|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| Destinataires : professeurs | **Cytométrie manuelle** |  |
| Elaboration | 12/10/22 | Professeurs STL Biotechnologies |
| Relecture 1 | 04/01/23 | Julie CAVALLI, Pascale DIMANCHE, Julien FIJEAN, Laura MATTIELLO, Anastasie SIGWALT |

1. Attendus pour un niveau maitrisé
* Réaliser une dilution de l’échantillon si nécessaire dans un tube préalablement identifié, avec un colorant vital ou autre diluant
* Poser la cellule de comptage sur un support
* Humidifier les plateaux latéraux de la cellule de comptage
* Poser la lamelle et la faire adhérer aux plateaux latéraux
* Homogénéiser l’échantillon
* Prélever un petit volume avec une pipette automatique (minimum 20 µL) ou avec une pipette molle effilée
* Remplir la chambre de comptage dans sa totalité, sans débordement, en une seule fois, par capillarité en plaçant la pointe du cône à l’interface entre la lamelle et le plateau central de la cellule de comptage
* Placer la cellule de comptage sur le microscope éteint afin d’éviter les évaporations de l’échantillon
* Laisser sédimenter les cellules 5 min
* Régler le microscope pour une observation à l’objectif x10 (condenseur bas, diaphragme presque fermé, intensité lumineuse moyenne)
* Vérifier l’homogénéité de la répartition des cellules sur le quadrillage
* Régler le microscope pour une observation à l’objectif x40 en gardant les mêmes réglages qu’à l’objectif x10
* Vérifier la densité cellulaire ; si la densité est trop importante diluer l’échantillon (100 cellules dans 5 rectangles distinct minimum)
* Compter les cellules dans 5 rectangles de la chambre de comptage (au 4 coins + 1 au centre) sans compter deux fois les mêmes cellules (compter les cellules sur les lignes extérieures une seule fois, cf. schéma)
* Consigner les valeurs trouvées dans le cahier de laboratoire
* Déposer la cellule de comptage directement après comptage dans un bac de désinfectant.
* Laisse agir le désinfectant pendant au moins 5 min
* Rincer à l’eau distillée puis sécher la cellule de comptage avant de la ranger.
1. **Erreurs majeures pénalisantes**
* Trop de lumière entrainant le dessèchement de l’échantillon
* Volume de remplissage insuffisant ou remplissage en plusieurs fois
* Débordement de la suspension hors rigoles
* Non-respect du temps de sédimentation
* Problème de densité et d’homogénéité dans la répartition des cellules
* Mauvais comptage (source d’erreur non identifiée)
1. **Erreurs mineures non pénalisantes**
* Mauvais réglage du microscope n’empêchant pas le comptage
1. **Diversités des pratiques**
* Les cellules de comptage
* Fixer la lamelle à l’albumine d’œuf
* Si un microscope pour deux, difficile de faire sédimenter les cellules sur le microscope
1. **Propositions pédagogiques**
* Numération de levures
* Test de viabilité cellulaire au bleu de Funk