite dans le cadre de notre consortium a mis en évidence une organisation spatiale particulière du volume cellulaire en fonction de la proximité des capillaires sanguins [40]. La Figure 5.1 illustre cette observation à travers des reconstructions 3D et 2D d'un échantillon tumoral, où chaque cellule est colorée en fonction de son volume. Visuellement, les cellules les plus proches du capillaire sanguin (en rouge) apparaissent majoritairement plus volumineuses (tons jaunes et verts), suggérant une influence locale de l'environnement vasculaire sur la taille cellulaire. Cette représentation visuelle a ainsi permis de formuler l'hypothèse selon laquelle la proximité d'un capillaire favoriserait une augmentation du volume cellulaire, potentiellement liée à un meilleur apport en nutriments et en oxygène [51, 52, 166].

Cette hypothèse a été confirmée par une analyse quantitative menée sur le même échantillon (Figure 5.2), mettant en évidence une corrélation négative significative entre la distance aux capillaires et le volume des cellules (test de Spearman entre les paramètres ID 17 et ID 4 [156], $p < 10^{-2}$). Une tendance similaire a été observée pour le volume des réseaux mitochondriaux (test de Spearman entre les paramètres ID 17 et ID 7 [156], $p < 10^{-4}$), renforçant l'idée d'une activité métabolique accrue dans les cellules les plus fournies en nutriments [118]. En revanche, aucune corrélation notable n'a été détectée concernant le volume des noyaux (paramètre ID 1), suggérant que ce paramètre morphologique pourrait être moins sensible aux gradients nutritionnels ou oxygénés apportés par les capillaires.

Dans nos propres expérimentations, ces corrélations négatives n'ont pas été retrouvées de manière systématique. Plusieurs hypothèses peuvent expliquer cette divergence. D'une part, la position des capillaires dans le champ de vue semble jouer un rôle important : selon leur localisation (centrale ou périphérique), leur influence sur les structures avoisinantes peut varier. Ainsi, il pourrait être plus pertinent de raisonner par zones concentriques autour des capillaires, en définissant par exemple des régions de $0 - 15$ µm, $15 - 30$ µm et > 30 µm, afin de mieux capturer les ef-

fets de gradient nutritionnel. D'autre part, la possibilité que des capillaires sanguins importants se situent hors du champ de vue ne peut être exclue et devrait être prise en compte dans l'interprétation des résultats. Ces éléments soulignent l'importance d'une contextualisation spatiale fine dans l'analyse bioarchitecturale des tissus tumoraux.

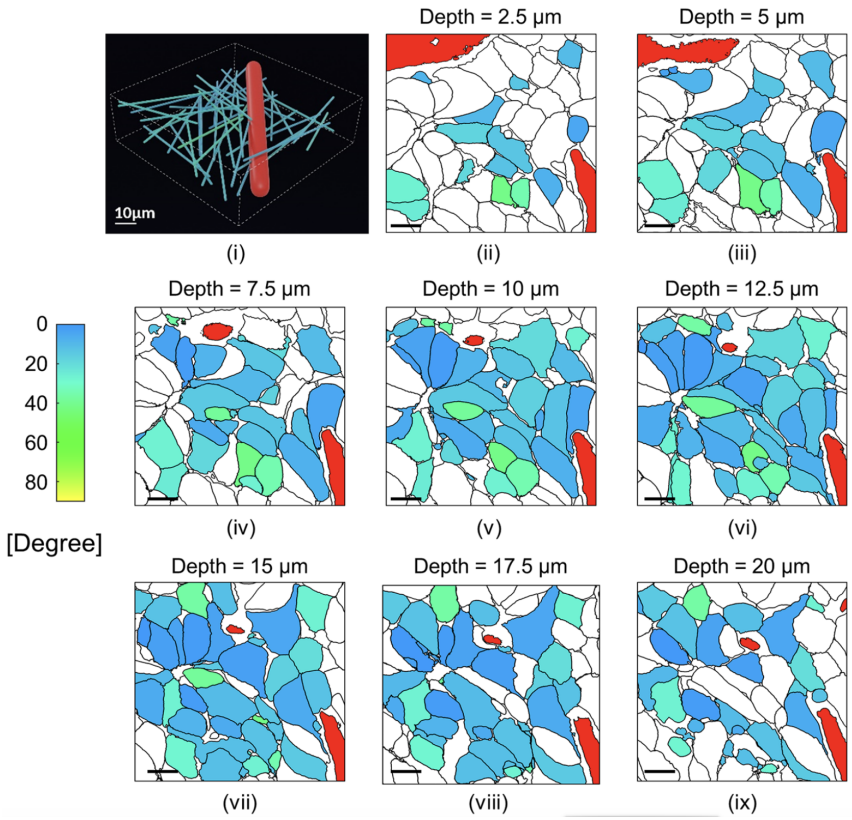
Impact des régions vasculaires sur l'orientation des structures cellulaires dans le tissu

D'un point de vue plus biophysique, la présence de régions vasculaires au sein des tissus tumoraux est susceptible de générer des contraintes physiques locales, influençant potentiellement l'organisation spatiale des structures cellulaires [166]. En particulier, les zones hémorragiques – vraisemblablement liées à la rupture ou à la fragilité des capillaires – pourraient induire un remodelage physique et mécanique du microenvironnement tumoral, facilitant l'invasion cellulaire ou le développement métastatique [195, 52]. Une piste exploratoire intéressante consiste donc à analyser l'impact de ces régions vasculaires sur l'orientation des structures cellulaires dans l'espace.

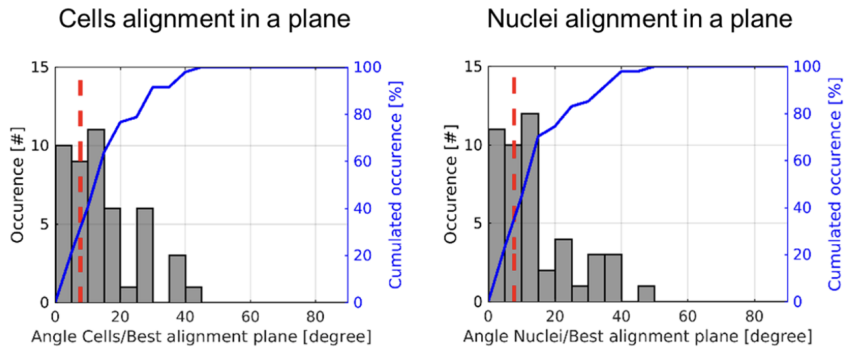
Une première analyse, illustrée par la Figure 5.3 et menée dans le cadre de notre consortium, suggérait que les capillaires sanguins exercent une influence sur l'orientation spatiale des cellules et de leurs noyaux [40]. En effet, il a été observé qu'environ 75% des cellules et des noyaux présentent une inclinaison comprise entre 0° et 20° par rapport au plan 2D d'alignement optimal (paramètres ID 23 et ID 21, respectivement), tandis que le capillaire sanguin présente une inclinaison de 8° (Figure 5.3b).

Dans nos propres expérimentations, des résultats aussi nets n'ont pas pu être reproduits. Afin de mieux comprendre l'influence des structures vasculaires sur l'orientation des noyaux – et d'exploiter la diversité des volumes d'échantillons d'HB acquis dans le cadre de cette thèse – nous avons sélectionné quatre volumes d'intérêt. Deux d'entre eux présentent une faible proportion de régions vasculaires (ANT PIN1 : 6.7% du volume ; BAL PIN1 : 8.6%), tandis que les deux autres affichent des proportions plus élevées (LEM PIN1 : 32.5% ; SET PIN1 : 28.8%). Pour chaque volume, l'angle formé entre l'axe principal des noyaux et celui du capillaire sanguin a été mesuré (paramètre ID 20), afin d'évaluer l'existence d'une corrélation entre l'abondance vasculaire et l'alignement nucléaire.

La Figure 5.4 présente la distribution des angles mesurés entre l'axe principal des noyaux et celui des capillaires pour les quatre volumes sélectionnés. Une différence significative apparaît pour le volume LEM PIN1 (test symétrique de Mann-Whitney [188], $p < 10^{-5}$), traduisant un effet probable de la densité vasculaire sur l'orientation spatiale des noyaux. En revanche, le volume SET PIN1, également fortement vascularisé, ne montre pas de différence marquée par rapport aux volumes faiblement vascularisés. Cette observation suggère que d'autres facteurs, tels que des contraintes mécaniques locales ou des spécificités tissulaires, pourraient également influencer l'alignement des noyaux. Une analyse multivariée, intégrant l'ensemble des paramètres bioarchitecturaux, serait nécessaire pour mieux comprendre les mécanismes à l'origine de ces différences d'orientation en contexte tumoral.



(a)



(b)

Figure 5.3 – Alignement des cellules et noyaux dans un volume d'échantillon d'HB constitué de 246 images acquises par SBF-SEM, dans le cadre de travaux antérieurs menés au sein du consortium [40]. (a) : Illustration de l'alignement des cellules et du capillaire sanguin par rapport à un plan optimal. (i) : Bâtonnets colorés = axe principal des cellules tumorales ; Bâtonnet rouge = axe principal de capillaire sanguin. (ii-ix) : Angle entre l'axe principal de chaque cellule et le plan 2D d'alignement optimal (paramètre ID 23). Coupe 2D avec une profondeur croissante le long de l'axe z. Barre d'échelle = 10 µm. (b) : Distribution des angles d'alignement des cellules (graphique de gauche, paramètre ID 23) et des noyaux (graphique de droite, paramètre ID 21). La ligne rouge pointillée indique l'angle entre l'axe principal du capillaire sanguin et le plan 2D d'alignement optimal. Illustration extraite de [40], sous licence internationale Creative Commons Attribution 4.0.

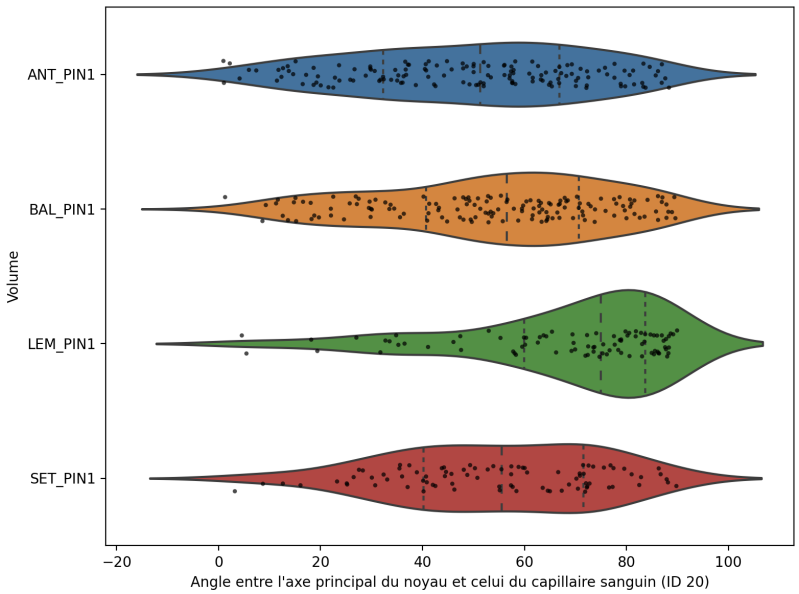


Figure 5.4 – Comparaison inter-tumorale de la distribution des orientations des noyaux (paramètre ID 20) dans quatre volumes issus de tumeurs distinctes d'HB et acquis par SBF-SEM dans le cadre de cette thèse. Les deux premiers volumes (ANT PIN1 et BAL PIN1) présentent les plus petites régions vasculaires, tandis que les deux derniers (LEM PIN1 et SET PIN1) présentent les plus volumineuses. Une distribution significativement différente est observée pour LEM PIN1 (test symétrique de Mann-Whitney [188], $p < 10^{-5}$), suggérant un effet marqué de la vascularisation sur l'orientation nucléaire.

Comparaison inter- et intra-tumorale de l'invagination des noyaux

La morphologie de la membrane nucléaire constitue un indicateur clé de l'état cellulaire, fréquemment corrélé au degré de différenciation cellulaire ou à l'agressivité tumorale [81, 201]. Parmi les altérations couramment observées dans les tissus tumoraux figurent les invaginations de l'enveloppe nucléaire, qui reflètent des déformations locales, parfois profondes, de la structure du noyau. Ces invaginations ne sont pas de simples anomalies morphologiques : elles peuvent modifier l'organisation interne du noyau et faciliter l'interaction avec d'autres organites [111]. En particulier, il a été montré que les mitochondries peuvent s'insérer dans ces repliements nucléaires, suggérant un rôle fonctionnel potentiel dans l'activité bio-énergétique ou dans certaines dépendances métaboliques propres aux cellules tumorales [63, 118].

La Figure 5.5 illustre la variabilité de la morphologie 3D des noyaux segmentés dans trois échantillons issus de deux tumeurs distinctes (CRE et BAL) et étudiés dans le cadre de cette thèse. Nous pouvons observer des différences inter-tumorales marquées dans l'architecture nucléaire : le premier échantillon (Figures 5.5a-c) présente des noyaux très irréguliers, avec des invaginations profondes et multiples, tandis que le dernier (Figures 5.5g-i) montre des noyaux bien plus réguliers et convexes. Des variations plus subtiles, mais perceptibles, apparaissent également lors d'une comparaison intra-tumorale entre deux régions distinctes d'une même tumeur (Figures 5.5d-i). Ces observations qualitatives suggèrent l'existence de variations inter- et intra-tumorales notables dans la morphologie nucléaire, qui pourraient refléter des états biologiques distincts ou des degrés variables d'agressivité tumorale [81, 201].

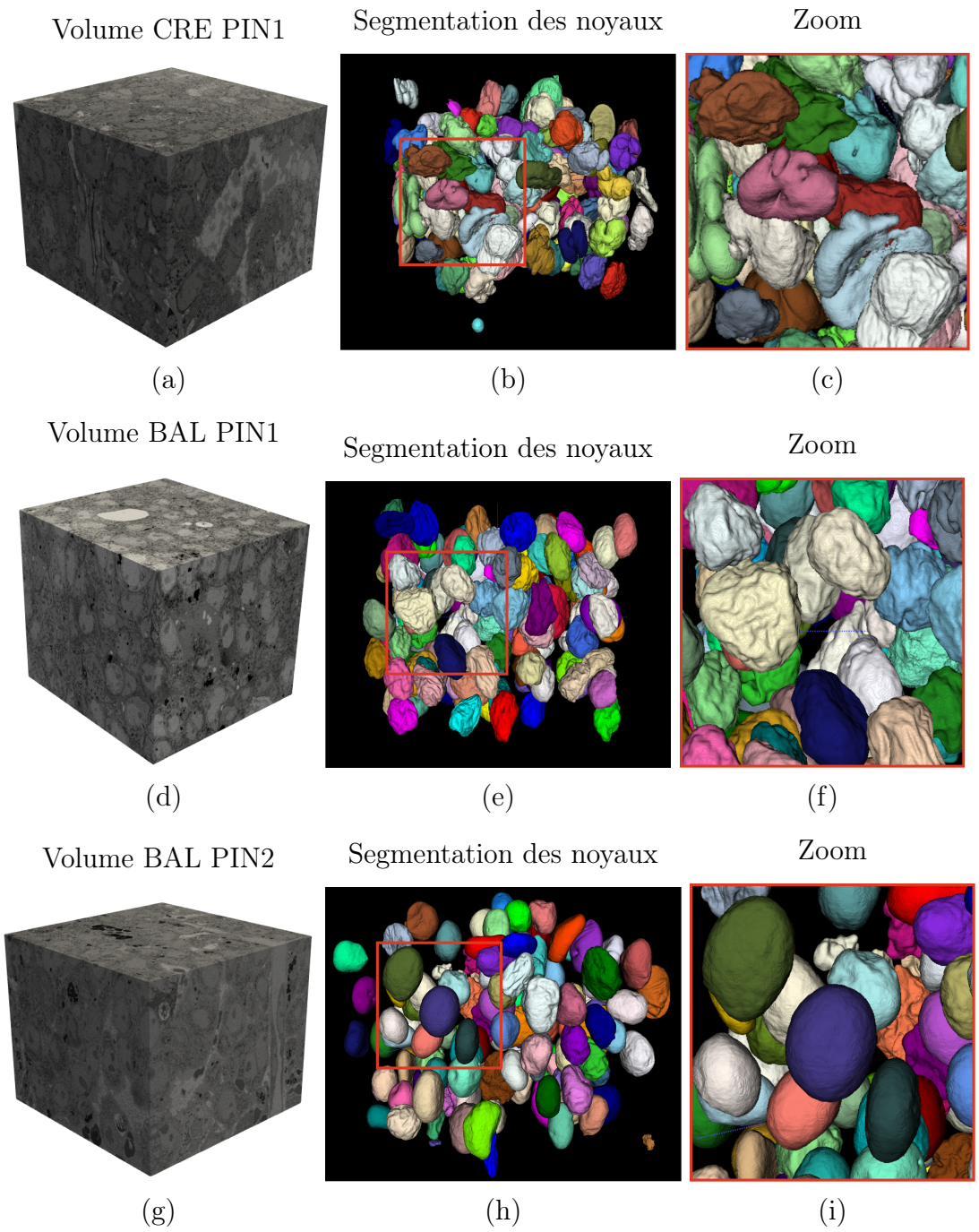


Figure 5.5 – Visualisation 3D des noyaux segmentés dans trois échantillons issus de deux tumeurs distinctes (CRE et BAL). Les volumes BAL PIN1 et BAL PIN2 proviennent de régions différentes d'une même tumeur, sélectionnées selon la procédure décrite dans la section 2.1.1. (a,d,g) : Volumes d'échantillon d'HB acquis par SBF-SEM dans le cadre de cette thèse. (b,e,h) : Segmentation par instance des noyaux dans les trois volumes correspondants à l'aide de l'approche développée au chapitre 2. (c,f,i) : Zoom sur les régions identifiées par un rectangle rouge dans (b,e,h) respectivement. Nous observons des variations notables dans la morphologie nucléaire entre les échantillons, allant de structures très irrégulières et invaginées (b,c) à des formes nettement plus régulières (h,i).

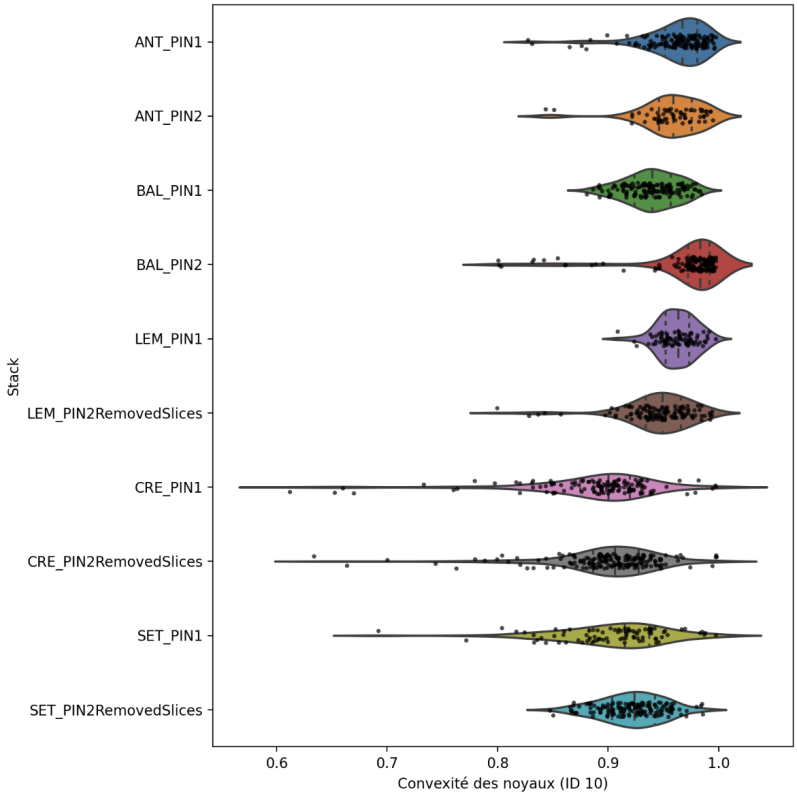


Figure 5.6 – Comparaison inter-tumorale et intra-tumorale de la distribution de la convexité des noyaux (paramètre ID 10) dans les dix volumes d'HB acquis par SBF-SEM dans le cadre de cette thèse. Deux régions différentes au sein de cinq tumeurs – ANT, BAL, LEM, CRE et SET – ont été sélectionnées selon la procédure décrite dans la section 2.1.1. Un score de convexité plus faible indique une forme moins convexe, pouvant être associée à la présence d'invaginations ou de déformations marquées de la membrane nucléaire. Ces altérations morphologiques peuvent refléter un état de différenciation cellulaire particulier ou des remaniements mécaniques et fonctionnels liés à l'agressivité tumorale.

Pour étudier ce phénomène dans les données issues des dix volumes d'HB acquis au cours de cette thèse, nous proposons, dans la Figure 5.6, une comparaison inter- et intra-tumorale de la convexité des noyaux segmentés (paramètre ID 10), utilisée ici comme indicateur quantitatif du degré d'invagination. Plus le score de convexité est faible, plus la forme du noyau est irrégulière et présente des invaginations marquées. Les résultats révèlent des différences significatives entre les tumeurs de patients différents (test symétrique de Mann-Whitney, $p < 10^{-31}$) : certaines, comme l'échantillon ANT, présentent globalement des noyaux très convexes, tandis que d'autres, comme CRE, affichent des valeurs nettement plus faibles. Des variations significatives sont également observées à l'échelle intra-tumorale, c'est-à-dire entre différentes régions d'un même tissu tumoral, comme illustré par les deux sous-volumes de l'échantillon BAL (test symétrique de Mann-Whitney, $p < 10^{-23}$).

