

Zeitschrift: Archives des sciences [1948-1980]
Herausgeber: Société de Physique et d'Histoire Naturelle de Genève
Band: 8 (1955)
Heft: 4

Artikel: L'efficacité du dénombrement dans l'hémacytomètre
Autor: Uehlinger, Verena / Linder, Arthur
DOI: <https://doi.org/10.5169/seals-739863>

Nutzungsbedingungen

Die ETH-Bibliothek ist die Anbieterin der digitalisierten Zeitschriften. Sie besitzt keine Urheberrechte an den Zeitschriften und ist nicht verantwortlich für deren Inhalte. Die Rechte liegen in der Regel bei den Herausgebern beziehungsweise den externen Rechteinhabern. [Siehe Rechtliche Hinweise.](#)

Conditions d'utilisation

L'ETH Library est le fournisseur des revues numérisées. Elle ne détient aucun droit d'auteur sur les revues et n'est pas responsable de leur contenu. En règle générale, les droits sont détenus par les éditeurs ou les détenteurs de droits externes. [Voir Informations légales.](#)

Terms of use

The ETH Library is the provider of the digitised journals. It does not own any copyrights to the journals and is not responsible for their content. The rights usually lie with the publishers or the external rights holders. [See Legal notice.](#)

Download PDF: 04.05.2025

ETH-Bibliothek Zürich, E-Periodica, <https://www.e-periodica.ch>

1) la phase de Gimillian, 2) la phase de Champlong, 3) la phase de Valnontey, suivies de stades des cirques latéraux.

Bien entendu, à propos d'homologies et d'âges glaciaires dans la vallée de Cogne je me garde de penser quoi que ce soit de définitif, mais il se pourrait bien que ces trois phases soient ici les équivalents du Buhl, du Gschnitz et du Daun. Ceci devra être précisé, mais en tout cas c'est dans cette vallée et non à Gressan que le Gschnitz peut se trouver.

Verena Uehlinger et Arthur Linder. — *L'efficacité du dénombrement dans l'hémacytomètre.*

Introduction.

L'estimation de la concentration d'une suspension de micro-organismes unicellulaires, par exemple de certaines algues, de spores de champignons, de levures, etc. peut s'effectuer par dénombrement des cellules présentes dans un volume connu de la suspension, volume qui se trouve dans une cellule de comptage appelée hémacytomètre. L'efficacité de cette estimation est définie par la quantité d'information fournie par rapport aux frais (ou par rapport au temps). La recherche de l'efficacité optimale, c'est-à-dire du maximum d'information, nous a conduits à appliquer la théorie de l'optimum à une série de dénombrements effectués préalablement. Cette théorie traitée dans les ouvrages de W. A. Shewhart [2] et de W. Snedecor [3] peut être appliquée à tous les systèmes d'hémacytomètres; nous traiterons ici deux exemples: l'hémacytomètre à un seul réseau, et celui à deux réseaux.

Technique.

Les hémacytomètres utilisés (modèles Zeiss-Thoma) comprennent un volume de $0,1 \text{ mm}^3$ au-dessus d'une surface de 1 mm^2 divisée en 20×20 carrés (fig. 1).

Le nouveau modèle possède deux réseaux de comptage indépendants, tandis que l'ancien modèle n'en a qu'un seul. Suivant le modèle, on prépare l'hémacytomètre avec une ou bien deux gouttes de la suspension dont on désire connaître

