

INTRODUCTION AU LABORATOIRE DE BIOCHIMIE MEDICALE

Professeur Ambroise MARTIN
Docteur en Médecine, Docteur ès-Sciences
Professeur de Biochimie à la Faculté de Médecine Lyon Grange-Blanche
Praticien Hospitalier au Laboratoire de Biochimie de l'Hôpital Cardio-vasculaire et
Pneumologique Louis Pradel de Lyon

Document 1995 - Revu janvier 2006

Chapitre I

Le cadre général de l'analyse biochimique: les exigences et les moyens de la qualité

La qualité de l'analyse biochimique, comme celle de tout acte biologique, est partie intégrante de la qualité de l'acte médical au service du malade. la biochimie clinique étant, plus que toute autre discipline, de nature quantitative, les méthodes chiffrées d'évaluation de la qualité ont pu se développer très précocement. L'obtention du meilleur niveau possible résulte du contrôle soigneux d'une multitude de facteurs. Avant d'aborder l'étude de ces facteurs, un survol rapide et forcément simplificateur des principaux domaines et des grandes évolutions de la discipline est nécessaire.

1. Evolution de la biochimie clinique

L'évolution de la biochimie clinique, à l'instar de celle de toutes les autres disciplines scientifiques et médicales, a été considérable au cours des dernières décennies, aussi bien du point de vue médical par le nombre des dosages actuellement réalisables, que du point de vue technologique par la variété des méthodes disponibles.

A. le point de vue médical ou clinique

Parmi les analyses nécessaires au clinicien, on peut distinguer de manière peut-être artificielle plusieurs grands domaines:

1. une base indiscutable, représentée par un ensemble d'analyses sûres, dont la valeur sémiologique est prouvée et reconnue par tous. Ces analyses, qui présentent souvent un caractère vital et donc d'urgence, sont en nombre relativement limité, peut-être 20 à 30. C'est évidemment cette base que tout laboratoire doit pouvoir exécuter avec le maximum de sûreté, et qui représente en fait la part la plus grosse de leur activité, au point de vue économique au moins. C'est dans ce domaine que l'automatisation et l'informatisation sont les plus anciennes et indispensables, et les plus adaptées. Dans un marché très concurrentiel, l'innovation reste forte, dans la réalisation d'automates de plus en plus performants et l'apparition de nouvelles méthodologies. Les principaux éléments de cette base sont inclus dans la figure I-1.

RIM 1993	% du nombre total d'actes
* Bilan lipidique	12,9
dont cholestérol	5,7
dont triglycérides	5,1
* Numération-formule sanguine	9,5
* Glycémie	8,2
* Urée et/ou Créatinine	6,3
Vitesse de sédimentation	6,0
* Bilan électrolytique	5,2
Temps de Quick	3,4
Microbiologie de base	3,3
* Transaminases	3,2
* Acide urique	3,1
Total	51,1 %
dont * Biochimie	39,4 %

Figure I-1. Répartition du volume des analyses les plus fréquentes par rapport à l'ensemble des analyses biologiques remboursées par la Sécurité Sociale.

Source: Recherche d'Informations Médicales sur le B (mars 1993).

2. Une biochimie plus spécialisée dans laquelle rentrent de nombreux analyses de grande valeur informative, mais qui n'ont pas le caractère vital évoqué plus haut. La demande en est généralement moins fréquente: hormones, protéines spécifiques, procédés de séparations, analyses génétiques, etc. Le nombre d'analyses ou de dosages réalisables dépasse largement le millier, mais pour une demande faible, les laboratoires doivent se spécialiser.

C'est dans de tels domaines que l'innovation apparaît la plus prometteuse et la plus "facile". les exigences que nous définirons plus loin restent cependant valables.

3. À côté de ces analyses "éprouvées", il existe de nombreux dosages, parfois aussi vite abandonnés qu'apparus, représentant ce que l'on pourrait appeler les modes de la biochimie. Ces modes qui peuvent apparaître irritantes traduisent la vitalité de la recherche en biochimie clinique, tant de la part des biologistes que des cliniciens ou des industriels. La démonstration de la validité technique et de l'utilité clinique d'une nouvelle analyse est longue et difficile. les contraintes économiques, traduites par le remboursement par la Sécurité Sociale, tiennent une place non négligeable dans la diffusion et l'implantation d'une analyse hors du champ de la recherche clinique.

B. le point de vue biochimique ou technologique

Plusieurs aspects des évolutions méthodologiques sont particulièrement clairs. Si on considère l'évolution des méthodologies, on constate:

- la disparition presque complète des techniques chimiques au profit des techniques enzymatiques pour le dosage des paramètres les plus courants (Figure I-2), s'accompagnant d'une automatisation pratiquement complète et de plus en plus performante.

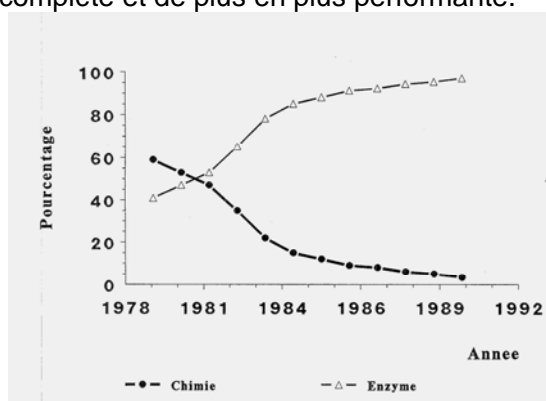


Figure I-2. Evolution de la "popularité" des méthodes chimiques et enzymatiques. Exemple du dosage de l'acide urique. Source: contrôle national de qualité, 1992.

- l'explosion des techniques immunologiques n'utilisant pas la radioactivité et donc accessibles à tous les laboratoires. L'augmentation de la demande entraîne le développement de l'automatisation, qui évolue rapidement en bénéficiant des acquis de l'automatisation de la biochimie traditionnelle.

- l'émergence de la "chimie sèche", la réalisation d'automates "portables" fiables et la mise au point de techniques immunologiques simples mettent la réalisation des analyses biologiques à la portée de non biologistes. Des pressions diverses poussent au développement des analyses par le médecin prescripteur lui-même (méditests ou "doctor's tests") ou par le patient (autotests ou "home-tests"). Une dérive est possible (constatée dans d'autres pays) sur le plan de la qualité des analyses et des conséquences éventuelles pour le patient (exemple de l'autodiagnostic du SIDA) ou la collectivité. Cette dérive peut rester limitée si ces tests restent dans le domaine des "TROC" (tests rapides d'orientation cliniques) et sont confirmés par des analyses effectuées en laboratoire spécialisé.

L'apparition et le développement des techniques de biologie moléculaire : encore réservées à des laboratoires spécialisés, ces techniques présentent une telle puissance que leur développement en routine apparaît inéluctable. Même si le marché de la biologie moléculaire est encore limité (60 millions de \$ contre 7 milliards pour la biologie courante en 1995), sa croissance est très rapide (de l'ordre de 35 % par an). Lors des divers salons de laboratoires, un nombre de

plus en plus grand d'exposants propose les appareils ou réactifs pour ces techniques (plus de la moitié des exposants au Salon de Munich en 1993).

- enfin, le domaine des procédures de séparation et d'analyses de mélanges complexes (techniques chromatographiques et électrophorétiques variées) se diversifie.

A la différence des trois premiers cas, ces deux derniers groupes de techniques laissent encore une large place à l'intervention très spécifique du biologiste, aussi bien dans leur mise en oeuvre que dans l'interprétation du résultat.

II. Les exigences de qualité en biochimie clinique

A. Les exigences cliniques

La biochimie clinique est au service du clinicien et donc du malade. De plus en plus, et pour de nombreuses raisons, médicales ou non médicales (formation biologique, risque de procès, pression des malades...) le clinicien a recours à l'analyse biologique. Il le fait le plus souvent pour obtenir un élément complémentaire de son diagnostic, élément permettant une quantification précise. Mais parfois aussi, le résultat biologique sera le critère-clé du diagnostic ou du traitement, fondant des conduites diagnostiques ou thérapeutiques éventuellement pénibles voire dangereuses pour le patient et en tout état de cause coûteuses pour la société. Le médecin exigera donc du biologiste des mesures fiables, imposant une qualité constante, vérifiée en permanence par la mise en oeuvre d'un contrôle de qualité. Souvent, particulièrement dans le domaine de l'anesthésie et de la réanimation, l'urgence du résultat sera un élément capital; mais la rapidité de l'analyse ne doit pas être obtenue aux dépens de sa fiabilité.

Le médecin doit pouvoir comparer ses résultats à ceux de la littérature médicale ou, au contraire, les publier. Ceci entraîne une exigence de standardisation. Un résultat sur un même prélèvement devrait être identique ou au moins très proche quel que soit le laboratoire qui le réalise, en France ou à l'étranger. Une telle standardisation devient en outre indispensable pour l'épidémiologiste qui s'occupe de groupes importants d'individus géographiquement dispersés: de bonnes décisions de santé publique pourront dépendre éventuellement de la qualité de cette standardisation.

B. Les exigences scientifiques

Pour répondre à ces exigences de qualité, le biologiste n'est pas isolé. Un certain nombre d'exigences scientifiques, parfois traduites dans des textes réglementaires, émanent des sociétés savantes.

1. Au niveau national

La société française de Biologie Clinique (SFBC)¹ a été fondée en 1942, par des cliniciens et des biologistes, médecins et pharmaciens. Cette société avait deux buts au départ :

- celui de discuter et de publier des travaux de biologie appliquée à la médecine
- celui de maintenir au niveau scientifique le plus élevé la technique du diagnostic biologique. La SFBC a créé 21 commissions (fin 1991), impliquant au moins 300 biologistes, afin de couvrir tous les domaines de l'analyse biochimique: contrôle de qualité, sondes nucléiques, validation des techniques, immunoanalyse, instrumentation, enzymologie, automatisation et informatique, lipides, protéines, hormonologie,...

Chaque commission, dans son domaine propre, évalue les méthodes ou les appareils, compare les avantages et les inconvénients, estime les coûts. Si la SFBC laisse libre choix quant aux appareillages, se contentant de réclamer l'adoption de certaines normes², elle veut être plus stricte

¹ SFBC, reconnue d'utilité publique (décret du 25.01.1985). Faculté de Pharmacie, BP 80403. 54000 Nancy Cedex. www.sfbc.asso.fr

² Des évaluations d'appareils sont également réalisées et publiées par d'autres organismes: Centre National de l'Équipement Hospitalier (CNEH, 9, rue Antoine Chantin, 75014 Paris) ; Bureau

sur le choix des méthodes: ses conclusions apparaissent sous la forme de recommandations, qui n'ont cependant pas de caractère contraignant absolu. De plus, étant donné la longueur d'élaboration de ces recommandations, qui nécessitent de très nombreuses études, seul un petit nombre a déjà vu le jour (cas du cholestérol et de plusieurs enzymes sériques).

La SFBC s'exprime dans deux publications: les "Annales de Biologie Clinique"³, créées en même temps que la société, orientée davantage vers les aspects médicaux, et, plus tard, "l'information Scientifique du Biologiste" actuellement fusionné avec Option/Bio⁴, orientée davantage vers les aspects techniques et pratiques. En outre, la SFBC organise de nombreuses réunions scientifiques ou techniques et a mis en place un site internet.

2. Au niveau international

La SFBC entretient des relations avec les sociétés nationales de Biochimie clinique d'Europe (notamment la DGKC, société d'Allemagne Fédérale, dont les recommandations sont parfois adoptées en l'absence de recommandations françaises) et d'Amérique. Toutes ces sociétés nationales sont rattachées à des instances internationales s'occupant de problèmes analogues :

- l'IFCC : International Federation of Clinical Chemistry, dont dépendent des commissions analogues à celles de la SFBC, par exemple :

+ pour l'enzymologie l'EPE (Expert Panel on Enzymes);

+ pour les valeurs de référence l'EPRTV (Expert Panel on Theory of Reference Values)

- l'IUPAC : International Union of Pure and Applied Chemistry ;

- l'IUB : International Union of Biochemistry.

3. Le versant industriel

Les travaux de la SFBC font une large place aux contacts avec les industriels, grâce à un organisme créé en 1917, à l'initiative de la SFBC et du CIFL⁵ : le CERMAB (Centre d'Étude des Réactifs et Matériels pour l'Analyse Biologique⁶) est ainsi constitué de biologistes et d'industriels, représentés en parts égales au Conseil d'Administration.

De leur côté, les industriels se sont regroupés dans le SFRL (Syndicat des Fabricants de Réactifs de Laboratoire), composé actuellement de plus d'une cinquantaine de sociétés et reconnu comme interlocuteur représentatif par les autorités de tutelle. Ce syndicat est affilié à l'UNIPHAR (Union des Industries et Commerces Pharmaceutiques...) et à l'EDMA (European Diagnostic Manufacturer Association). Ce dernier groupe est très impliqué dans l'élaboration des nouvelles directives et normes européennes qui se mettent en place à l'occasion du marché unique.

La recherche industrielle est très active et très performante et conditionne la survie des groupes. Le coût croissant du développement de nouvelles techniques ou de nouveaux appareils réservent de plus en plus l'innovation dans ces domaines à de très grandes entreprises. En outre, seule une diffusion multinationale permet d'amortir de tels coûts.

C. Les exigences économiques

Le poids des dépenses de santé dans l'économie est connu du grand public: il est d'environ 9 % du Produit Intérieur Brut. La part revenant à la biologie reste minime par rapport à d'autres postes budgétaires: la biologie privée (dont une large part est de la biochimie) ne représente que 3 % de ces dépenses soit quand même 18 milliards de francs (en 1991) ; la part de la biologie hospitalière en termes de coûts est plus difficile à connaître du fait de la structure globale des budgets hospitaliers, alors que son activité en termes d'actes en B est mieux connue (6 milliards de B en

d'Étude Technique des Equipements Mobiliers et Médicaux de l'Assistance Publique de Paris (BETEM, 8-10, rue des Fossés St-Marcel, 75005 Paris).

³ Editions Scientifiques Elsevier, 29 rue Buffon, 75005 Paris. Diffusion d'environ 2400 exemplaires.

⁴ Editions Scientifiques Elsevier.

⁵ Comité Interprofessionnel des Fournisseurs de Laboratoire, 28 rue St Dominique, 15001 Paris, 01 44 18 98 62).

⁶ 6-10, Avenue Hoche, 15008, PARIS.

1990 contre 8 milliards pour la biologie privée). Les exigences économiques tendent à devenir de plus en plus contraignantes dans la conjoncture actuelle.

a. les coûts de l'analyse biologique

La biologie courante est cotée par la lettre clé B. Chaque examen représente un certain nombre de B, définis par le ministère et inscrits à la "Nomenclature" des examens remboursés par la Sécurité Sociale, définie par la Commission Nationale de la nomenclature et publiée sous forme d'arrêté au Journal Officiel (dernière refonte fin 2005). Des examens hors nomenclature (HN) sont facturés par comparaison avec des examens similaires de la Nomenclature; dans ce cas, le remboursement est souvent soumis à l'accord préalable avec la Caisse de Sécurité Sociale.

Le prix unitaire d'un B est fixé par arrêté ministériel. Il est de 0,27 € actuellement après avoir été bloqué à 1,76 entre 1988 et la fin des années 90. Dans sa structure, de manière variable selon les laboratoires, on trouve approximativement 70 % de frais de personnel, 10 % de matériel, 5 % de réactifs; le reste étant affecté aux locaux, entretien, informatique, secrétariat... Une taxe parafiscale sur le nombre de B alimente en partie le fonctionnement du laboratoire National de la Santé (LNS) pour la réalisation du contrôle national de qualité.

Blocage de la valeur du B et modifications de la Nomenclature représentent pour un gouvernement des moyens simples mais limités de contrôle des dépenses de biologie médicale.

b. Les conséquences

Les contraintes économiques à l'intérieur d'un laboratoire se traduisent par une recherche constante de la productivité, limitée par les possibilités d'investissement. Un laboratoire peut rarement envisager de changer un appareil coûteux avant qu'il ne soit bien amorti. Or tous les appareils ne sont pas forcément adaptables aux normes actuelles et futures définies par les sociétés savantes. Ce fait peut expliquer en partie la lenteur de l'évolution vers une plus grande standardisation.

A un niveau plus général, ces contraintes ont conduit à la signature d'accord de modération des dépenses entre syndicats de biologistes et gouvernement. Elles peuvent conduire à terme à des modifications en profondeur de l'organisation de la biochimie clinique française, de manière analogue à ce qui se passe dans d'autres pays (Allemagne, USA) : disparition progressive des petits laboratoires de proximité au profit de grands laboratoires, véritables usines à analyses, organisant le ramassage des prélèvements sur des territoires de plus en plus vastes. Déjà en France, le quart des laboratoires réalise plus de 60 % du chiffre d'affaire de la profession. En contrepartie pour les examens courants ou urgents, il pourrait se développer une biochimie au lit du patient ("bed-side"), au cabinet du médecin (méditests), ou par le malade (autotests) avec les problèmes de contrôle que cela peut poser. Les études manquent pour pouvoir affirmer si de telles tendances entraîneraient de réelles économies à l'échelon du pays ou une simple réorganisation des coûts.

D. la position du biologiste

Sa position se trouve à un carrefour d'exigences et sa formation devrait être pluridisciplinaire. Les interrelations complexes du biochimiste avec les différents partenaires de l'analyse biochimique sont schématisées dans la figure I-3.

1. l'expert scientifique

a. Formation initiale

Les directeurs de laboratoire se recrutent sur des exigences très strictes (Certificats d'Etudes Spéciales après le Doctorat en Médecine ou en Pharmacie⁷, et maintenant par le Diplôme d'Etudes Spéciales (DES) obtenu par la voie de l'Internat en Biologie Médicale⁸). Ils ont une obligation

⁷ Loi de juillet 1975, J.O. du 13.7.75 et du 22.8.76.

⁸ Décret 90-180 du 10 septembre 1990.

d'exercice exclusif comme tous les spécialistes médicaux. Il existe une grande disparité au niveau européen sur le niveau et le type de formation requise pour exercer la profession.

b. Le prestataire de service et le consultant

Bien que non prescripteur des analyses, le rôle du biologiste ne devrait plus être celui d'un simple prestataire de service. Il doit en effet suivre la "chaîne biologique" depuis le prélèvement chez le malade jusqu'au rendu des résultats et à leur interprétation, en passant par tous les problèmes pratiques posés par le dosage proprement dit. Ainsi, des stages de clinique obligatoires sont prévus dans la nouvelle formation des biologistes médecins par l'Internat qualifiant, qui facilitera le dialogue entre cliniciens et biologistes. Le choix de dosages pertinents et non redondants dans un cas pathologique précis devient parfois très difficile.

En France, la législation autorise tout médecin à réaliser des examens biologiques dans son cabinet, mais interdit leur remboursement et la délivrance de résultats écrits. Utile en cas d'urgence (et un marché se développe en ce sens), cette pratique est donc limitée par son coût pour le praticien et/ou le patient {mais la loi peut changer!}. Par contre, compte tenu des problèmes de qualité évoqués dans ce chapitre, il apparaît souhaitable dans l'état actuel des choses que la biologie médicale reste aux mains de biologistes spécialistes de mieux en mieux formés.

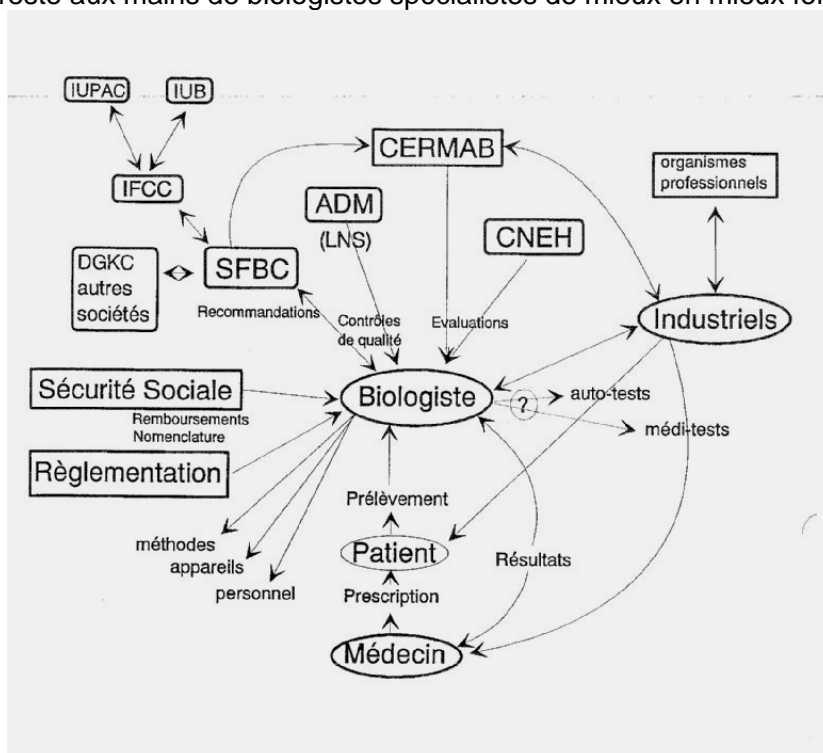


Figure I-3. Les interrelations entre le biologiste et les différents intervenants en Biologie Médicale.

2. le chef d'entreprise

Le directeur de LABM intervient dans le choix des méthodes et des appareils, mais les dosages eux-mêmes sont réalisés par des techniciens de laboratoire.

Les techniciens de laboratoires ne sont plus actuellement formés "sur le tas", mais acquièrent une compétence théorique et pratique dans des écoles spécialisées, délivrant des diplômes reconnus: au niveau Bac + 2, depuis 1993 au niveau Bac + 3. L'évolution et la sophistication des méthodes et appareils fait souhaiter aux organisations de techniciens une homologation de formation à un niveau Bac + 4 (qui permettra aussi à ces techniciens d'essaimer hors du domaine strict de l'analyse médicale). On trouve toujours dans les laboratoires des personnels dont la formation théorique est assez faible et j'adaptation aux nouvelles méthodologies parfois difficile.

Les erreurs purement humaines existent cependant toujours et peuvent être minimisées de plusieurs façons :

- par des solutions techniques (automatisation et informatisation) ;
- par un encadrement approprié (biologiste, technicien ou ingénieur de génie biologique et médical) ;
- par une formation continue indispensable. Cette formation peut être dispensée dans le cadre de la formation continue en général à "hôpital. Elle est également activement prise en charge par les associations des techniciens⁹.

III.les définitions de la qualité

Dans les normes internationales, la qualité se définit comme « l'aptitude d'un produit ou d'un service à satisfaire les exigences explicites ou implicites du client ». On peut considérer que la biologie médicale a deux clients : le couple médecin-malade et les organismes de prise en charge des frais (sécurité sociale et mutuelles).

1. Les composantes de la qualité

La qualité d'un résultat est en fait une notion complexe. On peut distinguer quatre composantes :

- la qualité technique proprement dite (précision, exactitude, sensibilité, spécificité.. .)
- la qualité chronologique (urgence...)
- la qualité informative: elle dépend en partie des deux premières, mais aussi de tout le contexte scientifique et médical;
- la qualité économique, qui devient de plus en plus importante.

La tâche fondamentale la plus évidente du biologiste est de fournir des valeurs quantitatives les plus précises et les plus exactes possibles (qualité technique). Mais ces valeurs obtenues n'ont de signification et ne sont utiles (qualité informative) que si elles sont interprétées en les comparant à des valeurs similaires choisies en fonction d'objectifs bien définis. Ceci impose la maîtrise de la variation analytique et la connaissance approfondie des variations biologiques.

Ces notions recourent et précisent les notions plus anciennes, mais plus vagues, de valeurs normales et pathologiques. Bien évidemment, l'obtention de telles valeurs nécessite une collaboration étroite du clinicien et du biologiste, voire de l'épidémiologiste et du statisticien. C'est un problème considérable: il est dommage d'atteindre au laboratoire une très grande qualité technique si l'interprétation en reste à 25 % près!

2. La variation analytique

Deux types de variation constituent la variation analytique totale:

- variation préinstrumentale, concernant les fluctuations des résultats attribuables aux étapes de séparation et de traitement des spécimens biologiques (centrifugation, dilution...). Les conditions du prélèvement ont une grande influence, parfois non prise en compte: position du corps, facilité de la ponction veineuse, nature du récipient de recueil, nature de l'anticoagulant utilisé. Tous ces facteurs influenceront le résultat, en dehors de toute pathologie.

- variation instrumentale, due à la méthode de mesure. Les moyens de la limiter seront étudiés dans les autres chapitres.

Cette variation analytique explique la difficulté d'obtenir une valeur vraie, c'est-à-dire une valeur qui représente la quantité réelle et exacte de substance contenue dans l'échantillon considéré.

3. La variation biologique : le normal et le pathologique

A ces difficultés proprement techniques s'ajoutent les causes de variation biologique

- la variation individuelle (ou intra individuelle) : un paramètre peut varier chez un même individu en dehors de toute pathologie, en fonction de l'heure de prélèvement, de l'état de repos ou d'exercice, de la proximité des repas, etc...
- la variation interindividuelle, due à l'âge, au sexe, au poids, etc.

⁹ UNA TEB (Union Nationale des Techniciens Biologistes) 109, Avenue Gabriel Peri, 94170 le Perreux. Edite la revue "Information du Technicien Biologiste".

a. Valeurs usuelles

Si on mesure des valeurs sur une population d'individus "tout-venant", on obtient des valeurs fréquentes ou usuelles. la distribution de ces valeurs peut être gaussienne ou suivre une loi de Poisson. Mais cette distribution est très large, bien que cette population soit supposée saine, ce qui en limite l'intérêt comme le montre le schéma I-4 : il existe un recouvrement plus ou moins important entre les deux populations de sujets (sains et malades). Dans cette zone, les valeurs sont ininterprétables. Le pourcentage de recouvrement entre les deux populations fournit une estimation simple du pouvoir discriminant de l'analyse.

b. Valeurs de référence

La maîtrise aussi complète que possible des facteurs de la variation biologique permet de produire des valeurs de référence.

A la différence des valeurs usuelles, les valeurs de références sont collectées sur des populations parfaitement définies quant à leur état physiologique et pathologique, dans des conditions de prélèvement et de traitement des échantillons bien codifiées. On diminue ainsi notablement la largeur de l'intervalle de référence et on augmente ainsi la valeur informative de l'examen. Les intervalles choisis sont définis le plus souvent en fonction de l'âge et du sexe, mais d'autres critères peuvent être pris en compte (poids, race, traitement, etc...). Le choix peut être fait "a posteriori" (étude rétrospective nécessitant un très grand nombre de sujets) ou "a priori" (étude prospective, nécessitant une connaissance préalable de ce qui peut être attendu). Le choix des limites de l'intervalle de référence dépend aussi du but poursuivi: définition d'un état de santé, études de variations physiologiques, aide au diagnostic, études épidémiologiques, etc... Des recommandations de l'IFCC sur ce sujet ont été publiées¹⁰.

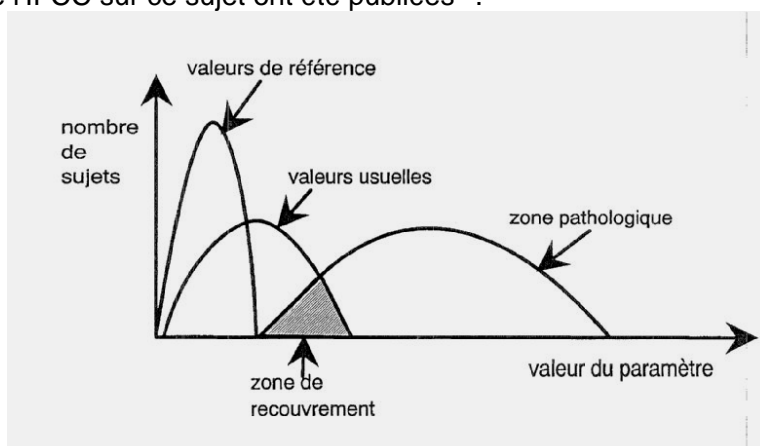


Figure I-4. Valeurs "normales" et "pathologiques" d'un paramètre biochimique.

4. la quantification de la valeur informative

La valeur informative d'une analyse peut être traitée de manière numérique. Un tel traitement numérique n'est pas propre à l'analyse biochimique mais peut s'appliquer à tout signe clinique.

Pour une analyse donnée, on peut définir les malades (M +) et les non malades (M-), ainsi que les sujets présentant le signe (S +) et ceux ne le présentant pas (S-). la population étudiée se divise donc en 4 groupes (Figure I-5).

	Non malades	Malades
Absence du signe S -	a	b
Présence du signe +	c	d

Figure I-5. Tableau de répartition des sujets pour le calcul des paramètres de sensibilité et de spécificité.

¹⁰ Annales de Biologie Clinique 49 (1991) 487-490.

On définit:

- la sensibilité comme le rapport $d / b + d$. Pour une analyse sensible, le signe est présent chez le plus grand nombre possible de malades.

- la spécificité comme le rapport $a / a + c$. Pour une analyse spécifique, le signe est absent chez le plus grand nombre possible de sujets sains.

Sensibilité et spécificité évoluent souvent en sens contraire, dépendant de la valeur seuil fixée pour admettre la positivité ou la négativité du signe biochimique. Ces deux paramètres peuvent être associés dans la définition du rapport de vraisemblance de présence (Sensibilité / 1 - Spécificité) ou d'absence (Spécificité / 1 - Sensibilité) du signe.

La détermination de la valeur seuil ("cut-off") la plus discriminante est réalisée par l'analyse ROC ("Receiver Operating Characteristic") : la courbe montrant l'évolution de la sensibilité en fonction de (1-spécificité) est tracée pour différentes valeurs seuil (figure I-6). La valeur idéale est située au coin supérieur gauche du tracé. La comparaison des courbes ROC obtenues par deux tests différents, chiffrée éventuellement par le calcul de l'aire sous la courbe, permet de choisir le test le plus performant.

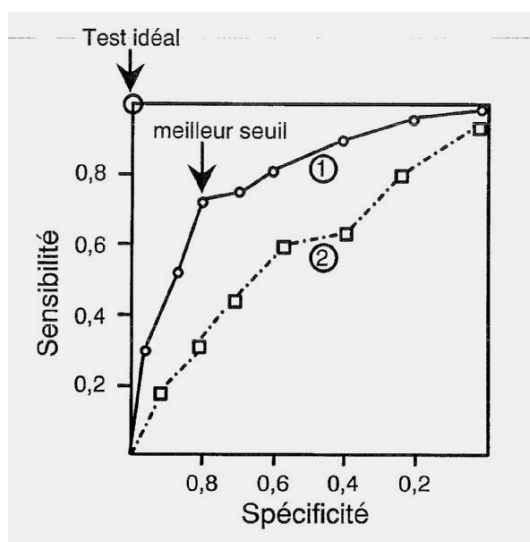


Figure I-6. Courbe ROC ("Receiver Operating Characteristic").

Représentation de l'évolution de la sensibilité d'un test en fonction de sa spécificité (1-spécificité)

Chaque point représente un incrément identique de la valeur seuil pour chaque test. Le test idéal (sensibilité 100 % et spécificité 100 %) est représenté par le symbole dans l'angle supérieur gauche. Le test 1 apparaît meilleur et plus discriminant que le test 2.

- la valeur prédictive, positive ou négative (probabilité d'une maladie ou de son absence selon que le signe est présent ou non) comme les rapports $VPP = d / c + d$ et $VPN = a / a + b$.

Lorsqu'il s'agit de valeurs quantitatives, la valeur prédictive dépend aussi du seuil que l'on fixe pour admettre la présence du signe. la détermination du seuil de décision le plus efficace détermine la valeur prédictive positive maximale.

Sensibilité et spécificité sont indépendants de la prévalence (fréquence de la maladie), par contre la valeur prédictive en dépend (car incluant les malades et non malades).

Tous ces chiffres permettent de choisir plus pertinemment les examens à effectuer et d'apprécier en termes économiques le rapport coût / efficacité. Ils sont très utiles sinon indispensables pour réaliser de bons programmes de diagnostic biologique informatisé utilisant des techniques probabilistes.

IV. le contrôle de qualité

L'obtention de valeurs de référence et la qualité des résultats fournis nécessitent de la part du biologiste une surveillance constante de ses méthodes et de ses appareils. L'évaluation la plus efficace est réalisée par la mise en oeuvre d'un contrôle de qualité.

A. Valeur cible du contrôle

La valeur vraie est la quantité réelle de substance contenue dans l'échantillon utilisé pour réaliser le contrôle. Le plus souvent elle n'est pas accessible avec les méthodologies de routine. En pratique, on fait référence à une valeur particulière, appelée valeur cible. La détermination de la valeur cible est réalisée par répétition des dosages et utilisation de la statistique, soit à l'intérieur d'un même laboratoire, soit par le concours de plusieurs laboratoires. La valeur est obtenue par calcul itératif (2 ou 3 fois) en éliminant chaque fois les valeurs aberrantes (supérieures à deux ou trois écart-types). La valeur cible est donc une moyenne tronquée, qui peut varier pour un même échantillon selon la méthodologie.

B. Limites acceptables du contrôle

Si on analyse à des instants différents un même échantillon, on obtient le plus souvent des résultats différents entre eux et différents de la valeur vraie. Si on analyse un échantillon une seule fois, ce qui est généralement le cas des sérums de malade, on a donc toutes les chances de rendre un résultat faux. Mais cela ne signifie pas que ce résultat est mauvais ou inutile, les moyens analytiques permettent de maintenir l'erreur dans des limites acceptables, compte tenu de la méthodologie utilisée.

Ces limites acceptables sont définies statistiquement à partir d'un grand nombre de résultats et sont rapportées à la valeur cible, soit en utilisant les percentiles, soit en utilisant l'écart type ou le double de l'écart type.

C. Les différents types de contrôle

1. Contrôles intra-laboratoire

Réalisés chaque jour ou plusieurs fois par jour, ils sont indispensables, car ils fournissent une information immédiatement utilisable. Ils sont encadrés dans le cadre du GBEA (Guide de bonne exécution des analyses).

a. Pool de sérums

Le type de contrôle le plus simple et le plus économique utilise un pool de sérums, provenant des restes des échantillons analysés chaque jour. Un tel mélange, filtré et congelé en petites fractions, peut être utilisé tout au long de la journée et intercalé dans les séries d'analyses. On ne peut évidemment obtenir qu'une valeur cible et le laboratoire devra définir lui-même ses limites acceptables. Cette méthode est très fructueuse dans l'étude de la précision, de la dérive et des erreurs fortuites.

b. Contrôles commerciaux

L'utilisation de pools de sérum provenant des malades pose de réels problèmes du fait de la contamination de ces pools par les virus du SIDA ou des hépatites (sérums HIV+ (SIDA) ou HBV+ (hépatite B) non connus). Pour des raisons de sécurité du personnel technique, ce type de contrôle économique est de plus en plus remplacé par le même type de contrôle sur des sérums lyophilisés contrôlés et garantis (humains ou bovins) fournis par des laboratoires spécialisés. Le coût plus élevé est compensé par le fait qu'on étudie en outre l'exactitude des résultats.

c. Contrôle par le résultat des patients

Dans les laboratoires importants qui réalisent un grand nombre de dosages identiques (du type bilan d'entrée dans un service hospitalier), il est possible d'effectuer des analyses statistiques sur les résultats obtenus chez les patients. En effet, un grand nombre de résultats se situent dans les

"fourchettes" physiologiques et la moyenne de ces valeurs sera pratiquement constante, d'autant plus qu'on utilise pour les calculs itératifs des bornes de troncature éliminant les valeurs trop éloignées de la moyenne. Les méthodes peuvent se distinguer dans le détail par les bornes de troncature et le nombre de résultats pris en compte. Une telle méthode n'est que statistique et n'est réalisable qu'avec des moyens informatiques appropriés.

2. Contrôle inter laboratoires (Figure I-7)

Ce contrôle apporte une information différée, utile au biologiste car elle lui permet d'estimer l'exactitude de ses dosages et d'éviter ainsi la persistance d'erreurs systématiques d'exactitude. Les résultats des contrôles inter laboratoires sont centralisés et rendus au biologiste sous la forme d'histogrammes, le situant par rapport à l'ensemble des laboratoires, ou de notes {TB, B, AB,...}, le plus souvent accompagnés d'analyses et de commentaires généraux très utiles. Il est aussi possible de calculer un index de déviation standard (IDS) : l'écart entre la moyenne du laboratoire et la moyenne du groupe est divisé par l'écart type du groupe. Idéalement, l'IDS doit être nul, mais il est considéré comme acceptable jusqu'à une valeur de 1,5. Sa fiabilité dépend de la taille du groupe.

Ce contrôle est aussi important pour l'ensemble de la profession: il indique la "popularité" des différentes techniques et peut mettre en évidence certains problèmes analytiques propres à une technique ou un appareil. La distribution des résultats est exprimée par sa moyenne et son écart-type et on peut définir le coefficient de variation CV, rapport de l'écart type sur la moyenne. L'évolution de l'automatisation et de la standardisation a considérablement renforcé la qualité des analyses, au moins pour les paramètres les plus courants. Le suivi régulier au cours du temps depuis l'instauration de ce type de contrôle indique une diminution régulière des CV : des coefficients de variations inter laboratoires inférieurs à 10 % et même à 5 % sont fréquemment trouvés actuellement. Cette amélioration paraît cependant atteindre un palier, qui pourrait en partie être dû à la diversification de plus en plus grande des systèmes analytiques. Il reste en outre beaucoup à faire par exemple dans le domaine de la chimie urinaire et dans celui des méthodes immunologiques (hormones, protéines spécifiques).

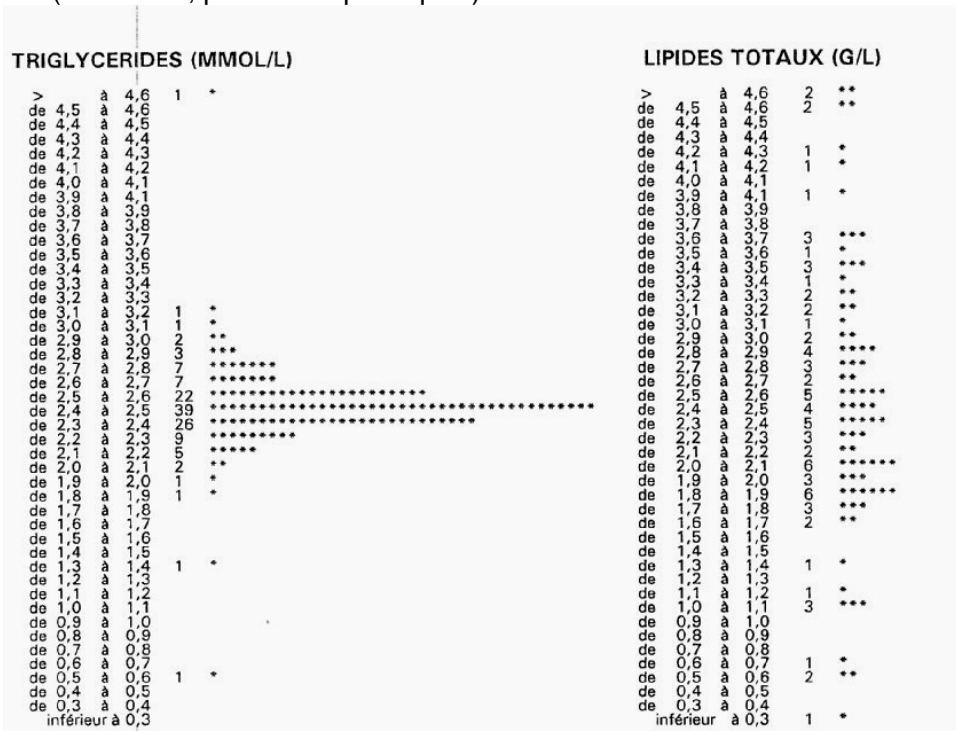


Figure I-7. Répartition des résultats obtenus par différents laboratoires lors de dosages effectués sur le même échantillon.

A gauche: répartition étroite pour un "bon dosage". A droite: répartition très dispersée pour une analyse non satisfaisante.

Les dosages sont effectués sur des sérums le plus souvent lyophilisés, d'origine humaine ou animale, distribués à tous les laboratoires participant au contrôle. Ce contrôle a plusieurs modalités:

- contrôle inter hospitalier, tel qu'il est réalisé dans certains gros centres hospitalo-universitaires: le même sérum est distribué à tous les laboratoires dépendant de ce centre.

- contrôle régional, réalisé par différentes associations (par exemple Pro-Bio-Qual dans la région lyonnaise¹¹) pour des laboratoires volontaires. Certains contrôles étant analysés régulièrement au cours de l'année par chacun des laboratoires ("contrôle permanent"), il est possible de calculer le CV50 et le CV90, définissant le CV intra laboratoire au niveau duquel se situent 50 % ou 90 % des laboratoires respectivement. Pour une bonne méthodologie, ces deux valeurs doivent être les plus basses possibles. Des essais de transmission par minitel avec traitement des données en temps réel se développent permettant un retour direct d'information élaborée à partir de ce qui est déjà rentré.

- contrôle national de qualité (CNQ), obligatoire, instauré en 1979 sous l'égide du Laboratoire National de la Santé (LNS), intégré à partir de 1993 à l'Agence du Médicament (ADM) et depuis 1999 à l'Afssaps (Agence française de sécurité sanitaire des produits de santé) et mis en place sous son aspect technique par la SFBC. Il est beaucoup moins fréquent (bisannuel), compte tenu des difficultés de mise en place et d'exploitation des résultats. Les résultats sont en général connus deux mois après. Une mauvaise position dans ce contrôle peut avoir actuellement des sanctions pratiques (retrait de l'autorisation de fonctionnement si absence de correction au bout d'un mois)¹².

- contrôle international, enfin, à l'échelon européen, en cours de mise en place (ECCLS : European Committee for Clinical Laboratory Standard).

D. Les types d'erreurs

1. Mise en forme du contrôle

Seul un contrôle relativement fréquent, qu'il soit intra ou inter laboratoire, permet de déceler les erreurs avant qu'elles n'aient des conséquences fâcheuses. La méthode la plus simple est une méthode visuelle, par tableau de contrôle de type Levey-Jenning, représenté dans la figure I-8. Elle est indispensable pour le contrôle quotidien à l'intérieur du laboratoire.

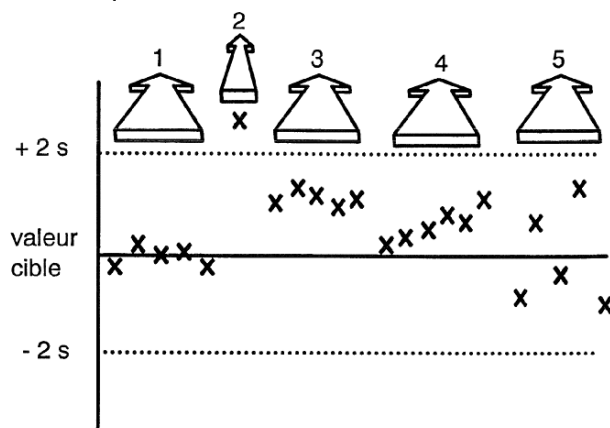


Figure I-8. Les enseignements du contrôle de qualité quotidien d'une analyse à l'intérieur d'un laboratoire.

1. Zone idéale. 2. Erreur fortuite. 3. Inexactitude vraie. 4. Dérive. 5. Imprécision.

¹¹ PRO-BIO-QUAL, Section Contrôle de Qualité, BP 4016, 69615 Villeurbanne

¹² Décret 89-92 du 10.2.89 (JO du 12.2.89).

2. L'erreur fortuite

Le point signalé par la flèche est un "mauvais résultat", hors des limites acceptables, mais il ne semble pas représentatif de l'ensemble des résultats. Il est donc affecté d'une erreur fortuite, résultant elle-même d'une cause fortuite, qui doit être recherchée et éliminée, ce qui est souvent difficile à faire a posteriori. Cette cause peut être très variable, par exemple :

- mauvaise reconstitution (erreur de volume, dénaturation par une agitation trop forte,...) ou mauvaise conservation du sérum de contrôle (évaporation, dénaturation thermique,...) ;
- vaisselle contaminée ou réactifs détériorés ;
- erreur de réglage de l'appareil ou défaut de lecture ;
- erreur de calcul, de recopiage ou d'identification.

3. L'erreur de justesse (exactitude)

Les résultats s'écartent de la valeur cible visée, compte tenu de la méthodologie utilisée, tout en restant dans des limites acceptables. Les parties 2 et 3 de la figure I-8 appartiennent à ce type, mais recouvrent en fait 2 notions différentes :

- l'inexactitude (partie 2 de la figure I-8) ou erreur d'exactitude proprement dite. L'erreur est constante dans le temps et peut être quantifiée statistiquement en mesurant la différence entre la moyenne des mesures répétées et la valeur cible. On peut l'exprimer en valeur absolue ou en pourcentage. C'est un des critères qui peut servir à l'évaluation d'un appareillage ou d'une méthodologie.

Les causes peuvent être par exemple :

- étalon ou réactif inappropriés (erreur d'identification d'un lot par exemple)
- méthode ou appareillage inexact (erreur sur une longueur d'onde par exemple)
- température, temps de mesure, coefficient de transformation faux,
- cinétique de l'étalon différente de celle du dosage
- la dérive, ou variation d'exactitude. Elle est représentée dans la partie 3 de la figure I-8. Elle n'est pas constante dans le temps et ne peut pas être quantifiée comme dans le cas précédent. Elle a des causes très diverses :
 - « vieillissement » entraînant une dénaturation progressive ou une concentration des réactifs ou des étalons
 - "encrassement" progressif des appareils, des cuves de mesure, vieillissement des lampes, etc...

Il s'agit donc dans ce cas d'un problème de maintenance, alors que dans le cas de l'inexactitude, le problème de la méthodologie est au premier plan. La maintenance ne doit pas être réduite à la détection et à la réparation des pannes. Un décret¹³ indique que le directeur de laboratoire doit pouvoir fournir la justification de la maintenance du matériel. Dans ce cadre, le contrôle continu journalier constitue un précieux indicateur de (bon) fonctionnement global. Des vérifications modulaires permettent d'étudier régulièrement chaque partie du système et de prévenir les problèmes.

Un problème très général peut être à l'origine de ces deux erreurs : c'est la conservation à l'air libre et à température ambiante jusqu'au moment de l'analyse des godets d'échantillons et de réactifs. Cette vieille pratique peut conduire à des erreurs (inexactitude pour les patients, dérive pour les contrôles), d'autant plus que les volumes d'échantillons sont petits, ce qui est de plus en plus le cas actuellement.

4. L'erreur de fidélité (imprécision)

La partie 4 de la figure I-8 met en évidence l'absence de fidélité des résultats, c'est l'imprécision ou dispersion. La fidélité est estimée soit par la mesure des écarts extrêmes, soit par le calcul de l'écart type (moins sensible aux erreurs fortuites), ou mieux par le coefficient de variation CV, exprimé en pourcentage. Indépendant des valeurs, le CV permet des comparaisons entre méthodes ou appareils. La précision pourra se compléter par deux notions :

¹³ Décret 83-104 du 15 février 1983, relatif au contrôle de la bonne exécution des analyses.

- la répétabilité (comparaison intra série) : mesures faites sur le même échantillon, de nombreuses fois de suite. On est donc dans des conditions idéales: même opérateur, même réactif...

- la reproductibilité, soit par comparaison inter séries (le même contrôle est passé le même jour dans toutes les séries d'échantillons à analyser), soit par comparaison de jour à jour.

Là encore, les causes d'erreur peuvent être nombreuses : outre les erreurs de manipulation, notamment sur la précision des temps de mesure, deux facteurs interviennent :

- instabilité des réactifs ou des échantillons de contrôle, de la température, de l'appareillage, du circuit électrique, etc....

