

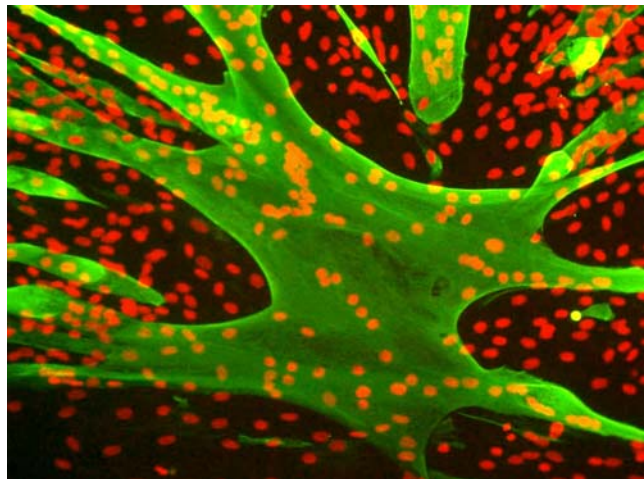
## MyoCellCompt

### Une méthode automatique de quantification de la différenciation des myoblastes en culture

Arnaud Delavaud<sup>1</sup>, Bruno Meunier<sup>1</sup>, Brigitte Picard<sup>1</sup> et Isabelle Cassar-Malek<sup>1</sup>

**Résumé :** *En culture de cellules musculaires, les cellules ont la particularité, lors de leur différenciation, de fusionner entre elles pour former des myotubes, précurseurs des fibres musculaires qui ont la faculté de se contracter. Deux des principales données étudiées sont les indices de prolifération et de différenciation. La mesure de ces indices se fait généralement par comptage manuel sous microscope des noyaux totaux et des noyaux présents dans les myotubes. Ces comptages étant longs et fastidieux, nous les avons automatisé à l'aide du logiciel Visilog 6.7 (© Noesis, France). Cette nouvelle méthode de comptage donne des résultats plus représentatifs de l'état de différenciation des cultures et de plus, elle permet de mesurer la taille des myotubes.*

**Mots clés :** culture de cellules, comptage de noyaux, myotube, myoblaste, noyau, analyse d'images, automatisation.



Cellules musculaires bovines après 10 jours de culture

### Introduction

La différenciation des cellules musculaires est caractérisée à la fois par des critères morphologiques (formation des fibres musculaires) et biochimiques (expression de marqueurs contractiles et métaboliques).

Les cellules musculaires non différenciées, appelées myoblastes, ont la particularité de fusionner entre elles pour former des cellules plurinucléées, appelées myotubes, qui vont ensuite maturer en fibres musculaires (Robelin, 1990). Ces fibres ont la faculté de se contracter grâce à un appareil contractile et un équipement d'enzymes métaboliques très spécialisés.

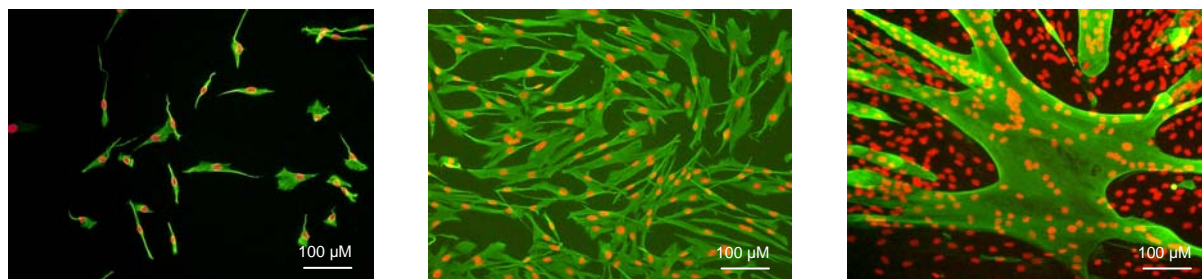
---

<sup>1</sup> UR1213 Herbivores – Equipe C2M (Croissance et Métabolisme du Muscle)

INRA – F- 63122 Saint-Genès-Champanelle ☎ 04 73 62 47 30 ✉ [Arnaud.Delavaud@clermont.inra.fr](mailto:Arnaud.Delavaud@clermont.inra.fr)

Ce processus de différenciation peut être reproduit en culture (Picard *et al.*, 1998) (**figure 1**). La différenciation morphologique des cellules musculaires peut être caractérisée par l'indice de fusion. Pour déterminer cet indice, les cellules sont généralement colorées au Giemsa R qui colore les noyaux en violet et le cytoplasme de la cellule en mauve. Un comptage manuel des noyaux est ensuite réalisé sous microscope. Ce comptage consiste à comptabiliser le nombre total de noyaux ainsi que le nombre de noyaux appartenant aux cellules différenciées (plurinucléées). L'indice de fusion (nombre de noyaux présents dans les cellules fusionnées/nombre total de noyaux) peut alors être calculé.

Pour l'analyse en routine de la différenciation, il est important de pouvoir automatiser les comptages de noyaux, ce qui représente un travail long et fastidieux. Il est également nécessaire de mesurer la surface occupée par les myotubes, représentative de leur taille. Une recherche bibliographique sur le sujet ne nous a pas permis de trouver de techniques de comptage permettant de calculer l'indice de fusion des cellules musculaires autre que la méthode manuelle (López *et al.*, 2008). L'objectif de ce travail était de développer un outil d'analyse d'image qui permette un comptage rapide et fiable des noyaux totaux et des noyaux localisés dans les myotubes et d'obtenir en plus des données sur le nombre et la taille des myotubes présents dans les cultures.



*A : prolifération (J2)*

*B : confluence (J6)*

*C : différenciation (J9)*

**Figure 1** : Les trois stades clés de la culture des cellules musculaires. A et B : marquage des cellules avec un anticorps anti-vimentine et contre coloration des noyaux au Hoechst 33258. C : Marquage des myotubes avec un anticorps anti-desmine et contre-coloration des noyaux au Hoechst 33258. Pour améliorer le contraste final, les noyaux, originellement bleus, sont ici colorés en rouge. *Jx* : nombre de jours de culture.