Cette hétérogénéité morphologique pourrait refléter des différences d'états cellulaires ou des contextes tumoraux distincts, traduisant des remaniements fonctionnels ou des niveaux variables de différenciation. Toutefois, il est également envisageable que d'autres éléments biologiques contribuent à ces variations intra-tumorales. Ces

premiers résultats ouvrent ainsi la voie à une comparaison inter- et intra-tumorale plus systématique et globale de l'organisation interne des tissus tumoraux, afin d'identifier plus finement les similarités et les différences bioarchitecturales associées à des états tumoraux spécifiques, et, à terme, de mieux comprendre les mécanismes biologiques impliqués dans l'agressivité tumorale.

En conclusion, les principales approches probabilistes mobilisées dans la littérature pour l'analyse bioarchitecturale reposent sur les outils de la statistique inférentielle. Ces méthodes se révèlent particulièrement pertinentes pour tester des hypothèses biologiques ciblées et initier une phase exploratoire préliminaire. Toutefois, leur portée reste limitée lorsqu'il s'agit d'appréhender la richesse et la complexité de l'ensemble des paramètres bioarchitecturaux disponibles. Ces limites justifient le recours à des approches plus avancées, capables de traiter des données en grande dimension et d'en extraire des structures latentes non évidentes. En particulier, l'apprentissage non supervisé constitue un cadre méthodologique bien adapté à ce type d'analyse, et sera exploré dans la section suivante.

5.3 Exploration des données bioarchitecturales par des approches d'apprentissage non supervisé

Face à la complexité et à la haute dimensionnalité des données bioarchitecturales extraites de la digitalisation 3D, les méthodes classiques de statistique inférentielle atteignent rapidement leurs limites. Elles nécessitent des hypothèses biologiques précises sur la distribution des données, se concentrent généralement sur un petit nombre de variables à la fois, et ne permettent pas toujours de révéler les structures globales ou les motifs cachés présents dans les données.

L'enjeu est maintenant d'exploiter pleinement le potentiel de ces représentations numériques, issues de la digitalisation 3D, pour révéler des patterns organisationnels, identifier des variables discriminantes et explorer la diversité morphologique des tissus tumoraux. Cette étape d'analyse constitue un maillon essentiel de notre étude : elle permet non seulement d'interpréter finement les structures segmentées, mais aussi d'orienter l'identification de phénotypes cellulaires spécifiques ou de régions tissulaires atypiques. Dans ce contexte, l'apprentissage non supervisé s'impose comme une alternative pertinente. Il regroupe un ensemble de techniques statistiques et algorithmiques permettant d'analyser, structurer et visualiser les données sans connaissance *a priori* des classes ou regroupements attendus. Ces méthodes sont particulièrement adaptées à la fouille de données complexes en grande dimension, comme les 35 paramètres bioarchitecturaux extraits de la digitalisation 3D des tissus biologiques.

Cette section s'attache à présenter plusieurs approches modernes d'exploration non supervisée adaptées aux données bioarchitecturales en grande dimension. Deux études de cas viennent illustrer concrètement leur apport. La première explore les redondances et complémentarités entre les différents paramètres bioarchitecturaux. La seconde s'intéresse à l'identification des paramètres les plus discriminants pour distinguer automatiquement deux types cellulaires présents au sein d'un même échantillon. Ces analyses démontrent qu'une quantification rigoureuse, associée à une ex-

ploration algorithmique pertinente, ouvre des perspectives prometteuses pour l'interprétation fine de l'organisation interne des tissus tumoraux. Elles constituent ainsi les premiers jalons d'une fouille de données en grande dimension, s'appuyant sur des représentations numériques à la fois fidèles et interprétables.

5.3.1 Aperçu des approches non supervisées pour l'exploration de données en grande dimension

La digitalisation 3D des tissus biologiques offre un accès inédit à des données bioarchitecturales riches et de grande dimension, où chaque structure biologique est décrite par plusieurs dizaines de paramètres. L'enjeu devient alors d'extraire l'information pertinente à partir de ces représentations complexes : comprendre les relations entre les paramètres, identifier les paramètres les plus discriminants, ou encore regrouper automatiquement des structures selon des similarités morphologiques ou spatiales. Cette section propose un aperçu des méthodes non supervisées pour l'exploration de données en grande dimension, dans le but d'une analyse plus exhaustive, automatisée et structurée des paramètres bioarchitecturaux décrivant l'organisation cellulaire et tissulaire.

Visualisation des corrélations en grande dimension

Dans le cadre de l'analyse de données en grande dimension, l'étude individuelle des corrélations entre paires de variables, bien que fondamentale, ne suffit pas à offrir une compréhension globale des relations complexes qui peuvent exister entre les multiples paramètres mesurés. En effet, comme illustré partiellement dans la Figure 5.2, une analyse bivariée isolée ne permet pas de mettre en évidence les réseaux d'interdépendances, ni de hiérarchiser l'importance relative des liens entre paramètres.

Pour pallier cette limitation, les coefficients de corrélations de Pearson ou de Spearman [128, 156] sont souvent représentés sous la forme de matrices de corrélation ou de cartes de chaleur colorées, qui synthétisent visuellement l'ensemble des relations bivariées entre les variables. Cette représentation facilite l'identification rapide de groupes de paramètres fortement corrélés, formant ainsi des groupes de variables potentiellement redondantes ou exprimant des phénomènes biologiques similaires. De telles visualisations constituent un outil essentiel pour orienter la sélection de paramètres dans les étapes ultérieures d'analyse, en évitant notamment la prise en compte simultanée de variables redondantes qui pourraient biaiser les modèles probabilistes.

Au-delà de la simple visualisation, l'analyse des corrélations permet aussi d'explorer la structure intrinsèque des données, contribuant à mieux comprendre les mécanismes biologiques sous-jacents à l'organisation tissulaire et à formuler des hypothèses plus précises. Ce travail préparatoire s'avère indispensable avant d'engager des méthodes plus complexes d'exploration multivariée non supervisée, qui tireront parti d'une sélection optimisée des paramètres d'entrée.

Identification des paramètres les plus discriminants

Pour évaluer l'importance relative des variables dans un cadre multivarié, les forêts aléatoires constituent une approche robuste, interprétable et particulièrement adaptée aux données complexes et bruitées [69]. Elles reposent sur un ensemble d'arbres de décision construits à partir de sous-échantillons de données et en sélectionnant aléatoirement un sous-ensemble de variables à chaque nœud de décision. Cette diversité introduite dans la construction des arbres permet de limiter le sur-apprentissage tout en capturant des interactions non linéaires entre les variables.

Une forêt aléatoire permet non seulement de classifier des structures à partir d'annotations supervisées, mais offre également un cadre robuste pour évaluer l'importance relative des variables utilisées. Deux métriques principales sont couramment employées à cette fin. La première, appelée importance Gini (ou réduction moyenne de l'impureté), mesure la contribution d'une variable à la construction d'arbres de décision. Plus précisément, elle quantifie la capacité d'un paramètre à réduire l'impureté des nœuds – c'est-à-dire à rendre les sous-groupes plus homogènes – au fil des divisions successives opérées dans l'ensemble des arbres. La seconde, dite importance par permutation, repose sur un principe intuitif mais puissant : elle consiste à perturber aléatoirement les valeurs d'une variable donnée dans l'ensemble de test, puis à mesurer la dégradation des performances du modèle induite par cette perturbation. Une chute importante de performance indique que la variable joue un rôle clé dans la qualité des prédictions.

Ces deux métriques permettent ainsi de hiérarchiser les variables selon leur contribution effective à la classification. Dans le contexte de l'analyse bioarchitecturale, cela peut révéler que certains paramètres de forme, de texture ou de distance sont plus informatifs que d'autres, et guider ainsi les interprétations biologiques ou le développement de modèles explicatifs.

Regroupement des observations en sous-populations homogènes

En l'absence d'annotations explicites, les méthodes de *clustering* non supervisées offrent une voie pertinente pour explorer la structure sous-jacente des données. Elles permettent de regrouper automatiquement les observations en sous-populations homogènes, révélant ainsi des patterns récurrents, sans connaissance *a priori* [44, 139].

Parmi les méthodes classiques, l'algorithme *K-means* [160] vise à partitionner les données en un nombre fixé de groupes, de manière à minimiser la variance intra-cluster. Bien qu'efficace, cette approche repose sur des hypothèses fortes – sphéricité et de taille comparable des groupes –, ce qui peut limiter son applicabilité dans des contextes hétérogènes. À l'inverse, le *clustering* hiérarchique agglomératif [167] propose une construction progressive de groupes emboîtés, représentée sous forme de dendrogramme, permettant d'examiner les niveaux de similarité entre observations et d'ajuster dynamiquement le seuil de séparation. Cette méthode présente l'avantage de ne pas exiger la fixation du nombre de groupes à l'avance.

Pour des structures plus complexes et potentiellement bruitées, l'approche DBSCAN (*Density-Based Spatial Clustering of Applications with Noise*) [48, 150] repose sur la densité locale de points pour identifier des régions cohérentes dans l'espace des paramètres. Cette méthode permet de détecter des *clusters* de forme arbitraire, tout

en identifiant explicitement les points isolés comme du bruit. Elle s'affranchit également de la contrainte de spécifier le nombre de *clusters*, en se fondant uniquement sur un rayon de voisinage et un seuil minimal de densité. Enfin, des techniques telles que t-SNE (*t-distributed Stochastic Neighbor Embedding*), UMAP (*Uniform Manifold Approximation and Projection*) [114] ou PCA (*Principal Component Axis*) [72] peuvent être mobilisées pour réduire la dimension des données tout en conservant leur structure locale, facilitant ainsi la visualisation des groupes et leur interprétation.

En somme, l'ensemble de ces approches non supervisées constituent un outil essentiel pour explorer la diversité des architectures tissulaires, détecter des groupements atypiques, et initier des hypothèses biologiques à partir de l'organisation spatiale des structures segmentées. Dans le cadre de cette thèse, elles s'inscrivent comme une étape clé vers une analyse plus systématique, automatisée et interprétable des tissus biologiques numérisés à l'échelle cellulaire et subcellulaire.

5.3.2 Exploration non supervisée pour révéler l'organisation interne des tissus tumoraux d'hépatoblastome

Maintenant que nous avons présenté un aperçu des méthodes d'apprentissage non supervisé conçues pour visualiser, explorer et structurer des données en grande dimension, nous illustrons le potentiel de ces approches à travers deux applications concrètes.

La première consiste en l'analyse de la matrice de corrélation entre les paramètres bioarchitecturaux, afin d'évaluer leur redondance et leur complémentarité, et de dégager des groupes de variables renseignant des aspects similaires ou indépendants de l'architecture tissulaire. Cette étape est essentielle pour mieux comprendre la structure interne des données et pour guider, le cas échéant, une réduction de dimension pertinente. La seconde approche repose sur l'utilisation de forêts aléatoires, un algorithme d'apprentissage supervisé, classiquement employé pour des tâches de classification ou de régression. Dans notre contexte, ces forêts ne sont pas utilisées pour produire un classifieur opérationnel, mais comme outil exploratoire visant à évaluer l'importance relative des paramètres bioarchitecturaux. L'objectif est d'identifier, au sein d'un même échantillon, les paramètres les plus discriminants entre deux types cellulaires. Cette démarche, bien qu'encadrée par une annotation, relève d'une logique non supervisée au sens où elle n'est guidée par aucune hypothèse biologique initiale sur les paramètres pertinents. Elle permet ainsi de faire émerger, à partir des données elles-mêmes, des descripteurs potentiellement caractéristiques de certaines identités cellulaires ou architectures tissulaires spécifiques.

Ces deux exemples posent les bases d'une lecture plus fine et plus systématique de l'organisation tissulaire, illustrant le potentiel des outils modernes de fouille de données en grande dimension. Ces premiers jalons visent à tirer pleinement parti de la richesse des données générées par la digitalisation 3D des tissus, en dépassant les analyses ciblées pour explorer la complexité morphologique et topologique des structures biologiques. Cette démarche ouvre la voie à une interprétation plus globale et intégrée des tissus tumoraux, permettant notamment d'identifier des signatures bioarchitecturales caractéristiques, susceptibles de refléter des états cellulaires, des

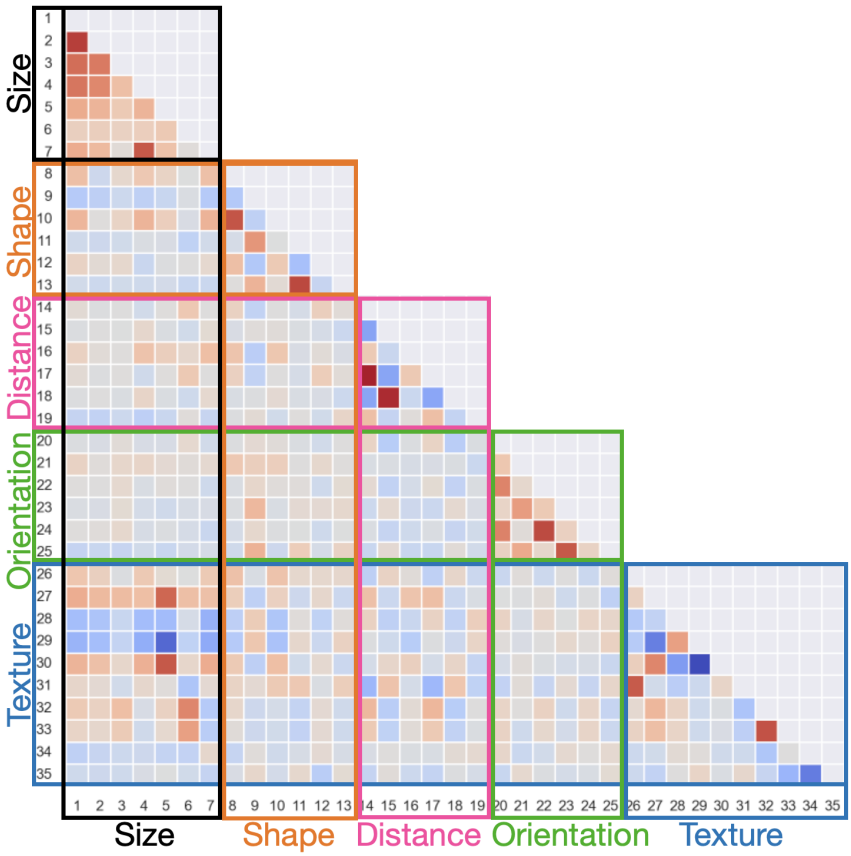


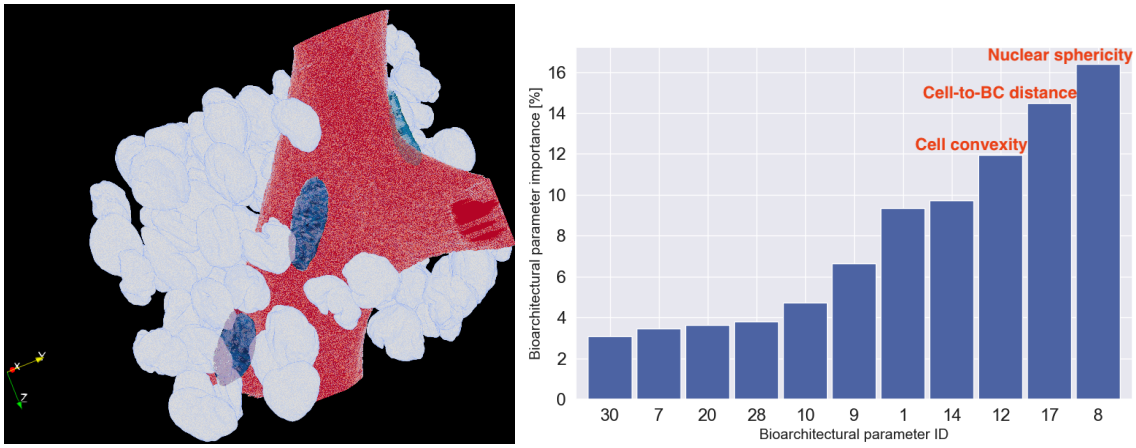
Figure 5.7 – Matrice de corrélation illustrant la pertinence et les relations monotones entre les paramètres bioarchitecturaux définis dans la section 5.1.2. Les corrélations positives et négatives sont représentées en rouge et en bleu, respectivement.

mécanismes pathologiques, des critères cliniques ou des contextes microenvironnementaux spécifiques.

Relations et complémentarité entre les paramètres bioarchitecturaux

Afin d'évaluer la redondance et la complémentarité des paramètres bioarchitecturaux définis précédemment, nous avons analysé les corrélations monotones entre tous les couples de paramètres, aussi bien à l'intérieur de chaque catégorie qu'entre les différentes catégories. L'objectif est d'identifier les paramètres fournissant des informations distinctes sur l'architecture tissulaire, ainsi que ceux potentiellement redondants. Pour cela, nous avons calculé une matrice de corrélation en utilisant le coefficient de Spearman [156], offrant une vue d'ensemble des dépendances monotones entre les 35 paramètres.

La Figure 5.7 présente une synthèse complète des corrélations observées. Dans l'ensemble, les corrélations inter-catégories sont faibles, ce qui indique que chaque famille de paramètres capture des dimensions différentes de l'organisation tissulaire. Une exception notable concerne les corrélations observées entre les paramètres de texture et ceux de taille, en particulier dans le quadrant inférieur gauche de la matrice (intersection du rectangle bleu et du rectangle noir). Cette forte corrélation



(a) (b)

Figure 5.8 – (a) Visualisation 3D de la disposition spatiale des noyaux de cellules tumorales (en blanc), des cellules endothéliales (en bleu) et du capillaire sanguin (en rouge). Les cellules endothéliales sont positionnées le long de la paroi vasculaire de part leur rôle fonctionnel et présentent une morphologie particulièrement allongée. (b) Importance relative des paramètres bioarchitecturaux pour la détection automatique des cellules endothéliales à l'aide d'une forêt aléatoire [69]. La définition de chaque paramètre est fournie dans la section 5.1.2.

s'explique principalement par l'influence des gouttelettes lipidiques sur les intensités des niveaux de gris mesurées dans les cellules et noyaux : ces structures lipidiques étant particulièrement sombres dans les images acquises par SBF-SEM, elles affectent fortement l'histogramme des intensités et, par conséquent, les paramètres de texture.

Cette analyse met en évidence la pertinence, ainsi que la complémentarité, de l'ensemble des paramètres bioarchitecturaux proposés dans la section 5.1.2. Les cinq grandes familles définies apparaissent comme non redondantes, chacune apportant une information spécifique sur l'organisation morphologique et spatiale des tissus biologiques. Cela valide leur utilisation conjointe dans les analyses multivariées menées dans la suite du chapitre, ainsi que dans les travaux futurs.

Identification des paramètres bioarchitecturaux clés

Dans cette seconde illustration, nous avons cherché à identifier les paramètres bioarchitecturaux caractéristiques de deux types cellulaires présents au sein d'un même échantillon : les cellules tumorales et les cellules endothéliales (cellules saines appartenant à la couche la plus interne des capillaires sanguins).

Comme le montre la visualisation 3D (Figure 5.8a), les noyaux des cellules endothéliales (en bleu) sont non seulement localisés à proximité immédiate des capillaires – ce qui est attendu au vu de leur rôle fonctionnel –, mais présentent également une forme nettement allongée, en contraste avec les noyaux plus sphériques des cellules tumorales (en blanc).

Afin de confirmer cette distinction morphologique, nous avons entraîné un classifieur de type forêt aléatoire à partir d'un jeu de données annotées manuellement, comprenant des cellules identifiées comme tumorales ou endothéliales [69]. L'analyse

de l'importance des variables selon l'indice de Gini, agrégé sur l'ensemble des arbres de décision, permet d'identifier les paramètres les plus discriminants pour distinguer ces deux populations. Les résultats, présentés dans la Figure 5.8b, mettent en évidence la sphéricité nucléaire (paramètre ID 8), la convexité cellulaire (paramètre ID 12), ainsi que la distance entre la cellule et le capillaire sanguin (paramètre ID 17) et entre le noyau et le capillaire (paramètre ID 14) comme étant les critères les plus discriminants.

Ces observations sont cohérentes avec la biologie des cellules endothéliales, qui forment la paroi interne des capillaires et présentent une morphologie fusiforme, en adéquation avec leur rôle structurel et fonctionnel. Cette approche exploratoire, bien qu'appuyée sur une méthode supervisée, permet de mettre en lumière des signatures morphologiques distinctives sans nécessiter d'*a priori* explicite, et offre un cadre robuste pour l'étude des phénotypes cellulaires au sein de microenvironnements tissulaires complexes.

L'ensemble de ces résultats souligne que l'analyse bioarchitecturale, fondée sur une quantification rigoureuse et une exploration intelligente des données, constitue un levier puissant pour l'interprétation fine de l'organisation tissulaire en contexte tumoral. Ces premières investigations posent les bases d'une approche systématique de fouille de données en grande dimension, tirant pleinement parti de représentations numériques fidèles, riches et interprétables. Cette perspective, encore embryonnaire dans ce manuscrit, fera l'objet de développements approfondis dans le cadre de travaux futurs.

Conclusion du chapitre

Dans ce chapitre, nous avons posé les bases d'une analyse bioarchitecturale systématique et automatisée des tissus biologiques en 3D, en exploitant les données issues de la digitalisation 3D des structures cellulaires et subcellulaires. Nous avons tout d'abord défini un ensemble rigoureux de 35 paramètres bioarchitecturaux, répartis en cinq grandes catégories (taille, forme, distance, orientation, texture), chacun ancré dans une signification biologique claire. Cette formalisation constitue, à notre connaissance, la première tentative structurée de quantification multidimensionnelle de l'organisation tissulaire à cette échelle.

Une phase exploratoire préliminaire a ensuite été menée à l'aide des outils classiques de la statistique inférentielle, couramment mobilisés pour l'analyse bioarchitecturale. Ces premières analyses ont permis d'affiner des hypothèses biologiques pertinentes, suscitant des discussions enrichissantes au sein de notre consortium. Elles ont également mis en évidence les limites de ces approches, et souligné la nécessité de recourir à des outils plus puissants pour exploiter la complexité et la richesse des données générées.

