



FACULTÉ DE SCIENCES ET GÉNIES

Étude de l'autofluorescence intestinale du poisson zèbre

Quentin Perry-Auger (quentin.perry-auger.1@ulaval.ca)
111 156 158
Valérie Pineau Noël (valerie.pineau-noel.1@ulaval.ca)
111 156 982

Stage d'été 2018

Résumé

Le microbiote intestinal de l'humain et des autres vertébrés joue un rôle central sur la santé. Par contre, les effets des modifications apportées à ce microbiote sur l'hôte sont encore mal connus. L'imagerie du système digestif peut donc devenir une bonne approche pour en apprendre plus sur les effets de ces changements sur son fonctionnement et son développement. Cependant, il est bien connu que les tissus vivants émettent souvent une fluorescence naturelle intrinsèque, appelée autofluorescence, pouvant biaiser les observations et les analyses d'images. C'est pour cette raison que cette étude quantifie cette autofluorescence chez le poisson zèbre. Cette quantification est effectuée en utilisant la microscopie à deux photons et des tests statistiques, puis une hypothèse sur les causes de cette autofluorescence intestinale est présentée. Les résultats montrent que la nourriture n'affecte pas l'autofluorescence des tissus des intestins et que son intensité ne varie pas de façon significative pour les mêmes individus pour une période de trois jours. Aussi, la longueur d'onde à laquelle l'excitation de l'autofluorescence intestinale est maximale chez le poisson zèbre est à environ 825 ± 25 nm, ce qui suggère que les microorganismes du microbiote ou les lipofuscines sont la cause probable de l'autofluorescence. En somme, cette présente étude sert de guide pour la compréhension éventuelle du fonctionnement de l'axe *cerveau-intestins-microbiote* en utilisant le *zebrafish* comme modèle biologique.

Table des matières

Résumé	ii
1 Approche théorique	4
1.1 Contexte	4
1.2 Le poisson zèbre	4
1.2.1 Les intestins et le microbiote	5
1.3 L'autofluorescence	5
1.4 La microscopie multiphoton	6
2 Approche expérimentale	7
2.1 Les soins apportés aux poissons zèbres	7
2.2 La microscopie en deux-photons pour l'imagerie <i>in vivo</i>	7
2.3 Les expériences sur l'autofluorescence	8
2.3.1 La nourriture et ses effets	8
2.3.2 L'imagerie et son influence sur l'autofluorescence	9
2.3.3 La variation de l'intensité de l'autofluorescence dans le temps	9
2.3.4 La construction d'un spectre d'excitation	10
2.4 Le traitement des images volumétriques	10
2.4.1 L'extraction et la compilation des données	10
2.4.2 Le traitement des données par les tests statistiques	11
3 Analyse	13
3.1 L'influence de l'alimentation	14
3.2 L'influence de l'imagerie	14
3.3 L'intensité de l'autofluorescence dans le temps	15
3.4 Le spectre d'excitation	17
3.5 Les causes de l'autofluorescence	18
4 Dans le futur	20
5 Conclusion	21
Bibliographie	22
Annexe I - Résultats de l'expérience sur l'effet de la nourriture	25
Annexe II - Résultats des tests de normalité	27
Annexe III - Résultats des tests de comparaison entre N et NN	29
Annexe IV - Résultats des tests de comparaison pour la variation quotidienne de l'autofluorescence	31
Annexe V - Macro pour utiliser la méthode <i>Subtract background</i> d'imageJ	33

Table des figures

1	Un poisson zèbre de cinq jours post-fertilisation (dpf pour <i>days post-fertilisation</i>) représenté en observation à fond clair. L'échelle est de 0,5 mm.	5
2	Illustration de l'émission de fluorescence en microscopie à un photon (gauche) et en microscopie à deux photons (droite).	6
3	Un poisson zèbre de 5 dpf représenté de façon schématisée. La région en vert représente le système digestif du poisson zèbre. Les régions encadrées en rouge correspondent aux endroits D et F imagés.	8
4	Illustration des différentes étapes pour l'extraction des régions d'intérêt	11
5	Exemple de structure très fluorescente dans la fin de l'intestin du poisson six NN	13
6	Illustration des valeurs de fluorescence élevées (cercles verts) obtenue en raison des structures fluorescentes	13
7	Valeurs d'I/V obtenues pour des poissons imagés à tous les jours pendant quatre jours et des poissons imagés seulement une fois. Les colonnes de l'histogramme indiquent la moyenne et la barre d'erreur représente l'écart type.	15
8	Graphique de la variation de la fluorescence au cours de la journée à quatre dpf. L'excitation est à 940 nm et seulement le D de l'intestin est imagé.	16
9	Graphique de la variation de la fluorescence au cours de la journée à cinq dpf. L'excitation est à 940 nm et seulement le D de l'intestin est imagé.	16
10	Graphique de la variation de la fluorescence au cours de la journée à six dpf. L'excitation est à 940 nm et seulement le D de l'intestin est imagé.	17
11	Spectres d'excitation normalisés obtenus pour le début de l'intestin des deux poissons NN. On retrouve sur le graphique la valeur du rapport entre la fluorescence maximale rouge sur la fluorescence maximale verte (825 nm) et la moyenne de ce même rapport pour chaque longueur d'onde.	18
12	Distributions de l'autofluorescence bleue (480 à 500 nm) obtenue sur trois jours avec une excitation à 800 nm pour le D (gauche) et la F (droite) de l'intestin. Les barres d'erreur correspondent à l'écart type.	25
13	Distributions de l'autofluorescence verte (500 à 550 nm) obtenue sur trois jours avec une excitation à 940 nm pour le D (gauche) et la F (droite) de l'intestin. Les barres d'erreur correspondent à l'écart type.	25
14	Distributions de l'autofluorescence rouge (625 à 675 nm) obtenue sur trois jours avec une excitation à 940 nm pour le D (gauche) et la F (droite) de l'intestin. Les barres d'erreur correspondent à l'écart type.	26
15	Distributions de l'autofluorescence rouge (625 à 675 nm) obtenue sur trois jours avec une excitation à 1045 nm pour le D (gauche) et la F (droite) de l'intestin. Les barres d'erreur correspondent à l'écart type.	26
16	Code du macro utilisé pour passer des ROI segmentées avec un filtre médian aux ROI segmentées avec la méthode <i>Subtract background</i> d' <i>ImageJ</i>	33

1 Approche théorique

1.1 Contexte

L'axe *cerveau-intestins-microbiote* est une forme de communication entre le système digestif, le système nerveux central (SNC) et le microbiote intestinal [5]. Ce dernier comprend une quantité innombrable de microorganismes différents qui non seulement interagissent ensemble dans un même hôte, mais aussi interagissent avec l'organisme vivant dans lequel ils vivent. Toutefois, il s'avère que les effets du microbiote intestinal sur son hôte sont encore mal compris dans le domaine scientifique. Par contre, il est connu qu'une modification de la composition du microbiote pourrait induire des conséquences au niveau du développement du cerveau, affectant le comportement et le métabolisme [5]. Par exemple, il a été prouvé que le microbiote intestinal affecte le développement et la différenciation des cellules intestinales du poisson zèbre. Effectivement, l'absence de microbiote résulte en un arrêt dans la différenciation des cellules intestinales et une altération de leurs fonctions [2]. Par contre, l'effet est annulé lorsque le microbiote normal du poisson zèbre est inséré dans le tube digestif, [2] ce qui indique que le microbiote interagit d'une façon ou d'une autre avec son hôte. Ainsi, c'est en bénéficiant des avantages de l'optogénétique et des techniques microscopiques qu'il est alors possible d'utiliser le poisson zèbre comme modèle biologique pour obtenir des explications détaillées à ce sujet. Cependant, l'autofluorescence des tissus biologiques peut devenir un problème dans le cas où il est nécessaire d'utiliser des molécules fluorescentes pour visualiser la migration de microorganismes dans le tube digestif. En effet, l'autofluorescence intestinale génère un arrière-plan fluorescent pouvant imiter une accumulation de sondes fluorescentes à un endroit dans l'intestin et, ainsi, provoquer une confusion lors de l'analyse des données.

Cette étude s'acharne principalement sur le système digestif et l'autofluorescence des tissus intestinaux chez le poisson zèbre pour l'analyse éventuelle du développement intestinal et neuronal. En fait, ce projet caractérise de façon quantitative l'intensité de cette autofluorescence selon différents critères et conditions, permettant ainsi de faciliter les futures expériences d'imagerie. Ce document sert donc de guide pour tous ceux qui emploient la microscopie pour étudier l'axe *cerveau-intestins-microbiote*.

Pour se faire, l'autofluorescence sera visualisée par un système de microscopie multiphoton qui permet d'observer plusieurs longueurs d'onde d'émission de l'autofluorescence des intestins du *zebrafish*. Ces derniers sont de lignée sauvage *Tüpfel long fin* (TLF) [38] provenant du Laboratoire de Recherche en Sciences Aquatiques (LARSA) de l'Université Laval. L'influence de l'alimentation et du temps sont des aspects discutés dans ce projet. Des analyses statistiques sont employées pour quantifier l'intensité de l'autofluorescence intestinale et pour comparer différents groupes de poissons entre eux.

1.2 Le poisson zèbre

Le poisson zèbre est un modèle biologique idéal pour l'étude de l'axe *cerveau-intestins-microbiote*, puisque la structure de son cerveau est très similaire au cerveau d'autres vertébrés comme le rat, le poulet et même l'humain [25]. Il en est de même pour l'organisation, le développement et le mode de fonctionnement de la traquée digestive des *zebrafish*, qui s'avèrent être comparables à ce qui est retrouvé chez les mammifères [46]. Aussi, des études ont montré que la séquence primaire en acides aminés des BDNF, des facteurs de croissance des neurones retrouvés dans le système nerveux central et périphérique, est identique à 91 % entre les poissons zèbres et les humains [5]. De plus, le système sérotoninergique des *zebrafish* est d'une complexité analogue à celui des humains et des rongeurs [5]. Il vient sans dire que le poisson zèbre partage plusieurs points communs avec l'Homme, mais il offre plus d'avantages techniques à l'étude, comme sa transparence à l'état larvaire

et juvénile, [36, 41] ce qui rend son système digestif et neuronal complètement accessible. La lumière peut donc être utilisée autant pour moduler l'activité de différentes molécules et voir ses effets que pour observer la colonisation de microorganismes dans la traquée intestinale. D'ailleurs, l'addition de microorganismes n'est pas sorcier ; il suffit d'inoculer l'eau de ce microorganisme et il entrera de façon passive dans le système digestif du poisson zèbre [5], ce qui est d'un fort intérêt pour l'étude de l'axe *cerveau-intestins-microbiote*. En plus, le poisson zèbre se développe dans un chorion stérile [41, 36], facilitant la production d'organismes axéniques. Toutes ces raisons expliquent pourquoi le poisson zèbre est maintenant reconnu comme étant un modèle de choix pour étudier les effets du microbiote intestinal sur le cerveau.



Crédit : Michael J. Taormina et al., 2014. Figure 1

FIGURE 1: Un poisson zèbre de cinq jours post-fertilisation (dpf pour *days post-fertilisation*) représenté en observation à fond clair. L'échelle est de 0,5 mm.

1.2.1 Les intestins et le microbiote

La morphogénèse des intestins est évidente dès 21 heures post-fertilisation (hpf), soit lorsque les premières cellules intestinales deviennent organisées [2]. Le développement s'ensuit par le duodénum, puis le colon et, finalement, l'intestin grêle [45]. Les oeufs éclosent entre 48 et 72 hpf, permettant à l'ouverture de la bouche de se faire à environ 74 hpf [2]. Il en résulte ensuite de l'ouverture de la sortie terminale postérieure à 96 hpf, résultant d'un système digestif complètement ouvert au monde extérieur [2]. C'est alors à cinq dpf que les intestins sont complètement fonctionnels et que la nourriture peut être administrée [41]. Force est de constater que son développement est assez rapide comparativement à d'autres animaux utilisés en recherche [41, 2, 36], un avantage qui n'est pas à négliger.

Ainsi, les expériences effectuées pour cette étude sont toutes d'une durée de trois jours, sauf exception : de quatre à six dpf. En effet, étudier les tissus intestinaux dans cette fenêtre temporelle permet d'en savoir davantage sur la fonctionnalisation des intestins. De plus, l'administration de nourriture est une condition intéressante à étudier dans le contexte de la quantification de l'intensité de l'autofluorescence intestinale.