- contamination entre deux échantillons présentant des valeurs très différentes. Ce phénomène peut être quantifié par l'utilisation successive de sérums de valeur haute et basse. L'élimination de ce phénomène a été un des grands soucis des ingénieurs qui ont conçu les automates modernes. Outre son impact évident sur la fiabilité des résultats, l'absence de contamination est un des facteurs d'abaissement des coûts, car elle évite d'avoir à recommencer des dosages, donc de consommer des réactifs, du temps appareil et du temps technicien. La contamination est exprimée en pourcentage (figure I-9).

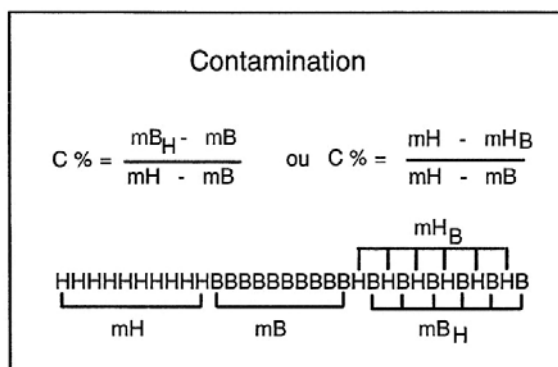


Figure I-9. Principe du calcul de la contamination entre échantillons.

mH : moyenne des résultats obtenus sur l'échantillon de valeur haute H. mB : moyenne des résultats obtenus sur l'échantillon de valeur basse B. mHB et mBH : moyennes des résultats obtenus sur les échantillons à valeur haute et basse lorsqu'ils sont analysés après un l'échantillon à valeur basse et haute respectivement.

5. Traitement informatisé de la qualité

a. Sur les résultats des contrôles : les règles de Westgard

Les résultats graphiques d'un tableau de Levey-Jenning peuvent également être gérés de manière informatisée par les automates, par l'utilisation des règles de Westgard. Ces règles ont pour but de signaler les erreurs fortuites graves (valeurs en dehors de ± 2 ou ± 3 écart-types) les tendances à la dérive ou à l'imprécision (2 valeurs consécutives en dehors de 2 écart-types, du même côté ou du côté opposé, 4 valeurs consécutives en dehors de 1 écart-type), ou des variations d'exactitude (10 valeurs consécutives sont du même côté de la valeur cible).

b. Sur les résultats des patients

Des erreurs sur les résultats obtenus sur les échantillons des patients peuvent être prévenues par deux types de techniques :

- technique de cohérence interne: certains paramètres évoluent généralement en parallèle. Par exemple, une élévation de la créatinine s'accompagne d'une élévation d'urée; la bilirubine conjuguée est toujours inférieure à la bilirubine totale.

- technique du delta check: la rapidité maximale d'évolution d'un paramètre biologique est connue dans certains cas. On peut comparer les résultats successifs d'un même patient pour le

même paramètre: une évolution supérieure à un certain seuil en fonction du délai entre les deux analyses peut générer un message d'alarme.

E. Étalonnage et calibration

Quelle que soit la méthode utilisée (en dehors du dosage des enzymes), un résultat ne peut être rendu en chiffres que par comparaison avec une solution connue, appelée étalon. Les solutions étalons permettent de déterminer la fonction d'étalonnage de l'appareil ou de la méthode (courbe ou droite, intervalle de linéarité), par utilisation de différents niveaux de concentration. Les étalons doivent être connus le mieux possible. On distingue :

- les étalons primaires, qui sont définis uniquement par des pesées et des mesures de volume; ils ne renferment que la substance étalon et un solvant très précis. Ils sont rigoureusement définis quant aux critères de pureté, aux conditions de préparation et aux conditions d'utilisation.

- les étalons secondaires, solutions qui ne répondent pas à tous les critères précédents, et qui sont connus par comparaison avec eux, après analyse par une très bonne méthode et détermination statistique des limites acceptables.

Lorsque la fonction d'étalonnage est connue, l'étalonnage quotidien ou pluriquotidien sera réalisé à l'aide d'une ou plusieurs concentrations de l'étalon. L'utilisation d'un ordinateur connecté à l'appareil de mesure permet éventuellement de calculer chaque fois une droite de régression et d'assurer plus de fiabilité aux résultats.

- les solutions de calibration. Dans le cas où la préparation de solutions étalons ou leur utilisation est impossible, on utilisera des solutions de calibration, de composition non parfaitement définie et dont le titre est défini après analyse. La calibration à l'aide de sérum est souvent la seule méthode utilisable pour les dosages faisant intervenir des enzymes (exemple: dosage enzymatique du cholestérol, qui est insoluble dans l'eau à l'état pur).

Le développement des réactifs commerciaux standardisés et contrôlés, ainsi que les qualités des appareils actuels, autorisent une calibration moins fréquente, d'où gain de temps et de réactifs.

V. les qualités des méthodes et des appareils

Les qualités des méthodes et des appareils ne sont pas des notions absolues car seule une partie est quantifiable. Une part non négligeable reste subjective.

Les qualités recherchées sont exprimées par le "Cahier des charges" réalisé par le biologiste, qui définit la réponse à un besoin, après une enquête interne de définition des besoins (enquête auprès des cliniciens, statistiques d'activité pour les différents paramètres) ;

Les qualités offertes sont les "Arguments de vente" pour le fabricant. En dehors des qualités chiffrables, les autres aspects sont repérés par des enquêtes plus ou moins régulières des grands fabricants auprès des biologistes. Les qualités les plus attendues par ceux-ci sont la fiabilité et les performances.

Si les critères de fiabilité et les performances peuvent être définis de manière objective, le dernier critère de praticabilité est beaucoup plus subjectif. La revue des éléments de ce critère n'est certainement pas exhaustive. Rares sont les méthodes ou les appareils qui présentent simultanément toutes les qualités dans un contexte précis. La tendance actuelle est à l'uniformisation vers le haut de la qualité des méthodes et des appareils ; aussi, les critères extrascientifiques peuvent devenir prépondérants dans le choix d'un biologiste !

A. la fiabilité

C'est l'étude scientifique des qualités d'une méthode ou d'un appareil, exprimées en chiffres. Plusieurs critères complémentaires sont définis:

- Critères statistiques : précision (répétabilité, reproductibilité) exprimée par des coefficients de variation;
- Critères opérationnels : exactitude (corrélation avec la méthode de référence ou d'autres méthodes) exprimée par les paramètres d'une droite de régression ;
- Critères fonctionnels :

+ sensibilité (exprimée par une concentration) : c'est la valeur la plus basse qu'on peut doser de façon fiable, avec une fidélité acceptable. Elle est à distinguer de la limite de détection, pour laquelle on admet des CV plus élevés. Cette qualité est surtout importante dans la détermination de composés habituellement présents en très faible quantité, comme les enzymes, et surtout les oligo-éléments ou les hormones. Les méthodes actuelles, telles que la fluorimétrie ou l'immunologie, ont beaucoup reculé les limites de détectabilité dans de nombreux domaines. De plus, l'apparition de méthodes micro ou ultra-micro (pour la pédiatrie notamment), impose la recherche d'une grande sensibilité.

- spécificité et sélectivité (exprimée en %) : la méthode ne dose effectivement que la molécule que l'on veut doser. La diffusion des méthodes enzymatiques ou immunologiques a considérablement amélioré ce critère.

- linéarité (exprimée par une gamme de concentration) : la linéarité indique la zone de concentration où le dosage est fiable ; plus cette zone est vaste, moins il est nécessaire de refaire des dosages avec dilution, d'où économie, mais plus le réactif devient coûteux. En général, les gammes de linéarité couvrent la plus grande partie de la pathologie courante.

La SFBC a publié des protocoles de validation des techniques ou des adaptations des techniques, prenant en compte la plupart de ces paramètres (protocole ValTec)¹⁴.

B. les performances

Les performances sont quantifiables, mais leur valeur est relative et doit s'apprécier par rapport aux besoins propres du laboratoire.

- cadence d'analyse: nombre de dosages réalisables par heure. Elle dépend de la durée unitaire de l'analyse, mais aussi des étapes parfois nécessaires entre deux analyses successives (par exemple rinçage des cuves de mesure).

- disponibilité: temps réellement consacré à l'analyse des échantillons des patients. On doit prendre en compte les délais de mise en route, les délais nécessaires aux étalonnages et contrôle, les durées et les fréquences des opérations de maintenance.

- coûts de l'analyse pour un résultat de patient, incluant l'amortissement de l'appareil, la maintenance, le coût des réactifs pour l'échantillon patient, mais aussi pour les étalonnages et la calibration.

Les performances permettent d'apprécier la productivité du système analytique.

C. Praticabilité

La praticabilité peut se définir comme l'aptitude d'une méthode (ou d'un appareil) à être réalisée (ou utilisé) par un biologiste donné, dans un laboratoire donné et dans des conditions données. La praticabilité recouvre plusieurs notions :

1. Critères internes

- Critères propres au laboratoire :

+ conditions d'usages: pour la routine (grandes séries) ou pour l'urgence (coup par coup) ; facilité de l'insertion et de la programmation des analyses urgentes au sein des séries ;

+ complexité de mise en oeuvre: nécessité de transformation du laboratoire ou intégration sans problème à l'existant ;

+ considération des surcoûts ou des économies générées par le nouveau système analytique : gains de temps, de personnel, économie de réactifs.

- Critères propres à l'opérateur ; nécessité de « tour de main » nouveau ; possibilité et facilité de la formation du personnel, qualité de sa compétence antérieure...

¹⁴ Annales de Biologie Clinique 44 (1986) 686-745.

2. Critères externes

- Critères propres à la machine : sécurité (risque d'explosion ou d'incendie), adaptabilité ou souplesse vis-à-vis des développements ultérieurs des méthodes, possibilités de connexion informatique, influence de l'ambiance (température, courant électrique,...)

- Critères concernant l'entreprise commerciale fournissant le système : qualité et importance de la formation initiale souvent proposée avec l'appareil, qualité du service après vente (rapidité des interventions, qualification du personnel, gardes de week-end), conditions de garantie....

D. Classification des méthodes

Les différentes sociétés de biologie clinique se sont mises d'accord pour classer les méthodes en 5 groupes. La répartition des méthodes existantes dans les différents groupes est un travail long et difficile, demandant une grande rigueur technologique et de nombreuses confrontations entre spécialistes divers¹⁵.

1. Les méthodes définitives

Elles sont reconnues au niveau international comme les plus exactes dans l'état actuel de la science. Elles fournissent des valeurs dites définitives, s'approchant le plus possible de la valeur vraie. Selon l'IFCC, une telle méthode, après une approche exhaustive ne présente aucune cause d'inexactitude ou d'ambiguïté, aucun paramètre qui ne soit totalement maîtrisé. La mise en œuvre de méthodes définitives nécessite souvent un appareillage complexe et n'est généralement possible (et d'ailleurs nécessaire) que dans un petit nombre de laboratoires. C'est cependant le critère ultime pour juger de l'exactitude d'une autre des méthodes suivantes. De telles méthodes n'existent pas pour tous les paramètres. Par exemple, pour le dosage du cholestérol sérique, la méthode retenue est la chromatographie en phase gazeuse sur colonne capillaire couplée à la spectrométrie de masse.

2. Les méthodes de référence

Elles sont également choisies au niveau international, mais sont de mise en œuvre plus facile et donc plus répandue : surtout, elles ne doivent présenter qu'une erreur d'exactitude négligeable par rapport à leur fidélité (précision). Elles doivent être validées par comparaison avec la méthode précédente. Une description codifiée a été recommandée par la SFBC¹⁶.

Ainsi, toujours pour le cholestérol, la méthode retenue est la chromatographie en phase gazeuse sur colonne capillaire.

3. Les méthodes sélectionnées

Elles sont des méthodes de fiabilité et de praticabilité reconnues, utilisables par des laboratoires même non spécialisés.

Pour le cholestérol, il a été retenu :

- soit la chromatographie en phase gazeuse sur colonne ordinaire
- soit, beaucoup plus simplement, la méthode enzymatique.

4. les méthodes acceptables

Elles peuvent être employées en routine, du fait, le plus souvent, de leur simplicité ou de leur faible coût de revient. Mais on doit connaître les limites de leur précision et de leur exactitude, qui peuvent beaucoup varier selon les laboratoires. Cependant, leurs qualités pratiques et économiques peuvent en faire des méthodes idéales pour les dépistages de masse.

¹⁵ Annales de Biologie Clinique 44 (1986) 746-755.

¹⁶ Annales de Biologie Clinique 34 (1976) 235-238.

5. Les méthodes non recommandées

Elles présentent de graves défauts de fiabilité, de praticabilité ou de spécificité et ne devraient plus être utilisées. Dans cette classe entrent de nombreuses méthodes colorimétriques, purement chimiques, faisant intervenir des produits trop polyvalents ou des mécanismes réactionnels mal définis.

6. Cas particulier de l'agroalimentaire

Il existe pour les dosages utiles en agroalimentaires des méthodes utilisant les mêmes principes et appareillages qu'en biochimie clinique. Un certain nombre de ces méthodes ont fait l'objet d'une normalisation soit française (AFNOR : association française de normalisation) soit européenne (CEN : comité européen de normalisation). Il est préférable de faire réaliser les dosages dans des laboratoires accrédités par le COFRAC (Comité français d'accréditation), qui délivre ces accréditations au cas par cas à un laboratoire, pour un couple précis paramètre – matrice alimentaire (par exemple acides gras – poissons).

VI. La qualité des produits et accessoires

A. Les produits chimiques

Les exigences de pureté ne sont pas fixées officiellement. Il faut utiliser en principe des produits "purissimum" (très pur) souvent spécifiés p.a. (pour analyse, pro analysis) dont la composition est connue. Il ne faut donc pas employer de produits "purum" (pur) ou encore moins "techniques". En effet, les nombreuses réactions de coloration utilisées sont souvent influencées par la présence d'impuretés. Il est même recommandé, une fois la méthode mise au point, d'utiliser un produit ayant toujours la même provenance.

B. L'eau

La qualité de l'eau utilisée au Laboratoire a une grande influence, d'autant plus que c'est le constituant de base de la plupart des tampons, réactifs et étalons utilisés dans les méthodes modernes, enzymatiques ou immunologiques. Avec le recul des limites de détectabilité des éléments, la qualité de l'eau peut même devenir critique (spectrométrie d'absorption atomique, HPLC, spectrométrie de masse). Même pour les méthodes courantes usuelles, enzymologiques par exemple, la qualité de l'eau est primordiale (sensibilité des enzymes à certains métaux...).

a. La qualité de l'eau

Les contaminants de l'eau sont très divers : particules minérales ou organiques (bactéries), substances en solution (ions et substances organiques). Aucune méthode, prise isolément, ne peut les éliminer tous complètement. La présence d'ions en solution est responsable de la conductivité électrique de l'eau et permet de définir différentes qualités d'eau :

- Type I : eau de qualité réactif, dont la résistivité est de 10 à 18 mégohms x cm à 25°C.

Cette eau est indispensable pour l'analyse des traces.

- Type II : qualité analytique: 1 mégohm x cm à 25°C

- Type III et IV : 0,2 à 0,5 mégohm x cm à 25°C. Elle est utilisée pour les analyses de routine ou la vaisselle, ou encore pour l'alimentation de systèmes plus performants de purification.

b. Les méthodes de purification de l'eau

La distillation consomme beaucoup d'énergie, n'élimine pas certaines matières organiques volatiles et nécessite une maintenance très soignée de l'appareillage. Elle n'est plus guère utilisée.

L'échange d'ions sur résine permet selon les cas :

- l'adoucissement : élimination du calcium par échange avec le sodium sur une résine chargée négativement ;

- la désionisation : échange de tous les ions de l'eau avec les ions H^+ ou OH^- fixés sur les résines. L'utilisation de deux résines en continu désionise totalement l'eau et fournit l'eau appelée permutée, mais elle n'élimine ni les particules, ni les matières organiques non ionisées, ni les microorganismes. L'efficacité de cette désionisation doit être régulièrement contrôlée et garantie par un changement périodique des résines qui sont régénérées par le fournisseur. Très récemment, la firme Millipore a proposé une régénération en continu dans l'appareil lui même par un procédé électrique.

L'adsorption sur charbon est très efficace pour les matières organiques dissoutes, mais elle élimine le chlore et favorise la pousse bactérienne dans les réservoirs en aval. Pour une élimination plus facile, les substances organiques peuvent être préalablement photo oxydées par passage de l'eau devant une lumière UV ($< 200 \text{ nm}$).

La filtration de l'eau utilise des techniques variées (figure I-10) :

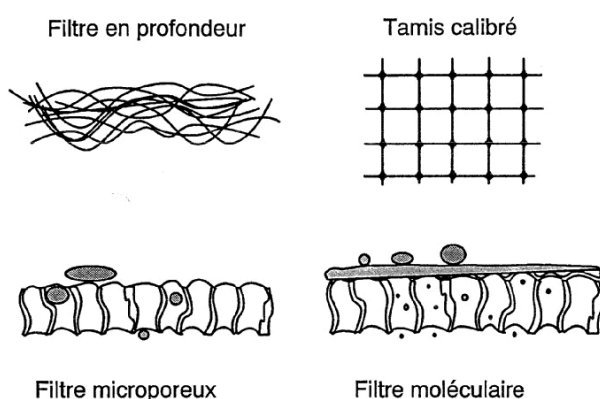


Figure I-10. Différents procédés de filtration de l'eau pour le laboratoire.

- macrofiltration, pour les particules en suspension : filtres "en profondeur" (entrelacs de fibres sur une certaine épaisseur, de porosité difficile à contrôler) ou filtres tamis (en polymères ou en acier, stérilisables, avec des mailles de taille mieux contrôlée à partir de 50 pm). Ces filtres sont utilisés comme préfiltres, car ils sont de grand débit et économiques.

- microfiltration : filtres microporeux ou filtres écrans plus précis (mince film de polymère organique de porosité contrôlée (généralement $0,22$ ou $0,45$ micromètre) sur un support microporeux). Ils éliminent les traces restant après macrofiltration, mais leur débit est beaucoup plus faible. Ils peuvent être installés sur le robinet de soutirage pour éliminer les éventuelles bactéries développées dans les réservoirs de stockage.

- ultrafiltration, avec des membranes de tamisage moléculaire (élimination de molécules de poids moléculaire supérieur au seuil de coupure (10.000 à 100.000 souvent)). Les débits sont très faibles et font réserver ces méthodes au dessalage ou à la concentration des solutions de macromolécules.

- l'osmose inverse représente la méthode la plus économique pour éliminer 90 à 95% des contaminants en une seule étape. Dans cette technique, une pression hydrostatique (30 à 80 bars) est appliquée sur le compartiment le plus concentré, de telle sorte que l'eau passe du compartiment le plus concentré vers le moins concentré en substances dissoutes (schéma I-11). Le faible débit de cette méthode est compensé par l'utilisation de filtres de grande surface.

La combinaison de plusieurs de ces techniques en unités intégrées permet de fournir actuellement une eau de qualité réactif à tout laboratoire, quelle que soit sa taille et pour un coût raisonnable. Certains automates comportent des stations de lavage des cuves, pour lesquelles la qualité de l'eau est importante. Ces systèmes utilisent fréquemment un système de purification intégré et un traitement propres, distinct de celui du reste du laboratoire.

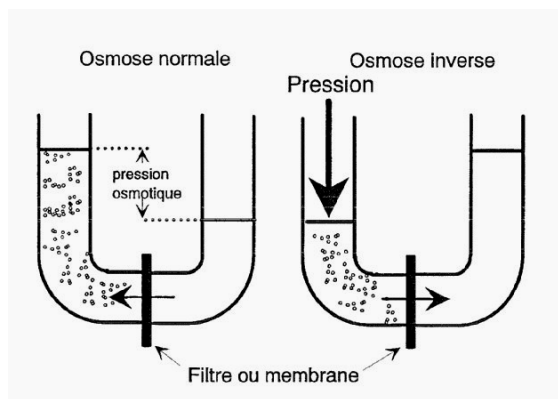


Figure I-11. Principe de l'osmose inverse pour la purification de l'eau.

C. Les accessoires

Les accessoires en matière synthétique prennent de plus en plus d'importance. Outre le fait qu'ils sont incassables, ils n'ont pas d'action d'échange d'ions comme le verre. La tendance à l'utilisation de matériel à usage unique se développe de plus en plus grâce à eux. Mais la résistance aux agents chimiques des matières synthétiques doit être connue.

En 1989 a été créée l'ELPA ("European Laboratory Plastic Association") regroupant les fabricants européens, pour préparer le marché unique et surtout des normes de qualité (GMP : "Good Manufacturing Practice"), susceptibles de se transformer en standard européen de qualité.

Le lavage des accessoires requiert également un soin particulier. Le mélange classique sulfochromique doit être abandonné, car des traces peuvent rendre les enzymes inactives. Les savons (surtout dans les eaux calcaires, où les sels de calcium des acides gras peuvent précipiter) laissent des films sur la verrerie qui sont très difficiles à enlever. Les détergents alcalins courants (type cuisine) corrodent la surface du verre (augmentant la capacité d'échange d'ions) et sont de forts inhibiteurs d'enzymes. Les méthodes les plus appropriées utilisent donc des détergents neutres (qui doivent en plus être biodégradables actuellement) suivis de plusieurs rinçages à l'eau déminéralisée.

VII. La qualité du prélèvement et de son traitement

La validité d'un résultat d'analyse biochimique repose sur des données théoriques correctes de réalisation des dosages et sur des appareillages fiables qui seront décrits dans les chapitres suivants. Mais il repose également sur l'utilisation d'un prélèvement adapté au but poursuivi, surtout en ce qui concerne les prélèvements sanguins (qui représentent la grande majorité des prélèvements en biochimie clinique).

Les "analyses de sang" peuvent en effet être réalisées :

- soit sur sang total (gaz du sang, ions par électrodes sélectives)
- soit sur plasma (surnageant non cellulaire d'un sang non coagulé) : ionogramme par exemple
- soit sur sérum (surnageant non cellulaire d'un sang coagulé) : enzymes par exemple.

Un certain nombre de dosages nécessitent des traitements particuliers : un traitement rapide de l'échantillon ; une conservation et/ou un transport dans la glace, ou toute autre technique appropriée. Les laboratoires sont aptes à fournir toutes les indications utiles, et même les tubes spéciaux de prélèvement si besoin, pour tous les dosages qui sortent de la routine.

A. Problèmes de coagulation

La coagulation du sang est une cascade complexe de réactions enzymatiques nécessitant du calcium et aboutissant à la transformation de fibrinogène en fibrine ("Polymérisation" du fibrinogène). L'étude approfondie de l'hémostase est extrêmement utile en clinique. Elle fait appel à des méthodes et des automates qui, comme ceux utilisés pour les groupages sanguins et les

études cytologiques, sortent du cadre de cet ouvrage. Cependant, certains enzymes ou substrats de la coagulation peuvent être dosés par des méthodes enzymatiques ou immunologiques tout à fait comparables à celles qui vont être décrites dans le chapitre suivant.

La présence de fibrine peut amener de sérieux ennuis et induire de nombreuses erreurs dans les systèmes automatiques d'analyses : principalement bouchage partiel ou total des tuyaux d'appareillages, colmatage des membranes de dialyse, encrassage d'électrodes. La fibrine peut être retrouvée :

- dans un plasma, si la quantité d'anticoagulant a été insuffisante ou l'homogénéisation du tube mal faite ;

- dans un sérum si la coagulation n'a pas été complète (examen trop précoce).

L'anticoagulant doit être choisi en fonction du dosage à réaliser. Il existe là aussi des recommandations internationales, qui s'étendent également à la nomenclature et aux codes de couleur des étiquettes. Schématiquement, on distingue 3 grandes classes d'anticoagulants :

- les complexants du calcium (oxalates, Citrates, EDTA) ne sont pas adaptés pour les dosages du calcium ou du magnésium. Ils perturbent de nombreux dosages enzymatiques en complexant des ions cofacteurs indispensables de la réaction. Ils sont plus souvent utilisés en hématologie qu'en Biochimie.

- les inhibiteurs de la glycolyse (fluorure de sodium) sont réservés à la détermination du glucose sanguin.

- les inhibiteurs d'enzymes de la coagulation sont les plus utilisés et les moins gênants en Biochimie. Le plus fréquent est l'héparine, sous forme d'héparinate (de sodium, d'ammonium ou de lithium).

B. Centrifugation

Que l'on utilise du plasma ou du sérum, il faut de toutes façons réaliser une centrifugation pour éliminer tout élément cellulaire. Une centrifugation de 3 min. entre 1000 et 3000 g est généralement suffisante. En dessous de cette accélération, les plaquettes restent dans le surnageant (préparation du plasma riche en plaquettes pour les études hématologiques), puis à plus basse vitesse encore, les leucocytes surnagent aussi. Dans la plupart des cas, la centrifugation ajoute un délai incompressible à la réalisation de l'analyse. Même lorsqu'on travaille sur le sérum, celui-ci doit être centrifugé après la rétraction du caillot, car il contient toujours quelques éléments cellulaires.

Le marché des centrifugeuses de paillasse, outil de base de tout laboratoire, est important. Cependant ces technologies ne seront pas développées ici.

C. Anomalies de l'échantillon : lactescence, hémolyse, ictère

L'observation de l'échantillon après centrifugation doit être réalisée pour détecter des anomalies ayant des conséquences médicales et/ou analytiques. De plus, une ponction veineuse libère toujours dans le sang prélevé des enzymes tissulaires, d'autant plus que la ponction a été difficile, qui peuvent fausser de manière importante certains dosages (exemple du dosage des facteurs du complément).

1. lactescence

La lactescence d'un sérum correspond à la diffusion de la lumière par de grosses particules de lipoprotéines, les chylomicrons, provenant de manière physiologique de l'absorption intestinale des graisses alimentaires ou de certaines circonstances pathologiques. Le phénomène doit donc être signalé au clinicien qui prescrira éventuellement des examens complémentaires. La lactescence peut perturber toutes les mesures optiques, et surtout les dosages non dénaturants, tels que les dosages d'enzymes ou les dosages immunologiques utilisant la turbidimétrie ou la néphélométrie. On pallie à cet inconvénient actuellement à l'aide de "réactifs clarifiants du plasma" : solvant organique fluoré non dénaturant et non miscible à l'eau. Ce réactif dissout les graisses sans modifier le volume de l'échantillon et donc sans modifier la concentration des autres constituants.

2. Hémolyse

L'hémolyse du sérum ou du plasma correspond à la destruction des globules rouges et à la libération d'hémoglobine, dont la coloration peut perturber les mesures optiques (entre 400 et 600 nm approximativement, variable selon le pH) et les mesures de K⁺ ou d'autres composés par inhibition de la réaction (diazotation dans le dosage de la bilirubine, dosage de la lipase). Visible à l'oeil nu, elle doit également être signalée. Elle peut être due en effet seulement à des problèmes techniques de prélèvements (prélèvement difficile, aspiration trop forte par une seringue) ou à de mauvaises conditions de conservation.

3. Ictère

Les sérums ictériques correspondent à la présence d'un pigment jaune provenant de la dégradation de l'hémoglobine, la bilirubine, qui peut perturber certaines mesures optiques et doit être mentionné de toutes façons, car c'est un phénomène pathologique.

4. Prise en compte et corrections

On pallie à ces inconvénients soit en réalisant un témoin ("blanc" échantillon) par une mesure au temps 0 ou en absence de réactif déclenchant la réaction. Le développement des automates informatisés réalisant des mesures à plusieurs longueurs d'onde différentes (bichromatisme ou polychromatisme) permet :

- la mesure automatique d'indices (lipémique, hémolytique, ictérique : figure II-12) en utilisant différentes formules à partir des densités optiques mesurées aux différentes longueurs d'onde. Un message d'alarme est généré au-delà d'un seuil prédéfini.

- la correction automatique. Si les indices précédents sont compris entre certaines limites, une correction peut être apportée ; au delà, un message d'alarme est généré. Avec les appareils polychromatiques, et une informatique plus élaborée, la correction peut être plus poussée, permettant le calcul du spectre des interférences et la déduction de l'absorption réelle de l'analyte étudié.

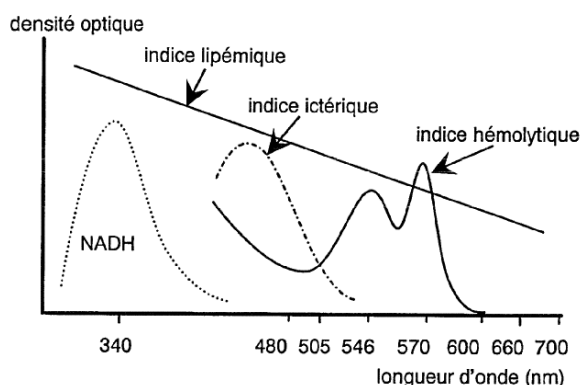


Figure I-12. Principe de la mesure d'indices sériques par lecture polychromatique.

VIII. L'aide informatique à la gestion de la qualité

A. Généralités

Comme dans beaucoup d'autres domaines, le champ d'application de l'informatique dans les laboratoires de Biochimie Clinique est en accroissement constant. Le temps n'est plus en effet où le coût et la complexité du matériel réservaient l'informatique aux gros laboratoires pratiquant un nombre élevé d'examen journaliers. Le développement et la diffusion des microprocesseurs (obligatoirement intégrés à tout appareil moderne comme élément indispensable) et des

microordinateurs rendent les techniques informatiques accessibles à tout laboratoire. La décision de s'informatiser doit être précédée d'une étude sérieuse et aussi complète que possible :

- des besoins: l'achat d'un système clé en mains peut entraîner une réorganisation complète du laboratoire ;
- des coûts: l'informatique (amortissement, entretien, consommable) ne doit représenter qu'un faible pourcentage de la valeur de la lettre-clé B ;
- une attention soignée doit être portée à l'étude des situations dégradées en cas de pannes ou d'incidents, fréquents en période de démarrage. L'intervention de l'ordinateur peut se faire à trois niveaux qui seront envisagés.

Un cahier des charges national très (trop ?) complet, établi à l'initiative du ministère par un groupe de biologiste, est actuellement disponible (Direction des Journaux Officiels, référence 87 33 bis).

B. Informatisation des tâches de gestion

Avec les systèmes décentralisés les plus répandus actuellement, ces tâches représentent l'essentiel du système central. De nombreux produits "clés en main" sont commercialement proposés.

1. Réception des analyses

L'informatique apporte dans ce domaine une diminution importante des tâches de secrétariat ainsi qu'une sécurité accrue au niveau de l'identification du malade et des échantillons :

a. Identification du malade

Plusieurs systèmes existent :

- on introduit dans l'ordinateur (visu, télétype..) les données concernant le malade (sexe, âge, service, etc...) et le type d'examen demandé. L'ordinateur affectera au prélèvement un numéro de travail qui l'identifiera sans erreur.
- on introduit une carte contenant ces mêmes données et fournie par le service d'accueil. Sur cette carte sont perforées ou cochées au crayon graphite les cases correspondant aux examens demandés. On évite ainsi une frappe intermédiaire et donc une source d'erreur.
- on introduit le numéro d'identification du patient et l'ordinateur du laboratoire extrait les données nécessaires dans le système informatique de l'hôpital.

b. Étiquetage des échantillons

L'ordinateur fournit :

- soit des étiquettes autocollantes, avec le numéro de travail et le code de l'examen demandé, étiquettes qui seront collées sur le tube correspondant ;
- soit une étiquette spéciale code barres, qui permettra l'identification positive directe de l'échantillon par l'automate.

c. Édition du Cahier Légal

Ce "cahier" regroupe tous les examens demandés au laboratoire et constitue, comme son nom l'indique, une obligation légale. Sous forme informatique, c'est évidemment un listing, qui peut être imprimé au fur et à mesure des entrées de demande (imprimante spécialement affectée à cette tâche) ou en une seule fois en fin de journée (pas d'imprimante spéciale).

d. Facturation automatique

Lorsque les résultats des examens demandés sont acquis par l'ordinateur, celui-ci peut lancer une facturation automatique utilisant les cotations de la nomenclature.

2. La gestion des analyses

Elle comporte plusieurs opérations :

- Edition des feuilles de travail. Chaque poste de travail du laboratoire se voit affecter une feuille récapitulative comportant le numéro des échantillons avec le ou les examens demandés, avec leur caractère éventuel d'urgence.

- Transmission directe des listes de travail aux automates connectés.
- Etude statistique des examens. Le listing du nombre de chaque examen effectué chaque jour permet de suivre l'évolution de la demande et facilite la gestion des stocks ou la détermination des nouveaux types d'appareil à acquérir.

3. L'édition des résultats

L'édition des résultats, sur papier à en-tête identifiant le laboratoire, peut-être immédiate ou différée, partielle ou définitive :

- immédiate : les résultats urgents pris en compte directement par j'ordinateur sont édités sur le champ au laboratoire même, ou imprimés à distance dans les service,s équipés d'une imprimante connectée (bloc opératoire à l'hôpital, par exemple). Les réseaux internet ou intranets ont évidemment considérablement amélioré ces procédures.

- différée : les résultats non urgents sont édités en fin de journée, ce qui permet de regrouper l'ensemble des résultats d'un même patient. Certaines options sont généralement proposées : édition partielle (alors que tous les résultats ne sont pas acquis) ; édition définitive ou récapitulative (quand tous les résultats ont été obtenus).

Les éditions sont sur papier, parfois en format très condensé pour l'archivage au laboratoire. La plupart des systèmes proposent une certaine aide biologique pour le destinataire :

- L'impression des valeurs limites du paramètre, en fonction du sous-ensemble auquel appartient le patient (âge et sexe en pratique) ;
- L'indication par un signe (étoile, astérisque) des valeurs anormales, facilitant la lecture du document.

Le développement et la généralisation de la micro-informatique et de la télématique ont bouleversé ce type traditionnel d'édition. Outre une consultation directe des résultats par les prescripteurs, grâce au minitel ou à un micro-ordinateur connecté, des systèmes sont en cours de développement pour réaliser automatiquement cette consultation et classer les résultats directement dans le fichier informatisé du malade au cabinet du médecin. Ces systèmes posent le problème de la confidentialité et du respect du secret médical, qui imposent sécurité et fiabilité des transmissions.

B. L'informatisation des taches techniques : l'acquisition et le traitement des résultats

L'informatique est une aide précieuse dans les dosages eux-mêmes. Ce point a déjà été abondamment développé lors de l'étude des appareils et des automates puisqu'il leur est de plus en plus intégré. A titre de rappel bref, on peut par exemple :

- valider des droites d'étalonnages par calcul de la régression linéaire ou non linéaire ;
- calculer automatiquement les valeurs des échantillons ;
- décider de la validité d'une valeur, couplée à une alarme en cas de refus :
 - linéarité d'une cinétique enzymatique ;
 - linéarité d'un plateau d'état constant en flux continu ;
 - forme anormale d'un pic d'absorption, absence de pic par bouchage, etc...
- décider de l'acceptabilité d'une valeur, par référence à des tables donnant des valeurs limites de vraisemblance d'un paramètre; génération de différents types d'alarmes ; mesures de cohérence interne entre différentes analyses ou pour la même analyse chez le même patient.

C. L'informatisation des taches biologiques

Ces procédés utilisent des systèmes experts fonctionnant en logique booléenne (structure de décision arborescente) ou en logique bayésienne (utilisant les probabilités). Les bases de données utilisées sont remplies par les résultats connus, chiffrés selon les méthodes vues précédemment.

1. La validation biologique

En routine, de très nombreux résultats sont parfaitement normaux. La vérification systématique par le biologiste de l'ensemble des résultats édités avant leur transmission au prescripteur est une tâche fastidieuse, qui n'élimine pas le risque d'erreur. Le développement de systèmes automatisés de validation biologique, utilisant des techniques déjà mentionnées (valeurs de référence, cohérence interne, delta check,...), permet de réduire l'examen approfondi aux dossiers réellement à problèmes.

2. Le diagnostic biologique informatisé et la prescription automatisée

Ce sont deux aspects complémentaires d'une même démarche :

- le diagnostic biologique est effectué à partir des résultats du patient, propose les hypothèses diagnostiques les plus probables et indique les analyses complémentaires les plus pertinentes ;
- la prescription automatisée part du tableau clinique pour proposer les examens biologiques les plus adaptés.

Ces outils peuvent se limiter à un aide-mémoire permettant l'exploitation rationnelle des investigations biologiques. A un niveau plus élaboré, par des algorithmes appropriés, ils peuvent aider à la mise en oeuvre des examens les plus pertinents, évitant la réalisation d'analyses redondantes non discriminantes.

Ces démarches ne peuvent être détachées de l'ensemble des données médicales et auront certainement un rôle à jouer dans la rationalisation de l'ensemble du système de santé. Ce domaine dépasse évidemment le cadre d'un laboratoire isolé et n'est concevable qu'à un échelon plus vaste. On n'en est encore qu'aux étapes expérimentales, mais ceci est d'ores et déjà possible avec le matériel existant.

D. Mise en oeuvre

Toutes les tâches évoquées dans les paragraphes précédents sont réalisables :

- soit par un système centralisé, utilisant un gros ordinateur multi-tâches. Historiquement, ce fut la première solution adoptée dans les gros laboratoires.
- soit de plus en plus, par un système décentralisé, utilisant des micro-ordinateurs aux postes de travail, connectés à une unité centrale de gestion. Cette dernière organisation permet une meilleure réponse aux situations dégradées. La réalisation de fichiers informatiques de plus en plus importants et les interconnexions télématiques possibles ont amené la CNIL (Commission nationale informatique et libertés) à se pencher sur ces problèmes pour sauvegarder la confidentialité et assurer la sécurité.

Conclusion générale

Ainsi, en dehors des techniques d'analyses proprement dites, un ensemble de procédures et de méthodologies sont disponibles pour le biologiste, afin d'atteindre et maintenir le meilleur niveau de qualité possible à un coût raisonnable. Un certain nombre de ces procédures sont réglementaires donc obligatoires. D'autres actuellement, s'imposeront peu à peu en pratique courante, pour un meilleur service rendu au malade et à la société...

Chapitre II

Principes des méthodes de dosage quantitatif

Seules les méthodes enzymatiques et immunologiques de dosage seront présentées. En effet, elles sont de plus en plus utilisées (figure I-1) ; de plus, les réactifs employés dans ces méthodes ne peuvent pas, la plupart du temps, être préparés au laboratoire, à la différence des réactifs purement chimiques plus simples. Il existe ainsi un important marché (pour les réactifs enzymatiques: de 2,8 milliards de dollars en 1984 pour l'Europe seule à près de 5 en 1990, soit une croissance de près de 80 % en 5 ans, sous forme de "kits" prêts à l'emploi, dont le choix et l'usage judicieux imposent une connaissance de leurs principes. De plus, cette connaissance est évidemment requise pour comprendre leur adaptation aux automates et les contraintes qu'ils imposent dans la conception des machines. La part des immunoanalyses dans le marché mondial des tests biologiques était de 36 % en 1987 (pour un marché global du réactif biologique de 7,1 milliards de \$). On estime qu'elle sera vers 41 % en 1995 (pour un marché global de 13,2 milliards de \$). Une partie seulement concerne la biochimie au sens strict, c'est l'immunochimie (pouvant représenter de 20 à 40 % des dosages immunologiques selon les définitions adoptées). Les réactifs de laboratoire ne sont pas soumis à une procédure d'agrément (pas d'AMM comme pour les médicaments, à la différence de ce qui se passe en Allemagne, et à l'exception des réactifs utilisant un marqueur radioactif) mais à une simple procédure d'enregistrement auprès du Laboratoire National de la Santé (décret du 8 septembre 1982 ; près de 20 000 réactifs sont répertoriés dans l'ordinateur du LNS, dont près de 4000 pour la biochimie et près de 1500 pour l'immunochimie). Cet enregistrement constitue d'une certaine manière un engagement de la part du fabricant sur les qualités et performances du réactif. Le dossier doit comporter les caractéristiques du réactif, les conditions de fabrication, les modalités de contrôle. Des contrôles a posteriori peuvent être réalisés en fonction des résultats aux contrôles de qualité ou des remarques des biologistes utilisateurs.

1. Méthodes enzymatiques

A. Les enzymes

Les enzymes sont des macromolécules protéiniques jouant le rôle de catalyseurs biologiques. Ils possèdent donc toutes les propriétés des catalyseurs. Les protéines sont des chaînes de briques de base, appelées acides aminés souvent arrangées dans l'espace sous une forme globulaire (d'où parfois le nom de globulines) et avec un poids moléculaire très variable selon le nombre d'acides aminés, supérieur en général à 10 000 daltons.

1. Action sur la vitesse de la réaction

Les enzymes augmentent la vitesse de la réaction.

Aux débuts de l'enzymologie, les unités utilisées pour exprimer cette vitesse prenaient le nom de l'auteur qui avait décrit la méthode de dosage. La vitesse étant exprimée comme la quantité de matière modifiée ou produite par l'enzyme et par unité de temps, les unités sont maintenant parfaitement standardisées. L'emploi du système international (SI), dérivé du système MKSA, est désormais obligatoire :

- l'unité de quantité de matière n'est plus le g ou le mg mais la mole et ses sous-multiples, sauf dans les cas où il s'agit d'une famille de molécules différentes (cas des protéines).
- l'unité de temps est la seconde.

En biochimie clinique, la vitesse est standardisée par unité de volume de l'échantillon : cette unité devrait être le m^3 , mais c'est le litre qui a été retenu, car plus proche de la réalité physiologique !

L'activité des enzymes est alors définie par une unité catalytique, le Katal (Kat) représentant la quantité d'enzyme transformant une mole de substrat par seconde. C'est une unité énorme et on emploie habituellement le nanokatal (nKat) ou le microkatal (μ Kat). Cette définition doit remplacer l'ancienne unité

internationale (correspondant à la quantité d'enzyme transformant une micromole de substrat par minute. Cette ancienne unité internationale est maintenant notée U pour éviter la confusion avec l'unité du système international actuel notée UI. Il existe bien évidemment une relation entre les deux unités :

$$1 \text{ U} = 16,67 \text{ nkatal}$$

La mesure d'une grandeur physique quelconque directement liée à la quantité de substrat ou de produit de la réaction enzymatique donne accès à la vitesse de la réaction. En pratique, ce sont essentiellement des mesures spectrophotométriques ; mais d'autres mesures sont utilisables (radioactivité, pH,...).

2. Les autres propriétés des enzymes

Comme tous les catalyseurs, les enzymes

- agissent à faible dose
- sont retrouvés intact à la fin de la réaction. Cependant, les enzymes sont fragiles et on doit faire attention à la dénaturation par la chaleur et à la dégradation par les bactéries. Même conservés au froid, ils présentent une perte d'activité par dénaturation progressive ("vieillesse").
- ne rendent pas possible une réaction impossible selon les lois de la thermodynamique.
- ne modifient pas la constante d'équilibre de la réaction.
- agissent en diminuant l'énergie d'activation nécessaire à la réaction.

Le grand avantage des enzymes repose sur leur spécificité, de réaction catalysée, de substrat S utilisé et donc de produit P formé. En ce qui concerne le substrat, la spécificité est soit très étroite (une seule structure chimique possible) ou plus large (plusieurs molécules présentant des analogies de structure).

Ils nécessitent souvent pour fonctionner la présence d'une petite molécule, le coenzyme, (appelé cosubstrat ou groupement prosthétique selon qu'il est faiblement ou fortement lié à l'enzyme). Cette petite molécule facilite simplement la réaction, alors que l'apoenzyme (partie protéinique) est responsable de la spécificité (nature du substrat modifié et type de réaction catalysée). Pour fournir une analogie : l'enzyme est l'ouvrier et le coenzyme l'outil.

3. Nomenclature des enzymes

Devant l'augmentation rapide et considérable du nombre d'enzymes caractérisées (plusieurs milliers voire dizaines de milliers), il était indispensable de disposer d'un système clair et simple, permettant de nommer sans ambiguïté toute enzyme existante ou à venir. Une commission internationale (EC : enzyme Commission), issue de l'International Union of Biochemistry (IUB) et mise en place en 1955, a proposé en 1961 une nomenclature systématique répartissant les enzymes en 6 classes, selon le type de réaction qu'elles effectuent (Figure II-1). Les classes sont elles-mêmes divisées en sous-classe et sous-sous-classes numérotées selon la nature des substrats, des groupes chimiques ou des types de liaison qui interviennent dans la réaction ; enfin, chaque enzyme est affectée d'un numéro d'ordre dans la sous-sous-classe. A côté de son nom systématique, l'enzyme est ainsi identifiée par un code à 4 chiffres :

E.C. n° classe. n° sous-classe. n° sous-sous classe. n° d'ordre

Ce système est géré sur ordinateur au National Institute of Health (NIH) aux USA, réactualisé en permanence, et publié périodiquement en version papier. Cette nomenclature est employée dans les publications scientifiques. Dans la vie courante d'un laboratoire, pour des raisons évidentes de commodité, c'est le nom commun de l'enzyme, ou même simplement ses initiales (ou acronyme), qui est utilisé.

Ainsi la créatine kinase (CK) ou créatine phosphokinase (CPK) a pour nom systématique ATP : créatine N-phosphotransférase ;

- l'ATP et la créatine sont les substrats donneurs et accepteurs respectivement, séparés par un double point.
- transférase: la réaction catalysée est une réaction de transfert (classe 2)
- phospho : le groupement chimique transféré sur l'accepteur est un groupe phosphate (sous-classe 7)
- N : le groupement chimique accepteur du phosphate est une fonction azotée (sous-sous classe 3)

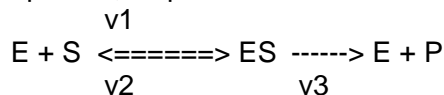
Le numéro d'ordre de la CPK étant 2 dans cette sous-sous-classe, le numéro de code est ainsi: E.C. 2.7.3.2.

Classe	Fonction	Sous-classe	Sous-sous-classe
1	Oxydoréductase	groupe donneur d'électrons 1. -CHOH 2. -CHO ou -C=O 3. -CH-CH- 4 - 17.....	groupe accepteur d'électrons 1. NAD-NADP 2. cytochrome 3. oxygène 4. autre accepteur 1,2,3,4,7 1,2,3,7 1....
2.	Transférase	1. de groupe monocarboné 2. d'aldéhyde ou cétone 3. d'acyles..... 4 - 8.....	1. groupe méthyle 2. groupe hydroxyméthyle 3. groupe carboxyle 1 - 2 1.....
3.	Hydrolase	1. coupant les esters 2. coupant les glycosyles 3 - 11.....	1. carboxyliques 2. thioesters 3. esters phosphoriques 4..... 1 - 3
4.	Lyase	1 - 4.....	1.....
5.	Isomérase	1 - 5.....	1.....
6.	Ligase	1 - 5.....	1.....

Figure II-1. Principe de la nomenclature systématique des enzymes.

B. Equations de la cinétique enzymatique

Les notions proposées par Michaelis et Menten au début du XXème siècle pour une enzyme monomérique à un seul substrat et un seul produit restent toujours valables, bien que les enzymes auxquelles elles puissent réellement s'appliquer soient peu nombreuses. Schématiquement, en représentant l'enzyme par E, le substrat par S et le complexe formé par l'association entre l'enzyme et le substrat par ES, l'équation d'une réaction enzymatique peut s'écrire:



Les équations de vitesse de ces trois réactions s'écrivent par rapport aux concentrations des substrats:

$$\begin{aligned} v1 &= k1 [E][S] \\ v2 &= k2 [E][S] \\ v3 &= k3 [ES] \end{aligned}$$

Lorsque la phase stationnaire est atteinte, la vitesse est constante, ce qui correspond à l'égalité :

$$\begin{aligned} v1 - v2 &= v3 \\ \text{soit } [E][S] / [ES] &= k2 + k3 / k1 = K_M \end{aligned}$$

La constante K_M est la constante de dissociation du complexe enzyme substrat, appelée constante de Michaelis. Elle traduit l'affinité de l'enzyme pour son substrat. K_M est d'autant plus grand que l'affinité est plus faible (prédominance des formes non associées E et S par rapport à la forme associée ES) et inversement. K_M a la grandeur d'une concentration et est exprimée en mole (ou sous-multiple) par litre.

