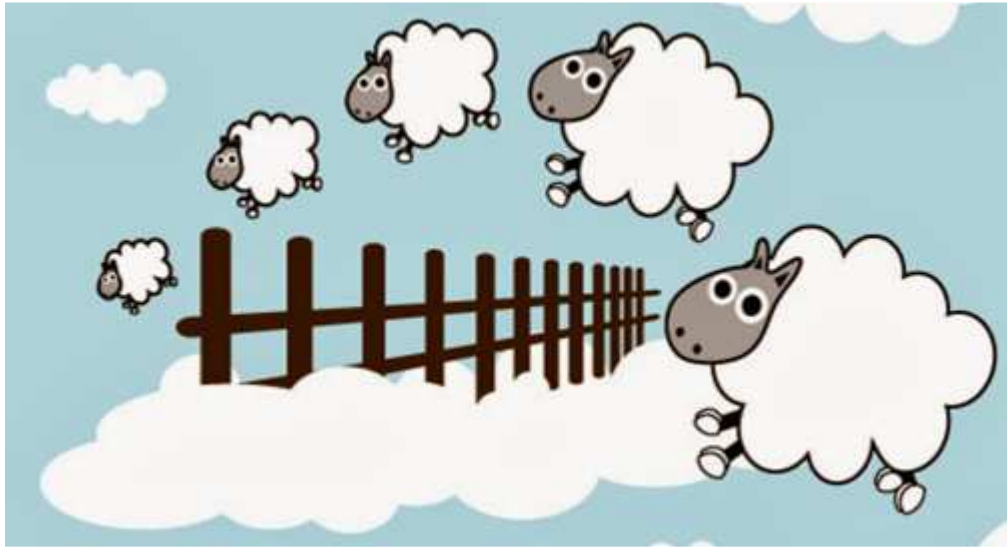


TechOzyme janvier 2017



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.

A travers ce TechOzyme, nous allons aborder les bonnes pratiques d'un comptage cellulaire, les méthodes existantes classiquement utilisées et donner quelques recommandations pour optimiser ses comptages.

Sommaire

- [Principe du comptage cellulaire](#)
- [Le comptage manuel](#)
- [Le comptage automatisé](#)
- [Questions fréquemment posées](#)

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 (lysate 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.

En complément, nous verrons qu'il est possible de combiner le comptage avec la viabilité des cellules.

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

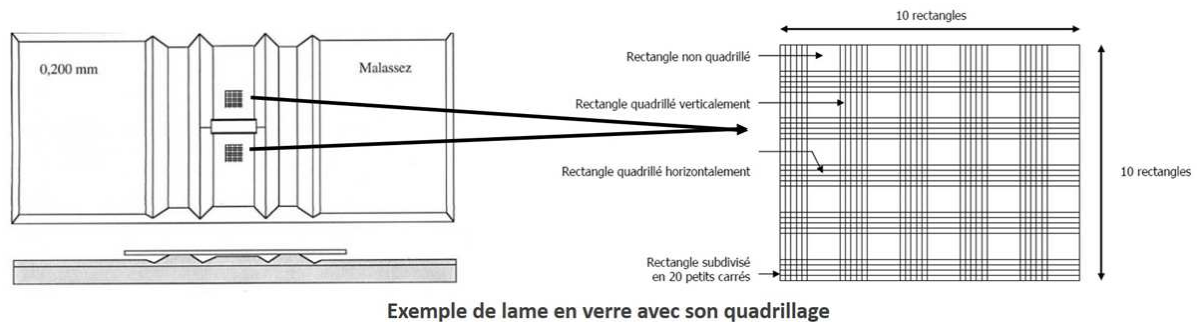
Les lames utilisées pour le comptage manuel sont des lames spécifiques, en verre ou en plastique. Généralement, les lames en verre sont les plus utilisées. Ces lames sont en forme de porte-objet de 30 x 70 mm et de 4 mm d'épaisseur comme montré ci-dessous :