1.3 L'autofluorescence

En savoir plus sur l'autofluorescence des intestins du *zebrafish* procure un avantage, non seulement pour faciliter l'analyse d'éventuelles acquisitions, mais aussi pour en apprendre plus en matière du développement intestinal sans nécessiter l'ajout de quelconques molécules fluorescentes synthétiques. L'autofluorescence correspond à une émission de lumière fluorescente sans ajout de sondes moléculaires ou protéines fluorescentes [15]. C'est la fluorescence émise par d'autres espèces que les fluorophores étudiés [4], donc par les molécules/groupements présents dans l'échantillon lui-même. La microscopie deux-photons aide à contrer l'effet d'arrière-plan, puisque les longueurs d'onde utilisées pour exciter les fluorophores sont dans la fenêtres thérapeutique optique [14, 9], mais elle n'est pas suffisante pour complètement éliminer l'autofluorescence des tissus.

1.4 La microscopie multiphoton

Pour cette étude, la microscopie à deux photons est utilisée pour acquérir des images volumétriques (empilement d'images prises à des intervalles réguliers sur toute la profondeur de l'échantillon) des intestins des poissons zèbre afin de quantifier l'intensité de son autofluorescence. Cette technique est basée sur le principe d'absorption multiphoton [3]. En microscopie à fluorescence conventionnelle, un échantillon est excité par des photons dont l'énergie est égale à la différence d'énergie entre l'état excité et l'état de repos de l'électron. Dans le cas de la microscopie à deux photons, plutôt que l'électron soit excité par un seul photon, celui-ci l'est par deux photons dont l'énergie est environ égale à la moitié de celle utilisée pour la microscopie à un seul photon (la longueur d'onde est environ doublée) [9]. Toutefois, l'absorption multiphoton est un phénomène d'optique non-linéaire qui est beaucoup moins probable que l'absorption avec excitation à un photon. Ainsi, le flux de photons dans l'échantillon doit être considérablement supérieur et une puissance lumineuse importante est nécessaire. Ceci explique pourquoi un laser à impulsion est utilisé : la puissance est concentrée dans des impulsions femtosecondes et la densité de photons au plan focal devient alors suffisante pour l'absorption simultanée de deux photons.

Ce type d'imagerie apporte plusieurs avantages. Tout d'abord, cette méthode permet d'obtenir un sectionnement optique efficace. En effet, puisque l'absorption à deux photons survient seulement lorsque la densité de photons est très grande, la fluorescence provient seulement de la région proche du plan focal [3, 9]. Ceci signifie que, contrairement aux méthodes de microscopie à un photon où la fluorescence recueillie sur les images provient de pratiquement toute la profondeur de l'échantillon, la microscopie à deux photons permet de recueillir la fluorescence provenant uniquement du plan focal (figure 2). Le bruit causé par l'absorption hors focus est alors grandement réduit. Cette méthode de microscopie réduit également la phototoxicité sur le volume de l'échantillon, puisque seulement une petite zone autour du plan focal est excitée [3, 9]. Enfin, pour les grandes longueurs d'onde utilisées, le coefficient de dispersion de la lumière dans un médium diminue, ce qui permet d'imager à des profondeurs plus importantes qu'avec la microscopie à un photon [44].

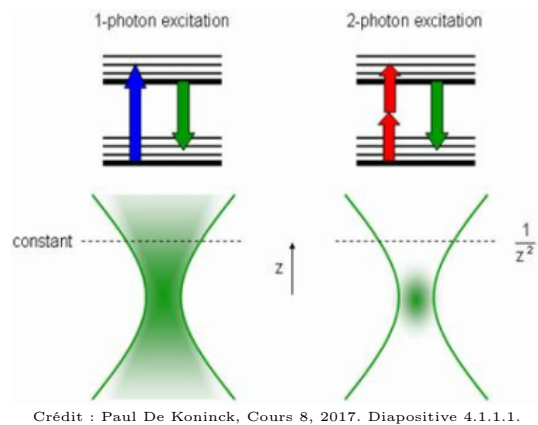


FIGURE 2: Illustration de l'émission de fluorescence en microscopie à un photon (gauche) et en microscopie à deux photons (droite).

2 Approche expérimentale

La section qui suit présente les différentes méthodes utilisées pour quantifier l'autofluorescence de la traquée intestinale du poisson zèbre selon différentes conditions ainsi que les méthodes préalables aux expériences.

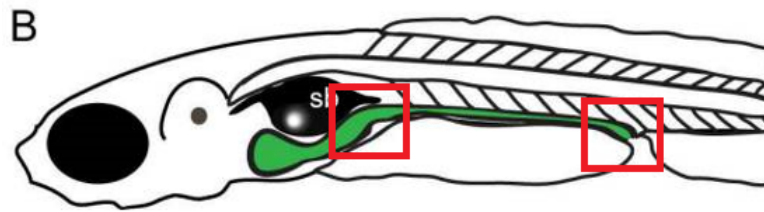
Toutes les manipulations des poissons zèbres sont acceptées par le Comité de protection des animaux de la direction des services vétérinaires de l'Université Laval (CPAUL).

2.1 Les soins apportés aux poissons zèbres

Pour l'entièreté de l'étude, les poissons sont conservés dans un incubateur (Iceless-CC40, Tritech Research DigiTherm, Los Angeles) à 28,5°C ayant un cycle jour/nuit intégré de 14/10 heures. L'eau des poissons est changée à leur arrivée et une fois par jour à partir de quatre dpf s'ils sont dans 10 mL d'eau. Sinon, lorsqu'ils sont dans des plaques de six puits, l'eau est changée deux fois par jour, soit matin et soir. Dès 24 hpf, les poissons sont traités au N-phénylthiocarbamide (PTU) (P7629, Millipore Sigma©, Allemagne) afin d'empêcher la production de mélanine et, de ce fait, empêche la formation de pigments sur la peau. Du PTU est ensuite ajouté à trois dpf et à chaque fois que l'eau est changée. De la nourriture sèche (Gemma Micro 300, Skretting Zebrafish©, États-Unis) commence à leur être administrée à partir de cinq dpf deux fois par jour, matin et soir. Si les conditions de l'expérience l'exigent, les poissons sont nourris seulement à partir de sept dpf. À 10 dpf, les *zebrafish* sont euthanasiés par immersion dans du méthanesulfonate de tricaine (MS-222) (Aqualife TMS, Syndel Canada), tel qu'indiqué par le CPAUL. Les protocoles détaillés sont documentés dans le GitHub de DCC-Lab dans le dossier Documentation [8].

2.2 La microscopie en deux-photons pour l'imagerie *in vivo*

Pour caractériser l'autofluorescence des intestins du poisson zèbre, les principales valeurs de longueur d'onde d'excitation employées sont 800, 940 et 1045 nm. Les images à 800 nm sont prises en utilisant un filtre d'émission 490/20, alors que celles à 940 nm sont prises avec deux filtres d'émission, 525/50 et 650/50. Les images prises à 1045 nm sont obtenues qu'avec le filtre d'émission 650/50. Pour ce qui est de l'excitation, celle-ci a été effectuée avec un laser à impulsion femtosecondes (InSight® X3™, Spectra-Physics). Pour la majorité des expériences, la puissance à l'échantillon est ajustée à $25,0 \pm 0,3$ mW à l'aide d'un puissance-mètre (PM100D, ThorLabs Inc., Allemagne) accompagné d'un senseur photodiode (S121C, ThorLabs Inc., Allemagne) pour éviter d'endommager les tissus. Il y a deux cas où une puissance différente de 25 mW est utilisée. Tout d'abord, la puissance est différente pour l'expérience sur l'alimentation à 1045 nm. En effet, pour cette longueur d'onde, une seconde sortie du laser est utilisée et la puissance maximale de cette sortie est inférieure à la sortie principale. Cette puissance maximale, soit $18,8 \pm 0,3$ mW, a donc été utilisée. L'autre cas est lors de l'analyse du spectre d'excitation (Section 2.3.4) où, en raison de l'exposition prolongée des poissons au laser, la puissance a été baissée à $20,0 \pm 0,1$ mW. Les images volumétriques sont des empilements d'images 8-bits RGB de 1000 x 500 pixels et sont prises à l'aide d'un objectif 40X (LUMPLFLN 40XW, © OLYMPUS CORPORATION). Puisque le cadre d'acquisition du microscope est trop petit pour prendre l'entièreté de la traquée intestinale en une seule acquisition, les poissons sont imagés au début (D) et/ou à la fin (F) du tube digestif le nombre de fois nécessaire selon les conditions de l'expérience (figure 3).



Crédit : Michael J. Taormina et al., 2014. Figure 1

FIGURE 3: Un poisson zèbre de 5 dpf représenté de façon schématisée. La région en vert représente le système digestif du poisson zèbre. Les régions encadrées en rouge correspondent aux endroits D et F imagés.

2.3 Les expériences sur l'autofluorescence

Dans cette section, les aspects techniques et protocolaires des quatre principales expériences de cette étude sont discutés en détail. Toutes les étapes préliminaires, telles que produire du E3 frais et stérile et apporter tous les soins nécessaires aux larves avant quatre dpf, comme indiqué à la section 2.1, sont effectuées avant et après chaque expérience. Les *zebrafish* sont conservés tous ensemble dans le même récipient jusqu'à leur imagerie où ils sont ensuite séparés individuellement dans des plaques de six puits pour suivre leur développement.

2.3.1 La nourriture et ses effets

Le tableau suivant (Tableau 1) précise les étapes employées pour étudier l'effet de la nourriture sur l'intensité de l'autofluorescence des intestins pendant trois jours, soit de quatre dpf à six dpf. Pour cette expérimentation, le D et la F de la traquée intestinale sont imagés une fois par jour pour chaque poisson, comme il est expliqué à la section 2.2. Une image volumétrique pour chaque longueur d'onde d'excitation employée, soit 800, 940 et 1045 nm, est prise pour chaque endroit prédéterminé de l'intestin, ce qui donne au final six images volumétriques par poisson par jour. Au total, 20 à 26 poissons sont imagés. Les deux groupes de poissons, nourris (N) et non nourris (NN), sont formés lors du changement d'eau à quatre dpf en AM. Toutes les étapes préliminaires sont exécutées de façon à maximiser la survie et le bon développement des embryons jusqu'à l'état larvaire afin que l'alimentation soit la seule condition qui distingue les deux groupes.

Tableau 1: Méthodologie pour l'expérience sur les effets de la nourriture sur l'intensité de l'autofluorescence

Temps	Étapes	4 dpf	5 dpf	6 dpf
AM	Changer eau et traitement au PTU	X	X	X
	Nourrir N		X	X
	Imager 10 à 16 NN	X	X	X
PM	Imager 10 à 16 N	X	X	X
	Changer eau et traitement au PTU	X	X	X
	Nourrir N		X	X

2.3.2 L'imagerie et son influence sur l'autofluorescence

Il est maintenant bien connu qu'un mode de vie stressant affecte les mouvements et les contractions de la traquée gastrointestinale, ce qui peut augmenter l'inflammation et possiblement rendre les individus touchés plus susceptibles aux infections [19, 39]. Pour la suite des expériences, il est alors important de savoir si l'imagerie précédente affecte l'imagerie actuelle d'une quelconque façon. Cette expérience a pour but d'avoir une idée générale et grossière de si l'imagerie affecte l'autofluorescence des intestins, principalement au niveau du photoblanchiment. Pour se faire, l'imagerie de seulement le début de la traquée intestinale à 940 nm est effectuée. Quatre poissons sont sélectionnés pour être imagés une fois par jour, alors que quatre poissons n'ayant jamais été imagés sont échantillonnés à chaque jour pour être imagés une fois. La suite des étapes est résumée dans le tableau 2.

Tableau 2: Méthodologie pour l'expérience sur les effets de l'imagerie

Temps	Étapes	4 dpf	5 dpf	6 dpf
AM	Changer eau et traitement au PTU	X	X	X
	Imager 1 à 4	X	X	X
PM	Imager 5 à 8	X		
	Imager 9 à 12		X	
	Imager 13 à 16			X
	Changer eau et traitement au PTU	X	X	X

2.3.3 La variation de l'intensité de l'autofluorescence dans le temps

Cette expérimentation comporte deux volets : dans le premier, quatre poissons NN sont imagés quatre fois par jour (à 9h, 11h, 13h et 15h), et dans le deuxième, 26 poissons divisés également en deux groupes, N et NN, sont imagés une fois par jour pendant trois jours. Le premier volet permet de vérifier la variation de l'intensité de l'autofluorescence pour le même individu en une journée, alors que le deuxième volet permet de vérifier si la distribution de l'autofluorescence varie sur une plus longue période de temps. Seulement le D de l'intestin est imagé à 940 nm pour le premier volet, alors que le deuxième volet réutilise les données recueillies pour l'expérience sur la nourriture de la section 2.3.1, mais les valeurs de fluorescence des même poissons sont comparées de jour en jour plutôt que de comparer les deux groupes de poissons (N et NN) entre eux. Le protocole adopté pour le premier volet de cette expérience est résumé dans le tableau 3, tandis que le protocole adopté pour le deuxième volet correspond au tableau 1 de la section 2.3.1.

