

TP – La numération cellulaire

I-Principe

La numération cellulaire est la détermination du nombre de cellules contenues dans un volume précis de milieu liquide. On exprime le résultat de la numération en concentration cellulaire, c'est à dire en **nombre de cellules par litre**.

La numération cellulaire est réalisée directement par comptage au microscope, à l'aide d'une lame de comptage spéciale (ou cellule de numération).

II-Technique de numération cellulaire

1-Dilution préalable

Lorsque la suspension cellulaire est trop concentrée, il est nécessaire de réaliser une dilution préalable. En effet, lorsque la suspension est trop concentrée (grand nombre de cellules par unité de volume), il est difficile de compter les cellules.

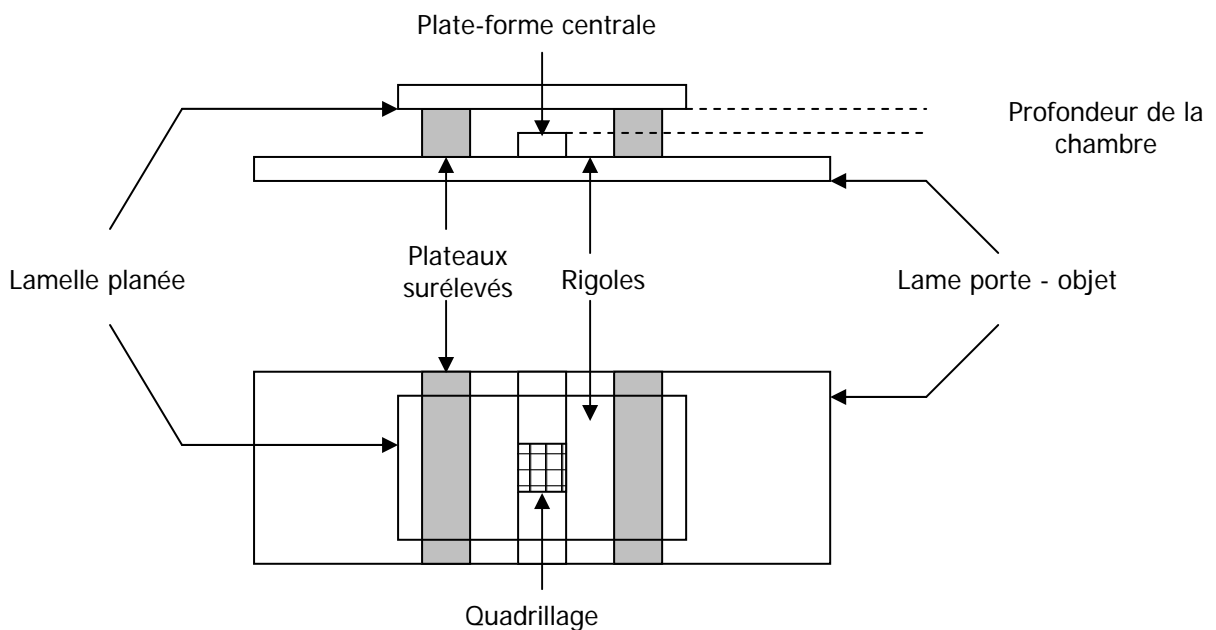
2-Utilisation de la cellule de numération

a-Présentation des cellules de numération

Il existe deux grands types principaux de cellules de numération :

- Cellule de Thoma.
- Cellule de Malassez (la plus courante).

Une cellule de numération est une lame porte objet dans laquelle est creusée une **chambre de comptage de volume connu**. C'est une lame épaisse en verre, comportant des rigoles et un quadrillage :