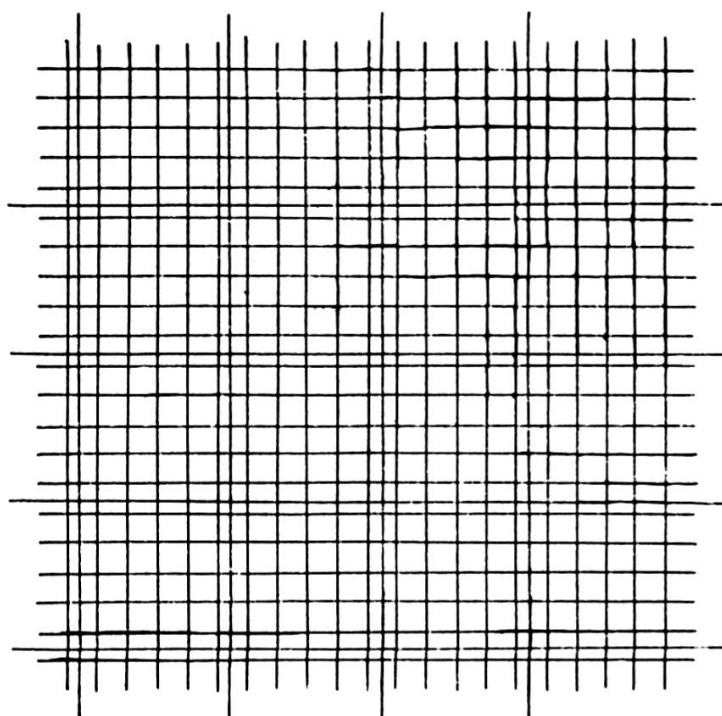


Fig. 1.

Division de 1 mm² en 400 carrés dans l'hémacytomètre.

la concentration. Dans la surface totale on choisit alors systématiquement un certain nombre de carrés, et on détermine ensuite le nombre de cellules que ceux-ci contiennent. La concentration est le nombre de cellules par 0,1 mm³. Nous la calculons en multipliant la quantité totale de cellules situées dans les carrés dénombrés par le rapport suivant :

$$\frac{\text{nombre de carrés du réseau entier}}{\text{nombre de carrés dénombrés}} .$$

La moyenne $\bar{x}$ des cellules par carré est donnée par le rapport

$$\frac{\text{total des cellules dans les carrés dénombrés}}{\text{nombre de carrés dénombrés}} .$$

Le problème.

On constatera toujours que ces valeurs de dénombrement varient d'une préparation à l'autre, d'un réseau à l'autre, et même d'un carré à l'autre. Nous pouvons éliminer une partie de cette variabilité en nous basant sur des valeurs moyennes. Toutefois, certains dénombrements faits dans l'hémacytomètre

à un seul réseau ont montré une importante variabilité entre préparations. Pour diminuer cette grande variabilité, il paraît nécessaire de dénombrer un petit nombre de carrés dans plusieurs préparations différentes.

Avec quelle précision peut-on alors évaluer la concentration ? Pratiquement, quel sera le nombre de préparations à faire et combien de carrés seront à dénombrer dans chacune d'elles pour obtenir, dans les conditions de temps fixées, le maximum de précision ? Nous considérons comme la plus précise l'estimation expérimentale $\bar{x}$ qui fournit un nombre de cellules situé le plus près possible de la moyenne théorique μ , μ indiquant la vraie concentration; on appelle donc $\bar{x}$ une estimation de μ .

La variabilité de la moyenne $\bar{x}$ est composée d'une variabilité entre carrés, d'une variabilité entre préparations et d'une variabilité entre échantillons. Ces variabilités peuvent être mises en évidence à l'aide d'une analyse de variance appliquée à une série de dénombrements préalables. Quel que soit le modèle d'hémacytomètre utilisé, tous les réseaux sont préparés indépendamment les uns des autres. On peut donc en conclure que la variabilité entre réseaux ne doit pas différer significativement de la variabilité entre préparations. Ainsi, dans nos calculs, la variabilité entre réseaux inclura celle des préparations.

Théorie de l'optimum.

L'estimation, par l'analyse de variance [1], des différentes composantes de la variabilité totale nous permet d'examiner l'efficacité des dénombrements par rapport au temps (ou par rapport à leurs frais).

Posons

σ_r^2 = composante de la variance entre réseaux

σ_c^2 = » » » » entre carrés,

et

N_p = nombre de préparations

N_r = nombre de réseaux par préparation

N_c = nombre de carrés choisis par réseau.

L'analyse de variance nous permet d'estimer les grandeurs σ_r^2 et σ_c^2 par les relations suivantes:

$$\sigma_c^2 = \text{CM entre carrés} \quad (\text{CM, abrég. de Carré moyen}),$$

$$N_c \cdot \sigma_r^2 + \sigma_c^2 = \text{CM entre réseaux},$$

donc

$$\sigma_r^2 = \frac{\text{CM entre réseaux} - \sigma_c^2}{N_c}.$$

Avec les composantes σ_r^2 et σ_c^2 nous pouvons évaluer la variance $\sigma_{\bar{x}}^2$ de la moyenne totale $\bar{x}$ pour des nombres N_p et N_c quelconques.