Dans cette perspective, nous avons expérimenté différentes méthodes d'apprentissage non supervisé adaptées à la fouille de données en grande dimension. À travers deux illustrations complémentaires, nous avons montré que ces méthodes permettent non seulement d'explorer les interdépendances et les complémentarités entre des paramètres bioarchitecturaux, mais aussi d'identifier les paramètres les plus discrimi-

nants pour distinguer deux sous-populations cellulaires au sein d'un même tissu.

Nous sommes bien conscients que ces premiers travaux exploratoires ne constituent qu'un point de départ, ouvrant la voie vers un vaste horizon de perspectives méthodologiques et applicatives à explorer. Le recours à des algorithmes de *clustering* non supervisé pourrait, par exemple, révéler des phénotypes cellulaires ou des organisations tissulaires émergentes sans connaissance *a priori*. L'intégration de cadres plus avancés d'inférence causale et de *causal machine learning* offre, quant à elle, une voie prometteuse pour étudier les relations entre organisation spatiale et comportements cellulaires, et tester des hypothèses mécanistes directement à partir des données.

Ainsi, l'analyse bioarchitecturale pourrait devenir un véritable levier pour décrypter les interactions entre microenvironnement tumoral, plasticité cellulaire et hétérogénéité morphologique, en passant d'une simple cartographie descriptive à l'identification de règles d'organisation potentiellement universelles dans les tissus tumoraux.

Conclusion générale et perspectives

Conclusion générale

Cette thèse s'inscrit dans une démarche innovante visant à concevoir, à partir d'images volumétriques acquises par SBF-SEM, un modèle numérique détaillé du tissu tumoral à l'échelle cellulaire et subcellulaire, afin de restituer avec précision la complexité architecturale des tissus tumoraux observés. À terme, ce modèle pourrait permettre de suivre l'évolution de la tumeur, de détecter d'éventuels dysfonctionnements et de simuler l'effet de traitements *in silico*, sans risque pour le patient. Compte tenu de ces ambitions, ce modèle s'inscrit pleinement dans la logique d'un jumeau numérique, c'est-à-dire une réplique numérique d'un objet ou d'un système physique réel, intégrant ses caractéristiques structurelles et fonctionnelles, pour simuler, analyser, surveiller et optimiser ses performances dans un environnement virtuel. Les travaux présentés dans cette thèse s'organisent autour de trois contributions majeures, qui marquent les premiers jalons dans la conception de ce modèle numérique du tissu tumoral. Bien que modestes au regard de l'ambition portée par le concept de jumeau numérique, ces avancées franchissent des étapes essentielles dans cette démarche multidisciplinaire, en combinant développement algorithmique, implémentation technique et validation biologique.

Notre première contribution a porté sur le développement d'une copie digitale d'échantillons du tissu tumoral ce qui nécessite une segmentation et une individualisation des structures biologiques ou d'un groupe de structures biologiques. Pour les entités à morphologie caractéristique telles que les capillaires sanguins ou les zones hémorragiques, des approches semi-automatiques ont été mises en place avec succès. Pour d'autres structures aux contours bien définis, comme les noyaux, les mitochondries ou les nucléoles, nous avons démontré la faisabilité d'une segmentation automatique de manière « *end-to-end* ». En revanche, la segmentation des cellules, rendue difficile par leur compacité et la faible visibilité de leurs membranes, constitue un véritable défi, notamment dans les tissus tumoraux denses et hétérogènes.

Notre deuxième contribution a visé à améliorer la segmentation par instance des cellules, un défi majeur dans les tissus tumoraux denses et hétérogènes. Cette étape est essentielle non seulement pour individualiser chaque cellule, mais aussi pour associer de manière unique les structures biologiques qu'elle contient, ouvrant ainsi la voie à une analyse de population à l'échelle cellulaire. Nous avons adopté une approche en deux étapes complémentaires. Dans un premier temps, nous avons conçu un opérateur de fermeture original, nommé COp-Net, capable de corriger automatiquement les discontinuités dans les contours cellulaires segmentés en 2D. Ce

module, inspiré du geste du biologiste expert corrigeant manuellement les contours, repose sur un CNN spécifiquement entraîné à détecter et combler les discontinuités de manière fiable. Il permet ainsi une individualisation plus précise des cellules dans chaque coupe 2D, tout en réduisant considérablement le besoin de corrections manuelles. Dans un second temps, nous avons exploité ces segmentations 2D corrigées pour développer une méthode entièrement automatique d'individualisation des cellules en 3D, sans nécessiter d'entraînement supplémentaire. En s'appuyant sur la sélection automatique d'un sous-ensemble de segmentations 2D fiables, notre méthode assure une propagation et une individualisation cellulaire cohérente en 3D dans le volume. L'ensemble de cette approche permet non seulement de renforcer la qualité et la robustesse des segmentations, mais constitue aussi un gain de temps significatif pour les biologistes, rendant la segmentation cellulaire à grande échelle plus accessible et reproductible.

Notre troisième contribution a consisté à poser les bases d'une analyse bioarchitecturale d'un échantillon biologique volumique d'HB ainsi segmenté. Nous avons défini un ensemble de 35 paramètres bioarchitecturaux, organisés en cinq catégories complémentaires – taille, forme, distance, orientation, texture – afin de quantifier l'organisation spatiale des tissus à l'échelle cellulaire et subcellulaire. Cette formalisation rigoureuse constitue un socle inédit pour une analyse quantitative approfondie des tissus biologiques en 3D. Une phase d'exploration préliminaire, basée sur les statistiques inférentielles, a permis d'affiner des hypothèses biologiques pertinentes et de mettre en évidence les limites de ces approches. Afin d'exploiter pleinement la richesse de ces données générées en grande dimension, nous avons mis en œuvre des approches d'exploration non supervisée, allant de l'étude des relations et complémentarité entre paramètres à l'identification des variables les plus discriminantes pour différencier des types cellulaires, ici les cellules endothéliales et tumorales. Ces analyses ont permis d'identifier les paramètres bioarchitecturaux porteurs d'information structurelle unique, tout en révélant les groupes de paramètres corrélés partageant une variance commune, ce qui nous éclaire sur leur signification biologique et leur potentiel interprétatif. Ces premiers jalons visent à ouvrir la voie vers une véritable fouille de données en grande dimension pour l'interprétation fine, systématique et automatique de l'organisation tissulaire en contexte tumoral.

En résumé, l'essentiel de notre travail s'est concentré sur la première étape, cruciale, de la conception de notre jumeau numérique du tissu tumoral : la digitalisation fine et interprétable du tissu à partir d'images 3D à très haute résolution. Cette phase s'est avérée particulièrement exigeante, en raison de nombreux défis techniques : gestion et standardisation de volumes massifs de données, segmentation précise et individualisation des structures biologiques, reproductibilité des approches proposées, etc. Ces fondations étaient toutefois indispensables pour poser les bases d'une exploration bioarchitecturale rigoureuse, notamment à travers le recours à des modèles probabilistes d'apprentissage non supervisé, en vue d'étudier les comportements cellulaires et leur organisation dans le tissu.

Au-delà des premiers résultats obtenus, ce travail ouvre de nombreuses perspectives, tant sur le plan méthodologique que biologique. Il crée un cadre pour identifier de nouveaux biomarqueurs morphologiques, affiner notre compréhension des mécanismes cellulaires et tissulaires sous-jacents, et, à plus long terme, intégrer

ces connaissances dans des modèles mécanistes à fort potentiel capables de mener des études longitudinales et de simuler des stratégies thérapeutiques personnalisées.

Perspectives

Nous avons pleinement conscience que les contributions méthodologiques de cette thèse ne constituent qu'un point de départ : elles posent les premiers jalons d'une approche d'analyse bioarchitecturale encore émergente pour l'étude des tissus tumoraux. Ce champ d'investigation n'en est qu'à ses débuts, et un vaste horizon de découvertes reste à explorer. Dans ce qui suit, nous esquissons quelques pistes concrètes de prolongement méthodologique et de perspectives biologiques encore ouvertes.

Étude des relations de causalité dans les données

Les approches non supervisées de fouille de données en grande dimension présentées dans cette thèse, bien qu'efficaces pour révéler des relations, des redondances ou des variables discriminantes, ne constituent qu'un premier pas dans l'exploration et l'exploitation de notre jumeau numérique du tissu tumoral. En effet, la richesse des données produites par la digitalisation 3D des tissus biologiques ouvre la voie à des analyses bien plus avancées, notamment par l'intégration d'approches issues du ***machine learning causal***.

Contrairement aux méthodes classiques d'apprentissage statistique, qui établissent principalement des corrélations, le *machine learning causal* vise à inférer des **relations de cause à effet** entre les variables [86, 127, 146]. Dans le cadre de l'analyse bioarchitecturale des tissus, cela permettrait par exemple de répondre à des questions biologiques telles que : « l'organisation des mitochondries influence-t-elle la convexité des noyaux ? » ou « la proximité du capillaire sanguin influence-t-elle l'orientation des cellules, leur fonctionnement ou leur réponse à la chimiothérapie ? ».

Ces méthodes s'appuient généralement sur des modèles appelés graphes causaux, où les variables sont représentées par des nœuds reliés par des flèches indiquant une direction causale potentielle. Pour construire ces graphes à partir des données, plusieurs algorithmes existent (comme PC [158], GES [27] ou NOTEARS [199]), qui examinent les dépendances statistiques entre les variables pour en inférer la structure la plus plausible. D'autres approches plus récentes, comme les *causal forests* [180] ou les modèles neuronaux causaux, utilisent l'apprentissage automatique pour estimer l'effet d'une variable sur une autre tout en prenant en compte les effets de confusion possibles [23, 143]. Certaines méthodes permettent même de simuler des scénarios contrefactuels, c'est-à-dire d'estimer ce qui se passerait si l'on modifiait une variable (par exemple : « que se passerait-il si une cellule se trouvait plus loin du capillaire ? ») [178, 177].

L'application de ces outils dans le contexte biologique reste encore exploratoire, mais leur potentiel est considérable. À plus long terme, ils pourraient permettre d'étudier le lien entre l'organisation interne des tissus et l'efficacité de certaines thérapies, jusqu'à identifier des marqueurs bioarchitecturaux précis de réponse aux

traitements. L'intégration de ces approches pour l'analyse bioarchitecturale du tissu biologique représente ainsi une perspective particulièrement riche et prometteuse.

Comparaison bioarchitecturale inter- et intra-tumorale

Une fois la digitalisation 3D réalisée pour plusieurs échantillons issus d'un ou plusieurs tissus tumoraux, une question fondamentale émerge : comment comparer de manière rigoureuse et globale l'organisation interne de ces tissus ? Autrement dit, peut-on **quantifier dans quelle mesure deux tissus partagent une architecture similaire**, ou au contraire, présentent des organisations spatiales profondément différentes ? Plutôt que de se limiter à une comparaison inter- et intra-tumorale fondée sur un unique paramètre bioarchitectural – comme amorcé dans le chapitre 5 –, il devient pertinent d'envisager une approche multivariée intégrant l'ensemble des paramètres définis. En effet, certains d'entre eux, tels que les métriques de forme ou de taille, pourraient se révéler plus discriminants ou représentatifs que d'autres pour décrire l'architecture tissulaire dans son ensemble.

Chaque volume étant associé à un ensemble de 35 paramètres bioarchitecturaux, calculés pour chacune des cellules segmentées, ces données peuvent naturellement être représentées comme une distribution de points dans un espace à 35 dimensions ($\mathbb{R}^{35}$). Plutôt que de se contenter de comparer des moyennes ou des statistiques agrégées, il devient alors plus judicieux de comparer les distributions entières de ces paramètres, afin de capturer à la fois la variabilité intra-échantillon et les différences structurelles entre tissus.

Dans ce contexte, au-delà des approches classiques d'apprentissage automatique [44, 139], l'utilisation de **distances adaptées à la comparaison de distributions** m'apparaît particulièrement prometteuse. C'est notamment le cas de la distance de Wasserstein, aussi appelée *earth mover's distance (EMD)*, issue de la théorie du transport optimal [83]. Cette distance offre une interprétation intuitive : elle mesure le coût minimal à fournir pour transformer une distribution en une autre. Plus ce coût est élevé, plus les distributions – et donc les architectures tissulaires qu'elles représentent – sont éloignées.

Sur le plan mathématique, étant données deux distributions de probabilité μ et ν dans $\mathbb{R}^d$ (ici, $d = 35$), la distance de Wasserstein d'ordre 1 se définit par :

$$W(\mu, \nu) = \inf_{\pi \in \Pi(\mu,\nu)} \int_{\mathbb{R}^d \times \mathbb{R}^d} \|x - y\|_2 \mathrm{d}\pi(x, y) \tag{5.9}$$

où $\| \cdot \|_2$ est la norme euclidienne sur $\mathbb{R}^d$ et $\Pi(\mu, \nu)$ désigne l'ensemble des mesures de probabilités sur $\mathbb{R}^d \times \mathbb{R}^d$ dont les lois marginales sont μ et ν.

En pratique, puisque les distributions considérées sont empiriques (issues de populations cellulaires discrètes), le calcul de cette distance repose sur la résolution d'un problème d'optimisation, généralement formulé sous forme de programme de transport. Plusieurs algorithmes existent pour l'estimer, dont l'approche par *linear programming*, qui est peu adaptée aux grands ensembles car de complexité $O(n^3 \log n)$, ou par l'ajout de terme de régularisation entropique [38], qui permettent une estimation rapide même en grande dimension via l'algorithme de Sinkhorn, avec une complexité réduite à $O(n^2)$ tout en conservant de bonnes propriétés de convergence.

L'utilisation de cette distance dans notre contexte permettrait de quantifier la dissimilarité bioarchitecturale entre différentes régions d'un même tissu tumoral (comparaison intra-tumorale), ou entre des tissus provenant de patients différents (comparaison inter-tumorale). Une telle approche offrirait un cadre rigoureux pour mettre en évidence les similarités et les divergences dans l'organisation spatiale des tissus, et ouvrirait la voie à des relations de corrélations ou causalités avec des données cliniques, des profils moléculaires ou des réponses aux traitements.

Perspectives biologiques et médicales

L'analyse fine et automatisée de l'organisation interne des tissus tumoraux ouvre des perspectives particulièrement prometteuses pour la biologie et la médecine, notamment en lien avec l'étude des traitements anticancéreux. La caractérisation quantitative de l'architecture cellulaire et subcellulaire d'un tissu tumoral proposée dans cette thèse ouvre la voie à l'identification de marqueurs morphologiques et organisationnels reflétant l'agressivité tumorale, la plasticité cellulaire ou encore la réponse aux traitements.

Dans un premier temps, des approches probabilistes d'exploration supervisée ou non supervisée peuvent révéler des signatures bioarchitecturales associées à différents états pathologiques ou à différentes réponses thérapeutiques. Il serait ainsi envisageable d'identifier des paramètres discriminants permettant, à partir d'une simple biopsie, d'anticiper la sensibilité d'une tumeur à un traitement donné ou d'évaluer son potentiel évolutif. En complément, les modèles mécanistes offrent une perspective particulièrement riche : en intégrant des données longitudinales de l'évolution de l'architecture tissulaire, ils permettraient de mieux comprendre les mécanismes de réorganisation cellulaire en réponse à un traitement, d'interroger les processus de résistance, et même de simuler l'effet de différentes stratégies thérapeutiques *in silico*, de façon personnalisée et sans risque pour le patient [9, 97, 108, 113].

À plus long terme, ces approches pourraient jouer un rôle déterminant dans la médecine personnalisée. En explorant les liens entre architecture tissulaire, dynamique cellulaire et réponses thérapeutiques, elles pourraient permettre d'identifier des biomarqueurs robustes, interprétables et exploitables cliniquement pour guider les décisions médicales. Ce type d'approche permettrait d'améliorer la stratification des patients, d'optimiser les protocoles de soin, et d'adapter les traitements en fonction de la morphologie et de l'organisation spatiale spécifiques des tumeurs. Loin de se limiter à une démonstration technique, ce travail pose les bases d'un cadre d'analyse original pour explorer les dynamiques du vivant à l'échelle cellulaire et subcellulaire, avec des retombées concrètes pour la recherche fondamentale, le diagnostic et les applications thérapeutiques.

Au terme de cette thèse, il me semble essentiel de prendre du recul sur la démarche suivie et sur les choix méthodologiques qui l'ont guidée. L'un des fils conducteurs de ce travail a résidé dans une volonté affirmée de partir des concepts biologiques, des contraintes expérimentales et des hypothèses formulées par les biologistes pour construire des solutions algorithmiques sur mesure, capables de les affiner, les corroborer ou de les infirmer. Ce positionnement contraste avec une approche plus classique qui consisterait à développer une méthode mathématique ou informatique

générique, puis à rechercher un ou des cas d'application biologique pertinent. Ici, l'ancrage biologique a précédé la modélisation, et non l'inverse : il a servi de socle à la formalisation des problématiques, à la conception des algorithmes et à l'interprétation des résultats.

Cette démarche a exigé un dialogue constant entre les mathématiciens, les biologistes et les microscopistes, illustrant pleinement la nature interdisciplinaire de cette thèse. Les méthodes développées n'ont pas été conçues de manière abstraite ou déconnectée, mais dans une interaction étroite avec des données réelles, des contraintes expérimentales et des objectifs scientifiques propres à la biologie. Ce lien multidisciplinaire fort s'est révélé non seulement fécond pour faire émerger des solutions innovantes, mais aussi structurant pour donner du sens aux résultats produits. À travers cette approche, le jumeau numérique encore modeste que nous avons conçu dans cette thèse devient un véritable outil d'exploration et de compréhension du vivant, au service de la recherche biologique et biomédicale, et non une simple démonstration technique.

Bibliographie

[1] M. Aharon, M. Elad et A. Bruckstein. “K-SVD : An algorithm for designing overcomplete dictionaries for sparse representation”. In : *IEEE Transactions on Signal Processing* 54.11 (2006), p. 4311-4322. 10.1109/TSP.2006.881199 (cf. p. 51).

[2] J. Ahrens, Berk Geveci et Charles Law. “ParaView : An End-User Tool for Large Data Visualization”. In : *Visualization Handbook* (jan. 2005) (cf. p. 186).

[3] Bassan J. Allan, Punam P. Parikh, Sofia Diaz, Eduardo A. Perez, Holly L. Neville et Juan E. Sola. “Predictors of survival and incidence of hepatoblastoma in the paediatric population”. In : *HPB* 15.10 (oct. 2013), p. 741-746. issn : 1365-182X. 10.1111/hpb.12112 (cf. p. 16).

[4] Shun-ichi Amari. “Backpropagation and stochastic gradient descent method”. In : *Neurocomputing* 5.4–5 (juin 1993), p. 185-196. issn : 0925-2312. 10.1016/0925-2312(93)90006-o (cf. p. 54).

[5] Luigi Ambrosio et Vincenzo Maria Tortorelli. “Approximation of functional depending on jumps by elliptic functional via t-convergence”. In : *Communications on Pure and Applied Mathematics* 43.8 (déc. 1990), p. 999-1036. issn : 1097-0312. 10.1002/cpa.3160430805 (cf. p. 51).

[6] Anwai Archit, Luca Freckmann, Sushmita Nair, Nabeel Khalid, Paul Hilt, Vikas Rajashekar, Marei Freitag, Carolin Teuber, Melanie Spitzner, Constanza Tapia Contreras, Genevieve Buckley, Sebastian von Haaren, Sagnik Gupta, Marian Grade, Matthias Wirth, Günter Schneider, Andreas Dengel, Sheraz Ahmed et Constantin Pape. “Segment Anything for Microscopy”. In : *Nature Methods* 22.3 (fév. 2025), p. 579-591. issn : 1548-7105. 10.1038/s41592-024-02580-4 (cf. p. 26, 104, 108).

[7] Utkarsh Ayachit. *The ParaView Guide : A Parallel Visualization Application*. Clifton Park, NY, USA : Kitware, Inc., 2015. isbn : 1930934300 (cf. p. 186).

[8] Connelly Barnes, Eli Shechtman, Adam Finkelstein et Dan B Goldman. “PatchMatch : a randomized correspondence algorithm for structural image editing”. In : *ACM Transactions on Graphics* 28.3 (juill. 2009), p. 1-11. issn : 1557-7368. 10.1145/1531326.1531330 (cf. p. 51).

[9] Sebastien Benzekry. "Artificial Intelligence and Mechanistic Modeling for Clinical Decision Making in Oncology". In : *Clinical Pharmacology & Therapeutics* 108.3 (août 2020), p. 471-486. issn : 1532-6535. 10.1002/cpt.1951 (cf. p. 147).

[10] Andrea Bertozzi, Selim Esedolu et Alan Gillette. "Analysis of a Two-Scale Cahn–Hilliard Model for Binary Image Inpainting". In : *Multiscale Modeling & Simulation* 6.3 (jan. 2007), p. 913-936. issn : 1540-3467. 10.1137/060660631 (cf. p. 70).

[11] Andrea L. Bertozzi, Selim Esedoglu et Alan Gillette. "Inpainting of Binary Images Using the Cahn–Hilliard Equation". In : *IEEE Transactions on Image Processing* 16.1 (jan. 2007), p. 285-291. issn : 1057-7149. 10.1109/tip.2006.887728 (cf. p. 70).

[12] Serge Beucher et Fernand Meyer. "The Morphological Approach to Segmentation : The Watershed Transformation". In : *Mathematical Morphology in Image Processing*. CRC Press, oct. 2018, p. 433-481. isbn : 9781315214610. 10.1201/9781482277234-12 (cf. p. 27, 50, 102).