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

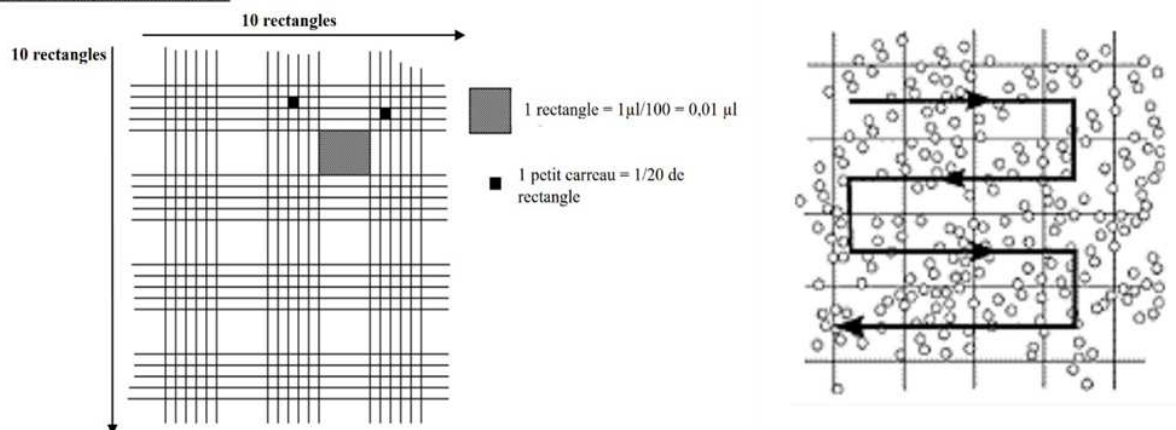
- **Les lames Malassez** : généralement utilisées pour le comptage d'échantillons à forte densité cellulaire, tel que le sang. Ces lames permettent le comptage d'une majorité d'échantillons et sont donc les plus répandues en laboratoire.

- **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



La lame la plus répandue en laboratoire est la lame de Malassez. Elle est gravée de 100 rectangles, eux-mêmes recoupés en 25 rectangles qui sont subdivisés en 20 petits carrés pour faciliter le comptage. Le volume correspondant au quadrillage total est égal à 1 μl .

Schéma d'une portion de la lamelle



[Voir en vidéo l'utilisation d'une lame de Malassez](#)

Pour réaliser le comptage, un volume d'échantillon de la solution à compter (en général entre 10 et 20 μl) est déposé entre la lame et la lamelle au niveau du quadrillage (étalement de l'échantillon par capillarité entre la lame et la lamelle).

Cas d'une culture de cellules adhérentes : pour obtenir la concentration il est nécessaire de décoller au préalable les cellules en ajoutant de la trypsine pour obtenir une suspension cellulaire à partir de laquelle le comptage sera fait.

La gamme de concentration pour ce type de comptage se situe entre 250 000 et 2 500 000 cellules/ml :

- Au-dessus de cette concentration, le risque d'erreur augmente de façon significative
- En-dessous de cette gamme, l'extrapolation est faite sur une quantité de cellules trop faible pour être fiable

La concentration optimale lue avec cette méthode est de 1 million de cellules/ml. En fonction de la confluence des cellules dans la suspension cellulaire, il est recommandé de faire une dilution avant le comptage. Dans ce cas, il faut tenir compte du facteur de dilution dans le calcul de la concentration totale de la suspension cellulaire.

Une fois la lame chargée, elle est observée sous le microscope. Après la mise au point, on compte le nombre d'événements sur au moins 4 ou 5 carrés du quadrillage. Le but est de compter environ 100 cellules.