On a pour variance $\sigma_{\bar{x}}^2$:

$$\sigma_{\bar{x}}^2 = \frac{N_r (\sigma_c^2 + N_c \cdot \sigma_r^2)}{N_c \cdot N_p}. \quad (1)$$

On appelle *information* ou *précision* l'inverse de cette variance:

$$\frac{1}{\sigma_{\bar{x}}^2} = \frac{N_c \cdot N_p}{N_r (\sigma_c^2 + N_c \cdot \sigma_r^2)}. \quad (1a)$$

Si nous posons

K_c = temps pour le dénombrement d'un seul carré,

K_p = temps pour 1 remplissage d'hémacytomètre = 1 préparation,

le temps total K se calcule alors selon

$$K = N_p (K_p + N_r \cdot N_c \cdot K_c). \quad (2)$$

L'information par unité de temps (ou par unité de frais) est égale à:

$$\frac{1/\sigma_{\bar{x}}^2}{K} = \frac{N_c}{N_r (\sigma_c^2 + N_c \cdot \sigma_r^2) \cdot (K_p + N_r \cdot N_c \cdot K_c)}. \quad (3)$$

Pour que cette information soit maximum, il faut que:

$$\frac{\partial}{\partial N_c} \left(\frac{1}{\sigma_{\bar{x}}^2 \cdot K} \right) = 0,$$

d'où l'on tire:

$$N_{c, \min} = \sqrt{\frac{K_p}{N_r \cdot K_c} \cdot \frac{\sigma_c^2}{\sigma_r^2}}. \quad (4)$$

Soit K_0 le temps total (mesuré) pour la détermination de $\bar{x}$, c'est-à-dire le temps pour compter le nombre de cellules, ajouté au temps des préparations; autrement dit:

$$K_0 = N_p \cdot N_r (N_c \cdot K_c) + N_p \cdot K_p, \quad (\text{cf. formule 2})$$

alors:

$$N_p = \frac{K_0}{K_p + N_r (N_{c, \min} \cdot K_c)}. \quad (5)$$

Les équations 3, 4 et 5 montrent que si nous choisissons pour K une valeur fixe K_0 , il n'existe qu'un seul couple de valeurs N_p , N_c pour lequel $\sigma_{\bar{x}}^2$ est minimum.

Nous pouvons nous faire une idée de la variance $\sigma_{\bar{x}}^2$ en calculant l'écart $|\bar{x} - \mu|$ entre la valeur calculée $\bar{x}$ et la moyenne théorique μ suivant la formule

$$|\bar{x} - \mu| = t \cdot \sigma_{\bar{x}}. \quad (6)$$

t est une variable statistique répartie suivant une loi de probabilité connue. On désigne par $t_{0,95}$ la valeur de la variable t telle que dans 95 estimations sur 100, la vraie valeur μ de la moyenne $\bar{x}$ soit située entre les limites

$$\bar{x} - t_{0,95} \sigma_{\bar{x}} \quad \text{et} \quad \bar{x} + t_{0,95} \sigma_{\bar{x}}.$$

Le nombre $t_{0,95}$ se trouve dans les tables statistiques [1]. Ce nombre dépend du *degré de liberté* n qui se calcule suivant la formule: $n = N_p \cdot N_c - 1$.

Applications.

Hémacytomètre à un réseau ($N_r = 1$).

D'une suspension de levures (*Saccharomyces Cerevisiae*), trois échantillons a , b , c furent prélevés et dilués chacun à 1/1000, concentration favorable au dénombrement. Dans

chaque échantillon cinq ou six préparations hémacytométriques furent dénombrées:

TABLE 1.

*Nombre de cellules trouvées dans 144 carrés
(carrés marqués d'un trait supplémentaire, voir fig. 1).*

Préparation	Echantillon		
	a	b	c
1	331	472	465
2	446	451	457
3	599	510	429
4	402	474	448
5	450	467	573
6	465	...	...
Total	2693	2374	2372
Moyenne de l'échantillon:			
	$\bar{x}_a = 449$	$\bar{x}_b = 475$	$\bar{x}_c = 474$

Pour estimer la concentration d'un échantillon, nous nous basons sur les moyennes $\bar{x}_a$, $\bar{x}_b$ et $\bar{x}_c$ par réseau. La moyenne $\bar{x}$ par carré est donnée par le rapport

$$\frac{\text{total des cellules dans les carrés dénombrés}}{\text{nombre de carrés dénombrés}}.$$

Elle vaut donc

$$\bar{x} = \frac{2693 + 2374 + 2372}{144 \cdot (6 + 5 + 5)} = 3,229 \quad (\text{cellules/carré})$$

Nous déterminons la variabilité entre échantillons, entre préparations et entre carrés à l'aide de l'analyse de variance résumée dans le tableau suivant.