## 1. Description de la méthode

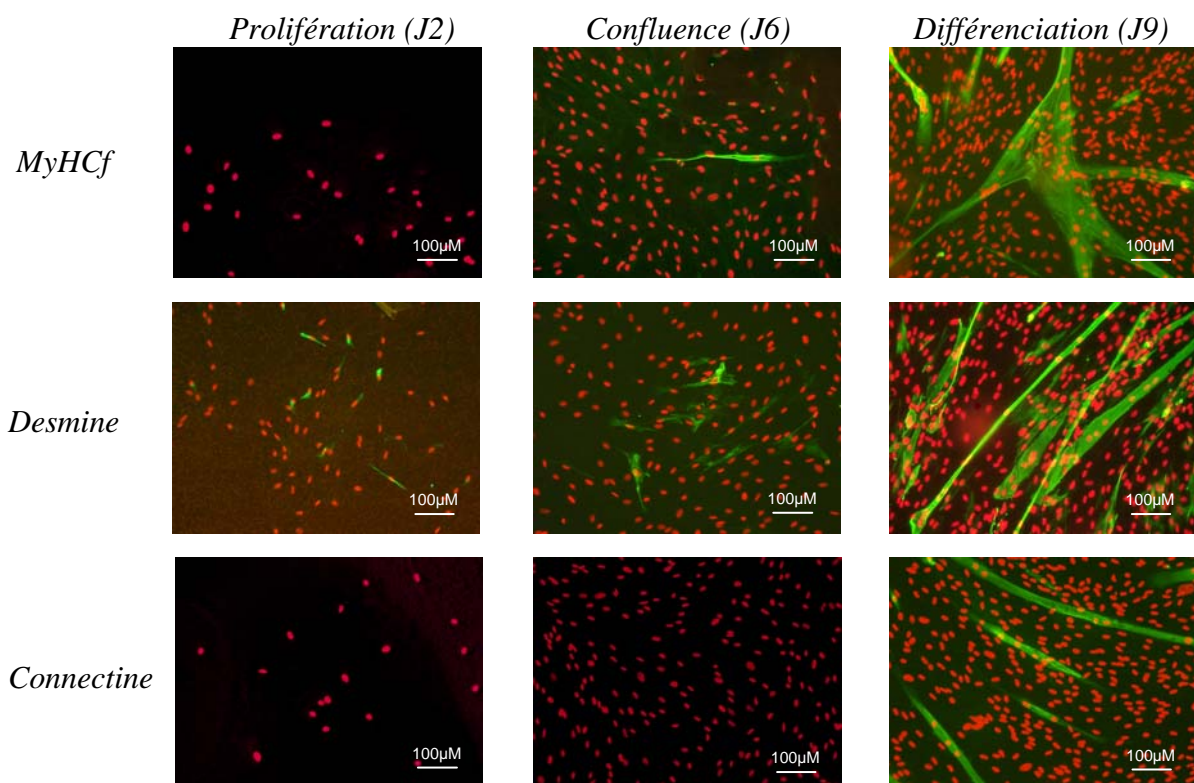
### 1.1 Marquage

Pour automatiser les comptages, nous avons décidé d'utiliser le logiciel commercial Visilog 6.7 (© Noesis, France) déjà utilisé en routine au laboratoire pour l'analyse des fibres musculaires sur coupes histologiques. Le traitement des images de cellules colorées au Giemsa R (RAL) par ce système s'avère délicat voire impossible car il est difficile d'obtenir un contraste suffisant entre le noyau et le cytoplasme des cellules pour permettre le comptage automatisé. Il a donc été nécessaire de passer par un autre type de révélation de ces compartiments cellulaires. Nous avons choisi la technique d'immunocytofluorescence, aussi utilisée en routine au laboratoire : après élimination du milieu de culture, les cellules sont rincées avec du tampon PBS (Phosphate Buffered Saline) puis fixées à froid (4°C) avec de l'éthanol absolu. Les cellules sont ensuite incubées en présence d'un anticorps spécifique de la protéine à révéler pendant une heure à température ambiante. Puis un second anticorps couplé à la fluorescéine est ensuite mis en présence des cellules pendant 40 minutes à

température ambiante. Les cellules sont enfin rincées plusieurs fois au PBS. La révélation du marquage se fait sous un microscope équipé d'un système à fluorescence. En effet, lorsqu'elle est excitée dans le bleu autour de 490 nm, la fluorescéine émet dans le vert à 520 nm.

### Les cytoplasmes

Comme les cellules musculaires non différenciées (myoblastes) sont mononucléées (1 noyau par cellule) la stratégie choisie est de visualiser le plus spécifiquement possible les cytoplasmes des cellules différenciées à l'aide d'un anticorps révélé ensuite à la fluorescéine. Trois anticorps spécifiques de trois protéines caractéristiques du système contractile présent dans les cellules musculaires différenciées, la desmine (DAKO, clone D33), la connectine (Novocastra, clone F146.9B9) et la chaîne lourde de myosine fœtale (MyHCf, Biocytex, clone 4C10) ont été testés. Le troisième (anti-MyHCf) a donné les meilleurs résultats. En effet, cette protéine est présente dans les myoblastes entrés en voie de différenciation ainsi que dans tous les myotubes des plus petits (3 noyaux) aux plus gros. Les deux autres anticorps n'ont pas été retenus car, d'une part la desmine possède l'expression la plus précoce et marque donc de nombreux myoblastes, et d'autre part la connectine possède l'expression la plus tardive et ne révèle pas les cellules différenciées les plus petites (**figure 2**).



**Figure 2** : séquence d'apparition des 3 protéines étudiées aux stades clés de la culture des myoblastes. **Jx** : nombre de jours de culture.

### Les noyaux

Le marquage des noyaux se fait à l'aide du Hoechst 33258 (bisbenzimidazole, Sigma). Ce fluorophore est un intercalant de l'ADN (et il est donc probablement mutagène et carcinogène). Des conditions d'utilisation spécifiques à cette classe de molécules sont donc nécessaires. Lorsqu'il est excité à une longueur d'onde de 365 nm (UV), le Hoechst 33258

émet dans le bleu à 461 nm. L'avantage de ce marquage est qu'il est rapide et très simple à mettre en œuvre : après la dernière étape du marquage des cytoplasmes, les cellules sont incubées 2 à 3 minutes dans une solution de Hoechst 33258 à 2 µg/ml de PBS. Elles sont ensuite rincées 2 fois avec du PBS, puis recouvertes d'une lamelle couvre-objet en présence d'un milieu de montage adapté au milieu aqueux. La fluorescence peut ainsi se conserver pendant plusieurs mois à + 4°C à l'abri de la lumière.