Après le comptage, il suffit alors d'extrapoler pour déduire la concentration totale de l'échantillon/suspension cellulaire :

- Formule de calcul pour obtenir la concentration cellulaire :

Concentration (cel/ml) = Quantité de cellules / Volume (en ml)

- Formule de calcul modifiée appliquée aux lames de comptage :

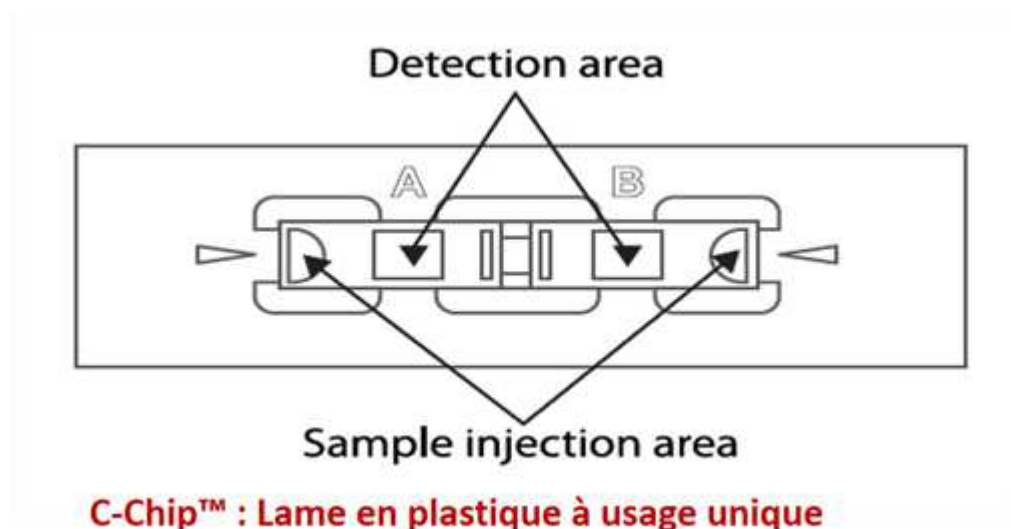
Concentration = (Quantité de cellules x 10 000) / (Quantité de cadres x dilution)

Comme dans toutes expériences, il est important de faire des réplicats.

Ce type de comptage manuel, bien que fastidieux, est économique et facile à mettre en place dans un laboratoire. Cependant, après le comptage il est essentiel de nettoyer les lames en verre pour éviter toutes contaminations croisées.

Pour pallier ce risque de contamination, des **lames en plastique à usage unique** ont été développées : [les hémocytomètres C-Chip™](#)

Ces lames en plastique comportent 2 chambres de dépôt avec chacune 2 quadrillages permettant d'effectuer 2 comptages à partir d'une seule lame.



Combiner une étude de viabilité cellulaire à son comptage

Il est possible de vérifier **la viabilité de sa suspension cellulaire**, aussi bien avec une lame en verre réutilisable ou en plastique à usage unique.

Pour cela, on utilise une solution commerciale de bleu de trypan de 0,4%. Le bleu de trypan, aussi appelé bleu diamine ou bleu de Niagara est un colorant vital dérivé de la ditoluidine (C₁₄H₁₆N₂) qui a été synthétisé pour la première fois par le chimiste allemand Paul Ehrlich en 1904. Ce produit est utilisé en laboratoire pour colorer les cellules mortes en bleu foncé, car il pénètre dans le cytoplasme des cellules mortes dont la membrane plasmique est devenue perméable. L'ajout du bleu de trypan dans une solution marque uniquement les cellules mortes, les cellules vivantes restent intactes. Ainsi, il est possible de déterminer dans une suspension cellulaire la proportion de cellules vivantes et mortes et donc d'en déduire la viabilité cellulaire.