La concentration du complexe ES n'est pas mesurable et les équations précédentes ne sont pas utilisables en pratique. D'autres transformations de l'équation sont nécessaires.

Si [ET] est la concentration totale de l'enzyme dans le système, la concentration d'enzyme libre est :

$$[E] = [ET] - [ES]$$

En reportant cette valeur dans l'équation du K_M , on arrivera, après différentes transformations simples, à l'équation suivante:

$$[ES] = [ET] [S] / K_M + [S]$$

Or la vitesse apparente de la réaction enzymatique, celle qu'on mesure en pratique, est

$$v = v_3 = k_3 [ES]$$

$$\text{soit } v = k_3 [ET] [S] / K_M + [S]$$

La vitesse est maximale (V_m) lorsque tout l'enzyme est sous forme de complexe enzyme – substrat.

On a alors :

$$V_m = k_3 (ET)$$

Finalement, l'équation de la vitesse devient :

$$v = V_m [S] / K_M + [S]$$

Cette équation fondamentale s'appelle équation de Michaelis-Menten. A partir de cette équation, il est facile de vérifier que K_M est la concentration de substrat correspondant à la moitié de la vitesse maximum (figure II-2). Cette représentation en coordonnées directes permet une détermination graphique du K_M . Cependant, la vitesse maximale est souvent difficilement appréciable, et d'autres transformations graphiques doivent être appliquées pour réaliser la détermination du K_M , par exemple en prenant les inverses de chaque membre de l'équation et en traçant $1/v$ en fonction de $1/[S]$. K_M n'est pas modifié si on change la concentration de l'enzyme : c'est une grandeur caractéristique de l'enzyme pour ce substrat. La mesure de cette constante pour les différents substrats possibles d'une enzyme permet de quantifier sa spécificité.

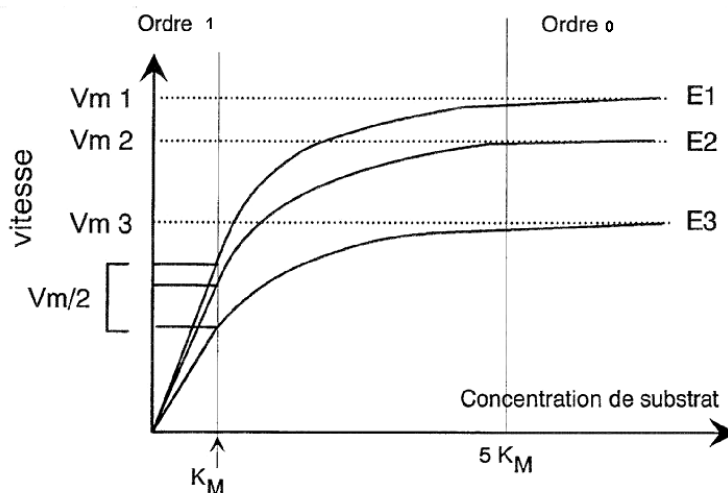


Figure II-2. Représentation en coordonnées directes de la vitesse de la réaction enzymatique en fonction de la concentration de substrat.

E1, E2 et E3 représentent trois concentrations de l'enzyme.

C. les ordres de la réaction enzymatique

Schématiquement, et sans rentrer dans des détails ardu de cinétique enzymatique, l'ordre d'une réaction traduit la dépendance de la vitesse de cette réaction par rapport à certains facteurs, notamment le temps et la concentration des substrats. L'ordre d'une réaction est exprimé par un nombre réel, mais les seuls ordres facilement exploitables sont l'ordre zéro ou nul (pas d'effet du facteur) et l'ordre 1 (effet direct du facteur, proportionnel).

1. L'ordre par rapport au temps

Si on porte la variation de la quantité de produit formée (se traduisant par exemple par une variation de densité optique) en fonction du temps, on obtient la figure II-3. La pente de la courbe en chaque point est la vitesse en ce point.

Après une éventuelle phase de latence (1), la quantité croît linéairement avec le temps (2) : la vitesse est constante et maximale dans les conditions opératoires utilisées, donc indépendante du temps (ordre 0), mais dépendante de la quantité d'enzyme et/ou de substrat (ordre 1 par rapport au substrat, voir ci-dessous) ; c'est la phase stationnaire de la réaction. Dans la phase (3), on est en ordre 1 par rapport au temps puisque la vitesse se modifie en fonction du temps : elle diminue puis devient nulle lorsqu'on a atteint le point final de la réaction.

2. Ordre par rapport à la concentration de substrat

L'étude de l'ordre de la réaction par rapport aux concentrations de substrat impose de mesurer la vitesse en cinétique d'ordre nul par rapport au temps, c'est à dire pendant la phase stationnaire de la réaction. Dans ces conditions, les courbes de la figure II-2 présentent deux zones très différentes :

- la zone du plateau, où la vitesse est indépendante de la concentration en substrat (ordre nul par rapport aux concentrations) : la vitesse dépend uniquement de la concentration d'enzyme et la concentration de substrat est appelée « concentration saturante ».
- la zone où la vitesse augmente en fonction de la concentration en substrat, de manière linéaire d'abord (ordre 1) puis de manière non linéaire.

C. Principe des dosages

Les principes précédents expliquent que les conditions expérimentales doivent être différentes et précises pour mesurer de manière valide une concentration de substrat ou estimer la quantité d'une enzyme par la mesure de son activité.

1. Dosage d'une enzyme

a. Aspects théoriques

On peut doser la quantité d'enzyme présente dans un milieu en mesurant son activité à condition que cette activité ne dépende que de la quantité d'enzyme : il faut se placer en conditions d'ordre nul par rapport aux concentrations de substrat et par rapport au temps :

- par rapport aux concentrations : dans l'équation de Michaëlis-Menten, si on prend $[S]$ grand par rapport à K_M (soit en pratique $[S] > 5 \text{ à } 10 K_M$), $K_M + [S]$ est peu différent de $[S]$ et l'équation de Michaelis-Menten se simplifie :

$$v = V_m [S] / [S] = V_m$$

La vitesse est maximale et dépend uniquement de la quantité d'enzyme : $V_m = a.[E]$

- par rapport au temps : l'ordre 0 signifie que la vitesse est indépendante du temps, donc constante, ou en pratique, que la grandeur que l'on mesure croît ou décroît de manière linéaire avec le temps.

b. Aspects pratiques

Plusieurs solutions sont possibles et existent sur les automates :

- méthodes en temps fixé : détermination de la quantité de produit formée après un certain temps de réaction fixe, prédéterminé comme étant dans la partie linéaire (zone 2) de la courbe de la figure II-3, au moins pour la plupart des valeurs mesurées en pathologie courante. C'est ce qui se passe par exemple en flux continu. On n'a aucun renseignement sur la manière dont se déroule la réaction et on n'a jamais la certitude d'être dans la bonne partie de la courbe. L'addition d'un deuxième point de mesure (généralement un temps zéro) permet d'éliminer certaines erreurs grossières dues à des anomalies de l'échantillon, mais ne lève pas l'incertitude.

- méthodes cinétiques : ce sont les plus satisfaisantes, car elles permettent le contrôle de linéarité de la réaction. Deux réalisations sont concevables :

+ l'enregistrement en continu de la cinétique donne un contrôle direct, visuel, de la linéarité de la réaction et permet un calcul de la vitesse par la mesure de la pente de la droite. Cette méthode est relativement longue et réservée en pratique aux dosages manuels.

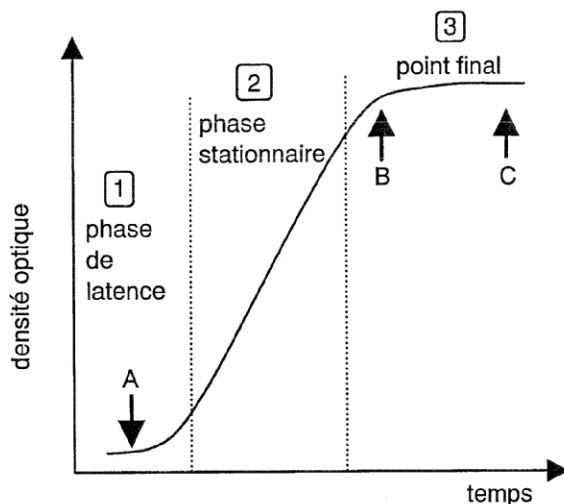


Figure II-3. Les phases de la réaction.

Enregistrement en continu d'une cinétique enzymatique. Après une phase de latence (1), la vitesse est constante pendant la phase stationnaire où on peut mesurer la quantité d'enzyme. Au plateau (3), il est possible de mesurer la concentration de substrat.

+ la mesure de nombreux points, rendue possible par l'utilisation des composants électroniques modernes. Une droite est calculée à partir de toutes les mesures. Si les données de base (valeurs effectivement mesurées) ne sont pas accessibles, il est important que celles-ci soient contrôlées par l'appareil dans deux domaines :

- le contrôle de la linéarité : le résultat est rejeté si le coefficient de corrélation de la droite calculée par régression linéaire est inférieur à un seuil.

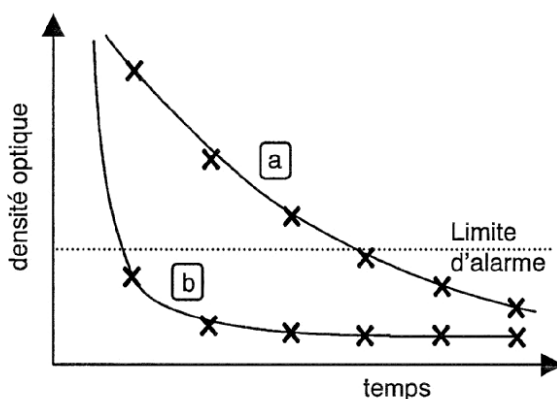


Figure II-4. Gestion automatisée du contrôle de la linéarité et de la déplétion en substrat.

En (a), la linéarité est mauvaise et la mesure est rejetée. En (b), la linéarité est acceptable, mais la zone dans laquelle s'effectue la mesure est inférieure à une limite préétablie et traduit un épuisement en substrat de la réaction.

- le contrôle de la déplétion en substrat (figure II-4) : lorsque l'enzyme est en quantité très importante, le substrat peut-être pratiquement entièrement consommé avant même le début de la

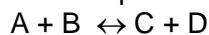
mesure. Celle-ci est alors effectuée dans la partie asymptotique de la courbe, donnant à tort un taux faible, avec des conséquences médicales pouvant être graves. Dans ces cas, soit la linéarité est mauvaise et le dosage rejeté (II-4a), soit la linéarité est bonne, mais la mesure est effectuée dans une zone de densité optique inhabituelle (trop forte ou trop faible selon le cas) par rapport à celle généralement mesurée pour les sérums (II-4b). La mémorisation de zones de DO correctes et le contrôle sur ces valeurs permet d'éviter de telles erreurs, en générant des messages d'alerte.

2. Dosage des substrats

En ajoutant à l'échantillon une quantité fixe et connue de l'enzyme spécifique d'un substrat, on peut déterminer la concentration de ce substrat soit par une méthode en point final soit par une méthode cinétique. Selon le K_M de l'enzyme, l'une ou l'autre méthode peut être plus appropriée. Les méthodes de dosages purement chimiques utilisent d'ailleurs les mêmes principes généraux.

a. Méthode en point final:

On attend le temps nécessaire pour que la réaction enzymatique soit terminée: la mesure au niveau du plateau (figure II-3, zone 3) donne la valeur de la concentration en substrat par comparaison avec une droite d'étalonnage. Si le K_M est faible (grande affinité) ce plateau est vite atteint. La méthode convient bien aux enzymes irréversibles, dont l'équilibre est spontanément très en faveur des produits de la réaction et non des substrats. Mais beaucoup de réactions enzymatiques sont réversibles et aboutissent en fait à un état d'équilibre où substrats et produits sont dans un rapport de concentration caractéristique de l'enzyme, appelé constante d'équilibre. Le problème est alors de déplacer cet équilibre afin de doser la totalité du substrat présent, en utilisant différents artifices techniques. Ces artifices portent sur la concentration des produits de part et d'autre de la flèche de l'équation de la réaction et utilisent les propriétés des réactions équilibrées : toute perturbation de l'un des éléments de la réaction fait évoluer la réaction pour que la valeur de la constante d'équilibre soit respectée. Par exemple, pour une réaction à deux substrats et deux produits servant au dosage du composé A :



On déplace l'équilibre:

- soit par augmentation de la concentration du réactif B, qui sera en large excès. On fait ainsi passer la réaction de l'ordre 2 (dépendant de la concentration des 2 substrats A et B) à l'ordre 1 (dépendant de la concentration du seul substrat à mesurer A) ;

- soit par élimination de l'un ou l'autre des produits de la réaction au fur et à mesure qu'il apparaît par différentes méthodes : chimique (combinaison avec un colorant ou un réactif chimique) ; enzymatique (utilisation de C ou D comme substrat d'une réaction enzymatique couplée) ; "mécanique" (passage à travers une membrane de dialyse, comme en flux continu).

Si l'appareil peut mesurer plusieurs points au cours de la réaction, un contrôle automatique du point final est possible (figure 11-3). La différence de DO entre le plateau (temps fixé B) et le point A (temps 0) doit se trouver entre certaines limites dépendant de la gamme de linéarité du dosage ; en outre, la différence de DO entre les deux points mesurés B et C du plateau théorique doit être inférieure à une certaine valeur (sinon, il y a une alerte indiquant que la réaction n'est pas terminée et donc que la concentration dépasse la gamme de linéarité du dosage).

b. Méthode cinétique

Comme pour le dosage d'enzyme, on fait une approximation sur l'équation de Michaëlis. On considère que pour les faibles concentrations de substrat (en pratique si $[S]$ est inférieur ou égal à $0,1 K_M$), $[S]$ est négligeable devant K_M et l'équation de vitesse se simplifie:

$$v = (V_m / K_M) \cdot [S]$$

V_m et K_M étant des constantes caractéristiques de l'enzyme ajoutée, la vitesse ne dépend que de la concentration en substrat (ordre 1 par rapport à la concentration du substrat). La méthode est très performante pour des enzymes à K_M élevé (affinité faible). Si le K_M est trop faible, il est possible de l'augmenter en ajoutant un inhibiteur compétitif, se fixant au même site que le substrat. La nouvelle constante K'_M dépend de la concentration de l'inhibiteur $[i]$ et de l'affinité K_i de cet inhibiteur pour l'enzyme :

$$K'_M = K_M (1 + [i] / K_i)$$

On compare alors la vitesse de la réaction obtenue pour l'échantillon à celle obtenue pour un étalon de concentration connue traité dans les mêmes conditions. On a :

$$[S]_{\text{échantillon}} = V_{\text{échantillon}} \times [S]_{\text{étalon}} / V_{\text{étalon}}$$

Cependant, lorsque la concentration de substrat est faible (on est en excès d'enzyme par rapport au substrat), très souvent la cinétique n'est plus linéaire. On fait l'approximation qu'entre deux temps assez rapprochés (jusqu'à quelques minutes), cette portion de courbe est une droite. Ceci est représenté dans la figure II-5. Là encore, un contrôle de validité peut être effectué en mesurant des points supplémentaires: la différence entre $\Delta 1$ et $\Delta 2$ (éventuellement modifiée par un facteur) doit être inférieure à un seuil d'alerte prédéfini. Il n'est pas nécessaire de réaliser des "blancs échantillon" : l'absorbance non spécifique ne variant pas au cours de la réaction, elle est automatiquement soustraite.

Les résultats sont obtenus plus rapidement qu'avec une méthode en point final. Seuls les appareils ou automates permettant la mesure de plusieurs points au cours de la réaction sont adaptables à cette méthodologie.

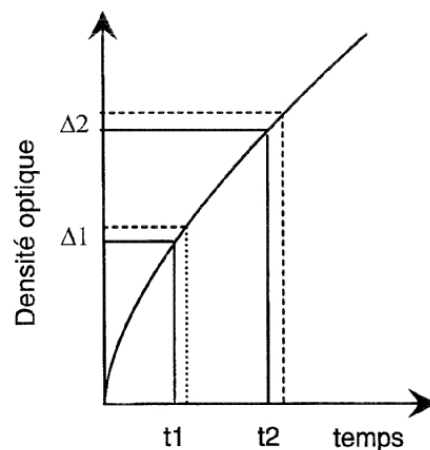


Figure II-5. Mesure cinétique de la concentration en substrat.

La différence de densité optique aux temps t1 et t2 est utilisée. Les petites variations de DO 1 et 2 entre des temps proches de t1 et t2 ajoute une sécurité supplémentaire à la mesure.

D. L'optimisation des dosages

L'optimisation des dosages consiste à déterminer les conditions optimales de réalisation pour l'ensemble des facteurs influençant le dosage (figure II-6). L'emploi de méthodes optimisées (quand elles existent) est recommandé par les sociétés savantes. L'optimisation d'une méthode est un travail long et fastidieux, réalisé par approximations successives en ne faisant varier qu'un paramètre à la fois. Ceci explique que seules les méthodes les plus utilisées soient actuellement optimisées et que lorsque les recommandations nationales manquent, les fabricants proposent des réactifs optimisés selon d'autres Sociétés (DGKC notamment).

Un certain nombre d'appareils anciens ne sont pas adaptables ou difficilement adaptables aux méthodes optimisées, surtout à cause des densités optiques trop importantes des milieux réactionnels.

1. Choix du substrat et de sa concentration

Le choix du substrat ne concerne évidemment que les dosages d'enzymes. La spécificité d'une enzyme n'est pas absolue et il n'est pas toujours facile de doser le substrat naturel de l'enzyme. Pour de nombreuses enzymes, on utilise des substrats non physiologiques synthétiques, présentant plusieurs avantages :

- bien définis et purifiés, souvent moins chers que le substrat naturel
- surtout, présentant lors de la réaction des changements de propriétés, rendant facile son dosage, notamment changement du coefficient d'absorption moléculaire ϵ (apparition ou disparition de coloration ou d'absorption UV)
- le choix de la concentration est souvent un compromis entre l'exigence scientifique (concentration saturante pour être en ordre nul), l'exigence pratique (lecture de densité optique possible) et le coût (largeur de la zone de linéarité, évitant la répétition des dosages après dilution).

2. Le pH

Il n'y a pas de règle fixe et la détermination du pH optimum doit être réalisée. Dans un système de dosage multienzymatique (réactions couplées ou twin-tests), on est obligé de trouver le meilleur compromis expérimental.

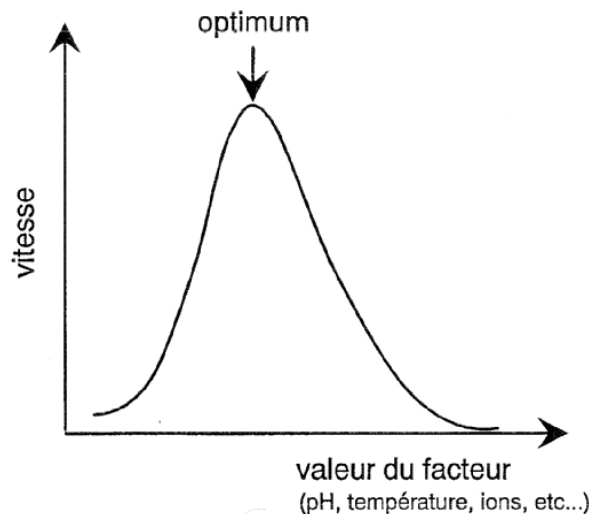


Figure II-6. Optimisation d'une réaction.

Tous les facteurs susceptibles d'intervenir dans la réaction sont étudiés afin de déterminer la valeur de chacun nécessaire pour atteindre la vitesse maximale de la réaction.

3. La température

L'augmentation de température accélère la vitesse de la réaction jusqu'à un certain point, appelé température optimale de l'enzyme. Le phénomène est compensé par l'augmentation de la dénaturation de l'enzyme, évidente lorsqu'on est au-delà de la température optimale, favorisée en outre par des durées d'incubation longues.

La température choisie n'a pas d'influence sur le résultat pour un dosage de substrat, si les étalonnages sont faits à la même température ; une température élevée accélère la vitesse et permet souvent d'obtenir un résultat plus rapide. Par contre le résultat varie avec la température pour les dosages d'enzymes : d'un point de vue médical, dans le suivi de l'évolution d'un patient, on ne peut comparer valablement des valeurs que si elles ont été obtenues à la même température de dosage. En pratique, si la température n'est pas indiquée sur la feuille de résultat, on ne peut comparer que des valeurs provenant du même laboratoire. Des coefficients de conversion des résultats en fonction de la température ont été déterminés expérimentalement pour les enzymes courantes.

Pour des raisons pratiques d'appareillage, il n'est pas possible de doser chaque enzyme à sa température optimum. Trois températures étaient couramment utilisées 25, 30 et 37° C, qui ont toutes les 3 des avantages et des inconvénients. Le choix de la SFBC s'était porté sur la température de 30° C qui réalise un bon compromis entre différentes exigences (activité enzymatique, équilibre avec la température ambiante, évaporation...). Cependant, actuellement, l'évolution technologique des systèmes

et des réactifs fait préférer la température de 37° C, adoptée par la plupart des fabricants étrangers de ces appareils¹.

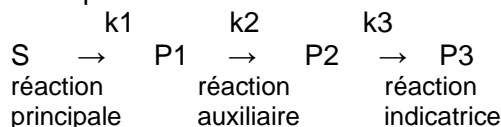
La précision (stabilité dans le temps) de la température est aussi importante que son exactitude. On admet que la régulation doit se faire à 0,1° C en plus ou moins, ce à quoi arrive la plupart des appareils modernes. En effet, selon l'enzyme étudiée et la forme plus ou moins pointue de sa courbe de température $v = f(T)$, l'erreur peut aller jusqu'à 8 à 10 % par degré. Lors d'une évaluation déjà ancienne (1978), l'erreur sur le résultat final attribuable à la thermostatisation a été trouvée inférieure à 1,6 % pour une vingtaine d'appareils différents.

E. Le problème des réactions couplées

1. Aspects théoriques

Lorsque le produit d'une réaction enzymatique est difficilement accessible à la mesure, on utilise une ou plusieurs réactions enzymatiques complémentaires, couplée les unes aux autres. La dernière doit faire intervenir un produit final facilement mesurable. Pour obtenir des valeurs exactes sur l'activité enzymatique que l'on étudie ou le substrat dosé, il faut que le paramètre à mesurer soit le seul facteur limitant de l'ensemble de réactions. L'optimisation doit également déterminer ces conditions.

Schématiquement :



Pour deux réactions couplées (principale et indicatrice), si k_1 est la constante de vitesse de la réaction que l'on veut mesurer, avec $k_1/k_2 = 1/1000$, le résultat s'écarte à peine de celui que l'on veut mesurer. Si on prend $1/100$, le résultat sera 96 % de celui que l'on veut mesurer. Si on utilise une troisième réaction (auxiliaire), les conditions optimales sont encore plus difficiles à déterminer. On admet qu'un excès 1000 fois supérieur de la dernière enzyme de la chaîne par rapport à la première donne des résultats satisfaisants en pratique. Mais chaque enzyme ayant ses propres paramètres optimaux, le compromis retenu peut conduire à des valeurs très différentes de cette valeur théorique.

De telles méthodes peuvent être conçues et présentées en mono réactif (tous les éléments sont ajoutés en même temps à l'échantillon), ou en réactifs fractionnés (ajoutés successivement à l'échantillon avec des délais variables : bi-réactif, tri-réactif,...). L'automatisation est bien évidemment d'autant plus facile que le réactif est moins fractionné.

2. Applications pratiques

Les systèmes couplés sont généralement conçus pour aboutir à des réactions indicatrices bien connues et optimisées, dont les composants sont à un coût raisonnable étant donné leur grande diffusion. Dans ce domaine, l'utilisation des coenzymes pyridiniques ou des peroxydases est très générale:

a. Coenzymes nicotiniques

Ces coenzymes sont le nicotinamide adénine dinucléotide (NAD) et sa forme phosphorylée (NADP) qui interviennent dans le fonctionnement de nombreuses déshydrogénases. Ils existent sous une forme oxydée (NAD⁺ et NADP⁺) ou sous une forme réduite (NADH, NADPH). L'intérêt de ces coenzymes provient du fait que les spectres dans l'ultraviolet des formes oxydées et réduites sont très différents (figure II-7). En suivant la variation de DO à 340 nm, on mesure l'apparition ou la disparition de la forme réduite. En pratique, on utilise également 334 ou 365 nm, qui correspondent à des raies d'émission des lampes à vapeur de mercure. Des exemples d'application sont donnés dans la figure II-8. Une étape supplémentaire permet de réaliser une lecture colorimétrique en lumière visible ; le dosage est alors réalisable sur les appareils les plus simples, sans lampe UV.

¹ Information Scientifique du Biologiste 16 (1990) 7-10.

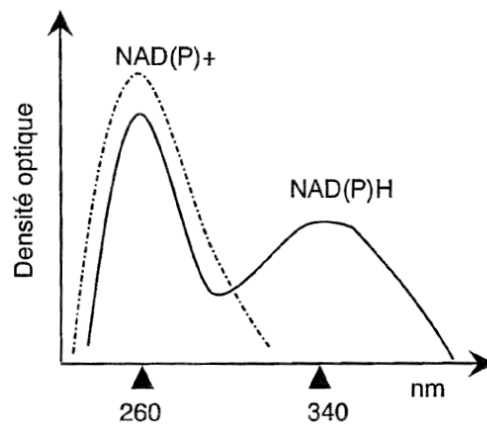


Figure II-7. Spectres d'absorption dans l'ultraviolet des formes oxydées (NAD(P)) et réduites (NAD(P)H) des coenzymes nicotiniques.

<p>LACTATE DESHYDROGENASE (LDH) * réaction directe $\text{L-lactate} + \text{NAD} \rightleftharpoons \text{pyruvate} + \text{NADH}$</p>
<p>TRANSAMINASE GLUTAMIQUE - PYRUVIQUE * réaction principale $\text{L-alanine} + \alpha\text{-c\acute{e}to-glutarate} \rightleftharpoons \text{L-glutamate} + \text{pyruvate}$ * réaction couplée indicatrice : LDH</p>
<p>CREATINE PHOSPHO-KINASE * réaction principale $\text{Cr\acute{e}atine} + \text{ATP} \rightleftharpoons \text{cr\acute{e}atine-phosphate} + \text{ADP}$ * réaction couplée auxiliaire $\text{ADP} + \text{phosphoenolpyruvate} \rightleftharpoons \text{pyruvate} + \text{ATP}$ * réaction couplée indicatrice par la LDH $\text{Pyruvate} + \text{NADH} \rightleftharpoons \text{lactate} + \text{NAD}$ * réaction révélatrice colorée $\text{Bleu de t\acute{e}razolium} + \text{NADH} \xrightarrow{\text{diaphorase}} \text{formazan color\acute{e}}$</p>

Figure II-8. Exemples de réactions couplées fréquemment utilisées en biochimie médicale.

LDH, TGP et CPK sont des enzymes très fréquemment dosées en pratique médicale courante.

b. les peroxydases

Ces enzymes sont surtout utilisées dans les réactions indicatrices des dosages de substrat. A l'inverse des réactions enzymatiques où l'on utilise des déshydrogénases à NAD, on emploie ici diverses peroxydases qui oxydent le substrat en produisant de l' H_2O_2 (peroxyde d'hydrogène ou eau oxygénée). L'eau oxygénée est ensuite dégradée par une peroxydase, selon divers protocoles, conduisant à un produit coloré (figure II-9). Ces types de réactions utilisant les peroxydases sont employés dans des conditions voisines dans certaines méthodes immunoenzymatiques.

PEROXYDASES	
Méthode de Trinder	$2 \text{H}_2\text{O}_2 + \text{amino-4-phénazone} + \text{phénol} \xrightarrow{\text{peroxydase}} (\text{monoimino-benzoquinone})\text{-4 phénazone} + 4 \text{H}_2\text{O}$
Méthode de Hantzsch	$\text{H}_2\text{O}_2 + \text{CH}_3\text{OH} \xrightarrow{\text{catalase}} \text{HCHO} + \text{H}_2\text{O}$ $\text{HCHO} + 2 \text{acétylacétone} + \text{NH}_3 \xrightarrow{\quad\quad\quad} \text{dihydro 1,4 lutidine} + 3 \text{H}_2\text{O}$

Figure II-9. Réactions révélatrices utilisant les peroxydases.

H. les développements récents

Les progrès des méthodes enzymatiques se sont dirigés vers une amélioration de la fiabilité et de la praticabilité pour les méthodes de routine ou vers une augmentation de la sensibilité pour des méthodes plus sophistiquées.

1. Tests doubles

En combinant différentes méthodes, on peut parvenir à réaliser simultanément le dosage de deux enzymes ou deux substrats différents dans une seule cuvette réactionnelle (tests doubles ou twin-tests). Cette technique permet un gain de temps pour des dosages d'enzymes ou de substrats souvent demandés ensemble. Elle impose un compromis sur le choix du pH du tampon réactionnel. Elle rend nécessaire un appareillage autorisant des mesures simultanées au moins en bichromatisme, mais elle rend plus difficile la correction des interférences.

2. Enzymes immobilisées

L'utilisation d'enzymes solubles dans le milieu aqueux réactionnel représente un gaspillage d'une matière première précieuse et chère. De nombreuses recherches sont effectuées pour réutiliser cette matière première. Le procédé le plus simple consiste à les "immobiliser" sur un support solide: membrane ou gel. Le développement le plus intéressant en matière d'analyse est celui des électrodes à enzyme, dont le principe sera développé dans le chapitre IV.

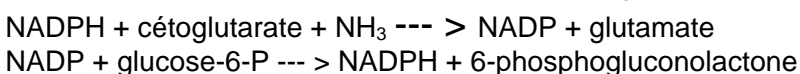
3. L'amplification enzymatique

Proposée par Lowry et Passonneau en 1972, cette méthode permet de doser des quantités très faibles de substrats, grâce à plusieurs enzymes travaillant en cycle fermé à partir du produit de la réaction primaire qu'on cherche à quantifier. L'amplification ainsi obtenue permet de doser des quantités de l'ordre de la picomole et dans certaines conditions de la femtomole. On utilise là aussi les coenzymes pyridiniques.

Le dosage est réalisé en trois étapes (figure II-10) :

- la première étape est spécifique du dosage à réaliser. On utilise un système qui produit du NADH ou du NADPH sous l'action de l'enzyme. Les conditions de cette réaction sont similaires à celles décrites dans les paragraphes précédents. A la fin du temps d'incubation, on détruit le NAD ou le NADP non utilisé par chauffage en milieu alcalin (pH 12, 4 mn, 60° C), ce qui arrête aussi la réaction.

- la deuxième étape réalise un cycle utilisant le NADH ou le NADPH formé précédemment. En 1 h à 37° C, on peut réaliser jusqu'à 10.000 tours de cycle. On doit fournir au milieu les enzymes E1 et E2 et les substrats S1 et S2. Si la concentration de NADH ou NADPH est inférieure aux K_M de E1 et E2, l'amplification est proportionnelle à cette concentration. Cependant, les conditions d'optimisation sont encore plus délicates à maîtriser que dans les dosages enzymatiques courants. Exemple de cycle :



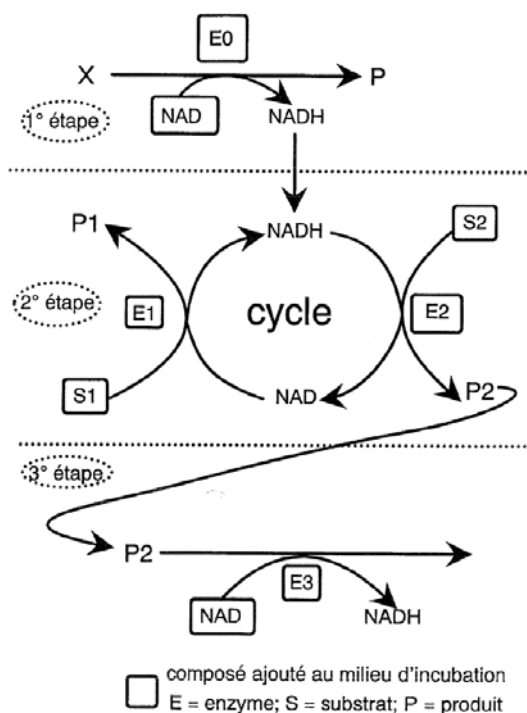
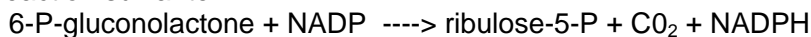


Figure II-10. Les trois étapes des méthodes de dosage avec amplification enzymatique.

- pour passer à la troisième étape, le cycle est arrêté par passage du milieu d'incubation à 100° C pendant 5 mn par exemple, puis le produit P1 ou P2 est révélé par une nouvelle réaction enzymatique utilisant la fluorescence du NAD(P)H. Par exemple, la 6-phosphogluconolactone accumulée est révélée par la réaction suivante :



De nombreux autres couples d'enzymes sont actuellement utilisables et disponibles commercialement. La technique est utilisable en amplification des méthodes immunoenzymatiques. Elle est réservée plutôt à la recherche du fait de sa complexité, mais une méthode commerciale a été proposée en biochimie clinique pour le dosage de l'estradiol. En recherche, cette technique permet de réaliser des dosages sur quelques microlitres de milieu : le problème de l'évaporation est résolu par la réalisation de l'incubation à l'intérieur d'une gouttelette d'huile minérale légère (60 %) et d'hexadécane.

4. La luminescence

A la différence de la fluorescence et de la phosphorescence, où les molécules qui émettent un photon sont excitées par une radiation électromagnétique, l'émission d'un photon en luminescence trouve l'énergie nécessaire dans une réaction chimique (chimiluminescence) ou enzymatique (bioluminescence). Le corps luminescent (ou luminophore) n'est pas forcément fluorescent ou phosphorescent.

Bien que plus de trois mille molécules soient dosables par ces méthodologies, leur développement en routine est encore assez modeste. En outre, il est nécessaire de disposer d'un appareillage adapté, le luminomètre.

a. Chimiluminescence

La chimiluminescence utilise les propriétés qu'ont certains dérivés cycliques en milieu alcalin d'émettre des photons en présence de peroxyde d'hydrogène et d'un catalyseur (Figure II-11). Le catalyseur est soit un métal, soit un complexe (permanganate, ferricyanure) soit une molécule biologique (hématine, peroxydase : on parle alors parfois d'enzymochimiluminescence). Les composés luminescents utilisés sont la lucigénine, le luminol et la lophine. Le rendement photonique est assez

faible, de l'ordre de 0,1 à 3 photons pour 100 réactions chimiques. Les esters d'acridinium, récemment introduits, ne nécessitent pas l'emploi d'un catalyseur. Les applications en immunoanalyses se sont beaucoup développées et seront présentées ultérieurement.

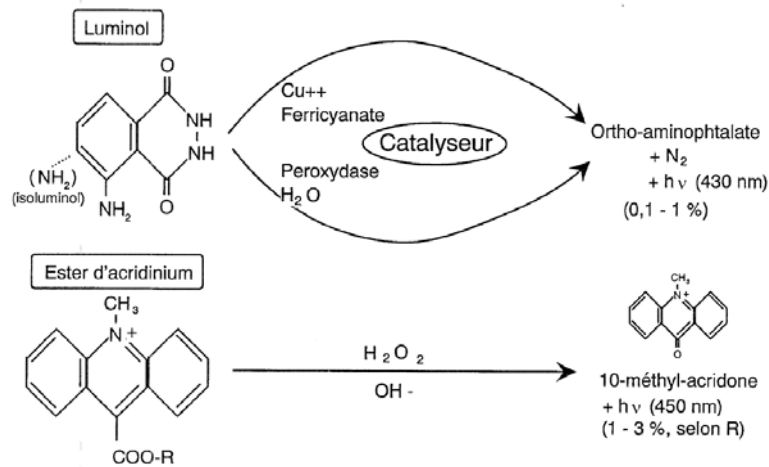


Figure II-11. La chimiluminescence.

Les luminophores peuvent être couplés à une autre molécule, soit au niveau de la fonction aminée pour le luminol ou l'isoluminol, soit au niveau de la fonction carboxylique pour les esters d'acridinium.

L'utilisation de la chimiluminescence connaît actuellement un certain développement pour l'étude des radicaux libres de l'oxygène, qui réagissent avec certains luminophores. Or ces radicaux libres sont produits dans de nombreuses circonstances, et ont des implications pathologiques très étudiées (vieillesse, athérosclérose...).

b. Bioluminescence

La bioluminescence utilise les propriétés d'enzymes bactériennes ou extraites de la luciole (ver luisant, "firefly") (Figure II-12).

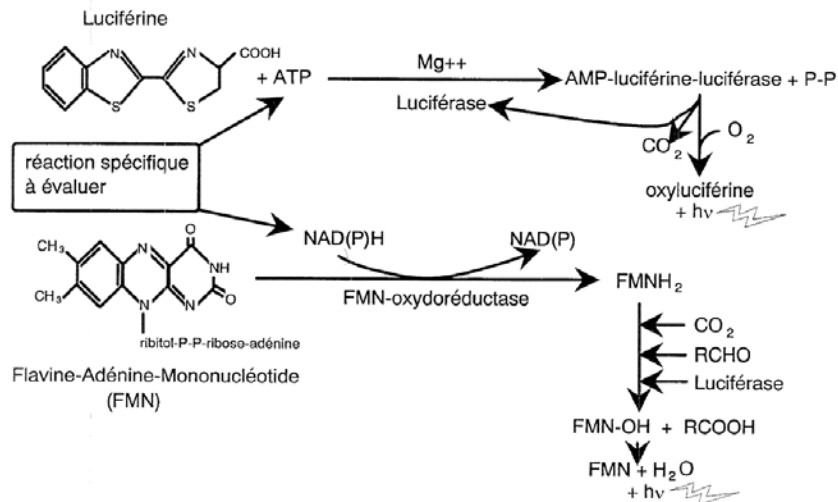


Figure II-12. La bioluminescence.

En haut, utilisation de la luciférase du ver luisant ; en bas, utilisation de la luciférase bactérienne.

- la luciférase bactérienne fonctionne avec un coenzyme, le flavine-adénine-mononucléotide (FMN), en présence d'un aldéhyde et d'oxygène. La lumière émise est bleue (480-490 nm) et le rendement photonique est de 27 %.

- la luciférase de luciole (firefly) utilise la luciférine et l'ATP, donne une lumière jaune-vert à 562 nm et est particulièrement intéressante par son rendement photonique entre 90 et 100 %. Toute réaction ou ensemble de réaction faisant intervenir ce donneur universel d'énergie qu'est l'ATP peut être théoriquement adaptable à cette méthodologie. La présence d'enzymes utilisant le NADH ou l'ATP dans la plupart des milieux biologiques humains limite les applications de ces techniques en biochimie clinique pure, car il est nécessaire de réaliser une étape d'extraction.

Les ordres de grandeur mesurés avec ces méthodes sont présentés dans le tableau II-13.

Méthode	Substance	Domaine de Concentration
Photométrie	NADH	0,1 - 2 μ M
Fluorimétrie	NADH	0,1 nM - 0,1 μ M
Amplification enzymatique	Cycle NAD	2 - 30 nM
	Cycle ATP	3 - 50 nM
Luminescence	ATP	1 pM - 0,1 μ M
	NADH	1 pM - 1 μ M

Figure II-13. Les gammes de concentration de substrat mesurées par les différentes techniques enzymatiques.

La colonne du milieu indique la substance modifiée lors de la réaction enzymatique, dont la concentration est mesurée.

Les domaines d'application de l'amplification enzymatique et de la bioluminescence peuvent être définis schématiquement :

- dosage des petites molécules courantes non immunogènes (glucose...) présentes à concentration parfois élevée dans des échantillons non habituels (biopsies, cellules,...) disponibles en très petites quantités (quelques microlitres). Elles sont sans concurrence dans ce domaine, mais de tels problèmes ne se posent guère qu'en recherche.

- dosage de molécules présentes en très petites quantités (hormones...) sur des échantillons classiques de sérum ou d'urines, disponibles en quantités habituelles (quelques millilitres ou plus). Dans ce domaine, elles pourraient parfois remplacer les méthodes immunologiques dans certaines applications, mais leur apparition plus tardive fait qu'elles ont du mal à s'imposer pour le moment.

- en agroalimentaire, la luminescence est parfois utilisée pour une détection rapide de la contamination bactérienne.

II. les techniques immunologiques

A. Principes généraux

Les techniques immunologiques reposent sur la mise en évidence du complexe qui se forme lors la réaction entre l'antigène et l'anticorps correspondant. Cette réaction présente une très grande spécificité.

L'antigène et l'anticorps se définissent l'un par l'autre :

- l'anticorps (Ac ou Ab pour antibody en anglais) est fabriqué par un organisme en réponse à une agression par un antigène. L'anticorps est toujours une protéine (immunoglobuline) ;

- l'antigène (Ag) est ce qui déclenche dans un organisme la production d'anticorps, l'organisme reconnaissant cet antigène comme quelque chose d'étranger, contre lequel il doit se défendre. L'antigène n'est pas obligatoirement une protéine, bien que les protéines fournissent les meilleurs antigènes. Une petite molécule (glucide, lipide, médicament...) peut être antigénique, souvent d'ailleurs uniquement lorsqu'elle est fixée sur une grosse molécule protéinique : l'antigène porte alors le nom d'haptène.

Pour les protéines, on définit un site antigénique (ou déterminant antigénique, ou épitope) comme un ensemble d'acides aminés (3 à 10) pouvant être contigus dans la séquence de la protéine (épitope séquentiel) ou non contigus dans la séquence mais rapprochés lors du repliement de la chaîne en structure tertiaire (épitope conformationnel) ; dans ce dernier cas, la reconnaissance du site par l'anticorps n'est plus possible si la protéine est dénaturée. Un site peut être très spécifique d'une seule protéine ou ubiquitaire (présent dans de nombreuses protéines différentes).

Les anticorps sont de deux types (Figure II-14) :

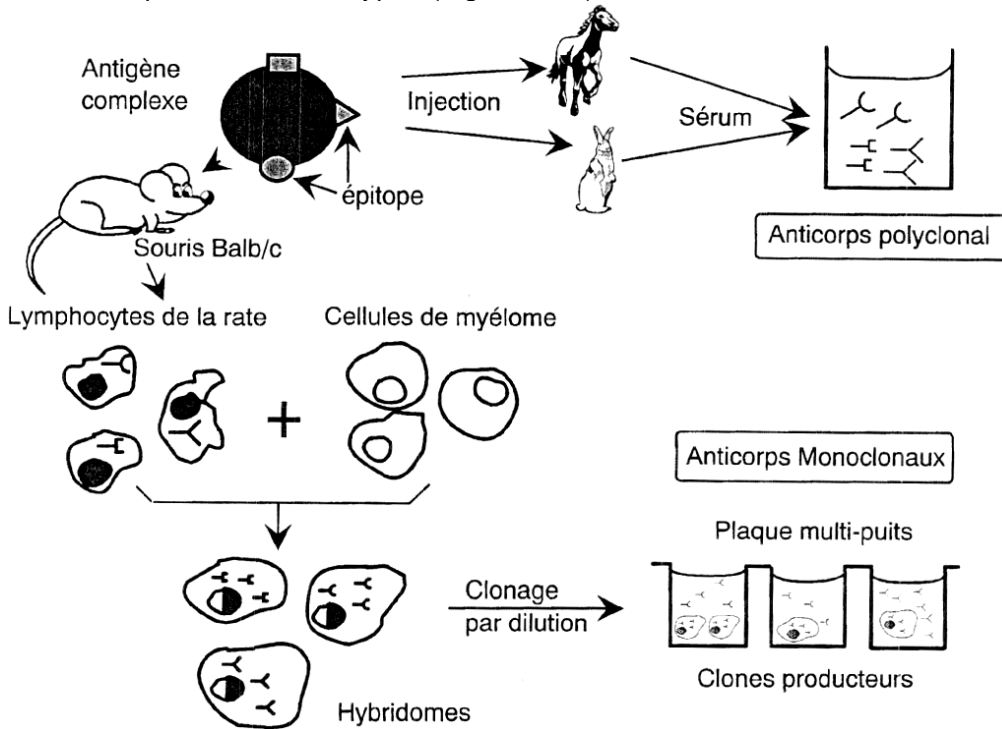


Figure II-14. Principes de la réalisation des anticorps polyclonaux et monoclonaux.

- soit "polyclonaux" : ils sont obtenus par injection de l'antigène à un animal approprié: le lapin en recherche, la chèvre ou le cheval en production industrielle pour des raisons évidentes de quantité, Après un contact plus ou moins long, et souvent grâce à l'adjonction à l'antigène d'un adjuvant non immunogène stimulant la réponse immunitaire, le sérum de l'animal contient des anticorps dirigés contre l'antigène. Il s'agit généralement d'un mélange d'anticorps pouvant réagir contre différents épitopes de l'antigène, expliquant la possibilité de réactions croisées avec d'autres antigènes. En outre, chaque animal d'une même espèce peut produire des mélanges différents d'anticorps, ce qui pose un problème industriel de continuité de la qualité des réactifs ;

- soit "monoclonaux" : c'est la tendance actuelle. On immunise un rat ou une souris et les cellules immunologiquement compétentes (lymphocytes de la rate) sont fusionnées avec des cellules tumorales compatibles (cellules de myélome ou cancer des cellules immunocompétentes) ne sécrétant pas d'anticorps et ne pouvant pas pousser sur des milieux dépourvus de certains substrats : la fusion avec le lymphocyte restaure la capacité de croissance et de multiplication sur ces milieux, les cellules ayant fusionné sont sélectionnées sur ces milieux spéciaux et se multiplient, conduisant à des hybridomes, Ceux-ci sont ensuite clonés : la suspension de cellules de l'hybridome est diluée très fortement et distribuée dans les puits de plaques appropriées, de façon à ce que les puits ne reçoivent qu'une seule cellule. Cette cellule sera à l'origine d'un clone unique, c'est à dire d'une population de cellules identiques ayant toutes la même capacité de synthèse. Le liquide de culture de chaque puits est testé pour détecter les anticorps, Chaque clone ne réalise qu'un seul type d'anticorps et on obtient ainsi directement un anticorps pur et spécifique d'un seul site antigénique. Cependant, "monoclonal" n'est pas identique à "monospécifique" : un anticorps monoclonal peut donner des réactions croisées avec plusieurs protéines

portant le même site antigénique. Les cellules hybrides résultant de la fusion combinent donc les propriétés des deux cellules mères :

- sécrétion d'un anticorps spécifique apportée par le lymphocyte de la rate de l'animal immunisé ;
- capacité des cellules du myélome à se reproduire indéfiniment, soit en culture, soit sous forme d'ascite chez l'animal (épanchement liquidien dans le péritoine, permettant d'obtenir des titres plus élevés d'anticorps qu'en culture).

On dispose donc ainsi indéfiniment (en théorie du moins) d'un anticorps pur monospécifique (s'il a été bien choisi).

L'obtention et le contrôle des anticorps représentent le point critique des méthodes immunologiques, mais au stade du laboratoire de routine, ce problème n'apparaît pas.

B. les anticorps (Figure II-15)

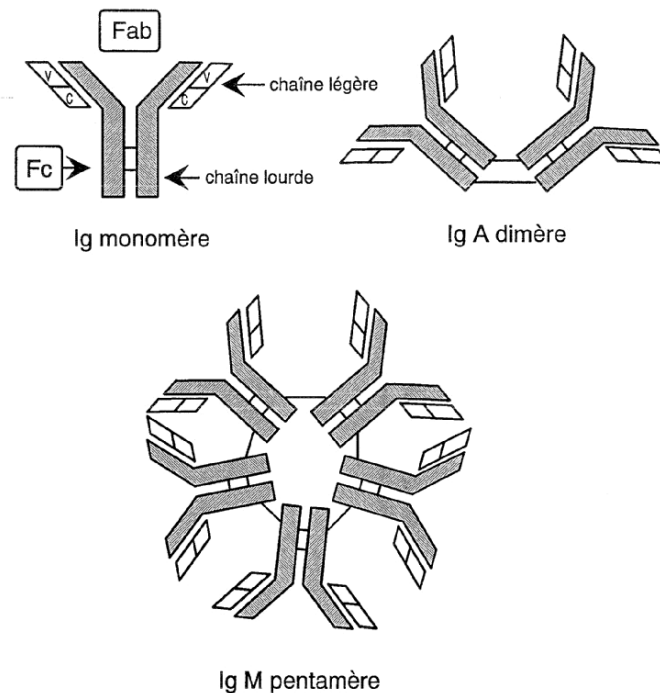


Figure II-15. Les principales classes d'immunoglobulines sériques.

