



LE COMPTAGE DES CELLULES

Présentée par:

Dr. DAHMANI



INTRODUCTION

- ❑ Le comptage cellulaire fait partie du quotidien du biologiste cellulaire. C'est une étape obligatoire, parfois fastidieuse mais incontournable en culture cellulaire.
- ❑ Elle permet d'avoir une information qualitative, et surtout quantitative sur sa culture cellulaire à un temps T.
- ❑ Selon les besoins de l'utilisateur ou de l'expérience, les résultats obtenus peuvent être décisifs pour la réussite de l'expérience.
 - ➔ C'est pourquoi, le comptage cellulaire ne doit pas être négligé
- ❑ L'opération de comptage permet de déterminer la concentration des cellules en culture tout en vérifiant leur vitalité.



- **Concentration des cellules:**

En culture cellulaire, on doit souvent connaître le nombre des cellules avec lequel on travaille; par exemple:

- ❖ Au moment d'effectuer un passage, le nombre des cellulesensemencées influencera la survie et la vitesse de croissance de la nouvelle population.

- ❖ Au moment de congeler des cellules, on doit vérifier qu'elles sont en concentration suffisante pour assurer la survie de la lignée, car plusieurs cellules meurent au cours du processus de congélation.

- **Vitalité des cellules:**

Une culture compte toujours un certain nombre de cellules mortes qui peut être plus ou moins important et on doit vérifier que les cellules utilisées sont bien vivantes. Pour ce faire, il existe des colorants permettant de distinguer les cellules vivantes des cellules mortes.

Principe du comptage cellulaire

- ❖ Le comptage ou numération cellulaire est la détermination du nombre de cellules contenues dans un volume précis d'un milieu liquide.
- ❖ On exprime le résultat d'un comptage en concentration cellulaire, c'est à dire en unité d'événements par unité de volume (par ex. nombre de cellules / ml).
- ❖ Le comptage cellulaire s'effectue toujours sur une partie de l'échantillon et jamais sur sa totalité.
- ❖ Pour cela un échantillon défini de la solution totale est prélevé puis le nombre d'événements présents est compté. Le nombre obtenu est extrapolé au volume total pour estimer la concentration.





- ❖ La numération cellulaire peut se faire soit par un **comptage manuel au microscope**, soit par un **comptage automatisé** avec des équipements dédiés.
- ❖ Selon la nature de l'échantillon (**lysats de broyage d'organes, suspension d'une culture cellulaire, extrait de sang de patients, etc ...**), le principe du comptage est identique mais avec les compteurs automatisés des optimisations sont nécessaires pour éviter de sur ou sous-exprimer la concentration cellulaire.

1-Le comptage manuel

Le comptage manuel est le comptage le plus répandu dans les laboratoires, car il est rapide et très facile à mettre en œuvre (nécessite peu de matériel).

C'est l'utilisateur lui-même qui choisit de compter ou non certaines cellules.

Pour ce comptage manuel, l'expérimentateur a besoin :

- ✓ D'un colorant
- ✓ D'une pipette
- ✓ D'un microscope ordinaire ou inversé
- ✓ De tampon PBS pour les dilutions
- ✓ D'une solution à compter
- ✓ D'une lame porte objet, généralement en verre épais, dans laquelle est creusée une chambre de comptage de volume connu et comportant un quadrillage appelée "hémacytomètre"



a. La coloration

Colorant et viabilité des cellules. On se sert généralement de colorants qui sont rejetés par les cellules bien vivantes qui disposent d'ATP (ex : bleu de trypan 0,1-0,4% ou érythrosine).

- ❖ Ce type de colorant colore donc les cellules mortes.
- ❖ Il faut observer les cellules dans les 3-5 premières minutes suivant la coloration car ces colorants sont toxiques et même les cellules viables finissent par se colorer.





❖ **Facteur de dilution :**

- ✓ On utilise habituellement des quantités égales de colorant et de suspension cellulaire (100 µl).