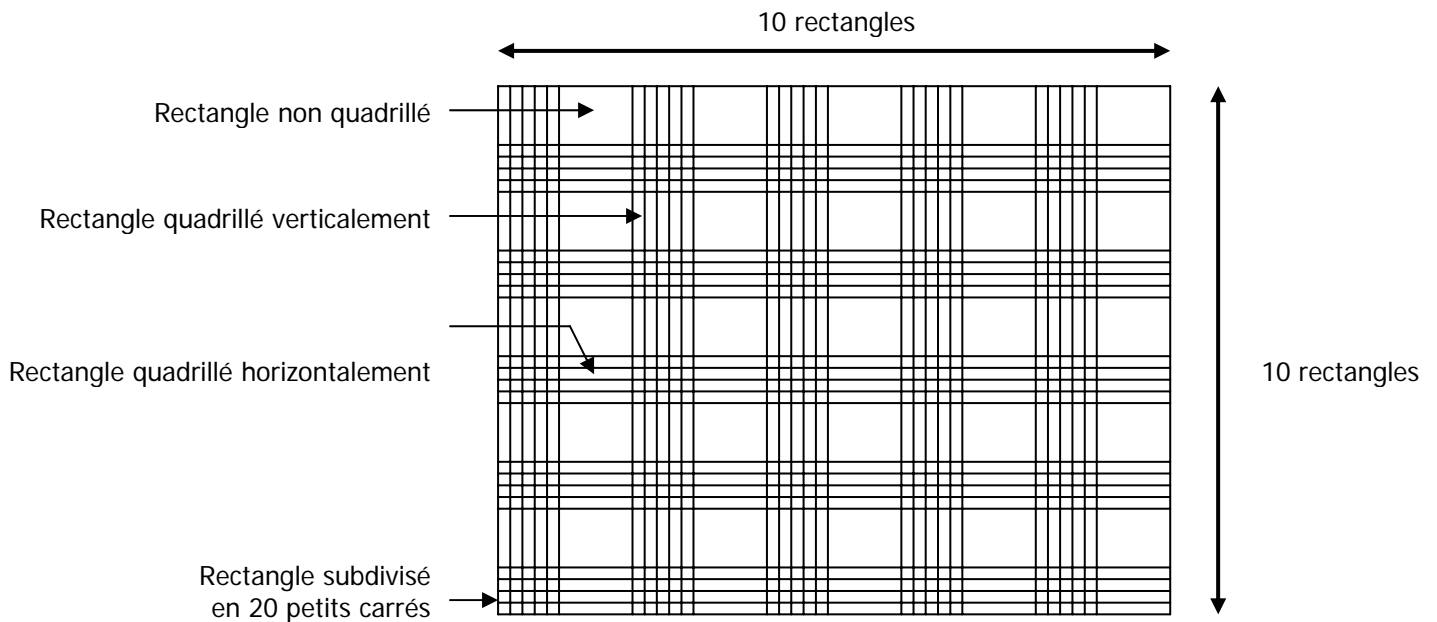


Le volume de comptage est déterminé par :

- la surface du quadrillage gravé sur la lame.
- la profondeur de la chambre.

b-La cellule de Malassez

La cellule de Malassez possède un quadrillage spécifique comportant 100 rectangles :



Parmi les 100 rectangles totaux, on trouve 25 rectangles qui sont divisés en 20 petits carrés afin de faciliter le comptage.

→ le volume correspondant au quadrillage total est égal à $1 \text{ mm}^3 = 10^{-6} \text{ dm}^3$

→ chaque rectangle correspond à un volume 100 fois plus faible, soit $0,01 \text{ mm}^3 = 10^{-8} \text{ dm}^3$

c-Remplissage de la cellule de numération

- Humecter les deux plateaux latéraux. Faire adhérer parfaitement la lamelle aux plateaux latéraux : pour cela placer la lamelle sur ces plateaux, puis à l'aide des pouces posés sur la lamelle, exercer une pression sur la lamelle tout en pratiquant un mouvement de va et vient jusqu'à perception d'une résistance.

- Placer la cellule de comptage sur une surface plane. Homogénéiser la suspension cellulaire, et prélever celle-ci à l'aide d'une pipette Pasteur. Remplir la chambre de comptage par capillarité, en plaçant la pointe de la pipette légèrement inclinée près de la lamelle sur la plate-forme centrale quadrillée.

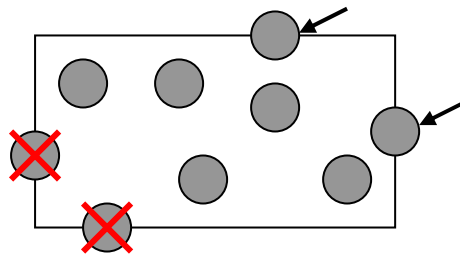
→ Le remplissage doit être fait en une seule fois, sans bulles d'air, et sans faire déborder le liquide dans les rigoles. Laisser sédimenter les cellules sur le quadrillage quelques minutes, et passer à la numération.

- Après utilisation, la lame porte-objet et la lamelle planée sont immergées dans un bain d'eau de Javel pendant 5 minutes, puis sont rincées avec de l'eau distillée et essuyées avec du papier (sans frotter, en particulier au niveau du quadrillage).

3-Numération

- Observer à l'objectif **x10** pour repérer la position du quadrillage, et vérifier l'homogénéité de la répartition des cellules à compter (si la répartition est mauvaise, recommencer).
- Observer ensuite à l'objectif **x40** pour réaliser le comptage (1 rectangle par champ).
- Compter les cellules contenues dans 4, 10, 20 ou dans la totalité des 100 rectangles du quadrillage.

Remarque : pour les cellules chevauchant les lignes de quadrillage, compter seulement celles qui chevauchent 2 arêtes du rectangle sur 4 (en pratique, on choisit de prendre en compte les cellules chevauchant la ligne horizontale supérieure, et la ligne verticale droite).



Numération sur le rectangle = 7 cellules

4-Calcul de la concentration cellulaire

Après avoir effectué la manipulation, on calcule la concentration cellulaire de la suspension de cellules étudiée.

- Soient :
- n : nombre de cellules comptées.
 - V : volume de comptage.
 - f : facteur de dilution.
 - N : nombre de cellules par litres.

Si on a n cellules dans V litres, alors on a N cellules dans un litre :

$$N \times V = n \times 1 \longrightarrow \boxed{N = n / V}$$

Si la solution avait été diluée : $N = (n / V) \times f$

III-Manipulation

On réalise le dénombrement de 2 échantillons :

- une suspension de levures de bière (*Saccharomyces cerevisiae*).
- une suspension diluée d'hématies bovines.

Réaliser chaque dénombrement en comptant sur 10 rectangles (choisir ces rectangles aux quatre coins du quadrillage).

Compte rendu

- Rappeler les caractéristiques principales de la cellule de Malassez (aspect, nombre de rectangles, volume de comptage total, volume de comptage pour un rectangle...)
- Rendre un tableau de résultats pour chaque dénombrement :

Exemple :

Rectangle	Nombre de cellules comptées	Volume de comptage (en dm^3)
1		
2		
3		
...		
	Nombre compté total =	Volume de comptage total =

- Calculer la concentration cellulaire de la suspension de levures. Rendre les résultats en nombre de cellules par dm^3 de suspension.
- Calculer la concentration cellulaire en hématies dans la suspension diluée d'hématies. Rendre le résultat en nombre d'hématies par dm^3 de suspension.

Sachant que cette suspension d'hématies a été obtenue en diluant 300 fois le sang testé, déduire la concentration cellulaire en hématies dans le **sang pur**. Rendre le résultat en nombre d'hématies par dm^3 de sang.