Les anticorps sont des protéines appartenant à la classe des immunoglobulines du sérum, On en distingue 5 groupes, classés par ordre de concentration sérique décroissante: IgG, IgA, IgM, IgD, IgE.

- les IgG représentent un monomère d'immunoglobuline, comportant deux chaînes lourdes (H pour heavy, en référence à leur poids moléculaire) de nature γ , liées entre elles par des ponts disulfures, et deux chaînes légères (ou L) de nature κ ou λ , également liées aux chaînes lourdes par liaisons disulfures. La structure d'une IgG est donc $(\gamma_2-\kappa_2)$ ou $(\gamma_2-\lambda_2)$. L'ensemble des 4 chaînes comporte plusieurs domaines :

- une extrémité de structure très variable (domaines VL appelée Fab (ab pour « antigen binding ») responsable de la spécificité de l'anticorps ;
- une extrémité de structure constante (domaines C) appelée Fc (pour la fixation du complément) commune à toutes les immunoglobulines d'une même classe (et qui liera donc les anticorps anti-anticorps).

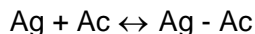
Les IgA existent sous forme de dimères ou de trimères de cette sous unité. Elles ont donc la structure $(\alpha_2-\lambda_2)_2$ ou 3 ou $(\alpha_2-\kappa_2)_2$ ou 3. Ce sont les anticorps qui sont fréquemment sécrétés au niveau des muqueuses (pulmonaire, intestinale) où ils assurent une première ligne de défense lors des infections.

Les IgM sont des pentamères $(\mu_2-\lambda_2)_5$ ou $(\mu_2-\kappa_2)_5$. Lors d'une infection, les IgM sont les premières fabriquées par l'organisme, les Ig G apparaissant plus tardivement. Le dosage séparé des IgG et IgM spécifiques contre une bactéries ou un virus permet de dater une infection (récente ou ancienne).

Les IgD et les IgE sont les moins abondantes des immunoglobulines sériques. Les IgE sont impliquées dans les réactions allergiques : la mesure de la quantité des IgE sériques spécifiques d'un allergène particulier a représenté un grand progrès dans le diagnostic en allergologie.

C. la réaction antigène - anticorps

La réaction antigène-anticorps est spécifique et réversible, car due à des forces de liaison non covalentes (liaison hydrogène, liaison ionique, forces de Van der Waales...). Elle dépend du pH, de la température et de la force ionique du milieu. la réaction antigène anticorps est caractérisée par un équilibre:



La constante d'équilibre $[Ag][Ac] / [Ag - Ac]$ représente l'affinité de l'anticorps pour l'antigène (c'est un peu la même chose que la constante de Michaelis K_M pour les enzymes).

Dans le modèle du "réseau" (figure II-16), un antigène polyvalent (à plusieurs sites) et un anticorps (au moins divalent) forment un réseau volumineux qui trouble le milieu puis précipite, permettant un repérage direct du complexe antigène-anticorps. La précipitation maximale a lieu au point d'équivalence ; de part et d'autre de ce point, le réseau est incomplet et reste en solution. Ce modèle explique les courbes obtenues lors de la mesure du trouble produit dans le milieu réactionnel lors de la formation du complexe antigène - anticorps (Figure II-17).

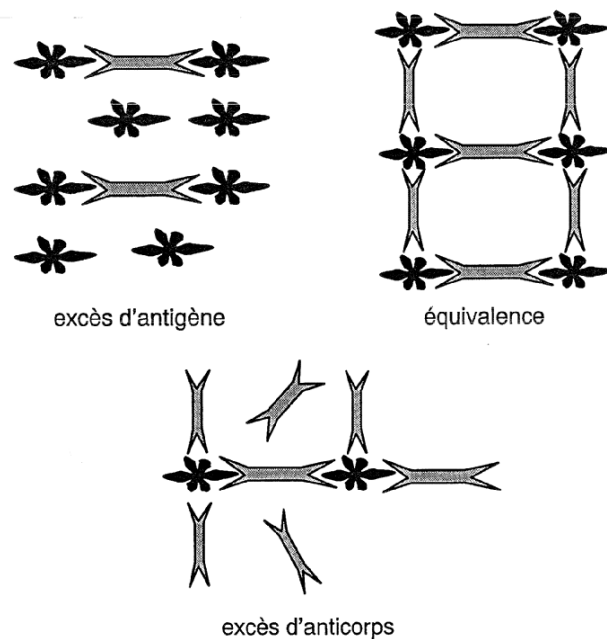


Figure II-16. La réaction antigène – anticorps : théorie du réseau.

La formation d'un réseau suppose la présence d'anticorps et d'antigènes à plusieurs sites.

Toutes les réactions ne répondent pas cependant à ce mécanisme (anticorps ou antigène monovalent). En absence de réseau, on doit utiliser un traceur.

Les techniques des dosages immunologiques quantitatifs sont donc de deux ordres: repérage direct du complexe, techniques avec immunotraceurs. Les techniques immunologiques donnant seulement des résultats qualitatifs seront étudiées dans le chapitre VI. Selon leur mise en oeuvre, les techniques quantitatives permettent de doser soit l'antigène soit l'anticorps spécifique d'un antigène.

Avant de commercialiser un réactif, deux éléments doivent être étudiés : l'avidité de l'anticorps (affinité pour l'antigène) et la spécificité (absence de réaction croisée).

Quel que soit le mécanisme, la qualité de la réaction va dépendre du titre et de l'avidité de l'anticorps. Le titre d'une solution d'anticorps est la quantité d'antigène qu'il faut ajouter à cette solution pour épuiser l'anticorps. L'avidité peut être estimée par le rapport de l'intensité du signal mesuré au point d'équivalence sur la concentration d'antigène en ce point.

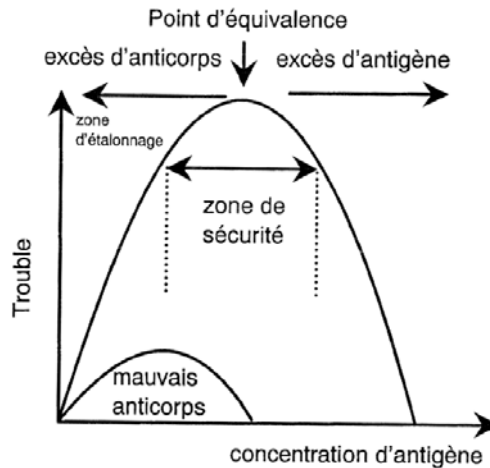


Figure II-17. La réaction antigène - anticorps.

Le trouble maximum créé dans la solution par la formation du réseau est mesurée en fonction de la concentration en antigène. Pour éviter les incertitudes, le début de la zone de sécurité est choisi au niveau des concentrations élevées le plus souvent rencontrées en pathologie.

Le contrôle de la spécificité de l'anticorps (étude des réactions croisées) est réalisable de manière qualitative simple par la méthode de double immunodiffusion ou méthode d'Ouchterlony (Figure II-18). Mettant en évidence la plus ou moins grande similitude de réaction de l'anticorps vis-à-vis d'antigènes différents. Si une réaction croisée existe, elle doit ensuite être quantifiée.

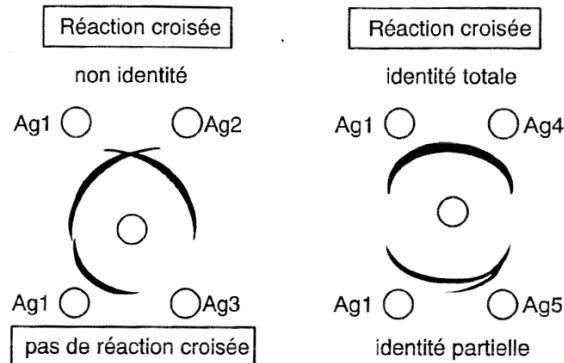


Figure II-18. Double immunodiffusion ou méthode d'Ouchterlony,

L'anticorps préparé contre l'antigène 1 est déposé dans le puits central et diffuse vers chacun des antigènes des puits latéraux. La présence et la forme des arcs de précipitation renseigne sur l'importance et la nature des réactions croisées entre l'antigène 1 et 4 autres antigènes.

D. Repérage direct du complexe antigène - anticorps

1. En milieu solide

Ces méthodes sont en général réalisées en milieu gélifié (souvent à base d'agar) permettant la diffusion des antigènes et des anticorps mais immobilisant le réseau formé lors de la réaction. les

courbes d'étalonnage sont fréquemment réalisées en trois points et les domaines choisis pour que cet étalonnage soit linéaire. Ces méthodes sont manuelles et adaptées au traitement de petites séries.

a. Immunodiffusion simple ou radiale (IDR ou RID) : méthode de Mancini (figure II-19)

L'antigène diffuse à partir d'un puits creusé dans la gélose imprégnée d'anticorps. la mesure du diamètre de l'anneau de précipitation permet de quantifier la quantité d'antigène" puisque le carré du diamètre est directement proportionnel à la quantité d'antigène.. la droite d'étalonnage ne passe pas par zéro (puisque'il y a au moins le diamètre du puits) et on ne peut pas extrapoler pour les diamètres supérieurs ou inférieurs à ceux de l'étalon. C'est une méthode de mise en oeuvre très simple, consommant deux à cinq microlitres de sérum, mais demandant un temps de diffusion d'au moins 24 h, variable en fait selon la taille de l'antigène à doser (jusqu'à 5 jours pour de grosses particules lipoprotéiniques). La méthode est commercialisée sous formes de plaques de différentes formes contenant en général 8 à 12 puits.

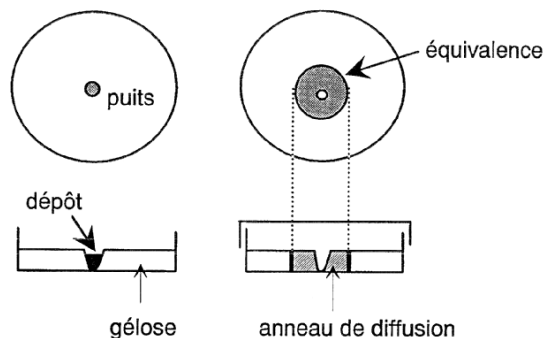


Figure II-19. L'immunodiffusion radiale (méthode de Mancini)

b. Electroimmunodiffusion (EID) : méthode de Laurell (figure II-20)

L'antigène est entraîné à partir d'un puits par un champ électrique à travers le gel contenant l'anticorps. On obtient des traînées ou fusées (d'où le nom anglo-saxon de "rocket electrophoresis") dont la hauteur est proportionnelle à la concentration de l'antigène : au point d'équivalence, le réseau est trop gros pour migrer dans le gel. Il est possible d'inclure dans le gel un deuxième anticorps pour doser simultanément deux antigènes différents. L'addition dans le gel d'autres anticorps à forte concentration permet de piéger certains antigènes et de doser ainsi des particules ayant une composition antigénique définie: cette méthode est très fructueuse pour l'étude des sous-classes de lipoprotéines ("lipoparticules" de composition définie en apolipoprotéines). L'obtention du résultat est plus rapide qu'en immunodiffusion radiale (4 à 6 heures). Dans les produits commercialisés, le gel est coulé sur un film plastique et contient entre 12 et 24 puits.

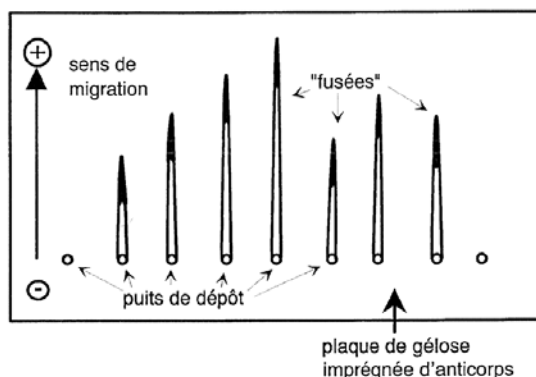


Figure II-20. L'électro-immunodiffusion (méthode de Laurell)

Les gels horizontaux sur film plastique sont soumis à une électrophorèse dans les conditions décrites au chapitre VI (Figure VI-30.5).

c. Révélation des complexes

Dans ces méthodes, la sensibilité peut être augmentée en utilisant des colorants spécifiques des protéines qui révéleront les complexes : bleu de Coomassie, Noir Amide, Rouge Ponceau...

2. En milieu liquide

Les méthodes sont fondées sur la mesure optique du trouble provenant de la diffusion de la lumière par les grosses particules du réseau (dès que leur poids moléculaire dépasse 3 millions de daltons). Elles peuvent surestimer certains résultats, lorsqu'on s'intéresse à de grosses particules hétérogènes. C'est le cas du dosage de l'apoprotéine B : cette protéine est contenue dans des particules relativement petites, les LDL, mais aussi dans des particules plus volumineuses, les VLDL diffusant davantage la lumière. Le trouble mesuré dépendra de la proportion de ces deux types de particules dans le réseau.

On utilise des concepts analogues à ceux des dosages employant les enzymes :

- mesure en point final. La cinétique de la réaction est importante à définir (figure II-21). Un temps minimum est nécessaire pour atteindre l'état final, mais une trop longue attente rendrait des résultats trop bas par sédimentation des gros complexes. Il est nécessaire de réaliser un "blanc échantillon". L'automatisation complète résout les problèmes de chronométrage de ces méthodes.

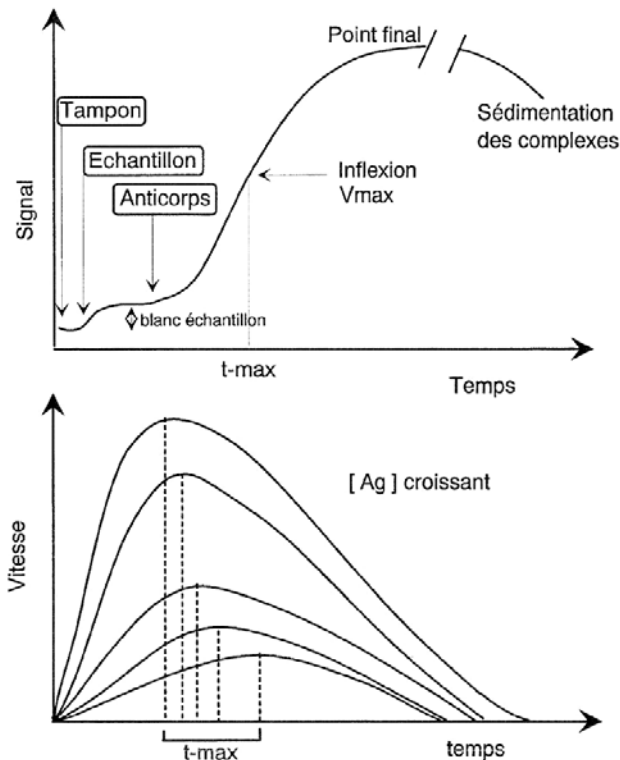


Figure II-21. La réaction antigène - anticorps, étude en milieu liquide.

En haut, le signal (turbidimétrique ou néphélométrique) est enregistré en fonction du temps: le point d'inflexion de la partie ascendante de la courbe représente la vitesse maximale V_{max} de la réaction de formation du réseau. En bas, la vitesse de la réaction est portée en fonction du temps pour des concentrations croissantes d'antigène. Le sommet des courbes (V_{max}) définit le t_{max} à chaque concentration.

- mesure en cinétique: dans la partie ascendante de la courbe de la figure II-21. La courbe de la réaction en fonction du temps présente une allure sigmoïde, avec un point d'inflexion correspondant à la vitesse maximale de la réaction (V_{max}) ; le temps nécessaire pour atteindre cette valeur est appelé t_{max} .

Une application intéressante est commercialisée par la firme Behring, utilisant ces deux paramètres en même temps (Turbitimer). Pour des V_{max} identiques de part et d'autre du point d'équivalence, le temps mis pour obtenir cette valeur (t_{max}) est différent (figure II-22). Cette méthode élargit le domaine de mesure utilisable en supprimant toute ambiguïté sur la zone de concentration (excès d'antigène ou d'anticorps).

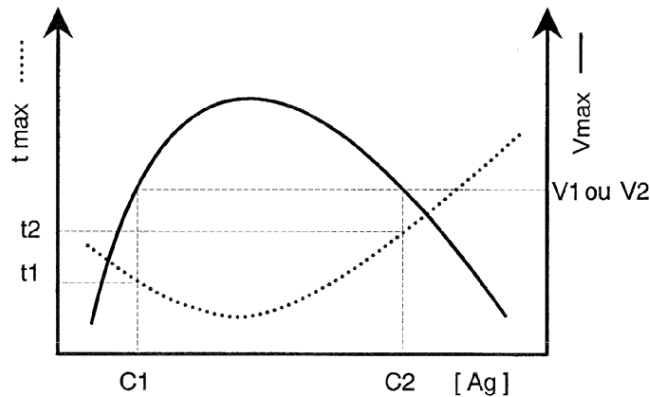


Figure II-22. Principe du Turbitimer (Behring).

La mesure simultanée de V_{max} et t_{max} lève l'ambiguïté sur la concentration réelle de l'analyte, C1 ou C2

La sensibilité des méthodes en milieu liquide peut être renforcée par le couplage de l'anticorps avec des billes de latex (LPIA : Latex Particle enhanced Immuno Assay) : le problème de la sédimentation devient alors encore plus important.

a. Immunoturbidimétrie

On mesure l'absorption de la lumière UV (ou plus exactement la lumière non transmise) due au trouble formé par le réseau. Cette méthode est automatisable sur la plupart des automates modernes soit en point final soit en cinétique. L'absorption de la lumière par des particules est meilleure si la longueur d'onde utilisée est plus faible que le diamètre de ces particules. Le dosage est plus sensible à faible longueur d'onde (Ultraviolet à 340 nm) car les petits complexes sont détectés.

b. Immunonéphélométrie

Cette méthode évalue la quantité de lumière diffusée par le réseau. Plus sensible que la turbidimétrie, elle a des contraintes plus grandes sur la qualité des étalons, des contrôles, des solutions d'anticorps et des échantillons. Notamment, les réactifs doivent présenter :

- un comportement identique au sérum humain natif, donc sans surcharge en protéines exogènes ;
- une limpidité parfaite ("light scattering grade") imposant une préparation spéciale pour les sérums lyophilisés (par exemple lyophilisation instantanée sous formes de microbilles par atomisation) ;
- une absence de contamination bactérienne ou virale.

c. L'étalonnage

L'étalonnage des méthodes en milieu liquide exige l'utilisation de nombreux points, car les résultats ne sont pas linéaires: les courbes obtenues ont des allures sigmoïdes et s'expriment par des polynômes du type :

$$\text{Concentration} = B_0 + B_1.a + B_2.a^2 + B_3.a^3 + \dots$$

B représente les coefficients de la courbe, a la concentration d'un standard.

Selon les cas, on utilise directement la concentration a (courbe cubique simple) ou son inverse 1/a (cubique réciproque) ou diverses transformations (log...). La détermination graphique manuelle, toujours possible mais imprécise, est remplacée dans les automates modernes par un traitement informatique. L'ajustement des résultats expérimentaux de l'étalonnage à une type de courbe théorique peut être

prédéfini (l'étalonnage n'est pas validé si la corrélation entre la courbe mesurée et la courbe théorique est inférieure à un certain seuil) ou variable: l'appareil calcule tous les ajustements possibles et retient la courbe théorique présentant la meilleure corrélation avec la courbe expérimentale. A partir des coefficients calculés de la courbe d'étalonnage, l'ordinateur calcule la valeur inconnue.

E. Techniques avec traceurs

Leur utilisation s'impose lorsque la réaction antigène - anticorps n'aboutit pas à la formation d'un réseau ou lorsque le réseau n'est pas détectable : la sensibilité est considérablement augmentée en couplant l'un des éléments de la réaction avec une molécule facilement détectable, même à faible concentration. Ces méthodes sont évidemment applicables aux molécules présentes en quantité importantes (il suffit de diluer suffisamment l'échantillon) et peuvent remplacer les méthodes directes en milieu solide, qui sont moins rapides et moins précises. Elles sont en outre insensibles à l'hétérogénéité de la taille des complexes (et donc plus exactes pour l'apoprotéine B par exemple). La molécule à doser est appelée analyte, quelle que soit sa nature (haptène, antigène complet dont les immunoglobulines elles-mêmes). L'anticorps reconnaît spécifiquement l'analyte (anticorps primaire ou "sensor antibody").

Les méthodes sont très diverses, phénomène dû en partie à la protection par des brevets solides qui a stimulé l'imagination des chercheurs ! Ceci se traduit par la floraison de nombreux sigles, dérivés des termes anglo-saxons et correspondant parfois à des marques déposées, ce qui rend le présent exposé sans doute non exhaustif !

1. les traceurs et leur détection

Les traceurs utilisables sont très divers. Selon les cas, le traceur est fixé sur l'un ou l'autre des éléments, l'analyte ou l'anticorps spécifique. Deux problèmes techniques sont communs à tous les traceurs :

- stabilité du traceur et du tracé lors de la réaction de couplage.
- modification éventuelle de la réaction analyte - anticorps par la présence du traceur sur l'un des éléments.

a. Isotope radioactif

Dans les méthodes radio-immunologiques (RIA : "Radio-Immuno Assay") on utilise un anticorps ou un antigène radioactif et on mesure la radioactivité fixée dans le complexe antigène-anticorps. Cette méthode, une des premières utilisant un immunotraceur, développée dès 1960 par Yalow et Berson, reste la méthode de référence, non seulement en raison de son antériorité, mais à cause d'avantages incontestables :

- une très grande sensibilité alliée à la couverture d'un très large domaine de concentration : les compteurs modernes de radioactivité déterminent de manière fiable un nombre de désintégrations radioactives par minute (dpm) compris entre quelques dizaines et 1 million ;
- à la différence de ce qui se passe avec les autres traceurs, le remplacement dans une molécule de un ou plusieurs hydrogènes ou carbones constitutifs par leur isotope radioactif, ^3H ou ^{14}C , ne modifie pas les propriétés physico-chimiques de la molécule et donc la reconnaissance de l'antigène par l'anticorps ;
- le marquage des anticorps, par exemple à l'iode ^{125}I , est réalisable par des méthodes douces bien codifiées qui modifient peu l'anticorps et son activité.

Mais la radio-immunologie présente aussi certaines contraintes:

- au niveau du marquage: labilité de l'élément marqueur (période courte de ^{125}I), obligeant à de fréquentes préparations; problème de radiolyse ;
- au niveau de la détection: nécessité d'un équipement lourd pour la mesure de la radioactivité (compteur β ou γ)
- au niveau des mesures de protection du personnel et de l'élimination des déchets radioactifs ;

- au niveau réglementaire² : nécessité d'une habilitation du directeur de laboratoire à la manipulation de radio-éléments en source non scellée pour un usage diagnostique, obtenue après une formation spécifique dispensée par le Commissariat à l'Energie Atomique ; agrément du laboratoire lui-même et de ses installations.

Cette habilitation a limité la diffusion des méthodes radio immunologiques à un nombre très restreint de laboratoires spécialisés, parfois mis en difficulté par la concurrence des méthodes n'utilisant pas la radioactivité.

Les dosages radio immunologiques ne seront pas décrits, mais un grand nombre de dosages non radioactifs découlent en fait de principes d'abord mis au point en RIA.

b. Particules agglutinables

L'antigène est fixé de manière covalente sur des particules variées (par exemple hématies ou particules synthétiques de latex). On apprécie soit l'agglutination lorsque l'anticorps est présent dans le sérum soit l'inhibition de l'agglutination (sous l'effet d'un anticorps spécifique ajouté) due à la présence d'antigène libre dans le sérum. Cette méthode est visuelle et de mise en oeuvre facile sur plaque de micropuits ou sur lame, et donc intéressante pour l'urgence. Elle est utilisée de manière semi quantitative en recherchant quelle est la plus grande dilution du sérum qui donne une agglutination ou une inhibition de l'agglutination. La mesure de la diffusion de la lumière par les particules agglutinées en néphélométrie permet une quantification plus précise. Une technique récente permet d'atteindre des sensibilités très grandes (de l'ordre de l'attomole, 10^{-18} M) à l'aide de particules de latex de 0,8 microns : les particules isolées, non agglutinées, sont comptées individuellement à l'aide d'un compteur approprié (IMPACT : "immunoparticule counting technique"). L'ensemble des opérations est automatisé dans un appareil spécial.

c. Fluorochrome : immunofluorescence

Un composé fluorescent est couplé à l'anticorps ou à l'antigène. A côté des fluorochromes traditionnels, tels que la fluorescéine, l'utilisation des terres rares présentant une fluorescence longue et intense (lanthanides tels que l'euporium, mais aussi le samarium ou le terbium) a permis des gains de sensibilité, mais nécessite un fluorimètre spécial décrit dans le prochain chapitre.

d. Luminophore

Le composé fixé est un luminophore tel que le luminol : l'émission lumineuse est relativement brève et sensible au quenching (atténuation du signal le milieu), ce qui pose de nombreux problèmes de mesure partiellement résolus par l'automatisation.

L'utilisation des esters d'acridinium et l'addition de divers composés permettent d'augmenter l'intensité, la durée et la stabilité du signal.

Sous le nom général de CLA ou CLIA ("ChimiLuminescent Immuno Assay"), diverses méthodes ont été décrites, dont les principes sont voisins de ceux décrits plus loin pour les enzymes : SPALT ("Solid Phase Antigen Luminescent Technique") ; ILMA ("Immuno Lumino Metric Assay").

En travaillant avec un support solide, la lumière émise peut être enregistrée sur un film photographique permettant le repérage simultané de plusieurs réactions. Un kit de détection semi quantitative des IgE spécifiques d'un sérum contre un grand nombre d'allergène respiratoire ou alimentaire a été commercialisé (Figure II-23).

e. Enzyme : immunoenzymologie (EIA: "Enzyme immuno Assay")

Une enzyme dont l'activité est facilement repérable est couplée à l'anticorps ou à l'analyte. C'est une des méthodes les plus utilisées actuellement, car elle donne des résultats précis, peut être effectuée par n'importe quel laboratoire déjà habitué à doser les enzymes et ne nécessite qu'un photomètre. La détection de l'activité enzymatique par fluorescence ou luminescence nécessite cependant l'appareil

² Arrêté du 23 avril 1969 et décret 75-936 du 13 octobre 1975, sur l'agrément des appareils et des installations ; arrêté du 26 mars 1974 sur les compétences des personnes autorisées à utiliser des radioéléments artificiels ; arrêté du 30 octobre 1981 sur les conditions d'emploi des radioéléments artificiels en source non scellée à des fins médicales.

approprié. L'EIA est mise en oeuvre selon deux modalités (soit en phase hétérogène soit en phase homogène) dont les principes seront détaillés dans des paragraphes ultérieurs.

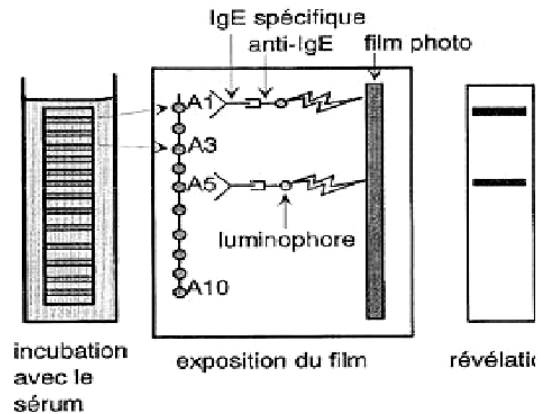


Figure II-23. Dépistage par immuno-chimiluminescence des IgE spécifiques d'allergènes.

Des allergènes différents (A 1, A2,...) sont fixés sur chaque barrette. Après incubation avec le sérum du patient, la présence des IgE spécifiques de chaque allergène est détectée par un anticorps anti-IgE marqué par un luminophore. Après introduction du catalyseur, le système est mis au contact d'un film photographique qui est ensuite révélaté. La présence d'une bande indique l'existence d'IgE spécifique. L'intensité de la bande donne une appréciation semi quantitative.

Le choix de l'enzyme doit répondre à un certain nombre d'exigences :

- possibilité d'obtention à un haut degré de pureté ;
- grande activité spécifique, qui doit être conservée lors du couplage. Elle sera responsable de la sensibilité du dosage ;
- stabilité lors du dosage et à la conservation ;
- absence de l'enzyme dans les milieux biologiques, de même que absence d'inhibiteurs ou d'activateurs ;
- facilité du dosage enzymatique, voire automatisation possible.

Le choix se porte actuellement sur un nombre très restreint d'enzymes : peroxydase (pour une réaction rapide), β -galactosidase, phosphatase alcaline (pour une réaction plus lente), glucose-6-phosphate déshydrogénase. Moins fréquemment utilisés sont l'acétylcholine estérase et la glucose-oxydase.

Diverses méthodes de couplage de l'enzyme à l'antigène ou l'anticorps sont utilisées (Figure II-24), par exemple :

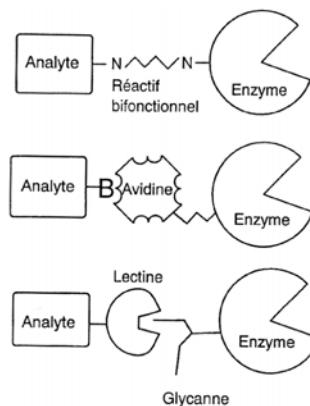


Figure II-24. Modes de fixation d'une enzyme sur un analyte.

- fixation covalente directe, utilisant soit le glutaraldéhyde (liant un groupements aminé de la protéine enzymatique à un groupement aminé de l'élément à coupler) soit le dimaléimide (se fixant aux

groupements thiols), soit la formation de base de Schiff (entre un groupe aminé libre et un aldéhyde de l'enzyme produit par oxydation par l'acide periodique) ;

- fixation indirecte : couplage covalent de biotine qui s'associera ultérieurement avec l'avidine liée à l'enzyme ; couplage covalent d'une lectine qui liera ensuite une enzyme de nature glycoprotéinique.

2. la quantification avec les traceurs

D'un point de vue théorique, la quantification utilise 2 modalités (Figure II-25) :

- mesure du nombre de sites anticorps occupés par l'analyte à doser. L'anticorps spécifique doit généralement être en excès pour doser tout l'analyte. Ces méthodes sont non-compétitives.

- mesure du nombre de sites anticorps non occupés par l'analyte à doser : méthodes par compétition.

Le sens de l'évolution du signal mesuré en fonction de la concentration en analyte varie selon la nature de l'élément marqué (analyte ou anticorps) et selon que l'activité du traceur est mesurée dans le complexe analyte - anticorps (fraction liée) ou dans la fraction libre après séparation du complexe. D'un point de vue pratique, les deux types de méthodologie donnent des courbes d'étalonnage inverses l'une de l'autre (Figure II-25) : les courbes obtenues ont la même allure que celles décrites pour le repérage direct en milieu liquide et peuvent être traitées avec les mêmes méthodes mathématiques.

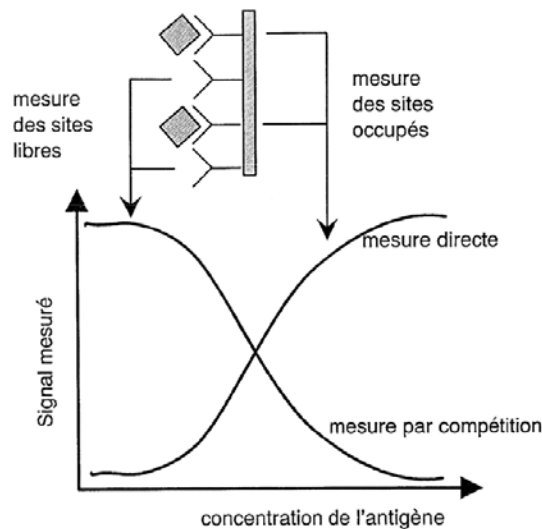


Figure II-25. Principes des mesures avec immunotraceurs.

Les méthodes compétitives mesurent à l'aide d'un analyte marqué le nombre de sites libres, non occupés par l'analyte à doser. L'intensité du signal mesuré est inversement proportionnelle à la concentration de l'analyte à doser. Les méthodes non compétitives mesurent le nombre de sites occupés par l'analyte à doser: l'intensité du signal est proportionnelle à la concentration de l'analyte.

a. les méthodes directes

La grandeur que l'on mesure est directement proportionnelle à la quantité de molécule à doser. C'est une méthode précise car en absence d'analyte, aucune activité n'est mesurée. Sa sensibilité dépend surtout de l'activité spécifique du traceur.

b. les méthodes indirectes par compétition

La grandeur que l'on mesure est inversement proportionnelle à la quantité des molécules à doser. Il y a compétition pour la fixation sur l'anticorps entre l'analyte non marqué et le même analyte marqué par le traceur et présent en quantité connue. La méthode est sensible si l'anticorps présente une grande affinité pour l'analyte, mais elle peut être moins précise aux concentrations faibles d'analyte, puisqu'on compare des grandes valeurs: en absence d'analyte, l'activité mesurée est maximale.

La compétition est réalisée selon deux modalités :

- simultanée (méthode classique de Yalow) : les deux types d'analyte (marqué et libre à doser) se présentent en même temps aux sites de fixation des anticorps placés en défaut;
- séquentielle : l'échantillon est ajouté à une quantité d'anticorps en excès de façon à lier tout l'analyte à doser ; puis l'analyte marqué est ajouté en excès pour saturer les sites libres sans déplacer le premier analyte. Les sites non occupés peuvent être également quantifiés par l'utilisation d'anticorps particuliers (anticorps anti-idiotype).

La technique séquentielle est souvent plus sensible que la technique simultanée : "excès d'anticorps permet de fixer tout l'analyte à doser. Mais elle est plus longue et impose des contraintes supplémentaires à l'automatisation.

3. Dosages immunoenzymatiques en phase hétérogène

Ces dosages ont pu se développer rapidement, car ils ont bénéficié, dès que le principe en a été décrit, de toutes les techniques de l'immunologie et de l'expérience acquise en radio-immunologie.

L'existence d'une phase hétérogène permet la séparation facile du complexe analyte - anticorps, lié à cette phase, des anticorps ou analytes libres en solution. Les associations variables entre les différentes modalités techniques décrites dans les paragraphes suivants conduisent à une grande variété des réactifs disponibles ou concevables, au moins pour les méthodes manuelles. Les contraintes liées à l'automatisation de plus en plus nécessaire constituent un critère de sélection efficace...

a. La phase hétérogène

L'anticorps ou l'analyte est fixé sur une surface solide en contact avec le milieu liquide. La paroi du tube réactionnel est la phase hétérogène la plus simple. On augmente la sensibilité en augmentant la surface de contact. De nombreuses astuces sont utilisées: billes, ailettes, microparticules (MEIA: microparticule enzyme immunoassay). Ces supports solides sont facilement séparables du milieu liquide par sédimentation, centrifugation (problème pour l'automatisation) ou filtration. Les particules magnétiques sont de plus en plus employées: constituées de polymères enveloppant un noyau magnétique de composition variable, elles sont facilement séparées du milieu réactionnel grâce à un aimant appliqué sur le tube.

La fixation sur la phase hétérogène utilise différentes techniques (Figure II-26) :

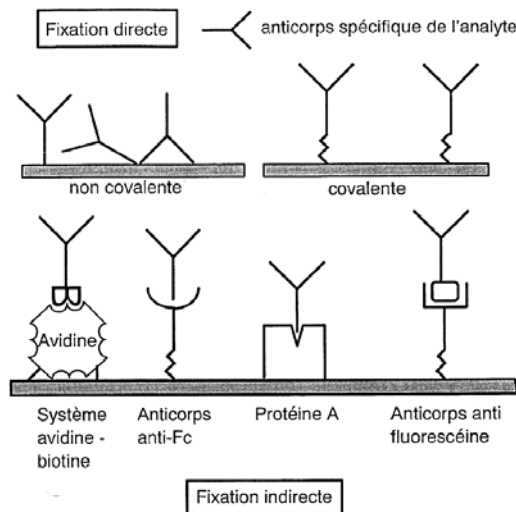


Figure II-26. Modes de fixation de l'anticorps primaire sur la phase hétérogène.

- adsorption sur des surfaces hydrophobes: facile à réaliser, mais peu sensible et peu reproductible de par l'orientation aléatoire des molécules ;
- fixation covalente sur une surface fonctionnalisée de l'un des éléments de la réaction analyte
- anticorps : elle nécessite la préparation d'une surface spécifique à chaque dosage ;

- fixation covalente d'un composant "universel": on peut alors utiliser la même surface pour des dosages différents. De telles techniques permettent aux fabricants de développer des gammes cohérentes de réactifs, tous les dosages ayant une phase hétérogène commune. Ces composants sont variés :

- avidine : tout élément de la réaction lié à la biotine est reconnu spécifiquement et lié fortement à la phase hétérogène par l'avidine ;
- protéine A ou G, fixant les immunoglobulines ;
- anticorps anti-fragment Fc des immunoglobulines, reconnaissant n'importe quel anticorps ;
- anticorps anti-fluorescéine liant tout élément marqué par cette molécule.

b. Les types de réaction

Comme pour toute méthode avec traceur, il existe des méthodes directes et indirectes par compétition.

- les méthodes directes sont bien adaptées aux grosses molécules présentant plusieurs sites antigéniques différents ou non: la fixation de la molécule sur la phase hétérogène utilisera le premier site; la fixation du deuxième anticorps (de manière simultanée ou séquentielle) sur un deuxième site permet la révélation du complexe. Une telle méthode, appelée Sandwich (figure II-27) présente des avantages. En effet, l'utilisation de deux sites distincts augmente la spécificité du dosage : il est rare que deux molécules différentes présentent deux sites antigéniques communs ; elle permet de doser des complexes de composition définie en protéines (exemple des lipoprotéines et du dosage de lipoparticules comportant spécifiquement deux apoprotéines).

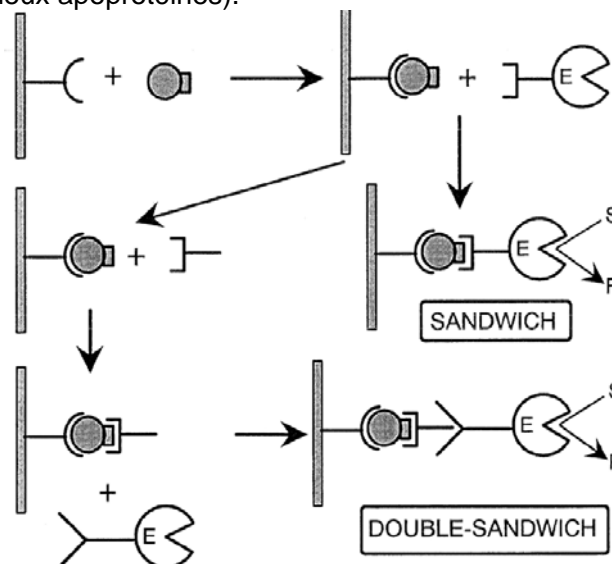


Figure II-27. Technique sandwich et double-sandwich.

Représentée ici sous forme séquentielle, la mise en oeuvre peut se faire également de manière simultanée.

D'autres méthodes directes sortent du cadre strict de la biochimie: permettant de doser un anticorps spécifique d'un antigène, elles sont très utiles dans le domaine des maladies infectieuses, virales ou parasitaires :

- méthode à double site anticorps (figure II-28) : l'analyte non marqué est fixé sur la phase hétérogène et retient l'anticorps spécifique. La quantité d'anticorps retenue est quantifiée en ajoutant l'analyte marqué qui s'associe au deuxième site de l'anticorps.

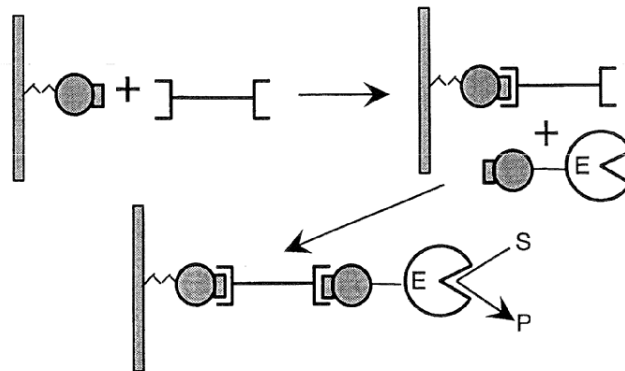


Figure II-28. Technique à double site anticorps.

- méthode par immunocapture : elle permet de doser l'anticorps spécifique d'un antigène en fonction de la nature de cet anticorps (IgM ou IgG), apportant des renseignements importants sur l'ancienneté d'une réaction immunitaire (les IgM spécifiques sont produits avant les IgG spécifiques) (Figure II-29). Un anticorps spécifique anti-IgG ou anti-IgM est fixé sur la phase hétérogène, retenant toutes les Ig de la même classe. Les Ig spécifiques d'un antigène précis sont quantifiées par l'addition de cet antigène marqué.

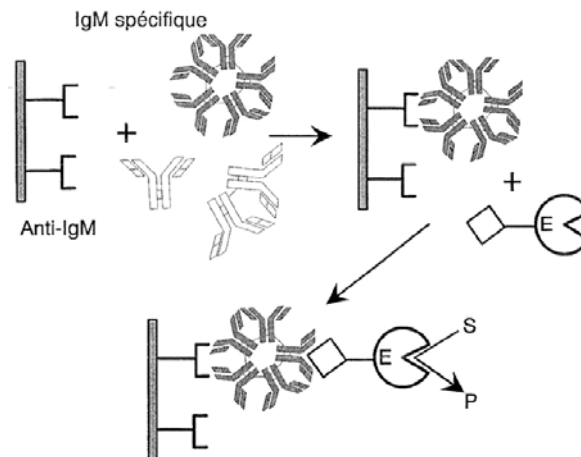


Figure II-29. Dosage d'IgM spécifiques d'un allergène par immunocapture.

Les méthodes indirectes par compétition sont utilisables aussi pour le dosage des grosses molécules telles que les anticorps, mais leur champ d'application privilégié reste celui des petits analytes de masse moléculaire inférieure à 500. La mise en oeuvre des différentes étapes de reconnaissance spécifique est réalisable dans la plupart des cas de manière simultanée ou séquentielle. la phase hétérogène est soit utilisée dès la première étape d'incubation (ELISA, CEIIA), soit secondairement après une incubation en Phase homogène (DASP, IEMA).

La méthode ELISA ("Enzyme linked Immuno Sorbent Assay") est sans doute la plus populaire (figure II-30). L'anticorps est fixé sur la phase hétérogène: il y a compétition entre l'analyte libre à doser et l'analyte marqué. Après lavage, l'activité fixée sur la phase solide est déterminée. D'autres techniques ne répondant pas à ce principe de compétition sont fréquemment appelées aussi ELISA : par exemple, après fixation de l'antigène sur la phase hétérogène, l'anticorps spécifique est fixé, puis révélé par un anticorps anti-immunoglobuline marqué.

- méthode CEIIA ("Competitive Enzyme linked Immuno Assay") (Figure II-31) : la compétition a lieu entre l'analyte à doser et l'analyte fixé sur une bille. Après séparation des phases, la quantité d'anticorps fixée sur les billes est révélée par un second anticorps et l'utilisation d'un complexe peroxydase-antiperoxydase.

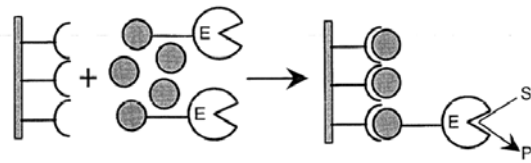


Figure II-30. Méthode ELISA.

Représentée ici en compétition simultanée, elle peut aussi être mise en oeuvre de manière séquentielle.

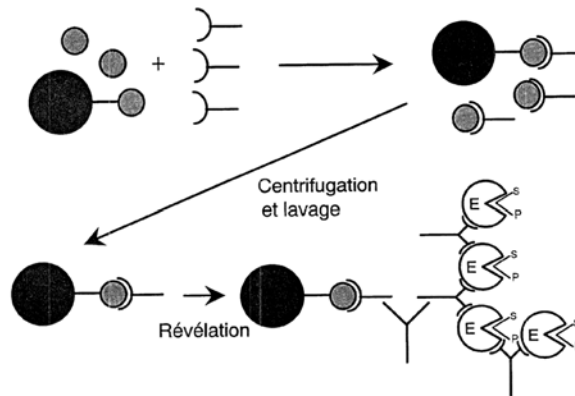


Figure II-31. Méthode CEIIA.

La révélation grâce au complexe peroxydase anti-peroxydase ou phosphatase alcaline anti-phosphatase alcaline est actuellement d'utilisation très générale.

- méthode DASP ("Double Antibody Solid Phase") : les complexes analyte – anticorps sont séparés des éléments libres par un deuxième anticorps fixé sur une particule solide (Figure II-32). Ce deuxième anticorps peut être le même que celui de la première phase ou être un anticorps anti-anticorps. Le dosage est réalisé dans le surnageant après centrifugation.

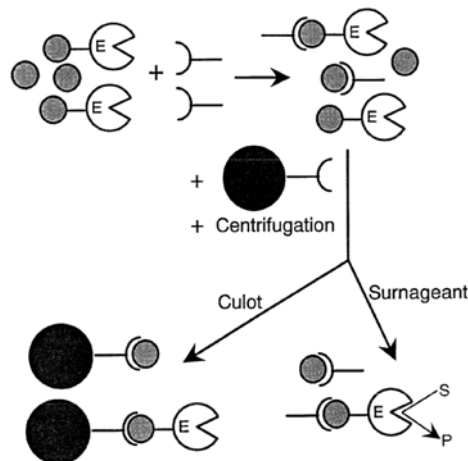


Figure II-32. Méthode DASP.

- méthode IEMA ("Immuno Enzymo-Metric Assay") ou méthode immunoenzymométrique (Figure II-33). Elle est dérivée de la méthode IRMA ("Immuno Radio Metric Assay") et s'applique aussi en fluorescence (IFMA : "Immuno-Fluoro-Metric Assay") comme en luminescence (ILMA : "Immuno-Lumino-Metric Assay"). Elle utilise un anticorps marqué et non un analyte marqué. L'anticorps marqué non lié à

l'analyte à doser à l'issue de la phase d'incubation en milieu liquide est récupéré dans un deuxième temps par fixation sur l'analyte couplé à la phase hétérogène. Après lavage, l'activité fixée sur la phase solide est déterminée.

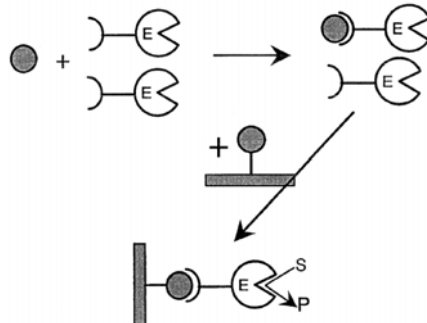


Figure II-33. Méthode immuno-enzymométrique.

Le même principe s'applique à toutes les méthodes immunométriques, quel que soit le marqueur.

c. Révélation du complexe antigène - anticorps

En fonction des descriptions précédentes, il apparaît clairement deux types de méthodes :

- les méthodes spécifiques: l'élément marqué est strictement spécifique du dosage à réaliser. Ceci est obligatoire lorsque c'est l'analyte qui est marqué et facultatif lorsque c'est l'anticorps qui est marqué.