Exemple : pour un volume égal de colorant et de cellules (100 µl),

$$\text{Facteur de dilution} = \frac{100 \mu\text{l de cellules} + 100 \mu\text{l de colorant}}{100 \mu\text{l de cellules}} = 2$$

de l'évaluation de la concentration des cellules:



Facteur de dilution = **Volume total après coloration**
(vol. de cellules + vol. de colorant) / **Volume de cellules**

b. Les lames :

Les lames utilisées pour le comptage manuel sont des lames spécifiques, en verre ou en plastique. Généralement, les lames en verre sont les plus utilisées. Ces lames sont en forme de porte-objet de 30 x 70 mm et de 4 mm d'épaisseur comme montré ci-dessous :



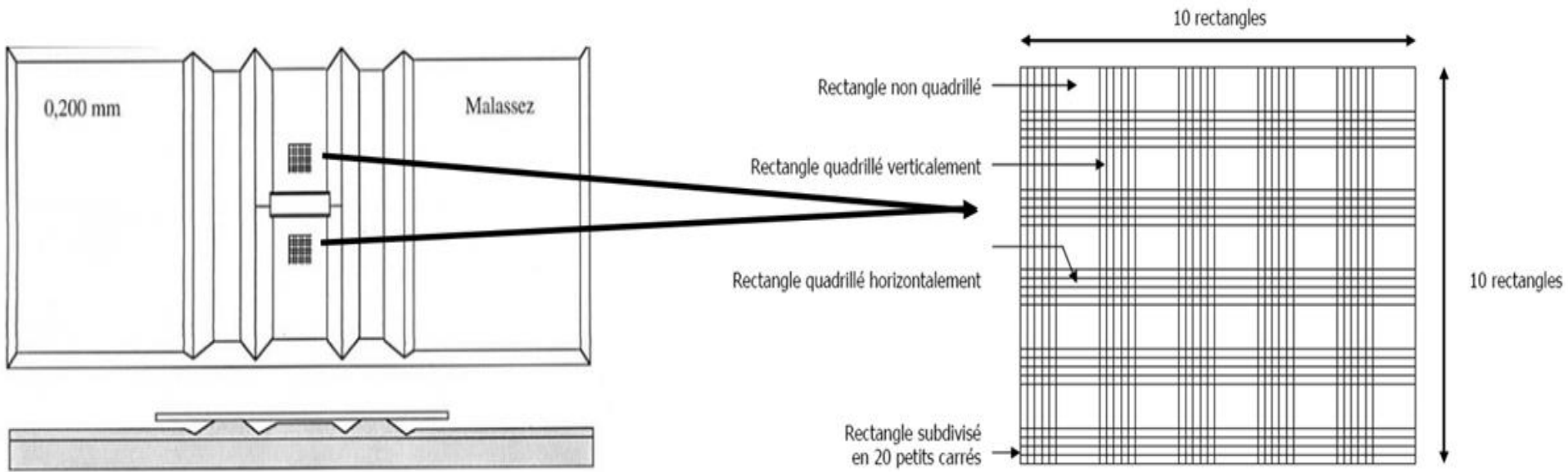
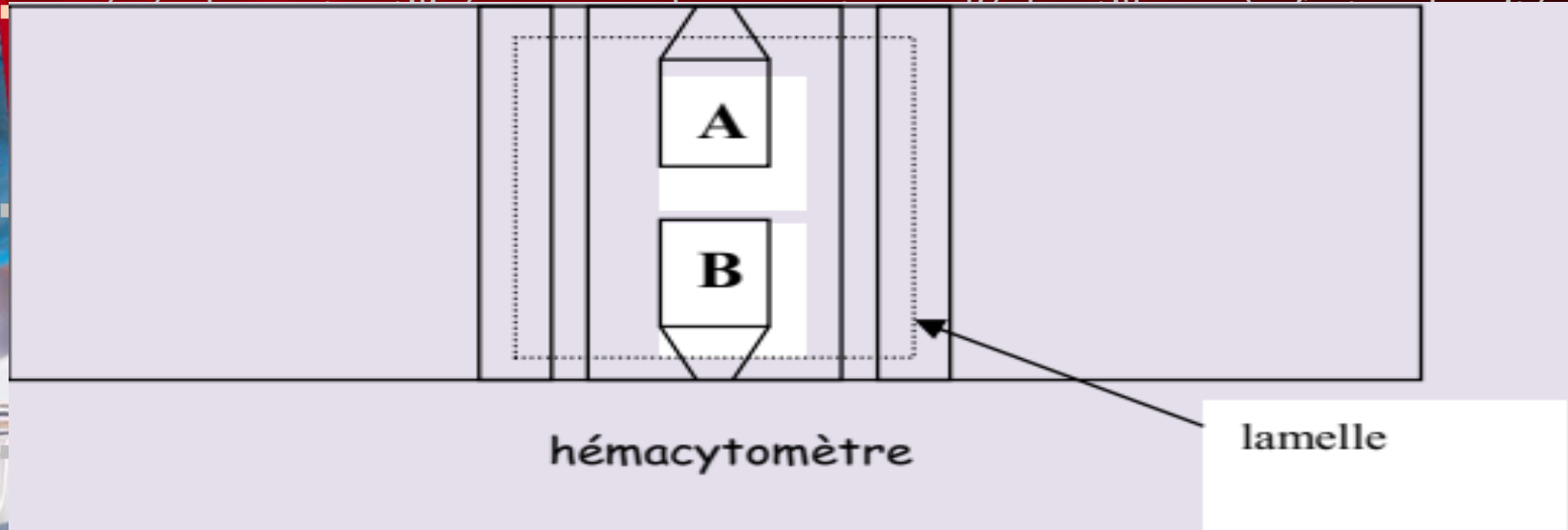
Lame de Malassez en verre