[13] Satyajit Bhattacharya, Brian Davidson et Amar Dhillon. "Blood Supply of Early Hepatocellular Carcinoma". In : *Seminars in Liver Disease* 15.04 (1995), p. 390-401. issn : 1098-8971. 10.1055/s-2007-1007289 (cf. p. 20, 57, 129).

[14] Jessica Bosch et Martin Stoll. "A Fractional Inpainting Model Based on the Vector-Valued Cahn–Hilliard Equation". In : *SIAM Journal on Imaging Sciences* 8.4 (jan. 2015), p. 2352-2382. issn : 1936-4954. 10.1137/15m101405x (cf. p. 70, 71).

[15] Jérôme Boulanger, Charles Kervrann, Patrick Bouthemy, Peter Elbau, Jean-Baptiste Sibarita et Jean Salamero. "Patch-Based Nonlocal Functional for Denoising Fluorescence Microscopy Image Sequences". In : *IEEE Transactions on Medical Imaging* 29.2 (fév. 2010), p. 442-454. issn : 1558-254X. 10.1109/tmi.2009.2033991 (cf. p. 44, 51).

[16] Steven Brem. "The Role of Vascular Proliferation in the Growth of Brain Tumors". In : *Neurosurgery* 23.Supplement 1 (jan. 1976), p. 440-453. issn : 0148-396X. 10.1093/neurosurgery/23.cn_suppl_1.440 (cf. p. 20, 57, 129).

[17] A. Buades, B. Coll et J.-M. Morel. "A Non-Local Algorithm for Image Denoising". In : *2005 IEEE Computer Society Conference on Computer Vision and Pattern Recognition (CVPR'05)*. T. 2. IEEE, p. 60-65. 10.1109/cvpr.2005.38 (cf. p. 44).

[18] Benoît Cadre et Céline Vial. *Statistique mathématique, cours et exercices corrigés*. Références sciences. Ellipse, juin 2012, p. 192. https://hal.science/hal-00960342 (cf. p. 125).

[19] Xiaohao Cai, Raymond Chan et Tieyong Zeng. "A Two-Stage Image Segmentation Method Using a Convex Variant of the Mumford–Shah Model and Thresholding". In : *SIAM Journal on Imaging Sciences* 6.1 (jan. 2013), p. 368-390. issn : 1936-4954. 10.1137/120867068 (cf. p. 51).

[20] John Canny. "A Computational Approach to Edge Detection". In : *IEEE Transactions on Pattern Analysis and Machine Intelligence* PAMI-8.6 (nov. 1986), p. 679-698. issn : 0162-8828. 10.1109/tpami.1986.4767851 (cf. p. 49).

[21] T.F. Chan et L.A. Vese. "A level set algorithm for minimizing the Mumford-Shah functional in image processing". In : *Proceedings IEEE Workshop on Variational and Level Set Methods in Computer Vision*. VLSM-01. IEEE Computer Soc, p. 161-168. 10.1109/vlsm.2001.938895 (cf. p. 51).

[22] T. Chang et C.-C.J. Kuo. "Texture analysis and classification with tree-structured wavelet transform". In : *IEEE Transactions on Image Processing* 2.4 (1993), p. 429-441. issn : 1057-7149. 10.1109/83.242353 (cf. p. 121).

[23] Aditya Chattopadhyay, Piyushi Manupriya, Anirban Sarkar et Vineeth N Balasubramanian. "Neural Network Attributions : A Causal Perspective". In : *Proceedings of the 36th International Conference on Machine Learning*. Sous la dir. de Kamalika Chaudhuri et Ruslan Salakhutdinov. T. 97. Proceedings of Machine Learning Research. Long Beach, California, USA : PMLR, sept. 2019, p. 981-990. http://proceedings.mlr.press/v97/chattopadhyay19a.html (cf. p. 145).

[24] Chien-Chang Chen et Daniel C. Chen. "Multi-resolutional gabor filter in texture analysis". In : *Pattern Recognition Letters* 17.10 (sept. 1996), p. 1069-1076. issn : 0167-8655. 10.1016/0167-8655(96)00065-7 (cf. p. 121).

[25] Hao Chen, Mario Valerio Giuffrida, Peter Doerner et Sotirios A. Tsaftaris. "Root Gap Correction with a Deep Inpainting Model". In : *British Machine Vision Conference*. 2018. https://api.semanticscholar.org/CorpusID:52290914 (cf. p. 72, 89-91, 174-176).

[26] Hao Chen, Mario Valerio Giuffrida, Peter Doerner et Sotirios A. Tsaftaris. "Adversarial Large-Scale Root Gap Inpainting". In : *2019 IEEE/CVF Conference on Computer Vision and Pattern Recognition Workshops (CVPRW)*. IEEE, juin 2019, p. 2619-2628. 10.1109/cvprw.2019.00318 (cf. p. 72).

[27] David Chickering. "Optimal Structure Identification With Greedy Search." In : *Journal of Machine Learning Research* 3 (jan. 2002), p. 507-554. 10.1162/153244303321897717 (cf. p. 145).

[28] Lucy M. Collinson, Carles Bosch, Anwen Bullen, Jemima J. Burden, Raffaella Carzaniga, Cheng Cheng, Michele C. Darrow, Georgina Fletcher, Errin Johnson, Kedar Narayan, Christopher J. Peddie, Martyn Winn, Charles Wood, Ardan Patwardhan, Gerard J. Kleywegt et Paul Verkade. "Volume EM : a quiet revolution takes shape". In : *Nature*

Methods 20.6 (avr. 2023), p. 777-782. ISSN : 1548-7105. 10.1038/s41592-023-01861-8 (cf. p. 22).

[29] Genevieve COOREY, Gemma A. FIGTREE, David F. FLETCHER et Julie REDFERN. "The health digital twin : advancing precision cardiovascular medicine". In : *Nature Reviews Cardiology* 18.12 (oct. 2021), p. 803-804. ISSN : 1759-5010. 10.1038/s41569-021-00630-4 (cf. p. 25).

[30] T. F. COOTES, G. EDWARDS et C. J. TAYLOR. "A Comparative Evaluation of Active Appearance Model Algorithms". In : *Procedings of the British Machine Vision Conference 1998*. BMVC 1998. British Machine Vision Association, 1998, p. 68.1-68.10. 10.5244/c.12.68 (cf. p. 121).

[31] Nicolas CORDIER, Herve DELINGETTE et Nicholas AYACHE. "A Patch-Based Approach for the Segmentation of Pathologies : Application to Glioma Labelling". In : *IEEE Transactions on Medical Imaging* 35.4 (avr. 2016), p. 1066-1076. ISSN : 1558-254X. 10.1109/tmi.2015.2508150 (cf. p. 51).

[32] Nicolas CORDIER, Bjoern MENZE, Hervé DELINGETTE et Nicholas AYACHE. "Patch-based Segmentation of Brain Tissues". In : *Proceedings of the MICCAI Challenge on Multimodal Brain Tumor Image Segmentation (BRATS) 2013*. Sous la dir. de Bjoern MENZE, Mauricio REYES, Andras JAKAB, Elisabeth GERSTNER, Justin KIRBY et Keyvan FARAHANI. Proceedings of the MICCAI Challenge on Multimodal Brain Tumor Image Segmentation (BRATS) 2013. Nagoya, Japan : IEEE, sept. 2013, p. 6-17. https://inria.hal.science/hal-00917084 (cf. p. 51).

[33] Pierrick COUPE, Pierre YGER, Sylvain PRIMA, Pierre HELLIER, Charles KERVRANN et Christian BARILLOT. "An Optimized Blockwise Nonlocal Means Denoising Filter for 3-D Magnetic Resonance Images". In : *IEEE Transactions on Medical Imaging* 27.4 (avr. 2008), p. 425-441. ISSN : 0278-0062. 10.1109/tmi.2007.906087 (cf. p. 44).

[34] Pierrick COUPÉ, José V. MANJÓN, Vladimir FONOV, Jens PRUESSNER, Montserrat ROBLES et D. Louis COLLINS. "Patch-based segmentation using expert priors : Application to hippocampus and ventricle segmentation". In : *NeuroImage* 54.2 (jan. 2011), p. 940-954. ISSN : 1053-8119. 10.1016/j.neuroimage.2010.09.018 (cf. p. 51, 52).

[35] John CRANK et Philip NICOLSON. "A practical method for numerical evaluation of solutions of partial differential equations of the heat-conduction type". In : *Mathematical Proceedings of the Cambridge Philosophical Society* 43.1 (jan. 1947), p. 50-67. ISSN : 1469-8064. 10.1017/s0305004100023197 (cf. p. 79).

[36] Daniel CREMERS, Nir SOCHEN et Christoph SCHNÖRR. "Towards Recognition-Based Variational Segmentation Using Shape Priors and Dynamic Labeling". In : *Scale Space Methods in Computer Vision*. Sous la dir. de Lewis D. GRIFFIN et Martin LILLHOLM. Berlin, Heidelberg : Springer Berlin Heidelberg, 2003, p. 388-400. ISBN : 978-3-540-44935-5 (cf. p. 50).

[37] Ruy J. Cruz, Sarangarajan Ranganathan, George Mazariegos, Kyle Soltys, Navdeep Nayyar, Qing Sun, Geoffrey Bond, Peter H. Shaw, Kimberly Haberman, Lakshmanan Krishnamurti, J. Wallis Marsh, Abhinav Humar et Rakesh Sindhi. "Analysis of national and single-center incidence and survival after liver transplantation for hepatoblastoma : New trends and future opportunities". In : *Surgery* 153.2 (fév. 2013), p. 150-159. issn : 0039-6060. 10.1016/j.surg.2012.11.006 (cf. p. 17).

[38] Marco Cuturi. *Sinkhorn Distances : Lightspeed Computation of Optimal Transportation Distances*. 2013. 1306.0895. https://arxiv.org/abs/1306.0895 (cf. p. 146).

[39] B Denis de Senneville, C Zachiu, M Ries et C Moonen. "EVolution : an edge-based variational method for non-rigid multi-modal image registration". In : *Physics in Medicine and Biology* 61.20 (oct. 2016), p. 7377-7396. issn : 1361-6560. 10.1088/0031-9155/61/20/7377 (cf. p. 107).

[40] Baudouin Denis de Senneville, Fatma Zohra Khoubai, Marc Bevilacqua, Alexandre Labedade, Kathleen Flosseau, Christophe Chardot, Sophie Branchereau, Jean Ripoche, Stefano Cairo, Etienne Gontier et Christophe F. Grosset. "Deciphering tumour tissue organization by 3D electron microscopy and machine learning". In : *Communications Biology* 4.1 (déc. 2021). issn : 2399-3642. 10.1038/s42003-021-02919-z (cf. p. 28, 29, 34, 43, 58, 61, 73, 85, 107, 120, 128-131).

[41] Winfried Denk et Heinz Horstmann. "Serial Block-Face Scanning Electron Microscopy to Reconstruct Three-Dimensional Tissue Nanostructure". In : *PLoS Biology* 2.11 (oct. 2004). Sous la dir. de Kristen M. Harris, e329. issn : 1545-7885. 10.1371/journal.pbio.0020329 (cf. p. 22).

[42] Lee R. Dice. "Measures of the Amount of Ecologic Association Between Species". In : *Ecology* 26.3 (juill. 1945), p. 297-302. issn : 1939-9170. 10.2307/1932409 (cf. p. 105, 111, 122).

[43] David L Donoho et Iain M Johnstone. "Ideal spatial adaptation by wavelet shrinkage". In : *Biometrika* 81.3 (sept. 1994), p. 425-455. issn : 1464-3510. 10.1093/biomet/81.3.425 (cf. p. 43, 44).

[44] Harold E. Driver et Alfred L. Kroeber. "Quantitative Expression of Cultural Relationships". In : *University of California Publications in American Archaeology and Ethnology* 31.5 (1932), p. 211-256 (cf. p. 137, 146).

[45] Xaiojun Du et Tien D. Bui. "Image segmentation based on the Mumford-Shah model and its variations". In : *2008 5th IEEE International Symposium on Biomedical Imaging : From Nano to Macro*. IEEE, mai 2008, p. 109-112. 10.1109/isbi.2008.4540944 (cf. p. 51).

[46] John Duchi, Elad Hazan et Yoram Singer. "Adaptive Subgradient Methods for Online Learning and Stochastic Optimization". In : *Journal of Machine Learning Research* 12.61 (2011), p. 2121-2159. http://jmlr.org/papers/v12/duchi11a.html (cf. p. 54).

[47] Andres F. Espinoza, Roma H. Patel, Kalyani R. Patel, Andrew A. Badachhape, Richard Whitlock, Rohit K. Srivastava, Saiabhiroop R. Govindu, Ashley Duong, Abhishek Kona, Pavan Kureti, Bryan Armbruster, Dina Kats, Ramakrishnan R. Srinivasan, Lacey E. Dobrolecki, Xinjian Yu, Mohammad J. Najaf Panah, Barry Zorman, Stephen F. Sarabia, Martin Urbicain, Angela Major, Karl-Dimiter Bissig, Charles Keller, Michael T. Lewis, Andras Heczey, Pavel Sumazin, Dolores H. López-Terrada, Sarah E. Woodfield et Sanjeev A. Vasudevan. "A novel treatment strategy utilizing panobinostat for high-risk and treatment-refractory hepatoblastoma". In : *Journal of Hepatology* 80.4 (avr. 2024), p. 610-621. issn : 0168-8278. 10.1016/j.jhep.2024.01.003 (cf. p. 17).

[48] Martin Ester, Hans-Peter Kriegel, Jörg Sander et Xiaowei Xu. "A density-based algorithm for discovering clusters in large spatial databases with noise". In : *Proceedings of the Second International Conference on Knowledge Discovery and Data Mining*. KDD'96. Portland, Oregon : AAAI Press, 1996, p. 226-231 (cf. p. 137).

[49] Jincheng Feng, Georgios Polychronidis, Ulrike Heger, Giovanni Frongia, Arianeb Mehrabi et Katrin Hoffmann. "Incidence trends and survival prediction of hepatoblastoma in children : a population-based study". In : *Cancer Communications* 39.1 (oct. 2019), p. 1-9. issn : 2523-3548. 10.1186/s40880-019-0411-7 (cf. p. 16).

[50] R. A. Fisher. "XV.—The Correlation between Relatives on the Supposition of Mendelian Inheritance." In : *Transactions of the Royal Society of Edinburgh* 52.2 (1919), p. 399-433. issn : 2053-5945. 10.1017/s0080456800012163 (cf. p. 126).

[51] Judah Folkman. "The Vascularization of Tumors". In : *Scientific American* 234.5 (1976), p. 58-73. issn : 00368733, 19467087. http://www.jstor.org/stable/24950351 (cf. p. 129).

[52] Jake Forster, Wendy Harriss-Phillips, Michael Douglass et Eva Bezak. "A review of the development of tumor vasculature and its effects on the tumor microenvironment". In : *Hypoxia* Volume 5 (avr. 2017), p. 21-32. issn : 2324-1128. 10.2147/hp.s133231 (cf. p. 20, 57, 129, 130).

[53] Denis Fortun, Patrick Bouthemy et Charles Kervrann. "Optical flow modeling and computation : A survey". In : *Computer Vision and Image Understanding* 134 (mai 2015), p. 1-21. issn : 1077-3142. 10.1016/j.cviu.2015.02.008 (cf. p. 107).

[54] Gianni Franchi, Amin Fehri et Angela Yao. "Deep morphological networks". In : *Pattern Recognition* 102 (juin 2020), p. 107246. issn : 0031-3203. 10.1016/j.patcog.2020.107246 (cf. p. 72).

[55] Joachim Frank. *Electron Tomography : Three-dimensional Imaging with the Transmission Electron Microscope*. Language of science. Plenum Press, 1992. isbn : 9780306439957. https://books.google.fr/books?id=eMy4WRbeOg0C (cf. p. 25).

[56] Mary M. Galloway. "Texture analysis using gray level run lengths". In : *Computer Graphics and Image Processing* 4.2 (juin 1975), p. 172-179. issn : 0146-664X. 10.1016/s0146-664x(75)80008-6 (cf. p. 121).

[57] Lorenzo Galluzzi, Stefani Spranger, Elaine Fuchs et Alejandro López-Soto. "WNT Signaling in Cancer Immunosurveillance". In : *Trends in Cell Biology* 29.1 (jan. 2019), p. 44-65. issn : 0962-8924. 10.1016/j.tcb.2018.08.005 (cf. p. 19).

[58] Lu Gan et Grant J. Jensen. "Electron tomography of cells". In : *Quarterly Reviews of Biophysics* 45.1 (nov. 2011), p. 27-56. issn : 1469-8994. 10.1017/s0033583511000102 (cf. p. 25).

[59] Ulysse Gimenez, Adriana-T. Perles-Barbacaru, Arnaud Millet, Florence Appaix, Michele El-Atifi, Karin Pernet-Gallay, Boudewijn van der Sanden, François Berger et Hana Lahrech. "Microscopic DTI accurately identifies early glioma cell migration : correlation with multimodal imaging in a new glioma stem cell model". In : *NMR in Biomedicine* 29.11 (sept. 2016), p. 1553-1562. issn : 1099-1492. 10.1002/nbm.3608 (cf. p. 20, 129).

[60] Michael Grieves et John Vickers. "Digital Twin : Mitigating Unpredictable, Undesirable Emergent Behavior in Complex Systems". In : *Transdisciplinary Perspectives on Complex Systems*. Springer International Publishing, août 2016, p. 85-113. isbn : 9783319387567. 10.1007/978-3-319-38756-7_4 (cf. p. 25).

[61] Fidel A. Guerrero-Peña, Pedro D. Marrero Fernandez, Tsang Ing Ren, Mary Yui, Ellen Rothenberg et Alexandre Cunha. "Multiclass Weighted Loss for Instance Segmentation of Cluttered Cells". In : *2018 25th IEEE International Conference on Image Processing (ICIP)*. IEEE, oct. 2018, p. 2451-2455. 10.1109/icip.2018.8451187 (cf. p. 61).

[62] Josef Hager et Consolato M. Sergi. "Hepatoblastoma". In : *Liver Cancer*. Exon Publications, mars 2021, p. 145-164. isbn : 9780645001723. 10.36255/exonpublications.livercancer.2021.ch8 (cf. p. 17).

[63] Mingqi Han, Eric A. Bushong, Mayuko Segawa, Alexandre Tiard, Alex Wong, Morgan R. Brady, Milica Momcilovic, Dane M. Wolf, Ralph Zhang, Anton Petcherski, Matthew Madany, Shili Xu, Jason T. Lee, Masha V. Poyurovsky, Kellen Olszewski, Travis Holloway, Adrian Gomez, Maie St. John, Steven M. Dubinett, Carla M. Koehler, Orian S. Shirihai, Linsey Stiles, Aaron Lisberg, Stefano Soatto, Saman Sadeghi, Mark H. Ellisman et David B. Shackelford. "Spatial mapping of mitochondrial networks and bioenergetics in lung cancer". In : *Nature* 615.7953 (mars 2023), p. 712-719. issn : 1476-4687. 10.1038/s41586-023-05793-3 (cf. p. 20, 28, 121, 132).

[64] Robert M. Haralick, K. Shanmugam et Its'Hak Dinstein. "Textural Features for Image Classification". In : *IEEE Transactions on Systems, Man, and Cybernetics* SMC-3.6 (nov. 1973), p. 610-621. issn : 2168-2909. 10.1109/tsmc.1973.4309314 (cf. p. 121).

[65] Jia He, Yan Zhang, Wenhao Sun, Ge Yang et Fei Sun. "IsoVEM : Isotropic Reconstruction for Volume Electron Microscopy Based on Transformer". In : (nov. 2023). 10.1101/2023.11.22.567807 (cf. p. 47).

[66] Julia E. Heck, Travis J. Meyers, Christina Lombardi, Andrew S. Park, Myles Cockburn, Peggy Reynolds et Beate Ritz. "Case-control study of birth characteristics and the risk of hepatoblastoma". In : *Cancer Epidemiology* 37.4 (août 2013), p. 390-395. issn : 1877-7821. 10.1016/j.canep.2013.03.004 (cf. p. 16).

[67] Jurgen A.W. Heymann, Dan Shi, Sang Kim, Donald Bliss, Jacqueline L.S. Milne et Sriram Subramaniam. "3D Imaging of mammalian cells with ion-abrasion scanning electron microscopy". In : *Journal of Structural Biology* 166.1 (avr. 2009), p. 1-7. issn : 1047-8477. 10.1016/j.jsb.2008.11.005 (cf. p. 25).

[68] Geoffrey Hinton. *rmsprop : Divide the gradient by a running average of its recent magnitude*. 2012. https://www.cs.toronto.edu/~tijmen/csc321/slides/lecture_slides_lec6.pdf (cf. p. 54).

[69] Tin Kam Ho. "Random decision forests". In : *Proceedings of 3rd International Conference on Document Analysis and Recognition*. T. 1. ICDAR-95. IEEE Comput. Soc. Press, p. 278-282. 10.1109/icdar.1995.598994 (cf. p. 28, 137, 140).

[70] Katarzyna B. Hooks, Jérôme Audoux, Helena Fazli, Sarah Lesjean, Tony Ernault, Nathalie Dugot-Senant, Thierry Leste-Lasserre, Martin Hagedorn, Benoit Rousseau, Coralie Danet, Sophie Branchereau, Laurence Brugières, Sophie Taque, Catherine Guettier, Monique Fabre, Anne Rullier, Marie-Annick Buendia, Thérèse Commes, Christophe F. Grosset et Anne-Aurélie Raymond. "New insights into diagnosis and therapeutic options for proliferative hepatoblastoma". In : *Hepatology* 68.1 (juill. 2018), p. 89-102. issn : 0270-9139. 10.1002/hep.29672 (cf. p. 17).

[71] Berthold K.P. Horn et Brian G. Schunck. "Determining optical flow". In : *Artificial Intelligence* 17.1–3 (août 1981), p. 185-203. issn : 0004-3702. 10.1016/0004-3702(81)90024-2 (cf. p. 107).