Cette analyse de variance nous conduit à la détermination des valeurs optimales; elle fournit les valeurs suivantes:

$$\sigma_c^2 = 3,44$$

$$\sigma_r^2 = \frac{28,66 - 3,44}{144} = 0,175.$$

TABLE 2.

*Analyse de variance.**Variabilités entre échantillons, entre préparations et entre carrés*

Origine de la variation	Degrés de liberté (DL)	Carré moyen (CM)	Estimation de
Echantillons . .	2	8,9	$\sigma_c^2 + 144 \sigma_r^2$ σ_c^2
Préparations . .	13	28,66	
Carrés	2288	3,44	
Total	2303	—, —	

Les temps utilisés ont été mesurés chronométriquement:

$$K_p = 120 \text{ sec.}$$

$$K_c = 3 \text{ sec.}$$

Le temps nécessaire pour déterminer $\bar{x}$ était de

$$K_0 = 16 \cdot (120 + 3 \cdot 144) = 8832 \text{ secondes} = 147 \text{ minutes}$$

avec

$$N_r = 1, \quad N_p = 16 \quad \text{et} \quad N_c = 144.$$

Le nombre $N_{c, \min}$ de carrés à compter par préparation, correspondant au minimum de la variance $\sigma_{\bar{x}}^2$, est égal à

$$N_{c, \min} = \sqrt{\frac{120}{3} \cdot \frac{3,44}{0,175}} = 28. \quad (\text{form. 4}).$$

Un temps K_0 étant donné, le nombre $N_{c, \min}$ détermine d'une part le nombre N_p de préparations à faire, d'autre part la valeur minimum $\sigma_{\bar{x}}^2$ de la variance totale de la moyenne $\bar{x}$. C'est-à-dire:

$$N_p = \frac{K}{120 + 28 \cdot 3}, \quad (\text{form. 5, où } N_c = N_{c, \min});$$

$$\sigma_{\bar{x}}^2 = \frac{3,44 + 28 \cdot 0,175}{28 \cdot N_p}, \quad (\text{form. 1, où } N_c = N_{c, \min}).$$

La table suivante contient le nombre N_p et les variances $\sigma_{\bar{x}}^2$ pour différentes valeurs de K .

TABLE 3.

Nombre de préparations N_p , variances $\sigma_{\bar{x}}^2$ et écarts $|\bar{x} - \mu|$ pour différentes valeurs de K .

$$\sigma_c^2 = 3,44 \quad \text{et} \quad \sigma_r^2 = 0,175$$

$$K_c = 3 \text{ s} \quad \text{et} \quad K_p = 120 \text{ s}$$

$$N_{c, \min} = 28$$

K	N_p	$\sigma_{\bar{x}}^2$	$t_{0,95}$	$ \bar{x} - \mu $
5530	27	0,0102	1,963	0,198
3600	18	0,0165	1,965	0,253
2400	12	0,0248	1,968	0,310
1800	9	0,0339	1,970	0,363
1200	6	0,0509	1,975	0,446
900	4	0,0681	1,980	0,516
600	3	0,0993	1,994	0,628

Il est bien entendu que ces chiffres dépendent des valeurs K et σ déterminées par les conditions d'échantillonnage que nous avons observées dans notre exemple.

Hémacytomètre à deux réseaux indépendants ($N_r = 2$).

En raccourcissant le temps K_0 par une diminution de K_c ou de K_p , on obtient une plus grande information par unité de temps. Une amélioration de ce type est réalisée par des modèles plus modernes d'hémacytomètres qui permettent de remplir simultanément deux préparations indépendantes.

Les résultats d'une série de dénombrements dans des suspensions parallèles d'algues (*Diplosphaera Chodati*) et l'analyse de variance correspondante sont groupés dans les tables 5 et 6.

On a donc:

$$\sigma_c^2 = 2,5268$$

et

$$\sigma_r^2 = 0,0021425 .$$

TABLE 5.

Nombre de cellules trouvées dans 40 carrés.