Tableau 3: Méthodologie pour l'expérience sur la variation de l'intensité de l'autofluorescence en une journée

Étapes	4 dpf	5 dpf	6 dpf
Imager 1 à 4	X		
Imager 5 à 8		X	
Imager 9 à 12			X

2.3.4 La construction d'un spectre d'excitation

Pour construire un spectre d'excitation de l'autofluorescence verte et rouge (filtres 525/50 nm et 650/50 nm) des intestins du poisson zèbre, la longueur d'onde d'excitation est changée entre chaque acquisition pour produire un spectre d'excitation de 800 nm à 1100 nm. La puissance du laser est fixée à $20,0 \pm 0,1$ mW sur l'échantillon lors de chaque changement de longueur d'onde d'excitation. Les images volumétriques sont prises à toutes les intervalles de 25 nm, ce qui produit au total 13 images volumétriques uniquement du D de l'intestin de chaque poisson imagé. En somme, seulement deux poissons NN à six dpf sont imagés. Le tableau suivant (Tableau 4) résume les manipulations apportées pour la construction du spectre d'excitation.

Tableau 4: Méthodologie pour la construction dun spectre d'excitation de l'autofluorescence

Étapes	4 dpf	5 dpf	6 dpf
Imager poisson 1			X
Imager poisson 2			X

2.4 Le traitement des images volumétriques

2.4.1 L'extraction et la compilation des données

L'application *Fiji* est utilisée pour extraire les données d'autofluorescence des images volumétriques. Afin de pouvoir comparer l'intensité de l'autofluorescence des intestins entre les différents groupes, des valeurs d'intensité par volume (I/V) doivent être obtenues pour chaque acquisition. À cet effet, un filtre médian, utilisé pour les images volumétriques pris à 940 et 1045 nm, ou un filtre moyen, utilisé pour les images volumétriques pris à 800 nm, est d'abord appliqué sur les images. Celles-ci sont ensuite binarisées avec la méthode de moyenne et un seuil de (1,255) afin d'obtenir des images volumétriques binaires. De cette façon, il est possible de sélectionner la région correspondant à l'intérieur de l'intestin pour chaque plan de l'image volumétrique. Les régions d'intérêt (ROI) construisent le masque qui est appliqué sur l'image volumétrique brute ; pour chaque ROI, la somme des valeurs des pixels, correspondant à l'intensité de l'autofluorescence, et la somme du nombre de pixels, correspondant à l'aire, sont calculées. Les valeurs d' I/V sont alors obtenues en faisant la somme de la valeur d'intensité de chaque pixel pour tous les plans de l'image volumétrique et en divisant cette valeur par le nombre total de pixels dans toutes les ROI, tel que le décrit l'équation 1.

$$\frac{I}{V} = \frac{\sum \text{Valeur d'intensité de chaque pixel pour chaque plan}}{\text{Nombre total de pixels dans tout le volume}} \quad (1)$$

Cependant, pour les images volumétriques prises à 940 nm, le découpage des ROI est imprécis en raison d'une baisse du pouvoir de segmentation du filtre median pour de grandes valeurs de fluorescence. Pour tenter de remédier à ce manque d'exactitude, la fonction *subtract background* est utilisée pour mieux affiner la structure autofluorescente à l'étude. Puisque ceci a été remarqué après avoir obtenu des ROI avec la méthode du filtre médian, ces ROI déjà obtenues ont été utilisées pour obtenir un masque de régions d'intérêt générales. La fonction *subtract background* est ensuite appliquée dans ces zones à l'aide d'un macro (voir l'annexe V).

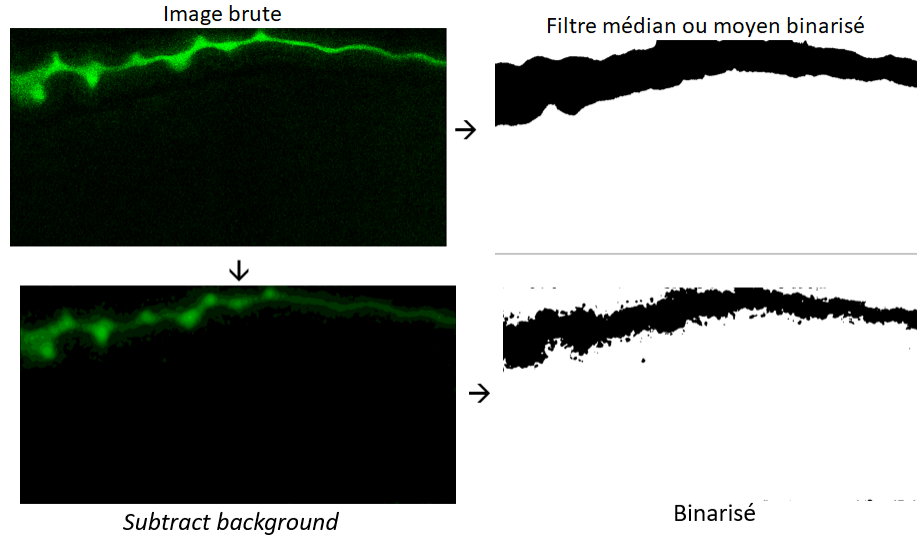


FIGURE 4: Illustration des différentes étapes pour l'extraction des régions d'intérêt

Un autre problème soulevé est que le bruit intrinsèque au microscope semble varier de façon aléatoire d'acquisition en acquisition. Ainsi, un bruit plus intense pour une acquisition tend à augmenter la valeur de la fluorescence ; cette variable doit être contrôlée. Pour minimiser l'effet de celle-ci, le bruit moyen est calculé pour chaque image volumétrique et soustrait de la valeur d'I/V préalablement obtenue. Ceci est effectué en traçant une région d'intérêt rectangulaire à un emplacement où aucune autofluorescence n'est recueillie et en calculant une moyenne de la valeur des pixels. Cette valeur de bruit moyen est alors soustraite de la valeur d'I/V trouvée auparavant tel que l'illustre l'équation 2.

$$\frac{I}{V_{bruit}} = \frac{\sum \text{Valeur d'intensité de chaque pixel pour chaque plan}}{\text{Nombre total de pixels dans tout le volume}} - \overline{Bruit} \quad (2)$$

2.4.2 Le traitement des données par les tests statistiques

Une fois que les mesures pour toutes les régions d'intérêt sont obtenues en format *.csv*, une fonction Matlab est utilisée pour traiter ces fichiers et calculer les valeurs d'I/V. Ces valeurs sont ensuite utilisées afin de comparer la fluorescence de divers échantillons de poissons. Plus précisément, le but est de dire s'il est probable ou non que les deux échantillons comparés proviennent de la même population. Ces comparaisons sont effectuées à l'aide de tests d'hypothèse. Toutefois, la majorité des tests de comparaisons exigent certaines conditions : les échantillons doivent provenir de populations dont la distribution est normale [12] et les échantillons doivent être indépendants [21]. Dans le domaine des statistiques, l'indépendance correspond à une notion probabiliste qualifiant des échantillons qui n'ont aucune influence l'un sur l'autre [11].

Pour s'assurer que la première condition est satisfaite, des tests de normalité sont effectués pour chaque échantillon. Afin d'augmenter la validité des résultats obtenus, quatre tests différents sont utilisés. Le premier est le test de Jarque-Bera qui utilise les coefficients d'asymétrie et d'aplatissement pour juger de la normalité [50]. Les deuxième et troisième tests sont les tests de Lilliefors et d'Anderson-Darling qui sont deux variantes du test de Kolmogorov-Smirnov [50]. Ceux-ci emploient la fonction de répartition empirique. Enfin, le dernier test est le test de Shapiro-Wilk qui utilise les quantiles pour évaluer la normalité [35]. Parmi ces quatre tests,

certaines études ayant pour but de comparer les différents tests de normalité semblent s'entendre sur le fait que le test de Shapiro-Wilk est le plus puissant [50, 37], surtout pour de petits échantillons tels que ceux présentés dans cette étude.

Une fois la normalité testée, les tests de comparaison sont effectués. Certains tests médians qui ne nécessitent pas la normalité sont également utilisés. Dans le cas où les échantillons sont indépendants, les tests utilisés sont le test de Kolmogorov-Smirnov à deux échantillons, le test de la somme des rangs de Wilcoxon et le test t à deux échantillons. Parmi ces trois tests, seulement le dernier demande la normalité et les deux premiers ne sont pas paramétriques [48], c'est-à-dire qu'ils ne font aucune hypothèse quant à la forme des distributions. Dans le cas où les échantillons sont dépendants, par exemple si les mêmes poissons sont comparés à quatre et cinq dpf, d'autres tests doivent être utilisés. Ceux-ci sont le test t pour échantillons appariés et le test des rangs signés de Wilcoxon.

Tous ces tests donnent une valeur p qui est alors comparée au seuil de signification α posé à 5% pour déterminer si l'hypothèse nulle, soit l'hypothèse à tester, est rejetée ou non.

3 Analyse

Avant de commencer l'analyse des résultats obtenus, il est important de mentionner qu'à 940 nm ainsi qu'à 1045 nm, certaines structures se démarquant par leur forte fluorescence, autant verte que rouge, sont observées chez quelques poissons (poisson 6 NN à cinq et six dpf, poisson 13 NN à six dpf et poisson 8 N à six dpf) à la fin de l'intestin (figure 5). Toutefois, trop peu de poissons ont été imagés pour affirmer que ce type de structure se trouve seulement à la fin de l'intestin et non au début chez certains poissons. Ces structures entraînent une hausse importante de la fluorescence pour ces zones (figure 6). Puisque ces structures ont été observées autant chez des poissons N que NN, ceci ne peut être de la nourriture. Dans tous les cas, ces acquisitions sont ignorées dans l'analyse, puisqu'elles écartent les distributions de la normalité. En effet, il est remarqué qu'en considérant ces valeurs d'I/V, les distributions de fluorescence ne correspondent pas à des distributions normales alors que, lorsque ces valeurs sont mises de côté, la normalité est retrouvée. Il est également important de mentionner que ces structures étaient peut-être présentes en fluorescence bleue à 800 nm, mais elles sont difficilement identifiable sans la fluorescence rouge puisque c'est celle-ci qui augmente le plus dans ces structures.

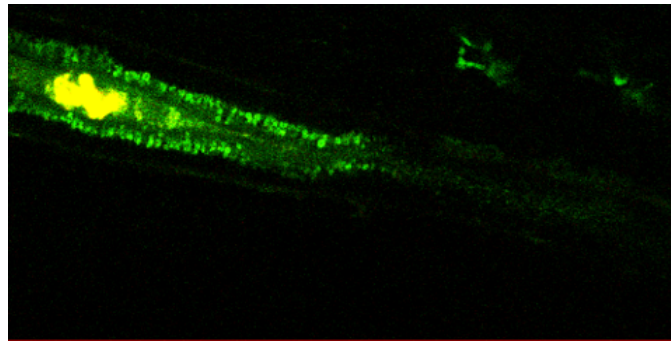


FIGURE 5: Exemple de structure très fluorescente dans la fin de l'intestin du poisson six NN

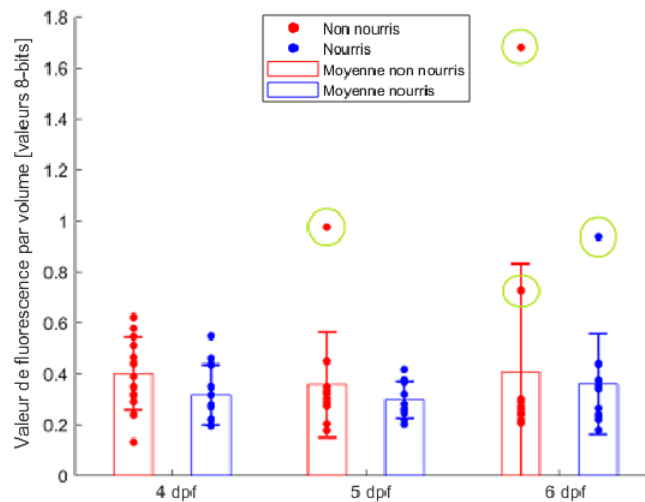


FIGURE 6: Illustration des valeurs de fluorescence élevées (cercles verts) obtenue en raison des structures fluorescentes

3.1 L'influence de l'alimentation

Le but de cette expérience est de vérifier si l'alimentation a un impact sur l'intensité de l'autofluorescence bleue, verte et rouge des tissus intestinaux. Deux groupes de poissons, N et NN, sont donc imagés une fois par jour pendant trois jours pour étudier cette condition. L'autofluorescence selon la diète est un aspect qui a été étudié auparavant chez la souris [15]. Plus précisément, il a été reporté que l'autofluorescence verte de l'abdomen ne semble pas varier selon la sorte de nourriture administrée à la souris, alors que l'autofluorescence rouge change dramatiquement lors d'une modification de la diète. En effet, il est reconnu dans le domaine que la chlorophylle contenu dans la nourriture donnée aux animaux émet une fluorescence rouge assez intense lorsqu'elle est excitée avec de la lumière UV [15, 43]. Puisque la nourriture utilisée dans cette présente étude ne semble pas contenir de chlorophylle selon le fabricant [51], l'autofluorescence rouge ne devrait pas être influencée par l'alimentation. C'est effectivement ce qui est obtenu comme résultat.

