



ETIENNE REGULIER
ETIENNE.REGULIER@EPFL.CH
LABORATOIRE D'ÉTUDE SUR LA NEURODÉGÉNÉRESCENCE,
FACULTÉ SV, EPFL

Application de la STÉRÉOLOGIE AUX NEUROSCIENCES

INTRODUCTION

L'un des problèmes majeurs posé en analyse d'image, notamment à caractère biologique, réside dans le fait que les mesures de différents paramètres ne peuvent se faire que sur des coupes de l'échantillon. De fait, l'analyse d'image ne permet alors d'accéder qu'à des paramètres en 2 dimensions alors que la prise en compte de ces paramètres dans 3 dimensions pourrait apporter un complément d'informations biologiques significatif. La stéréologie est une méthode statistique permettant l'estimation de quantités géométriques tels que le nombre, la longueur, l'aire, la surface et le volume d'évènements à l'intérieur d'un objet donné. Au-delà des équations mathématiques et principes souvent complexes régissant cette méthodologie, la stéréologie devient un outil indispensable dans le domaine des neurosciences, par exemple, en permettant une analyse non biaisée de l'efficacité de tel ou tel traitement appliqué au cerveau dans son entité sans pour autant nécessiter une analyse fine et détaillée de chaque section. Aujourd'hui, de puissants systèmes d'analyse d'image, couplés à un microscope équipé d'une caméra numérique permettent d'accéder à cette analyse stéréologique en oubliant presque l'aspect équation pour se focaliser sur l'étude biologique. La stéréologie représente donc un modèle d'intégration de la biologie, de l'informatique et de l'imagerie en système autonome et interdépendant, élément indispensable aux études réalisées en biologie.

PRINCIPES DE STÉRÉOLOGIE

Dans le cadre d'une étude biologique, quelle qu'elle soit, le chercheur posera une hypothèse puis rassemblera des données pour évaluer cette hypothèse. Les données ainsi récoltées portent sur la superficie (e.g. d'une lésion), le nombre (e.g. de cellules), la longueur (e.g. de fibres nerveuses) ou encore le volume des spécimens à comparer. En examinant et en comparant ces mesures, les chercheurs pourront ainsi prouver ou réfuter l'hypothèse posée. Cependant, toute expérience ne peut être considérée comme valide que si les données ont été rassemblées d'une façon fiable et impartiale. La stéréologie est une méthode impartiale admise pour rassembler des informations sur la superficie, le nombre, la longueur, et le volume d'un spécimen. La méthode se fonde sur le prélèvement aléatoire uniforme systématique du spécimen. Si l'on prend l'exemple d'un jeu de 52 cartes dans lequel on souhaite prélever 4 cartes de manière aléatoire uniforme systématique, on sélectionnera d'abord un début aléatoire de 1 à 13 puis l'on prendra cette carte et chaque treizième carte ensuite. De ce principe essentiel ont émergé, à partir du 15^{ème} siècle, un certain nombre de développements critiques fournissant les bases théoriques permettant des évaluations impartiales des quatre paramètres stéréologiques de premier ordre: nombre (n), volume (v), superficie (s), et longueur (l).

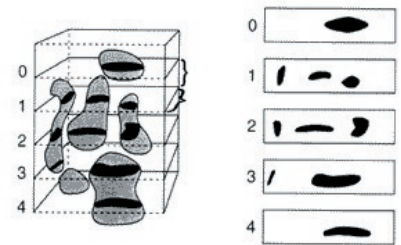
PARAMÈTRES STÉRÉOLOGIQUES DE 1^{ER} ORDRE

En 1635, Buonaventura Cavalieri prouve que le volume moyen d'une population peut être estimé d'une façon théoriquement impartiale par la somme des aires coupées au travers des objets. La méthode de Cavalieri tient compte de l'évaluation morphologique du volume total de n'importe quelle population d'objets à partir de l'aire sur un prélèvement systématique aléatoire de sections. En 1777, le naturaliste Georges Leclerc Buffon présente à l'académie royale des sciences à Paris le problème d'aiguille. Il prouve qu'une aiguille jetée en l'air au hasard sur une grille de lignes coupe

chaque ligne avec une probabilité directement proportionnelle à la longueur de l'aiguille et fournit ainsi la base théorique pour estimer la longueur et la surface totale d'objets de forme non géométrique. En 1984, Sterio édite le principe du disector, la première méthode impartiale pour estimer le nombre vrai d'objets dans un volume donné de tissu.

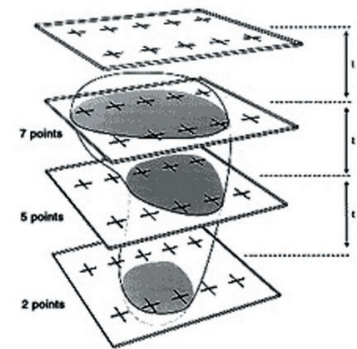
PRINCIPE DU DISECTOR ET ESTIMATION DU NOMBRE

Le disector est une sonde 3-D géométrique pour compter des nombres d'objets (cellules) avec une probabilité qui est inchangée par la taille, la forme, ou l'orientation des objets. Elle s'apparente à un carré placé régulièrement au sein de l'échantillon. Chaque fois qu'un objet coupe le carré, il est totalisé. Les applications pratiques du principe du disector incluent le comptage d'objets avec deux plans physiques (disector physique) ou deux plans optiques (disector optique).



