

LE COMPTAGE DES CELLULES SOMATIQUES

A TRAVERS LA LITTÉRATURE RECENTE

Le dénombrement des cellules somatiques du lait est devenu un élément important de la qualité du lait, d'où des études sur la question dans de nombreux laboratoires laitiers à travers le monde. Certains de ces travaux, qui étudient principalement les méthodes instrumentales automatisées ont été publiés récemment.

Une équipe australienne (Clarke et al.) a ainsi centré son travail sur l'effet de modifications de la préparation des échantillons ou des réactifs sur les résultats obtenus avec deux types d'appareils, fondés sur le même principe, mais de génération différente. Une équipe allemande (Heeschen et al.) a, elle, comparé les résultats donnés par des appareils fondés sur des supports de comptage différents. L'étude de la calibration et le développement d'échantillons de référence ont fait l'objet des travaux d'une équipe néerlandaise (Vermunt et al.). Enfin, une étude plus isolée s'intéresse uniquement au perfectionnement de la méthode de référence.

La littérature récente reflète le souci de la maîtrise des conditions expérimentales pour le dénombrement des cellules somatiques.

Des articles parus au cours de l'année 1995 étudient ainsi l'impact de la préparation des échantillons, des réactifs, des appareils utilisés, sur les comptages cellulaires instrumentaux. La calibration à l'aide d'échantillons à teneur garantie est également abordée. Enfin, on suggère de faire évoluer la méthode de référence.

Quelques articles récents

Clarke et al. (1995) s'intéressent principalement à l'influence des facteurs « mordants », sur la justesse du comptage des cellules. Rappelons qu'en bactériologie, un « mordant » est un agent intervenant dans une coloration, comme un intermédiaire qui facilite ou hâte la fixation du colorant sur l'objet à colorer.

Les facteurs susceptibles d'avoir un effet mordant sont notamment l'âge des échantillons, leur traitement par un conservateur ou par la chaleur, la préparation de certains réactifs. Leur étude est menée principalement sur deux types d'appareils différents, un appareil assez ancien à seuil fixe (Fossomatic 215) et un appareil plus moderne à seuil variable (Fossomatic 360).

Heeschen et al. (1994) évaluent les résultats obtenus par un appareil de comptage par cytométrie de flux (Somacount) dans différentes conditions de conservation des échantillons. Puis ils comparent les résultats de mesure obtenus selon ce principe avec ceux provenant d'un Fossomatic 360, autre type de compteur automatique, utilisant le même procédé de coloration des cellules, mais un support de comptage différent.

Vermunt et al. (1995) ont surtout le souci de développer des échantillons de référence à teneur garantie pour le calibrage des appareils (Fossomatic 360, dans leur cas).

Faltusz (1994), enfin, ne s'intéresse qu'à l'amélioration de la méthode de référence.

LES FACTEURS AFFECTANT LE COMPTAGE INSTRUMENTAL

↳ AGE DES ECHANTILLONS

Les échantillons trop jeunes sont réputés aboutir à une sous-estimation des comptages cellulaires (Grappin et Jeunet, 1974). La norme FIL 148A:1995 recommande d'ailleurs de laisser reposer les échantillons sans conservateur au moins 24h au frais avant de les analyser selon une méthode fluoro-opto-électronique. Heeschen et al. notent cependant un manque de stabilité des comptages cellulaires entre 24 et 48 h de stockage réfrigéré pour des échantillons de lait cru exempts de conservateur.

Clarke et al. confirment que les cellules trop jeunes prennent mal le colorant et conseilleraient même un stockage plus long des échantillons, aussi bien dans le cadre d'une méthode instrumentale que dans la méthode de référence.

↳ EFFET DES CONSERVATEURS

On a reconnu depuis longtemps (Grappin et Jeunet) l'effet mordant du dichromate de potassium, ce qui augmente les résultats des comptages cellulaires. Clarke et al. attribuent cet effet à une intensité de coloration plus forte des cellules et constatent des effets très proches pour le dichromate de potassium et le bronopol. Heeschen et al. observent de même des comptages cellulaires plus élevés en présence de conservateur. Ils obtiennent des résultats comparables entre le dichromate de potassium, le bronopol et l'acide borique; plus faibles en revanche pour l'azide de sodium.

Le bronopol et le dichromate de potassium garantissent, de manière égale, une stabilité du comptage cellulaire pendant au moins 48h, quel que soit le niveau de concentration en cellules. Cela semble plus délicat aux niveaux cellulaires élevés avec l'azide de sodium et l'acide borique (Heeschen et al.).

↳ EFFET D'UN TRAITEMENT THERMIQUE

Une stabilité du comptage sur une durée beaucoup plus longue (10-12 semaines), recherchée pour le développement

d'échantillons à teneur garantie ne peut toutefois être obtenue que par un traitement thermique, suivi de l'addition d'un conservateur (Vermunt et al.). Clarke et al. observent en outre un effet mordant dû au traitement thermique, principalement lors des comptages avec les appareils anciens ayant tendance à sous-estimer les comptages. Cet effet se surajouterait aux effets dus au vieillissement des échantillons et aux conservateurs. Clarke et al. l'attribuent à une augmentation de la perméabilité de la membrane cellulaire aux colorants, sous l'effet de la chaleur.