[72] H Hotelling. "Analysis of a complex of statistical variables into principal components". In : *Journal of educational psychology* 24.6 (1933), p. 417-441. issn : 0022-0663 (cf. p. 122-124, 138).

[73] Louise Hughes, Chris Hawes, Sandy Monteith et Sue Vaughan. "Serial block face scanning electron microscopy—the future of cell ultrastructure imaging". In : *Protoplasma* 251.2 (nov. 2013), p. 395-401. issn : 1615-6102. 10.1007/s00709-013-0580-1 (cf. p. 23).

[74] Hitoshi Ikeda, Yoichi Hachitanda, Masako Tanimura, Kenichi Maruyama, Takenobu Koizumi et Yoshiaki Tsuchida. "Development of unfavorable hepatoblastoma in children of very low birth weight : Results of a surgical and pathologic review". In : *Cancer* 82.9 (mai 1998), p. 1789-1796.

ISSN : 1097-0142. 10.1002/(sici)1097-0142(19980501)82:9<1797::aid-cncr28>3.0.co;2-z (cf. p. 16).

[75] Fabian ISENSEE, Paul F. JAEGER, Simon A. A. KOHL, Jens PETERSEN et Klaus H. MAIER-HEIN. "nnU-Net : a self-configuring method for deep learning-based biomedical image segmentation". In : *Nature Methods* 18.2 (déc. 2020), p. 203-211. ISSN : 1548-7105. 10.1038/s41592-020-01008-z (cf. p. 27, 56, 57, 59, 61, 73, 94).

[76] Fabian ISENSEE, Tassilo WALD, Constantin ULRICH, Michael BAUMGARTNER, Saikat ROY, Klaus MAIER-HEIN et Paul F. JAEGER. *nnU-Net Revisited : A Call for Rigorous Validation in 3D Medical Image Segmentation*. 2024. 2404.09556 (cf. p. 27, 56, 57, 61, 73, 94).

[77] Nina JACOBSEN, Andreas DEISTUNG, Dagmar TIMMANN, Sophia L. GOERICKE, Jürgen R. REICHENBACH et Daniel GÜLLMAR. "Analysis of intensity normalization for optimal segmentation performance of a fully convolutional neural network". In : *Zeitschrift für Medizinische Physik* 29.2 (mai 2019), p. 128-138. ISSN : 0939-3889. 10.1016/j.zemedi.2018.11.004 (cf. p. 42).

[78] Nickhil JADAV, Sailakshmi VELAMOOR, Daniel HUANG, Léna CASSIN, Niki HAZELTON, Alice-Roza ERUERA, Laura N. BURGA et Mihnea BOSTINA. "Beyond the surface : Investigation of tumorsphere morphology using volume electron microscopy". In : *Journal of Structural Biology* 215.4 (déc. 2023), p. 108035. ISSN : 1047-8477. 10.1016/j.jsb.2023.108035 (cf. p. 28, 120).

[79] Xin JIANG et Shengdong NIE. "Urine Sediment Image Segmentation Based on Level Set and Mumford-Shah Model". In : *2007 1st International Conference on Bioinformatics and Biomedical Engineering*. IEEE, 2007, p. 1028-1030. 10.1109/icbbe.2007.266 (cf. p. 51).

[80] Brett E. JOHNSON, Allison L. CREASON, Jayne M. STOMMEL, Jamie M. KECK, Swapnil PARMAR, Courtney B. BETTS, Aurora BLUCHER, Christopher BONIFACE, Elmar BUCHER, Erik BURLINGAME, Todd CAMP, Koei CHIN, Jennifer ENG, Joseph ESTABROOK, Heidi S. FEILER, Michael B. HESKETT, Zhi HU, Annette KOLODZIE, Ben L. KONG, Marilyne LABRIE, Jinho LEE, Patrick LEYSHOCK, Souraya MITRI, Janice PATTERSON, Jessica L. RIESTERER, Shamilene SIVAGNANAM, Julia SOMERS, Damir SUDAR, Guillaume THIBAULT, Benjamin R. WEEDER, Christina ZHENG, Xiaolin NAN, Reid F. THOMPSON, Laura M. HEISER, Paul T. SPELLMAN, George THOMAS, Emek DEMIR, Young Hwan CHANG, Lisa M. COUSSENS, Alexander R. GUIMARAES, Christopher CORLESS, Jeremy GOECKS, Raymond BERGAN, Zahi MITRI, Gordon B. MILLS et Joe W. GRAY. "An omic and multidimensional spatial atlas from serial biopsies of an evolving metastatic breast cancer". In : *Cell Reports Medicine* 3.2 (fév. 2022), p. 100525. ISSN : 2666-3791. 10.1016/j.xcrm.2022.100525 (cf. p. 25, 28).

[81] Nicole Johnson, Matthew Krebs, Rosanne Boudreau, Gisele Giorgi, Mark LeGros et Carolyn Larabell. "Actin-filled nuclear invaginations indicate degree of cell de-differentiation". In : *Differentiation* 71.7 (sept. 2003), p. 414-424. issn : 0301-4681. 10.1046/j.1432-0436.2003.7107003.x (cf. p. 20, 132).

[82] Omar S. Al-Kadi. "A Gabor Filter Texture Analysis Approach for Histopathological Brain Tumor Subtype Discrimination". In : (2017). 10.48550/ARXIV.1704.05122 (cf. p. 121).

[83] L. V. Kantorovich. "Mathematical Methods of Organizing and Planning Production". In : *Management Science* 6.4 (juill. 1960), p. 366-422. issn : 1526-5501. 10.1287/mnsc.6.4.366 (cf. p. 146).

[84] Michael Kass, Andrew Witkin et Demetri Terzopoulos. "Snakes : Active contour models". In : *International Journal of Computer Vision* 1.4 (jan. 1988), p. 321-331. issn : 1573-1405. 10.1007/bf00133570 (cf. p. 50).

[85] Dai Keino, Tomoko Yokosuka, Ayana Hirose, Yukari Sakurai, Wataru Nakamura, Sachio Fujita, Akiko Hayashi, Naoyuki Miyagawa, Fuminori Iwasaki, Satoshi Hamanoue, Masakatsu Yanagimachi, Masae Shiomi, Shoko Goto, Norihiko Kitagawa, Mio Tanaka, Kumiko Nozawa, Yukichi Tanaka et Hiroaki Goto. "Pilot study of the combination of sorafenib and fractionated irinotecan in pediatric relapse/refractory hepatic cancer (FINEX pilot study)". In : *Pediatric Blood & Cancer* 67.11 (août 2020). issn : 1545-5017. 10.1002/pbc.28655 (cf. p. 18).

[86] David Kenny. *Correlation and Causality*. T. -1. Jan. 1979 (cf. p. 127, 145).

[87] Charles Kervrann et Jérôme Boulanger. "Unsupervised Patch-Based Image Regularization and Representation". In : *Computer Vision – ECCV 2006*. Springer Berlin Heidelberg, 2006, p. 555-567. isbn : 9783540338390. 10.1007/11744085_43 (cf. p. 51).

[88] Charles Kervrann et Alain Trubuil. "Optimal Level Curves and Global Minimizers of Cost Functionals in Image Segmentation". In : *Journal of Mathematical Imaging and Vision* 17.2 (sept. 2002), p. 153-174. issn : 1573-7683. 10.1023/a:1020685520659 (cf. p. 50).

[89] Ron Kikinis, Steve D. Pieper et Kirby G. Vosburgh. "3D Slicer : A Platform for Subject-Specific Image Analysis, Visualization, and Clinical Support". In : *Intraoperative Imaging and Image-Guided Therapy*. Springer New York, nov. 2013, p. 277-289. isbn : 9781461476573. 10.1007/978-1-4614-7657-3_19 (cf. p. 26).

[90] Diederik P. Kingma et Jimmy Ba. *Adam : A Method for Stochastic Optimization*. 2017. 1412.6980. https://arxiv.org/abs/1412.6980 (cf. p. 54).

[91] Alexander Kirillov, Eric Mintun, Nikhila Ravi, Hanzi Mao, Chloe Rolland, Laura Gustafson, Tete Xiao, Spencer Whitehead, Alexander C. Berg, Wan-Yen Lo, Piotr Dollár et Ross Girshick. *Segment Anything*. 2023. 2304.02643. https://arxiv.org/abs/2304.02643 (cf. p. 26, 104, 108).

[92] Caroline KIZILYAPRAK, York-Dieter STIERHOF et Bruno M. HUMBEL. "Volume microscopy in biology : FIB-SEM tomography". In : *Tissue and Cell* 57 (avr. 2019), p. 123-128. ISSN : 0040-8166. 10.1016/j.tice.2018.09.006 (cf. p. 25).

[93] Mathieu KOCIAK. "Introduction à la microscopie électronique". In : *École thématique de la Société Française de la Neutronique* 12 (2007), p. 61-74. ISSN : 2107-7231. 10.1051/sfn:2007006 (cf. p. 21).

[94] G. KOEPFLER, C. LOPEZ et J. M. MOREL. "A Multiscale Algorithm for Image Segmentation by Variational Method". In : *SIAM Journal on Numerical Analysis* 31.1 (fév. 1994), p. 282-299. ISSN : 1095-7170. 10.1137/0731015 (cf. p. 50).

[95] William H. KRUSKAL et W. Allen WALLIS. "Use of Ranks in One-Criterion Variance Analysis". In : *Journal of the American Statistical Association* 47.260 (déc. 1952), p. 583-621. ISSN : 1537-274X. 10.1080/01621459.1952.10483441 (cf. p. 126).

[96] Brigitte LACOUR, Aurélie GUYOT-GOUBIN, Sandra GUISSOU, Stéphanie BELLEC, Emmanuel DÉSANDES et Jacqueline CLAVEL. "Incidence of childhood cancer in France : National Children Cancer Registries, 2000–2004". In : *European Journal of Cancer Prevention* 19.3 (mai 2010), p. 173-181. ISSN : 0959-8278. 10.1097/cej.0b013e32833876c0 (cf. p. 15).

[97] Marc LAVIELLE. *Mixed effects models for the population approach : models, tasks, methods and tools*. CRC press, 2014 (cf. p. 147).

[98] Y. LECUN, L. BOTTOU, Y. BENGIO et P. HAFFNER. "Gradient-based learning applied to document recognition". In : *Proceedings of the IEEE* 86.11 (1998), p. 2278-2324. ISSN : 0018-9219. 10.1109/5.726791 (cf. p. 54).

[99] Thomas LEWINER, Hélio LOPES, Antônio Wilson VIEIRA et Geovan TAVARES. "Efficient Implementation of Marching Cubes' Cases with Topological Guarantees". In : *Journal of Graphics Tools* 8.2 (jan. 2003), p. 1-15. ISSN : 1086-7651. 10.1080/10867651.2003.10487582 (cf. p. 122).

[100] Amy M. LINABERY et Julie A. ROSS. "Trends in childhood cancer incidence in the U.S. (1992–2004)". In : *Cancer* 112.2 (déc. 2007), p. 416-432. ISSN : 1097-0142. 10.1002/cncr.23169 (cf. p. 16).

[101] Jason B. LITTEN et Gail E. TOMLINSON. "Liver Tumors in Children". In : *The Oncologist* 13.7 (juill. 2008), p. 812-820. ISSN : 1549-490X. 10.1634/theoncologist.2008-0011 (cf. p. 16).

[102] S. LIVENS, P. SCHEUNDERS, G. van de WOUWER et D. VAN DYCK. "Wavelets for texture analysis, an overview". In : *1997 Sixth International Conference on Image Processing and Its Applications*. T. 2. 1997, p. 581-585. 10.1049/cp:19970958 (cf. p. 121).

[103] Arthur Longuefosse, Baudouin Denis de Senneville, Gaël Dournes, Ilyes Benlala, Fabien Baldacci et Pascal Desbarats. "Anatomical feature-prioritized loss for enhanced MR to CT translation". In : *Physics in Medicine and Biology* 70.14 (juill. 2025), p. 145012. issn : 1361-6560. 10.1088/1361-6560/adea07 (cf. p. 107).

[104] Bradley C. Lowekamp, David T. Chen, Luis Ibanez et Daniel Blezek. "The Design of SimpleITK". In : *Frontiers in Neuroinformatics* 7 (2013). issn : 1662-5196. 10.3389/fninf.2013.00045 (cf. p. 89, 101).

[105] Lucie M Turcotte et Logan G Spector. "What do we know about the etiology of hepatoblastoma ?" In : *Hepatic Oncology* 1.1 (déc. 2013), p. 7-10. issn : 2045-0931. 10.2217/hep.13.2 (cf. p. 16).

[106] Archana Machireddy, Guillaume Thibault, Kevin G. Loftis, Kevin Stoltz, Cecilia E. Bueno, Hannah R. Smith, Jessica L. Riesterer, Joe Gray et Xubo Song. "Robust Segmentation of Cellular Ultrastructure on Sparsely Labeled 3D Electron Microscopy Images Using Deep Learning". In : *SSRN Electronic Journal* (2021). issn : 1556-5068. 10.2139/ssrn.3830021 (cf. p. 28).

[107] Archana Machireddy, Guillaume Thibault, Kevin G. Loftis, Kevin Stoltz, Cecilia E. Bueno, Hannah R. Smith, Jessica L. Riesterer, Joe W. Gray et Xubo Song. "Segmentation of cellular ultrastructures on sparsely labeled 3D electron microscopy images using deep learning". In : *Frontiers in Bioinformatics* 3 (déc. 2023). issn : 2673-7647. 10.3389/fbinf.2023.1308708 (cf. p. 28, 61, 121).

[108] Giuseppe Magazzù, Guido Zampieri et Claudio Angione. "Clinical stratification improves the diagnostic accuracy of small omics datasets within machine learning and genome-scale metabolic modelling methods". In : *Computers in Biology and Medicine* 151 (déc. 2022), p. 106244. issn : 0010-4825. 10.1016/j.compbiomed.2022.106244 (cf. p. 147).

[109] Amirreza Mahbod, Christine Polak, Katharina Feldmann, Rumsha Khan, Katharina Gelles, Georg Dorffner, Ramona Woitek, Sepideh Hatamikia et Isabella Ellinger. "NuInsSeg : A fully annotated dataset for nuclei instance segmentation in H&E-stained histological images". In : *Scientific Data* 11.1 (mars 2024). issn : 2052-4463. 10.1038/s41597-024-03117-2 (cf. p. 176, 178, 179).

[110] Lena Maier-Hein, Annika Reinke, Peter Godau, Mohammad D Tizabi, Felix Buettner, Evangelos Christodoulou, Ben Glocker, Fabian Isensee, Jens Kleesiek, Michal Kozubek, Mauricio Reyes, Martin A Riegler, Manuel Wiesenfarth, Anil E Kavur, Carole H Sudre, Michael Baumgartner, Matthias Eisenmann, Daniel Heckmann-Nötzel, Thomas Rädsch, Laura Acion, Michela Antonelli, Tal Arbel, Sotirios Bakas, Aristeidis Benis, Matthew B Blaschko, M Jorge Cardoso, Veronika Cheplygina, Beth A Cimini, Gary S Collins, Keyvan Farahani, Lluís Ferrer, Adrian Galdran, Bram van Ginneken, Rolf Haase, Daisuke A Hashimoto, Matthew M Hoffman, Menno Huisman, Pierre

Jannin, Charles E Kahn, Dagmar Kainmueller, Bernhard Kainz, Alexandros Karargyris, Alan Karthikesalingam, Felix Kofler, Annette Kopp-Schneider, Anna Kreshuk, Tahsin Kurc, Bennett A Landman, Geert Litjens, Ali Madani, Klaus Maier-Hein, Anne L Martel, Per Mattson, Erik Meijering, Bjoern Menze, Karel G M Moons, Henning Müller, Boris Nichyporuk, Felix Nickel, Jens Petersen, Nasir Rajpoot, Nicola Rieke, Julio Saez-Rodriguez, Clara I Sánchez, Sharmila Shetty, Maarten van Smeden, Ronald M Summers, Abdel Aziz Taha, Alexander Tiulpin, Sotirios A Tsaftaris, Ben Van Calster, Gaël Varoquaux et Paul F Jäger. "Metrics Reloaded : Recommendations for Image Analysis Validation". In : *Nature Methods* 21.2 (fév. 2024), p. 195-212. 10.1038/s41592-023-02151-z (cf. p. 87).

[111] Ashraf N. Malhas et David J. Vaux. "Nuclear Envelope Invaginations and Cancer". In : *Cancer Biology and the Nuclear Envelope*. Springer New York, 2014, p. 523-535. isbn : 9781489980328. 10.1007/978-1-4899-8032-8_24 (cf. p. 20, 132).

[112] Martin Maska, Vladimír Ulman, Pablo Delgado-Rodriguez, Estibaliz Gómez-de-Mariscal, Tereza Necasová, Fidel A. Guerrero Peña, Tsang Ing Ren, Elliot M. Meyerowitz, Tim Scherr, Katharina Löffler, Ralf Mikut, Tianqi Guo, Yin Wang, Jan P. Allebach, Rina Bao, Noor M. Al-Shakarji, Gani Rahmon, Imad Eddine Toubal, Kannappan Palaniappan, Filip Lux, Petr Matula, Ko Sugawara, Klas E. G. Magnusson, Layton Aho, Andrew R. Cohen, Assaf Arbelle, Tal Ben-Haim, Tammy Riklin Raviv, Fabian Isensee, Paul F. Jäger, Klaus H. Maier-Hein, Yanming Zhu, Cristina Ederra, Ainhoa Urbiola, Erik Meijering, Alexandre Cunha, Arrate Muñoz-Barrutia, Michal Kozubek et Carlos Ortiz-de-Solórzano. "The Cell Tracking Challenge : 10 years of objective benchmarking". In : *Nature Methods* 20.7 (2023), p. 1010-1020. issn : 1548-7105. 10.1038/s41592-023-01879-y (cf. p. 173).

[113] P Mazzocco, C Barthélémy, G Kaloshi, M Lavielle, D Ricard, A Idbaih, D Psimaras, M-A Renard, A Alentorn, J Honnorat, J-Y Delattre, F Ducray et B Ribba. "Prediction of Response to Temozolomide in Low-Grade Glioma Patients Based on Tumor Size Dynamics and Genetic Characteristics". In : *CPT : Pharmacometrics & Systems Pharmacology* 4.12 (oct. 2015), p. 728-737. issn : 2163-8306. 10.1002/psp4.54 (cf. p. 147).

[114] Leland McInnes, John Healy et James Melville. *UMAP : Uniform Manifold Approximation and Projection for Dimension Reduction*. 2020. 1802.03426. https://arxiv.org/abs/1802.03426 (cf. p. 138).

[115] Colleen C. McLaughlin, Mark S. Baptiste, Maria J. Schymura, Philip C. Nasca et Michael S. Zdeb. "Maternal and Infant Birth Characteristics and Hepatoblastoma". In : *American Journal of Epidemiology* 163.9 (mars 2006), p. 818-828. issn : 0002-9262. 10.1093/aje/kwj104 (cf. p. 16).

[116] William Meiniel, Jean-Christophe Olivo-Marin et Elsa D. Angelini. "Denoising of Microscopy Images : A Review of the State-of-the-Art, and a New Sparsity-Based Method". In : *IEEE Transactions on Image Processing* 27.8 (2018), p. 3842-3856. 10.1109/TIP.2018.2819821 (cf. p. 44).

[117] Rebecka L Meyers, Rudolf Maibach, Eiso Hiyama, Beate Häberle, Mark Krailo, Arun Rangaswami, Daniel C Aronson, Marcio H Malogolowkin, Giorgio Perilongo, Dietrich von Schweinitz, Marc Ansari, Dolores Lopez-Terrada, Yukichi Tanaka, Rita Alaggio, Ivo Leuschner, Tomoro Hishiki, Irene Schmid, Kenichiro Watanabe, Kenichi Yoshimura, Yurong Feng, Eugenia Rinaldi, Davide Saraceno, Marisa Derosa et Piotr Czauderna. "Risk-stratified staging in paediatric hepatoblastoma : a unified analysis from the Children's Hepatic tumors International Collaboration". In : *The Lancet Oncology* 18.1 (jan. 2017), p. 122-131. issn : 1470-2045. 10.1016/s1470-2045(16)30598-8 (cf. p. 17).

[118] Julie Mondet, Caroline Lo Presti, Simon Chevalier, Anne Bertrand, Sylvie Tondeur, Sandrine Blanchet, Anne Mc Leer, Karin Pernet-Gallay et Pascal Mossuz. "Mitochondria in human acute myeloid leukemia cell lines have ultrastructural alterations linked to deregulation of their respiratory profiles". In : *Experimental Hematology* 98 (juin 2021), 53-62.e3. issn : 0301-472X. 10.1016/j.exphem.2021.03.001 (cf. p. 20, 129, 132).

[119] David Mumford et Jayant Shah. "Optimal approximations by piecewise smooth functions and associated variational problems". In : *Communications on Pure and Applied Mathematics* 42.5 (juill. 1989), p. 577-685. issn : 1097-0312. 10.1002/cpa.3160420503 (cf. p. 50).

[120] Kamyar Nazeri, Eric Ng, Tony Joseph, Faisal Qureshi et Mehran Ebrahimi. "EdgeConnect : Structure Guided Image Inpainting using Edge Prediction". In : *2019 IEEE/CVF International Conference on Computer Vision Workshop (ICCVW)*. 2019, p. 3265-3274. 10.1109/ICCVW.2019.00408 (cf. p. 72).