La partie centrale possède un quadrillage différent selon le type de lame (Par ex : Malassez, Neubauer, Bürker, Fuchs Rosenthal, Thoma, ou Bürker Türk) :

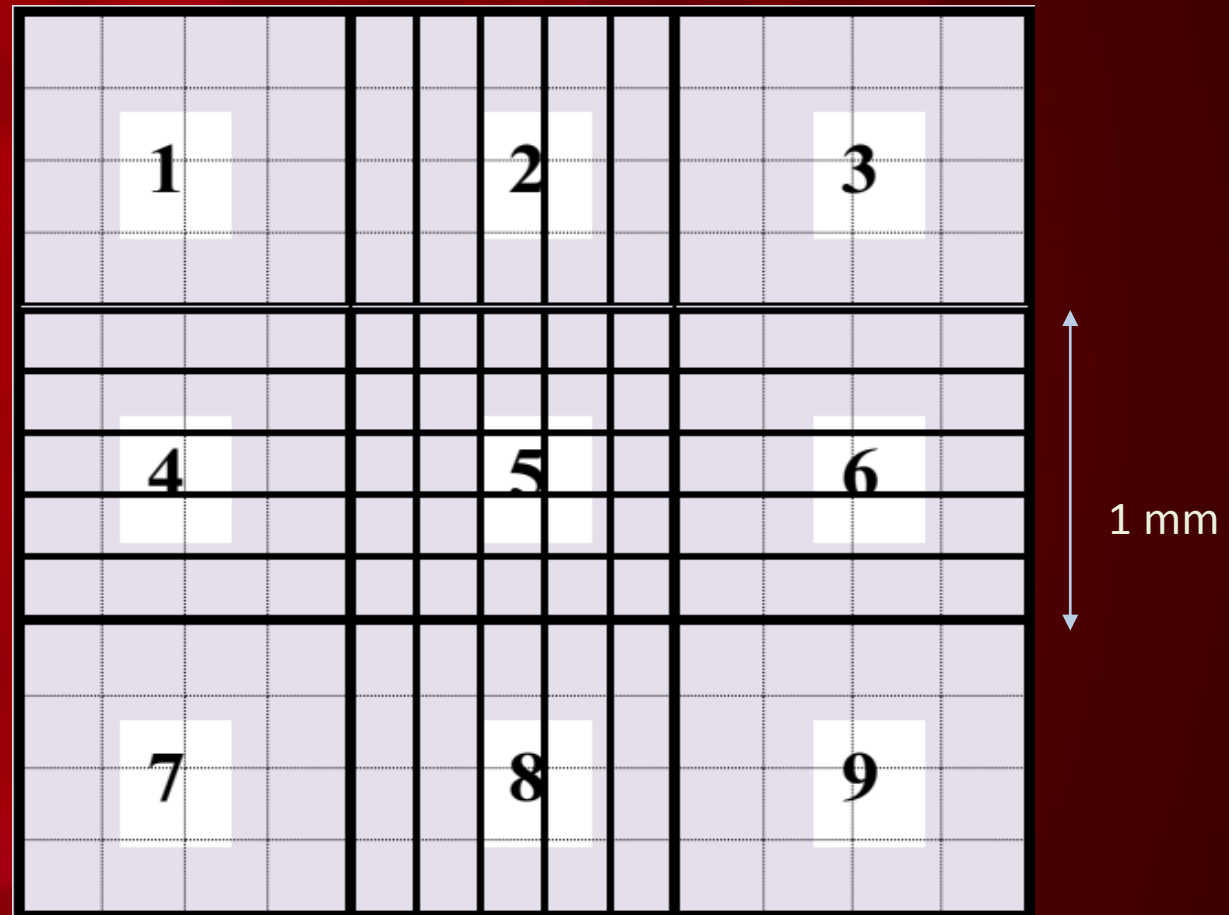
- ❖ **Les lames Neubauer** : dédiées au comptage d'érythrocytes et de thrombocytes
- ❖ **Les lames Bürker** : utilisées pour le comptage de leucocytes
- ❖ **Les lames Fuchs Rosenthal** : ont une surface bien plus grande que les autres lames, et sont adaptées pour le comptage d'échantillons tel que le liquide céphalorachidien.
- ❖ **Les lames Thoma** : plutôt réservées pour le comptage d'hématies et de leucocytes
- ❖ **Les lames Bürker Türk** : sont une combinaison des lames Bürker et Thoma