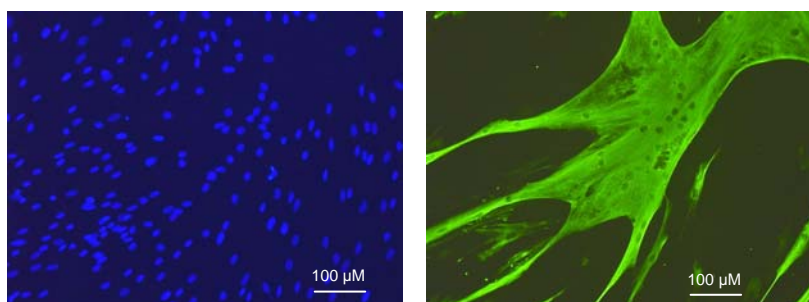
### Avantages et inconvénients

En utilisant des filtres d'émission / absorption spécifiques à chacun des 2 fluorophores, ce type de double marquage permet, pour un même champ, de prendre séparément une image des noyaux et une image des cytoplasmes. De plus, le contraste est, *a priori*, optimal puisque les marquages sont sur fond noir.

L'inconvénient est que cela nécessite d'utiliser un microscope équipé d'un système à fluorescence.

### 1.2 Acquisition des images

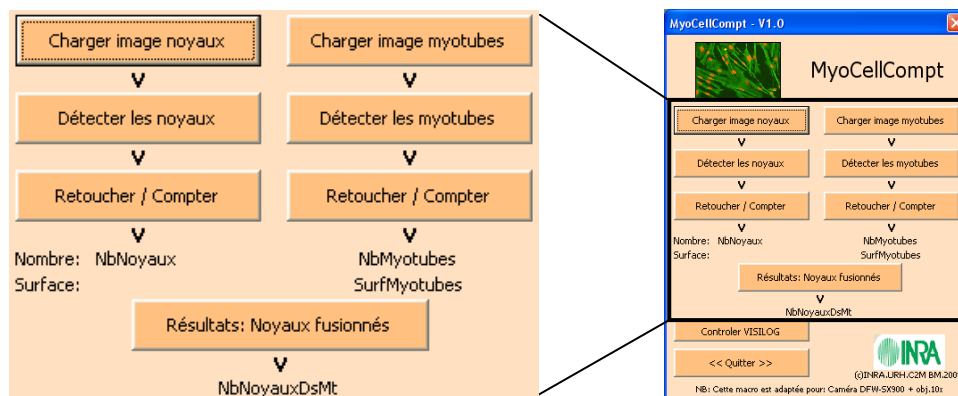
Ainsi, deux images peuvent être acquises à partir d'un même champ dans une boîte de culture (**Figure 3**). Pour faciliter la suite des opérations, il est essentiel que les images soient prises avec les meilleurs netteté et contraste possibles. Pour chaque boîte de culture, 5 zones sont choisies au hasard. Sur chacune, 2 images sont enregistrées, l'une des noyaux et l'autre de la myosine fœtale. Entre ces 2 saisies, la boîte de culture ne doit pas être bougée pour que les images soient parfaitement superposables. Elles sont acquises avec le logiciel Visilog au format JPEG. Les réglages de balance des blancs sont de 0-0 pour la fluorescéine et de 255-0 pour le Hoechst. Les temps d'exposition avec notre matériel (objectif 10× fluo sur microscope Nikon Labophot-2 et caméra couleur Sony DFW-SX900) sont d'environ 100 ms pour les cytoplasmes et 20 ms pour les noyaux. Les images obtenues représentent un champ de  $780 \times 585 \mu\text{m}^2$ , soit une résolution de  $0,61 \mu\text{m}$  par pixel.



**Figure 3 :** acquisition de deux images du même champ. A gauche les noyaux révélés au Hoechst et à droite les cytoplasmes révélés avec l'anticorps dirigé contre la MyHC fœtale.

### 1.3 Traitement des images

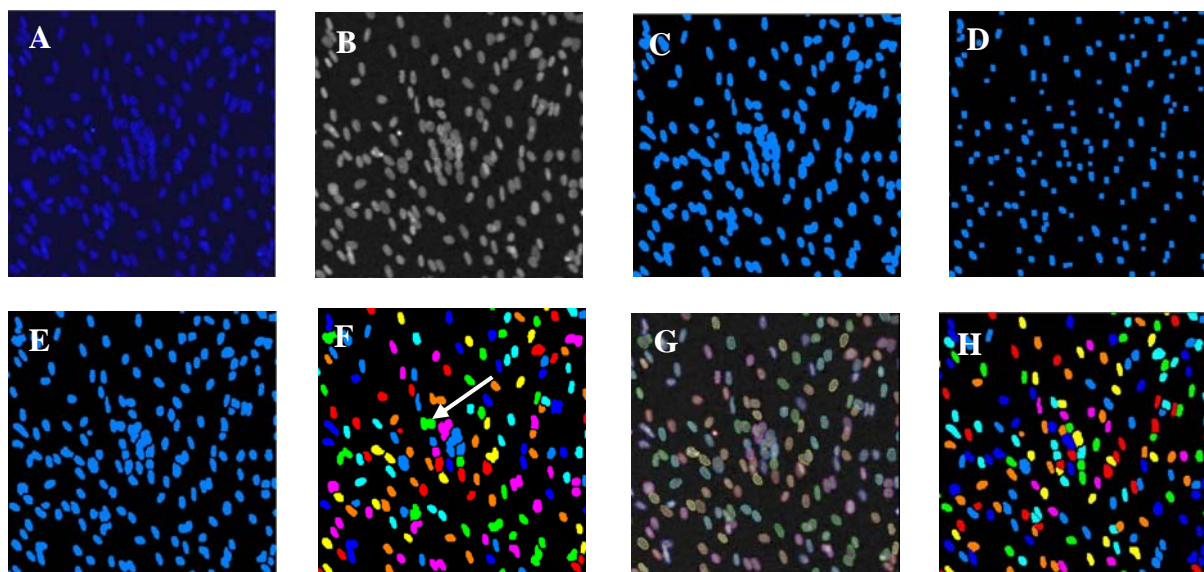
Nous avons développé une application Visual Basic (VBA) sous Visilog 6.7, appelée « MyoCellCompt ». Ce programme est doté d'une interface interactive avec des boutons de commande pour faciliter son utilisation (**figure 4**). Les deux images d'un même champ seront tout d'abord traitées séparément afin de mesurer le nombre total de noyaux ainsi que le nombre des myotubes et la surface qu'ils occupent. Puis elles sont combinées pour dénombrer les noyaux se trouvant dans les myotubes, ce qui permettra de calculer un pourcentage de différenciation équivalent à l'indice de fusion.