[121] Stanislav Nikolov, Sam Blackwell, Alexei Zverovitch, Ruheena Mendes, Michelle Livne, Jeffrey De Fauw, Yojan Patel, Clemens Meyer, Harry Askham, Bernadino Romera-Paredes, Christopher Kelly, Alan Karthikesalingam, Carlton Chu, Dawn Carnell, Cheng Boon, Derek D'Souza, Syed Ali Moinuddin, Bethany Garie, Yasmin McQuinlan, Sarah Ireland, Kiarna Hampton, Krystle Fuller, Hugh Montgomery, Geraint Rees, Mustafa Suleyman, Trevor Back, Cían Owen Hughes, Joseph R Ledsam et Olaf Ronneberger. "Clinically Applicable Segmentation of Head and Neck Anatomy for Radiotherapy : Deep Learning Algorithm Development and Validation Study". In : *Journal of Medical Internet Research* 23.7 (juill. 2021), e26151. issn : 1438-8871. 10.2196/26151 (cf. p. 87).

[122] Keiller Nogueira, Jocelyn Chanussot, Mauro Dalla Mura et Jefersson A. Dos Santos. "An Introduction to Deep Morphological Networks". In :

IEEE Access 9 (2021), p. 114308-114324. ISSN : 2169-3536. 10.1109/access.2021.3104405 (cf. p. 72).

[123] Adaobi NWANESHIUDU, Christiane KUSCHAL, Fernanda H. SAKAMOTO, R. ROX ANDERSON, Kathryn SCHWARZENBERGER et Roger C. YOUNG. "Introduction to Confocal Microscopy". In : *Journal of Investigative Dermatology* 132.12 (déc. 2012), p. 1-5. ISSN : 0022-202X. 10.1038/jid.2012.429 (cf. p. 24).

[124] Stanley OSHER et James A SETHIAN. "Fronts propagating with curvature-dependent speed : Algorithms based on Hamilton-Jacobi formulations". In : *Journal of Computational Physics* 79.1 (nov. 1988), p. 12-49. ISSN : 0021-9991. 10.1016/0021-9991(88)90002-2 (cf. p. 106).

[125] Marius PACHITARIU et Carsen STRINGER. "Cellpose 2.0 : how to train your own model". In : *Nature Methods* 19.12 (nov. 2022), p. 1634-1641. ISSN : 1548-7105. 10.1038/s41592-022-01663-4 (cf. p. 61, 88, 174, 177).

[126] Taesung PARK, Ming-Yu LIU, Ting-Chun WANG et Jun-Yan ZHU. "Semantic Image Synthesis With Spatially-Adaptive Normalization". In : *2019 IEEE/CVF Conference on Computer Vision and Pattern Recognition (CVPR)*. IEEE, juin 2019. 10.1109/cvpr.2019.00244 (cf. p. 80).

[127] Judea PEARL. *Causality*. Cambridge university press, 2009 (cf. p. 145).

[128] Karl PEARSON. "Note on Regression and Inheritance in the Case of Two Parents". In : *Proceedings of the Royal Society of London Series I* 58 (jan. 1895), p. 240-242 (cf. p. 126, 136).

[129] Thomas POCK, Daniel CREMERS, Horst BISCHOF et Antonin CHAMBOLLE. "An algorithm for minimizing the Mumford-Shah functional". In : *2009 IEEE 12th International Conference on Computer Vision*. IEEE, sept. 2009, p. 1133-1140. 10.1109/iccv.2009.5459348 (cf. p. 51).

[130] Claire POULALHON, Stéphanie GOUJON, Fabienne MARQUANT, Laure FAURE, Sandra GUISSOU, Audrey BONAVENTURE, Emmanuel DÉSANDES, Paula RIOS, Brigitte LACOUR et Jacqueline CLAVEL. "Factors associated with 5- and 10-year survival among a recent cohort of childhood cancer survivors (France, 2000–2015)". In : *Cancer Epidemiology* 73 (août 2021), p. 101950. ISSN : 1877-7821. 10.1016/j.canep.2021.101950 (cf. p. 15).

[131] Jacquelyn M. POWERS, Martha M. PACHECO et Jonathan E. WICKISER. "Addition of Vincristine and Irinotecan to Standard Therapy in a Patient With Refractory High-risk Hepatoblastoma Achieving Long-term Relapse-free Survival". In : *Journal of Pediatric Hematology/Oncology* 41.3 (avr. 2019), e171-e173. ISSN : 1077-4114. 10.1097/mph.0000000000001171 (cf. p. 18).

[132] Chuan QIN, Shuozhong WANG et Xinpeng ZHANG. "Simultaneous inpainting for image structure and texture using anisotropic heat transfer model". In : *Multimedia Tools and Applications* 56.3 (sept. 2010), p. 469-483. ISSN : 1573-7721. 10.1007/s11042-010-0601-4 (cf. p. 70).

[133] Valeria QUARANTA, Costanza BALLARÒ et Gianluigi GIANNELLI. "Macrophages Orchestrate the Liver Tumor Microenvironment". In : *Cancers* 16.9 (mai 2024), p. 1772. ISSN : 2072-6694. 10.3390/cancers16091772 (cf. p. 20).

[134] Nikhila RAVI, Valentin GABEUR, Yuan-Ting HU, Ronghang HU, Chaitanya RYALI, Tengyu MA, Haitham KHEDR, Roman RÄDLE, Chloe ROLLAND, Laura GUSTAFSON, Eric MINTUN, Junting PAN, Kalyan Vasudev ALWALA, Nicolas CARION, Chao-Yuan WU, Ross GIRSHICK, Piotr DOLLÁR et Christoph FEICHTENHOFER. *SAM 2 : Segment Anything in Images and Videos*. 2024. 2408.00714. https://arxiv.org/abs/2408.00714 (cf. p. 26, 104, 108).

[135] Jessica L. RIESTERER, Claudia S. LÓPEZ, Erin S. STEMPINSKI, Melissa WILLIAMS, Kevin LOFTIS, Kevin STOLTZ, Guillaume THIBAULT, Christian LANICAULT, Todd WILLIAMS et Joe W. GRAY. "A workflow for visualizing human cancer biopsies using large-format electron microscopy". In : (juin 2019). 10.1101/675371 (cf. p. 25).

[136] Alexander RIGORT et Jürgen M. PLITZKO. "Cryo-focused-ion-beam applications in structural biology". In : *Archives of Biochemistry and Biophysics* 581 (sept. 2015), p. 122-130. ISSN : 0003-9861. 10.1016/j.abb.2015.02.009 (cf. p. 25).

[137] J. ROELS, J. AELTERMAN, H.Q. LUONG, S. LIPPENS, A. PIŽURICA, Y. SAEYS et W. PHILIPS. "An overview of state-of-the-art image restoration in electron microscopy". In : *Journal of Microscopy* 271.3 (juin 2018), p. 239-254. ISSN : 1365-2818. 10.1111/jmi.12716 (cf. p. 47).

[138] Joris ROELS, Frank VERNAILLEN, Anna KREMER, Amanda GONÇALVES, Jan AELTERMAN, Hiêp Q. LUONG, Bart GOOSSENS, Wilfried PHILIPS, Saskia LIPPENS et Yvan SAEYS. "An interactive ImageJ plugin for semi-automated image denoising in electron microscopy". In : *Nature Communications* 11.1 (fév. 2020). ISSN : 2041-1723. 10.1038/s41467-020-14529-0 (cf. p. 44).

[139] Lior ROKACH et Oded MAIMON. "Clustering Methods". In : *Data Mining and Knowledge Discovery Handbook*. Springer-Verlag, p. 321-352. ISBN : 0387244352. 10.1007/0-387-25465-x_15 (cf. p. 137, 146).

[140] Olaf RONNEBERGER, Philipp FISCHER et Thomas BROX. *U-Net : Convolutional Networks for Biomedical Image Segmentation*. 2015. 1505.04597. https://arxiv.org/abs/1505.04597 (cf. p. 27, 55, 56, 61).

[141] Frank ROSENBLATT. *The perceptron : A perceiving and recognizing automaton*. Report. Project PARA, Cornell Aeronautical Laboratory, jan. 1957 (cf. p. 52).

[142] Sebastian RUDER. *An overview of gradient descent optimization algorithms*. 2017. 1609.04747. https://arxiv.org/abs/1609.04747 (cf. p. 51, 54).

[143] Maria Virginia Ruiz Cuevas, Nataliya Sokolovska, Pierre-Henri Wuillemin et Jean-Daniel Zucker. "Detecting Low-Complexity Confounders from Data". In : *ICML / IJCAI / AAMAS FAIM'18 Workshop on CausalML*. Stockholm, Sweden, juill. 2018. https://hal.science/hal-01858403 (cf. p. 127, 145).

[144] David E. Rumelhart, Geoffrey E. Hinton et Ronald J. Williams. "Learning representations by back-propagating errors". In : *Nature* 323.6088 (oct. 1986), p. 533-536. issn : 1476-4687. 10.1038/323533a0 (cf. p. 54).

[145] Jacquelyn O. Russell et Satdarshan P. Monga. "Wnt/Beta-Catenin Signaling in Liver Development, Homeostasis, and Pathobiology". In : *Annual Review of Pathology : Mechanisms of Disease* 13.1 (jan. 2018), p. 351-378. issn : 1553-4014. 10.1146/annurev-pathol-020117-044010 (cf. p. 18, 19).

[146] Pedro Sanchez, Jeremy P. Voisey, Tian Xia, Hannah I. Watson, Alison Q. O'Neil et Sotirios A. Tsaftaris. "Causal machine learning for healthcare and precision medicine". In : *Royal Society Open Science* 9.8 (août 2022). issn : 2054-5703. 10.1098/rsos.220638 (cf. p. 145).

[147] Ragna Sannerud, Michaël Marie, Clément Nizak, Hege Avsnes Dale, Karin Pernet-Gallay, Franck Perez, Bruno Goud et Jaakko Saraste. "Rab1 Defines a Novel Pathway Connecting the Pre-Golgi Intermediate Compartment with the Cell Periphery". In : *Molecular Biology of the Cell* 17.4 (avr. 2006), p. 1514-1526. issn : 1939-4586. 10.1091/mbc.e05-08-0792 (cf. p. 24).

[148] Kazuma Sasaki, Satoshi Iizuka, Edgar Simo-Serra et Hiroshi Ishikawa. "Joint Gap Detection and Inpainting of Line Drawings". In : *2017 IEEE Conference on Computer Vision and Pattern Recognition (CVPR)*. IEEE, juill. 2017, p. 5768-5776. 10.1109/cvpr.2017.611 (cf. p. 72).

[149] Johannes Schindelin, Ignacio Arganda-Carreras, Erwin Frise, Verena Kaynig, Mark Longair, Tobias Pietzsch, Stephan Preibisch, Curtis Rueden, Stephan Saalfeld, Benjamin Schmid, Jean-Yves Tinevez, Daniel James White, Volker Hartenstein, Kevin Eliceiri, Pavel Tomancak et Albert Cardona. "Fiji : an open-source platform for biological-image analysis". In : *Nature Methods* 9.7 (juin 2012), p. 676-682. issn : 1548-7105. 10.1038/nmeth.2019 (cf. p. 26).

[150] Erich Schubert, Jörg Sander, Martin Ester, Hans Peter Kriegel et Xiaowei Xu. "DBSCAN Revisited, Revisited : Why and How You Should (Still) Use DBSCAN". In : *ACM Transactions on Database Systems* 42.3 (juill. 2017), p. 1-21. issn : 1557-4644. 10.1145/3068335 (cf. p. 137).

[151] Jean Serra. *Lecture Notes on Morphological Operators*. Retrieved on 2024-07-22. 2011. https://people.cmm.minesparis.psl.eu/users/serra/cours/T-34.pdf (cf. p. 68).

[152] Russell T. Shinohara, Elizabeth M. Sweeney, Jeff Goldsmith, Navid Shiee, Farrah J. Mateen, Peter A. Calabresi, Samson Jarso, Dzung L. Pham, Daniel S. Reich et Ciprian M. Crainiceanu. "Statistical normalization techniques for magnetic resonance imaging". In : *NeuroImage : Clinical* 6 (2014), p. 9-19. issn : 2213-1582. 10.1016/j.nicl.2014.08.008 (cf. p. 42).

[153] Suprosanna Shit, Johannes C. Paetzold, Anjany Sekuboyina, Ivan Ezhov, Alexander Unger, Andrey Zhylka, Josien P. W. Pluim, Ulrich Bauer et Bjoern H. Menze. "clDice - a Novel Topology-Preserving Loss Function for Tubular Structure Segmentation". In : *2021 IEEE/CVF Conference on Computer Vision and Pattern Recognition (CVPR)*. IEEE, juin 2021, p. 16555-16564. 10.1109/cvpr46437.2021.01629 (cf. p. 87).

[154] I.-M. SINTORN, L. BISCHOF, P. JACKWAY, S. HAGGARTY et M. BUCKLEY. "Gradient based intensity normalization". In : *Journal of Microscopy* 240.3 (nov. 2010), p. 249-258. issn : 1365-2818. 10.1111/j.1365-2818.2010.03415.x (cf. p. 42).

[155] T. Sørensen. *A Method of Establishing Groups of Equal Amplitude in Plant Sociology Based on Similarity of Species Content and Its Application to Analyses of the Vegetation on Danish Commons*. Biologiske skrifter. Munksgaard, 1948. https://books.google.fr/books?id=rpS8GAAACAAJ (cf. p. 105, 111, 122).

[156] C. Spearman. "The Proof and Measurement of Association between Two Things". In : *The American Journal of Psychology* 15.1 (1904), p. 72-101. issn : 00029556. http://www.jstor.org/stable/1412159 (cf. p. 127, 129, 136, 139).

[157] Daniele Spehner, Anna M. Steyer, Luca Bertinetti, Igor Orlov, Lucas Benoit, Karin Pernet-Gallay, Andreas Schertel et Patrick Schultz. "Cryo-FIB-SEM as a promising tool for localizing proteins in 3D". In : *Journal of Structural Biology* 211.1 (juill. 2020), p. 107528. issn : 1047-8477. 10.1016/j.jsb.2020.107528 (cf. p. 25, 44).

[158] Peter Spirtes, Clark Glymour et Richard Scheines. *Causation, Prediction, and Search*. Springer New York, 1993. isbn : 9781461227489. 10.1007/978-1-4612-2748-9 (cf. p. 145).

[159] Isaac Squires, Amir Dahari, Samuel J. Cooper et Steve Kench. "Artefact removal from micrographs with deep learning based inpainting". In : *Digital Discovery* 2.2 (2023), p. 316-326. issn : 2635-098X. 10.1039/d2dd00120a (cf. p. 47).

[160] Hugo Steinhaus. "Sur la division des corps matériels en parties". French. In : *Bulletin de l'Académie Polonaise des Sciences, Classe 3* 4 (1957), p. 801-804. issn : 0001-4095 (cf. p. 28, 137).

[161] W. A. Strauss. *Partial Differential Equations : An Introduction*. Wiley, 2007. isbn : 9780470054567. https://books.google.fr/books?id=m2hvDwAAQBAJ (cf. p. 78).

[162] Carsen STRINGER et Marius PACHITARIU. "Cellpose3 : one-click image restoration for improved cellular segmentation". In : (fév. 2024). 10.1101/2024.02.10.579780 (cf. p. 61, 88, 174, 177).

[163] Carsen STRINGER, Tim WANG, Michalis MICHAELOS et Marius PACHITARIU. "Cellpose : a generalist algorithm for cellular segmentation". In : *Nature Methods* 18.1 (déc. 2020), p. 100-106. ISSN : 1548-7105. 10.1038/s41592-020-01018-x (cf. p. 61, 88, 174, 177).

[164] STUDENT. "The Probable Error of a Mean". In : *Biometrika* 6.1 (1908), p. 1-25. ISSN : 00063444, 14643510. http://www.jstor.org/stable/2331554 (cf. p. 28, 125).

[165] Chengjun SUN et William G WEE. "Neighboring gray level dependence matrix for texture classification". In : *Computer Vision, Graphics, and Image Processing* 23.3 (sept. 1983), p. 341-352. ISSN : 0734-189X. 10.1016/0734-189x(83)90032-4 (cf. p. 121).

[166] András SZABÓ et Roeland M. H. MERKS. "Blood vessel tortuosity selects against evolution of aggressive tumor cells in confined tissue environments : A modeling approach". In : *PLOS Computational Biology* 13.7 (juill. 2017). Sous la dir. d'Alexander R.A. ANDERSON, e1005635. ISSN : 1553-7358. 10.1371/journal.pcbi.1005635 (cf. p. 129, 130).

[167] Gabor J. SZEKELY et Maria L. RIZZO. "Hierarchical Clustering via Joint Between-Within Distances : Extending Ward's Minimum Variance Method". In : *Journal of Classification* 22.2 (sept. 2005), p. 151-183. ISSN : 1432-1343. 10.1007/s00357-005-0012-9 (cf. p. 137).

[168] P. THEVENAZ, U.E. RUTTIMANN et M. UNSER. "A pyramid approach to subpixel registration based on intensity". In : *IEEE Transactions on Image Processing* 7.1 (1998), p. 27-41. ISSN : 1057-7149. 10.1109/83.650848 (cf. p. 47, 185).

[169] J.-P. THIRION. "Image matching as a diffusion process : an analogy with Maxwell's demons". In : *Medical Image Analysis* 2.3 (sept. 1998), p. 243-260. ISSN : 1361-8415. 10.1016/s1361-8415(98)80022-4 (cf. p. 106).

[170] Gail E. TOMLINSON et Roland KAPPLER. "Genetics and epigenetics of hepatoblastoma". In : *Pediatric Blood & Cancer* 59.5 (juill. 2012), p. 785-792. ISSN : 1545-5017. 10.1002/pbc.24213 (cf. p. 16).

[171] Dobrina TSVETKOVA et Stefka IVANOVA. "Application of Approved Cisplatin Derivatives in Combination Therapy against Different Cancer Diseases". In : *Molecules* 27.8 (avr. 2022), p. 2466. ISSN : 1420-3049. 10.3390/molecules27082466 (cf. p. 18).

[172] Nicholas J. TUSTISON et James GEE. "Run-Length Matrices For Texture Analysis". In : *The Insight Journal* (mai 2011). ISSN : 2327-770X. 10.54294/ex0itu (cf. p. 121).

[173] Vladimír Ulman, Martin Maška, Klas E G Magnusson, Olaf Ronneberger, Carsten Haubold, Nathalie Harder, Pavel Matula, Petr Matula, David Svoboda, Miroslav Radojevic, Ihor Smal, Karl Rohr, Joakim Jaldén, Helen M Blau, Oleh Dzyubachyk, Boudewijn Lelieveldt, Pengdong Xiao, Yuexiang Li, Siu-Yeung Cho, Alexandre C Dufour, Jean-Christophe Olivo-Marin, Constantino C Reyes-Aldasoro, Jose A Solis-Lemus, Robert Bensch, Thomas Brox, Johannes Stegmaier, Ralf Mikut, Steffen Wolf, Fred A Hamprecht, Tiago Esteves, Pedro Quelhas, Ömer Demirel, Lars Malmström, Florian Jug, Pavel Tomancak, Erik Meijering, Arrate Muñoz-Barrutia, Michal Kozubek et Carlos Ortiz-de-Solorzano. "An objective comparison of cell-tracking algorithms". In : *Nature Methods* 14.12 (oct. 2017), p. 1141-1152. issn : 1548-7105. 10.1038/nmeth.4473 (cf. p. 173).

[174] Alexandre Vallée. "Digital twin for healthcare systems". In : *Frontiers in Digital Health* 5 (sept. 2023). issn : 2673-253X. 10.3389/fdgth.2023.1253050 (cf. p. 25).

[175] Vinorth Varatharasan, Hyo-Sang Shin, Antonios Tsourdos et Nick Colosimo. "Improving Learning Effectiveness For Object Detection and Classification in Cluttered Backgrounds". In : *2019 Workshop on Research, Education and Development of Unmanned Aerial Systems (RED UAS)*. IEEE, nov. 2019, p. 78-85. 10.1109/reduas47371.2019.8999695 (cf. p. 49).

[176] Ashish Vaswani, Noam Shazeer, Niki Parmar, Jakob Uszkoreit, Llion Jones, Aidan N. Gomez, Lukasz Kaiser et Illia Polosukhin. *Attention Is All You Need*. 2023. 1706.03762. https://arxiv.org/abs/1706.03762 (cf. p. 27, 57).

[177] Sahil Verma, John Dickerson et Keegan Hines. *Counterfactual Explanations for Machine Learning : Challenges Revisited*. 2021. 2106.07756. https://arxiv.org/abs/2106.07756 (cf. p. 145).

[178] Sandra Wachter, Brent Mittelstadt et Chris Russell. "Counterfactual Explanations Without Opening the Black Box : Automated Decisions and the GDPR". In : *SSRN Electronic Journal* (2017). issn : 1556-5068. 10.2139/ssrn.3063289 (cf. p. 145).

[179] Hakon Wadell. "Volume, Shape, and Roundness of Quartz Particles". In : *The Journal of Geology* 43.3 (avr. 1935), p. 250-280. issn : 1537-5269. 10.1086/624298 (cf. p. 120).

[180] Stefan Wager et Susan Athey. "Estimation and Inference of Heterogeneous Treatment Effects using Random Forests". In : *Journal of the American Statistical Association* 113.523 (juin 2018), p. 1228-1242. issn : 1537-274X. 10.1080/01621459.2017.1319839 (cf. p. 145).

[181] Stéfan van der Walt, Johannes L. Schönberger, Juan Nunez-Iglesias, François Boulogne, Joshua D. Warner, Neil Yager, Emmanuelle Gouillart et Tony Yu. "scikit-image : image processing in Python". In : *PeerJ* 2 (juin 2014), e453. issn : 2167-8359. 10.7717/peerj.453 (cf. p. 122).

[182] Donglai Wei, Zudi Lin, Daniel Franco-Barranco, Nils Wendt, Xingyu Liu, Wenjie Yin, Xin Huang, Aarush Gupta, Won-Dong Jang, Xueying Wang, Ignacio Arganda-Carreras, Jeff W. Lichtman et Hanspeter Pfister. "MitoEM Dataset : Large-Scale 3D Mitochondria Instance Segmentation from EM Images". In : *Medical Image Computing and Computer Assisted Intervention – MICCAI 2020*. Springer International Publishing, 2020, p. 66-76. isbn : 9783030597221. 10.1007/978-3-030-59722-1_7 (cf. p. 28).