L'annexe III présente les résultats des tests de comparaison entre le D et la F de la traquée intestinale des deux groupes pour chaque jour concerné. Il est possible de remarquer que, pour la grande majorité des comparaisons effectuées, l'hypothèse nulle, soit que les deux échantillons proviennent de populations avec la même distribution de fluorescence, est acceptée. En d'autres mots, il ne semble pas y avoir de différence significative entre les poissons N et NN à quatre, cinq et six dpf, ce qui indique que la nourriture n'est pas assez fluorescente ou est présente en quantité assez faible pour qu'aucune distinction entre les deux groupes soit effectuée dans le cadre de cette expérience. Toutefois, il est possible de remarquer que, dans quelques cas, certains tests semblent relever une différence significative entre les groupes N et NN, principalement aux longueurs d'onde d'excitation de 800 nm et 1045 nm. Plusieurs causes d'incertitude pourraient expliquer cet écart. Tout d'abord, la méthode utilisée pour isoler les régions d'intérêt (Section 2.4.1) à 800 nm et 1045 nm est moins robuste que celle utilisée pour les images à 940 nm. Par la suite, il y a également l'incertitude par rapport au positionnement du poisson sous l'objectif du microscope ; si un poisson n'est pas bien placé horizontalement, les régions d'intérêt deviennent plus petites et plus nombreuses. L'incertitude sur l'obtention des régions d'intérêt devient alors importante. Enfin, la variabilité biologique entre en compte. Il est possible que, par hasard, certains échantillons contiennent majoritairement des valeurs extrême de la distribution et que ceci entraîne le rejet de l'hypothèse nulle.

3.2 L'influence de l'imagerie

Cette expérience rapide a pour but d'assurer qu'il n'y ait pas d'effet majeur causé par l'imagerie sur l'autofluorescence. La figure 7 montre les résultats obtenus après avoir imagé quatre poissons à tous les jours pendant trois jours en plus de 12 autres poissons qui sont imagés une seule fois, soient quatre par jour. Puisque les échantillons sont très petits, une comparaison quantitative ne peut pas être faite. Toutefois, en regardant les moyennes, il est possible d'avoir une idée générale de si l'imagerie affecte l'autofluorescence intestinale. Il est possible de remarquer, en observant la figure 7, qu'il ne semble pas y avoir de baisse d'intensité de l'autofluorescence due au photoblanchiment, puisque la moyenne des valeurs pour les poissons imagés à tous les jours est supérieure à celle des poissons imagés une seule fois, et ce dans presque tous les cas. De plus, puisque les valeurs d'autofluorescence sont dans le même ordre de grandeur tant pour les poissons imagés tous les jours que pour ceux imagés une seule fois, il est à conclure que l'imagerie ne semble pas grandement affecter l'autofluorescence. Cependant, il n'est pas possible de confirmer que les poissons ne vivent pas un stress intense par l'imagerie.

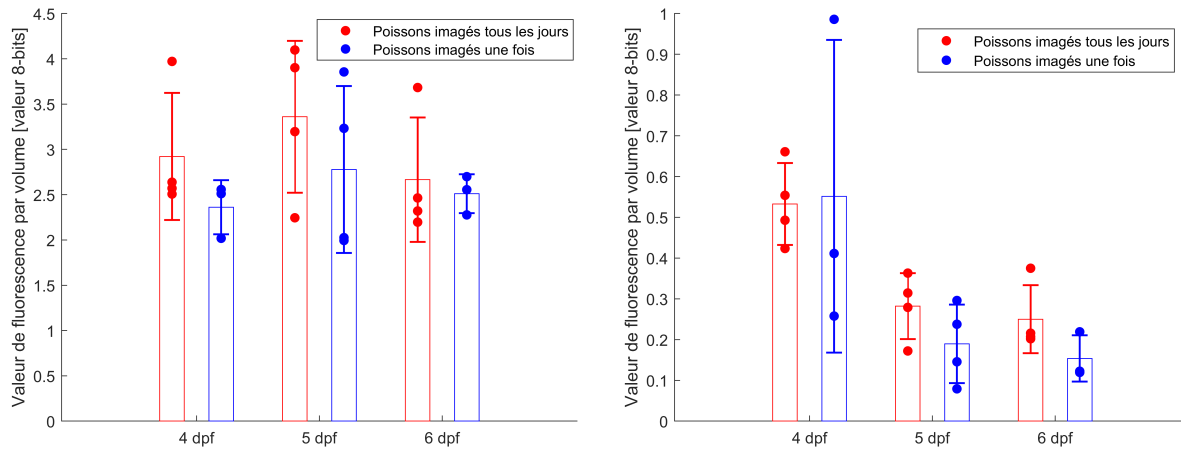


FIGURE 7: Valeurs d'I/V obtenues pour des poissons imagés à tous les jours pendant quatre jours et des poissons imagés seulement une fois. Les colonnes de l'histogramme indiquent la moyenne et la barre d'erreur représente l'écart type.

3.3 L'intensité de l'autofluorescence dans le temps

Cette section porte sur la variation de l'intensité de l'autofluorescence des intestins du *zebrafish* en une journée et sur une période de trois jours. Pour étudier la variation en une journée, quatre poissons différents sont sélectionnés à quatre, cinq et six dpf pour les imager à quatre moments différents de la journée. Les résultats pour quatre, cinq et six dpf sont présentés aux figures 8, 9 et 10, respectivement. Ces figures illustrent une variation de l'autofluorescence assez importante durant la journée. Par contre, les variations semblent aléatoires et aucune corrélation entre les différents poissons n'a pu être relevée. Toutefois, puisque les données ne sont pas analysées quantitativement en raison de la faible taille des échantillons étudiés, il est difficile de déterminer avec certitude si cette variation est significative ou non. De plus, les incertitudes présentées à la section 3.1, notamment celle due au positionnement du poisson et celle due au fait que la zone imagée n'est pas exactement la même à chaque acquisition, jouent probablement un rôle dans les variations observées.

À la lumière de ces résultats, afin de réduire l'effet des différentes variabilités, il est conclu qu'il vaut mieux comparer des distribution de poissons que de seulement étudier un poisson par lui-même. De plus, l'étude de la variation en une journée est délaissée au profit d'une analyse de la variation en trois jours, ce contexte étant plus représentatif des autres expériences, notamment de celle sur la nourriture (section 2.3.1). Pour chaque groupe de poisson (NN et N) et pour chaque zone imagée (D et F de l'intestin), trois comparaisons sont effectuées : la comparaison entre quatre et cinq dpf, celle entre cinq et six dpf et celle entre quatre et six dpf, et ce à l'aide des tests pour échantillons dépendants présentés à la section 2.4.2. Les résultats sont rapportés dans les tableaux de l'annexe IV. Ces résultats montrent que, dans la majorité des cas, aucune distinction ne peut être relevée entre les distributions de fluorescence de jour en jour. Toutefois, il y a tout de même quelques cas où les tests statistiques indiquent une différence entre les distributions. Ces résultats peuvent être causés par la variabilité biologique, de même que par les causes d'erreur énoncées à la section 3.1.

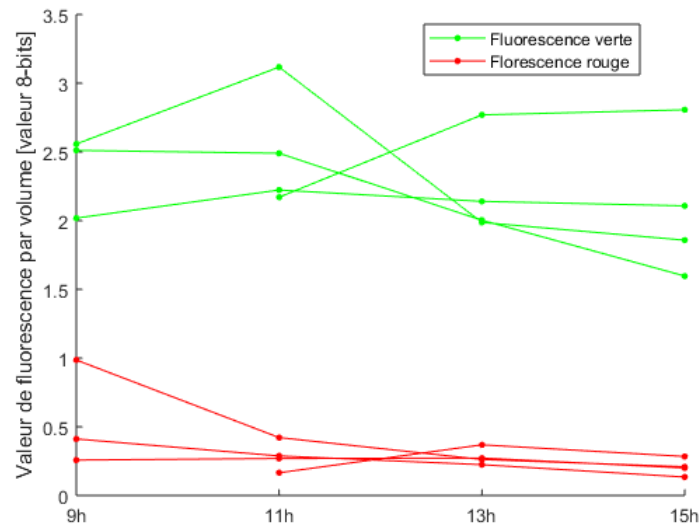


FIGURE 8: Graphique de la variation de la fluorescence au cours de la journée à quatre dpf. L'excitation est à 940 nm et seulement le D de l'intestin est imagé.

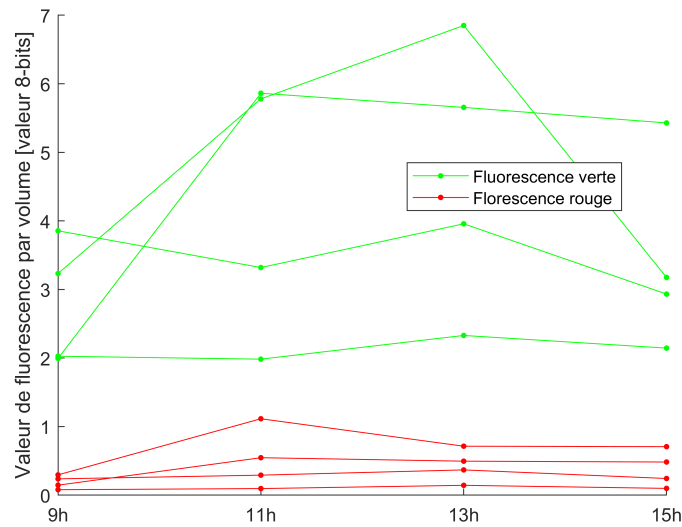


FIGURE 9: Graphique de la variation de la fluorescence au cours de la journée à cinq dpf. L'excitation est à 940 nm et seulement le D de l'intestin est imagé.

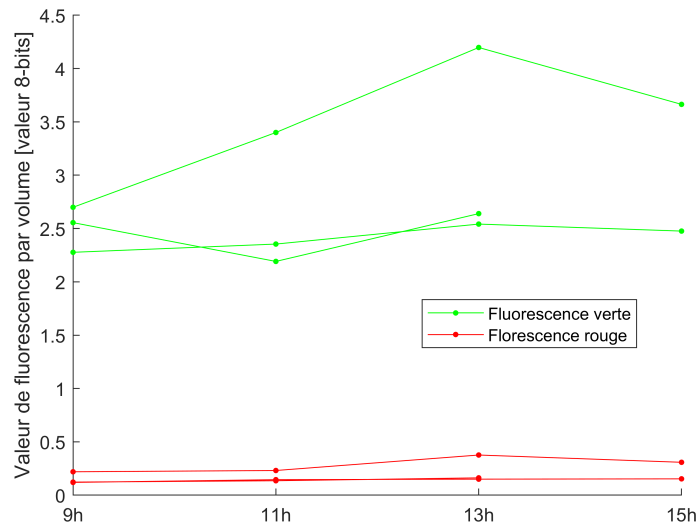


FIGURE 10: Graphique de la variation de la fluorescence au cours de la journée à six dpf. L'excitation est à 940 nm et seulement le D de l'intestin est imagé.