**Figure 4 :** interface interactive de l'application Visual Basic MyoCellComp.

La première étape a consisté à calibrer la chaîne optique (caméra, objectif et projectif) afin de pouvoir transformer les pixels en  $\mu\text{m}^2$ . Nous avons ainsi déterminé à l'aide d'une échelle micrométrique que la surface moyenne d'un noyau, mesurée avec notre matériel, était de 475 pixels. Cette étape est importante pour la suite des analyses. Cette mesure a été réalisée avec un objectif donné (10x) avec lequel on prendra toutes les images servant aux comptages. Il nous a paru plus simple de n'utiliser qu'un seul objectif pour minimiser les risques d'erreurs. Pour plus de visibilité, les images ci-dessous ne représentent qu'une partie du champ utilisé pour les comptages.

### Comptage des noyaux



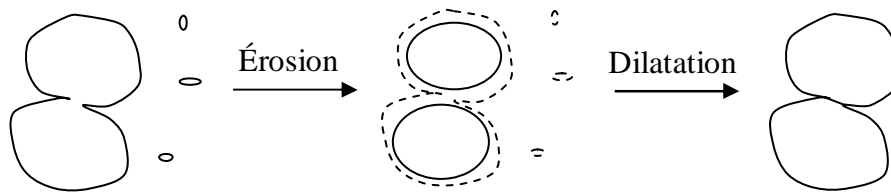
**Figure 5 :** séquence Visual Basic pour le comptage des noyaux dans les cultures de cellules. **A :** chargement de l'image des noyaux, **B :** seuillage, **C :** image binarisée, **D :** filtrage des noyaux, **E :** algorithme « watershed » **F :** labellisation des noyaux, la flèche indique 2 noyaux non séparés, **G :** retouches manuelles de l'image, **H :** image finale des noyaux.

La première étape (**figure 5, image A**) consiste à charger l'image des noyaux obtenue à l'aide de la caméra dans le logiciel Visilog en validant la commande « charger image noyaux » de l'interface interactive (**figure 4**).

Lorsque la commande « détecter les noyaux » de l'interface est lancée, plusieurs étapes sont réalisées automatiquement.

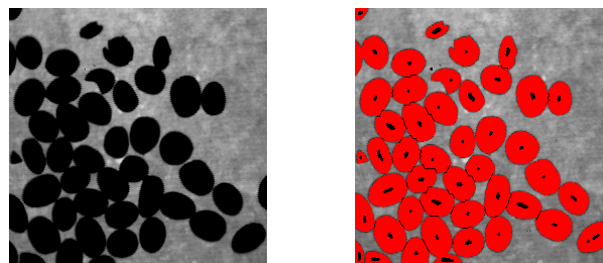
L'image subit un seuillage automatique sur fond noir (**figure 5, image B**) qui est permis par le contraste maximal lié au marquage fluorescent. L'image est transformée en niveau de gris pour simplifier les étapes suivantes.

L'image est alors binarisée (**figure 5, image C**). C'est-à-dire qu'à chaque pixel est appliquée une valeur 0 (noir) pour le fond ou 1 (bleu) pour les noyaux. Les noyaux sont maintenant bien repérables, mais un grand nombre d'entre eux sont trop proches les uns des autres pour être individualisés. Pour mieux les séparer, un filtrage morphologique et un algorithme « watershed » (« ligne de partage des eaux ») vont être réalisés (**figure 5 images, D et E**). Nous utilisons un filtrage morphologique avec une ouverture de taille 2. Cela consiste en une érosion puis une dilatation des noyaux (**figure 6**) ce qui permet d'éliminer les petites particules et de séparer quelques noyaux.



**Figure 6** : principe du filtrage morphologique des noyaux.

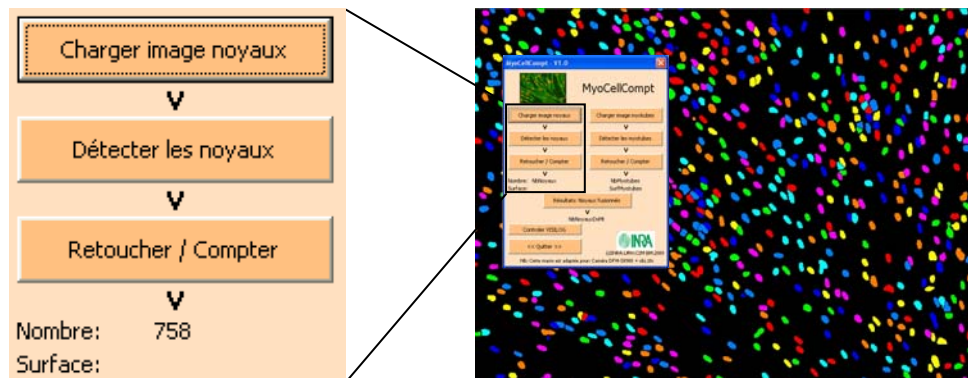
Pour affiner la séparation des noyaux, nous utilisons l'algorithme « watershed ». La méthode de segmentation basée sur la ligne de partage des eaux considère l'image en niveaux de gris comme un relief topographique. Il s'agit alors de calculer la ligne de partage des eaux du dit relief. Les vallées ainsi obtenues correspondent aux endroits où la partition sera réalisée (**figure 7**).



**Figure 7** : segmentation par l'algorithme watershed.  
Source [cmm.enscm.fr/~beucher/wtshed.html](http://cmm.enscm.fr/~beucher/wtshed.html).

