

Quantifier en microscopie

Adaptation d'une méthode de comptage à la caractérisation de différences biologiques

Laure Avoscan ¹

Résumé : *Pour mettre en évidence certains effets structurels de traitements appliqués aux plantes, nous avons mis au point, à l'unité microbiologie du sol et de l'environnement du centre Inra de Dijon, une méthode originale. Cette démarche a été initiée à partir du travail de Leborgne-Castel et al., 2007 pour exploiter des observations d'un effet structurel en réponse à un traitement donné. Notre apport a consisté à compléter cette approche quantitative par une méthode statistique de l'analyse qualitative d'images de microscopie électronique à transmission sur des coupes ultrafines de racines d'Arabidopsis thaliana. Nous avons pu valider cette méthode lors de comparaisons de l'abondance de vésicules dans les cellules de racines d'A. thaliana en présence ou non de fer chélaté à un sidérophore bactérien.*

Mots clés : fer, *Arabidopsis thaliana*, *Pseudomonas fluorescens*, microscopie électronique à transmission, MET, analyse statistique

1. Introduction

Des études en microscopie électronique à transmission (MET) soulèvent la difficulté de la démonstration significative d'un effet biologique sur la base de la collecte d'images à partir des observations d'échantillons. En effet, pour démontrer un effet biologique significatif, la difficulté est de collecter suffisamment d'images pour que les résultats soient statistiquement exploitables. Grâce à l'amélioration des techniques d'acquisition d'images par des caméras numériques associées aux MET, l'acquisition d'un grand nombre d'images ainsi que des mesures simples comme les distances et les surfaces sont facilitées. Malgré ces avancées certaines, nous nous trouvons toujours en MET devant une double difficulté ; la première consiste à élaborer une méthode d'exploitation des observations pour obtenir une représentativité chiffrée de l'effet observé ; la seconde est de pouvoir caractériser significativement de légères différences sur la base d'observations structurelles purement qualitatives.

Notre équipe « dynamique des interactions entre les plantes et les microorganismes » du Centre Inra de Dijon, a travaillé, ces deux dernières années, sur des observations qualitatives en MET de coupes ultrafines de racines de plantes. Les résultats issus de cette étude, purement qualitative, montraient une différence d'abondance de vésicules apoplasmiques dans des cellules racinaires, en présence ou non de fer chélaté à un sidérophore bactérien. Les différences observées nécessitaient néanmoins une validation quantitative et une étude statistique. Sans cette validation statistique, nous ne pouvions conclure quant aux observations réalisées à ce stade de l'étude.

¹ UMR1229 MSE - Microbiologie du Sol et de l'Environnement - INRA - F-21065 Dijon cedex

☎ 03 80 69 35 72 ✉ laure.avoscan@dijon.inra.fr

Nous nous sommes donc basés sur le travail de Leborgne-Castel *et al.*, 2007 qui ont quantifié leurs observations d'invaginations plasmalemmiques de clathrine (avant la libération des vésicules à clathrine dans le cytosol) dans des cellules isolées de tabac. Dans leur étude, ces structures sur la membrane plasmique sont quantifiées et rapportées au nombre de structures pour 100 μm de périmètre de membrane plasmique. Pour chaque échantillon sectionné, 20 à 30 sections de cellules ont été observées. Ces auteurs ont, par ailleurs, réparti en trois classes les observations : la première classe comporte l'absence d'invagination, la deuxième classe regroupe une observation d'invagination et la troisième classe regroupe deux ou plus d'invaginations pour 100 μm de membrane plasmique. Dans notre étude, pour comptabiliser et pour établir un groupement en classes sur l'observation de tissus racinaires et non de cellules isolées, nous avons apporté des adaptations. Ces adaptations consistaient à comptabiliser les observations de vésicules apoplasmiques pour un μm de membrane plasmique et à réaliser le classement selon des classes basées sur le nombre de vésicules apoplasmiques par μm de membrane plasmique de cellules racinaires. Pour valoriser les résultats numériques, nous avons comparé les distributions de fréquence obtenues des observations dans chacune des classes ainsi définies à l'aide d'un test statistique non-paramétrique. Nous décrivons ici les adaptations et modifications apportées à cette méthode.

2. Description de la méthode et d'un exemple d'application

2.1 Préparation du matériel biologique

La première étape (**figure 1.1**) consiste à préparer le matériel biologique selon la procédure choisie pour les observations d'ultra-structure en microscopie électronique.

2.2 Acquisition des images

La seconde étape (**figure 1.2**) correspond à l'observation des coupes et l'acquisition des images de l'effet biologique observé. Dans l'exemple présenté en **figure 1**, deux traitements sont comparés. L'acquisition des images est réalisée, pour chaque traitement, sur au moins 3 échantillons fixés c'est-à-dire 3 blocs coupés ; 30 à 50 cellules sont observées à partir de ces coupes.