PRINCIPE DE CAVALIERI ET ESTIMATION DU VOLUME

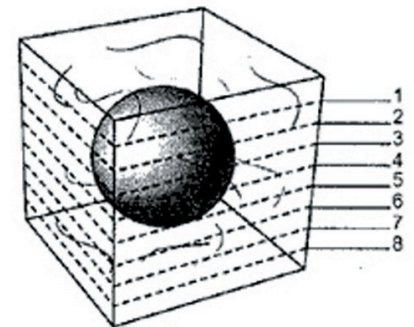
En utilisant le principe de Cavalieri, tout le volume moyen d'un espace arbitraire de référence peut être estimé à partir des secteurs sur les sections systématiques uniformes aléatoires. La sonde géométrique est dans ce cas un plan 2-D. Plusieurs méthodes existent pour estimer le nombre d'objet par aire sur chacune des surfaces de coupe. L'une des méthodes les plus efficaces est le comptage de points.



ESTIMATION DE LA LONGUEUR ET DE L'AIRE

Des sondes géométriques en combinaison avec le prélèvement systématique aléatoire sont employées. Des sondes géométriques avec deux dimensions (plans) et une dimension (lignes) sont utilisées pour estimer les paramètres d'aire et de longueur sur des sections de tissu.

Par exemple, l'estimation de la longueur de neurites (structures plus ou moins linéaires) peut être accomplie en utilisant une sphère. Puisque la surface d'une sphère est isotrope (orientation égale dans toutes les directions), la probabilité d'une intersection est proportionnelle à la longueur du dispositif linéaire. Cette probabilité, qui est basée sur le problème de l'aiguille de Buffon du 18ème siècle, tient compte de l'évaluation de la longueur totale pour les objets linéaires minces sur des sections de tissu.



PARAMÈTRES STÉRÉOLOGIQUES DE 2ÈME ORDRE

VARIATION BIOLOGIQUE

La variation biologique représente la source la plus importante de variation de l'analyse stéréologique. Elle fournit la variation vraie entre les individus qui sert à analyser des différences possibles au sein de chaque groupe. Par le biais des analyses statistiques précédemment réalisées, cette variation biologique peut être estimée par détermination des coefficients de variation (CV) et d'erreur (CE).

ERREUR D'ÉCHANTILLONNAGE

L'erreur d'échantillonnage contribue de manière significative à augmenter le coefficient d'erreur final d'une analyse stéréologique d'une population (e.g. cerveaux de rats injectés avec un médicament). D'une manière générale, une stratégie efficace consiste à effectuer un prélèvement relativement léger pour chaque cerveau étudié mais d'augmenter le nombre de cerveaux analysés. De fait, il faut savoir que la variation biologique d'un individu à un autre est typiquement de l'ordre de 20 à 30%. On comprend donc aisément l'intérêt d'augmenter le nombre d'individu étudiés et non pas le nombre de coupes par individu.

INFORMATIQUE ET STÉRÉOLOGIE

Le développement de logiciels de calcul puissants couplés à du matériel de microscopie performant permet aujourd'hui d'employer l'analyse stéréologique sans devoir maîtriser les formules statistiques et principes décrits plus hauts. Cet outil ne dispense pas des bases de stéréologie mais permettent de donner à l'utilisateur non statisticien les moyens d'une analyse précise et reproductible. L'un des systèmes les plus performants actuellement sur le marché est sans aucun doute la solution intégrative de MicroBrightField, Inc. (<http://www.microbrightfield.com>).



Couplée au logiciel StereoInvestigator™, cette solution permet de traiter des images prises avec des appareils photographiques ou numériques, des microscopes légers ou confocaux, des microscopes électroniques, et des sources tomographiques de balayage. Lorsque l'ensemble du système est associé en direct à un microscope optique motorisé (système disponible à l'EPFL - Faculté des Sciences de la Vie - LEN), le logiciel StereoInvestigator™ utilise la platine motorisée dans l'axe X, Y et Z et commandée par ordinateur pour la navigation dans les sections de tissu et pour exécuter des balayages aléatoires systématiques efficaces. Le logiciel comporte aussi des outils sophistiqués de tracé anatomique permettant de déterminer des régions pour y placer les sondes stéréologiques, de tracer les zones de distribution de cellules, de préparer des cartes anatomiques pour la publication, et d'exécuter des analyses morphométriques détaillées. Enfin, les résultats d'évaluation et les coefficients d'erreur de chaque analyse sont automatiquement calculés et présentés sous forme de bilan pour chaque catégorie de mesure (longueur, volume, aire, nombre,...).■