Aussi, lors de l'extraction des données des images volumétriques des poissons, il a été observé que les masques pour les images volumétriques prises à 800 et 1045 nm ne couvrent peut-être pas tout l'intérieur de l'intestin, considérant la très faible intensité de l'auto fluorescence détectée. Les données prises à 940 nm sont probablement plus précises compte tenu de la forte intensité de l'auto fluorescence, facilitant ainsi la construction du masque et le rendant plus sélectif. Alors, les distinctions entre les distributions à 800 et 1045 nm sont possiblement influencées par un découpage moins précis lors de la construction des ROI. Néanmoins, il ne faut pas ignorer complètement ces résultats ; le D de l'intestin des poissons N serait différent de quatre à cinq dpf à 800 et 940 nm dans le rouge. Il en est de même pour le début des poissons N à 940 nm, tant dans le vert que dans le rouge, en plus d'à 1045 nm ainsi que la fin des poissons NN de quatre à six dpf pour l'auto fluorescence rouge, autant à 940 qu'à 1045 nm. C'est à savoir si, avec une plus grande taille d'échantillonnage, une tendance plus marquée ressortirait de ces résultats.

3.4 Le spectre d'excitation

Pour cette partie de l'étude, le D des intestins de deux poissons NN sont imagés à des longueurs d'onde différentes allant de 800 à 1100 nm par incréments de 25 nm pour construire un spectre d'excitation de l'auto fluorescence verte et rouge. Toutefois, les valeurs d'I/V des longueurs d'onde supérieures à 1025 nm sont ignorées puisque la fluorescence est trop faible pour bien discerner l'intestin. Les spectres obtenus après traitement sont présentés à la figure 11. Le premier point important à tirer de ces résultats est que le pic maximal d'excitation se situe autour de 825 nm, autant pour l'auto fluorescence verte que rouge. Puisque les spectres d'excitation de des deux couleurs coïncident, il est fort probable que l'auto fluorescence provienne de la même structure ou du même composé. Le deuxième point important à noter est que l'auto fluorescence rouge est plus faible que l'auto fluorescence verte d'environ un facteur 10. À la lumière de ces résultats, il semble plus approprié d'utiliser un fluorophore qui émet à haute longueur d'onde afin de minimiser l'excitation et l'amplitude de l'auto fluorescence des intestins lorsqu'il est temps d'imager le microbiote intestinal.

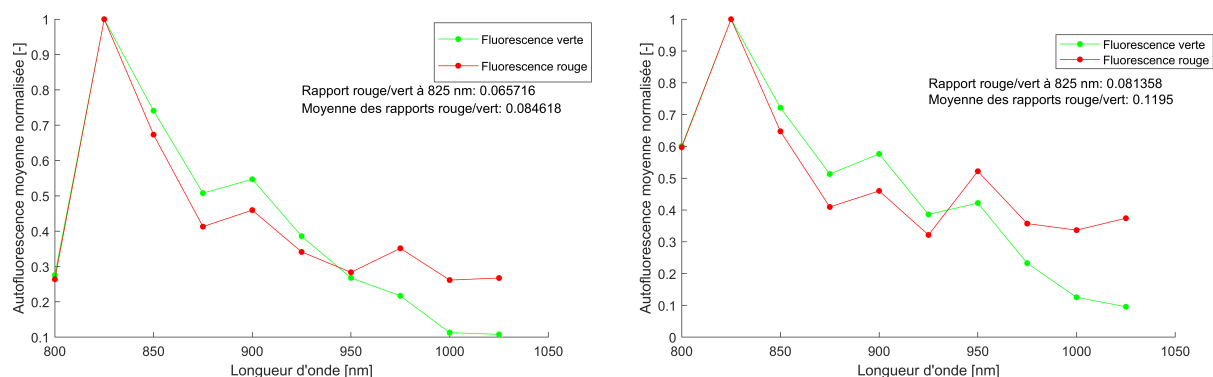


FIGURE 11: Spectres d'excitation normalisés obtenus pour le début de l'intestin des deux poissons NN. On retrouve sur le graphique la valeur du rapport entre la fluorescence maximale rouge sur la fluorescence maximale verte (825 nm) et la moyenne de ce même rapport pour chaque longueur d'onde.

3.5 Les causes de l'autofluorescence

Certains microorganismes ont des propriétés fluorescentes intrinsèques bien propre. Le microbiote peut donc être la cause de l'autofluorescence intestinale. Par exemple, *Escherichia coli* (*E.coli*) est reconnu pour sa grande production extracellulaire de flavines [26, 29, 49, 7], une catégorie de coenzymes ubiquitaires cruciale au métabolisme de plusieurs organismes vivants [49]. Les flavines incluent la riboflavine, la flavine adénine dinucléotide (FAD) et la flavine mononucléotide (FMN). La forme oxydée des flavines s'avère être fluorescente à 500-560 nm lorsqu'elle est excitée à 450-490 nm [29, 26, 49], ce qui correspond exactement à la plage de longueur d'onde dans le vert captée par les détecteurs dans cette étude. Il en est de même pour *Pseudomonas fluorescens* [29, 7], une bactérie aerobie étant naturellement retrouvée dans l'eau et les excréments [6], et les espèces faisant parties du genre *Shewanella* [7]. Puisque la famille Enterobacteriaceae et les genres *Pseudomonas* et *Shewanella* ont déjà été détectés par Brendan JM Bohannan et son groupe dans le microbiote intestinal du zebrafish [41], il est possible que ces microorganismes soient la cause de l'autofluorescence verte de l'intestin du poisson zèbre. Aussi, l'autofluorescence bleue peut provenir des microorganismes de l'ordre Legionellales et du genre *Mycobacterium*, ceux-ci ayant aussi été identifiés dans le microbiote intestinal du poisson zèbre [41]. En effet, le genre *Legionella* excrète la legioliulin, un composé de l'isocoumarine [1]. Cette molécule a des propriétés fluorescentes dans la région étudiée de 480-500 nm lorsqu'elle est excitée à 330-385 nm au microscope à un photon [1, 31, 40], ce qui rejoint approximativement le 800 nm utilisé dans cette expérience pour visualiser l'autofluorescence bleue. De plus, il est aussi connu que *Mycobacterium smegmatis* et *Mycobacterium tuberculosis* produisent une fluorescence bleue lorsqu'ils sont sous de la lumière de 390-430 nm au microscope à un photon [34, 47], des longueurs d'onde équivalant pratiquement aux conditions employées dans cette étude. Force est de constater que l'autofluorescence bleue et verte visualisée dans les images volumétriques est très probablement corrélée avec la composition du microbiote intestinal du poisson zèbre.

Outre les microorganismes, il a été montré que les cellules émettent de l'autofluorescence selon leur métabolisme et leur stade de développement [33, 42, 22, 13]. Considérant le spectre d'excitation (Section 3.4), il semble n'avoir qu'un seul pic maximal d'excitation pour l'autofluorescence verte et rouge des intestins, ce qui laisse croire qu'une seule structure ou molécule cause cette autofluorescence. En effet, l'autofluorescence bleue, verte et rouge peut provenir de lipofuscines, des cellules pigmentaires composées de débris cellulaires. Ce sont plus spécifiquement des lysosomes secondaires intracellulaires qui apparaissent lorsque les tissus sont en voie de sénescence ou de dégénération [18]. Elles sont fréquemment présentes dans les cellules présentatrices d'antigènes [33], un groupe hétérogène de cellules immunitaires qui évaluent et procèdent la réponse

immunitaire [32]. Ces lipopigments ont des propriétés autofluorescentes principalement jaunes [18, 33]. Par contre, le spectre d'émission de son autofluorescence est assez large pour couvrir autant le bleu que le rouge [28, 17, 33], mais en plus faible intensité d'émission, ce qui correspond à ce qui est obtenu tout au long de l'étude. Aussi, il est à noter que la fluorescence émise par les lipofuscines est maximale sous la lumière UV au microscope à un photon, ce qui équivaut à environ 800 nm pour une excitation à deux photons. En prenant en compte le pic maximal d'excitation de 825 nm obtenu lors de la construction du spectre d'excitation (Section 3.4), l'hypothèse que l'autofluorescence des intestins du poisson zèbre provienne des lipofuscines devient de plus en plus fondée.

D'ailleurs, des études antérieures ont montré qu'un manque de vitamine E chez le singe, le hamster, le chien et le rat peut causer de la pigmentation brunâtre dans le petit intestin, correspondant à de l'accumulation de lipofuscines dans les tissus intestinaux [10, 16]. En effet, puisque les lipofuscines sont principalement formées par l'oxydation d'acides gras, un manque de puissants antioxydants, tels que la vitamine E, pourrait encourager la formation de lipofuscines [10]. D'autre part, ces pigments sont typiques de patients ayant le syndrome de l'intestin irritable, reconnu maintenant comme étant causé par un déficit en vitamine E chez l'humain [24, 27].

Par conséquent, l'autofluorescence des intestins des poissons NN fait preuve de la présence possible de lipofuscines, puisqu'ils n'ont aucun apport en vitamine E. N'ayant que 0,075 % de vitamine E dans la nourriture utilisée dans cette présente étude [51], il est possible que les poissons zèbres N n'ingèrent pas assez de vitamine E et qu'eux aussi subissent les mêmes conséquences. De recherches plus poussées sur le sujet seraient nécessaires afin d'affirmer avec certitude que ces derniers énoncés sont véridiques. Par contre, il a été prouvé qu'un manque de vitamine E dans la diète du poisson zèbre cause des anomalies morphologiques et augmente le pourcentage de mortalité [30, 23]; une concentration de 5% (m/m) de vitamine E dans la nourriture du poisson zèbre suffit pour empêcher ces aberrances développementales [30]. En considérant ces faits, il est très plausible que l'autofluorescence des intestins soit causée par des lipofuscines, eux-mêmes étant causés par un déficit en vitamine E.

4 Dans le futur

Les causes de l'autofluorescence des intestins du poisson zèbre restent encore inconnues. Par contre, compte tenu du fait que plusieurs microorganismes étant présents dans le microbiote intestinal du *zebrafish* ont des propriétés fluorescentes, il serait intéressant de refaire certaines expériences présentées dans cette étude avec des poissons axéniques. De cette façon, le microbiote intestinal est éliminé des causes possible de l'autofluorescence intestinale. Peut-être que des différences développementales pourraient aussi être décelées chez les poissons axéniques, ce qui livre plus d'informations quant à l'influence du microbiote sur le développement du poisson zèbre.

En plus, au lieu de prendre l'autofluorescence comme un aspect négatif de l'imagerie, il est aussi possible d'utiliser cette propriété endogène des molécules/groupements des tissus biologiques pour distinguer différents types cellulaires et éléments fonctionnels pendant les processus dynamiques de la voie digestive [33, 20]. Par conséquent, il serait intéressant de caractériser le développement des intestins du poisson zèbre en utilisant son autofluorescence.

Par ailleurs, la microscopie HiLo est une alternative intéressante pour étudier les différents aspects du développement du cerveau du poisson zèbre tout en modifiant son microbiote intestinal. En effet, la construction d'un microscope HiLo permettrait non seulement d'imager facilement et rapidement le cerveau d'un poisson zèbre transgénique, mais aussi de caractériser son développement selon les modifications apportées au microbiote intestinal.

5 Conclusion

Le but de cette étude est de quantifier l'autofluorescence bleue (480 à 500 nm), verte (filtre 500 à 550 nm) et rouge (625-675 nm) des intestins du poisson zèbre entre quatre et six jours après leur fertilisation, soit au moment où les intestins commencent à être fonctionnels. En utilisant des méthodes d'imagerie telles que la microscopie deux-photons, il est possible d'obtenir des images volumétriques du D et de la F de la traquée intestinale du *zebrafish*. Les données d'I/V sont obtenues pour chacune d'entre elles en les traitant avec un masque qui leur est propre. Des analyses statistiques permettent par la suite de comparer différents groupes de *zebrafish* selon des conditions distinctes. Suite à cette analyse, les résultats indiquent que ; la nourriture et l'imagerie n'affectent pas ou peu l'intensité de l'autofluorescence intestinales ; celle-ci peut varier en une journée donnée, mais que sa distribution statistique ne varie pas de façon significative sur une plus longue période de temps ; l'excitation maximale à deux photons est à 825 nm. Ces résultats laissent croire que les lipofuscines et/ou le microbiote intestinal sont les causes les plus probables de l'autofluorescence. Aussi, l'absence de variation d'intensité de l'autofluorescence prouve que le développement n'influence pas l'autofluorescence, du moins pas pour cette fenêtre temporelle. La prochaine étape serait de refaire le spectre d'excitation avec un échantillon plus grand nombre de poissons, permettant d'en apprendre plus sur les causes de l'autofluorescence. Aussi, il serait intéressant d'étudier l'autofluorescence intestinale chez les poissons axéniques. Somme toute, cette étude permet à la communauté scientifique d'en apprendre plus sur le poisson zèbre et son imagerie, une étape cruciale pour étudier l'effet du microbiote intestinal sur le développement et le fonctionnement du cerveau.