- les méthodes universelles sont applicables à toutes les techniques où l'anticorps est marqué. Dans ce cas l'anticorps spécifique de l'analyte (ou anticorps primaire) n'est pas marqué ; le complexe analyte - anticorps est révélé par l'utilisation d'un deuxième anticorps (anticorps secondaire anti-immunoglobuline) qui est marqué : c'est le cas de la méthode double Sandwich (Figure II-26). Le marquage de l'anticorps secondaire par l'enzyme peut être direct ou indirect (par l'intermédiaire de la biotine). Ce type de révélation évite d'avoir à marquer spécifiquement l'anticorps et bénéficie de la disponibilité commerciale abondante d'anticorps marqués à un coût raisonnable. Intéressante lors de la mise au point d'un dosage, l'intérêt en biochimie clinique peut être limité par le fait qu'une étape supplémentaire est ajoutée à l'analyse, d'où augmentation de la durée de l'analyse et automatisation plus difficile.

Il est possible d'accroître la sensibilité de la révélation du complexe par différents artifices, ce qui apporte certains avantages :

- diminuer la quantité d'anticorps ou d'antigène marqué à utiliser (qui peut être un facteur limitant en terme de coût) ;

- diminuer la quantité d'échantillon à analyser (une dilution plus grande permet de diminuer les interférences dues à des réactions non spécifiques) ;

- permettre de doser des molécules présentes en quantité très faible.

En photométrie d'absorption moléculaire, on utilise :

- le système avidine - biotine : la biotine est une vitamine de petite taille (présente dans le jaune d'oeuf) liée très fortement et très spécifiquement par une protéine (présente dans le blanc d'oeuf), l'avidine. En pratique, l'avidine extraite d'un streptocoque (streptavidine) est préférée à l'avidine, du fait de propriétés physico-chimiques et de fixation plus intéressantes, car pouvant lier 4 molécules de biotine. Une molécule d'anticorps peut fixer plusieurs molécules de biotine, qui seront chacune révélées par une molécule de streptavidine couplée à l'enzyme (Figure II-34). La sensibilité est encore accrue par l'utilisation de la méthode ABC ("avidine - biotin complex"), possible car la streptavidine peut lier 4 molécules de biotine (Figure II-35) : à chaque biotine fixée sur l'anticorps correspondra un grand nombre de molécules enzymatiques.

- le système peroxydase - antiperoxydase (méthode PAP) ou phosphatase alcaline - anti-phosphatase alcaline (méthode APAAP) : complexe formé de plusieurs molécules de peroxydase ou de phosphatase alcaline reliées par des anticorps antiperoxydase (ou antiphosphatase alcaline). L'anticorps primaire est lié à ce complexe par un anticorps secondaire reconnaissant à la fois l'anticorps primaire et l'anticorps

anti-enzyme, dans la mesure évidemment où ces deux anticorps ont été produits chez le même animal (Figure II-32). L'activité enzymatique est mesurée après dissociation du complexe.

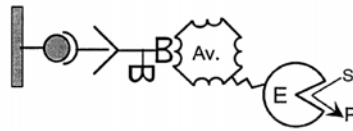


Figure II-34. Révélation universelle par une enzyme marquée par l'avidine.
L'anticorps secondaire est marqué par la biotine.

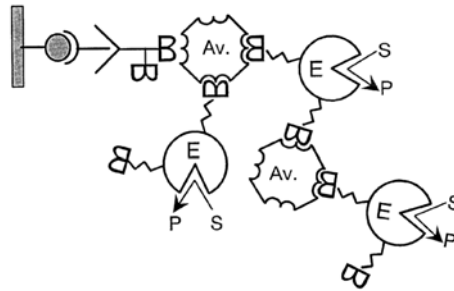
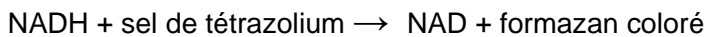


Figure II-35. Amplification du signal par le système « complexe avidine-biotine ».
La biotine est fixée sur l'anticorps secondaire et l'enzyme.

- l'amplification enzymatique: l'enzyme traceur doit libérer ou consommer du NADH ou du NADPH, utilisable dans un cycle d'amplification analogue à celui décrit au paragraphe I-H-3. Cette technique est facilement utilisable avec les anticorps marqués à la phosphatase alcaline: cette enzyme fournit du NAD à partir du NADP. Le NAD est ensuite utilisé dans un cycle d'oxydo-réduction, associant deux enzymes, l'alcool déshydrogénase et une diaphorase :



- utilisation de la fluorescence : technique immunofluoroenzymatique (ELFIA : "Enzyme Unked Fluoro immuno Assay"). Elle est facilement adaptable si l'enzyme couplée est la β -galactosidase dont le substrat peut être une galactosyl-ombelliférone donnant un composé fluorescent après action de l'enzyme ou si l'enzyme couplée utilise du NAD.

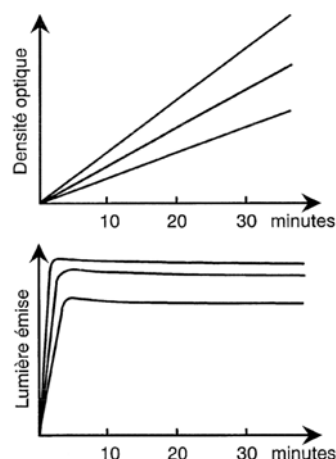


Figure II-36. Comparaison des signaux obtenus en immunoenzymologie et immunoluminescence.

- utilisation de la luminescence, possible avec les peroxydases (enzymochimiluminescence) : l'utilisation de la peroxydase du raifort ("horseradish peroxidase" ou HRP) et d'activateurs tels que la luciférine, divers benzothiazoles ou dérivés phénoliques, permet d'obtenir un signal lumineux intense, prolongé et stable. La rapidité d'obtention de ce signal confère un avantage à cette technique par rapport aux méthodes enzymatiques (Figure II-36), ce qui explique le développement rapide de cette technologie avec des automates appropriés. Dans le système Amerlite d'Amersham, le signal lumineux produit par un conjugué luminol - peroxydase est amplifié ($\times 2.500$) et prolongé (> 10 mn) par la présence de dérivés phénoliques (p-indophénol, p-phénylphénol) (limite de détection à 5.10^{-19} mole).

4. Dosages immunoenzymatiques en phase homogène

Ces méthodes, apparues en 1972, ont des caractéristiques communes :

- l'absence de réactions de séparation facilite l'automatisation et procure un gain de temps ;
- cette rapidité compense leur sensibilité plus faible par rapport aux méthodes en phase hétérogène ;
- elles utilisent toujours la compétition entre l'antigène à doser et l'haptène, couplé à l'un des éléments de la réaction enzymatique ;

Elles sont bien adaptées au dosage des haptènes. Un de leur domaine majeur d'application est celui du dosage des médicaments (barbituriques, diazépines, morphine et dérivés, amphétamines, tonocardiaques, etc.) : elles rendent possibles la surveillance personnalisée de nombreux traitements.

Trois enzymes sont principalement utilisées: le lysozyme, la malate déshydrogénase et la glucose-6-phosphate déshydrogénase.

Le principe général est la modification d'une activité enzymatique lors de la réalisation du complexe antigène - anticorps. L'antigène haptène peut être fixé sur un des éléments intervenant dans la réaction enzymatique, ce qui entraîne selon les cas l'augmentation ou la diminution de l'activité enzymatique.

a. Méthodes en phase homogène vraie

Dans ces méthodes, l'élément sur lequel l'haptène est fixé est variable :

- L'enzyme lui-même dans la méthode EMIT ("Enzyme Multiplied Immunoassay Technique") (figure II-37). Le NAD peut également être mesuré en fluorescence (technique immunofluoroenzymatique en phase homogène). La fixation des anticorps sur l'haptène va diminuer l'activité enzymatique (cas de la glucose-6-phosphate déshydrogénase) ou au contraire la restaurer (cas de la malate déshydrogénase). Le mécanisme de cet effet est rattaché selon les cas soit à une gêne stérique (masquage du site catalytique par l'anticorps) soit à un changement de conformation de la protéine enzymatique.

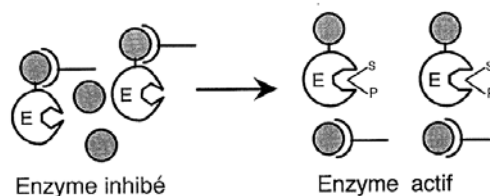


Figure II-37. Principe de la méthode EMIT en phase homogène.

Modification de la conformation du site catalytique de l'enzyme lorsque l'anticorps est fixé à l'analyte.

- un inhibiteur de l'enzyme (EU: "Enzyme Inhibition Immunoassay") ou plus généralement un modulateur de l'activité de l'enzyme (EMMIA : "Enzyme Modulator Mediated Immunoassay"). L'haptène est couplé au modulateur, qui ne peut plus agir sur l'enzyme s'il est impliqué dans le complexe antigène anticorps.

- un coenzyme de la réaction : méthode ARIS ("Apoenzyme Reactivation Immunoassay System").
- le substrat de l'enzyme : méthode SLFIA ("Substrate labelled Fluoro Immunoassay")
- un fragment de l'enzyme : méthode CEDIA ("Cloned Enzyme Donor Immuno Assay").

Cette méthode utilise 2 fragments de β -galactosidase obtenus par génie génétique. Les deux fragments séparés sont inactifs et l'un des fragments est couplé à l'antigène à doser. Si l'antigène n'est pas lié à un anticorps, il peut se combiner à l'autre fragment et former avec lui une enzyme active.

b. méthodes intermédiaires ou mixtes

Des méthodes intermédiaires utilisent des réactifs immobilisés sur une phase hétérogène. Seule la réaction immobilisant le complexe antigène - anticorps sur la phase hétérogène permet le déclenchement de la réaction enzymatique qui ne peut avoir lieu en milieu liquide. Il n'est pas nécessaire, comme dans les méthodes en phase hétérogène vraies, d'introduire une étape de séparation :

- méthode BEIA ("Bioluminescent Immuno Enzymatic Assay") (Figure II-38). La fixation de l'anticorps marqué initie la réaction de bioluminescence. La formation du NADH dans le milieu liquide est possible, mais il ne peut intervenir dans la luminescence, car il est détruit par un autre système enzymatique soluble.

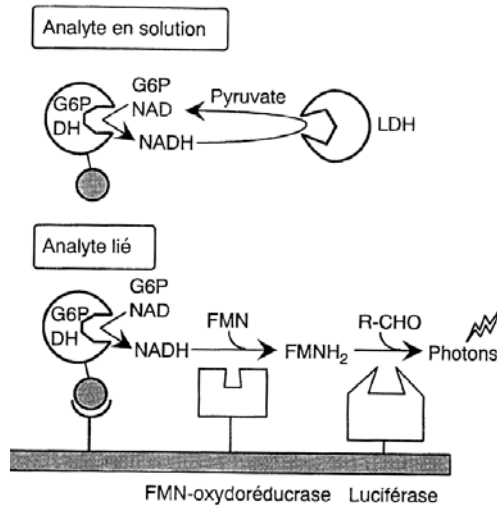


Figure II-38. Principe de la méthode BEIA

En haut, réaction en solution; en bas, réaction sur les éléments fixés à la surface du

- méthode ECIA ("Enzyme Channeling immuno Assay") utilisant la coopérativité entre deux enzymes, et fondée sur un principe voisin du précédent: une enzyme est fixée sur la phase hétérogène, l'autre sur l'anticorps. Seule la fixation de l'anticorps marqué sur la phase hétérogène "canalise" le substrat entre les deux enzymes et permet le déroulement la réaction mesurée.

5. L'immunofluorescence

a. Les méthodes classiques

Ces méthodes ajoutent à la spécificité de la réaction immunologique la sensibilité des mesures de fluorescence. L'exactitude et la précision des dosages sont en général plutôt meilleurs que celles obtenues avec les méthodes immunoenzymatiques, mais les principes des réactions sont superposables, le fluorochrome remplaçant l'enzyme. La principale difficulté réside dans la fluorescence endogène du sérum, donnant un fort bruit de fond, variable d'ailleurs selon de nombreux facteurs (concentration du complexe albumine/bilirubine, vitamines, médicaments, etc..). Les interférences sont importantes, surtout entre 340 et 500 nm et peuvent être contournées de différentes façons :

- réalisation d'un blanc, permettant de soustraire la fluorescence non spécifique; mais ceci ajoute une étape supplémentaire à l'analyse.
- dilution des sérums, mais on a une perte de sensibilité.
- mesure de la cinétique de la réaction, plus simple et plus rapide.
- utilisation de composés dont les spectres d'émission sont déplacés dans le rouge bien au-delà de 500 nm (brevet SYVA).

b. L'immunofluorimétrie en temps résolu (TR-FIA : "Time Resolution Fluoro Immuno Assay")

Cette méthode est rendue possible par le développement de composés ayant une fluorescence longue (10⁻⁴ s) et l'utilisation de lampes éclairs. La mesure de fluorescence peut alors être mesurée après

disparition de la lumière incidente excitatrice. On utilise un lanthanide couplé à j'anticorps, notamment l'euporium. L'euporium est par lui-même peu fluorescent. La fluorescence est développée par l'addition d'une solution de développement qui augmente la fluorescence d'un facteur 10^6 . La technique DELFIA ("Development Enhanced Lanthanide Fluoro Immuno Assay") est une technique par méthode sandwich qui permet de détecter jusqu'à 10^{-17} mole d'Euporium par cuvette réactionnelle. On atteint ainsi la sensibilité de la RIA, même si la gamme de dosage est peut-être un peu plus étroite. Il faut évidemment utiliser un fluorimètre spécial adapté à ce type de mesure.

c. La polarisation de fluorescence (FPIA : "Fluorescence Polarisation Immuno Assay")

La fluorescéine est fixée sur le traceur qui entre en compétition avec la substance à doser vis à vis de l'anticorps. Si le traceur reste libre, sa vitesse de rotation est élevée et la polarisation de la lumière fluorescente est pratiquement nulle. Si le traceur est fixé sur l'anticorps, la rotation du complexe est plus faible et la polarisation de la lumière fluorescente sera plus importante.

- polarisation faible: forte concentration de la substance à doser
- polarisation forte: faible concentration de la substance à doser.

La méthode est automatisée et permet d'avoir le résultat d'un dosage de médicament en 20 mn. Elle nécessite un fluorimètre spécial (cf chapitre III).

d. L'immunofluorimétrie par transfert d'énergie (FETIA : "Fluorescent Energy Transfer Immuno Assay")

Réalisable sur un fluorimètre standard, elle utilise deux traceurs en même temps: fluorescéine antigène et rhodamine anticorps. Lorsqu'il y a formation du complexe antigène marqué - anticorps marqué, la fluorescence de la fluorescéine est captée par la rhodamine (quenching). L'extinction de fluorescence est inversement proportionnelle à la quantité d'antigène libre.

e. La protection de fluorescence

La méthode met en oeuvre l'analyte-fluorescéine et un anticorps anti-fluorescéine. Si l'analyte marqué est lié à son anticorps, l'anticorps anti-fluorescéine ne peut plus se fixer. La fluorescence sera d'autant plus forte qu'il y a plus d'antigène libre à doser.

III. Conclusion

1. Décrypter la représentation d'un dosage immunologique

Il est vain de vouloir tenter de mémoriser tous les sigles, les noms et le détail de chacune des méthodes exposées. Il est en général relativement simple et facile de décrypter les schémas réactionnels et de décrire une méthode à partir d'eux, permettant en outre d'en analyser les avantages et les inconvénients éventuels. La méthode logique repose sur la considération successive de plusieurs points :

a. Identification des éléments de la réaction

La représentation des anticorps est habituellement celle d'un Y plus ou moins sophistiqué, dont les deux branches tournées vers le haut peuvent avoir une forme variable, selon la géométrie adoptée pour la représentation de l'antigène. Les schémas ci-dessus utilisent ainsi plusieurs types de représentation.

La représentation de l'anticorps est beaucoup plus variable, depuis la représentation presque exacte de la molécule, jusqu'à un symbolisme plus complet. La présence de cette représentation entre les branches de l'Y de l'anticorps révèle qu'il s'agit d'un antigène. L'existence de plusieurs épitopes sera souvent évidente, soit parce qu'il y a deux anticorps fixés sur l'antigène, soit parce que deux ou plus formes géométriques différentes sont utilisées sur le même antigène.

La présence d'une phase solide est la plupart du temps évidente (trait plus ou moins épais, grosse structure illustrant une particule latex ou autre,...).

b. Identification de l'élément dosé

Elle peut être souvent évidente, mais requiert parfois une analyse plus systématique, prenant en considération les éléments suivants :

- repérage des éléments ajoutés au milieu réactionnel : les éléments ajoutés, qui ne peuvent donc être ceux qu'on cherche à doser, sont :

- + la phase hétérogène et les éléments fixés directement sur cette phase
- + les éléments marqués par une enzyme, un fluorochrome, un luminophore, etc...

Le représentation de deux éléments identiques, l'un marqué et l'autre non marqué, traduit à coup sûr que l'élément non marqué est celui qu'on cherche à doser et que la méthode fait intervenir une compétition.

c. Reconstitution des étapes de la réaction

Cette question se pose essentiellement pour les méthodes utilisant une phase hétérogène et un repérage indirect du complexe antigène – anticorps. Cette analyse permet de reconnaître l'aspect qui a été privilégié dans la question :

- aspect économique : utilisation d'un élément « universel » pour la fixation ou la génération du signal ;
- la sensibilité : utilisation d'éléments d'amplification, de fluorochrome ou de luminophore ;
- la praticabilité : facilité d'automatisation, gain de temps,...

Par souci de simplification, seul l'édifice final est fréquemment représenté. On peut cependant trouver des représentations (comme dans les paragraphes précédents) faisant intervenir un schéma réactionnel. Cependant, un certain nombre de réactions peuvent être conçues de façon simultanée ou séquentielle et être représentées selon l'une ou l'autre des deux modalités précédentes. La distinction n'est pas forcément évidente dans les schémas.

L'identification des étapes d'incubation et de rinçage est primordiale ;

- incubation ; la réalisation de l'équilibre (état stable) de la réaction antigène – anticorps nécessite un temps d'incubation, variable selon l'avidité de l'anticorps pour l'antigène ;
- les étapes de rinçage permettent :

- + d'éliminer les éléments qui n'ont pas réagi et qui pourraient interférer avec l'étape suivante.

Dans les conceptions séquentielles, un rinçage est introduit avant tout ajout de l'élément suivant ;

- + d'éliminer l'élément marqué non lié à la phase hétérogène, étape de toute façon indispensable avant le dosage final.

Au final, cette analyse permet de décrire le cahier des charges pour l'appareil sur lequel le dosage sera réalisé et les contraintes qu'il devra gérer.

2. chimie liquide" et "chimie sèche"

La biochimie clinique quantitative a longtemps été une chimie liquide : la grandeur mesurée était facilement accessible avec une très grande précision à l'aide d'appareils relativement simples utilisant les lois bien connues de transmission de la lumière dans des milieux transparents. La chimie sèche a d'abord été développée pour des déterminations qualitatives ou semi-quantitatives dans les urines, sous forme de bandelettes réactives. L'amélioration des matériaux et une meilleure connaissance des procédés de mesure de la lumière en réflexion ont permis le développement d'une chimie sèche quantitative qui est devenue aussi performante que la chimie liquide traditionnelle. Le terme de chimie sèche est d'ailleurs impropre bien que consacré par l'usage : seuls les supports et les réactifs sont à l'état sec lors de leur conservation, mais ils sont humidifiés par l'échantillon et parfois par de très faibles volumes de réactifs; on devrait parler de chimie sur support de réactif sec. Les supports sont adaptables à de nombreuses méthodes enzymatiques ou immunologiques en phase hétérogène décrites dans les paragraphes de ce chapitre. Leur simplicité, la facilité de la mise en oeuvre et de la gestion des déchets, leurs performances permettent le développement théorique d'un grand nombre de méditests ou autotest. Pour les méthodes immunologiques, des systèmes multianalytiques sur une même phase solide sont réalisables. Il est même envisagé dans le futur la réalisation de compact-discs microanalytique d'immunologie : sur une petite surface (1 cm²) un millier d'analytes pourraient être déposés ; après incubation avec le sérum et les réactifs de révélation, la lecture du résultat serait effectuée par laser sur chaque point³. Différents aspects de l'automatisation de la chimie sèche seront décrits dans le chapitre V.

³ Annales de Biologie Clinique 50 (1992) 337-353.

Chapitre III

Les appareils de mesure

La réalisation des mesures quantitatives dont les principes viennent d'être analysés repose sur un petit nombre de types d'appareillages présentés dans ce chapitre. L'adaptation et l'insertion de certains de ces appareils dans un automate seront présentées au chapitre V.

1. Photométrie d'absorption moléculaire

La plupart des substances organiques ont la propriété d'absorber, avec dégagement simultané de chaleur et de façon plus ou moins sélective, l'énergie de rayonnement de certaines longueurs d'onde, fournissant un spectre caractéristique : une substance est caractérisée à chaque longueur par son coefficient d'extinction moléculaire ϵ . La mesure de la lumière non absorbée, transmise ou réfléchie, est à la base de la photométrie d'absorption moléculaire : elle permet de déduire la quantité de lumière absorbée et donc la quantité de substance dans certaines conditions.

La lumière est une onde électromagnétique propagée en ligne droite, dont la vitesse dans le vide c est reliée à la fréquence ν et à la longueur d'onde λ :

$$c = \nu \times \lambda$$

Par l'intermédiaire de la constante de Planck h , l'énergie de la radiation E s'écrit

$$E = h \times \nu \text{ ou } E = h \times c / \lambda$$

L'énergie de la radiation augmente lorsque la longueur d'onde diminue. Les domaines utilisés en biochimie clinique sont essentiellement l'ultraviolet (UV, 200-400 nm) et le visible (400-800 nm).

Les mesures photométriques sont les méthodes les plus couramment utilisées dans les laboratoires aussi bien à l'aide de photomètres ou spectrophotomètres isolés que dans les modules de mesure des automates. Ces mesures sont réalisées principalement en transmission sur milieu liquide, mais aussi, et de plus en plus, par réflexion sur milieu solide.

A. Photométrie d'absorption moléculaire en transmission

1. La loi de Beer-Lambert et ses applications

La transmission T d'une lumière d'intensité I_0 (lumière incidente) à travers un liquide est représentée par la relation :

$$T = I_t / I_0$$

ou, en pourcentage de transmission :

$$\%T = (I_t / I_0) \cdot 100$$

Expérimentalement, si l'épaisseur traversée augmente linéairement, l'intensité transmise diminue de manière logarithmique. Cette diminution est notée E (extinction), ou A (absorbance), ou D.O. ou O.D. (densité optique ou "optical density") et s'écrit :

$$E = A = DO = OD = - \log T = k \cdot l$$

Le coefficient k dépend de la concentration molaire de la substance C (mole/litre) et du coefficient d'absorption moléculaire de cette substance ϵ . La formulation de la loi de Beer-Lambert devient donc :

$$DO = \epsilon \cdot c \cdot l$$

L'utilisation de ϵ pour le calcul de c à partir de la densité optique suppose que la lumière utilisée soit rigoureusement monochromatique, puisque ce coefficient varie avec la longueur d'onde.

La longueur l (ou d ou t) de solution traversée par le faisceau définit le trajet optique de la solution absorbante.

Deux applications de cette loi sont possibles (Figure III-1).

a. La mesure à trajet optique fixe

Dans les photomètres et les automates, la fixité et la valeur de cette longueur sont imposées par la géométrie de la cuve de mesure. La valeur de la concentration de substance est calculée directement à partir de la densité optique. La précision et l'exactitude de la mesure dépendent de la précision et de l'exactitude des volumes de réactifs et des volumes d'échantillon. Traditionnellement, un trajet optique de 1 cm est utilisé, car il facilite les calculs ; avec l'informatisation des appareils, l'utilisation de cette valeur n'a plus de justification.

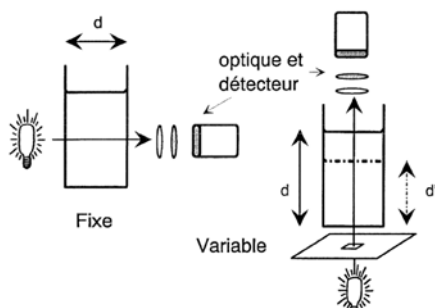


Figure III-1. Les deux types de mesures par photométrie d'absorption en transmission.

A gauche: à trajet optique d fixe (la longueur de la cuve doit être précise) ; à droite: à trajet optique variable (la surface du faisceau doit être précise).

b. La mesure à trajet optique variable

L'utilisation d'une légère modification de la loi de Beer-Lambert permet de simplifier certains problèmes.

La concentration c d'une substance dans un volume v dépend de la masse de cette substance présente dans ce volume :

$$c = m/v$$

Le volume v responsable de la valeur mesurée dépend de la surface du faisceau lumineux s et du trajet optique :

$$v = s \cdot l$$

En reportant ces éléments dans l'équation de la loi de Beer-Lambert, la masse de substance est donnée par la relation

$$m = DO \cdot s / \varepsilon$$

La masse de substance est directement proportionnelle à la densité optique (dans la mesure où la surface du faisceau est parfaitement connue et rigoureusement constante, et indépendante de la longueur de solution traversée. La longueur du trajet optique peut être sans problème supérieure au 1 cm habituellement utilisé, ce qui donne des DO plus importantes et permet de doser des échantillons à faible teneur. Les erreurs sur le volume de réactif deviennent sans grande importance, seul le volume d'échantillon doit être extrêmement précis.

2. Les éléments du photomètre

Les astuces de montage peuvent être très variables selon le type d'appareil, mais on retrouve toujours les éléments de base décrits dans la figure III-2, qui sont représentés alignés comme simple illustration du principe général.

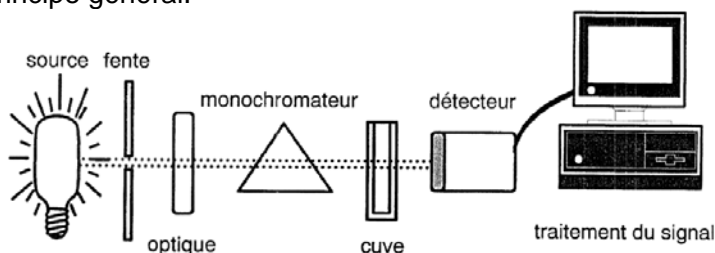


Figure III-2. Schéma simplifié d'un photomètre d'absorption en transmission.

a. La source lumineuse

La nature de la source lumineuse conduit à distinguer deux familles de photomètres :

- photomètre à lignes spectrales : on emploie une lampe qui émet une lumière de spectre discontinu (spectre de raies). La position des bandes de ces sources est bien connue, et à l'aide de filtres, on obtient vraiment une lumière monochromatique, avec une largeur de bande d'environ 1 nm. Les calculs utilisant la valeur exacte du coefficient d'extinction moléculaire sont ainsi très fiables, mais la souplesse d'utilisation est moindre que dans le cas suivant.

- photomètre spectral ou spectrophotomètre : au moyen d'un monochromateur, on peut isoler chaque longueur d'onde d'une source émettant une lumière à spectre continu. Mais la largeur de la bande ainsi isolée est plus grande que dans le cas précédent et un monochromatisme satisfaisant n'est atteint que par l'adjonction de filtres appropriés. L'avantage de ce type de photomètre est de permettre une très grande souplesse, puisque toutes les longueurs d'onde sont théoriquement utilisables. Ils permettent d'établir les spectres d'absorption des molécules.

Les lampes sont très variées, et permettent (avec d'autres éléments) de distinguer dans quelle gamme de qualité se situe l'appareil :

- à filament de tungstène : source stable, peu chère, fournissant un spectre continu couvrant tout le domaine visible. La durée de vie est cependant limitée par le noircissement de l'enveloppe de verre, causé par l'évaporation du tungstène, ce qui entraîne des dérives dans les résultats.

- lampe tungstène-halogène : filament de tungstène dans une enveloppe de quartz remplie d'un halogène. La lumière émise est plus forte, car elles fonctionnent à température plus élevée. La durée de vie est plus longue, car l'halogène évite la déposition du tungstène sur le quartz. L'halogène permet en outre d'obtenir une lumière dans le proche UV.

- lampe à décharge dans des gaz raréfiés : elles constituent les principales sources de radiations ultraviolettes.

- lampe à hydrogène H₂ ou deutérium D₂ : fournissent un spectre continu jusqu'à 375 nm et sont en quartz. Elles nécessitent un courant continu et régulé.

- lampe au xénon : de plus en plus utilisée, car donnant une lumière intense avec un spectre continu entre 200 et 700 nm. En outre, elle peut fonctionner en mode éclair, avec une alimentation stroboscopique. Le signal mesuré pendant la période noire permet de soustraire le bruit de fond permanent du système.

- lampe à vapeur de mercure : elle donne un rayonnement discontinu très intense (313, 334, 365, 404-407, etc...). Il faut un peu de néon ou d'argon dans la lampe. Le mercure, en gouttelettes, se vaporise sous l'effet de la chaleur provoquée par la décharge électrique. L'arc électrique amorcé entre les deux électrodes excite les molécules du gaz. Il y a trois types de lampes :

+ froide à basse pression (< 1 mm Hg), donnant des radiations peu intenses.

+ chaude à pression moyenne (1 atm), la plus utilisée, mais nécessite un système de ventilation pour le refroidissement.

+ chaude à surpression, nécessitant en outre une enveloppe de refroidissement.

Les diodes photoémettrices émettent une lumière dans le visible dont la longueur d'onde dépend de leur composition chimique. Elles sont parfois utilisées dans certains automates spécialisés, mais la versatilité est faible et ne permet pas un usage général.

Les photomètres UV - visibles permettant de couvrir tout le spectre utile en biochimie courante comportent ainsi la plupart du temps deux types de sources. Le basculement entre les deux, manuel ou automatique, sélectionne la source appropriée en fonction de la longueur d'onde choisie.

Les fentes et dispositifs optiques délimitent la source optique réelle ; ce sont des dispositifs plus ou moins complexes permettant :

- de concentrer le faisceau lumineux et de sélectionner sa largeur ou sa surface, ce qui a une influence sur son intensité.

- d'assurer le parallélisme du faisceau, ce qui permet d'obtenir un meilleur fonctionnement des filtres et des réseaux.

Les fentes ont une taille réglable par un mécanisme très précis (réglage au micron) et les bords ne doivent pas être détériorés (création de diffractions parasites). Elles doivent toujours être ouvertes au maximum lors du transport de l'appareil.

L'utilisation éventuelle de différents types de miroir permet de classer les photomètres en fonction du nombre de faisceaux lumineux utilisés :

- l'appareil simple faisceau ne réalise qu'une mesure à la fois. C'est le plus simple au point de vue optique. Le couplage à un microprocesseur permet de garder en mémoire et de soustraire automatiquement la valeur du zéro lue précédemment. L'appareil simple faisceau peut comporter deux détecteurs, permettant la mesure concomitante de la lumière incidente donnant le 100 % de transmission.

- dans les appareils à double faisceau, à l'aide de dispositifs optiques particuliers, deux cuves sont traversées alternativement (miroir tournant) ou simultanément (semi-miroir) par des faisceaux identiques dont les intensités mesurées sont comparées. Ceci permet de toujours conserver une cuve témoin, automatiquement soustraite de la cuve échantillon. On obtient ainsi une grande stabilité de la mesure: une variation de l'alimentation électrique affecte les deux mesures de manière identique.

b. Le monochromateur

Le monochromateur représente l'ensemble des dispositifs permettant de décomposer la lumière et de sélectionner la longueur d'onde voulue.

Le plus ancien procédé de décomposition de la lumière est représenté par le prisme en verre ou en quartz, monté sur une plaque tournante. Mais l'étalement des longueurs d'onde n'est pas identique sur tout le spectre.

Actuellement, dans les bons photomètres, on utilise le plus souvent un réseau de réflexion. Une surface métallique plane est striée de centaines de raies parallèles par mm. La lumière blanche incidente est renvoyée comme une série de spectres superposés. La rotation du réseau permet d'avoir accès à toutes les longueurs d'onde, grâce à des montages particuliers dérivés de la méthode de Czerny-Turner (Figure III-3). Les réseaux sont en général plus dispersifs que les prismes, mais les pertes lumineuses sont supérieures. Il existe des réseaux concaves fournissant un faisceau lumineux convergent directement dans la cuve, ce qui simplifie ou fait disparaître certains éléments des systèmes optiques.

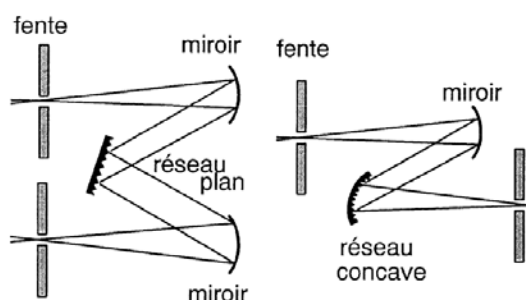


Figure III-3. Le montage des réseaux plans et concaves.

A gauche, montage de Czerny-Turner.

Les réseaux sont les seuls utilisés en UV où le verre absorbe.

Les filtres ajoutés à l'élément dispersif permettent d'améliorer le monochromatisme. Ils sont caractérisés par leur longueur d'onde de transmission maximale et leur bande passante (figure III-4). Un bon filtre doit avoir une bande passante inférieure à 10 nm.

Les filtres colorés, en verre ou en gélatine, peu coûteux mais peu précis ne sont plus guère utilisés.

Les filtres interférentiels sont beaucoup plus performants ; ils sont constitués d'un empilement de lames de verre où sont déposées de minces couches métalliques, formant miroir, créant des indices de réfraction différents. La traversée d'un faisceau lumineux fournit ainsi des interférences

qui entraînent une élimination plus ou moins complète de certaines radiations et une transmission intégrale des autres. Selon l'appareil, les filtres sont changés manuellement ou automatiquement (montés sur des roues tournantes) ; ils sont choisis pour fournir les longueurs d'onde les plus couramment utilisées dans les dosages de routine.

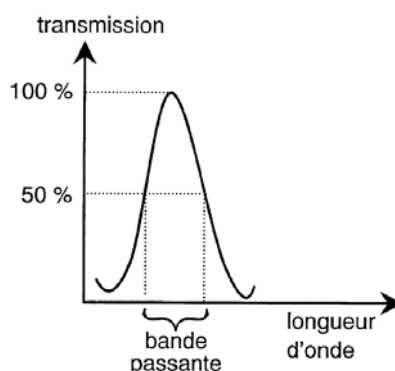


Figure III-4. Définition de la largeur de la bande passante d'un filtre.

L'exactitude des longueurs d'onde doit être régulièrement contrôlée : on utilise des solutions aqueuses (50 g/l) soit de perchlorate d'holmium (bandes à 345, 360.9, 415, 420, 450, 466 nm) soit de nitrate d'holmium (bandes à 347, 362, 416,5, 451, 474 nm).

c. Les cuves

Les cuves font partie intégrante du dispositif optique et leur qualité doit être aussi soignée que celle des autres éléments. Elles peuvent être classées de différentes façons (Figure III-5) :

- selon leur taille : pour les méthodes macro- (3 ml), semi-micro- ou micro (0,1 ml).
- selon le matériau :

- en quartz, pour travailler dans l'UV, avec une limite de perméabilité optique vers 200 nm.
- en verre, pour le visible et le proche UV. Limite de perméabilité optique vers 320 nm.

- en polystyrène, à usage unique et de faible coût, permettant d'éviter la contamination entre les dosages. La transmission est très satisfaisante (> 95 %) au-dessus de 400 nm. Elles sont de plus en plus utilisées en biochimie clinique.

- selon leur principe :

- sans circulation de fluide (cuve ordinaire, avec remplissage et vidange manuelle).
à vidange

- à circulation. Les microcuves à circulation, remplies et vidées par une pompe péristaltique permettent d'effectuer facilement des mesures sur quelques dizaines à quelques centaines de microlitres et offrent une plus grande sécurité pour le technicien lors de la manipulation de réactifs toxiques ou corrosifs.

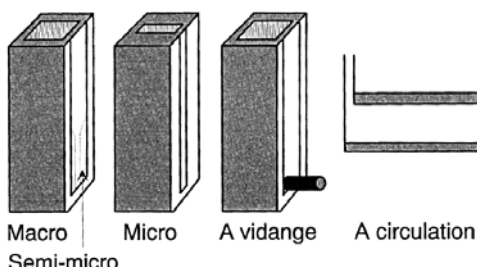


Figure III-5. Les cuves utilisées en photométrie d'absorption.

La thermostatisation des cuves est assurée par différents procédés :

- circulation d'eau dans le porte cuve

- élément de chauffage par effet Peltier entourant les microcuves à circulation. Ces éléments sont constitués de deux jonctions métalliques à chaque extrémité d'un semi-conducteur.

La qualité de la thermostatisation des cuves peut être étudiée à l'aide de solutions dont le pH varie en fonction de la température, entraînant des variations d'absorbance. Par exemple, le rouge de crésol à 30 mg/l passe d'une DO d'environ 0,9 à 0,5 entre 25 et 37° C. Cette technique est adaptable à la vérification de la thermostatisation des automates¹.

Les cuves sont disposées dans une enceinte obscure pour éviter les interférences des lumières parasites. Elles peuvent être isolées ou montées sur un ensemble permettant de réaliser de manière automatique plusieurs dosages : roue tournante, rack mobile.

d. Détecteurs d'intensité lumineuse

Les photocellules, type indicateur photographique, et les phototubes ne sont plus utilisés pour les appareils de bon niveau. Dans les phototubes, la surface photosensible est incorporée dans une enveloppe de verre ou de silice sous vide. Les électrons libérés de cette surface par le faisceau lumineux sont collectés par une grille. Généralement, deux tubes, l'un sensible au rouge, l'autre au bleu, sont nécessaires pour couvrir la totalité des longueurs d'onde.

Les éléments utilisés actuellement sont :

- Les photomultiplicateurs (PM) plus sensibles et avec une réponse plus rapide que celle des phototubes. Les électrons libérés par le faisceau lumineux frappant la photocathode tombent sur une première électrode appelée dynode portée à un potentiel supérieur. Pour chaque électron incident, plusieurs électrons sont réémis, qui tombent sur la dynode suivante de potentiel plus élevé. Le nombre de dynodes conditionne l'amplification obtenue. L'ensemble des électrons réémis est collecté sur l'anode. L'ensemble des dynodes est rassemblé dans une enveloppe où la pression est la plus faible possible. Les tensions appliquées et la chaleur dégagée conduisent à l'émission d'un bruit de fond plus ou moins important. Le temps de réponse des photomultiplicateurs est variable selon leur géométrie et les tensions utilisées. On distingue :

- + les PM à fenêtre latérale, les plus simples et les moins chers ;
- + les PM avec fenêtre en bout, donnant une meilleure amplification, car pouvant contenir plus de dynodes, et meilleurs, car ayant une photocathode plus grande. Ils sont plus coûteux (figure III-6).

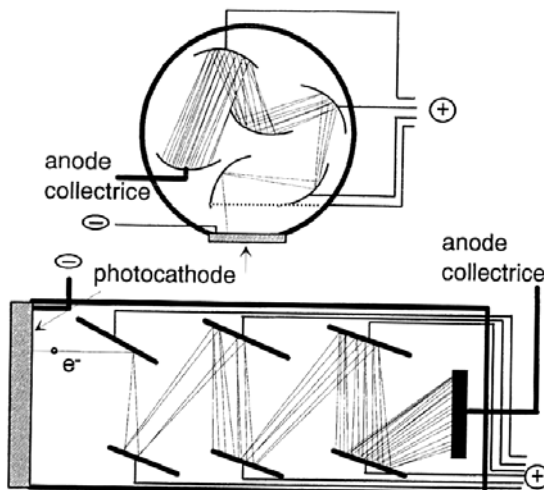


Figure III-6. Les photomultiplicateurs.

En haut, à fenêtre latérale. En bas, à fenêtre en bout.

- Les détecteurs photovoltaïques au silicium sont d'introduction plus récente. Une jonction p-n au silicium fonctionne en mode photovoltaïque quand aucune tension n'est appliquée à ses bornes. Ces détecteurs présentent de nombreux avantages : le bruit de fond est plus faible

¹ Annales de Biologie Clinique 46 (1988) 281-287.

qu'avec les PM, car il n'y a pas de tension aux bornes ; grande linéarité dans une gamme spectrale étendue (185 à 1100 nm) ; coût moins élevé que les PM à spécifications égales ; grande fiabilité des semi-conducteurs par rapport aux tubes à vide nécessaires pour les PM ; pas de nécessité de refroidir et encombrement faible.

- Les barrettes de diode fonctionnent sur le même principe. Un grand nombre de diodes photoréceptrices sont disposées côte à côte et reçoivent la lumière dispersée par un réseau après la traversée de la cuve. On obtient en quelques fractions de secondes un spectre complet de la lumière transmise : c'est le polychromatisme vrai. La lumière traversant la cuve est la lumière blanche. On parle de photométrie inverse puisque l'élément dispersif est après la cuve et non avant la cuve (Figure III-7). Ce dispositif est peu sensible aux interférences, ce qui permet d'utiliser les cuves en système ouvert, sans enceinte obscure.

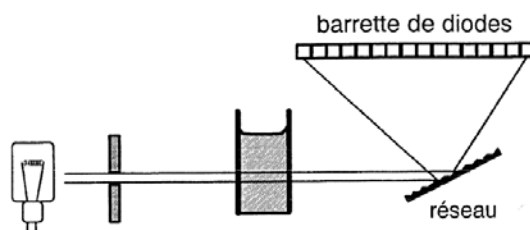
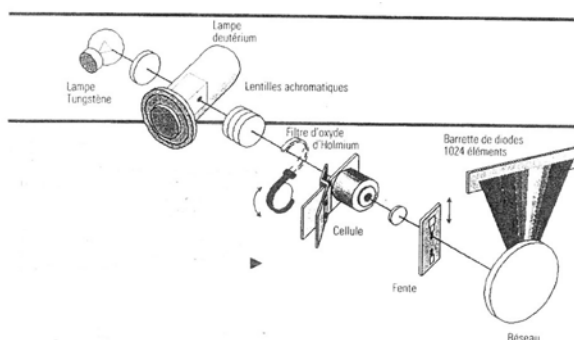


Figure III-7. Principe de la photométrie inverse avec détecteur à barrette de diodes.



Les contrôles d'exactitude, de linéarité et de stabilité des absorbances mesurées doivent être périodiquement réalisés, avec des produits dont le coefficient d'extinction molaire est connu : NADH ou bichromate de potassium pour le proche UV, paranitrophénol à 405 nm, nitrate de cobalt à 510 nm.

L'amplification du signal mesuré est souvent nécessaire. Mais ce signal est un courant continu difficile à amplifier. On obtient un courant pseudo-alternatif simplement en interrompant le faisceau lumineux par une roue à ailette tournant à vitesse fixe ("chopper") et donnant donc une fréquence déterminée.

Le traitement du signal fait appel aux moyens informatiques modernes : visualisation sur écran, calculs plus ou moins complexes des concentrations, corrections, sauvegarde sur disque, édition de résultats élaborés, connexion au système central etc...

3. le photomètre idéal

Alors que le dosage des substrats peut utiliser comme référence des étalons bien connus, une telle possibilité n'existe pas lors des dosages enzymatiques : on transforme directement la densité optique mesurée en unités catalytiques. Les erreurs dans ce domaine peuvent être très gênantes, lorsque on est à la frontière du normal et du pathologique, ce qui souligne l'importance de la qualité de l'appareillage. Les sources d'erreurs passibles et leur importance variable sont résumées dans la Figure III-8. Les erreurs s'additionnent de manière arithmétique, mais fort heureusement, elles ne vont pas toujours dans le même sens !

Lors d'un colloque tenu à Lyon à la fin de l'année 1978 sur les spectrophotomètres destinés aux Laboratoires d'analyses biologiques et utilisés pour l'enzymologie, un cahier des charges définissant le photomètre idéal a été élaboré et reste d'actualité. Les points importants sont les suivants :

- stabilité de mesure, sans dérive, nécessitant la stabilité de l'alimentation électrique, sans parasite.
- le bruit de fond ne doit pas masquer une activité faible.
- linéarité correcte jusqu'à des DO élevées (> 2) puisque certaines méthodes optimisées travaillent dans ce domaine. D'où importance également du monochromatisme

On peut alors dresser le tableau suivant :

Stabilité : < 0.004 A/h à 2 de DO
 Linéarité : 2.5 Unités d'absorbance à 340 nm
 longueur d'onde : ± 1 nm
 bande passante : < 5 nm
 trajet optique : 10 mm ± 0.05
 temps de mesure : $\pm 0,1$ %
 thermostatisation : $\pm 0,05^\circ$ C
 dilution : ± 0.5 %

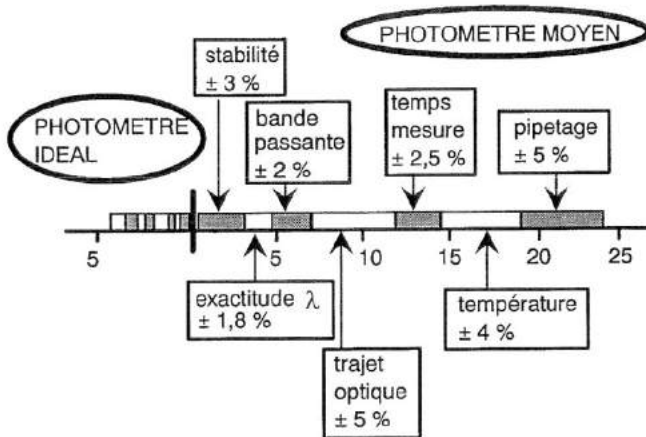


Figure III-8. Les sources d'erreur dans un photomètre de biochimie clinique.

B. Photométrie en lumière réfléchie ou réflectométrie

Cette technologie mesure la lumière réfléchie sur une surface solide et est en plein essor avec le développement des méthodes de "chimie sèche".

Il existe deux types de réflecteurs (figure III-9) :

- le réflecteur spéculaire (se comporte comme un miroir et suit les lois de Descartes)
- le réflecteur diffus: se comporte plutôt comme un mur blanc mat. En fonction de la qualité de la surface, ce type de réflecteur peut être subdivisé : réflexion isotrope (ou lambertienne : identique dans toutes les directions) au non isotrope.

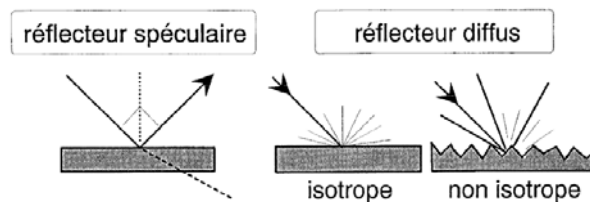


Figure III-9. Les différents types de réflecteur en photométrie.

On définit :

- le facteur de réflexion ou réflectivité $R = I_r/I_0$ exprimé en pourcentage ;
- la réflectance, analogue à la densité optique en transmission, ou densité de réflexion :

$$\rho = \log \phi_{(\text{incident})} / \phi_{(\text{réfléchi})}$$

Elle est définie par la loi de Kubelka-Munk :

$$(1 - R)^2 / 2R = \varepsilon \cdot c / S$$

dans laquelle ε est le coefficient d'absorption molaire et S le coefficient de diffusion, propre au support de la coloration. R doit être compris entre 0,2 et 0,8, ce qui dépend des conditions de mesure (épaisseur, longueur d'onde, dispositif de mesure, etc..., figure III-10). En dehors de cette zone, l'erreur devient rapidement importante.