- *Les lames Malassez :*




Exemple de lame en verre avec son quadrillage

- Observées à faible grossissement (G : 40X), chacune des chambres présente une grille composée de 9 grands carrés qui sont eux-mêmes subdivisés.



Grille des chambres A ou B observées au microscope



Chacun des 9 grands carrés correspond à un volume standard de 10^{-4} ml (ou 1/10 000 ml). En effet, les dimensions sont :

Côtés = 1 mm ou 0,1 cm

Profondeur = 0,1 mm ou 0,01 cm (espace entre lame et lamelle)

Volume = 0,1 cm X 0,1 cm X 0,01 cm = 10^{-4} cm³ = 10^{-4} ml

c. Les règles de comptage

- ❖ **Grille de comptage** : en culture cellulaire, on peut utiliser uniquement le grand carré central. Il est lui-même subdivisé en 25 petits carrés.
- ❖ **Ordre de comptage** : lorsque nous comptons les cellules, il est essentiel de le faire de façon très structurée afin de ne pas compter une même cellule 2 fois. Tout d'abord, l'utilisateur établit sa propre routine dans l'ordre de comptage des petits carrés.
- ❖ **Exemple:**

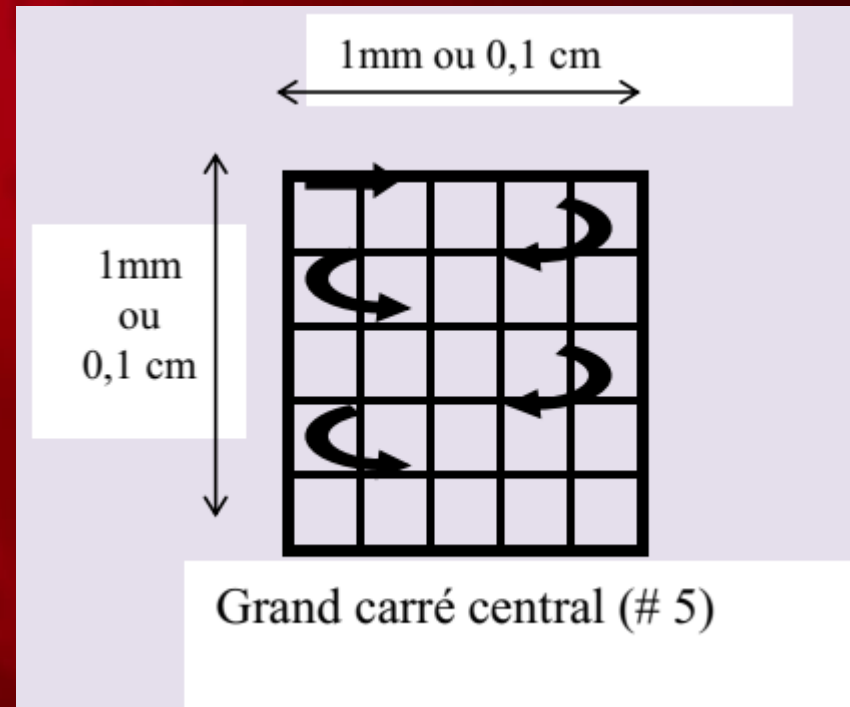
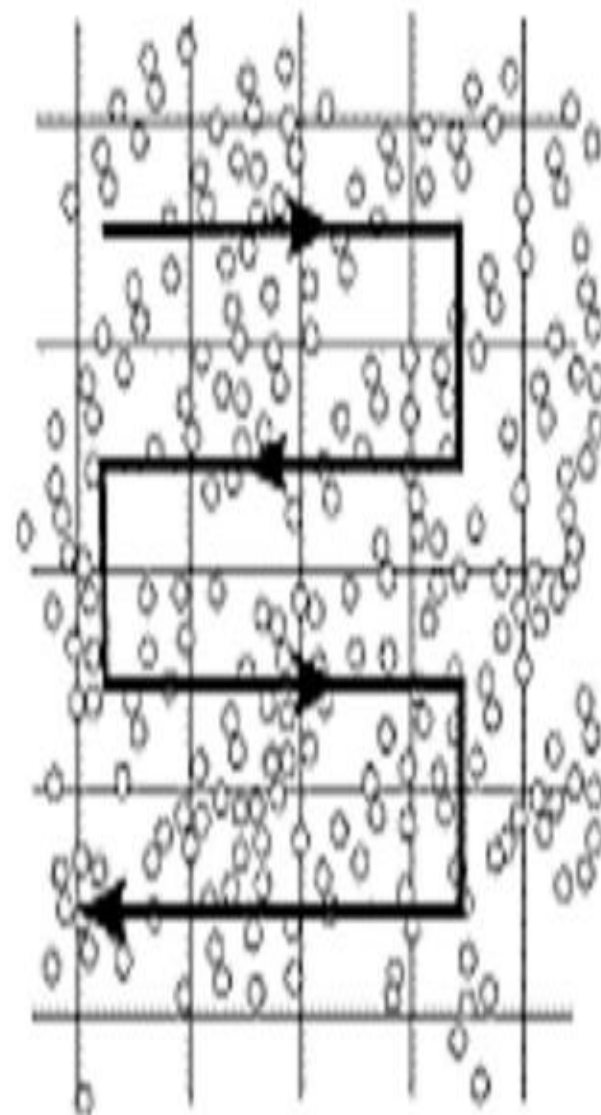
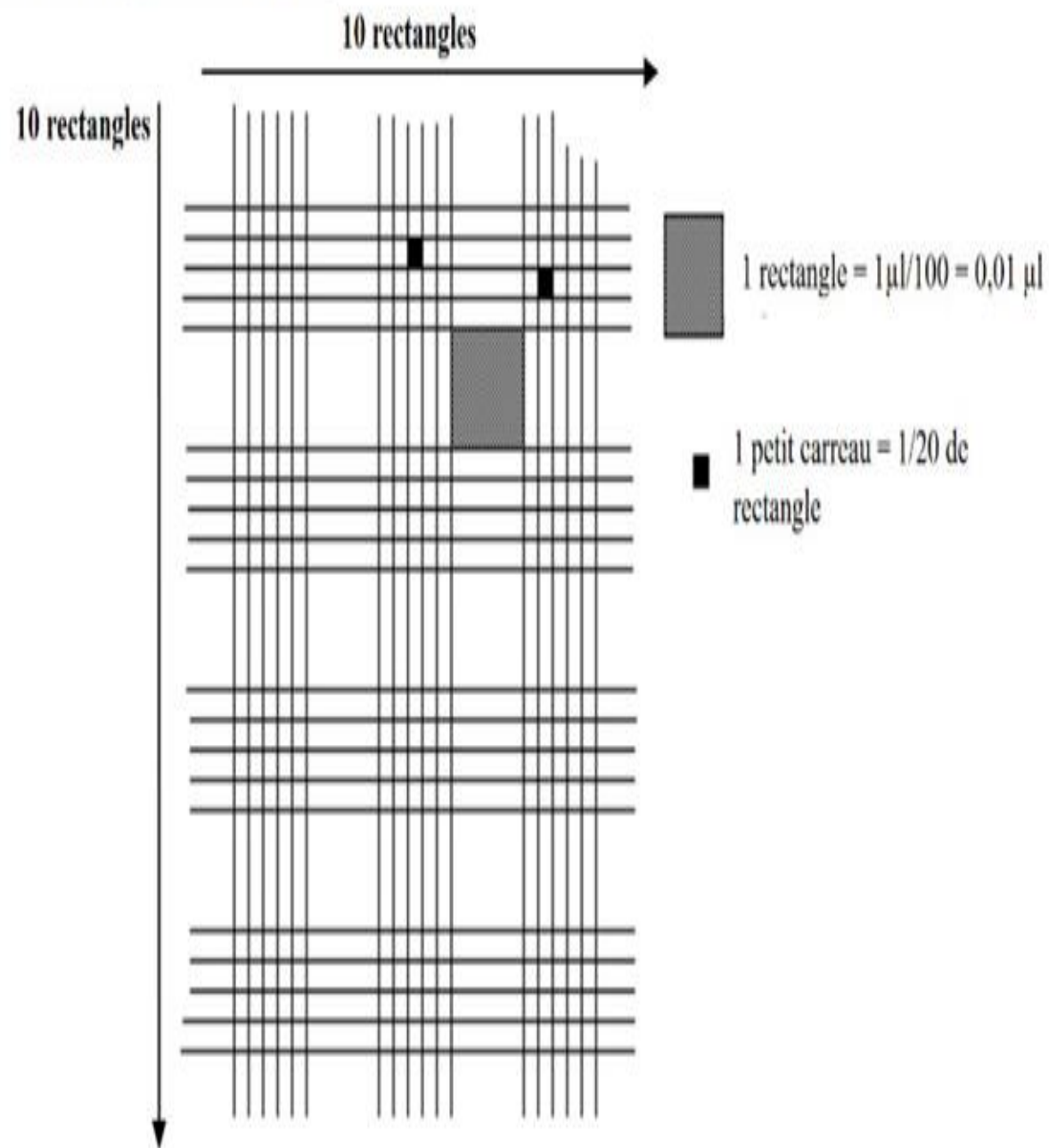
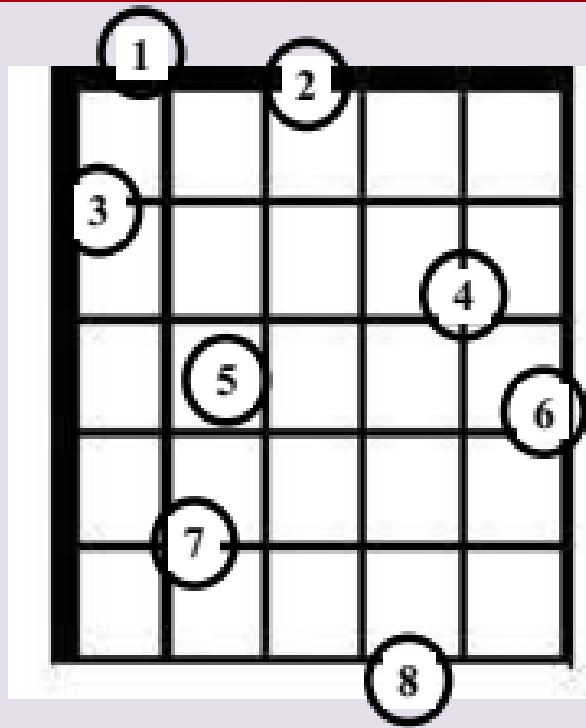