Références

- [1] J. AMEMURA-MAEKAWA et al. « Legioliulin, a new isocoumarin compound responsible for blue-white autofluorescence in *Legionella* (*Fluoribacter*) *dumoffii* under long-wavelength UV light ». In : *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 323.3 (oct. 2004), p. 954–959.
- [2] J. M. BATES et al. « Distinct signals from the microbiota promote different aspects of zebrafish gut differentiation ». In : *Dev. Biol.* 297.2 (sept. 2006), p. 374–386.
- [3] K.P.R. BENNINGER et D.W. PISTON. « Two-Photon Excitation Microscopy for the Study of Living Cells and Tissues ». In : *Curr Protoc Cell Biol.* (Juin 2013), p. 3–8.
- [4] Mário Nuno Berberan-Santos BERNARD VALEUR. *Molecular Fluorescence : Principles and Applications*. 1. 2012, p. 274.
- [5] L. BORRELLI et al. « Probiotic modulation of the microbiota-gut-brain axis and behaviour in zebrafish ». In : *Sci Rep* 6 (juil. 2016), p. 30046.
- [6] Robert S. BREED et al. *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*. 7. 1957.
- [7] H. von CANSTEIN et al. « Secretion of flavins by *Shewanella* species and their role in extracellular electron transfer ». In : *Appl. Environ. Microbiol.* 74.3 (fév. 2008), p. 615–623.
- [8] DCCLAB. *Documentation, Zebrafish*. <https://github.com/DCC-Lab>. 2018.
- [9] Paul DE KONINCK. « Introduction à la biophotonique - BPH-2001 ». Cours en ligne. 2017.
- [10] B. FOX. « Lipofuscinosis of the gastrointestinal tract in man ». In : *J. Clin. Pathol.* 20.6 (nov. 1967), p. 806–813.
- [11] Nathaniel GBENRO. *Correlation vs Indépendance*. 2017. URL : <https://n2s.hypotheses.org/1> (visité le 02/09/2018).
- [12] A. GHASEMI et S. ZAHEDIASL. « Normality Tests for Statistical Analysis : A Guide for Non-Statisticians ». In : *International Journal of Endocrinology & Metabolism* 10 (2012), p. 486–489.
- [13] M. HOECHL & C. RICHTER H. ANDERSSON T. BAECHI. « Autofluorescence of living cells ». In : *Journal of Microscopy* 191.1 (juil. 1998), p. 1–7.
- [14] Fabrice HARMS. « Imagerie des tissus à haute résolution en profondeur par tomographie de cohérence optique plein champ : approches instrumentales et multimodales pour l'application au diagnostic per-opératoire ». In : *Physique. Université Pierre et Marie Curie - Paris VI* 1 (2015), p. 16.
- [15] Y. INOUE et al. « Diet and abdominal autofluorescence detected by in vivo fluorescence imaging of living mice ». In : *Mol Imaging* 7.1 (2008), p. 21–27.
- [16] M. L. KATZ, A. B. GROOME et W. G. ROBISON. « Localization of lipofuscin in the duodenum of vitamin E-deficient rats ». In : *J. Nutr.* 115.10 (oct. 1985), p. 1355–1365.
- [17] M. L. KATZ et M. NORBERG. « Influence of dietary vitamin A on autofluorescence of leupeptin-induced inclusions in the retinal pigment epithelium ». In : *Exp. Eye Res.* 54.2 (fév. 1992), p. 239–246.
- [18] M. L. KATZ et W. G. ROBISON. « What is lipofuscin ? Defining characteristics and differentiation from other autofluorescent lysosomal storage bodies ». In : *Arch Gerontol Geriatr* 34.3 (2002), p. 169–184.
- [19] Anthony L. KOMAROFF. *The gut-brain connection*. 2018. URL : <https://www.health.harvard.edu/diseases-and-conditions/the-gut-brain-connection> (visité le 28/08/2018).
- [20] S. KRETSCHMER et al. « Autofluorescence multiphoton microscopy for visualization of tissue morphology and cellular dynamics in murine and human airways ». In : *Lab. Invest.* 96.8 (août 2016), p. 918–931.
- [21] M. KRZYWINSKI et N. ALTMAN. « Comparing samples — part I ». In : *Nature Methods* 11 (mar. 2014), p. 215–216.
- [22] J. R. LAKOWICZ et al. « Fluorescence lifetime imaging of free and protein-bound NADH ». In : *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 89.4 (fév. 1992), p. 1271–1275.
- [23] K. M. LEBOLD et al. « Vitamin E deficiency decreases long-chain PUFA in zebrafish (*Danio rerio*) ». In : *J. Nutr.* 141.12 (déc. 2011), p. 2113–2118.
- [24] Sun Ah LEE et al. « Brown Bowel Syndrome that Developed after Total Gastrectomy - A Case Report - ». In : *The Korean Journal of Pathology* 42.3 (2008), p. 165–168.

- [25] L. A. LOWERY et al. « Characterization and classification of zebrafish brain morphology mutants ». In : *Anat Rec (Hoboken)* 292.1 (jan. 2009), p. 94–106.
- [26] Cindy MADDERA, Shelly THEISS et Amy HUSEBY. *Autofluorescence of Bacteria*. 2018. URL : <http://microbiology.okstate.edu/faculty/jtblank/JTB%5C%20Web%5C%20site%5C%20Aug%5C%2000.htm> (visité le 28/08/2018).
- [27] Guido MAJNO et Isabelle JORIS. *Cells, Tissues, and Disease : Principles of General Pathology*. Août 2004, p. 104.
- [28] A. D. MARMORSTEIN et al. « Spectral profiling of autofluorescence associated with lipofuscin, Bruch's Membrane, and sub-RPE deposits in normal and AMD eyes ». In : *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 43.7 (juil. 2002), p. 2435–2441.
- [29] I. MIHALCESCU et al. « Green autofluorescence, a double edged monitoring tool for bacterial growth and activity in micro-plates ». In : *Phys Biol* 12.6 (déc. 2015), p. 066016.
- [30] G. W. MILLER et al. « Zebrafish (*Danio rerio*) fed vitamin E-deficient diets produce embryos with increased morphologic abnormalities and mortality ». In : *J. Nutr. Biochem.* 23.5 (mai 2012), p. 478–486.
- [31] R. R. MUDER et V. L. YU. « Infection due to *Legionella* species other than *L. pneumophila* ». In : *Clin. Infect. Dis.* 35.8 (oct. 2002), p. 990–998.
- [32] © Springer NATURE. *Antigen-presenting cells*. 2018. URL : <https://www.nature.com/subjects/antigen-presenting-cells> (visité le 28/08/2018).
- [33] R. ORZEKOWSKY-SCHROEDER et al. « In vivo spectral imaging of different cell types in the small intestine by two-photon excited autofluorescence ». In : *J Biomed Opt* 16.11 (nov. 2011), p. 116025.
- [34] S. PATINO et al. « Autofluorescence of mycobacteria as a tool for detection of *Mycobacterium tuberculosis* ». In : *J. Clin. Microbiol.* 46.10 (oct. 2008), p. 3296–3302.
- [35] Ricco RAKOTOMALALA. *Tests de normalité : Techniques empiriques et tests statistiques*. 2011. URL : http://eric.univ-lyon2.fr/~ricco/cours/cours/Test_Normalite.pdf (visité le 03/09/2018).
- [36] J. F. RAWLS, B. S. SAMUEL et J. I. GORDON. « Gnotobiotic zebrafish reveal evolutionarily conserved responses to the gut microbiota ». In : *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 101.13 (mar. 2004), p. 4596–4601.
- [37] N.M. RAZALI et B.W. YAP. « Power comparisons of Shapiro-Wilk, Kolmogorov-Smirnov, Lilliefors and Anderson-Darling tests ». In : *Journal of Statistical Modeling and Analytics* 2 (2011), p. 21–33.
- [38] Howe DG & Bradford YM & Conlin T & Eagle AE & Fashena D & Frazer K & Knight J & Mani P & Martin R & Moxon S & Paddock H & Pich C & Ramachandran S & Ruef BJ & Ruzicka L et SCHAPER K & SHAO X & SINGER A & SPRUNGER B & VAN SLYKE CE & WESTERFIELD M. *ZFIN, the Zebrafish Model Organism Database : increased support for mutants and transgenics*. *Nucleic Acids Res.* 2013. URL : <http://zfin.org/> (visité le 11/06/2018).
- [39] © Gastrointestinal SOCIETY. *Stress and Your Gut*. 2018. URL : <https://www.badgut.org/information-centre/a-z-digestive-topics/stress-and-your-gut/> (visité le 28/08/2018).
- [40] THE LEGIONELLA EXPERTS SPECIAL PATHOGENS LABORATORY. *Blue White Legionella*. 2018. URL : <https://www.specialpathogenslab.com/blue-white-legionella.php> (visité le 28/08/2018).
- [41] W. Z. STEPHENS et al. « The composition of the zebrafish intestinal microbial community varies across development ». In : *ISME J* 10.3 (mar. 2016), p. 644–654.
- [42] S.Y. Ruff & J.F. Adur & M. Bianchi & et V.H. CASCO. « Autofluorescence of the Intestinal Mucosa in a Mouse Colorectal Cancer Model ». In : *Springer International Publishing Switzerland* 49 (2015), p. 437–440.
- [43] P. TALAMOND, J. L. VERDEIL et G. CONEJERO. « Secondary metabolite localization by autofluorescence in living plant cells ». In : *Molecules* 20.3 (mar. 2015), p. 5024–5037.
- [44] Ulrike TAUER. « Advantages and risks of multiphoton microscopy in physiology ». In : *Experimental Physiology* 87.6 (août 2002), p. 712.
- [45] K. N. WALLACE et M. PACK. « Unique and conserved aspects of gut development in zebrafish ». In : *Dev. Biol.* 255.1 (mar. 2003), p. 12–29.
- [46] K. N. WALLACE et al. « Intestinal growth and differentiation in zebrafish ». In : *Mech. Dev.* 122.2 (fév. 2005), p. 157–173.

- [47] C. WONG et al. « Differentiating between live and dead *Mycobacterium smegmatis* using autofluorescence ». In : *Tuberculosis (Edinb)* 101S (déc. 2016), S119–S123.
- [48] XLSTATS. *Which statistical test should you use ?* 2017. URL : <https://help.xlstat.com/customer/en/portal/articles/2062457-which-statistical-test-should-you-use-> (visité le 03/09/2018).
- [49] L. YANG et al. « Detection and quantification of bacterial autofluorescence at the single-cell level by a laboratory-built high-sensitivity flow cytometer ». In : *Anal. Chem.* 84.3 (fév. 2012), p. 1526–1532.
- [50] B.W. YAP et C.H. SIM. « Comparisons of various types of normality tests ». In : *Journal of Statistical Computation and Simulation* 81 (déc. 2011), p. 2141–2155.
- [51] SKRETTING ZEBRAFISH. *GEMMA Micro 75*. 2018. URL : <https://zebrafish.skrettingusa.com/products/gemma-micro-75> (visité le 26/08/2018).

Annexe I - Résultats de l'expérience sur l'effet de la nourriture

Cette annexe présente les résultats de fluorescence obtenus dans le cadre de l'expérience sur l'effet de la nourriture sur l'auto fluorescence. La valeur de fluorescence correspond à l'intensité par volume décrite à la section 2.4.1.