Les objets (noyaux) détectés sont ensuite labellisés (**figure 5, image F**). A chacun d'entre eux est attribué un numéro et une couleur pour les différencier visuellement. Malgré toutes ces étapes, il reste souvent des noyaux qui n'ont pas été séparés en raison de leur trop grande proximité (**figure 5, image F**). Nous avons donc ajouté une étape de retouches manuelles en activant la commande « retoucher / compter » de l'interface visual basic. Pour rendre possibles les modifications, l'image traitée, dont on ne conserve que les contours des noyaux détectés, est superposée à l'image originale (**figure 5 image, G**). Quatre actions sont possibles : la séparation de deux noyaux trop proches que l'application n'a pas pu distinguer, l'ajout de noyaux dont le marquage, trop faible, n'a pu permettre qu'ils soient détectés, la suppression d'objets retenus par le système qui ne sont pas des noyaux et la reconnexion de noyaux qui auraient été abusivement coupés en deux. Une fois ces retouches réalisées, le

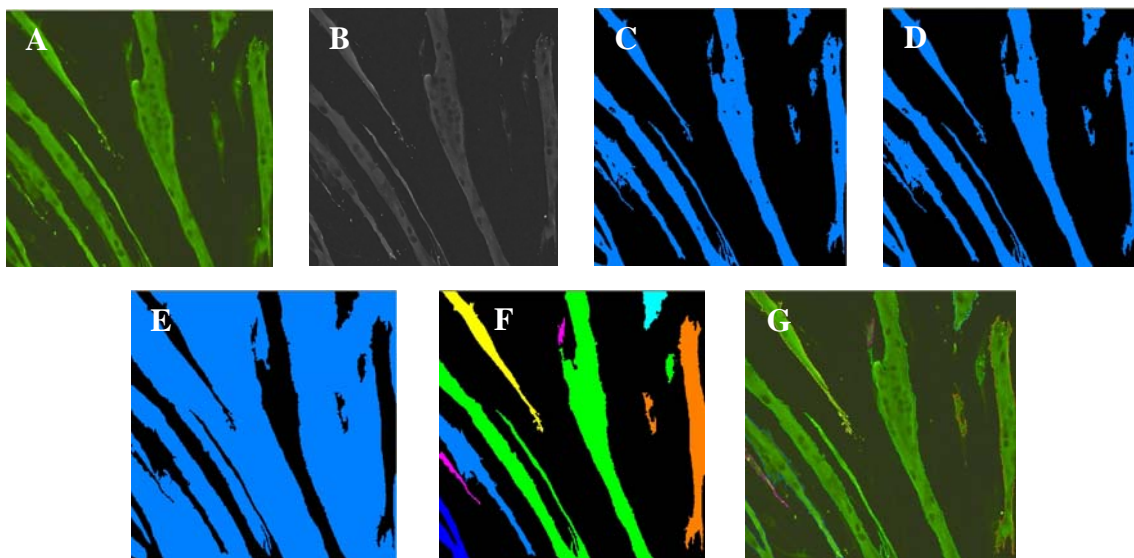
logiciel refait une labellisation des noyaux (**figure 5, image H**) et le nombre total de noyaux présents sur la zone étudiée (758 dans notre exemple) s'affiche dans l'interface (**figure 8**).



**Figure 8** : résultat du comptage des noyaux obtenu après retouches manuelles (lorsqu'elles sont nécessaires)

### Comptage des myotubes

Le principe du comptage des myotubes est basé sur le même principe que celui du comptage des noyaux.



**Figure 9** : séquence d'images créées par l'application Visual Basic pour la mesure de surface et le dénombrement des myotubes

**A** : chargement de l'image des myotubes **B** : image en niveaux de gris **C** : image binarisée après seuillage manuel  
**D** : filtrage éliminant le bruit de fond **E** : second filtrage nettoyant l'intérieur des myotubes  
**F** : labellisation des myotubes **G** : retouches manuelles de l'image.

La première étape (**figure 9, image A**) consiste à charger l'image des myotubes obtenue à l'aide de la caméra dans le logiciel Visilog en validant la commande « charger image myotubes » de l'interface interactive (**figure 4**).

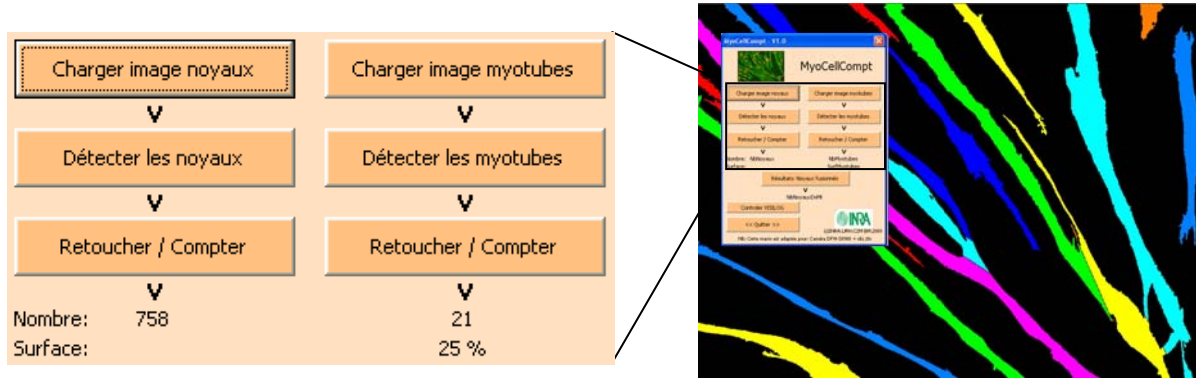
Lorsque la commande « détecter les myotubes » de l'interface est lancée, l'image est transformée en niveau de gris (**figure 9, image B**). L'intensité du marquage des myotubes n'étant pas homogène, nous avons choisi de faire un seuillage manuel des myotubes qui permet de choisir l'information à conserver ou non. L'image est ensuite binarisée