Schéma d'une portion de la lamelle





❖ **Cas limites** : Par convention, on compte les cellules qui touchent aux lignes de **gauche et du haut** du carré, lorsque celles-ci sont à 50% ou plus à l'intérieur.



Cette chambre
contient 5 cellules!
Lesquelles?



- ❖ **Chambres A et B** : normalement on compte les cellules dans les 2 chambres et on établit la moyenne. Pour un comptage statistiquement valable
 - ✓ On devrait compter entre 20 et 50 cellules dans chacune des chambres.
 - ✓ On ne devrait pas obtenir une différence de plus de **10% entre les deux chambres**. Avec une différence de plus de 10%, on devrait **recommencer la préparation de l'hémacytomètre** en mélangeant bien les cellules avant de les charger dans les deux chambres.
- ❖ **Homogénéité de la suspension** : Si les cellules sont trop en grappes, il faut recommencer en tentant de mieux homogénéiser la suspension.
 - ✓ Dans une suspension homogène, **une petite grappe** (deux ou quelques cellules accolées) est acceptable mais doit être comptée **comme une seule cellule**.
- ❖ **Apparence des cellules** : les cellules vivantes devraient être arrondies ou un peu allongées. Il est important de bien distinguer les cellules vivantes des cellules mortes et des débris.




d. Calculs effectués à partir du comptage

1. Évaluation du pourcentage de viabilité des cellules:

On peut calculer le % de viabilité d'une culture après

Exemple : Nous comptons en moyenne 35 cellules pour un grand carré et la coloration a été faite en ajoutant 200 μ l de colorant à 100 μ l de suspension cellulaire.

$$\text{Concentration} = \frac{35 \text{ cell.} \times 3}{10^{-4} \text{ ml}} = (35 \times 3 \times 10\,000) \text{ cell/ml} = 1\,050\,000 \text{ cell/ml}$$



ou pour la congélation) on doit évaluer la concentration des cellules **viables**, en tenant compte du **facteur de dilution** utilisé pour la coloration et du **volume des chambres** de l'hémacytomètre (1/10 000 ou 10^{-4} ml).

$$\text{Nb cellules/ ml} = \text{Nb moyen de cellules viables} \times \text{facteur de dilution} / \text{Volume des chambres (10-4 ml)}$$



3. Évaluation du volume à transférer lors d'un passage:

❖ **Concentration initiale désirée du nouveau flacon:**

Au moment d'effectuer le passage d'une culture, on doit d'abord décider quelle sera la concentration initiale des cellulesensemencées dans le nouveau flacon. Cette décision est prise en fonction de divers facteurs tels la vitesse de reproduction du type cellulaire utilisé, de la durée d'incubation prévue, ou du degré de confluence désiré à échéance.

❖ **Calcul du volume de cellules à transférer:** Par la suite, il s'agit de calculer le volume de cellules qu'il faut ajouter au nouveau flacon pour obtenir la concentration initiale désirée, selon la formule :

$$C_1 V_1 = C_2 V_2$$

C1= Concentration calculée.

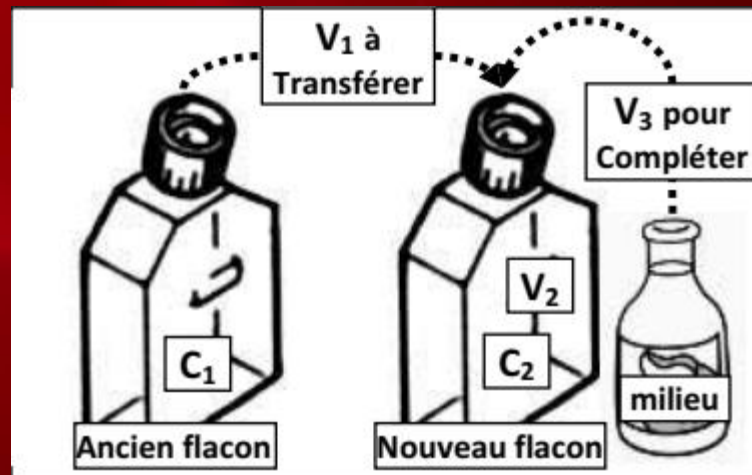
V1= Volume de culture à transférer (ml).