Préparation		Echantillon				
	Réseau	a	b	c	d	e
1	1	75	90	111	84	106
	2	78	103	72	91	106
2	1	81	96	81	81	106
	2	94	82	87	88	124

TABLE 6.

*Analyse de variance.**Variabilités entre échantillons, entre réseaux et entre carrés.*

Origine de la variation	Degrés de liberté (DL)	Carré moyen (CM)	Estimation de
Echantillons . .	4	12,277	$\sigma_c^2 + 40 \sigma_r^2$
Réseaux	15	2,6125	
Carrés	780	2,5268	
Total	799	—	

Les temps utilisés (mesures chronométriques) sont :

$$K_c = 2,5 \text{ secondes}$$

et

$$K_p = 140 \text{ secondes.}$$

La moyenne totale $\bar{x} = 2,2975$.

Le temps total pour déterminer la moyenne $\bar{x}$:

$$K_0 = 10 (140 + 2 \cdot 40 \cdot 2,5) = 3400 \text{ secondes} = 56 \text{ minutes.}$$

Le nombre $N_{c, \min}$ de carrés à dénombrer par réseau, assurant le maximum d'information, est égal à :

$$N_{c, \min} = \sqrt{\frac{140}{2 \cdot 2,5} \cdot \frac{2,5268}{0,0021425}} = 181,5 \simeq 182 .$$

Le nombre N_p de préparations, ainsi que les écarts $|x - \mu|$ et les variances σ_x^2 sont donnés dans le tableau suivant en fonction de différentes valeurs de K .

TABLE 7.

Nombre de préparations N_p , variances σ_x^2 et écarts $|\bar{x} - \mu|$ pour quelques valeurs de K .

$$\sigma_c^2 = 2,5268 \quad \text{et} \quad \sigma_r^2 = 0,0021425$$

$$K_c = 2,5 \text{ s} \quad \text{et} \quad K_p = 140 \text{ s}$$

$$N_{c, \min} = 181,5$$

K	N_p	σ_x^2	$t_{0,95}$	$ \bar{x} - \mu $
3400	3,25	0,0130	1,965	0,224
2400	2,29	0,0184	1,966	0,267
1800	1,72	0,0245	1,968	0,308
1200	1,15	0,0367	1,972	0,378
900	0,86	0,0491	1,976	0,438

Pratiquement on se contentera de prendre pour N_p et N_c des nombres entiers. La table 7 prend alors la forme suivante:

TABLE 8.

Nombre de préparations N_p , écarts $|\bar{x} - \mu|$ et variances σ_x^2 pour quelques valeurs de K .

$$N_c = 182$$

N_p	K	σ_x^2	$t_{0,95}$	$ \bar{x} - \mu $
3	3142,5	0,0141	1,965	0,233
2	2095	0,0211	1,967	0,286
1	1047,5	0,0422	1,972	0,405

Discussion.

L'analyse de variance des dénombrements avec l'hémacytomètre à un réseau nous indique une variabilité entre prépara-

tions beaucoup plus importante qu'entre carrés d'un réseau. Cela s'explique par les nombreuses possibilités de fautes techniques pouvant s'introduire, par exemple lors du pipettage de petits volumes, ou par évaporation pendant la préparation, et surtout par la difficulté de remplir correctement la cellule de comptage. On voit facilement que, pour éviter une trop grande erreur dans l'estimation de la concentration, il est nécessaire de faire plusieurs préparations, dans chacune desquelles on ne dénombre qu'un petit nombre de carrés. La meilleure estimation de la concentration nous est fournie par le nombre de préparations et le nombre de carrés calculés ci-dessus. Nous choisirons ce couple de nombres selon le temps disponible pour le dénombrement, ou selon la précision désirée dans l'estimation.

L'hémacytomètre à deux réseaux demande une technique de remplissage plus simple et qui élimine dans une large mesure les grandes variations entre réseaux. C'est ce que nous indique l'analyse de variance: la variabilité entre réseaux ne s'écarte pas significativement de la variabilité entre carrés, comme le montre le test de F [1]. Il est donc normal que par préparation, un grand nombre de carrés soit dénombré, mais que par contre le montage d'un petit nombre de préparations soit suffisant.