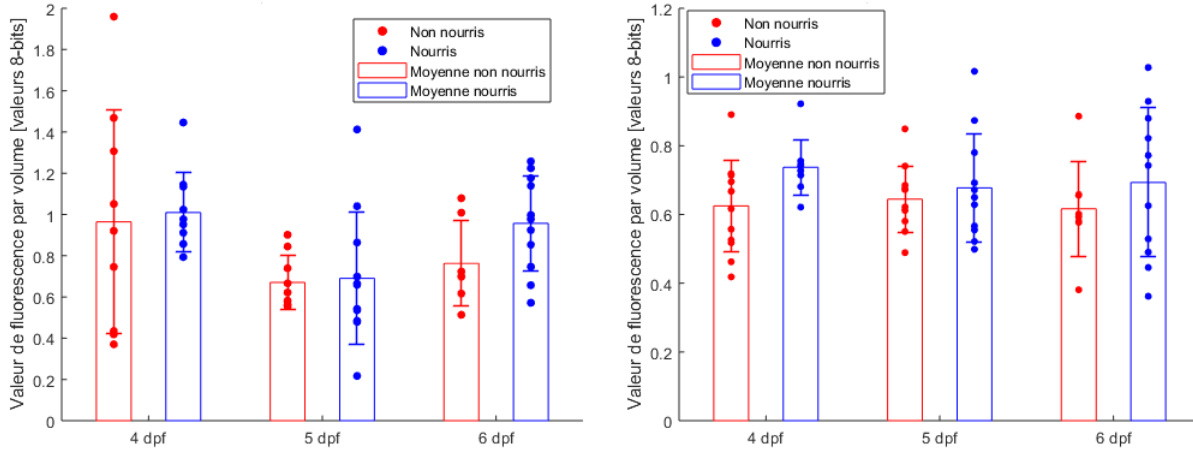


FIGURE 12: Distributions de l'auto fluorescence bleue (480 à 500 nm) obtenue sur trois jours avec une excitation à 800 nm pour le D (gauche) et la F (droite) de l'intestin. Les barres d'erreur correspondent à l'écart type.

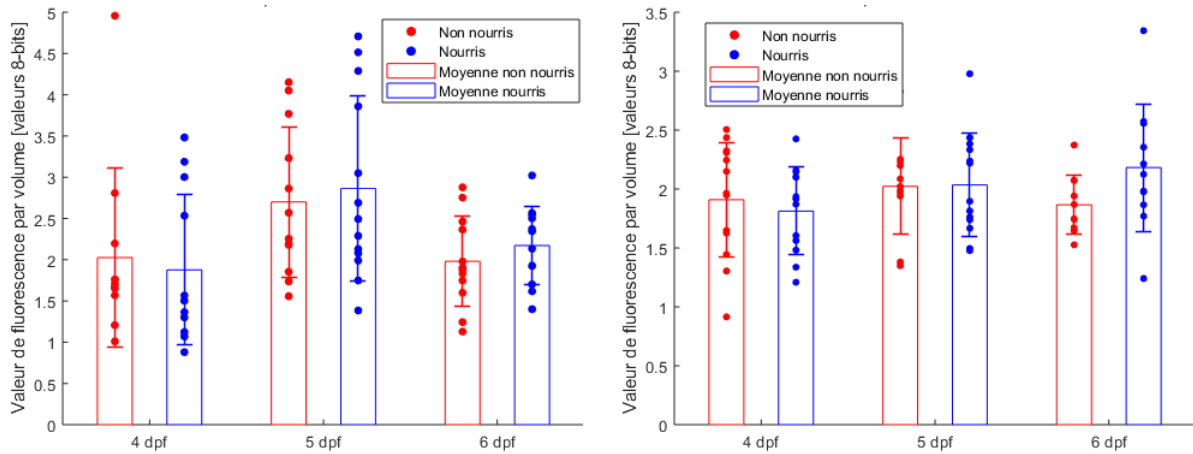


FIGURE 13: Distributions de l'auto fluorescence verte (500 à 550 nm) obtenue sur trois jours avec une excitation à 940 nm pour le D (gauche) et la F (droite) de l'intestin. Les barres d'erreur correspondent à l'écart type.

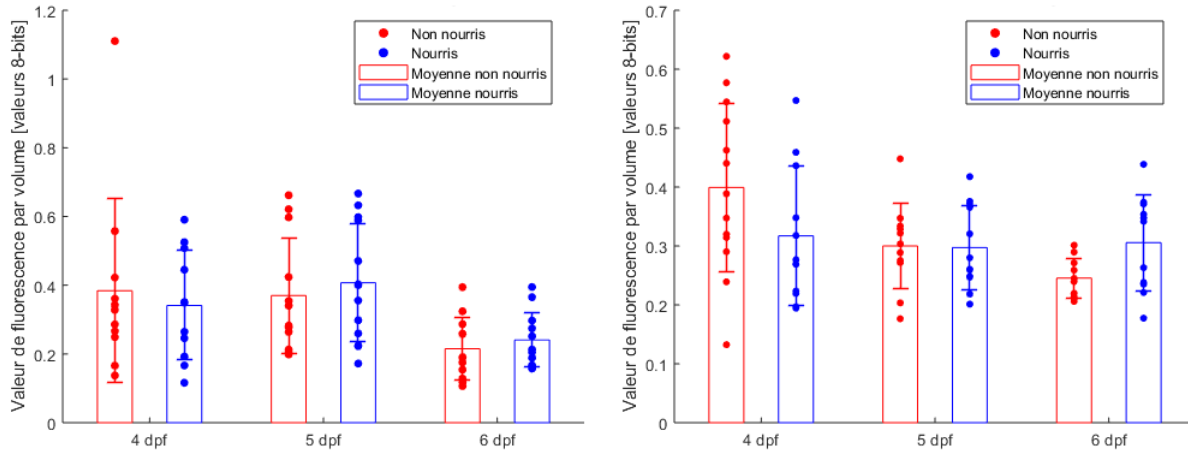


FIGURE 14: Distributions de l'autofluorescence rouge (625 à 675 nm) obtenue sur trois jours avec une excitation à 940 nm pour le D (gauche) et la F (droite) de l'intestin. Les barres d'erreur correspondent à l'écart type.

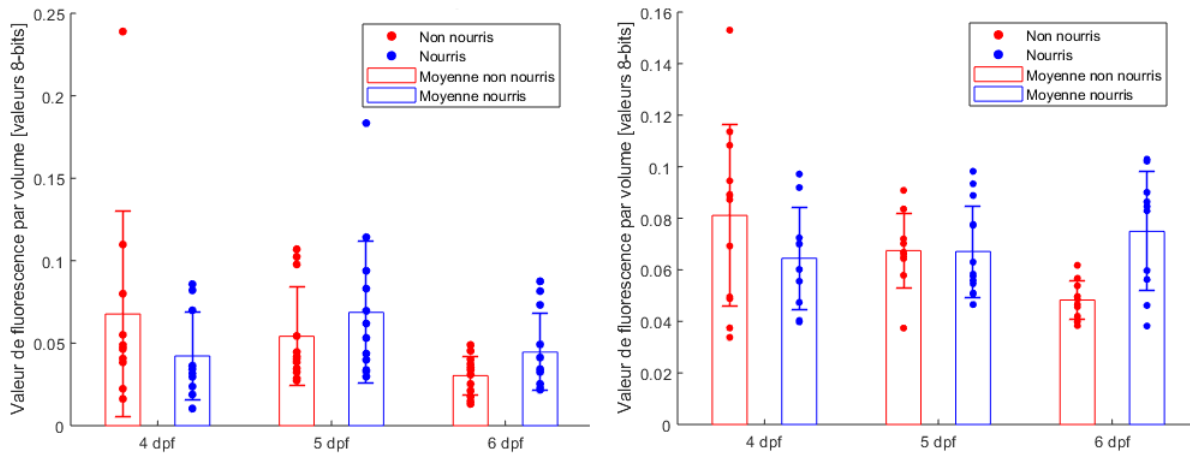


FIGURE 15: Distributions de l'autofluorescence rouge (625 à 675 nm) obtenue sur trois jours avec une excitation à 1045 nm pour le D (gauche) et la F (droite) de l'intestin. Les barres d'erreur correspondent à l'écart type.

Annexe II - Résultats des tests de normalité

Cette annexe présente les résultats des tests de normalité effectués pour les différentes distributions obtenues lors de l'expérience sur les effets de la nourriture. Les distributions sont identifiées selon la structure suivante : Groupe (N/NN)_Âge en dpf_D/F de l'intestin. Il est également important de noter que, sur Matlab, lorsque la valeur p calculée est plus grande que 0,5 pour les tests de Jarque-Bera et de Lilliefors, la valeur retournée est de 0,5. Enfin, pour les colonnes *Rejet de la normalité*, une valeur de 0 indique que l'hypothèse que l'échantillon provient d'une distribution normale est acceptée et une valeur de 1 indique que cette hypothèse est rejetée.

Tableau 5: Résultats des tests de normalité pour les valeurs d'autofluorescence bleue (480 à 500 nm) avec une excitation à 800 nm

	Valeurs p				Rejet de la normalité			
	Jarque-Bera	Lilliefors	Anderson-Darling	Shapiro-Wilk	Jarque-Bera	Lilliefors	Anderson-Darling	Shapiro-Wilk
'NN_4dpf_D'	0,5	0,5	0,6321	0,4747	0	0	0	0
'NN_5dpf_D'	0,1485	0,3488	0,0950	0,0726	0	0	0	0
'NN_6dpf_D'	0,3981	0,0762	0,1925	0,2682	0	0	0	0
'N_4dpf_D'	0,0555	0,5	0,2281	0,1668	0	0	0	0
'N_5dpf_D'	0,1022	0,1534	0,2032	0,2949	0	0	0	0
'N_6dpf_D'	0,4736	0,5	0,7880	0,6195	0	0	0	0
'NN_4dpf_F'	0,5	0,5	0,5902	0,7219	0	0	0	0
'NN_5dpf_F'	0,5	0,5	0,7274	0,8455	0	0	0	0
'NN_6dpf_F'	0,5	0,1094	0,0776	0,1934	0	0	0	0
'N_4dpf_F'	0,0341	0,0198	0,0320	0,0563	1	1	1	0
'N_5dpf_F'	0,1207	0,3138	0,3273	0,2626	0	0	0	0
'N_6dpf_F'	0,4965	0,5	0,8352	0,7937	0	0	0	0

Tableau 6: Résultats des tests de normalité pour les valeurs d'autofluorescence verte (500 à 550 nm) avec une excitation à 940 nm

	Valeurs p				Rejet de la normalité			
	Jarque-Bera	Lilliefors	Anderson-Darling	Shapiro-Wilk	Jarque-Bera	Lilliefors	Anderson-Darling	Shapiro-Wilk
'NN_4dpf_D'	0,0014	0,0021	0,0012	0,0009	1	1	1	1
'NN_5dpf_D'	0,2510	0,2779	0,2844	0,2273	0	0	0	0
'NN_6dpf_D'	0,5	0,4313	0,6985	0,7433	0	0	0	0
'N_4dpf_D'	0,1208	0,0041	0,0176	0,0318	0	1	1	1
'N_5dpf_D'	0,1943	0,3121	0,1243	0,1418	0	0	0	0
'N_6dpf_D'	0,5	0,5	0,8219	0,9235	0	0	0	0
'NN_4dpf_F'	0,3088	0,5	0,4301	0,3798	0	0	0	0
'NN_5dpf_F'	0,5	0,0779	0,0997	0,1946	0	0	0	0
'NN_6dpf_F'	0,4603	0,4466	0,6456	0,6559	0	0	0	0
'N_4dpf_F'	0,5	0,5	0,7551	0,8423	0	0	0	0
'N_5dpf_F'	0,4579	0,4457	0,3846	0,3630	0	0	0	0
'N_6dpf_F'	0,5	0,5	0,5818	0,7365	0	0	0	0

Tableau 7: Résultats des tests de normalité pour les valeurs d'autofluorescence rouge (625 à 675 nm) avec une excitation à 940 nm

	Valeurs p				Rejet de la normalité			
	Jarque-Bera	Lilliefors	Anderson-Darling	Shapiro-Wilk	Jarque-Bera	Lilliefors	Anderson-Darling	Shapiro-Wilk
'NN_4dpf_D'	0,0015	0,0342	0,0045	0,0020	1	1	1	1
'NN_5dpf_D'	0,1300	0,1771	0,0429	0,0396	0	0	1	1
'NN_6dpf_D'	0,3723	0,2577	0,5308	0,4683	0	0	0	0
'N_4dpf_D'	0,4180	0,5	0,7336	0,6537	0	0	0	0
'N_5dpf_D'	0,2768	0,4156	0,3606	0,2801	0	0	0	0
'N_6dpf_D'	0,1441	0,1033	0,1714	0,1254	0	0	0	0
'NN_4dpf_F'	0,5	0,5	0,9666	0,9739	0	0	0	0
'NN_5dpf_F'	0,5	0,5	0,4501	0,6349	0	0	0	0
'NN_6dpf_F'	0,3667	0,5	0,5423	0,3934	0	0	0	0
'N_4dpf_F'	0,1992	0,3993	0,2315	0,1785	0	0	0	0
'N_5dpf_F'	0,3040	0,2070	0,2208	0,2950	0	0	0	0
'N_6dpf_F'	0,5	0,1570	0,2759	0,4535	0	0	0	0