2.3 Calibration des observations

La troisième étape (Figure 1.3) exploite les images acquises pour quantifier l'effet biologique observé c'est-à-dire dans notre exemple, dénombrer le nombre de vésicules apoplasmiques pour chaque traitement testé. Pour cela, les observations sont normalisées en comptant les vésicules apoplasmiques pour 1 μm de membrane plasmique. Cette calibration est nécessaire pour comparer les différentes observations de chaque traitement car les cellules observées n'ont pas toute la même taille. Le nombre d'observations de vésicules apoplasmiques par μm de membrane plasmique est présenté dans des graphiques en **figure 1.3**.

2.4 Distribution des observations

La quatrième étape (**figure 1.4**) permet de grouper les observations dans des classes afin de différencier statistiquement les distributions obtenues. L'intervalle de chaque classe est déterminé à partir de ces graphiques ; nous avons fait le choix de regrouper en classe 0, le nombre d'observations pour une à deux vésicules apoplasmiques par μm de membrane plasmique, en classe 1, le nombre d'observations pour trois à six vésicules apoplasmiques par μm de membrane plasmique et en classe 2, le nombre d'observations équivalent ou supérieur

à sept vésicules apoplasmiques par μm de membrane plasmique. Il en résulte une distribution de classes par traitement étudié.

2.5 Analyse statistique

La cinquième étape (**figure 1.5**) compare la signification des différences entre deux distributions à l'aide du test du chi carré (X^2). Dans notre exemple, la distribution du nombre d'observations de vésicules apoplasmiques du traitement 1 est-elle différente de celle du traitement 2 ? Le test du chi carré est conduit en posant :

- l'hypothèse nulle H_0 signifie que les distributions sont indépendantes du traitement, c'est-à-dire que la répartition du nombre de vésicules apoplasmiques ne dépend pas du traitement,
- l'hypothèse alternative H_1 signifie que les distributions sont dépendantes du traitement, c'est-à-dire que la répartition du nombre de vésicules apoplasmiques est corrélée au traitement de la plante.

Le tableau de contingence **5a de la figure 1.5** présente les données observées et quantifiées c'est-à-dire le nombre d'observations par classe et par traitement, la somme des observations par traitement, et la somme des observations par classe. Les valeurs théoriques présentées dans le tableau **5b de la Figure 1.5** sont calculées à partir de ces données observées selon la formule suivante :

$$\text{Valeur théorique} = \frac{\text{total des observations en colonne (classe)} \times \text{total des observations en ligne (traitement)}}{\text{nombre total des observations}}$$

Enfin, le tableau 5c présente les valeurs détaillées chi carré calculées et obtenues à l'aide de la formule suivante :

$$X^2 \text{ d'une donnée} = \frac{(\text{valeur observée} - \text{valeur théorique})^2}{\text{valeur théorique}}$$

La somme de ces valeurs, relatives à chaque cellule, permet de calculer le X^2 des données qui est de 108,18. 108,18 correspond à une mesure de l'écart existant entre les effectifs théoriques attendus et ceux observés dans l'échantillon. Cette valeur est alors comparée au X^2 théorique, obtenue dans la table du X^2 , pour un pourcentage de risque α que l'on définit et un degré de liberté (ddl) calculé comme suit :