Il est recommandé et important d'utiliser une solution de bleu de trypan préparée extemporanément avant une série de comptage. Pour cela, une solution commerciale de bleu de trypan 0,4% est diluée pour obtenir une solution à 0,2%, puis filtrée sur un filtre 0,2 µm pour éliminer les précipités. Enfin, l'échantillon cellulaire est mélangé avec la solution de bleu de trypan 0,2% selon un ratio de 1:1

Pour déterminer la viabilité cellulaire d'une solution, ce mélange est donc déposé sur la lame de comptage et observé au microscope. Les cellules marquées au bleu de trypan ainsi que les cellules non marquées sont comptées. A partir d'un même échantillon, on obtient donc la viabilité (c'est-à-dire le nombre de cellules vivantes par rapport au nombre de cellules mortes) et la concentration cellulaire.

Bien que la méthode de comptage manuelle soit facile et économique, elle a ses limites. En effet, les résultats peuvent varier d'un utilisateur à l'autre. Cette méthode de comptage peut donc être controversée car le comptage est peu reproductible d'une lame à une autre et/ou d'un utilisateur à un autre. Cela nécessite aussi la présence d'un microscope partagé dans la salle de culture, ce qui n'est pas toujours le cas dans tous les laboratoires.

Le comptage automatisé

Pour garantir une reproductibilité de comptage, réduire la variabilité des résultats liés à l'utilisateur et gagner du temps, des systèmes de comptage automatisés ont été développés depuis quelques années. Ces systèmes sont plus ou moins complexes et plus ou moins précis selon les modèles, mais ils fonctionnent tous sur un même principe : un échantillon de volume connu, une détection des cellules et un calcul de la concentration finale.

Compteur de cellules portatif :

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



Le principe Coulter a été développé par Wallace H. Coulter en 1940 : il permet de compter et déterminer la taille des particules en se basant sur la mesure d'impédance. Cette technologie a principalement été créée pour compter rapidement des cellules sanguines en mesurant les modifications de conductance électrique (impédance) lors du passage de ces cellules en suspension dans un fluide conducteur à travers un petit orifice.

Avec le compteur de cellules, l'utilisateur installe à l'extrémité de la pipette une sonde*, puis il va pipeter directement 50 μ l 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 micro-capillaire 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 (cf photo ci-dessus) 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 comptées 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 μ m -> pour une gamme de tailles de cellules entre 3-17 μ m

- 60 μ m -> pour une gamme de tailles de cellules entre 6-36 μ m

Compteurs automatisés :

Des compteurs automatisés disponibles sur le marché utilisent une lecture de cellules en bleu de trypan, ils possèdent une caméra CCD, un logiciel de traitement des résultats et certains sont équipés d'un portoir de tubes (comptage haut-débit). L'échantillon est aspiré ainsi que le bleu de trypan, puis le mélange est injecté dans le système fluidique et passe à travers une cellule qui permet de capter une image de la suspension cellulaire. L'acquisition porte sur une centaine d'images qui déterminent le nombre de cellules, la concentration et la viabilité de l'échantillon. Les données obtenues sont des résultats numériques, des histogrammes de distribution des tailles de cellules et des images des cellules. Le fait de visualiser les cellules post-comptage

permet de s'assurer que le dispositif n'a pas compté de faux positifs ou des débris cellulaires. En plus des données quantitatives, l'utilisateur a accès à des données qualitatives, essentielles et complémentaires pour la suite de ses expériences.

Pour ces compteurs, le volume d'échantillon utilisé peut être important (environ 500 μ l) auquel il faut ajouter le volume mort et le volume de nettoyage du système fluide. Ce dispositif est donc gourmand en tampon et en échantillon, d'autant plus que le volume utilisée d'une suspension cellulaire n'est pas ré-utilisable après le comptage.

De plus, le volume de comptage utilisé et la fluide exigent des étapes contraignantes de nettoyage pour écarter tout risque de contamination croisée.