Ces valeurs de la variance nous servent aussi de *contrôle technique* de nos opérations. Une analyse de variance plus complète des valeurs de l'exemple 2 indiquerait, au lieu de la variance entre tous les réseaux une variance entre préparations d'une part, et une variance entre réseaux, d'autre part (entre réseaux à l'intérieur des préparations). Nous y constatons la différence non significative entre la variance entre préparations et la variance entre réseaux (test de F). Ceci permet de ne considérer que la variance totale entre tous les réseaux; une différence significative indiquerait des erreurs techniques provenant soit d'un mauvais brassage de la suspension avant le prélèvement des gouttes à analyser, soit d'une communication existant entre les gouttes posées sur les deux réseaux d'une même préparation.

Chaque expérimentateur a son propre rythme de travail, par conséquent il aura à déterminer ses propres temps K_c et K_p et les variances σ_c^2 et σ_p^2 . Une certaine influence sur ces

TABLE 9.

Analyse de variance pour le contrôle.

Origine de la variation	Degrés de liberté (DL)	Carré moyen (CM)
Echantillons	4	12,277
Préparations	5	1,5925
Réseaux	10	3,1225
Carrés	780	2,5268
Total	799	—

valeurs, surtout sur le temps K_c , est exercée par la concentration même de la suspension. Ainsi, il nous paraît recommandé de diluer préalablement la suspension de façon à ce que les cellules situées dans un carré puissent être comptées d'un coup d'œil; en d'autres termes: la concentration de la suspension devrait être telle qu'un carré ne contienne en général pas plus de cinq cellules.

Toutes ces déterminations de valeurs optimales, à partir d'une série de dénombrements, demandent plusieurs heures, éventuellement même des journées de travail. Pour quelques dénombrements occasionnels, un tel travail ne présente guère d'avantage, alors qu'il assure une économie de temps ou un gain de précision appréciables au moment où on est appelé à examiner de longues séries de suspensions du même genre, comme dans le cas de l'étude [5] portant sur la croissance d'une algue unicellulaire en culture.

Université de Genève.

Institut de Botanique générale.

Laboratoire de Statistique mathématique.

BIBLIOGRAPHIE

1. A. LINDER, *Statistische Methoden*, Birkhäuser, 1951, p. 123.
2. W. A. SHEWHART, *The Economic Control of Quality of Manufactured Product*, 1931, p. 389.

3. W. SNEDECOR, *25th Session Internat. Stat. Inst. Proceedings*, 1947, Vol. III, Part A, p. 440.
4. L. H. C. TIPPET, *The Methods of Statistics*, 1931, p. 177.
5. V. UEHLINGER et F. CHODAT, « Influences d'intensités lumineuses sur la croissance ». *Archives des Sciences*, 1955, vol. 8, fasc. 2, p. 187.

R. Lagier et G. Pollmann. — *Contribution à l'étude de l'os oestrogénique chez la Souris. Administration d'Héparine au cours de son développement.*

La substance osseuse se compose d'une matrice protéique sur laquelle sont fixés des sels minéraux. Depuis quelques années de nombreux travaux ont précisé la nature de cette charpente organique; étant une différenciation du tissu conjonctif, elle se compose d'une substance fondamentale au sein de laquelle sont noyées des cellules (les ostéocytes) et des fibres collagènes (que l'on peut mettre en évidence au microscope électronique).

Cette substance fondamentale se dépose en présence de cellules conjonctives d'un type particulier: les ostéoblastes; à un stade plus avancé, ceux-ci sont englobés dans la masse ainsi formée et deviennent des ostéocytes. Elle est essentiellement constituée par des combinaisons de protéines et de polysaccharides; le mieux connu de ceux-ci est l'acide chondroïtine-sulfurique, déjà mis en évidence par Karl Meyer en 1938 au niveau de l'os spongieux. L'emploi de méthodes histochimiques a montré que l'os non calcifié (ou ostéoïde) est métachromatique après coloration par le bleu de Toluidine (Follis); la même propriété a été signalée par Godart au niveau de l'os folliculaire chez le Pigeon. On sait que ce caractère tinctorial traduit la présence de mucopolysaccharides acides à l'état polymérisé (Lison).

Récemment certains travaux ont montré que l'héparine (qui appartient au groupe des mucopolysaccharides acides) est susceptible de modifier le métabolisme d'autres mucopolysaccharides acides, du moins dans certaines conditions. Sans pouvoir préciser exactement le mécanisme en cause, Thiery a montré son effet cliniquement favorable sur l'évolution d'une