(cf. paragraphe « comptage des noyaux ») en fonction du seuillage réalisé précédemment (**figure 9, image C**). Pour supprimer le bruit de l'image obtenue, trois filtrages sont réalisés. Le premier va permettre d'éliminer le bruit de fond (**figure 9, image D**). Toutes les particules dont la taille est inférieure à 475 pixels (taille des noyaux, présentée dans le paragraphe « traitement des images ») sont supprimées. Le second est un filtre morphologique qui est l'inverse de celui utilisé pour les noyaux, c'est-à-dire qu'il va commencer par une dilatation des objets puis une érosion de même taille. Cette étape permet de fermer les petits trous présents dans les myotubes et d'en lisser les contours. On constate néanmoins, après ces deux filtrages, qu'il reste de nombreux vides dans les myotubes (**figure 9, image D**) qui correspondent à l'emplacement des noyaux. Cela se vérifie facilement en superposant les images des myotubes et des noyaux. En effet, la protéine révélée étant cytoplasmique, il n'y a pas de marquage des noyaux. Cela se traduit sur l'image par une intensité de fluorescence plus faible à leur niveau. Pour éliminer ces artéfacts, l'image est tout d'abord inversée, puis à chaque pixel ayant une valeur 0 (noir) est appliquée une valeur 1 (bleu) et inversement. Ainsi, le fond de l'image et les trous présents dans les myotubes deviennent des objets. Puis, comme pour le premier filtrage, tous les objets d'une taille inférieure ou égale à celle d'un noyau (475 pixels) sont supprimés (**figure 9, image E**). Après réinversion, les objets sont labellisés (**figure 9, image F**). Nous avons conservé une étape de retouches manuelles avec les quatre mêmes possibilités que pour les noyaux (**figure 9, image G**) : la séparation de deux myotubes, l'ajout de parties de myotube qui n'auraient pas été détectées lors du seuillage, la suppression de cellules mononucléées (myoblastes) détectées et la reconnexion de myotubes qui auraient été séparés en plusieurs morceaux. En culture de cellules, il arrive souvent que les myotubes fusionnent entre eux (**figure 3**). Par convention, nous avons décidé de les séparer. Face à une structure en étoile qui correspond, en fait, à plusieurs myotubes fusionnés il nous est apparu plus juste de compter plusieurs myotubes. Donc, lors de l'étape de retouches manuelles les myotubes sont séparés. Après validation des modifications, s'affiche sur l'interface de l'application, en plus du nombre total de noyaux présents sur la zone étudiée calculé précédemment, le nombre de myotubes présents sur la zone et le pourcentage de surface qu'ils occupent (**figure 10**). Lors de l'utilisation de ces résultats, il faut tenir compte du fait que les myotubes ne sont que très rarement entiers dans la zone étudiée, seuls les plus petits, ayant 2 à 4 noyaux, peuvent l'être. Le nombre de myotubes représente donc la quantité de présents au moins en partie dans le champ, et le pourcentage de surface représente une densité d'occupation de ces cellules pour ce même champ. En aucun cas on ne peut diviser cette densité par le nombre de myotubes pour obtenir la surface moyenne qu'ils occupent. Cette limite existe quel que soit le grossissement utilisé. La seule solution qui permettrait de résoudre ce problème serait d'étudier la totalité de la boîte de culture, ce qui est encore irréalisable.

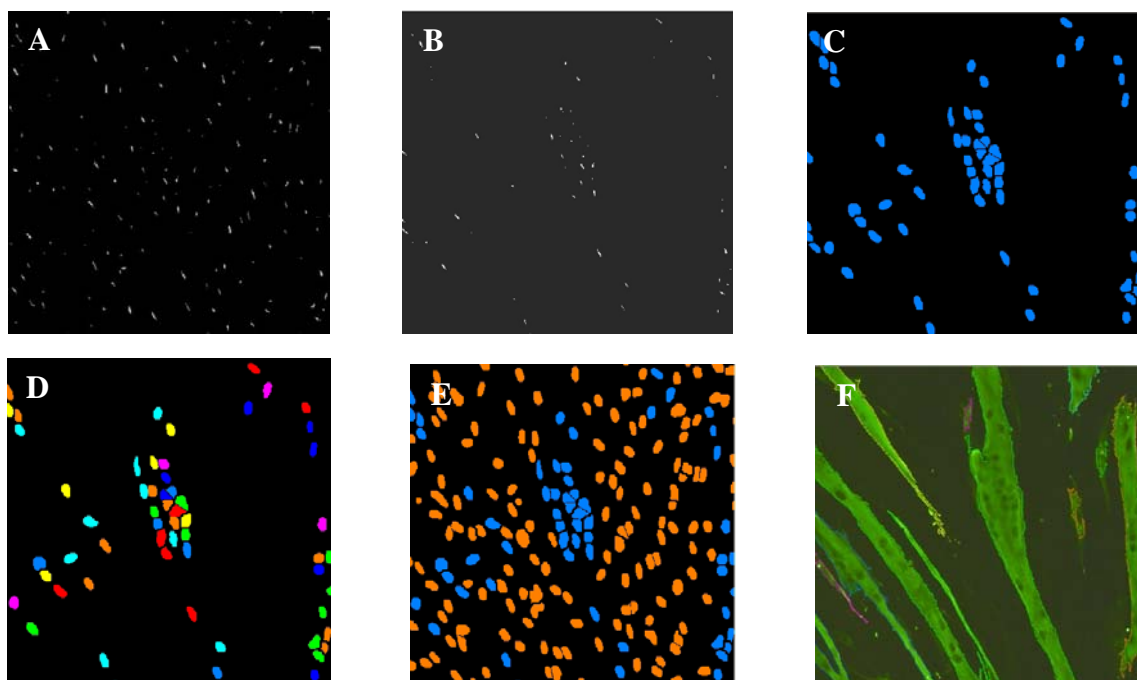
### Mesure de l'indice de fusion

Comme nous l'avons dit, l'indice de fusion étant le pourcentage de noyaux présents dans les myotubes, il représente le taux de cellules musculaires différenciées. Pour déterminer cet indice nous partons des images finales du comptage des noyaux (**figure 8**) et de celui des myotubes (**figure 10**).