Tableau 8: Résultats des tests de normalité pour les valeurs d'autofluorescence rouge (625 à 675 nm) avec une excitation à 1045 nm

Autofluorescence rouge, excitation à 1045 nm								
	Valeurs p				Rejet de la normalité			
	Jarque-Bera	Lilliefors	Anderson-Darling	Shapiro-Wilk	Jarque-Bera	Lilliefors	Anderson-Darling	Shapiro-Wilk
'NN_4dpf_D'	0,0010	0,0049	0,0009	0,0005	1	1	1	1
'NN_5dpf_D'	0,0746	0,0061	0,0015	0,0040	0	1	1	1
'NN_6dpf_D'	0,4927	0,5	0,8195	0,6996	0	0	0	0
'N_4dpf_D'	0,1644	0,0195	0,0533	0,0760	0	1	0	0
'N_5dpf_D'	0,0100	0,2667	0,0278	0,0121	1	0	1	1
'N_6dpf_D'	0,0964	0,0306	0,0138	0,0201	0	1	1	1
'NN_4dpf_F'	0,5	0,5	0,5731	0,5817	0	0	0	0
'NN_5dpf_F'	0,5	0,2180	0,2337	0,4248	0	0	0	0
'NN_6dpf_F'	0,5	0,5	0,9421	0,8612	0	0	0	0
'N_4dpf_F'	0,5	0,5	0,6459	0,4951	0	0	0	0
'N_5dpf_F'	0,1534	0,0600	0,0611	0,0733	0	0	0	0
'N_6dpf_F'	0,3340	0,1205	0,2887	0,2900	0	0	0	0

Annexe III - Résultats des tests de comparaison entre N et NN

Cette annexe présente les résultats des tests de comparaison entre le groupe de poissons nourris et le groupe de poissons non nourris. Les cases jaunes indiquent que le test effectué nécessite la normalité, mais que celle-ci a été rejetée dans au moins un des tests de normalité effectués sur les distributions en jeu.

Tableau 9: Résultats des tests de comparaison entre les distributions de fluorescence bleue (480 à 500 nm) des poissons nourris et non nourris avec une excitation à 800 nm

		Kolmogorov-Smirnov à deux échantillons		Somme des rangs de Wilcoxon		Test t à deux échantillons	
		Valeur p	Rejet de l'hypothèse nulle	Valeur p	Rejet de l'hypothèse nulle	Valeur p	Rejet de l'hypothèse nulle
Début de l'intestin	4dpf	0,2266	0	0,7197	0	0,8054	0
	5dpf	0,1870	0	0,5949	0	0,8638	0
	6dpf	0,1158	0	0,1259	0	0,0902	0
Fin de l'intestin	4dpf	0,0352	1	0,0173	1	0,0387	1
	5dpf	0,9852	0	0,7928	0	0,5616	0
	6dpf	0,2957	0	0,5448	0	0,3945	0

Tableau 10: Résultats des tests de comparaison entre les distributions de fluorescence verte (500 à 550 nm) des poissons nourris et non nourris avec une excitation à 940 nm

		Kolmogorov-Smirnov à deux échantillons		Somme des rangs de Wilcoxon		Test t à deux échantillons	
		Valeur p	Rejet de l'hypothèse nulle	Valeur p	Rejet de l'hypothèse nulle	Valeur p	Rejet de l'hypothèse nulle
Début de l'intestin	4dpf	0,0915	0	0,3722	0	0,7221	0
	5dpf	0,8448	0	0,7648	0	0,6949	0
	6dpf	0,4333	0	0,3408	0	0,3690	0
Fin de l'intestin	4dpf	0,5409	0	0,3412	0	0,5847	0
	5dpf	0,3534	0	1,0000	0	0,9494	0
	6dpf	0,1822	0	0,0725	0	0,1086	0

Tableau 11: Résultats des tests de comparaison entre les distributions de fluorescence rouge (625 à 675 nm) des poissons nourris et non nourris avec une excitation à 940 nm

		Kolmogorov-Smirnov à deux échantillons		Somme des rangs de Wilcoxon		Test t à deux échantillons	
		Valeur p	Rejet de l'hypothèse nulle	Valeur p	Rejet de l'hypothèse nulle	Valeur p	Rejet de l'hypothèse nulle
Début de l'intestin	4dpf	0,9852	0	1,0000	0	0,6526	0
	5dpf	0,6258	0	0,5316	0	0,5898	0
	6dpf	0,4333	0	0,4025	0	0,4673	0
Fin de l'intestin	4dpf	0,2486	0	0,1178	0	0,1440	0
	5dpf	0,5199	0	0,7818	0	0,9300	0
	6dpf	0,0551	0	0,0980	0	0,0437	1

Tableau 12: Résultats des tests de comparaison entre les distributions de fluorescence rouge (625 à 675 nm) des poissons nourris et non nourris avec une excitation à 1045 nm

		Kolmogorov-Smirnov à deux échantillons		Somme des rangs de Wilcoxon		Test t à deux échantillons	
		Valeur p	Rejet de l'hypothèse nulle	Valeur p	Rejet de l'hypothèse nulle	Valeur p	Rejet de l'hypothèse nulle
Début de l'intestin	4dpf	0,0782	0	0,2178	0	0,2489	0
	5dpf	0,6258	0	0,3412	0	0,3427	0
	6dpf	0,4333	0	0,1749	0	0,0720	0
Fin de l'intestin	4dpf	0,3162	0	0,3734	0	0,1996	0
	5dpf	0,2142	0	0,5558	0	0,9608	0
	6dpf	0,0310	1	0,0211	1	0,0027	1

Annexe IV - Résultats des tests de comparaison pour la variation quotidienne de l'autofluorescence

Cette annexe présente les résultats des tests de comparaison pour l'étude de la variation de l'autofluorescence sur 24 heures. Les cases jaunes indiquent que le test effectué nécessite la normalité, mais que celle-ci a été rejetée dans au moins un des tests de normalité effectués sur les distributions en jeu.

Tableau 13: Résultats des tests de comparaison entre les valeurs de fluorescence bleue (480 à 500 nm) obtenues pour les mêmes poissons mais à des jours différents. La longueur d'onde d'excitation est de 800 nm

		NN début			NN fin			N début			N fin		
		4 vs 5dpf	4 vs 6 dpf	5 vs 6dpf	4 vs 5dpf	4 vs 6 dpf	5 vs 6dpf	4 vs 5dpf	4 vs 6 dpf	5 vs 6dpf	4 vs 5dpf	4 vs 6 dpf	5 vs 6dpf
Test t pour échantillons appariés	Valeur p	0,0992	0,8674	0,4726	0,8135	0,7948	0,6434	0,0729	0,9536	0,0068	0,6181	0,6207	0,8498
	Rejet hypothèse nulle	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0
Test de rangs signés de Wilcoxon	Valeur p	0,1953	0,5625	0,4688	0,7646	0,8438	0,8438	0,0977	1,0000	0,0068	0,3750	0,8125	0,6377
	Rejet hypothèse nulle	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0

Tableau 14: Résultats des tests de comparaison entre les valeurs de fluorescence verte (500 à 550 nm) obtenues pour les mêmes poissons mais à des jours différents. La longueur d'onde d'excitation est de 940 nm

		NN début			NN fin			N début			N fin		
		4 vs 5dpf	4 vs 6 dpf	5 vs 6dpf	4 vs 5dpf	4 vs 6 dpf	5 vs 6dpf	4 vs 5dpf	4 vs 6 dpf	5 vs 6dpf	4 vs 5dpf	4 vs 6 dpf	5 vs 6dpf
Test t pour échantillons appariés	Valeur p	0,3251	0,8743	0,0248	0,4288	0,8776	0,4636	0,0479	0,3225	0,0839	0,1006	0,0358	0,1358
	Rejet hypothèse nulle	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	1	0
Test de rangs signés de Wilcoxon	Valeur p	0,1602	0,6953	0,0342	0,4648	0,8457	0,2754	0,0425	0,5771	0,0923	0,1294	0,0645	0,1230
	Rejet hypothèse nulle	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0

Tableau 15: Résultats des tests de comparaison entre les valeurs de fluorescence rouge (625 à 675 nm) obtenues pour les mêmes poissons mais à des jours différents. La longueur d'onde d'excitation est de 940 nm

		NN début			NN fin			N début			N fin		
		4 vs 5dpf	4 vs 6 dpf	5 vs 6dpf	4 vs 5dpf	4 vs 6 dpf	5 vs 6dpf	4 vs 5dpf	4 vs 6 dpf	5 vs 6dpf	4 vs 5dpf	4 vs 6 dpf	5 vs 6dpf
Test t pour échantillons appariés	Valeur p	0,7255	0,1243	0,0027	0,2530	0,0124	0,0742	0,4580	0,1279	0,0139	0,6148	0,7785	0,4854
	Rejet hypothèse nulle	0	0	1	0	1	0	0	0	1	0	0	0
Test de rangs signés de Wilcoxon	Valeur p	0,7695	0,1602	0,0034	0,4131	0,0273	0,0840	0,4131	0,1934	0,0210	1,0000	0,7344	0,8457
	Rejet hypothèse nulle	0	0	1	0	1	0	0	0	1	0	0	0

Tableau 16: Résultats des tests de comparaison entre les valeurs de fluorescence rouge (625 à 675 nm) obtenues pour les mêmes poissons mais à des jours différents. La longueur d'onde d'excitation est de 1045 nm

		NN début			NN fin			N début			N fin		
		4 vs 5dpf	4 vs 6 dpf	5 vs 6dpf	4 vs 5dpf	4 vs 6 dpf	5 vs 6dpf	4 vs 5dpf	4 vs 6 dpf	5 vs 6dpf	4 vs 5dpf	4 vs 6 dpf	5 vs 6dpf
Test t pour échantillons appariés	Valeur p	0,4416	0,0972	0,0121	0,9588	0,0214	0,0019	0,0983	0,9394	0,1059	0,6495	0,0656	0,3834
	Rejet hypothèse nulle	0	0	1	0	1	1	0	0	0	0	0	0
Test de rangs signés de Wilcoxon	Valeur p	0,3750	0,0645	0,0161	0,8203	0,0391	0,0078	0,0645	0,8203	0,0771	0,6250	0,0781	0,5566
	Rejet hypothèse nulle	0	0	1	0	1	1	0	0	0	0	0	0

Annexe V - Macro pour utiliser la méthode *Subtract background* d'imageJ

La figure 16 montre le macro utilisé sur *ImageJ* afin de passer des ROI segmentées avec le filtre médian aux ROI segmentées avec la méthode *Subtract background*. Il est important que les anciennes ROI soient ouvertes dans le ROI manager pour que le macro fonctionne. Celui-ci commence par construire un masque binaire avec les anciennes ROI, puis le multiplie aux images brutes. Par la suite, le filtre *Subtract background* est appliqué à ces nouvelles images et les nouvelles ROI sont tracées.

```

1 rename("RealStack");
2 run("Duplicate...", "title=MaskStack duplicate");
3
4 selectWindow("MaskStack");
5 for (i=1; i<=nSlices; i++){
6     setSlice(i);
7     run("Select All");
8     run("Clear", "Yes");}
9
10 for (m = 0; m < roiManager("count"); m++){
11     roiManager("Select", m);
12     run("Fill", "No");}
13
14 setOption("BlackBackground", false);
15 run("Make Binary", "method=Mean background=Dark calculate");
16
17 selectWindow("RealStack");
18 run("Subtract Background...", "rolling=10 create stack");
19 setOption("BlackBackground", false);
20 run("Make Binary", "method=Mean background=Dark calculate");
21 imageCalculator("Multiply create stack", "RealStack", "MaskStack");
22
23 if (isOpen("ROI Manager")) {
24     selectWindow("ROI Manager");
25     run("Close");}
26
27 selectWindow("Result of RealStack");
28
29 for (k=1; k<=nSlices; k++) {
30     setSlice(k);
31
32     run("Create Selection");
33     run("Add to Manager");}

```

FIGURE 16: Code du macro utilisé pour passer des ROI segmentées avec un filtre médian aux ROI segmentées avec la méthode *Subtract background* d'*ImageJ*