Dans les appareils commercialisés, les deux types de réflexion sont utilisés :

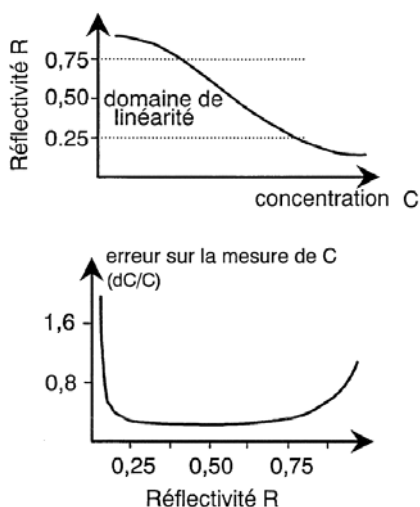


Figure III-10. Les limites de la mesure en photométrie de réflexion.

En haut, domaine de linéarité ; en bas, évolution de l'erreur sur la mesure d'une concentration en fonction de la réflectivité.

- la mesure diffuse à l'aide de la sphère d'Ulbrich (figure III-11) ou de variantes. La sphère possède une surface interne très réfléchissante. La lumière incidente est mesurée en un point quelconque de la sphère ; la lumière réfléchi est mesurée à partir d'un collimateur qui évite la contamination par la lumière incidente. Le zéro est réalisé sur une pastille de porcelaine mate ou sur une plaque de réactif vierge. Ce système est utilisé dans de petits réflectomètres (Seralyzer de Ames, Reflotron de Boehringer), appareils monoparamétriques peu encombrants destinés aux petits laboratoires, aux analyses isolées, à l'urgence ou aux autotests (suivi de la glycémie chez les diabétiques par exemple).

- la mesure spéculaire: le flux lumineux projeté par un collimateur sous un angle de 45° est recueilli à 90° (Kodak).

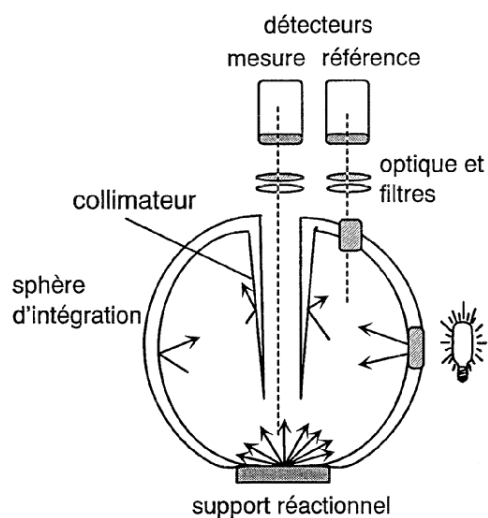


Figure III-11. La sphère d'Ulbrich pour la mesure de la réflexion diffuse.

II. Photométrie d'émission

La coloration caractéristique obtenue lorsqu'on brûle des métaux est connue depuis plusieurs siècles. Vers la fin du XIX^{ème} siècle, elle fut utilisée pour le dosage du sodium, mais c'est seulement vers 1930 avec l'introduction du nébuliseur que ce type de photométrie prend de l'importance, pour ne se généraliser cependant qu'après la 2^{ème} guerre mondiale.

La détermination du sodium, du potassium et du lithium est très facile avec un photomètre de flamme. Théoriquement, il serait possible d'appliquer cette méthode au fer, au cuivre, au chrome, manganèse, cobalt, plomb, zinc, etc..., c'est à dire à de nombreux oligo-éléments métalliques d'importance biologique ; mais, étant donnée la complexité des phénomènes mis en jeu à l'échelle atomique, de nombreux obstacles techniques s'opposent en réalité à ces déterminations².

A. Le spectre d'émission

Le chauffage d'un métal dans une flamme développe une série de réactions complexes : évaporation de la couche d'eau, évaporation des particules du métal en molécules salines, puis en atomes (atomisation). Ces atomes peuvent réagir avec d'autres particules de la flamme (groupes OH par exemple) ou être ionisés. On obtient ainsi un mélange de molécules, d'atomes et d'ions.

Les atomes peuvent prendre de l'énergie à la flamme et passer à un état excité (saut des électrons d'une couche à une autre). Lors du retour à l'état fondamental, l'énergie absorbée est restituée et émise sous forme de lumière avec une longueur d'onde caractéristique du métal. Les atomes et les petits ions donnent des bandes étroites, schématisées dans la figure III-12. Au contraire, les molécules produisent une bande large, peu intense. Il existe en outre une bande d'émission large, commune à tous les atomes, superposable à la bande des gaz de la flamme. On peut distinguer également pour chaque métal des bandes principales et des bandes secondaires.

² R. Bourdon, Fondements théoriques des méthodes spectroscopiques appliquées aux dosages des composés inorganiques dans les liquides biologiques. Revue Française des Laboratoires 177 (1988) 38-60.

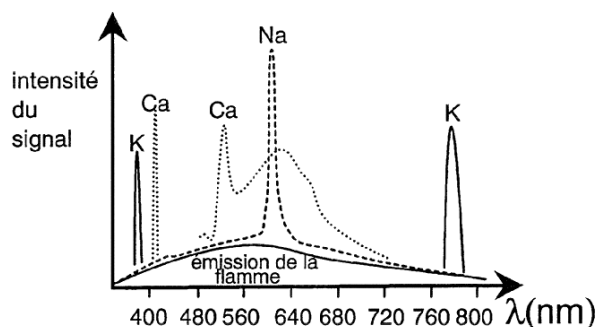


Figure III-12. Spectre d'émission dans une flamme du sodium, du potassium et du calcium.

B. Les éléments d'un photomètre d'émission

L'échantillon dilué comportant éventuellement l'étalon interne est transformé en aérosol et brûlé dans la flamme. La lumière émise est détectée et le signal obtenu amplifié et traité. Le schéma général est représenté dans la figure III-13. Les gammes d'appareil vont se différencier par l'adjonction éventuelle de certaines fonctions : pipeteur-diluteur automatique, usage de l'étalon interne, affichage simultané du sodium et du potassium, position "urine" pour le potassium (dont les concentrations sont très différentes de celles trouvées dans le sérum), etc... Une étude du CNEH a montré que la différence de prix d'achat entre les appareils les plus simples et les plus complexes est vite compensée par l'augmentation du temps "personnel" nécessaire à l'obtention de bons résultats sur les appareils les plus simples (amortissement du surcoût en 2-3 ans, en fonction du débit du laboratoire).

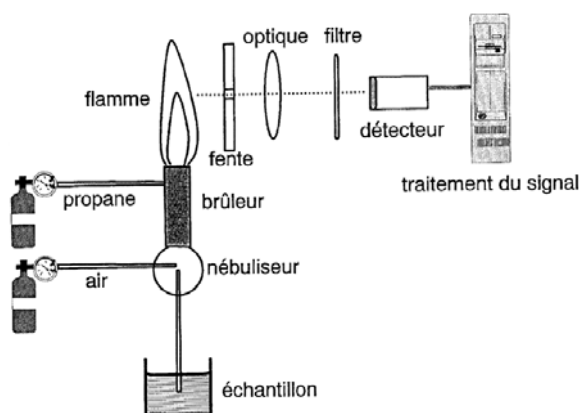


Figure III-13. Schéma du principe d'un photomètre d'émission à flamme.

1. Nébulisation

La dilution de l'échantillon et le mélange éventuel de l'échantillon et de l'étalon interne peuvent être assurés par différents procédés. Par exemple, un courant d'eau de dilution est fortement aspiré à travers un orifice très étroit et crée ainsi des turbulences. Le mélange passe ensuite dans une cupule où le prélèvement est effectué pour former l'aérosol, brûlé ensuite dans la flamme.

La chambre de nébulisation est une enceinte dans laquelle l'échantillon est transformé en aérosol ; elle doit permettre l'évacuation des grosses gouttelettes résiduelles. La nébulisation à partir de la cupule de prélèvement fonctionne selon deux grands principes (Figure III-14) : atomiseur à entonnoir (par pression) ; atomiseur à aspiration (par dépression).

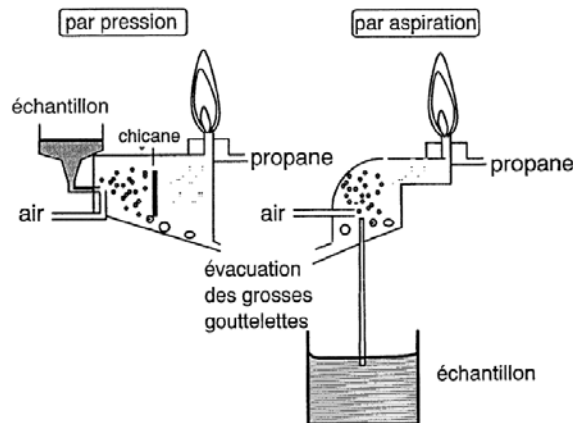


Figure III-14. Types de nébuliseur utilisés en photométrie d'émission.

Cette chambre est le point final d'un système de canalisations plus ou moins complexes, servant à traiter l'air et le gaz (le plus souvent propane) :

- filtres de purification des gaz ;
- manomètres de sécurité, en cas de baisse de pression de l'air ou du gaz ; résistance chauffante dans une chambre d'humidification de l'air, assurant une hygrométrie constante ;
- régulation des pressions relatives air/propane contrôlant les débits (0,5 l de propane pour 10 l d'air en général).

2. Brûleur et flamme

a. Photométrie classique à "flamme froide"

Pour les photomètres d'émission utilisés en routine (dosage Na, K et Li), la flamme est obtenue par un mélange air - propane dans lequel l'aérosol d'échantillon est injecté. Le mélange traverse le tube du brûleur et parvient dans la flamme (Figure III-15a). La combustion du propane fournit suffisamment d'énergie (1925° K) pour réaliser l'activation des atomes. La flamme se trouve généralement dans un manchon de verre, entourée d'un manchon d'air filtré, évitant les contaminations atmosphériques et participant à la stabilité de la flamme. Par sécurité, il existe également une cellule, placée dans la gaine de la cheminée, détectant la présence de la flamme.

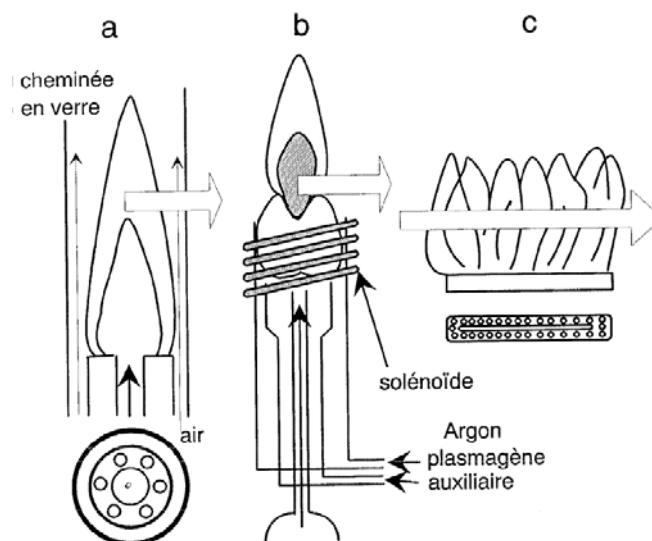


Figure III-15. Les types de flamme en photométrie.

A : flamme à panache étroit en photométrie d'émission classique. B : flamme en photométrie d'émission à plasma induit (ICP). C : flamme à panache large de photomètre d'absorption atomique.

b. les plasmas induits à "flamme chaude"

Les plasmas induits haute fréquence ou ICP (inductively coupled plasma) ou "torches à plasma" sont des flammes produites par des gaz totalement ionisés, mais neutres électriquement, obtenues par le passage d'un gaz plasmagène (tel que l'argon) à travers un solénoïde créant un champ magnétique intense de haute fréquence (Figure III-15b). Les températures de la torche sont variables à l'intérieur de la flamme, mais dépassent 5000° K et permettent d'avoir accès à des atomes non dosables par les flammes classiques. Pour des éléments d'intérêt biologique, l'ICP est cependant en concurrence avec l'absorption atomique plus ancienne.

4. Optique et électronique

La lumière de la flamme passe à travers la fenêtre de la cheminée de verre et tombe sur les filtres sélectionnés en fonction de l'élément à mesurer. La qualité de l'appareil dépend en partie de l'étroitesse de leur bande passante. Les bandes les plus utilisées sont 589 nm (pour le sodium), 776 nm (pour le potassium) et 671 nm (pour le lithium).

Derrière chaque filtre se trouve un détecteur d'intensité lumineuse. Le courant de sortie est proportionnel à l'intensité lumineuse fournie par chaque espèce atomique. Le signal est ensuite amplifié et traité : conversion analogue/digital, affichage IED ou LCD ou enregistrement.

5. Les limites de l'analyse

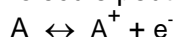
Un certain nombre de paramètres affecte la qualité du résultat.

1. Interférence optique

Lorsque les concentrations du métal sont élevées, les bandes spécifiques d'un métal peuvent devenir très larges (de 340 à 600 nm pour le Na⁺) et recouvrir celles d'autres métaux. De même, plusieurs spectres peuvent se superposer (Mg et Na vers 285 nm par exemple). Cette interférence limite le nombre de raies d'émission utilisables en pratique pour un élément donné.

2. Interférence cationique

L'ionisation d'une molécule peut se comparer à un équilibre de dissociation :



Selon la loi des équilibres des réactions chimiques, l'augmentation de la densité électronique diminue l'ionisation et augmente ainsi la quantité des atomes excitables, provoquant un accroissement de l'émission et donc un dosage surévalué. Ce danger est diminué par l'utilisation de flammes assez "froides".

3. Interférence anionique

Il peut se former des combinaisons peu volatiles de certains anions avec les atomes à mesurer. Par exemple, le phosphate interférera avec le calcium. A l'inverse du cas précédent, l'utilisation de flammes très chaudes pallie à cet inconvénient.

4. Problèmes de nébulisation

On compare l'intensité lumineuse fournie par l'échantillon à celle provenant d'un standard. Or la nébulisation dans la flamme dépend beaucoup de la tension superficielle du liquide, qui n'est pas la même pour le solvant de l'étalon et l'échantillon biologique. L'addition systématique à l'échantillon d'un agent mouillant limite cet inconvénient.

5. Stabilité des mesures.

L'émission peut être perturbée par des variations de température au niveau de la flamme. Pour résoudre cette difficulté, les photomètres modernes utilisent un étalon interne ajouté systématiquement aux échantillons et aux étalons, en concentration constante, grâce à un diluteur

approprié. Ainsi, des résultats corrects sont obtenus en comparant les rapports Na/Li et K/Li. lors des dosages du lithium, l'étalon interne est le potassium.

Malgré les grandes possibilités théoriques de la méthode, tous ces facteurs, difficilement compatibles entre eux, font que, en pratique courante, la photométrie d'émission à flamme froide est réservée aux trois ions déjà cités, sodium, potassium et lithium, les deux premiers ayant une importance fondamentale en pathologie et en réanimation, le troisième en thérapeutique psychiatrique. Cependant, on assiste de plus en plus à un remplacement de la photométrie d'émission par des électrodes sélectives (cf chapitre IV) qui n'ont pas la contrainte d'une alimentation en gaz et les risques qui y sont liés (il y a cependant d'autres contraintes). D'après les données du contrôle national de qualité³, la part de la photométrie est passée de 91 % en 1980 à 50 % en 1991 (dont 38 % avec étalon interne et 12 % sans étalon interne).

III. Photométrie d'absorption atomique

Malgré des principes de base relativement simples, la photométrie d'absorption atomique (ou spectrométrie d'absorption atomique, SAA) est délicate à mettre en oeuvre, car elle s'adresse à des éléments traces exigeant des précautions particulières dans le traitement de l'échantillon. Les dosages de ces éléments sont encore peu fréquents : lors d'un contrôle national de qualité, seuls 51 laboratoires⁴ ont dosé le cuivre par absorption atomique alors que la totalité des participants (un peu plus de 3800) a rendu des résultats pour le sodium et le potassium.

A. Principe

La loi de Kirchhoff indique que tout atome peut absorber les radiations qu'il peut émettre. Si on soumet des atomes à une radiation d'intensité I_0 dont la fréquence correspond à leur principale raie d'émission, on a montré que :

$$\log I_0/I = K \times N$$

N est le nombre d'atomes absorbants, qui peut donc être connu par la simple mesure de l'intensité transmise I. En photométrie d'émission, ce sont les atomes excités peu nombreux (1/100000) qui émettent ; en photométrie d'absorption atomique, ce sont les atomes restés à l'état fondamental, beaucoup plus nombreux, qui absorbent, ce qui explique la très grande sensibilité de cette technique. Elle permet ainsi de doser des éléments présentant des raies intenses au-delà de 190 nm, mais qui sont thermiquement peu excitables et ne peuvent être dosés par photométrie d'émission : Ca, Mg, Sr, Cu, Zn, Pb, Co, Ni, Fe, etc... C'est une méthode très sensible, exploitant des gammes de concentration de l'ordre de 0,1 à 5 pmol/l, dépendant de la qualité de l'appareillage et de l'élément dosé.

Les sources lumineuses doivent fournir avec une intensité et une précision suffisante la longueur d'onde caractéristique de l'élément à doser. Elles sont de deux types :

- soit à vapeur métallique ou au deutérium, analogues à celles utilisées comme source UV ; ces lampes fournissant un spectre continu, la qualité et la sensibilité du dosage dépendent de la qualité du monochromateur.

- soit à "cathode creuse" (figure III-16) : la cathode est constituée par le métal à doser. Une décharge électrique dans un gaz rare provoque son ionisation, les ions frappent la cathode et excitent les atomes qui émettent leur radiation propre en revenant à leur état fondamental, avec une intensité dépendant de l'énergie fournie qui doit être précisément régulée. L'exactitude de la longueur d'onde est parfaite, mais il faut une lampe spécifique pour chaque dosage.

³ Contrôle National de Qualité, septembre 1991, LNS 91/09/Bio 50

⁴ Contrôle National de Qualité, juillet 1993, ADM 93/07/Bio 56.

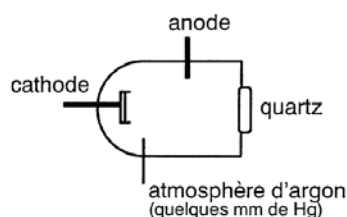


Figure III-16. La lampe à cathode creuse en photométrie d'absorption atomique.

B. Les appareils

Deux grands types d'appareils coexistent actuellement et certains appareils mixtes (flamme/four) sont également proposés. Les procédés de transport et de régulation des fluides (éventuellement automatisés), la détection de l'énergie lumineuse, l'optique et l'électronique utilisent des éléments déjà décrits.

1. A flamme

Dans ce type d'appareil, l'installation diffère peu dans son principe de celle qui a été décrite pour la photométrie de flamme, notamment en ce qui concerne la nébulisation. Par contre, la flamme est une flamme à panache large pour une meilleure absorption, alors qu'en photométrie, on recherche une flamme haute et étroite. Cependant, la flamme à utiliser doit être de très haute température, par exemple acétylène et oxygène (3200°K). La flamme contenant les atomes à doser est éclairée par la source et la lumière transmise étudiée comme précédemment. Comme en photométrie de flamme, on mesure en continu l'absorption de la lumière et l'intensité de cette absorption est proportionnelle à la quantité de substance à mesurer.

2. A four

On parle alors de photométrie d'absorption électrothermique. Le four est un petit four en graphite (figure III-17) dont la montée thermique est assurée par effet joule. La régulation thermique en atmosphère inerte (argon) est facilement programmable : montée lente à 100°C pour la désolvatation (séchage de l'échantillon), minéralisation (oxydation en sels entre 250 et 900°C), atomisation (température très régulée entre 1200 et 2600°C , selon les éléments étudiés, pour éviter l'ionisation), purgeage du four pour nettoyage entre les analyses à une température supérieure à 2000°C ou à la température d'atomisation.

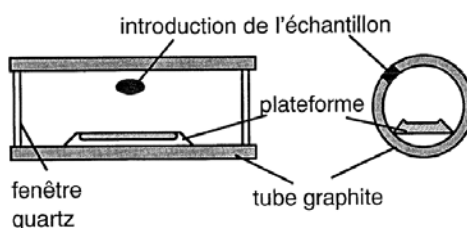


Figure III-17. Le four avec plateforme de L'vov en photométrie d'absorption électrothermique.

À gauche, vue latérale; à droite, vue en coupe.

À la différence de la flamme, toutes les mesures ont lieu dans un milieu immobile, sans bruit de fond, d'où une grande augmentation de la sensibilité et une bonne adaptation aux microvolumes (10 à 50 microlitres). La quantité d'échantillon déposée étant très faible et fixe, on enregistre une courbe d'absorption dont la hauteur et la surface sont proportionnelles à la quantité d'analyte et dont la forme peut renseigner sur les interactions avec la matrice. En effet, ces interactions peuvent limiter cette augmentation de sensibilité pour des milieux complexes où existent des

adsorptions non spécifiques ou des interactions chimiques avec les matrices des parois du four, modifiant les processus d'atomisation. Les solutions à ces problèmes cherchent selon les cas à supprimer ou au contraire à accroître et exploiter ces interactions. Des traitements spéciaux cherchent ainsi à améliorer les qualités du four, par exemple: dépôt de carbone pyrolytique par chauffage à 2300°C du four balayé par un courant d'argon méthane ; métallisation par un métal réfractaire, en chauffant à 2300°C en présence de sels ou d'oxyde de tantale, niobium, zirconium ou tungstène. Les carbures métalliques ainsi obtenus comme matrice permettent de réaliser des interactions spécifiques et constantes, remplaçant d'autres interactions mal connues et non maîtrisables.

Le rendement d'atomisation dépend également du rapport des températures de la phase gazeuse T_g et de la surface de l'atomiseur T_s . Il est d'autant meilleur que T_g/T_s est supérieur ou égal à 1. Pour des valeurs inférieures à 1, on favorise les interactions avec la surface. Dans les fours cylindriques chauffés par effet joule, la condition $T_g/T_s > 1$ est difficilement remplie. On utilise alors une petite plateforme, dite plateforme de L'vov, qui est, elle, chauffée par irradiation et permet de remplir la condition $T_g/T_s > 1$ (Figure III-17).

C. Les limites de l'analyse

Comme en photométrie d'émission, certaines applications sont gênées par des interférences diverses.

1. Interférences spectrales

- spécifiques : atomes présentant des raies superposables, d'où l'importance du choix de la raie mesurée ;

- non spécifiques : absorption ou diffusion par des particules solides dues à un excès de sels.

On corrige ce type d'interférence de plusieurs façons :

- par une mesure à une longueur d'onde différente à l'aide d'une lampe à deutérium. Cette lampe n'est cependant utilisable que dans la zone 200-325 nm, qui est cependant la plus perturbée;

- par élimination par effet Smith-Hieftje, utilisant la lampe à cathode creuse elle-même. Après la mesure normale (élément + bruit de fond), une forte intensité pendant un temps très bref élargit la radiation qui est alors principalement absorbée par le fond. La même source étant utilisée, l'alignement optique reste parfait.

- par effet Zeeman dans les appareils hauts de gamme : cet effet est fondé sur la décomposition en raies spectrales polarisées et très légèrement décalées de la raie initiale émise par la lampe spécifique lorsqu'on la traite par un champ magnétique. Quand le champ magnétique est en action, la mesure à travers un filtre polariseur ne détermine que le bruit de fond. Cette technique impose des filtres à bande passante extrêmement étroite. Les dernières générations d'appareil peuvent même se passer de l'utilisation des polariseurs, améliorant la luminosité du système optique et repoussant encore les limites de détection.

2. Interférence d'ionisation

Comme en photométrie d'émission, si un atome facilement ionisable est présent, il va modifier l'équilibre d'ionisation de l'atome à doser et donc le taux d'absorption. On peut saturer la solution avec cet atome ionisable pour travailler dans des conditions constantes.

3. Interférence chimique

Elle correspond à la formation de complexes non atomisables, principalement avec des phosphates, mais aussi des sulfates. On peut soit augmenter la température de la flamme, soit éliminer ces complexants (par des sels de lanthane par exemple).

Les solutions actuelles apportées à l'ensemble de ces problèmes rendent l'absorption atomique précise et rapide. Le gain de sensibilité entre 1970 et 1990 a été de 1000 pour l'aluminium, de 20000 pour l'arsenic et de 100 000 pour le vanadium!

Parmi les méthodes disponibles, il semble que les meilleurs résultats soient obtenus en théorie :

- Zn, Ca, Fe : SAA flamme
- Mn, Ni, Co, Cr, Cd, Au, Ag : SAAFG (four graphite)
- Al, Cr, B, Ba, Pt (à taux non physiologiques, lors d'intoxications ou de traitements), As, Sb, Hg (à des taux physiologiques) : ICP.

En pratique les laboratoires utilisent la méthode qu'ils connaissent le mieux, car chaque méthode possède ses avantages et ses inconvénients, ses contraintes et ses limitations.

IV. Fluorimétrie

La fluorescence est un phénomène anciennement connu (Stokes, 1852) mais son application au domaine biologique est relativement récente. Son principal mérite réside dans sa sensibilité.

1. Principe

Lorsqu'un atome ou une molécule absorbe une radiation électromagnétique, il peut passer à un état excité, d'énergie supérieure. Cet état excité est atteint très rapidement (10^{-15} s) et n'a qu'une durée de vie très brève (1 à 10 nanosecondes). Il y a retour à l'état fondamental (l'électron retombe sur une couche d'énergie inférieure) avec libération d'énergie. Toute l'énergie absorbée n'est pas restituée, de sorte que la radiation de fluorescence a une énergie inférieure, donc une longueur d'onde supérieure, à la radiation incidente. Lorsque la quantité de lumière absorbée est très petite, l'intensité de la fluorescence est proportionnelle :

- à l'intensité de la lumière d'excitation I_0
- au coefficient d'extinction moléculaire ϵ
- à la concentration du soluté fluorescent c
- au trajet optique de la solution l
- au rendement quantique de la fluorescence Q

$$I = I_0 \cdot \epsilon \cdot c \cdot l \cdot Q$$

En pratique, on estime que la réponse de fluorescence sera linéaire jusqu'à ce que la concentration de soluté absorbe environ 5 % de la lumière incidente.

D'autres facteurs peuvent intervenir dans l'analyse :

- le pH a une grande importance, car il modifie le rapport des formes ionisées et non ionisées dont les spectres de fluorescence, de même que ϵ et Q peuvent être différents ;
- la température, dont l'augmentation diminue en général la fluorescence ;
- la nature des solvants peut modifier la fluorescence ; certains composés peuvent n'être fluorescents que dans certains solvants ;
- la photodécomposition des molécules fluorescentes est un phénomène analogue à l'autoradiolyse en radioactivité et diminue évidemment l'intensité de la réponse ;
- des lumières parasites de diverses origines peuvent aussi perturber la mesure :
 - + effet Tyndall : la diffusion par des particules en suspension d'une lumière de même longueur d'onde que la lumière incidente impose la filtration des solutions et l'utilisation de matériel très propre ;
 - + effet Rayleigh : réémission d'une lumière absorbée par les cuves, les solvants ou les solutés ;
 - + effet Raman : réémission d'une lumière de longueur d'onde constante, quelle que soit la longueur d'onde incidente, et due au solvant.

Ces lumières sont surtout gênantes aux faibles concentrations. Elles peuvent être éliminées par des polariseurs ou par l'utilisation de monochromateurs de bonne qualité.

B. Les éléments de l'appareil

1. Fluorimétrie classique

Le schéma général d'un fluorimètre est donné dans la figure III-18. Les principaux composants ont déjà été décrits : optique, fentes, monochromateurs, photomultiplicateurs et électronique ne présentent pas de particularités sur le principe du moins par rapport à ce qui a été présenté pour la photométrie d'absorption moléculaire. De la qualité de ces éléments dépend la qualité du fluorimètre. Comme en photométrie d'absorption, la possibilité de travailler avec un faisceau de référence permet une grande stabilité de la mesure. Seules quelques particularités sont soulignées :

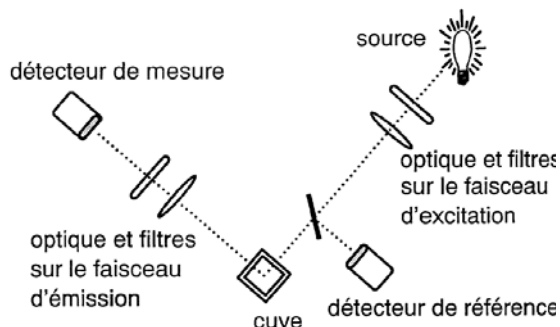


Figure III-18. Schéma simplifié d'un fluorimètre.

La source lumineuse doit être d'intensité élevée, capable de donner une excitation. On utilise principalement les lampes à vapeur de mercure ou, de plus en plus, les lampes au xénon.

Les meilleurs systèmes utilisent un double monochromateur (figure III-19), un pour la lumière d'excitation, un pour la lumière émise, ce qui est indispensable pour les études en fluorescence synchrone (voir plus loin).

La cuve a une grande importance, car la lumière réémise est faible : sa taille ne doit pas être trop grande, pour diminuer les effets de filtre et de quenching (diminution de l'énergie du rayonnement par les particules du milieu). La lumière réémise est généralement étudiée sous un angle de 90° (ce qui impose une cuve dont deux faces contiguës sont polies : les cuves de photomètres sont donc inadéquates). Mais on peut théoriquement étudier la réémission dans d'autres directions (Figure III-20) :

- la lecture dans l'axe pose des problèmes de filtres et d'écrans pour absorber la totalité de la lumière incidente.

- la lecture à la surface de la cuve, à 90° , diminue l'importance de l'effet de concentration, mais l'absorbance de la solution doit être très faible.

- la lecture à la surface du milieu ("front surface") est réalisable en milieu liquide (IMX d'Abbott) ou solide (Stratus de Baxter), ce qui élimine les parasites éventuels dus aux surfaces optiques des cuves.

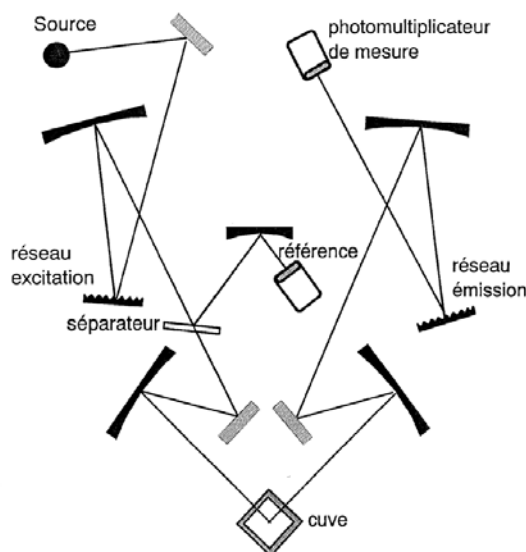


Figure III-19. Schéma de montage d'un fluorimètre à double monochromateur (sur le faisceau d'émission et le faisceau d'excitation).
(D'après document Perkin-Elmer).

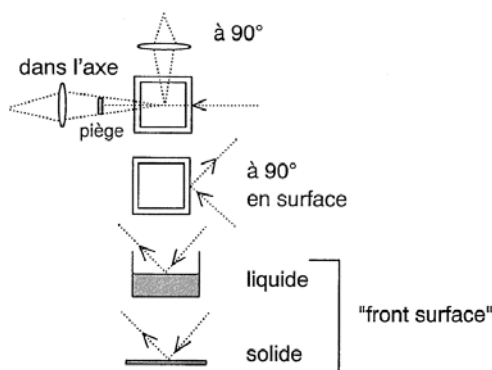


Figure III-20. Différents procédés de mesure de la lumière fluorescente.

2. Autres possibilités en fluorimétrie

En fonction des perfectionnements techniques et informatiques existant sur certains appareils, deux traitements des mesures sont réalisables:

a. Fluorescence synchrone

Avec les fluorimètres à double monochromateur, on peut réaliser 2 types de spectres :

- le spectre d'excitation : la longueur d'onde d'excitation défile et la fluorescence est mesurée à longueur d'onde fixe ;
- le spectre d'émission : la longueur d'onde d'excitation est fixe et l'émission est mesurée sur tout le spectre.

En réalisant les deux spectres à la fois, avec un décalage constant (correspondant à la différence des maximums d'excitation et d'émission pour de meilleurs résultats) on obtient un pic d'émission enregistré plus étroit, plus facile à séparer des fluorescences parasites (Figure III-21).

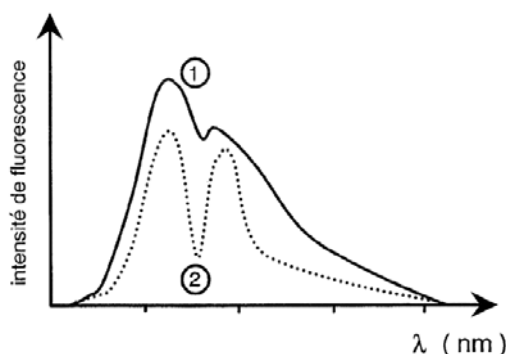


Figure III-21. Comparaison d'un spectre de fluorescence obtenu à longueur d'onde d'excitation fixe (1) et avec un spectre de fluorescence synchrone (2).

b. Fluorescence dérivée

Le spectre de fluorescence est de la forme :

$$\text{Intensité} = f(\text{longueur d'onde})$$

On peut calculer les dérivées successives de cette fonction : on constate alors que la largeur des bandes diminue lorsque l'ordre de la dérivée augmente (Figure III-22). On peut ainsi séparer des bandes qui se chevauchent dans le spectre de fluorescence. Il est aussi possible de coupler ce traitement des courbes avec la mesure de la fluorescence synchrone.

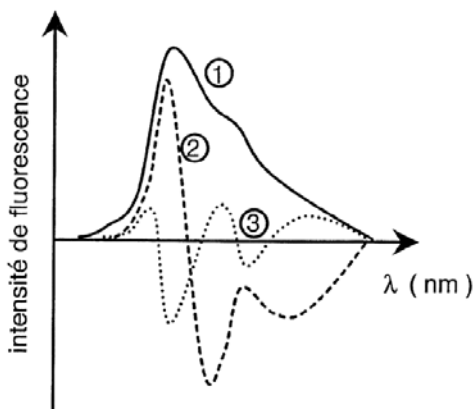


Figure III-22. Spectres de fluorescence dérivée.

1 : Spectre direct obtenu par mesure de la lumière réémise. 2 et 3 : spectres obtenus par calcul de la dérivée première (2) et seconde (3) du spectre d'origine.

c. Polarisation de fluorescence

Comme dans un polarimètre traditionnel, deux éléments sont utilisés (cristal traditionnel ou cristal liquide) :

- le polariseur sur le faisceau d'excitation
- l'analyseur sur le faisceau d'émission

Ces deux éléments peuvent être positionnés l'un par rapport à l'autre, soit en parallèle soit en perpendiculaire. L'utilisation des mesures d'émission de ces deux positions permet de mesurer le degré de liberté d'un composé fluorescent : plus le composé est libre et mobile, plus la polarisation de la lumière réémise est faible.

Cette technique, utilisée dans les dosages immunologiques (par exemple Système TDX d'Abbott) est automatisée et permet d'avoir le résultat d'un dosage en 20 mn.

La polarisation de fluorescence est également utilisée pour mesurer la fluidité d'une membrane biologique ou d'une couche lipidique d'une lipoprotéine à l'aide de sondes hydrophobes fluorescentes, mais de telles mesures ne sont pas encore effectuées en routine.

3. Fluorimétrie en temps résolu

Un éclair excite la solution et la fluorescence n'est mesurée qu'après un certain délai, si possible quand la lumière incidente, le bruit de fond et la lumière diffusée ont disparu (Figure III-23). On augmente ainsi la sensibilité de l'analyse.

Pour les composés fluorescents traditionnels, la durée de fluorescence est de 20 à 200 ns : la mesure nécessite des appareillages extrêmement performants (PM répondant à la nanoseconde) ;

Avec des composés dont la durée de fluorescence est plus longue (1 microseconde à 1 ms : europium, terbium), l'excitation peut être réalisée par une lampe au Xénon ou par un laser à N₂ à 337 nm (europium), avec une alimentation pulsée délivrant des éclairs très brefs. La mesure de la fluorescence peut être réalisée avec des photomultiplicateurs beaucoup moins coûteux que ceux travaillant à la nanoseconde, après l'extinction de la lumière incidente et de la fluorescence endogène du sérum.

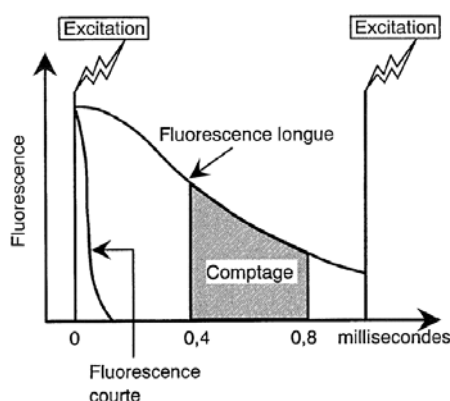


Figure III-23. Principe de la mesure de fluorescence en temps résolu.

V. Etude des milieux troubles

A. Principe

La photométrie des milieux troubles repose sur la loi de Rayleigh.

Schématiquement :

$$I_{\text{incidente}} = I_{\text{absorbée}} + I_{\text{transmise}} + I_{\text{diffusée}}$$

La lumière diffusée dépend de la taille des particules, de la nature de leur surface et de la constitution chimique de cette surface. Plus précisément :

$$I_D = K \cdot I_0 \cdot (\eta^2 - \eta_0^2) \cdot N \cdot V / (\eta^2 + \eta_0^2) \cdot \lambda_0^4$$

Cette loi est valable si le diamètre des particules est inférieur à la longueur d'onde incidente I_0 et si leur indice de réfraction η est peu différent de celui du milieu η_0 ; l'intensité diffusée I_D dépend donc du volume V et du nombre de particules N . A volume égal, on mesurera donc le nombre de particules N .

B. Applications

1. L'opacimétrie

C'est l'appréciation visuelle du trouble par rapport à une gamme de référence.

Bien que peu sensible et peu précise, elle est très utilisée dans la détermination de la protéinurie, car suffisante.

2. Turbidimétrie

On mesure avec un photomètre la lumière transmise dans l'axe du faisceau. La turbidimétrie est très utilisée pour les dosages immunologiques avec repérage direct du complexe antigène - anticorps. On ne peut doser que des protéines ayant une concentration suffisante, car la

sensibilité est faible. Cette méthode est automatisable et réalisable sur la plupart des automates modernes.

L'utilisation de microsphères parfaitement calibrées sensibilise le dosage (principe du Sphérotest de indicia).

3. La néphélogométrie

C'est l'étude de la lumière diffusée. Elle peut être réalisée :

- avec un fluorimètre, mais le monochromatisme et le parallélisme du faisceau ne sont pas parfaits, ce qui limite la validité des lois décrites plus haut.

- avec un néphélogomètre à diode (photoémettrice et photoréceptrice)

- avec un néphélogomètre laser. Le laser le plus utilisé est le tube Hélium-néon qui donne une lumière monochromatique à 632,8 nm puissante. Le parallélisme et la longueur d'onde du faisceau sont parfaits, expliquant la grande sensibilité de la méthode : toute diffusion sera exclusivement due à l'échantillon. La lumière diffusée est lue selon un certain angle, variant selon les modèles: angle solide (Figure III-24) ou angle fixe.

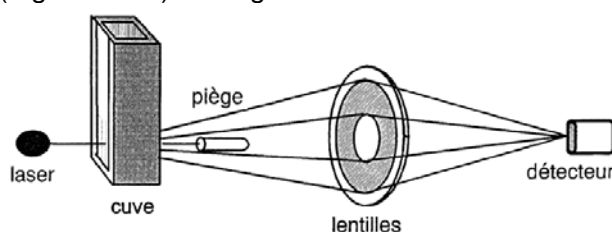


Figure III-24. Néphélogométrie laser avec mesure selon un angle solide.

(D'après documents Behring)

VI. Le luminomètre

La mesure d'une lumière émise par l'échantillon est théoriquement possible sur un photomètre classique, en annulant bien évidemment l'émission de la source. Mais en général, la sensibilité est insuffisante et il est préférable d'utiliser un appareil spécial, le luminomètre. Les caractéristiques spécifiques d'un tel appareil portent sur :

- la qualité des photomultiplicateurs : la mesure d'une faible quantité de lumière fait appel à un photomultiplicateur sensible (efficacité de la cathode > 20 %, temps de réponse < 2 ns, courant noir très faible), installé dans une enceinte parfaitement protégée de la lumière ambiante. Les PM peuvent avoir une photocathode double et fonctionner soit en impulsions (comptage de tous les photons) soit en sommation (problème de la constante de temps si le signal émis est faible et très variable dans le temps).

- la géométrie de la chambre de mesure : l'efficacité du luminomètre dépend aussi de la géométrie du porte-échantillon et de la présence d'un miroir pour "récupérer" tous les photons émis. L'efficacité générale de l'appareil peut être appréciée soit à l'aide de réactions standardisées (luminol, peroxyde d'hydrogène, ferricyanure) soit avec une lumière de référence.

VII. Conclusions

L'utilisation d'appareils de plus en plus performants avec des méthodes de plus en plus élaborées, intégrées dans des systèmes automatisés, donnent accès à un nombre croissant de dosages. Cependant, dans certains domaines, des techniques issues d'autres disciplines pourraient à l'avenir concurrencer les techniques biochimiques. Ainsi, les techniques de résonance magnétique nucléaire in vitro sur échantillon biologique sont en plein développement. La RMN du plasma (1D ou 2D) permet en une seule analyse de détecter, d'identifier et de quantifier un grand nombre de composés (Figure III-25). Malgré le coût apparent élevé et la durée de chaque analyse, il apparaît que cette technique pourrait d'ores et déjà être compétitive avec certaines analyses de biochimie sophistiquée dans certains domaines. Elle a déjà montré son intérêt dans le suivi de certaines tumeurs ou les réactions de rejet des greffes.

C'est sûrement en tout cas un concurrent à surveiller!

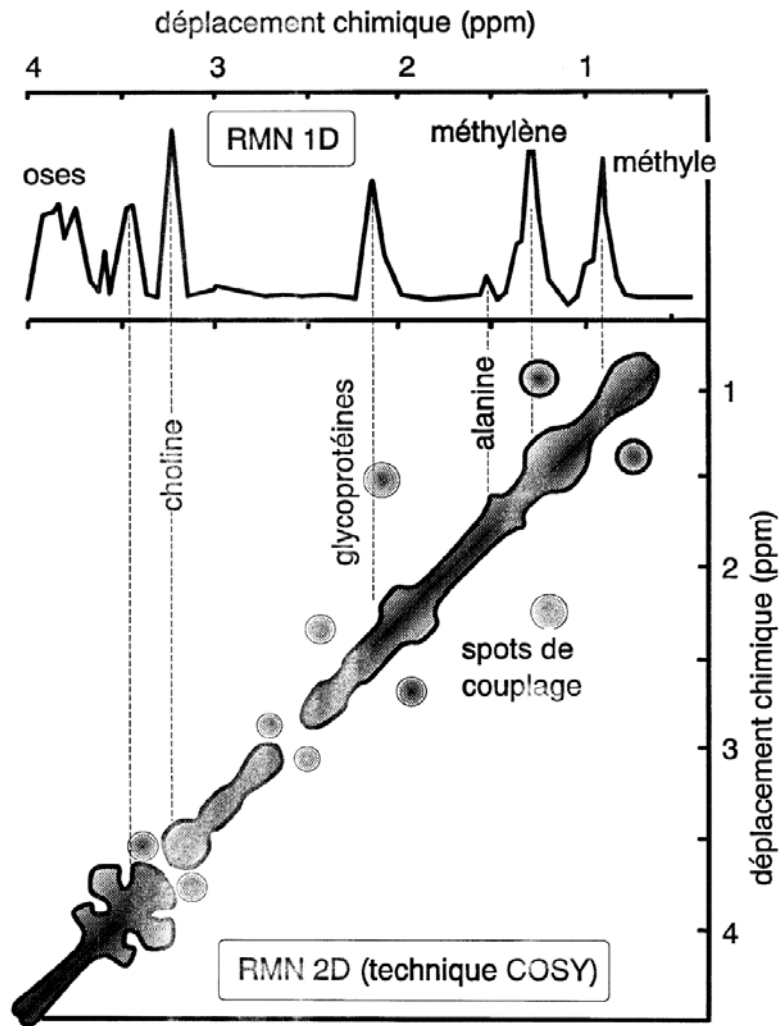


Figure III-25. Spectres RMN 1D et 2D d'un échantillon biologique

Chapitre IV

Les électrodes sélectives et les biocapteurs

La notion de biocapteur ("biosensor") s'est peu à peu développée à partir des principes de base utilisés pour les électrodes de mesure du pH, les premières développées. Un biocapteur est un instrument susceptible de mesurer un paramètre biologique. Il comprend trois parties (Figure IV-1) :

- le module de reconnaissance spécifique de l'élément à mesurer. Ce module est fondé soit sur des interactions physico-chimiques simples (perméabilité ou solubilité) soit sur des interactions biologiques plus complexes (affinité) ;
- le transducteur, capable de détecter l'interaction spécifique au niveau du module précédent et de la traduire en un signal mesurable ;
- le système de traitement du signal fourni par le transducteur. Les capteurs potentiométriques et ampérométriques sont les plus utilisés en biochimie clinique : la plupart des laboratoires utilisent maintenant les électrodes sélectives pour le dosage des principaux ions du plasma. Seule l'utilisation d'électrodes appropriées permet une mesure rapide et sûre du pH et des gaz du sang, indispensable dans de nombreuses situations pathologiques. D'autres procédés possibles dont certains sont en cours de développement seront plus brièvement évoqués.

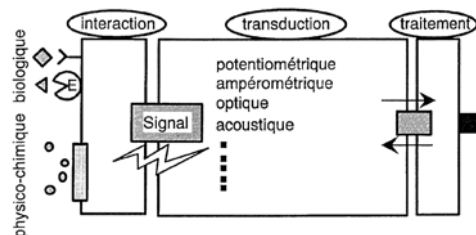


Figure IV-1 : Principe général d'un biocapteur.

I. la mesure du pH

Les premières électrodes ont été développées pour la mesure du pH de solutions utilisées au laboratoire, puis adaptées à la mesure du pH du sang sur de petits volumes.

1. Rappels théoriques: oxydo-réduction et piles

On appelle couple redox un mélange de la forme réduite Red (enrichie en électrons) et de la forme oxydée Ox (appauvrie en électrons) d'un composé quelconque. Le potentiel de la demi pile constituée par ce couple dans lequel on trempe un fil conducteur (platine par exemple) se déduit de la formule de Nernst :

$$E = E_0 + (RT / nF) \cdot \log ([Ox] / [Red])$$

E_0 = potentiel redox standard, dans les conditions standards de température, de pression et de concentration : dans ces conditions, la forme réduite et la forme oxydée sont en concentrations égales.

R = constante des gaz parfaits de Boltzmann (8,314 J/°K.mol)

T = température absolue (°K)

n = nombre d'électrons mis en jeu dans la réaction

F = constante de Faraday (96487 coulombs).

Si on relie électriquement deux demi piles différentes, on mesure entre les deux une différence de potentiel : ce principe est à la base de tous les capteurs potentiométriques.

2. Mesure du pH

Le pH est l'expression de l'activité de l'ion hydrogène en solution, dépendant de sa concentration. L'expression la plus utilisée est :

$$\text{pH} = \log 1 / [\text{H}^+]$$

En toute rigueur, selon des données thermodynamiques, l'ion hydrogène n'existe pas en solution, mais est complexé à l'eau pour former l'ion hydronium H_3O^+ . Cependant, cette formulation ne présente pas d'avantage particulier en biochimie médicale et l'expression sous forme H^+ , bien que fautive, est suffisante.

Le couple redox de l'hydrogène s'écrit $\text{H}^+ / (1/2\text{H}_2)$. Le potentiel redox de ce couple dans les conditions standard a été défini par convention égal à zéro. Dans les conditions non standard, le potentiel est différent de zéro et ne dépend que de $[\text{H}^+]$ si la pression d'hydrogène est identique à celle du couple redox standard.