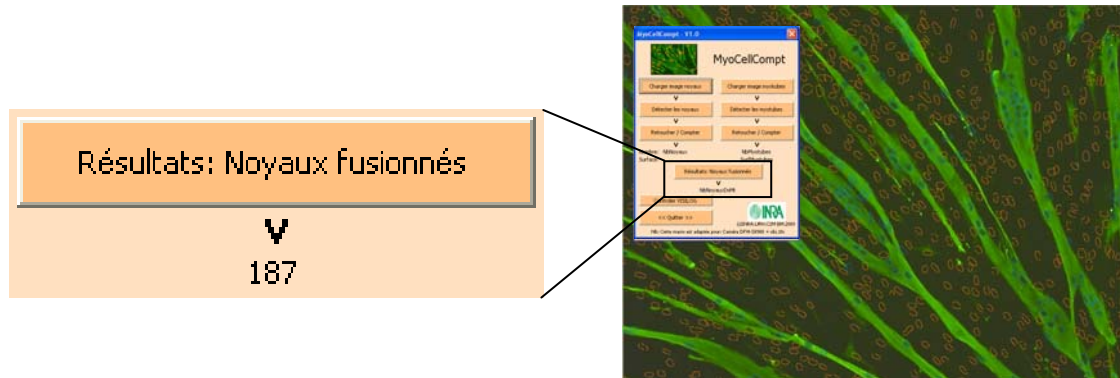
**Figure 10 :** résultats du comptage des myotubes et de la surface qu'ils occupent sur la zone étudiée



**Figure 11 :** séquence d'images créées par l'application Visual Basic pour la mesure de l'indice de fusion. **A :** érosion ultime des noyaux (centre de gravité), **B :** élimination des centres de gravité qui ne sont pas dans des myotubes, **C :** reconstruction des noyaux conservés (fusionnés), **D :** labellisation des noyaux fusionnés, **E :** visualisation des noyaux fusionnés (en bleu), **F :** image des myotubes de la même zone que l'image E.

Toutes les étapes pour réaliser cette mesure se font en activant la commande « résultats : noyaux fusionnés » de l'interface Visual Basic. Pour déterminer si un noyau fait partie ou non d'un myotube, nous avons choisi d'utiliser son centre de gravité obtenu après érosion ultime (**figure 11, image A**). Cela consiste à éliminer des couches successives de pixels et de s'arrêter à la dernière, juste avant que l'objet ne disparaisse. Puis cette image est superposée à l'image des myotubes (**figure 10**), et tous les centres de gravité qui ne sont pas inclus dans l'un d'entre eux sont éliminés (**figure 11, image B**). Enfin, les noyaux conservés sont reconstruits (**figure 11, image C**), labellisés et comptés (**figure 11, image D**). L'image finale (**figure 11, image E**) présente les noyaux des cellules fusionnées en bleu et ceux qui ne le sont pas en orange. Nous avons conservé une dernière étape manuelle qui consiste à compter

au compte-globule les noyaux qui auraient été mis, à tort, dans les myotubes. Le résultat donné par l'interface est le nombre de noyaux dont le centre de gravité se trouve dans les myotubes (**figure 12**).



**Figure 12** : résultats du comptage des noyaux fusionnés

À cela, il faut retrancher le nombre de noyaux que l'on estime à tort dans les myotubes puis diviser ce résultat par le nombre total de noyaux pour obtenir l'indice de fusion. Nous avons choisi de conserver les valeurs brutes c'est pourquoi le calcul n'est pas automatique.

## 2. Comparaison des méthodes de comptage

Nous avons comparé cette méthode de comptage des noyaux à la méthode manuelle précédemment utilisée dans notre équipe. Lors de la mise en culture des cellules musculaires, deux lots de trois boîtes de pétri ont étéensemencées à la même densité (20 000 cellules/cm<sup>2</sup>) et avec le même milieu de culture. A chacun des trois stades étudiés (prolifération, confluence et différenciation), deux boîtes de culture ont été prélevées. L'une a été colorée au Giemsa R et sur la deuxième a été réalisé un marquage immunofluorescent de la chaîne lourde de myosine foetale (MyHCf) avec une contre coloration des noyaux au Hoechst 33258 (bisbenzimidazole) selon la technique décrite dans le paragraphe « marquage ». Une fois toutes les boîtes prélevées, les deux méthodes de comptages ont été utilisées.

### 2.1 Résultats

Sur les cellules colorées au Giemsa R, le comptage a été fait directement sous microscope à l'aide de compte-globule sur dix zones prises au hasard en utilisant l'objectif 20× du microscope. Sur celles marquées par cytoimmunofluorescence, le comptage a été réalisé en utilisant la technique décrite dans cet article. Ici, ce sont 5 zones prises au hasard qui ont été comptées en utilisant l'objectif 10×. Selon la méthode utilisée, les comptages ne se font donc pas avec le même objectif du microscope. En effet, le comptage manuel avec l'objectif 10× devient extrêmement difficile à réaliser aux stades confluence et différenciation en raison du nombre important de cellules présentes et du faible contraste entre les noyaux et les cytoplasmes de certains myotubes. De plus, les champs comptés selon ces deux méthodes ne sont pas directement comparables car pour la méthode manuelle la zone de comptage correspond à une grille placée dans l'oculaire du microscope et pour la méthode automatique,

la zone correspond au champ de vision de la caméra. Cette comparaison a donc été faite après avoir calculé le nombre de noyaux par unité de surface. Cette unité est la même pour les deux méthodes et correspond approximativement à un centimètre carré. Nous avons conservé le terme « unité de surface » car nous ne connaissons pas cette dimension avec suffisamment de précision.

	Méthode de comptage	Nbre de nx comptés	Nx/ U de surf	% de fusion	Surf occupée par les Mt (%)	Nbre de Mt/champ	Surf moy occupée par un Mt (%)
Stade prolif.	MyoCellCompt	598	22364	0	0	0	0
	Manuelle	145	22241	0			
Stade conf.	MyoCellCompt	3851	144020	2,39	1,1	1,7	0,65
	Manuelle	908	138964	1,27			
Stade diff	MyoCellCompt	4840	181006	58,11	25	12	2,08
	Manuelle	1146	175373	57,45			

**Tableau 1** : comparaison des résultats obtenus selon les méthodes manuelle et automatique.  
*Mt* = myotubes, *Nx* = noyaux.