[183] Marijke Welvaert et Yves Rosseel. "On the Definition of Signal-To-Noise Ratio and Contrast-To-Noise Ratio for fMRI Data". In : *PLoS ONE* 8.11 (nov. 2013). Sous la dir. d'Essa Yacoub, e77089. issn : 1932-6203. 10.1371/journal.pone.0077089 (cf. p. 43).

[184] Chentao Wen, Mami Matsumoto, Masato Sawada, Kazunobu Sawamoto et Koutarou D. Kimura. "Seg2Link : an efficient and versatile solution for semi-automatic cell segmentation in 3D image stacks". In : *Scientific Reports* 13.1 (mai 2023). issn : 2045-2322. 10.1038/s41598-023-34232-6 (cf. p. 26).

[185] Paul J. Werbos. "Generalization of backpropagation with application to a recurrent gas market model". In : *Neural Networks* 1.4 (jan. 1988), p. 339-356. issn : 0893-6080. 10.1016/0893-6080(88)90007-x (cf. p. 54).

[186] T L Whiteside. "The tumor microenvironment and its role in promoting tumor growth". In : *Oncogene* 27.45 (oct. 2008), p. 5904-5912. issn : 1476-5594. 10.1038/onc.2008.271 (cf. p. 20).

[187] Theresa L. Whiteside. "The Role of Immune Cells in the Tumor Microenvironment". In : *The Link Between Inflammation and Cancer*. Springer US, 2006, p. 103-124. isbn : 9780387262833. 10.1007/0-387-26283-0_5 (cf. p. 20).

[188] Frank Wilcoxon. "Individual Comparisons by Ranking Methods". In : *Biometrics Bulletin* 1.6 (1945), p. 80-83. issn : 00994987. http://www.jstor.org/stable/3001968 (cf. p. 91, 113, 125, 130, 132).

[189] Bryan M Williams, Jack A Spencer, Ke Chen, Yalin Zheng et Simon Harding. "An effective variational model for simultaneous reconstruction and segmentation of blurred images". In : *Journal of Algorithms & Computational Technology* 10.4 (nov. 2016), p. 244-264. issn : 1748-3026. 10.1177/1748301816660406 (cf. p. 50).

[190] Steffen Wolf, Fred A. Hamprecht et Jan Funke. "Inpainting Networks Learn to Separate Cells in Microscopy Images". In : *British Machine Vision Conference*. 2020. https://api.semanticscholar.org/CorpusID:221668904 (cf. p. 72).

[191] Chengyue Wu, Guillermo Lorenzo, David A. Hormuth, Ernesto A. B. F. Lima, Kalina P. Slavkova, Julie C. DiCarlo, John Virostko, Caleb M. Phillips, Debra Patt, Caroline Chung et Thomas E. Yankeelov. "Integrating mechanism-based modeling with biomedical imaging to build practical digital twins for clinical oncology". In : *Biophysics Reviews* 3.2 (mai 2022). issn : 2688-4089. 10.1063/5.0086789 (cf. p. 25).

[192] Adeline Yang, Rebecca Sisson, Anita Gupta, Greg Tiao et James I. Geller. "Germline APC mutations in hepatoblastoma". In : *Pediatric Blood & Cancer* 65.4 (déc. 2017). issn : 1545-5017. 10.1002/pbc.26892 (cf. p. 16).

[193] Paul A. Yushkevich, Joseph Piven, Heather Cody Hazlett, Rachel Gimpel Smith, Sean Ho, James C. Gee et Guido Gerig. "User-Guided 3D Active Contour Segmentation of Anatomical Structures : Significantly Improved Efficiency and Reliability". In : *Neuroimage* 31.3 (2006), p. 1116-1128 (cf. p. 26, 186).

[194] C Zachiu, N Papadakis, M Ries, C Moonen et B Denis de Senneville. "An improved optical flow tracking technique for real-time MR-guided beam therapies in moving organs". In : *Physics in Medicine and Biology* 60.23 (nov. 2015), p. 9003-9029. issn : 1361-6560. 10.1088/0031-9155/60/23/9003 (cf. p. 26, 107).

[195] Muhammad Asyaari Zakaria, Nor Fadilah Rajab, Eng Wee Chua, Gayathri Thevi Selvarajah et Siti Fathiah Masre. "The Roles of Tissue Rigidity and Its Underlying Mechanisms in Promoting Tumor Growth". In : *Cancer Investigation* 38.8–9 (sept. 2020), p. 445-462. issn : 1532-4192. 10.1080/07357907.2020.1802474 (cf. p. 130).

[196] Fan Zhang, Huiying Liu, Chuanshuo Cao, Qing Cai et David Zhang. "RVLSM : Robust variational level set method for image segmentation with intensity inhomogeneity and high noise". In : *Information Sciences* 596 (juin 2022), p. 439-459. issn : 0020-0255. 10.1016/j.ins.2022.03.035 (cf. p. 50).

[197] Xiaobo Zhang, Donghai Zhai, Tianrui Li, Yuxin Zhou et Yang Lin. "Image inpainting based on deep learning : A review". In : *Information Fusion* 90 (fév. 2023), p. 74-94. issn : 1566-2535. 10.1016/j.inffus.2022.08.033 (cf. p. 72).

[198] Yi Zhang, Antonio Solinas, Stefano Cairo, Matthias Evert, Xin Chen et Diego F. Calvisi. "Molecular Mechanisms of Hepatoblastoma". In : *Seminars in Liver Disease* 41.01 (jan. 2021), p. 028-041. issn : 1098-8971. 10.1055/s-0040-1722645 (cf. p. 18).

[199] Xun Zheng, Bryon Aragam, Pradeep K Ravikumar et Eric P Xing. "DAGs with NO TEARS : Continuous Optimization for Structure Learning". In : *Advances in Neural Information Processing Systems*. Sous la dir. de S. Bengio, H. Wallach, H. Larochelle, K. Grauman, N. Cesa-Bianchi et R. Garnett. T. 31. Curran Associates, Inc., 2018. https://proceedings.neurips.cc/paper_files/paper/2018/file/e347c51419ffb23ca3fd5050202f9c3d-Paper.pdf (cf. p. 145).

[200] Zheng ZHONG et David M. VIRSHUP. "Wnt Signaling and Drug Resistance in Cancer". In : *Molecular Pharmacology* 97.2 (fév. 2020), p. 72-89. ISSN : 0026-895X. 10.1124/mol.119.117978 (cf. p. 19).

[201] Arthur ZIMMERMANN. "Nucleus, Nuclear Structure, and Nuclear Functional Changes in Liver Cancer". In : *Tumors and Tumor-Like Lesions of the Hepatobiliary Tract*. Springer International Publishing, oct. 2016, p. 3043-3069. ISBN : 9783319269566. 10.1007/978-3-319-26956-6_169 (cf. p. 20, 132).

Annexe A

Deux cas d'études supplémentaires pour la validation de l'opérateur de fermeture (COp-Net)

Dans cette annexe, nous présentons deux cas d'études supplémentaires visant à évaluer les performances et la robustesse de l'opérateur de fermeture (COp-Net) développé dans le chapitre 3 de cette thèse. L'objectif de ces analyses supplémentaires est de démontrer la reproductibilité et la généralisabilité de l'approche proposée dans des contextes applicatifs variés, en s'appuyant sur des jeux de données accessibles publiquement.

Le premier cas d'étude concerne l'application du COp-Net dans le cadre du suivi cellulaire sur des séquences temporelles acquises en 2D, communément désigné sous le terme de *cell tracking*. Le second cas d'étude explore l'utilisation de notre méthode pour la segmentation par instance des noyaux dans des images d'histopathologie en couleurs, un domaine à fort enjeu pour l'analyse automatisée de coupes tissulaires.

A.1 Suivi temporel des cellules sur lame 2D

Dans ce cas d'étude, nous avons évalué les performances de l'opérateur de fermeture COp-Net sur le jeu de données public DIC-C2DH-HeLa, issu du *Cell Tracking Challenge* [173, 112]. Ce jeu de données contient des images 2D de cellules HeLa cultivées sur une lame de verre, acquises à intervalles réguliers dans le temps dans le but de réaliser des tâches de *cell tracking* et est accessible à l'adresse suivante : `https://celltrackingchallenge.net/2d-datasets/`. L'imagerie a été effectuée à l'aide d'un microscope confocal Zeiss LSM 510 Meta, avec une résolution spatiale de $0.19 \times 0.19 \mu m^2$/pixel, un champ de vue de $97.28 \times 97.28 \mu m^2$ et un intervalle temporel de 10 minutes entre chaque image. Afin d'harmoniser les traitements et réduire les temps de calcul, chaque image a été redimensionnée à une résolution standard de 512×512 pixels.

Dans la suite de cette section, nous décrivons les conditions expérimentales dans lesquelles l'opérateur de fermeture a été appliqué à ce jeu de données. Nous présentons ensuite les résultats obtenus, illustrant la capacité de notre approche à renforcer

la continuité des contours et à améliorer la qualité de la segmentation par instance des cellules dans un contexte dynamique de suivi temporel.

A.1.1 Conditions expérimentales

Dans ce contexte d'images 2D acquises de manière longitudinale, nous avons adapté la segmentation initiale des contours cellulaires (Step #1 dans la Figure 3.3) afin de l'appliquer au jeu de données DIC-C2DH-HeLa en utilisant l'architecture 2D du nnU-Net. Ce réseau a été spécifiquement entraîné sur un premier jeu de données composé de 84 images pour lesquelles 1 112 cellules avaient été délimitées manuellement. Ce réseau a ainsi appris à générer des cartes de probabilité des contours cellulaires à partir d'images individuelles, sans considération temporelle.

Pour évaluer les performances de notre approche complète, incluant l'opérateur de fermeture COp-Net (Step #2 dans la Figure 3.3), un second jeu de données distinct, également constitué de 84 images mais contenant cette fois 1 000 délimitations cellulaires, a été utilisé comme jeu de test. Il est important de souligner que, dans un souci de robustesse et de généralisation, le COp-Net entrainé sur les données générées par l'EDP (3.5) n'a été ni réentraîné ni ajusté spécifiquement sur ces jeux de données publics. Cette décision garantit une évaluation impartiale de notre approche face aux méthodes concurrentes, en testant directement sa capacité à corriger les erreurs de segmentation typiques dans un contexte biologique différent de celui utilisé pour l'apprentissage initial.

Dans la section suivante, nous analysons les résultats obtenus sur ce jeu de test, mettant en lumière les apports spécifiques de notre méthode dans l'amélioration de la continuité des contours et de la qualité des segmentations par instance dans un cadre du suivi temporel des cellules sur une lame 2D.

A.1.2 Résultats et comparaison des performances de l'opérateur de fermeture (COp-Net)

La Figure A.1 propose une comparaison qualitative des résultats obtenus par notre approche par rapport à plusieurs méthodes concurrentes sur le jeu de test public DIC-C2DH-HeLa. L'image originale en niveaux de gris (Figure A.1a) et la vérité terrain associée (Figure A.1b) sont présentées à titre de référence. Les résultats issus du Cellpose [163, 125, 162] (Figure A.1c), du nnU-Net seul (Figure A.1d), de la méthode concurrente pour le comblement de discontinuités [25] (Figure A.1e), ainsi que du nnU-Net enrichi par notre opérateur de fermeture COp-Net entrainé sur les données générées par l'EDP (Figure A.1f) sont ensuite comparés. D'un point de vue visuel, l'ajout du COp-Net permet une amélioration nette de la précision des contours segmentés. Les pixels blancs, indiquant les segmentations des contours cellulaires, montrent une meilleure continuité, et le nombre de cellules correctement identifiées augmente visiblement. À l'inverse, la méthode concurrente pour le comblement de discontinuités appliquée après le nnU-Net n'apporte que peu d'améliorations sur la segmentation initiale (Figure A.1e), illustrant les limites de cette approche dans ce contexte.

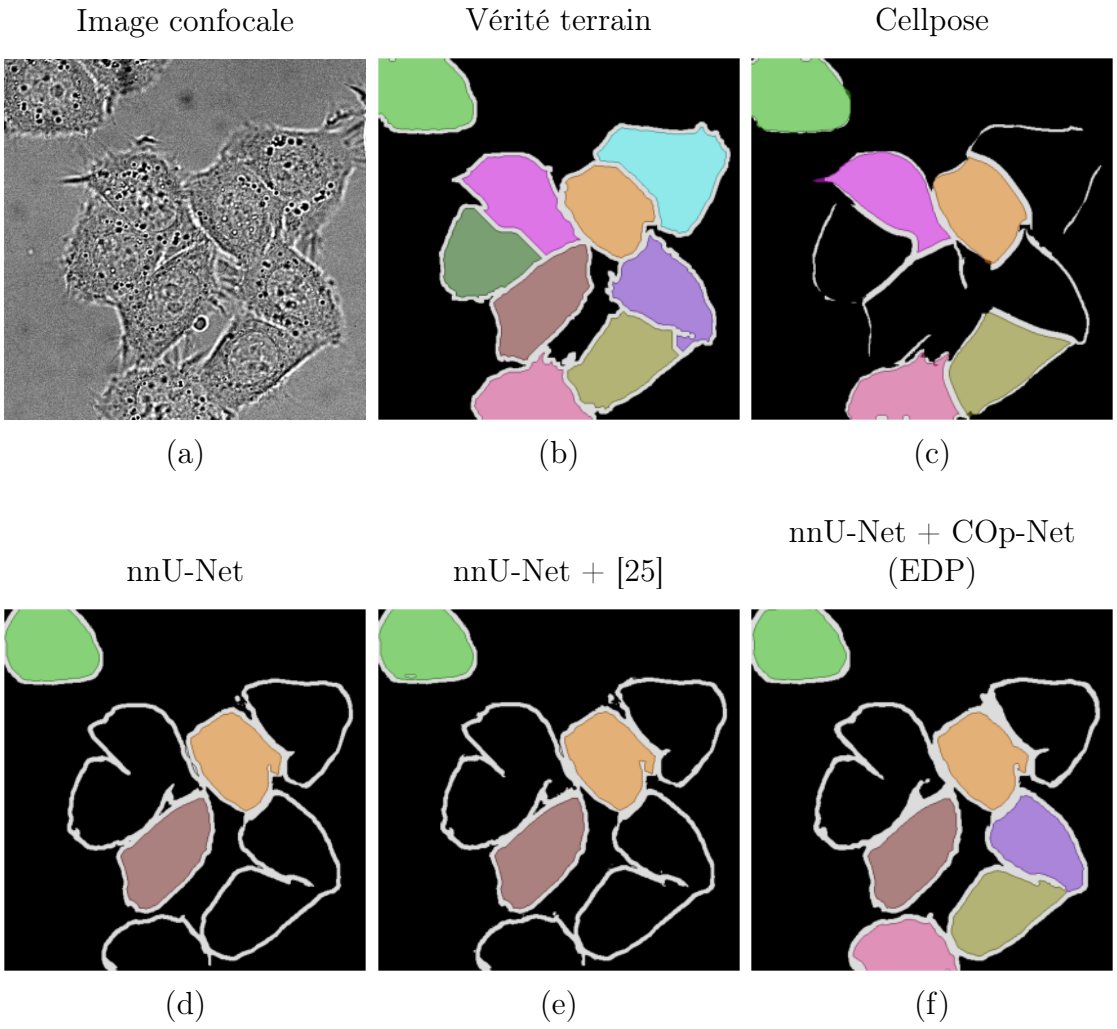


Figure A.1 – Comparaison visuelle des résultats obtenus sur le jeu de données des cellules DIC-C2DH-HeLa. (a) : Image acquise par microscopie confocale. (b-f) : la couleur blanche représente les contours cellulaires, les cellules colorées représentent les cellules correctement identifiées par rapport à la vérité terrain (b), et la couleur noire indique le fond ou les erreurs par rapport à la vérité terrain (sauf pour (b)). (c) : Les contours cellulaires ont été obtenus en utilisant la carte de probabilité générée par le Cellpose et une fonction de contour classique.

La Table A.1 confirme les observations visuelles précédentes sur l'ensemble du jeu de test, composé de 1 000 délimitations cellulaires. Dans ce contexte aussi, l'inférence itérative du COp-Net permet une amélioration significative de l'individualisation des cellules : la proportion de cellules correctement identifiées passe de 64.2±17.2% (sans itération) à 72.4±13.8% après une première itération, puis atteint 74.7±14.3% après trois itérations. Ces résultats confirment les capacités de généralisation du COp-Net et soulignent ses performances supérieures à celles des méthodes concurrentes, y compris dans un contexte différent de celui présenté au chapitre 3, ici appliqué au suivi temporel des cellules sur des lames 2D.

Table A.1 – Évaluation et comparaison de l'approche proposée sur le jeu de données de test des cellules DIC-C2DH-HeLa. Des pourcentages plus élevés de cellules correctement identifiées indiquent une meilleure performance, tandis que des pourcentages plus faibles de cellules regroupées ou séparées de manière erronée reflètent moins d'erreurs. En outre, les scores NSD et clDice les plus élevés correspondent à une meilleure qualité de segmentation des contours. Les meilleurs résultats sont indiqués en caractères gras, et * indique les résultats de notre COp-Net qui démontrent une amélioration significative par rapport au nnU-Net seul (Step #1 dans la Figure 3.3) (test asymétrique de Mann-Whitney, $p < 0.05$).

	Métriques d'identification			**Métriques de segmentation**	
	Cellules correctement identifiées [%]	**Cellules regroupées par erreur** [%]	**Cellules séparées par erreur** [%]	**NSD** [A.U.]	**clDice** [A.U.]
Cellpose	65.9 ± 17.8	30.2 ± 17.2	$\mathbf{3.9 \pm 5.5}$	$0.47 \pm .06$	$0.44 \pm .08$
nnU-Net	64.2 ± 17.2	30.6 ± 17	5.2 ± 7.5	$\mathbf{0.65 \pm .04}$	$0.69 \pm .05$
nnU-Net + [25]	68.1 ± 15.6	25.9 ± 15.3	6 ± 8	$0.65 \pm .04$	$0.69 \pm .05$
nnU-Net + COp-Net (1st iter.)	72.4 ± 13.8	18.1 ± 14.2	9.6 ± 9.3	$0.64 \pm .04$	$0.70 \pm .05$
nnU-Net + COp-Net (Full conv.)	$\mathbf{74.7^* \pm 14.3}$	$\mathbf{14.5^* \pm 12.9}$	10.8 ± 9.7	$0.63 \pm .04$	$\mathbf{0.70 \pm .05}$

A.2 Segmentation par instance dans les images d'histopathologie

Dans ce second cas d'étude, nous avons évalué les performances de l'opérateur de fermeture COp-Net dans le contexte de la segmentation par instance des noyaux dans des images d'histopathologie. Cette tâche présente des défis spécifiques, liés notamment à la nature colorée des images, à la complexité architecturale et à la variabilité morphologique des tissus. L'élargissement du champ de vision, combiné aux variations d'intensité de la coloration (Hématoxyline-Éosine), accentue encore les difficultés de séparation précise des noyaux. Pour conduire cette analyse, nous avons utilisé le jeu de données public NuInsSeg [109], constitué d'images 2D acquises sur des tissus humains et murins, colorés à l'hématoxyline et à l'éosine (H&E). Ce jeu de données est particulièrement pertinent car il couvre une grande diversité de conditions biologiques. Afin d'harmoniser les traitements et réduire les temps de calcul, chaque image a été redimensionnée à une résolution standard de 512×512 pixels.

Dans la suite de cette section, nous détaillons les conditions expérimentales dans lesquelles l'opérateur de fermeture COp-Net a été appliqué à ce jeu de données. Nous présentons ensuite les résultats obtenus, illustrant la capacité de notre approche à améliorer la séparation des noyaux dans un environnement histologique hétérogène et réaliste.

A.2.1 Conditions expérimentales

Bien que le réseau nnU-Net soit capable de traiter des images en couleur grâce à sa prise en charge de plusieurs *channels*, nous avons choisi de convertir l'ensemble des images du jeu de données en niveaux de gris afin de simplifier l'apprentissage et de réduire la variabilité liée à la coloration. Contrairement au cas d'étude précédent, le modèle de segmentation initial et l'opérateur de fermeture COp-Net ont été ici

spécifiquement réentraînés sur ces nouvelles données.

Pour cela, un sous-ensemble de 345 images du jeu de données NuInsSeg a été utilisé pour entraîner le réseau de segmentation initial (Step #1 dans la Figure 3.3). Ces images ont également servi à générer des cartes de probabilité des contours nucléaires à l'aide de l'équation (3.5), qui ont ensuite été utilisées pour entraîner le COp-Net (Step #2 dans la Figure 3.3).

Les hyperparamètres associés à la simulation des perturbations locales d'information par le modèle basée sur l'EDP ont été ajustés pour tenir compte des spécificités de ce cas d'usage. Premièrement, les diffusions et pertes locales ont été restreintes aux régions où les noyaux sont en contact, afin de simuler des discontinuités réalistes et pertinentes pour la séparation des instances. Deuxièmement, pour compenser la forte variabilité du nombre de noyaux par image, les nombres de perturbations simulées, notés N_1 et N_2, ont été définis proportionnellement au nombre total de noyaux présents dans chaque image. Troisièmement, la taille des perturbations a été réduite pour s'adapter à la morphologie plus compacte des noyaux, comparée à celle des cellules analysées en SBF-SEM dans le reste de cette thèse. Plus précisément, le rayon des perturbations a été borné entre $R_{\min} = 5$ pixels et $R_{\max} = 15$ pixels.

Enfin, une fois les cartes de probabilité générées, le COp-Net a été entraîné *from scratch* afin de prédire, pour chaque carte altérée, la version corrigée cohérente avec la vérité terrain.