C2= Concentration initiale désirée dans le nouveau contenant déterminée avec le prof.

V2= Volume final dans le nouveau contenant qui varie selon la grosseur de celui-ci :

- ◆ Flacon T25 =>10 ml
- ◆ Flacon T75 =>20 ml
- ◆ Plaque 4 puits =>1 ml par puits

Calcul du volume de milieu pour compléter au volume final: $V_3 = V_2 - V_1$






Exemple : Nous voulons effectuer le passage d'une culture dont la concentration est de 1 050 000 cell./ml dans un nouveau flacon T25 avec une concentration initiale de 200 000 cellules/ml :

$$\text{Vol. à transférer} = V_1 = \frac{C_2 V_2}{C_1} = \frac{200\,000 \text{ cell/ml} \times 10 \text{ ml}}{1\,050\,000 \text{ cell/ml}} = 1,9 \text{ ml}$$

Volume de milieu à ajouter (V_3) pour compléter le volume total à 10 ml = 10 ml - 1,9 ml = 8,1 ml de milieu nutritif



2. Le comptage automatisé:

- ❖ Pour garantir une reproductibilité de comptage, réduire la variabilité des résultats liés à l'utilisateur et gagner du temps, des systèmes automatisés ont été développés.

Principe de fonctionnement du compteur Coulter.

- ❖ Le Coulter enregistre un signal proportionnel au volume des particules, indépendamment de leur forme. Le signal est provoqué par une modification du champ électrique établi au travers d'un orifice au travers duquel le fluide contenant les particules est aspiré.

i. Compteur de cellules

Ce type de compteur ressemble à une pipette et est basé sur le principe Coulter.





Le premier compteur portatif à utiliser la technique du Coulter qui vous donne en quelques secondes, un comptage rapide et précis de vos cellules, ainsi que leur viabilité.

Compteur compact automatisé :

- ✓ Technologie innovante basée sur le principe de Coulter
- ✓ Format unique portatif et miniaturisé
- ✓ Utilisation facile, intuitive, rapide, de haute précision
- ✓ Port USB, stockage et transfert des données sur PC
- ✓ Batterie rechargeable

Ecran intégré :

- ✓ Populations cellulaires représentées sous forme d'histogramme
- ✓ Concentration cellulaire
- ✓ Moyenne du volume des cellules et de leur taille
- ✓ Fenêtre de calcul modulable



- ❖ Avec le compteur de cellules, l'utilisateur installe à l'extrémité de la pipette une sonde*, puis il va pipeter directement 50 μl de sa suspension cellulaire (par ex. culture, lysat issu d'un broyage, etc ..) préalablement diluée si nécessaire.
 - ❖ La suspension entre dans la pipette pour être envoyée dans un microcapillaire situé au niveau de la sonde qui détecte chaque cellule *via* le principe Coulter et détermine la concentration cellulaire. Le résultat obtenu est alors affiché sur l'écran de la sonde) avec un histogramme montrant la distribution des tailles des cellules.
 - ❖ Ce compteur automatisé est pratique car petit, rapide et portable. Cependant, il reste très limité en termes d'application, et surtout, il est impossible de vérifier la fiabilité des résultats obtenus. En effet, l'utilisateur n'a aucun moyen de vérifier si les cellules comptées ne sont pas des débris ou des « clusters » de cellules comptés comme une seule cellule. Il n'a également aucun moyen de réajuster le comptage ou recompter le même échantillon à la différence de certains compteurs automatisés (cf Cellometer® paragraphe suivant).
- *Sonde :
 - 40 μm -> pour une gamme de tailles de cellules entre 3-17 μm
 - 60 μm -> pour une gamme de tailles de cellules entre 6-36 μm



Cellometer® Auto1000 de Nexcelom

nettoyage pour écarter tout risque de contamination croisée.