↳ AMELIORATION DES REACTIFS

Persuadés de l'importance à accorder à tout ce qui est susceptible de modifier la perméabilité membranaire, Clarke et al. ont étudié les conséquences des modifications expérimentales portant sur tous les réactifs qui contiennent du Triton, un agent perméabilisant. Ils en concluent que, particulièrement pour les appareils anciens, il serait souhaitable de diminuer la durée de stockage des solutions diluées de Triton et d'augmenter la concentration en Triton des réactifs, afin de garantir leur pouvoir perméabilisant.

↳ INFLUENCE DE L'APPAREIL

Heeschen et al. ont comparé des appareils basés sur le même principe de mesure, mais dont le support de comptage diffère, à savoir le Somacount (Bentley USA) et le Fossomatic 360 (Foss Electric Danemark).

Le Somacount utilise la cytométrie de flux, une méthode fluoro-opto-électronique basée sur la numération automatique des cellules en suspension dans un flux liquide en écoulement laminaire devant un objectif microscopique. Le Fossomatic 360, dont le principe de coloration est similaire effectue sa lecture sur un film de suspension cellulaire, déposé sur la tranche d'un disque en rotation devant un objectif microscopique. Ils en concluent à des résultats comparables.

Par contre, il faut être plus prudent avec des appareils de génération différente. Clarke et al. soulignent ainsi que les résultats obtenus avec les Fossomatic 215, appareils à seuil fixe, sont bien plus sensibles à l'impact des effets mordants qu'avec les appareils à détermination automatique de seuil, comme les Fossomatic 360. Quand l'effet mordant est défavorable, la fluorescence des cellules est certes réduite avec tous les appareils. Mais les comptages cellulaires obtenus risqueront de ne diminuer de façon considérable que pour les appareils anciens, incapables de distinguer la fluorescence des cellules de celle du fond.

Clarke et al. conseillent donc de veiller tout particulièrement à l'optimisation des effets mordants avec les appareils anciens. Pour pouvoir diagnostiquer les cas où les différents facteurs évoqués ci-dessus exercent des effets défavorables sur l'efficacité du comptage cellulaire, ils proposent de modifier les procédures de calibrage des appareils. Ils suggèrent ainsi d'utiliser ensemble deux séries d'échantillons de calibrage identiques, l'une non chauffée, et l'autre chauffée. Les résultats obtenus ne devraient pas différer.

Améliorer la norme !

Clarke et al. proposent que des précisions concernant l'ensemble des facteurs évoqués ci-dessus soient apportées en complément dans le texte de la norme FIL actuelle.

Il leur semblerait même que la méthode de référence doive elle aussi être revue. La littérature a déjà souligné sa sensibilité à certains effets mordants (Schmidt Madsen, 1979, in Clarke et al.), ainsi que ses incertitudes (Heeschen et al.; Faltusz). Des modifications significatives ont d'ailleurs déjà été proposées (Faltusz).

Ces études ont le mérite de soulever de nombreuses questions. Elles peuvent inciter à une réflexion dans la définition des méthodes d'étalonnage, de contrôle d'appareils et d'analyse proprement dites.

Bibliographie

CLARKE T.; EVANS M.E.; HEPWORTH G.; MOATE P.; STEWART J.A. Mordant factors that affect the fluorescence and counting of somatic cells by instruments. *J. Dairy Research*, 1995, V. 62, p. 373-394

FALTUSZ E. Bestimmung der Anzahl somatischer Zellen in Rohmilch mit der REF-methode. [*Dénombrement des cellules somatiques du lait par la méthode REF*]. *Z. Lebensm. Unters. Forsch.*, 1994, V. 199, N. 3, p. 219-221 [résumé en anglais]

GRAPPIN R.; JEUNET R. Premiers essais de l'appareil Fossomatic pour la détermination automatique du nombre de cellules du lait. *Lait*, 1974, V. 54, N. 539-540, p. 627-644

HEESCHEN W.H.; UBBEN E.H.; RATHJEN G. Zählung somatischer Zellen in Milch : Untersuchungen zur Messung in der Durchflußzytometrie (Somacount) und Vergleich mit den Meßergebnissen nach fluoreszenzoptischem Prinzip (Fossomatic 360). [*Dénombrement des cellules somatiques dans le lait : essais de mesure en cytométrie de flux (Somacount) et comparaison avec les résultats obtenus par une méthode fluoroptique (Fossomatic 360)*]. *Kieler Milchwirtschaftliche Forschungsberichte*, 1994, V. 46, N. 4, p. 291-316 [résumé en français]

VERMUNT A.E.M.; LOEFFEN G.J.M.; VAN DER VOET H; NABER M.A.A.M. Development of reference samples for the calibration and quality control of somatic cell count using a Fossomatic instrument. *Netherlands Milk and Dairy Journal*, 1995, V. 49, p. 111-123