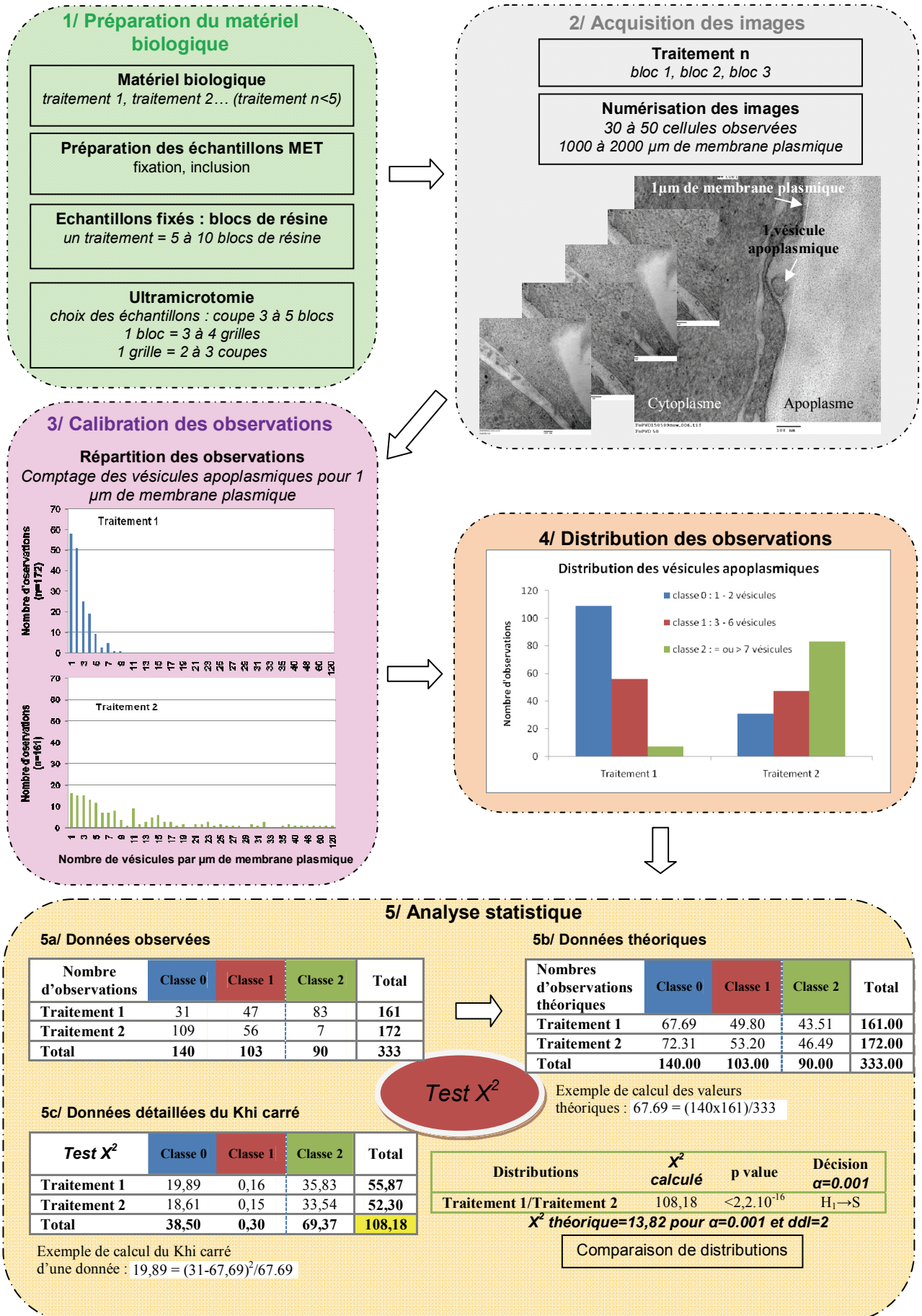
Si on se donne un risque α de 0,001% de chance de se tromper, la valeur du χ^2 théorique pour un ddl de 2 est 13,82. Or la valeur du χ^2 calculée de 108,18 est nettement supérieure à la valeur théorique, cela signifie que l'hypothèse H_0 est rejetée pour la comparaison des

$$\text{ddl} = (\text{nombre de ligne} - 1) \times (\text{nombre de colonnes} - 1)$$

soit dans notre exemple,

$$\text{ddl} = (2 - 1) \times (3 - 1) = 1 \times 2 = 2$$

distributions avec un risque de 0,001% de chance de se tromper. Ces distributions diffèrent significativement entre elles, l'hypothèse alternative H_1 est vraie, c'est-à-dire que dans notre exemple, la répartition du nombre de vésicules apoplasmiques est corrélée au traitement de la plante.



Conclusion

Nous avons mis au point et expérimenté une approche quantitative et statistique d'exploitation d'images en microscopie électronique à transmission, lors de la comparaison de l'abondance de vésicules dans les cellules de racines d'*A. thaliana* en présence ou non de fer chélaté à un sidérophore bactérien. Cette approche quantitative est actuellement appliquée pour comparer l'effet biologique du sidérophore, en l'absence et en présence de fer, qu'il soit chélaté ou non au sidérophore bactérien, au niveau cellulaire des racines d'*A. thaliana* sur le nombre de vésicules apoplasmiques observées en microscopie électronique à transmission. Cette méthode peut-être applicable sur d'autres modèles biologiques ; toutefois, nous recommandons d'éviter de multiplier les conditions de traitements puisque l'acquisition de nombreuses images est nécessaire pour un échantillon ou traitement donné.

Remerciements : Nous remercions Nathalie Leborgne-castel et Jeannine Lherminier pour leurs conseils techniques au cours de l'exploitation des résultats ainsi que Sylvie Mazurier pour son aide dans l'exploitation statistique des données.

Bibliographie

Leborgne-Castel N., Lherminier J., Der C., Fromentin J., Houot V., Simon-Plas F. (2008) The plant defense elicitor cryptogein stimulates clathrin-mediated endocytosis correlated with reactive oxygen species production in Bright Yellow-2 Tobacco cells. *Plant Physiology* 146:1255-1266.