On peut construire pour l'hydrogène une pile (Figure IV-2), constituée par :

- une électrode de référence à hydrogène, de potentiel fixe et égal à 0 par définition, lorsque $p(\text{H}_2) = 1 \text{ atm}$ et $[\text{H}^+] = 1 \text{ mol/l}$
- une électrode de mesure à hydrogène, où $p(\text{H}_2)$ est la même que dans la demi pile de référence et seule la concentration $[\text{H}^+]$ est inconnue. Les deux demi piles sont reliées par un pont salin, fermant le circuit électrique.

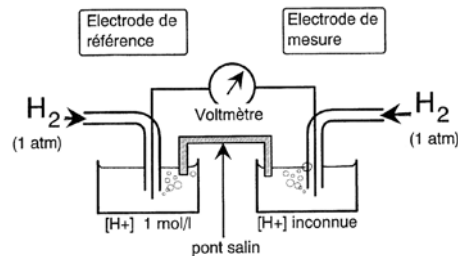


Figure IV-2 : Mesure du pH à l'aide d'électrodes à hydrogène.

Tous les paramètres étant connus, on démontre facilement à partir de l'équation de Nernst que la différence de potentiel mesurée entre les deux demi piles est directement proportionnelle au pH :

$$E = - 0,06 \text{ pH}$$

Cette valeur représente la sensibilité idéale d'une électrode de mesure du pH ($\Delta E/\Delta \text{pH}$), soit 60 mV par unité pH. Un pH-mètre est ainsi simplement un voltmètre étalonné pour rendre les résultats directement en unités pH.

Utilisés comme techniques de référence, ces montages ne sont pas facilement adaptables à la routine. Les électrodes à hydrogène sont remplacées par d'autres électrodes plus faciles à manipuler. Mais les principes sont les mêmes et il y a toujours (Figure IV-3) :

- une électrode de référence, au calomel (Hg_2Cl_2) ou à l'argent/chlorure d'argent, de potentiel fixe, bien que différent de 0 ;
- une électrode de mesure, constituée par une fine ampoule d'un verre perméable aux ions H^+ et contenant une solution de concentration connue de H^+ . Il se développe sur la membrane de verre séparant la solution interne de la solution à mesurer un potentiel de membrane dépendant de la concentration de H^+ dans la solution à mesurer.

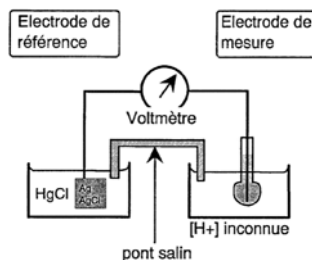


Figure IV-3 : Principe de la mesure du pH à l'aide d'électrodes n'utilisant pas l'hydrogène.

La jonction électrique entre l'électrode de référence et la solution est là encore assurée par une jonction saline. L'utilisation de KCl saturé pour cette jonction permet en outre de maintenir constante l'activité des ions chlore au niveau de l'électrode de référence.

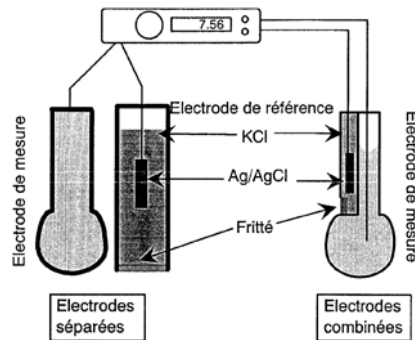


Figure IV-4 : Les électrodes de mesure du pH utilisées en routine.

Pour la mesure du pH de solutions utilisées au laboratoire à l'aide de pH-mètres, les électrodes sont fréquemment combinées en un seul module (Figure IV-4), afin de permettre la mesure sur des petits volumes par immersion de l'électrode dans la solution. Pour la mesure du pH du sang, pour lequel les volumes disponibles sont très faibles, les deux électrodes restent séparées : le sang entre en contact avec la surface active de l'électrode sur une très petite surface (Figure IV-5).

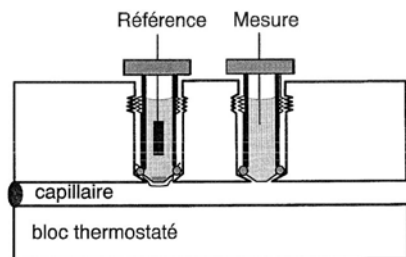


Figure IV-5 : La mesure du pH du sang sur tube capillaire dans un automate de mesure des gaz du sang.

Selon l'IFCC, lors de la mesure du pH du sang, les caractéristiques de ces électrodes doivent être les suivantes :

- temps de réponse faible, inférieur à 15 s pour une réponse de 95 % de la réponse maximale sur un échantillon préchauffé ;
- bonne stabilité : variation du signal inférieure à 0,1 mV (ou 0,002 unités pH) par période de 15 minutes lors du contact prolongé avec une solution de pH 7,38 ;
- résistance inférieure à 0,001 fois l'impédance d'entrée de l'électromètre ;

L'étalonnage fait appel à deux tampons constitués de phosphate monopotassique et de phosphate disodique, en rapport 1:1 (pH 6,839) ou 1:3,5 (pH 7,384) ; le pH bas correspond au pH de la solution à l'intérieur de l'électrode. La différence de potentiel mesurée à ce pH est donc nulle. A pH 7,38, la différence de potentiel mesurée doit être de 33,5 mV. La différence de potentiel étant une fonction linéaire du pH, ces deux points d'étalonnage sont considérés comme suffisants pour une mesure correcte. La valeur 7,38 étant la valeur normale physiologique, les mesures au dessus de cette valeur risquent d'être moins précises. Mais les états d'alcalose sont moins fréquents et moins graves que les états d'acidose, car tout le métabolisme de l'organisme produit des acides. Les appareils modernes sont capables de mesurer les dérives entre deux étalonnages et d'estimer les modifications du temps de réponse, générant des messages d'alerte si ces valeurs sont supérieures à un certain seuil. Certaines limites doivent être déterminées :

- le sodium peut donner des interférences qui sont quantifiables et doivent être évaluées ;

- possibilité d'un effet mémoire (capacité tampon de la membrane de verre) dépendant de la composition de la membrane ;
- lors de la mesure du pH du sang, les membranes de ces deux électrodes sont très sensibles aux protéines du plasma qui peuvent s'y adsorber et modifier leur asymétrie, donc leur courbe de réponse. Un nettoyage soigneux et régulier est nécessaire. Pour l'électrode de référence, il est facile de changer la membrane de référence. Pour l'électrode de verre, les lavages font intervenir l'hypochlorite (1 mol/l), des détergents ou des enzymes protéolytiques (trypsine) en milieu neutre. Les traitements physiques éventuels (frottements) doivent être doux et soigneux.

II. Equilibres acido-basiques et gaz du sang

A. les principes

Le fonctionnement correct du métabolisme cellulaire dépend en grande partie de deux facteurs importants :

- la constance du pH dont dépend l'ionisation des protéines et donc leurs caractéristiques fonctionnelles. Cette constance est assurée par des systèmes tampons, capables d'absorber les variations de pH.
- la disponibilité en oxygène et la possibilité d'évacuer le dioxyde de carbone formé à partir de cet oxygène lors du métabolisme cellulaire.

Ces deux facteurs peuvent être correctement appréciés par la mesure des gaz du sang (O_2 et CO_2) et par la mesure du pH sanguin. Ces 3 paramètres peuvent subir des évolutions très rapides en fonction des conditions respiratoires et métaboliques. Leur détermination présente un caractère d'urgence dans de nombreux domaines. Dans ces situations, un délai de réponse trop long, au-delà de 30 minutes, rend inutile les résultats !

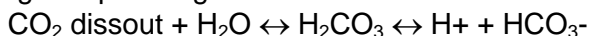
Les biologistes et les techniciens se sont donc particulièrement attachés à la mise au point de techniques rapides et fiables, précises et exactes. Les développements modernes des électrodes spécifiques et des appareils intégrés donnant accès à ces paramètres seront détaillés après un bref rappel des principes utilisés.

1. Les systèmes tampons

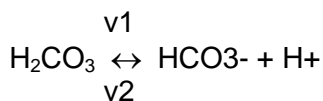
Un système tampon est un mélange d'un acide faible et de son sel capable d'amortir les variations de pH d'un mélange dans certaines limites. Par ordre d'importance décroissante, les systèmes tampons du sang comportent :

- acide carbonique - bicarbonates (H_2CO_3 - HCO_3^-)
- hémoglobine - hémoglobinate
- oxyhémoglobine - oxyhémoglobinate
- système des protéines plasmatiques
- phosphates monométalliques - phosphates bi-métalliques.

Ces systèmes tampons sont extracellulaires ou intracellulaires, mais les seuls facilement accessibles à la mesure sont les tampons extracellulaires. Tous ces systèmes étant en équilibre, la mesure du plus important d'entre eux (acide carbonique - bicarbonate) est suffisante en pratique pour apprécier l'équilibre acido-basique. Ce système dépend de l'état du CO_2 dans le plasma. Ce gaz peut en effet être sous forme dissoute CO_2 , dont une partie est hydratée en acide carbonique (H_2CO_3). L'acide carbonique présente un équilibre de dissociation avec l'ion bicarbonate. Enfin, la forme carbaminée, par fixation du CO_2 sur les fonctions amines des protéines, peut représenter jusqu'à 20-30 % du CO_2 transporté par le sang. L'équation générale est :



La dissociation de l'acide carbonique, comme celle de tout acide faible, est régie par la loi d'action des masses et s'écrit :



Les équations des vitesses de dissociation (v1) et d'association (v2) s'écrivent :

$$v_1 = k_1 \cdot [\text{H}_2\text{CO}_3] \quad \text{et} \quad v_2 = k_2 \cdot [\text{HCO}_3^-] \cdot [\text{H}^+]$$

A l'état d'équilibre, ces vitesses sont égales, d'où :

$$k_1 \cdot [\text{H}_2\text{CO}_3] = k_2 \cdot [\text{HCO}_3^-] \cdot [\text{H}^+]$$

$$\text{soit } k_1/k_2 = [\text{HCO}_3^-] \cdot [\text{H}^+] / [\text{H}_2\text{CO}_3] = K_{\text{eq}}$$

Les constantes de vitesse, k_1 et k_2 , selon la relation d'Arrhénius, dépendent de la température. La constante d'équilibre K_{eq} dépend donc aussi de la température, ce qui explique l'importance de la thermostatisation des appareils. A partir de cette équation, la concentration des ions hydrogène s'exprime :

$$[\text{H}^+] = K_{\text{eq}} \cdot [\text{H}_2\text{CO}_3] / [\text{HCO}_3^-]$$

En posant $\text{pH} = \log 1/[\text{H}^+]$ et $\text{pK} = \log 1/K_{\text{eq}}$, on obtient l'équation de Henderson-Hasselbach, caractéristique d'un système tampon :

$$\text{pH} = \text{pK} + \log [\text{HCO}_3^-] / [\text{H}_2\text{CO}_3]$$

Le pK de l'acide carbonique est 6,1. Le pH sanguin normal (7,4) conduit à un rapport des concentrations bicarbonate/acide carbonique de 20. Cette équation indique en outre que le pH d'un tampon n'est pas modifié par dilution (le rapport des concentrations n'est pas modifié), dans la mesure du moins où les éléments ont une concentration nettement supérieure aux produits de dissociation de l'eau H^+ et OH^- .

2. Les lois régissant les gaz du sang

Deux lois sont essentielles :

- la loi de Dalton : la pression d'un gaz dans un mélange de différents gaz (ou pression partielle, notée pGAZ) est identique à la pression qu'il développerait s'il était seul dans le même volume. Les pressions partielles de l' O_2 et du CO_2 (pO_2 et pCO_2) sont les plus importantes d'un point de vue médical.

- la loi de Henry : la quantité de gaz dissous dans un liquide est proportionnelle à la pression partielle de ce gaz à une température donnée.

Les valeurs des pressions partielles doivent être exprimées en unités du système international SI, le kilopascal ou kPa ($1 \text{ Pa} = 1 \text{ newton/m}^2$). L'expression en millimètres de mercure est encore cependant très courante. 100 mm de mercure correspondent à 13,33 kPa. Les automates modernes donnent le choix entre les deux types d'expression.

3. L'interprétation biologique

Du fait de l'existence de deux processus régulateurs, les altérations de l'équilibre acido-basique peuvent être d'origine respiratoire ou métabolique. On distingue donc :

- l'acidose ou l'alcalose respiratoire, caractérisées par une augmentation ou une diminution de H_2CO_3 , liée à un excès ou à un défaut de CO_2 (excès ou défaut d'acide dit volatil) ;

- l'acidose ou l'alcalose métabolique, caractérisées par un excès ou un défaut d'acides ou de bases appelées fixes, par opposition au précédent, et d'origine métabolique : par exemple, l'acide lactique, l'acide acétoacétique, l'acide β -hydroxybutyrique, produits dans les acidoses. Ces troubles métaboliques sont appréciés par le calcul de l'excès de base qui sera défini plus loin.

En pratique, ces syndromes peuvent s'enchevêtrer. En outre, ils peuvent être totalement ou partiellement compensés par une évolution des systèmes tampons. Ainsi, il n'est pas toujours aisé d'interpréter correctement les désordres observés, ce qui est pourtant fondamental pour la conduite du traitement. On peut représenter ces différents syndromes sur un diagramme (Figure IV-6).

La ligne tampon normale représente la courbe de titrage du tampon bicarbonate et sa pente permet d'apprécier sa valeur tampon (quantité de H^+ nécessaire pour faire varier le pH d'une unité).

- La zone normale (A) se trouve à l'intersection de cette ligne et de la ligne de pCO_2 normale.

- B et C représentent des acidoses et alcaloses respiratoires non compensées : respiratoires, car la pCO_2 a varié, mais les bicarbonates sont sur la ligne tampon normale ; non compensées, car le pH a varié.

- F et G représentent des acidoses et alcaloses respiratoires compensées : respiratoires, car la $p\text{CO}_2$ a varié ; compensées, car le pH a été maintenu constant grâce à d'importantes modifications des bicarbonates. En F, ils sont augmentés pour compenser un excès d'acide ; en G, ils sont diminués pour compenser un excès de base.

- D et E qui sont sur la ligne de $p\text{CO}_2$ normale représentent des troubles d'origine métabolique. Ils sont non compensés puisque le pH a varié.

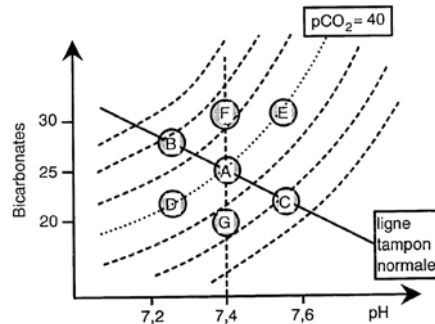


Figure IV-6 : L'interprétation des paramètres de l'équilibre acido-basique.

Les points situés en dehors de ces droites représentent toutes les combinaisons possibles de ces différents effets. Un diagnostic correct et une thérapeutique appropriée requièrent ainsi une détermination précise de ces différents paramètres.

4. les précautions préanalytiques

Les résultats les plus utiles sont obtenus sur le sang artériel. Le sang veineux peut cependant permettre une appréciation acceptable dans certains cas de l'équilibre acido-basique. Chez l'enfant, l'étude du sang capillaire artériolisé est très utilisée et donne des résultats corrects si l'état circulatoire est satisfaisant. Le prélèvement est réalisé sur tube capillaire. L'héparine est l'anticoagulant le plus adapté.

La qualité technique du prélèvement est essentielle. La présence de bulle d'air peut modifier significativement les paramètres mesurés. La seringue doit être soigneusement bouchée, et l'analyse réalisée le plus rapidement possible (moins de 30 minutes), après homogénéisation du prélèvement ; sinon, l'échantillon doit être refroidi dans la glace.

B. Les principes des mesures et leur réalisation pratique

1. Principes des méthodes de mesure

a. l'équation

L'équation de Henderson-Hasselbach n'est pas utilisable en pratique étant donné les difficultés de mesure de HCO_3^- et H_2CO_3^- . Cette équation peut être modifiée en utilisant les relations suivantes :

$$\begin{aligned} \text{HCO}_3^- &= (\text{CO}_2 \text{ total}) - (\text{CO}_2 \text{ dissout}) \\ &= (\text{CO}_2 \text{ total}) - (S \cdot p\text{CO}_2) \end{aligned}$$

S étant le coefficient de solubilité du CO_2 égal à 0,031.

L'équation de Henderson-Hasselbach devient donc :

$$\text{pH} = \text{pK} + \log \left[\frac{(\text{CO}_2 \text{ total}) - (S \cdot p\text{CO}_2)}{(S \cdot p\text{CO}_2)} \right]$$

Les constantes pK et S étant connues, il suffit de mesurer 2 paramètres pour calculer le troisième.

2. Paramètres mesurés

Trois méthodes reposent sur l'utilisation de cette équation. Une quatrième méthode repose sur un principe légèrement différent :

- mesure du pH et du CO_2 total, calcul de la $p\text{CO}_2$;
- mesure du CO_2 total et de $p\text{CO}_2$, calcul du pH.

Ces deux méthodes ne sont plus utilisées actuellement. La mesure du CO_2 total est réalisable par colorimétrie (l'addition au sérum de H_2SO_4 titré libère le CO_2 total ; la

neutralisation est apprécié par un indicateur coloré), volumétrie (le volume de CO_2 libéré dans les mêmes conditions que précédemment est mesuré) ou manométrie (mesure de la pression du CO_2 libéré). Ces deux dernières méthodes peuvent être appliquées au dosage de l'oxygène.

- méthode d'interpolation d'Astrup : si on équilibre le sang à des pCO_2 différentes et parfaitement connues, la variation du pH mesuré est une fonction linéaire de $\log(\text{pCO}_2)$. Connaissant le pH avant équilibration, on en déduit la pCO_2 réelle. Le report sur une abaque spéciale, construite expérimentalement, permet de déduire tous les autres paramètres. Cette méthode n'est plus utilisée, mais le nom "Astrup" est encore parfois employé à la place de "gaz du sang".

- mesure du pH et de la pCO_2 le CO_2 total étant calculé. Cette méthode est la plus couramment employée, puisque pour ces deux paramètres on dispose d'électrodes sélectives. Cette méthode peut en outre être étalonnée avec des gaz appropriés, alors que les méthodes précédentes ne peuvent pas l'être, le CO_2 total étant un mélange complexe.

3. Mesure de la pCO_2

Les électrodes modernes dérivent toutes de l'électrode de Sveringhaus (1958). Le CO_2 dissout dans le sang diffuse à travers une membrane de Téflon et modifie le pH d'une solution de bicarbonate de concentration connue. On n'a donc pas une mesure directe, mais indirecte, et il est nécessaire d'étalonner l'électrode avec deux concentrations de CO_2 (généralement 4 et 8 %) qui fournissent une pCO_2 calculable si on connaît la pression atmosphérique. En pratique, on a une électrode de mesure du pH combinée, mesurant le pH d'une petite chambre contenant l'électrolyte (Figure IV-7).

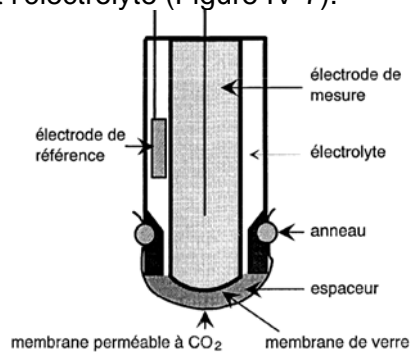


Figure IV-7 : L'électrode de mesure de la pCO_2 .

Les protéines peuvent modifier par adsorption la perméabilité de la membrane qui doit donc être changée périodiquement. Ceci permet en outre le renouvellement périodique de l'électrolyte. Le remplacement doit être soigneux pour ne pas modifier le volume de la chambre de mesure, ce qui changerait la courbe de réponse de l'électrode.

4. Paramètres calculés

Des abaques permettent de déterminer graphiquement un paramètre lorsqu'on connaît les deux autres. Avec les appareils récents pilotés par microprocesseur, cette détermination s'effectue directement par calcul. De nombreux paramètres sont calculables ; les plus utilisés en pratique courante sont :

- les bicarbonates, parmi lesquels on distingue :
 - + les bicarbonates réels, concentration des bicarbonates dans le sang à sa pCO_2 et son pH réel;
 - + les bicarbonates standard ou normalisés : c'est la concentration de bicarbonate qu'aurait ce sang s'il était équilibré à 37°C et à une pCO_2 de 40 mm Hg. Cette valeur peut également être mesurée après équilibration du sang, mais son intérêt clinique est limité.
- le CO_2 total, à partir de la pCO_2 et des bicarbonates réels ;
- l'excès de base ou "base excess" (EB ou BE) ; il est positif ou négatif et, dans ce cas, correspond alors à un déficit de base. Il représente la quantité de base ou d'acide à ajouter à

un litre de sang pour normaliser son pH. L'excès de base est par définition nul dans un sang normal. Sa connaissance est très utile dans le traitement des troubles acido-basiques d'origine métabolique, car elle permet le calcul des quantités de tampons à perfuser au patient.

Une grande partie des substances tampons étant intra globulaires, ces calculs (à l'exception de celui des bicarbonates réels) font intervenir la concentration du sang en hémoglobine et la saturation de cette hémoglobine en oxygène, lorsque la valeur de l'hémoglobine n'est pas connue, le taux de 150 g/l est généralement utilisé par défaut. La saturation étant également calculée avec cette même valeur par défaut, des erreurs importantes peuvent apparaître dans les résultats des calculs pour des valeurs très anormales d'hémoglobine.

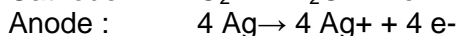
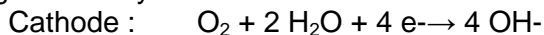
La mesure est effectuée à une température stable, fixée à 37° C, différente le plus souvent de la température réelle du malade. Certains appareils proposent des formules de correction des valeurs en fonction de la température vraie du patient. Il ne semble pas que cette correction apporte des avantages réels, alors qu'elle peut être source de confusion. En effet, d'une part, les connaissances de l'influence de la température sur le métabolisme sont mal connues, mêmes aux températures extrêmes (grandes hypo- ou hyperthermies), ce qui rend l'interprétation des valeurs délicates. D'autre part, il faut évidemment connaître la température exacte du patient au moment du prélèvement, ne pas oublier de la rentrer dans l'automate et clairement indiquer à l'édition des résultats la nature corrigée des valeurs rendues : ces trois nécessités entraînent un risque non négligeable d'erreur.

C. Etude de l'oxygène et de l'hémoglobine

1. La pO₂

Les méthodes volumétriques ou manométriques sont totalement remplacées par la mesure ampérométrique (détermination d'une intensité électrique) de l'oxygène à l'aide de l'électrode polarographique de Clark.

Une tension permanente de 600 à 700 mV est maintenue en permanence entre l'anode et la cathode. L'oxygène du sang diffuse à travers une membrane perméable de polypropylène et est réduit à la cathode en raison de la tension existante. Le circuit est complété à l'anode où l'argent est oxydé :



Le courant qui passe (4 e⁻ pour une molécule de O₂) est transformé en pO₂ après étalonnage par rapport à une pO₂ connue. L'électrode est représentée sur la figure IV-8. Comme pour les autres électrodes, on est amené à effectuer des changements réguliers de la membrane et de l'électrolyte.

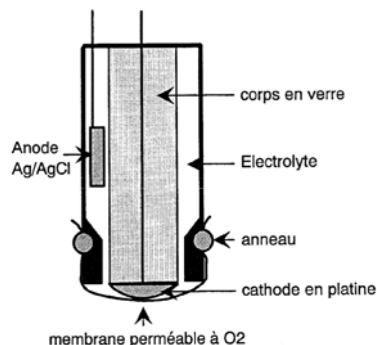


Figure IV-8 : L'électrode de mesure de la pO₂.

La saturation en oxygène du sang exprime en % le volume d'oxygène réellement transporté par le sang par rapport au volume maximal théorique possible. Le contenu en oxygène du sang est calculé à partir du taux d'hémoglobine et de sa saturation en oxygène

et il est exprimé en volume %. Ces calculs risquent d'être erronés si une valeur par défaut est utilisée pour l'hémoglobine.

2. L'hémoglobine

La détermination exacte du taux d'hémoglobine est réalisée par photométrie ou réflectométrie. Cependant, l'utilisation d'une seule longueur d'onde est imprécise, étant données les différences des coefficients d'extinction moléculaire des différentes formes d'hémoglobine. Une mesure plus exacte est obtenue après préincubation avec un réactif donnant un chromogène stable et identique quelle que soit la forme de l'hémoglobine. Malgré tout, la connaissance du taux d'hémoglobine totale laisse persister des causes d'erreurs dans le calcul de la saturation, car elle ne tient pas compte de l'incapacité de certaines formes d'hémoglobine à fixer l'oxygène (methémoglobine, CO-hémoglobine) et du rôle régulateur sur cette fixation du 2-3 diphosphoglycérate intraérythrocytaire.

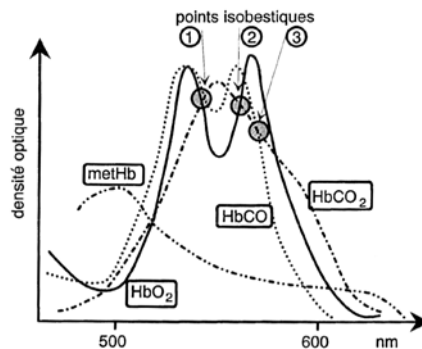


Figure IV-9 : Spectres d'absorption des différentes formes de l'hémoglobine.

MetHb : méthémoglobine ; HbCO₂ et HbO₂ : hémoglobine réduite ou oxydée; HbCO : complexe hémoglobine - oxyde de carbone. Les points isobestiques 1, 2 et 3 correspondent respectivement aux longueurs d'onde de 548, 568 et 578 nm.

Le développement des CO-oxymètres pallie à ces inconvénients : il s'agit simplement d'une mesure polychromatique (simultanée ou successive) à des longueurs d'onde caractéristiques des spectres d'absorption des différentes formes de l'hémoglobine (Figure IV-9), après dilution et hémolyse. Il faut une longueur d'onde par forme mesurée. la connaissance de 4 densités optiques permet alors de résoudre le système d'équation à 4 inconnues (Figure IV-10). Cette méthode est considérée comme une référence, mais présente quelques limitations :

- absorption ou diffusion de la lumière par d'autres substances : lipoprotéines, fragments globulaires, certains médicaments tels que le bleu de méthylène ;
- présence d'hémoglobine foetale qui ne présente pas tout à fait les mêmes spectres d'absorption que l'hémoglobine adulte. Certains programmes peuvent introduire des corrections si le taux d'hémoglobine foetale est connu et rentré dans l'appareil.

D. Les automates intégrés

Les appareils les plus simples réalisent seulement les trois mesures fondamentales pH, PCO₂ et pO₂. Pour avoir des résultats plus complets et plus fiables, la tendance actuelle est d'ajouter la mesure d'autres paramètres (hémoglobine, ions, oxymétrie) ou de connecter plusieurs appareils dont les données se complètent. Il existe de nombreux types d'appareils sur le marché, qui peuvent différer par des détails pratiques dans l'agencement des tuyauteries, la programmation des séquences d'analyse et de calibration, la géométrie des électrodes, etc... Les principaux éléments indispensables sont présentés dans les paragraphes suivants.

1. Chambre de mesure et électrodes

La chambre de mesure est le plus souvent constituée d'un capillaire sur lequel les surfaces actives des électrodes viennent se positionner. Dans certains appareils, ce capillaire est segmenté, chaque segment appartenant à une électrode, facilement

changeable (Figure IV-11). L'utilisation d'un capillaire permet de réaliser les 3 dosages électrométriques sur 80 à 200 µl de sang. la thermostatisation du bloc capillaire est indispensable : toutes les mesures sont réalisées à 37° C (± 0,05° C idéalement). Elle est réalisée par un circuit d'eau, par air pulsé ou grâce à un bloc solide thermostaté dans lequel sont creusés la chambre et les emplacements des électrodes (Figure IV-5).

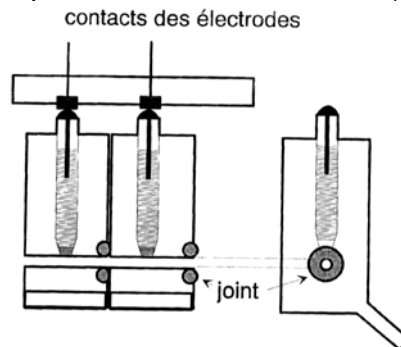


Figure IV-11 : Mini-électrodes reconstituant un capillaire de mesure.

2. Circuit hydraulique

Des tuyaux relient les réservoirs de solution à la chambre de mesure. Le déplacement des fluides, assuré par une pompe péristaltique, permet :

- l'aspiration des échantillons
- le passage d'une solution de rinçage entre deux mesures
- le passage des solutions d'étalonnage pour le pH.
- la récupération des effluents dans un flacon approprié.
- les déplacements des fluides dans les circuits sont interrompus ou libérés par des électrovannes pilotées par microprocesseur.

3. Circuit des gaz

On utilise deux gaz connus qui permettent l'étalonnage en deux points de la pCO₂ et de la pO₂, déterminées à partir du pourcentage de chacun des gaz dans le mélange et de la pression atmosphérique ambiante:

- un gaz "haut" : 8 ou 10 % de CO₂ et 0 % de O₂ le reste étant de l'azote ;
- un gaz bas: 4 ou 5 % de CO₂ et 10 ou 12 % d'O₂ le reste étant de l'azote.

On fait passer ces gaz par des humidificateurs, ce qui évite la dessiccation des membranes des électrodes et augmente leur durée de vie. L'emploi de solutions tonométrées (gaz d'étalonnage dissout dans un liquide) plutôt que de mélanges gazeux a été proposé, comme étant plus proche des conditions de mesure sur le sang. Cette méthode n'apporte pas d'amélioration particulière aux qualités de la mesure.

Dans certains cas, il existe un troisième circuit, permettant le séchage de la chambre par aspiration d'air, pour éviter les erreurs de mesure provenant de liquides résiduels éventuels.

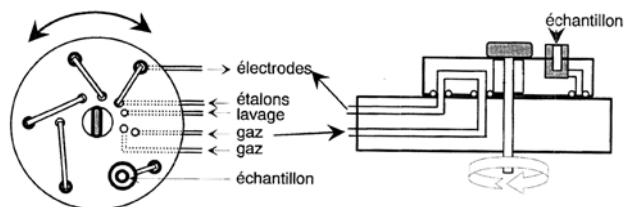


Figure IV-12 : Exemple de barillet pour la distribution des différents fluides devant traverser le capillaire de mesure dans un automate des gaz du sang. (D'après le système Corning).

4. Système multivoie

On doit donc pouvoir faire passer dans la chambre successivement 7 courants très différents: échantillon, tampons d'étalonnage de pH, gaz d'étalonnage, solution de rinçage et air pour séchage.

Différents types de "barillet" permettent de mettre en communication chaque circuit avec la chambre de mesure, par rotation manuelle ou automatique (Figure IV-12).

5. Électronique et informatique

Les signaux analogiques fournis par les électrodes sont amplifiés et transmis soit à des cadrans (voltmètre et ampèremètre étalonnés en pH, pCO₂ et pO₂) soit le plus souvent convertis en signaux digitaux affichés puis imprimés.

La gestion de ces automates est bien évidemment confiée à l'ordinateur. Les programmes présentent quelques éléments communs d'organisation :

- une mémoire permanente, comprenant la succession des séquences à effectuer pour un dosage ou une calibration, la mise en route de calibrations automatiques à intervalles fixes et la détection des pannes.
- une mémoire non permanente où sont provisoirement stockés les résultats de l'analyse et les valeurs de la dernière calibration (mesure de la dérive de l'électrode).

III. Les électrodes sélectives aux ions

Lors de la mesure du pH à l'aide de l'électrode de verre, on s'est très vite aperçu que les erreurs étaient de plus en plus grandes quand on travaillait dans les pH alcalins. Ces erreurs furent attribuées à des ions alcalins, Na⁺ ou K⁺, entrant en compétition avec les ions H⁺. On a donc imaginé la fabrication de verres plus sensibles aux ions alcalins qu'à l'ion H⁺, donnant ainsi des électrodes spécifiques, qu'il vaut mieux d'ailleurs appeler sélectives à cause des interférences possibles. La sélectivité de certains verres pour Na⁺ ou K⁺ peut ainsi atteindre 100 ou 1000 par rapport à l'autre ion ou à H⁺.

A. Principes généraux

1. L'activité des ions

On réalise là encore une pile permettant l'application de la formule de Nernst pour la mesure de l'activité (a) de l'ion principal (i) de charge (n) à mesurer, en prenant en compte l'activité des ions (j) susceptibles d'interférer dans la mesure. Dans sa formulation la plus générale, la relation s'écrit :

$$E = E_0 + \frac{RT}{nF} \log [a_i + \sum K_{ij} (a_j)^{n_i/n_j}]$$

K_{ij} représente le facteur de sélectivité de l'électrode qui, idéalement, doit être égal à zéro.

Si la notion d'activité avait peu d'importance pour l'ion H⁺, du fait de sa faible concentration, cette notion devient importante pour la détermination potentiométrique des ions dont la concentration sérique est plus grande. L'activité a est reliée à la concentration C par la relation :

$$A = \gamma C$$

La concentration inconnue est mesurée par comparaison des différences de potentiel obtenues sur l'échantillon avec celles obtenus sur un étalon. Le coefficient d'activité γ n'étant pas mesuré, la valeur de la concentration n'est valable que si le rapport des coefficients est voisin de 1. Le coefficient γ est voisin de 1 dans un échantillon très dilué (10⁻⁷ M, d'où le fait que cette notion est négligée pour le pH) mais dans le plasma, les concentrations de Na⁺ sont environ 0,14 M et γ est voisin de 0,75. Cependant, ces concentrations varient dans des limites assez étroites et les mesures sont possibles, les erreurs n'étant manifestes que lors de variations pathologiques très importantes.

Les mesures sont correctes, à condition que la pente de réponse de l'électrode soit suffisante et qu'on respecte le domaine de linéarité, ce qui pose des problèmes pour les valeurs faibles, notamment pour les mesures sur l'urine.

2. L'eau plasmatique

On mesure en fait une activité dans l'eau plasmatique, qui ne représente pas la totalité du volume de l'échantillon. Une partie de ce volume est occupée par les protéines et les lipoprotéines. La formule empirique de Waugh est applicable :

$$\text{eau plasmatique} = 99,1 - 0,073 \cdot \text{protéines totales} - 0,013 (\text{cholestérol} + \text{triglycérides})$$

Mais l'utilisation de cette formule est lourde, difficile et coûteuse en routine, puisqu'il faut mesurer trois paramètres supplémentaires. Comme ces valeurs sont la plupart du temps dans le domaine normal, une simple correction systématique de 7 % est effectuée :

$$\begin{aligned} \text{eau plasmatique} &= 99,1 - (0,073 \times 72 \text{ g/l}) - (0,013 \times 6 \text{ g/l}) \\ &= 93,2 \end{aligned}$$

Pour des sérums franchement pathologiques, les différences pourront être plus importantes et atteindre 20-30 mM pour Na.

Un autre moyen de minimiser l'erreur est la dilution de l'échantillon : on parle alors de potentiométrie indirecte, opposée à la potentiométrie directe réalisée sur l'échantillon non dilué (Figure IV-13).

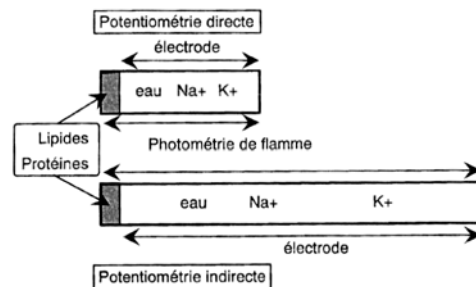


Figure IV-13 : Potentiométrie directe et indirecte.

Le problème se complique encore de plusieurs manières :

- l'effet des lipides dépend de la nature de la lipoprotéine sérique augmentée (problèmes de contact avec la membrane)
- l'hématocrite a aussi une influence: le Na varie de 8 mmol/l entre le plasma et un sang total ayant un hématocrite de 70 %.

Dans les urines, les résultats obtenus sur le Na sont abaissés si le K est supérieur à 80 mmol/l. Ce phénomène ne se produit pas sur des solutions aqueuses de même concentration et ne dépend pas du pH.

Dans un essai multicentrique publié en 1983 par le CNEH sous l'égide de la SFBC, la comparaison photomètre de flamme - électrode sélective donnait le graphique représenté dans la figure IV-14.

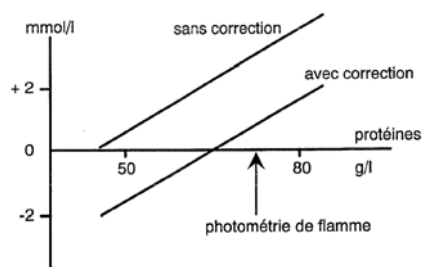


Figure IV-14 : Différence entre potentiométrie et photométrie d'émission.

Cette différence varie avec la concentration en protéines du sérum. Pour une valeur constante de photométrie d'émission (axe des abscisses), la différence des valeurs obtenues par les électrodes sélectives, avec ou sans correction, est donnée en ordonnée (d'après une étude du CNEH).

L'utilisation de l'activité des ions aurait dû conduire à un changement des habitudes des cliniciens dans l'interprétation des valeurs pathologiques. En fait, l'interprétation clinique est

largement plus imprécise que ces différences, et le passage d'une méthode à l'autre s'est en réalité passé sans problème!

B. Les électrodes sélectives

Les membranes sélectives peuvent être solides (verre notamment) ou liquides (liquide organique non miscible à l'eau, incorporant un composé chargé ou non, variable selon l'élément à mesurer et jouant le rôle de complexant ou ionophore (Figure IV-15). Par son interaction avec ce composé, l'ion à mesurer modifie le potentiel de membrane. Au moins une cinquantaine d'ions est théoriquement mesurable par cette technique.

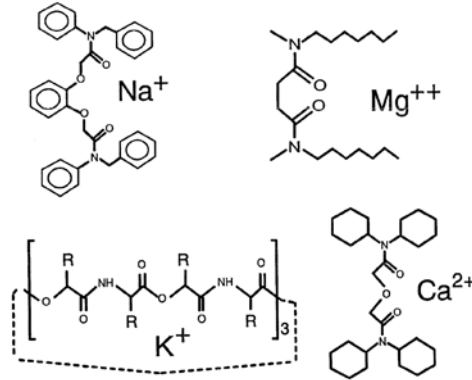


Figure IV-15 : Différents ionophores utilisés pour les électrodes sélectives.

Pour le potassium K^+ , la formule représente la structure générale de la valinomycine, peptide cyclique à 12 acides-aminés.

Cependant, le problème de la sélectivité de la membrane dans un milieu complexe est très important pour des ions présents en faibles concentrations. Ainsi, en pratique clinique, seul un petit nombre d'ions est mesurable et mesuré à l'aide d'électrodes, couramment appelées ISE ("ion selective electrodes").

1. Sodium

Des verres modifiés grâce à l'addition d'alumine, d'anhydride borique, d'oxyde de sodium ou d'oxyde lithium, permettent d'obtenir une sélectivité satisfaisante pour le Na^+ . On peut également utiliser des ionophores, tels que la monensine dans les électrodes à usage unique de la chimie sèche.

2. Potassium

Compte tenu de la concentration plus faible du potassium dans le sérum (4 mmol/l de K^+ contre 140 pour le Na^+), les électrodes de verre, théoriquement réalisables, ne sont pas utilisables en pratique. On a recours à un autre procédé : sur un support poreux tel que le verre fritté, on réalise une membrane liquide, grâce à un solvant polaire non miscible à l'eau (tel que le diphényléther) dans lequel on dissout un composé capable de séquestrer l'ion K^+ et de modifier ainsi le potentiel de membrane. l'ionophore le plus souvent utilisé est un oligopeptide cyclique, la valinomycine.

L'ion ammonium est celui qui interfère le plus avec le K^+ , mais les augmentations de cet ion sont relativement rares et observées dans des pathologies très particulières et bien connues (grandes insuffisances hépatiques). La détermination du K^+ sur sang total ne permet pas d'éliminer le problème de l'hémolyse.

3. Autres composés

Le calcium ionisé (forme active du calcium plasmatique) et le chlore sont également couramment mesurés par électrodes sélectives à l'aide de complexants ou ionophores appropriés. D'autres électrodes sensibles à d'autres ions (NH_4^+ , F^- , I^- , nitrates, etc...) sont moins utilisées en routine.

C. Conclusion

1. Avantages des électrodes

Les appareils à électrodes sélectives ont réalisé d'énormes progrès et présentent plusieurs avantages, notamment l'absence de fluides (air, propane), ce qui évite une infrastructure assez lourde et est un facteur de sécurité. La rapidité de la réponse et la sélectivité sont très satisfaisantes en pratique clinique. Actuellement, la durée de vie des électrodes pour les ions majoritaires atteint et dépasse couramment un an.

2. Limites des mesures électrométriques et développement de nouvelles méthodologies

En contrepartie, il faut bien connaître les problèmes posés par cette technique (effets matrices, interactions d'autres ions, influence des protéines, des lipides ou de l'hématocrite) et informer les cliniciens des variations constatées par rapport à la photométrie de flamme dans certaines situations pathologiques.

L'obtention de résultats corrects exige une maintenance soignée et des calibrations fréquentes, qui ont limité l'application des électrodes au domaine des médiateurs et autotests où, pourtant, leur simplicité aurait pu représenter un atout séduisant.

Le développement de méthodes photométriques simples représente une alternative. Les méthodes colorimétriques de la Société Technicon (Bayer-Diagnostics) utilisent des cryptates spécialement conçus (Figure IV-16) : la fixation de l'ion est sélective du fait de la taille de la cavité du cryptate ; cette fixation modifie le pK du complexe, entraînant une variation de densité optique. Il a également été proposé l'utilisation de réactions enzymatiques contrôlées par le caractère indispensable de l'ion K⁺ pour l'activité. Réduire la détermination des ions à une mesure colorimétrique banale risque à terme de concurrencer sérieusement les méthodes électrochimiques. Cependant, avec les automates actuels, cette utilisation surchargerait la voie d'analyse principale et diminuerait en fait la productivité. L'analyse des coûts et des performances en routine sera peut-être un élément déterminant de l'évolution de ces méthodes alternatives aux électrodes ou à la photométrie d'émission.

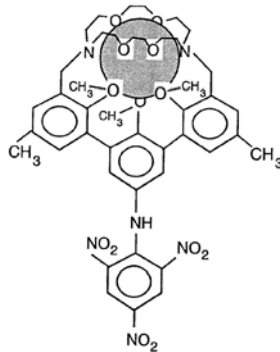


Figure IV-16 : Exemple de cryptate utilisé pour la mesure colorimétrique de l'ion potassium. (D'après le "chromolyte" développé par la Société Technicon).

IV. Les électrodes à enzymes

A. L'immobilisation

Les applications des enzymes aux dosages sont limitées en partie par leur coût et leur instabilité : ces enzymes ne servent qu'une fois, ce qui est un gaspillage de produits précieux. L'immobilisation des enzymes sur un support solide présente donc de nombreux avantages :

- le même enzyme peut servir très longtemps ;
- sa stabilité est augmentée (surtout en cas de liaison covalente qui s'oppose au déplissement de la chaîne protéique) ;
- surtout, on peut coupler à ce support un capteur électrochimique sensible à la substance produite ou utilisée par l'enzyme lors de son action, ce qui permet de réaliser un dosage.

Plusieurs types de fixation des enzymes peuvent être envisagés (figure IV-17). L'adsorption simple est facile à réaliser, mais difficilement contrôlable et instable. Le piégeage dans des microbilles ou dans un réseau de polymère à mailles étroites laisse l'enzyme en solution et augmente peu sa stabilité. La formation de liaisons covalentes entre une molécule d'enzyme et le support, ou entre diverses molécules d'enzyme, pour former un réseau est également utilisable.

Les principes apparaissent simples, mais la réalisation pratique est parfois délicate. Les recherches actuelles portent sur la création de nouvelles interfaces électrochimiques entre la membrane enzymatique et le microprocesseur, sur la miniaturisation et l'accroissement de fiabilité de ces systèmes.

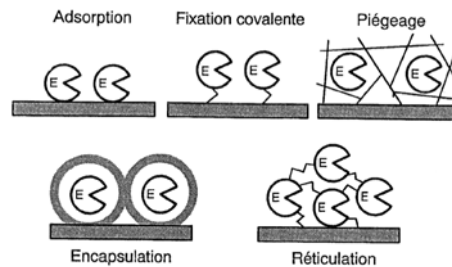
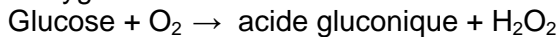


Figure IV-17 : Les différents procédés d'immobilisation des enzymes.

B. Applications

1. Utilisant la mesure de l'oxygène

L'oxygène consommé lors de la réaction de la glucose oxydase :



est mesuré grâce à une électrode de Clark et permet de réaliser le dosage du glucose. On recouvre la membrane de l'électrode à pO_2 d'un film protéique contenant la glucose oxydase (figure IV-18). Le film est fait de gélatine, qui a l'avantage de stocker beaucoup plus d'oxygène que l'eau ; ainsi le dosage ne dépendra pas de la quantité d'oxygène du sang veineux qui est très variable.

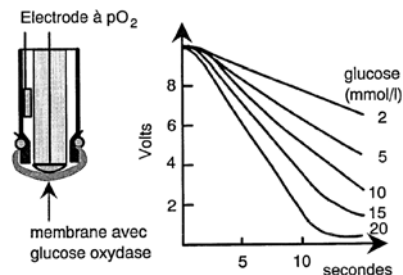


Figure IV-18 : Electrode à enzyme pour le dosage du glucose.

Les pentes de réponse de l'électrode obtenues lors de l'étalonnage sont représentées dans le diagramme de droite.

C'est une électrode ampérométrique où l'espèce redox est consommée par la réaction à l'électrode. La diminution de la pO_2 dépend de la quantité de substrat : la pente est proportionnelle à la concentration de glucose. Le capteur devient entièrement dépendant de la vitesse du transfert de masse entre la solution et la membrane. C'est certainement l'électrode la plus étudiée, compte tenu de la prévalence du diabète et de l'importance économique du dosage du glucose.

2. Utilisant la mesure du CO_2

Toutes les réactions libérant ou consommant du CO_2 peuvent être suivies par couplage avec une électrode de mesure de pCO_2 . Par exemple, les réactions de décarboxylation par les décarboxylases libèrent du CO_2 . On peut doser ainsi de nombreux acides.

3. Utilisant la mesure du pH

De nombreuses réactions enzymatiques libèrent ou consomment des ions H^+ . Le couplage à une électrode de pH permet la mesure des substrats correspondants.

4. Utilisant la mesure de la conductivité

La conduction de l'électricité entre deux plaques en platine plongées dans une solution dépend de la quantité d'ions présente dans cette solution. On peut ainsi mesurer la conductivité (en Siemens) ou la résistivité (en Ohms) d'une solution. Ce paramètre est proportionnel à la force ionique de la solution. Toute réaction modifiant la quantité d'ions est mesurable. En pratique, cette technique a été appliquée à la mesure de l'urée, qui sous l'action de l'uréase, libère des ions ammoniums.

5. Electrode immunoenzymologique

Une telle électrode est concevable à partir des principes exposés pour les dosages immunoenzymatiques, notamment la technique sandwich. L'utilisation d'une microcellule à circulation permet facilement la réalisation des différentes étapes de la réaction (Figure IV-19). La membrane sélective porte l'anticorps primaire. Après incubation avec l'analyte et rinçage, on fixe un deuxième anticorps anti-analyte portant la glucose oxydase. L'activité est mesurée ensuite comme pour l'électrode à glucose. Pour le moment, il faut changer la membrane pour chaque dosage. De nombreuses études sont en cours pour résoudre ce problème.