On ne constate pas de différences entre les deux méthodes de comptage pour ce qui est du nombre de noyaux par unité de surface (22364 vs 22241, 144020 vs 138964 et 181006 vs 175373) et du pourcentage de fusion (58,11 vs 57,45 au stade différenciation) (**tableau 1**). Ceci permet de valider le comptage automatique. On remarque que le nombre de noyaux comptés avec MyoCellCompt sur cinq zones est quatre fois supérieur à celui compté manuellement sur dix zones (598 vs 145, 3851 vs 908 et 4840 vs 1146). Le comptage automatique se fait donc sur une surface totale quatre fois plus importante, ce qui rend les résultats plus représentatifs des cultures étudiées. Enfin, MyoCellCompt permet d'avoir accès à des résultats que nous n'avions pas auparavant, le pourcentage de la surface occupée par les myotubes et le nombre de myotubes présents au moins en partie sur le champ étudié. Ces deux nouvelles données permettent de calculer la surface moyenne occupée par les myotubes qui est un indicateur de leur taille (longueur et épaisseur).

Nous avons déterminé les variabilités liées au nombre de zones comptées pour chacune des deux méthodes en calculant les coefficients de variation (CV) du comptage des noyaux totaux (**tableau 2**) et des pourcentages de fusion (**tableau 3**). Tous les CV, que ce soit pour les noyaux totaux ou pour les pourcentages de fusion, sont plus faibles avec MyoCellCompt qu'avec la méthode manuelle. Ces résultats montrent que le comptage de 5 zones avec MyoCellCompt permet de diminuer la variabilité liée à l'échantillonnage et de détecter des différences plus faibles entre différents lots de cellules ou entre des cellules issues de la même suspension mais ayant reçu des traitements différents.

Stade Méthode	Prolifération		Confluence		Différenciation	
	Manuelle	MyoCellCompt	Manuelle	MyoCellCompt	Manuelle	MyoCellCompt
Zone 1	21	107	62	781	127	1013
Zone 2	15	77	89	822	64	1122
Zone 3	2	71	128	759	95	882
Zone 4	2	179	68	749	102	900
Zone 5	7	164	88	740	145	923
Zone 6	14		89		141	
Zone 7	17		86		124	
Zone 8	34		97		122	
Zone 9	25		92		102	
Zone 10	8		109		124	
moyennes	14,5	119,6	90,8	770,2	114,6	968
Ecart-types	10,28	49,59	18,68	32,74	24,19	99,73
CV (%)	70,87	41,46	20,58	4,25	21,11	10,30

**Tableau 2 :** résultats des comptages des noyaux totaux par zone de comptage et calcul des coefficients de variation (CV).

Stade Méthode	Confluence		Différenciation	
	Manuelle	MyoCellCompt	Manuelle	MyoCellCompt
Zone 1	0	2,69	80,31	53,50
Zone 2	0	2,31	67,19	46,08
Zone 3	2,34	2,24	54,74	39,80
Zone 4	4,41	1,87	40,20	74,67
Zone 5	0	2,84	77,24	76,49
Zone 6	2,25		34,04	
Zone 7	0		54,03	
Zone 8	0		84,43	
Zone 9	0		41,18	
Zone 10	3,67		41,13	
moyennes	1,27	2,39	57,45	58,11
Ecart-types	1,75	0,38	18,66	16,68
CV (%)	137,72	16,07	32,48	28,71

**Tableau 3 :** résultats des pourcentages de fusion par zone de comptage et calcul des coefficients de variation (CV).

## 2.2 Confort d'utilisation pour l'opérateur

À l'utilisation, MyoCellCompt se révèle plus convivial et moins fatigant pour les yeux que le comptage manuel sous microscope.

Le fait de pouvoir s'interrompre pendant un comptage rend l'utilisation de la méthode automatique plus confortable. En effet, lors du comptage manuel, il n'est pas possible de s'arrêter pendant le comptage d'une zone sans devoir recommencer. Cela est possible avec MyoCellCompt à condition de ne pas fermer le logiciel.

## 2.3 Temps passé aux comptages

Pour cette validation (trois boîtes de culture), aucune des deux méthodes ne s'est avérée plus rapide l'une que l'autre ceci en raison des trois étapes (saisie des images, comptage automatique et retouches manuelles) nécessaires lors de l'utilisation de la méthode automatique. Par expérience, nous savons que cette technique devient nettement avantageuse en termes de temps passé lorsque le nombre de boîtes à compter devient plus grand. Cet avantage devient sensible à partir de 5 ou 6 boîtes de culture.

## Conclusions

Depuis 2003, notre équipe utilise MyoCellCompt, qui donne entière satisfaction. Les résultats montrent que cette méthode permet un gain sur plusieurs plans : augmentation de la surface de comptage, diminution de la variabilité, diminution du temps passé aux comptages et augmentation de la précision des résultats. Les résultats obtenus sont fiables, reproductibles et ne sont pas différents lorsque deux personnes font les comptages d'une même boîte, ce qui n'était pas le cas avec la méthode manuelle. Depuis quelques mois, l'application Visual Basic a été adaptée au comptage des noyaux marqués au Hoechst 33258 sur coupes histologiques et fonctionne parfaitement. La seule limite de comptage que nous avons rencontrée concernait des cultures qui n'étaient pas monocouche où les myotubes s'entrecroisent et où même le comptage manuel s'est avéré difficile à réaliser.

## Bibliographie

- Image segmentation and mathematical morphology. Centre de morphologie mathématique. Mines ParisTech : <http://cmm.ensmp.fr/~beucher/wtshed.html>
- López C, Lejeune M, Salvadó M T, Escrivà P, Bosch R, Pons L E, Alvaro T, Roig J, Cugat X, Baucells J, Jaén J (2008) Automated quantification of nuclear immunohistochemical markers with different complexity. *Histochem Cell Biol* 129:379-387.
- Picard B, Depreux F, Geay Y (1998) Muscle differentiation of normal and double-muscléd bovine foetal myoblasts in primary culture. *Basic Appl Myol* 8:197-203.
- Robelin J (1990) Différenciation, croissance et développement cellulaire du tissu musculaire. *INRA Prod. Anim*, 3(4):253-263.
- Visilog 6. Programming guide (2003) Noesis S.A. 6-8, rue de la Réunion. F-91955 Courtaboeuf