Dans la section suivante, nous présentons et analysons les résultats obtenus sur un jeu de test comprenant 122 images, en soulignant les bénéfices spécifiques apportés par notre méthode pour la segmentation par instance des noyaux, dans un contexte particulièrement hétérogène en termes de morphologie, de coloration et d'organisation tissulaire.

A.2.2 Résultats des performances de l'opérateur de fermeture (COp-Net)

La Figure A.2 illustre une comparaison visuelle des résultats obtenus avec différentes méthodes de segmentation par instance des noyaux sur des images d'histopathologie. L'image d'origine convertie en niveaux de gris (Figure A.2a) ainsi que la vérité terrain correspondante (Figure A.2b) sont présentées comme référence. Trois approches sont comparées : l'algorithme Cellpose [163, 125, 162] (Figure A.2c), le nnU-Net seul (Figure A.2d), et le nnU-Net enrichi par l'opérateur de fermeture COp-Net, entraîné sur les données synthétiques générées par l'EDP (Figure A.2f). L'ajout du COp-Net permet une amélioration visuelle marquée, avec une meilleure restitution des contours et une séparation plus fine des noyaux en contact étroit, particulièrement dans les zones de forte densité.

La Table A.2 corrobore ces observations par une évaluation quantitative sur l'ensemble du jeu de test, contenant 122 images. Les métriques d'identification confirment que l'intégration du COp-Net améliore significativement la capacité du modèle à distinguer les noyaux regroupés par erreur par le nnU-Net seul. Cette amélioration se traduit par une augmentation du nombre de noyaux correctement identifiés, tout en ne provoquant qu'une légère hausse du nombre de noyaux séparés par erreur. Ces résultats soulignent l'intérêt de notre opérateur de fermeture pour

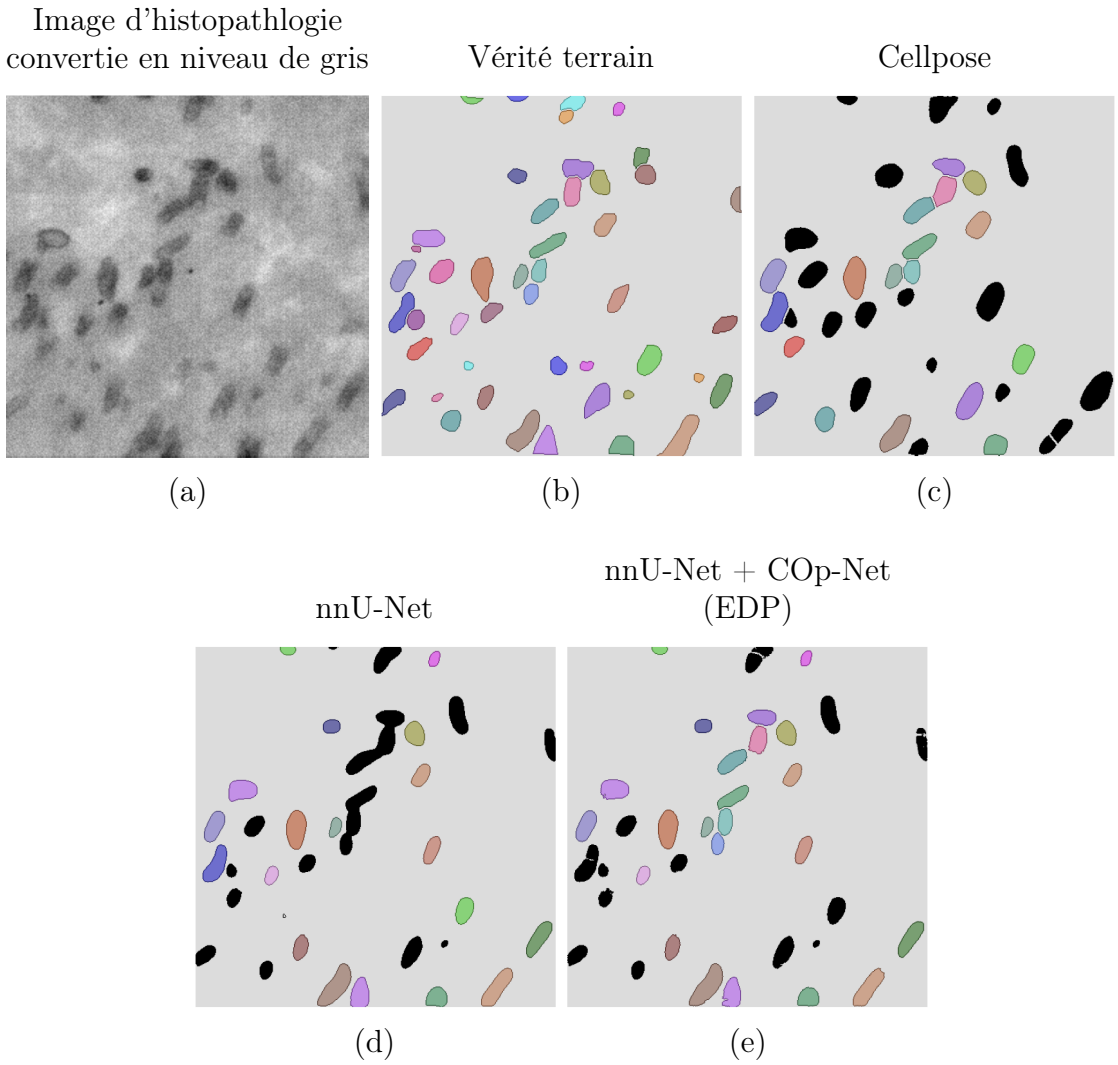


Figure A.2 – Comparaison visuelle des résultats obtenus sur le jeu de données NuInsSeg [109]. (a) : Image d'histopathologie acquise et convertie en niveau de gris. (b-e) : la couleur blanche représente le fond, les noyaux colorés représentent les noyaux correctement identifiés par rapport à la vérité terrain (b), et la couleur noire indique les erreurs par rapport à la vérité terrain. (c) : Les contours des noyaux ont été obtenus en utilisant la carte de probabilité générée par le Cellpose et une fonction de contour classique.

renforcer la précision de la segmentation par instance dans des contextes histologiques complexes.

Table A.2 – Évaluation et comparaison de l'approche proposée sur les 122 images de test issues du jeu de données NuInsSeg [109]. Des pourcentages plus élevés de noyaux correctement identifiés indiquent une meilleure performance, tandis que des pourcentages plus faibles de noyaux regroupés ou séparés de manière erronée reflètent moins d'erreurs. En outre, les scores NSD et clDice les plus élevés correspondent à une meilleure qualité de segmentation des contours. Les meilleurs résultats sont indiqués en caractères gras, et * indique les résultats de notre COp-Net qui démontrent une amélioration significative par rapport au nnU-Net seul (Step #1 dans la Figure 3.3) (test asymétrique de Mann-Whitney, $p < 0.05$).

	Métriques d'identification			**Métriques de segmentation**	
	Noyaux correctement identifiés [%]	**Noyaux regroupés par erreur** [%]	**Noyaux séparés par erreur** [%]	**NSD** [A.U.]	**clDice** [A.U.]
Cellpose	24.3 ± 20.5	$\mathbf{31.4 \pm 23}$	44.3 ± 30.9	$0.62 \pm .15$	$0.90 \pm .11$
nnU-Net	39.1 ± 19.8	46.8 ± 20.7	$\mathbf{14.1 \pm 14.7}$	$0.75 \pm .10$	$\mathbf{0.95 \pm .04}$
nnU-Net + COp-Net	$\mathbf{47.3^* \pm 21.6}$	$32.7^* \pm 20.8$	19.9 ± 14.1	$\mathbf{0.75 \pm .10}$	$0.94 \pm .05$

Annexe B

Mise à disposition du code source et reproduction des résultats de l'opérateur de fermeture proposé (COp-Net)

Dans un souci de reproductibilité et de partage des avancées méthodologiques, une partie du code développé au cours de cette thèse a été mise à disposition de la communauté scientifique à l'adresse suivante : `https://github.com/Florian-40/CellSegm`. Ce dépôt GitHub permet de reproduire la méthodologie présentée dans le chapitre 3, ainsi qu'une partie des résultats obtenus. Il contient notamment :

- le code pour la simulation des cartes de probabilité des contours cellulaires, obtenues par la résolution de l'EDP (3.5),
- les poids de l'opérateur de fermeture proposé (COp-Net), pré-entraîné puis *finetuné*,
- un script Python pour réaliser l'inférence itérative du COp-Net,
- l'implémentation des métriques d'évaluation utilisées dans les expériences.

Deux *Notebooks Jupyter* illustrent l'utilisation des principales fonctionnalités : l'un dédié à la simulation des cartes de probabilité, l'autre à l'inférence et à l'évaluation de l'opérateur de fermeture proposé (COp-Net). Ces notebooks offrent un point d'entrée accessible pour les chercheurs souhaitant tester ou adapter la méthode à leurs propres données. Les Figures B.1 et B.2 présentent quelques captures d'écran extraites de ces *notebooks*.

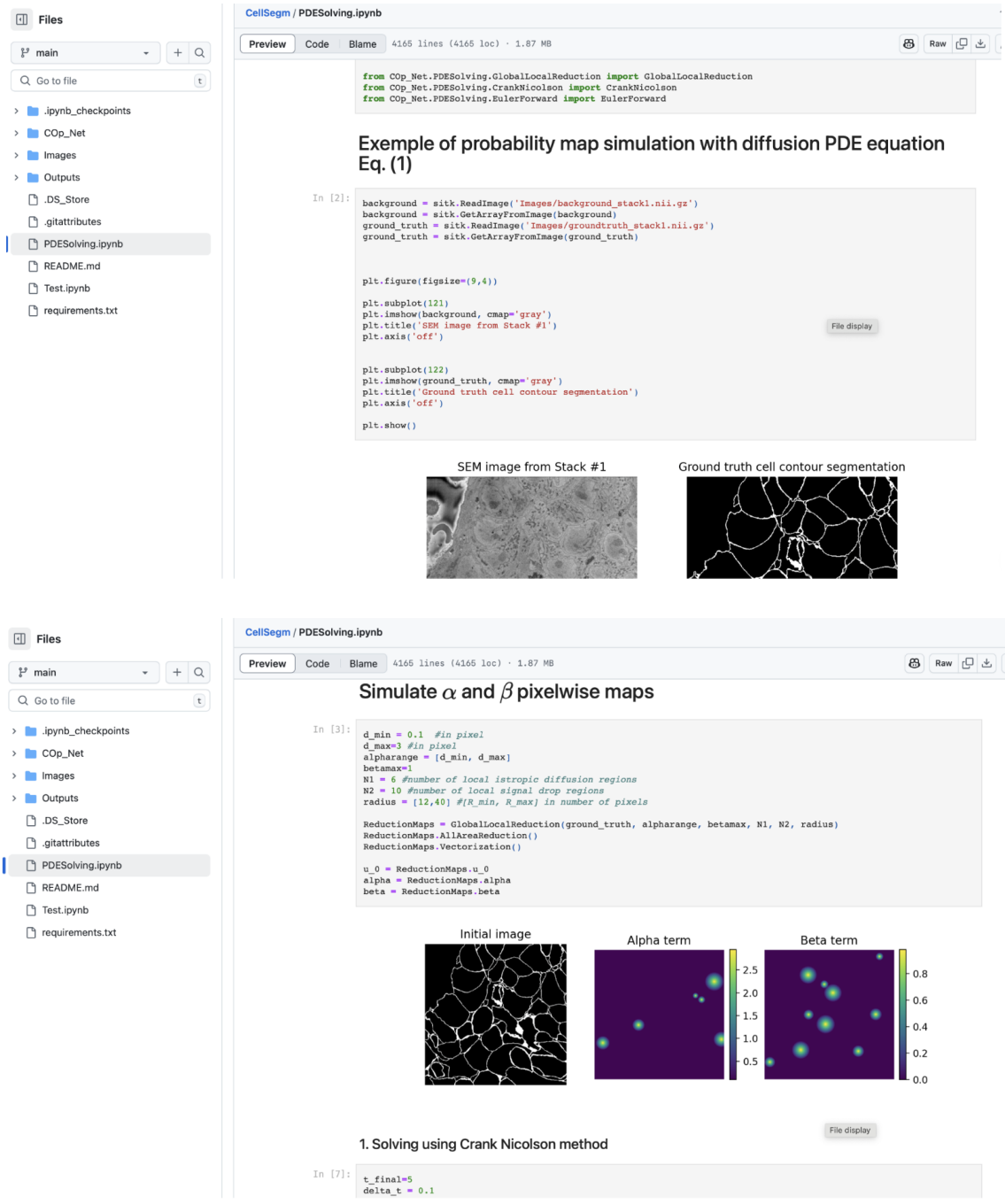


Figure B.1 – Extraits du *Notebook Jupyter* dédié à la simulation des cartes de probabilité des contours cellulaires, obtenues par résolution de l'EDP (3.5).

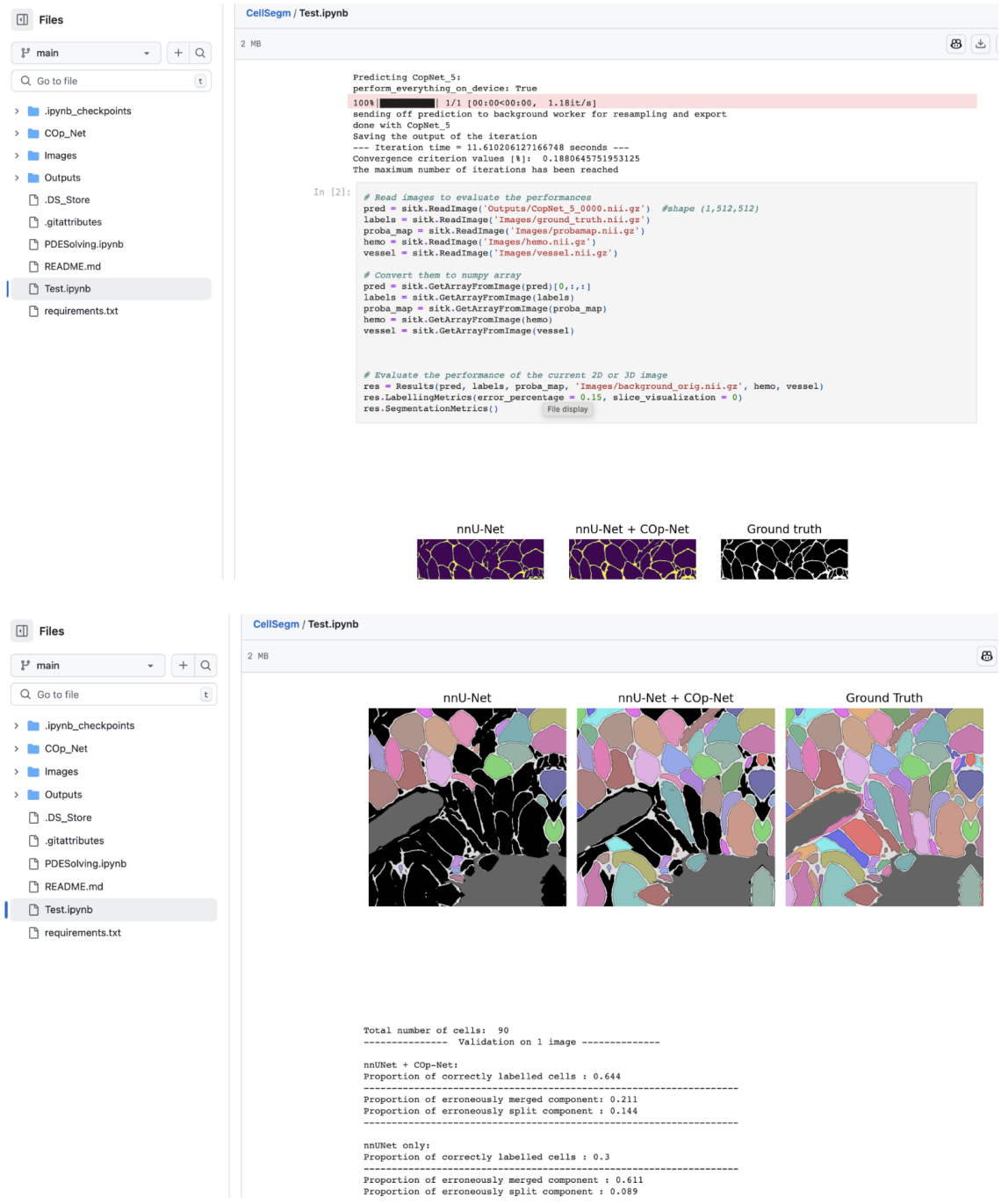


Figure B.2 – Extraits du *Notebook Jupyter* consacré à l'inférence itérative du COp-Net et à l'évaluation des résultats à l'aide des métriques introduites au chapitre 3.

Annexe C

Ressources informatiques utilisées et détails d'implémentation

Le pré-traitement et la standardisation des données brutes, présentés dans la section 2.1.2, ont été réalisés sur la plateforme expérimentale PlaFRIM, soutenue par Inria, le CNRS (LaBRI et IMB), l'Université de Bordeaux, Bordeaux INP et le Conseil Régional d'Aquitaine (`https://www.plafrim.fr/`). Plus spécifiquement, les calculs ont été effectués sur un nœud de calcul équipé de deux CPU AMD Zen2 32 cœurs et de 256 GB de RAM.

L'entraînement et l'évaluation des modèles développés dans la suite de la thèse ont été effectués sur une station de travail fonctionnant sous Ubuntu 20.04.6 LTS, équipée d'un processeur Intel(R) Xeon(R) Gold 6248R et d'un GPU NVIDIA RTX A6000 disposant de 48 GB de VRAM.

Le code développé dans le cadre de cette thèse a été implémenté en Python `3.9`. La librairie `OpenCV v4.9.0.90` a servi au redimensionnement des images, tandis que le module StackReg [168] de la librairie `pystackreg v0.2.7` a été utilisé pour leur alignement.

Plusieurs modèles publics ont été employés : nnU-Net `v2.3.1` (`https://github.com/MIC-DKFZ/nnUNet/tree/v2.3.1`), SPADE-GAN (`https://github.com/NVlabs/SPADE`), COp-Net développé dans le cadre de ce travail (`https://github.com/Florian-40/CellSegm`), micro-SAM `v1.0.1` (`https://github.com/computational-cell-analytics/micro-sam/tree/v1.0.1`) et Cellpose `v3.0.8` (`https://github.com/MouseLand/cellpose/tree/v3.0.8`).

Les analyses statistiques ont été réalisées à l'aide de `SciPy v1.12.0`. L'individualisation par composantes connexes a été effectuée à l'aide de `SimpleITK v2.2.1` et `Scikit-image v0.22.0`. L'instanciation 3D des cellules à partir de résultats 2D coupe par coupe a été réalisée par l'algorithme de *seeded watershed*, accessible publiquement (`https://github.com/haesleinhuepf/napari-segment-blobs-and-things-with-membranes`) (Figure 4.1). L'algorithme de *marching cubes*, implémenté dans `Scikit-image v0.22.0`, a permis le calcul de l'aire 3D (en μm^2) de l'enveloppe nucléaire. Le calcul des distances euclidiennes minimales inter-structures a été réalisé à l'aide de la librairie `edt v2.3.1`. L'estimation de l'axe principal des éléments biologiques et l'entraînement de la forêt aléatoire ont été effectués à l'aide de `scikit-learn v1.4.2`.

Enfin, les rendus 3D des échantillons acquis par SBF-SEM ainsi que les Figures 4.5 et 5.8a ont été générés avec Paraview `5.11.0-RC1` [2, 7], les visualisations tridimensionnelles des segmentations ont été produites avec ITK-SNAP `3.8.0` [193] et les graphiques du chapitre 5 ont été générés à l'aide des librairies `pandas v2.2.2` et `seaborn v0.13.2`.

Exploration de l'organisation interne des tissus tumoraux par imagerie volumétrique, méthodes numériques et apprentissage profond.

Résumé vulagrisé : Comprendre l'organisation interne des tissus tumoraux est essentiel pour améliorer les traitements contre le cancer chez l'enfant. Cette thèse se concentre sur l'hépatoblastome, la tumeur hépatique maligne la plus fréquente chez l'enfant. À partir d'images 3D obtenues par microscopie électronique, un jumeau numérique du tissu tumoral a été élaboré à l'aide d'outils innovants permettant de segmenter et d'identifier automatiquement les structures biologiques comme les cellules, les noyaux ou les capillaires sanguins. Ces informations ont ensuite permis d'analyser l'organisation interne du tissu à l'aide de méthodes d'apprentissage non supervisé. Ce travail ouvre la voie à une meilleure compréhension de l'architecture des tumeurs, et à terme, a pour objectif d'améliorer le diagnostic, choisir le meilleur traitement et mieux prendre en charge les enfants atteints de cancer.
Mots-clés : Microscopie électronique à balayage, Jumeau numérique, Segmentation, Exploration non supervisée

---

Exploring the internal organization of tumor tissue through volumetric imaging, numerical methods, and deep learning.

Concise abstract: Understanding the internal organization of tumor tissues is essential for improving cancer treatments in children. This thesis focuses on hepatoblastoma, the most common malignant liver tumor in children. Based on 3D images obtained by electron microscopy, a digital twin of the tumor tissue was developed using innovative tools capable of automatically segmenting and identifying biological structures such as cells, nuclei, or blood capillaries. This information then made it possible to analyze the internal organization of the tissue using unsupervised learning methods. This work paves the way for a better understanding of tumor architecture and ultimately aims to improve diagnosis, choose the most appropriate treatment, and enhance the care of children with cancer.
Keywords: Scanning electron microscopy, Digital twin, Segmentation, Unsupervised exploration

---

Institut de Mathématiques de Bordeaux, IMB
UMR5251 Université de Bordeaux, 351 cours de la Libération, Talence, F-33400, France.