Un autre automate de comptage : [le Cellometer® Auto100 de Nexcelom](#) utilise une technologie qui combine la facilité et l'ergonomie du compteur portable, et la fiabilité des résultats obtenus avec les compteurs automatisés



Cellometer® Auto1000 de Nexcelom

Le Cellometer® Auto 1000 utilise une caméra CCD, une lame de dépôt dédiée, et un algorithme de calcul. L'utilisateur dépose sur une lame en plastique dédiée 20 μ l d'échantillon cellulaire (avec ou sans bleu de trypan en fonction des besoins) et place la lame dans le dispositif. La suspension apparaît à l'écran, l'expérimentateur effectue la mise au point sur ses cellules (netteté, temps d'exposition, ...) et lance le comptage. La caméra CCD détecte les cellules et grâce à un algorithme détermine le nombre et la taille des cellules, ainsi que la concentration et potentiellement la viabilité cellulaire. Les résultats obtenus sont présentés sous forme numérique, avec un histogramme de distribution des tailles et des images. L'utilisateur observe qualitativement ses résultats, peut choisir de refaire si besoin un comptage pour vérifier la reproductibilité des données, ou effectuer des modifications de paramètres pour optimiser son comptage.

Ce système nécessite l'utilisation de consommables (lames) dédiées et à usage unique et il ne permet d'effectuer qu'un seul comptage à la fois. Dans ce système automatisé, il existe une bibliothèque de données sur les lignées cellulaires incluant des indications sur la forme, la morphologie des cellules et aussi sur leur taille, diamètre, rotondité, intensité d'expression du marquage, ...

[Voir l'utilisation du Cellometer® en vidéo](#)

L'ajout de données qualitatives (visuels, images des cellules comptées, histogramme, viabilité, ...) aux données quantitatives a permis de démocratiser ce type de comptage au vue des avantages :

- Gain de temps, moins de manipulation
- Meilleure reproductibilité
- Sécurité pour l'utilisateur lors des manipulations (pas de lame en verre, pas de décontamination des outils)
- Garantie et qualité des résultats

De plus, la plupart des systèmes actuels donnent accès à des modules de fluorescence, permettant entre autre :

- Le comptage de cellules marquées (par ex. en Acridine Orange ou Iodure de Propidium)
- Le comptage de solutions cellulaires complexes telles que des échantillons sanguins

Grâce à toutes les données directement intégrées dans ce type de compteur automatisé, et au marquage en fluorescence (simple ou double), la discrimination des cellules vivantes ou mortes dans un échantillon cellulaire devient très facile et rapide. Par exemple, dans le cas d'un comptage en présence de globules rouges dans un échantillon, ces systèmes automatisés facilitent cette discrimination et l'énumération. Le bénéfice pour les utilisateurs est alors conséquent : gain de temps, diminution du nombre d'expériences, nombre d'erreurs potentielles minimisé, diminution des faux positifs et une efficacité de manipulation optimisée.

Questions fréquemment posées :

- **Je compte mes cellules en bleu de trypan, mais je constate souvent une sur-estimation de ma concentration cellulaire, comment éviter cela ?**

Le bleu de trypan contient souvent des petits précipités qui se mélangent à votre échantillon cellulaire et qui peuvent être comptés comme des cellules par votre compteur. Nous recommandons de diluer le bleu de trypan de stock (0,4 %) avec du PBS pour obtenir une solution à 0,2 %, le filtrer avec un filtre 0,2 μm puis de le mélanger ensuite à la suspension cellulaire au 1:1 pour effectuer le comptage. La filtration permet d'éliminer les précipités présents dans le bleu de trypan et optimise ainsi le comptage.

- **Lors de la numération cellulaire, si les cellules ne sont pas complètement individualisées, et qu'elles sont agrégées, comment doit-on compter ?**

De manière générale, il est conseillé de compter toutes les cellules (pour éviter de sous-estimer votre densité cellulaire). Que les cellules soient en agrégats (« cluster ») ou en division dans l'échantillon, il faut toute les dénombrer et non compter un agrégat comme une seule cellule. Il est également recommandé d'effectuer les comptages en triplicat. Le compteur automatisé [Cellometer® Auto1000](#) parvient à détecter, à individualiser et à compter toutes les cellules présentes dans un « cluster ».