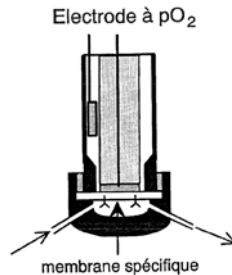


Figure IV-19 : Electrode immuno-enzymologique avec mini-cellule à circulation.

V. Autres capteurs biochimiques

D'autres méthodes sont développées ou développables, permettant d'élargir le champ des mesures électrométriques, au laboratoire ou en dehors du laboratoire, au lit du malade.

A. Les mesures transcutanées des gaz du sang

Les gaz du sang peuvent diffuser à travers la peau ; cette diffusion dépend de la température. Il est possible de suivre de manière non invasive l'évolution des pressions partielles d' O_2 et de CO_2 à l'aide d'électrodes adaptées de celles déjà décrites précédemment. Les principales adaptations concernent les points suivants :

- une surface de contact plus grande, car les quantités de gaz qui diffusent sont faibles;
- la présence d'un élément chauffant, afin de maintenir une température constante, associé à un capteur de température régulant cet élément chauffant. Ceci impose un changement régulier de place de l'électrode pour éviter les brûlures superficielles de la peau.

Les deux électrodes peuvent être dissociées ou combinées en une seule.

B. Les capteurs de type FET

1. Principes

Un transistor à effet de champ (FET : "field effect transistor", ou MOSFET : "metal oxide semi-conductor field effect transistor") fonctionne sur le principe représenté dans la figure IV-20. Le potentiel V_g appliqué à la grille crée dans le substrat un champ plus ou moins important ; selon la valeur de ce potentiel, ce champ s'oppose alors à la circulation des électrons entre la source et le drain, circulation créant un courant de drain d'intensité I_d . Pour réaliser un capteur, il suffit que le potentiel de la grille soit dépendant de l'espèce chimique à

mesurer (grille sélective) : on peut ainsi réaliser un ISFET ("ion Sensitive Field Effect Transistor") ou un ENFET ("Enzyme Field Effect Transistor"). Dans ce dernier cas, les problèmes à résoudre sont encore plus difficiles que pour les électrodes à enzyme traditionnelles (faible durée de vie, réponse sub-nernstienne, temps de réponse long...). En pratique, il est plus sûr de mesurer V_g en maintenant I_d constant, car on est alors indépendant des caractéristiques géométriques ou électroniques du transistor. Pour un fonctionnement optimal, le transistor doit être parfaitement isolé du milieu ambiant (Figure IV-21).

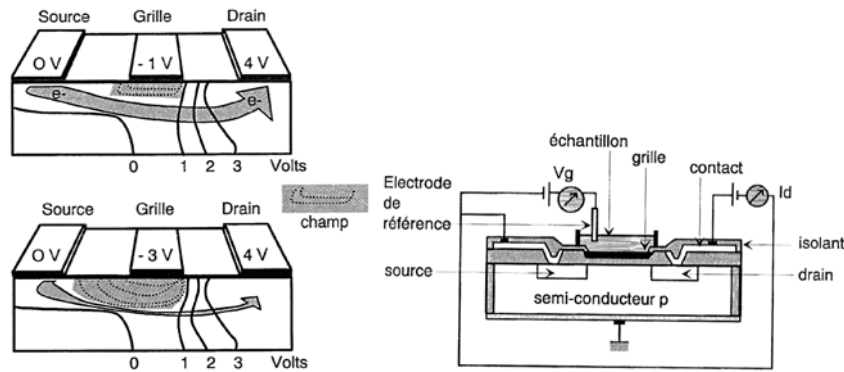


Figure IV-20 (à gauche) : Principe d'un transistor à effet de champ.

En haut, le potentiel de la grille est faible et le champ généré peu intense ; les électrons circulent facilement de la source vers le drain au sein du support semi-conducteur. En bas, le potentiel de la grille est plus important et le champ plus intense; la circulation des électrons entre source et drain est réduite.

Figure IV-21 (à droite) : Réalisation d'un ISFET.

2. Avantages et limites

Par rapport aux électrodes sélectives, les avantages théoriques sont nombreux :

- l'ensemble est solide (pas d'électrolyte) et robuste; la fabrication fait appel à des techniques bien éprouvées de fabrication des transistors, permettant des productions en grande série, à un coût plus faible que celui des électrodes spécifiques classiques.

- l'encombrement très réduit d'un ISFET (quelques millimètres) concourt à ces deux qualités précédentes, et permet d'intégrer le traitement du signal dans le capteur lui-même.

Cet ensemble de qualités permet d'envisager le développement de capteurs à usage unique, éliminant les délicats problèmes de maintenance qui ont jusqu'ici freiné le développement des méthodes électrochimiques hors du laboratoire d'analyse.

De nombreux capteurs ISFET ou ENFET ont été développés à l'échelle du laboratoire (tableau IV-22).

Ion	Grille sélective	Sensibilité (mV/décade)	Linéarité	Temps de réponse	Interférences
H ⁺	Ta2O5	57	10 ⁻¹ -10 ⁻¹³	95 % = 0,1 s 98 % = 60 s	Na, K
K ⁺	valinomycine dans PVC	57	10 ⁻¹ -10 ⁻⁵	95 % = 0,6 s	Na
Ca ²⁺	Dodecyl phosphonate	59	10 ⁻¹ -10 ⁻²	95 % = 0,1 s	Na, K
Urée	enzyme	20	10 ⁻²	95 % = 40 s	

Figure IV-22 : Exemple des caractéristiques de quelques ISFET.

C. Voltamétrie

La voltamétrie impulsionnelle après adsorption de surface ("adsorptive stripping voltammetry") est une méthode ancienne, qui a subi de nouveaux développements avec l'amélioration des moyens électroniques et informatiques de traitement et d'analyse du signal. Le principe de cette méthode repose sur deux étapes :

- une première étape de préconcentration de l'analyte à la surface de l'électrode. Cette étape dépend de nombreux paramètres : potentiel de l'électrode, pH, force ionique,

température..., qui influencent les transferts de masse entre la solution et l'électrode. La sélectivité de l'adsorption est assurée par le choix du potentiel et l'utilisation de tampon approprié. Pour les espèces chimiques non chargées, ou pour les métaux, elle peut être améliorée par l'utilisation d'agents complexant l'analyte. L'adsorption dépend aussi évidemment de la nature de l'électrode : la plus fréquemment utilisée est dite "à goutte de mercure pendante", mais d'autres existent (pâte de carbone, graphite imprégné, platine). Cette étape de préconcentration permet d'atteindre des gammes de concentration très faible (10^{-7} à 10^{-9} M en 1-5 minutes de préconcentration).

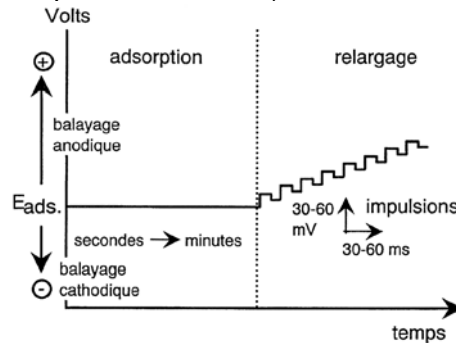


Figure IV-23 : Principe de la voltamétrie à balayage impulsif.

- une deuxième étape qui consiste en un balayage impulsif, en diminuant ou augmentant par impulsions brèves (quelques millisecondes) le potentiel de l'électrode, selon les caractéristiques redox de l'analyte ou du complexe formé avec l'analyte (Figure IV-23). Ce balayage entraîne une redissolution du complexe, générant un courant mesuré (en nanoampères). On détecte un pic dont la position est caractéristique de l'analyte et la hauteur proportionnelle à sa concentration. Dans des conditions bien choisies, plusieurs analytes peuvent être mesurés en même temps (Figure IV-24). La méthode des ajouts dosés permet un bon étalonnage. La mesure est parfois réalisée après remplacement de l'échantillon par un tampon approprié, ce qui augmente la spécificité en éliminant les interférences par d'autres espèces chimiques électroactives présentes dans l'échantillon.

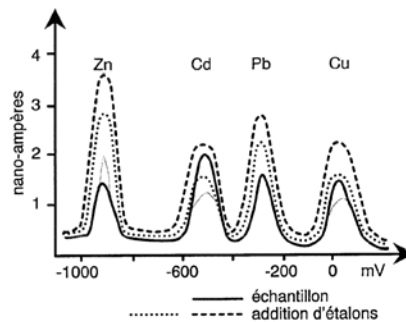


Figure IV-24 : Exemple des tracés obtenus lors du dosage voltamétrique de 4 ions.

L'analyse de la qualité des eaux et notamment de l'eau de mer, pour la recherche des métaux traces, est une application importante de la méthode. Dans le domaine biologique, le dosage de nombreuses molécules médicamenteuses dans le sang ou l'urine a été développé.

D. Les méthodes de pH différentiel

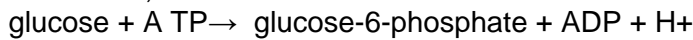
Les méthodologies de pH différentiel sont apparues vers 1971, quand a été mis au point un appareil capable de détecter de très petits changements de pH (10^{-5} unités) entre deux solutions aqueuses. Bien que peu utilisées en pratique, ces méthodes pourraient être utiles, car non seulement elles évitent les erreurs dues à la turbidité ou à l'hémolyse, mais elles permettraient de réaliser des dosages rapides (1 à 3 minutes) sur sang total, sans

centrifugation préalable, dans des gammes de concentrations courantes en biochimie clinique (10 pM pour les substrats, 1 U/l pour les enzymes). Ces méthodes peuvent s'utiliser pour toutes les réactions faisant intervenir le NAD, les phosphates, une décarboxylation, une désamination, la rupture ou la synthèse d'esters, etc...

Plusieurs paramètres sont importants à considérer :

- la nature du tampon : un tampon sulfate d'ammonium ou un tampon tris sont à éviter. Pour ce dernier, par exemple, la sensibilité du pK aux variations de température est trop grande ; une différence de 0,001° C donne une variation de pK de 0,10 mpH.

- les réactions annexes de la réaction principale. Par exemple, dans le dosage du glucose avec l'hexokinase,



il existe une dizaine de réactions parasites qui interviennent sur la modification du pH final :



etc...

On peut résoudre le problème soit par le calcul, soit plus simplement par étalonnage, la difficulté principale d'un tel étalonnage étant la prise en compte du pouvoir tampon du sang total.

Les résultats obtenus sur sang total sont identiques à ceux obtenus sur plasma pour quelques paramètres (glucose, urée, créatinine...) mais sont différents pour d'autres, notamment les enzymes ayant aussi une localisation intraglobulaire, telle que la CPK ou la LDH. La signification clinique de ces différences n'est pas encore connue.

E. Les optrodes

Les optrodes ou capteurs à fibres optiques ("Optical electrodes") reposent sur la mesure de la modification d'un signal lumineux de manière sélective par le paramètre à mesurer. La conduction du signal lumineux est assurée par une fibre optique jusqu'à la cellule de mesure ; le retour du signal à l'unité de traitement est réalisé par une autre fibre optique (Figure IV-25). De par sa sensibilité, la fluorescence est fréquemment utilisée.

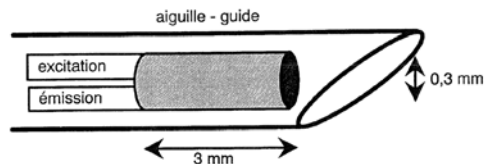


Figure IV-25 : Une optrode pour mesure biochimique in vivo dans la circulation sanguine.

Dans une chambre ou cellule de mesure est enfermé un composé (coloré, fluorescent ou luminescent) séparé du milieu à analyser par une membrane semi-perméable permettant le passage par dialyse du composé à étudier. Est également inclus dans la cellule de mesure un système de reconnaissance spécifique (enzyme, complexant, etc...). L'interaction entre l'analyte et le système de reconnaissance modifie le signal lumineux (absorption, longueur d'onde de fluorescence, intensité de fluorescence, etc...) les développements théoriques pour les mesures in vivo sont nombreux et séduisants¹. La miniaturisation des systèmes permet d'envisager des déterminations en continu directement dans le courant circulatoire.

Les optrodes les plus étudiées concernent :

¹ Hall E.A.H, Recent progress in biosensor development. international Journal of Biochemistry 20 (1988) 357-362.

- la mesure en continu du pH sanguin (la fluorescence de certains composés est très sensible au pH). Ce type d'optrode est déjà commercialisé.

- la mesure en continu du glucose sanguin, pouvant être couplée à une pompe à insuline dans la réalisation d'un pancréas artificiel. Un exemple de fonctionnement d'une optrode à glucose est donné dans la figure IV-26.

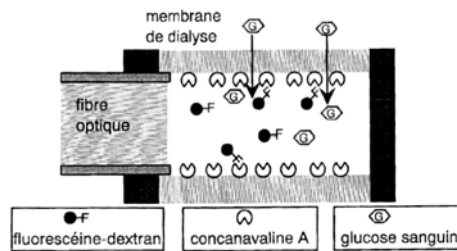


Figure IV-26: L'optrode pour la mesure du glucose sanguin in vivo.

Le glucose sanguin diffuse à travers la membrane de dialyse et modifie l'équilibre de fixation entre le complexe fluorescéine-dextran (le dextran est un petit polymère de glucose) et la concanavaline A (lectine liant spécifiquement le glucose) fixée à la membrane. Le relargage du complexe dextran-fluorescéine modifie la fluorescence de la fluorescéine.

- optrode à laser N₂ fonctionnant à 337 nm et permettant la mesure du NADH : elle a été proposée pour le suivi in situ dans les coronaires des conséquences biochimiques de l'ischémie cardiaque lors d'infarctus du myocarde.

VI. Conclusion

A lui seul, l'ensemble des électrodes décrit dans les premiers paragraphes de ce chapitre (pH, gaz du sang, électrodes sélectives aux ions) représenterait environ 95 % du marché des biocapteurs. Finalement, les développements commerciaux réels sont limités par rapport aux espoirs soulevés lors de l'apparition de ces techniques séduisantes², dont l'implantation est beaucoup plus longue que prévu. Le poids des habitudes et les contraintes économiques liées aux développements de ces méthodologies nouvelles sont des freins très efficaces. Les biologistes sont encore peu familiarisés avec ces techniques électrométriques qui apparaissent en concurrence avec des méthodes plus anciennes, économiquement viables et techniquement validées. Enfin, pour les biocapteurs *in vivo*, les avantages en termes cliniques, pour le bien-être et la sécurité du malade, ne sont pas dans de nombreux cas aussi importants que ce qu'il avait été espéré, par rapport aux contraintes que l'utilisation de telles techniques imposent au patient.

² Swain A., Biosensors : a new realism. Annales de Biologie Clinique 50 (1992) 175-9.

Chapitre V

Les automates

1. Généralités et classification

Le problème de l'automatisation se pose inéluctablement dès qu'un laboratoire atteint une certaine taille: le nombre de paramètres identiques demandés, le grand nombre d'analyses à effectuer imposent l'automatisation, afin que les résultats soient rendus dans un délai raisonnable, compatible avec une utilité médicale ("qualité chronologique"). De plus, l'automatisation est l'élément clef de la productivité des laboratoires, essentielle à leur survie. Enfin, par l'analyse des données obtenues lors des contrôles régionaux et nationaux de qualité, on a constaté que la précision inter laboratoire s'améliore parallèlement à l'augmentation de l'automatisation: l'achat de réactifs adaptés aux automates contribue à généraliser les méthodes recommandées (standardisation).

Depuis le développement des méthodes en flux continu, à partir des années 50, plusieurs autres types d'automates sont apparus sur le marché, reposant sur des principes différents. Les comparaisons et les choix sont devenus difficiles. Aussi, la Commission Instrumentation de la SFBC a formalisé les problèmes de l'automatisation, permettant des classifications relativement simples¹. Il n'est pas possible de décrire individuellement tous les appareils du marché : outre le caractère fastidieux d'une telle description qu'il serait difficile de rendre exhaustive, cette approche rendrait ce chapitre rapidement obsolète. Il a paru plus judicieux de dégager les grandes lignes des solutions conceptuelles et techniques adoptées. En ce sens, des appareils qui ne sont plus éventuellement commercialisés seront évoqués, car représentant des étapes historiquement importantes dans ces choix techniques et illustrant la diversité des solutions possibles. Bien des appareils et des marques actuellement commercialisés ne seront pas cités, ce qui n'enlève bien évidemment rien à leurs qualités ou à leurs performances dans les services rendus à la biochimie clinique.

Les équipements des laboratoires de Biochimie Clinique ne rentrent pas dans les listes de matériel soumis à homologation². Cependant, leur acquisition peut être soumise à une autorisation administrative préalable pour les matériels "lourds", réalisant soit plus de 200 tests/h soit plus de 5 paramètres par patient³.

L'automate n'est qu'une partie du Système de Traitement des Analyses Biologiques (STAB : figure V-1) qui inclut également l'environnement matériel et humain dans lequel l'automate doit s'insérer au mieux (critère de praticabilité). L'automate lui-même se définit par son Système d'Organisation (SO) donnant les caractéristiques logiques (ou de gestion) de l'appareil, choix faits *a priori* au tout début de la conception de la machine. Quatre sous-ensembles du SO reflètent les choix plus proprement technologiques. La description complète de l'automate est ainsi fournie par la description du SO et de ses sous-ensembles, permettant autant de classifications complémentaires.

A. le système d'organisation SO

Le SO reflète des choix logiques que l'on peut classer en plusieurs rubriques ; certains de ces choix conditionnent éventuellement les solutions techniques retenues pour les sous-ensembles.

¹ Information Scientifique du Biologiste 12 (1986) 433-442.

² Journal Officiel, 29.6.84.

³ Décret 84-247 du 5.4.84, précisé par la circulaire DH/4B/85-75 du 4.2.85.

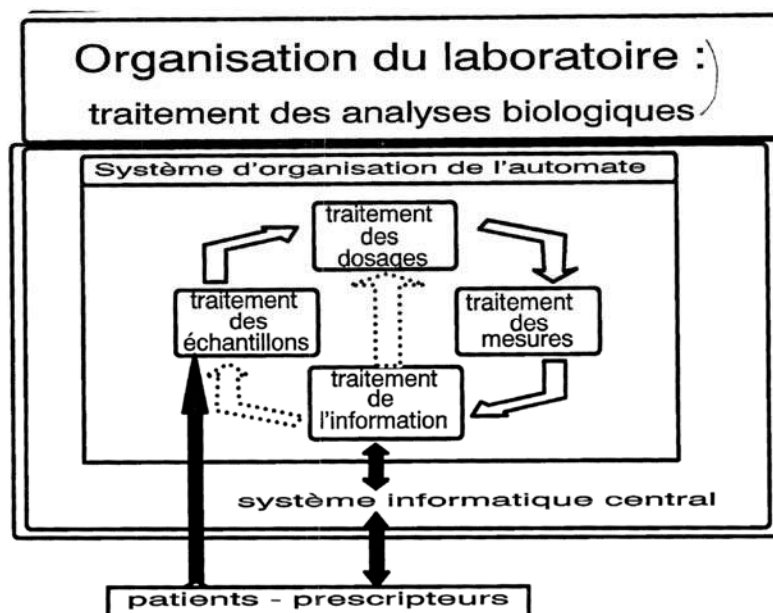


Figure V-1 : L'automate dans le traitement des analyses biochimiques.

1. Nombre de paramètres

L'analyseur monoparamétrique ne peut doser qu'un seul paramètre : s'il est fondé sur une astuce technologique particulière, il ne permet alors qu'un seul type de dosage (analyseur spécialisé). L'analyseur multiparamétrique détermine simultanément ou successivement (analyseurs séquentiels) plusieurs paramètres différents.

Les paramètres en ligne sont ceux qui sont installés à un moment donné sur l'automate et disponibles immédiatement. Ils peuvent représenter une partie seulement ou la totalité des paramètres programmables sur la machine. Le dosage des paramètres en ligne est réalisable en permanence, sans intervention extérieure (changement de plateau ou de réservoir de réactifs...). Le nombre de paramètres en ligne est un facteur important de la productivité.

2. Spécialisation

Les analyseurs spécialisés sont dédiés à la réalisation d'un seul paramètre (analyseur monoparamétrique) ou de plusieurs paramètres (analyseurs multiparamétriques) qui sont toujours les mêmes et ne peuvent pas être modifiés.

Les analyseurs non spécialisés permettent la réalisation d'un choix de paramètres plus ou moins important, en ligne ou par des changements simples. On caractérise ainsi la souplesse ou versatilité d'un appareil, ainsi que son caractère évolutif éventuel (possibilité de réaliser des analyses non prévues initialement).

3. Sélectivité

L'analyseur sélectif réalise seulement les dosages prescrits par rapport à ceux qui sont en ligne. L'analyseur non sélectif réalise tous les dosages en ligne sur l'automate. Les performances sont alors indiquées en nombre de sérums analysés par heure. La plupart des automates modernes sont sélectifs, d'où évidemment une économie de réactif et un gain de temps ; les performances sont alors indiquées en nombre de dosages ou de tests par heure.

Cependant, la non sélectivité des premiers automates avait été vécue par les biologistes et le corps médical comme un grand progrès, permettant d'obtenir pour chaque patient un bilan "complet", considéré comme utile au dépistage au suivi de nombreuses pathologies. Actuellement, la non sélectivité est génératrice de surcoûts pour le biologiste, puisque seuls les examens prescrits seront effectivement facturés et remboursés. Mais les habitudes sont tenaces : il est

encore fréquent de recevoir une prescription de ionogramme sanguin complet, alors que seul le potassium (au l'urée, ...) est réellement nécessaire ou souhaité. En outre, la probabilité de trouver des résultats en dehors des normes (fondées sur la statistique, cf chapitre I) en dehors de toute pathologie n'est pas négligeable : cela peut entraîner des examens complémentaires inutiles, coûteux et pas forcément sans danger pour le malade. Les radiologues ont bien décrit le problème sous le nom « d'incidentalome ».

4. Conditionnement des réactifs

On distingue les systèmes ouverts (réactifs non prédistribués et laissés au libre choix du biologiste) et les systèmes fermés ou clos dans lesquels les réactifs liquides ou solides sont prédistribués, selon des procédés souvent protégés par des brevets. Ces réactifs s'imposent ainsi au biologiste et ne peuvent lui être fournis que par le fabricant de l'automate. Dans ce dernier cas, le coût est généralement plus élevé que dans les systèmes ouverts, ce qui est compensé par une bonne praticabilité, notamment pour les petites séries ou l'urgence.

Un certain nombre d'automates théoriquement ouverts sont en réalité fermés, de par les modalités de prélèvement, les formes de flacons, les astuces nécessaires pour que le réactif fonctionne bien sur l'appareil, etc.

En pratique et par sécurité (ou parfois par facilité), le biologiste utilise le réactif préconisé par le fabricant comme le mieux adapté à son automate. Le coût d'utilisation lié aux réactifs doit évidemment être pris en compte lors du choix de l'automate.

5. Analyses par patient ou par série

Les analyseurs se distinguent aussi selon le mode d'organisation des dosages :

- par série : l'analyseur fait tous les dosages identiques en même temps (ou successivement) et regroupe les résultats pour un même patient seulement au moment de l'édition des résultats.

- par patient ou par bilan : l'analyseur réalise tous les examens demandés sur un même sérum avant de passer au sérum suivant. Il est alors plus difficile de suivre l'évolution de la qualité d'un paramètre donné ; selon certains, ce type d'approche induit une perte de souplesse, nécessitant une augmentation de la fréquence des contrôles de qualité. Cependant, la praticabilité médicale est bonne : pour un patient donné, les résultats sont acquis en un minimum de temps ; le traitement de l'urgence est facilité.

6. Optimisation et redosage

Dans le mode de travail "par patient", un gain de productivité supplémentaire est obtenu par l'optimisation de l'ordre des analyses demandées pour ce patient. Cette optimisation est le plus souvent automatique : mise en route d'abord des analyses les plus longues, puis seulement ensuite des plus rapides.

Si le résultat d'un dosage se situe hors de limites préétablies, certains systèmes réalisent automatiquement un redosage avec une dilution supérieure de l'échantillon. Le redosage automatique implique une gestion informatique appropriée et des contraintes techniques supplémentaires sur l'automate. En contrepartie, il améliore la productivité et supprime un risque d'erreur lié à l'intervention humaine en cas de redosage après dilution manuelle, ainsi qu'un risque de contact avec le prélèvement pour le personnel technique.

B. Les sous-ensembles

Les sous-ensembles peuvent ne pas être totalement indépendants : certains choix dans un sous-ensemble conditionnent éventuellement des choix dans un autre sous-ensemble. La distinction précise des quatre sous-ensembles décrits ci-dessous peut apparaître parfois un peu artificielle pour certaines machines. Cependant, cette division offre un moyen descriptif clair et simple des principales fonctions d'un automate.

1. Système de Traitement des Echantillons (STE)

Le STE concerne l'ensemble des opérations depuis la réception du prélèvement jusqu'à l'introduction des aliquotes dans le milieu réactionnel.

Le développement des méthodes sans prétraitement de l'échantillon a dans de nombreux cas simplifié le travail du STE : l'analyse directe sur sérum ou plasma grâce à la spécificité apportée par les enzymes ou les anticorps a permis la suppression de la déprotéinisation ou de l'extraction des composés à doser ; la suppression de la centrifugation préalable avec une analyse sur sang total est réalisable par centrifugation dans l'analyseur pour certains automates centrifuges.

De nombreuses améliorations dans ce sous-ensemble permettent d'importants gains de productivité et une augmentation de la sécurité, par diminution des risques de confusion entre prélèvements, par suppression ou automatisation de certaines tâches :

- l'identification positive des échantillons est réalisée par la fixation d'étiquettes à code barre sur le tube, le godet d'échantillon ou le rack porte godets ; la lecture optique par faisceau laser supprime ainsi les erreurs liées à l'identification et au positionnement des échantillons sur le plateau. Cependant, ceci peut induire un relâchement de la vigilance !

- l'utilisation des tubes primaires de prélèvement supprime l'étape de transfert dans un godet ou un tube spécial adapté à l'automate et les risques d'erreurs d'identification liés à ce transfert. Il faut une souplesse d'adaptation aux différents types de tubes utilisés, mais la standardisation actuelle des tubes de prélèvement facilite cette adaptation. La sécurité du personnel est accrue par la diminution du risque de contamination par des sérums pathologiques (SIDA, hépatite), lors des différentes manipulations.

- le développement de systèmes de prélèvements sur tubes fermés ou la réfrigération des échantillons élimine ou diminue le problème de la dérive liée à la conservation des échantillons ou des contrôles en godets ouverts à température ambiante ;

- l'attention portée aux problèmes de la contamination entre échantillons sera analysée ultérieurement.

Enfin, au niveau du STE, les performances des pipeteurs-diluteurs conditionnent la qualité des résultats et limitent les possibilités de miniaturisation. Jusqu'en 1980, des prélèvements de l'ordre du microlitre étaient considérés comme aléatoires.

2. Le système de Traitement des Dosages (STD)

Le STD assure l'addition des réactifs à l'échantillon, l'homogénéisation et l'incubation du milieu réactionnel. L'utilisation ou non de fluides autres que l'échantillon et les processus de circulation de ces fluides caractérisent techniquement les grands groupes d'automates. En effet, selon les principes de circulation des fluides (réactifs et échantillons) utilisés dans ce sous-ensemble, on distingue deux grands groupes d'automates :

- dans les analyseurs à flux continu, la circulation des fluides est permanente ;
- dans les analyseurs discontinus, la circulation des fluides est périodique, l'utilisation de la force centrifuge pour déplacer les fluides caractérise le groupe des analyseurs centrifuges. Tous les autres types d'automates rentrent dans la catégorie des analyseurs à transfert. Des définitions plus complètes de ces termes seront données dans les paragraphes correspondants. Les fonctions des STD pour ces classes sont rassemblées dans le tableau V-2.

Dans le traitement des dosages, deux grandes voies analytiques sont généralement séparées :

- la voie conduisant aux mesures photométriques, pour la plupart des substrats et enzymes ;
- la voie des ions, conduisant au module des électrodes sélectives ou de la photométrie de flamme.

3. Le système de Traitement des Mesures (STM)

Tous les appareils élémentaires décrits dans les chapitres précédents peuvent être théoriquement inclus dans un automate. La photométrie d'absorption moléculaire est cependant prépondérante. Le STM comprend :

- la cellule de mesure

- le module de mesure (photométrique ou autre)
- le traitement des mesures brutes : modalités des mesures (fixes ou programmables, nombre de points...), transformation du signal électrique en unités ou concentrations. Dans le STM, le facteur temps est actuellement considéré comme le plus fiable.

	Analyseurs à flux continu	Analyseurs discontinus Centrifuges	Analyseurs discontinus à transfert	
Fonctions			cuve réactionnelle et cuve de mesure identiques	cuve de mesure différentes
1. Mesure des volumes	pompe péristaltique + tuyaux calibrés	utilisation de seringues de précision		
2. Transfert des réactants	pompe péristaltique + tuyaux calibrés	force centrifuge	introduction directe dans la cuve réactionnelle	
3. Homogénéisation	bulles + bobines	vibration du rotor	aiguilles d'agitation	
4. Incubation	bobines	rotation du rotor	variable selon l'automate	
5. Transfert pour la mesure	continuité de la cellule de mesure avec le circuit réactionnel	non	transfert de la cellule réactionnelle pour la mesure	transfert du milieu réactionnel dans la cellule de mesure

Figure V-2 : Fonction du sous-ensemble de traitement des dosages dans les différents types d'analyseur.

Les procédures de contrôle (validation technique, déclenchant si nécessaire des alarmes analytiques) et la prise en compte des caractéristiques propres de l'échantillon (couleur, turbidité,...) nécessitent l'intervention du système de traitement des informations et peut amener des contraintes dans le STM ou le STD (réalisation d'un blanc - sur le même aliquote par mesure cinétique, avant ou au tout début de la réaction - ou en parallèle, sur un aliquote différent ; correction bichromatique ou polychromatique).

4. Le Système de Traitement des Informations (STI)

Les développements et la miniaturisation de l'informatique font que le STI est de plus en plus intégré à l'automate et ne transmet au système central que des données élaborées. Les performances informatiques portent :

- sur les qualités du matériel ("hardware")
- ses possibilités de traitement en fonction du nombre de microprocesseurs (1 à 20 selon les automates), conditionnant la possibilité de travail multitâches (travail au clavier ou à l'écran sur d'autres séries pendant le fonctionnement de l'appareil ;
- ses possibilités de stockage des données (disque souple, disque dur) ;
- ses possibilités de sortie: capacité et qualité de l'imprimante; possibilités de connexion (uni- ou bi-directionnelle) au système central du laboratoire.
- sur les capacités de traitement des logiciels ("software") dépendant en partie de la taille de la mémoire :
 - + gestion élaborée du contrôle de qualité et gestion des alertes sur les résultats des contrôles;
 - + gestion des alertes sur les résultats des patients à différents niveaux (validation technique et biologique) : valeurs en dehors des zones normales (alarme minimale, seulement imprimée à côté du résultat en général) ; valeurs aberrantes ou valeurs "panique", imposant une action (vérification par redosage, identique ou après dilution, souvent automatisée), téléphone au prescripteur (alarme maximale) ; beaucoup moins fréquemment, utilisation des techniques du delta check ou de la cohérence interne, permettant un certain niveau de validation biologique.

C. Les principales caractéristiques de l'automatisation

1. Conceptions générales

Quelques conceptions générales et solutions techniques se retrouvent sur de très nombreux automates, quels que soient leurs principes. Sans souci de hiérarchie ni d'exhaustivité, on peut indiquer :

- conception modulaire : possibilité de passer d'un dosage à un autre par quelques changements simples (de réservoir, de cassette, de disquette...). Les conceptions modulaires dans la mécanique et surtout dans la partie électronique permettent des dépannages très rapides et simples par échange standard de blocs. La tendance actuelle semble être d'ailleurs à la limitation des pièces mécaniques qui s'usent plus ou moins vite et qui sont les parties les moins fiables des appareils.

- conception évolutive, laissant toute possibilité de s'adapter aux nouvelles technologies et dosages, au moins ceux qui sont prévisibles dans l'état actuel des techniques.

- conception économique, atteinte de plusieurs manières: utilisation de microméthodes ; cadence élevée d'analyse, permettant une économie de personnel, vite libéré pour d'autres tâches ; sélectivité; gestion optimale de la contamination entre dosages.

- exigence de sécurité, aussi bien pour les utilisateurs, qu'en ce qui concerne la fiabilité des résultats : conservation des réactifs et des échantillons ; détection des erreurs analytiques ; détection des pannes (procédures d'autodiagnostic) ; possibilité de télédépannage (le contrôle de l'appareil est pris à distance par un technicien spécialiste, grâce à la transmission téléphonique par modem).

2. les mouvements liquidiens

Les déplacements de liquides (échantillons, tampons ou réactifs) font toujours intervenir à un moment ou un autre un nombre restreint de modules :

- Les bras mobiles, permettant le déplacement des éléments nécessaires : aiguilles de prélèvements des échantillons ou des réactifs, aiguilles d'agitation du mélange réactionnel, système de lavage et rinçage des cuves. Ils peuvent avoir des mouvements dans les trois dimensions de l'espace, et fonctionnent selon trois modalités (Figure V-3) : en coordonnées cartésiennes, en coordonnées polaires, ou de type mixte appelé "cylindrique", le plus fréquemment rencontré. Dans les distributions centralisées, ces bras subissent de simples mouvements de rotation. Sinon, des déplacements plus importants sont effectués, soit à l'aide de vis sans fin soit par glissement sur des guides avec entraînement par des courroies (Figure V-4).

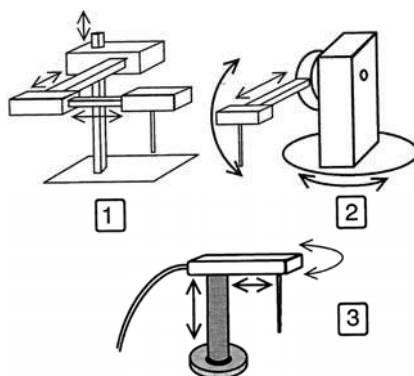


Figure V-3 : Les différents procédés de déplacements des aiguilles de prélèvement et de distribution des échantillons et réactifs par des bras robotisés.

1. Déplacement en coordonnées cartésiennes. 2. Déplacement en coordonnées polaires. 3. Déplacement "cylindrique", un des plus utilisés.

- les pompes péristaltiques (Figure V-5) représentent un des moyens les plus utilisés pour assurer le mouvement des liquides. Un tuyau souple est comprimé par un ensemble de cylindres

tournants ; le déplacement du point de compression assure le déplacement du liquide. La précision des volumes ainsi délivrés dépend de la constance de la vitesse de rotation de la pompe et de la précision du diamètre interne du tuyau. Le tuyau doit être adapté à la pompe : si la compression est incomplète, le déplacement du liquide est aléatoire. Les tuyaux étant soumis à une contrainte physique, ils s'usent et doivent être changés régulièrement. Ils peuvent relarguer des microparticules à partir de leur paroi.

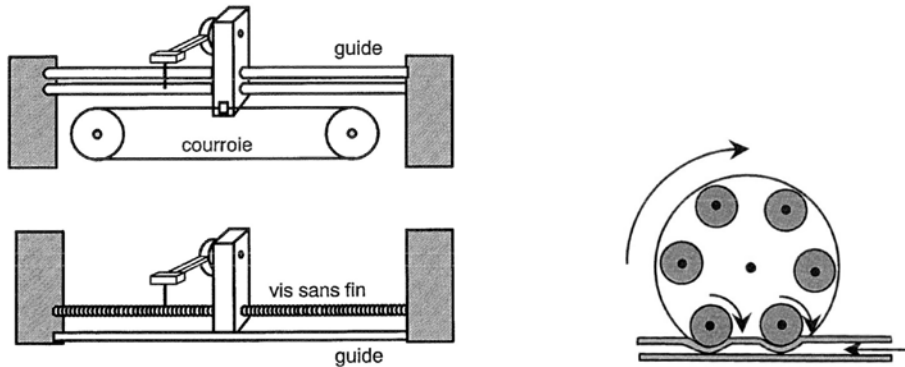


Figure V-4 (à gauche) : Déplacement des bras des éléments mobiles dans les automates par courroie ou vis sans fin.

Figure V-5 (à droite) : Principe de la pompe péristaltique.

- les seringues de précision représentent le deuxième grand système pour assurer les mouvements liquidiens (Figure V-6). La précision des volumes délivrés dépend de la précision du déplacement du piston, de l'étanchéité du système et du fonctionnement des éléments anti-retour. Très fréquemment, ce sont des électrovannes qui assurent la circulation unidirectionnelle du fluide, mais il peut s'agir aussi d'une pompe péristaltique dont le fonctionnement est couplé à celui du piston de la seringue.

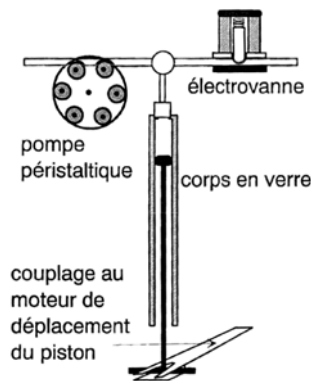


Figure V-6 : Seringue de précision et systèmes anti-retour.

A droite, par électrovanne ; à gauche, par couplage à une pompe péristaltique dont la rotation est synchronisée avec le déplacement du piston.

Dans certains gros automates, les réactifs sont contenus dans des flacons étanches maintenus à pression élevée et constante. L'ouverture par électrovanne du tube de distribution assure le débit rapide d'un volume défini précisément défini par le temps d'ouverture de l'électrovanne.

3. la gestion des échantillons

Trois possibilités sont généralement exploitées (Figure V-7), qui permettent de présenter l'échantillon devant le système centralisé de prélèvement :

- le plateau rotatif est le plus fréquemment rencontré. Il présente un nombre variable de position, selon sa taille; parfois une couronne interne est réservée aux contrôles.
- les racks mobiles, entraînés par des systèmes analogues à ceux de la figure V-4 ;

- la chaîne sans fin
- chaîne reconstituée à partir de petits racks pouvant s'accrocher les uns à la suite des autres.

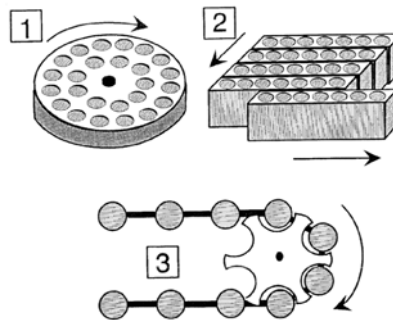


Figure V-7 : Les systèmes de positionnement des échantillons.

1. Plateau circulaire. 2. Racks mobiles, 3. Chaîne sans fin.

4. la gestion des réactifs

Le compartiment des réactifs présente une structure variable selon les appareils, mais certaines solutions techniques se généralisent :

- réfrigération du compartiment réactif, protégeant les composants fragiles (enzymes, anticorps) ;
- identification positive des flacons réactifs, éliminant les erreurs dues à un mauvais positionnement sur le plateau ou à la mise place d'un mauvais flacon ;
- suivi de la consommation des réactifs, le plus souvent par calcul (prise en compte du nombre de dosages réalisés par rapport au nombre de dosages possibles à l'aide d'un flacon plein) permettant d'alerter à temps le technicien, supprimant des risques d'erreur et de perte de temps.

a. Postes de réactifs fixes

Les flacons de réactifs étant immobiles, deux possibilités sont exploitables :

- avec un système de distribution fixe et propre à chaque réactif, les cuvettes réactionnelles défilent et s'arrêtent devant le poste du réactif nécessaire au dosage programmé. Ceci supprime le risque de contaminations entre réactifs.
- avec un système de distribution unique et mobile (cf figure V-4).

b. Postes de réactifs mobiles

L'utilisation d'un système unique et centralisé de distribution des réactifs impose de pouvoir déplacer les flacons de réactifs pour les amener vers le bras de prélèvement. On utilise :

- des plateaux circulaires, dont les mouvements sont simples et faciles à gérer, mais dont la taille peut limiter le nombre de réactifs en ligne ;
- des racks mobiles dans les deux dimensions du plan; les déplacements sont moins rapides, mais le nombre de réactifs en ligne peut être plus élevé.

5. La gestion du risque de contamination

Elle doit être assurée à différents niveaux : entre échantillons, entre réactifs, entre dosages.

a. Entre échantillons ou entre réactifs

Les systèmes gèrent de façon variable la prévention de la contamination entre prélèvements ou réactifs dispensés par un système centralisé :

- détection de niveau liquidien (Figure V-8.1). A chacun des bras de prélèvement se trouve associé un détecteur de niveau liquidien. Ce détecteur, fonctionnant le plus souvent par effet capacitif, permet de poser l'aiguille juste à la surface du liquide, cette aiguille descendant pour suivre la diminution de volume due au pipetage. Cette technique permet d'éviter les risques de prélèvements insuffisants, évite d'avoir à remplir les godets de manière uniforme et supprime une source de contamination (par la surface extérieure de l'aiguille), simplifiant et raccourcissant les étapes de lavage.

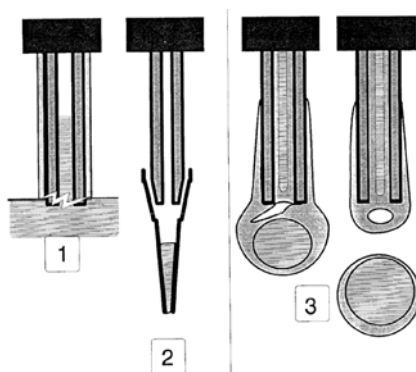


Figure V-8 : La gestion de la contamination entre prélèvements ou réactifs.

1. Détecteur à effet capacitif, 2. Embout plastique à usage unique. 3, Fluide fluorocarboné (Technicon).

- le lavage intérieur et extérieur des aiguilles de prélèvement est très souvent systématiquement ajouté entre chaque prélèvement (ce qui ralentit la cadence).

- utilisation d'un embout plastique à usage unique, analogue à celui employé pour les pipettes manuelles (Figure V-8.2).

- dans le système RA de Bayer Diagnostics (Technicon) (RA = "random access"), l'innovation la plus intéressante est la mise au point "d'embout de pipette liquide" à usage unique (Figure V-8.3). Un fluide fluorocarboné ou TRAF ("Technicon Random Access Fluid") tapisse les parois intérieures et extérieures de l'aiguille de prélèvement et forme un film continu autour de l'échantillon et du réactif, déposant une "bulle" dans la cuve de réaction. Ces bulles éclatent lors de l'agitation. Cette technique évite pratiquement toutes les contaminations entre échantillons et réactifs, puisque ceux-ci ne sont jamais directement en contact avec les parois des tubes ou des aiguilles de prélèvement. Cependant, la contamination reste possible si les réactifs ne sont pas adaptés, car le TRAF n'est pas imperméable à toutes les substances.

b. Entre dosages

La gestion du risque de contamination doit être aussi réalisée au niveau du module réactionnel :

- les modules à usage unique éliminent ce risque dans les automates à réactifs pré-distribués. Dans d'autres automates, l'utilisation de cuvettes en plastique à usage unique, soit indépendantes soit sous forme d'un plateau réactionnel complet, est fréquemment adoptée.

- la réutilisation des cuvettes de dosage permet un fonctionnement éventuellement plus économique mais impose une surveillance plus rigoureuse. Les cuvettes doivent être soigneusement lavées et contrôlées pour leur qualité optique avant réutilisation. Le lavage peut être réalisé hors de l'appareil, manuellement, mais ceci entraîne un certain risque pour le personnel. Il peut être inclus dans l'automate : une station de lavage spécialisée lave, rince et sèche les cuvettes. Certaines cuvettes ont une forme spéciale (coins arrondis) pour faciliter ces opérations et diminuer le risque de gouttelettes résiduelles dans la cuve. Une alimentation particulière en eau pure doit être raccordée à l'appareil. Le système informatique doit optimiser la gestion de cette tâche supplémentaire afin de ne pas ralentir la cadence d'analyses.

5. L'homogénéisation du milieu réactionnel

L'homogénéisation du mélange réactif - échantillon est réalisée de différentes manières :

- par vibration de la cuve, avec ou sans la présence de l'aiguille de prélèvement ou d'une aiguille spécialisée ;

- par vibration d'une aiguille spécialisée qui doit évidemment être lavée entre chaque usage ;

- par accélération et freinage brusque du plateau réactionnel de manière un peu analogue à la technique de l'analyse centrifuge. Pour cette technique, utilisée sur les appareils de type RA de Bayer Diagnostics, il existe de petites aspérités au fond des cuvettes pour faciliter la rupture des bulles de TRAF emprisonnant réactifs et échantillons.

6. Le module ISE

La plupart des automates multiparamétriques modernes réalisent les dosages des ions par électrodes sélectives, le plus souvent en potentiométrie indirecte, grâce à un module spécialisé. La conception de ce module est variable, mais ne diffère pas dans son principe de ce qui a été décrit pour la mesure du pH et des gaz du sang. Le fonctionnement de ce module est indépendant de celui de la voie analytique principale, grâce à un bras de prélèvement autonome. Les performances, exprimées en nombre de tests par heure sont ainsi nettement améliorées.

II. Le flux continu : analyseurs séquentiels simples et multiples

Développées à partir de 1950 par la Société Technicon, les analyseurs en flux continu représentent les plus anciens automates et peuvent parfois être encore présents dans certains laboratoires.

A priori, leur principe n'est pas évident, puisque ces automates ne reproduisent pas les gestes du technicien. Cependant, ce sont techniquement les plus simples, puisque les seules parties mécaniques indispensables sont une pompe péristaltique tournant à vitesse fixe et un enregistreur.

A. Caractéristiques générales

1. Principes de fonctionnement et d'organisation

a. Principe de l'état constant

La caractéristique essentielle de l'analyse en flux continu repose sur la possibilité d'enregistrer un état constant dans lequel le milieu réactionnel ne varie plus en fonction du temps (Figure V-9).

La longueur de l'état constant dépend du temps d'analyse et des volumes liquidiens. Dans les auto-analyseurs de première génération, il existe un seul canal analytique et une cadence telle qu'on mesure seulement la hauteur d'un pic. Dans les analyseurs multi-canaux ("Sequential Multiple Analyzer" ou SMA) comportant 6 à 12 canaux d'analyse indépendants, on réalise au contraire des états constants plus longs, décalés les uns par rapport aux autres de façon à pouvoir interroger chaque canal avec un seul enregistreur.

Toutes les méthodes colorimétriques chimiques, toutes les méthodes de dosages de substrats par voie enzymatique en point final se prêteront bien à l'analyse en flux continu.

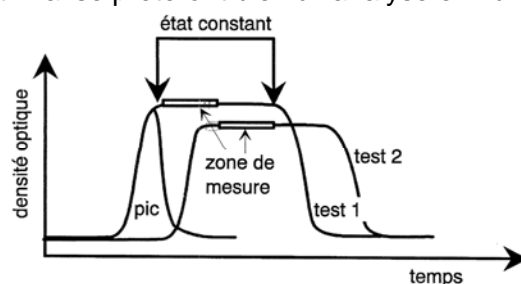


Figure V-9 : Principe de l'état constant en flux continu.

Mesure de la hauteur d'un pic (analyseur à un seul canal) ; mesure de la hauteur d'une partie de plateau (analyseur multicanal).

b. Organisation générale

Une pompe péristaltique aspire échantillons et réactifs dans les proportions exactes requises par l'analyse. Les flux liquidiens sont segmentés par des bulles d'air et circulent continuellement dans un système de tuyaux. Le dosage d'un échantillon est ainsi représenté par un "train" de segments liquidiens séparés par des bulles d'air. Le flux analytique circule ensuite dans les différents postes (Figure V-10) : dialyse, bain-marie, mesure colorimétrique dans une cuve à circulation, dont le signal est enregistré sur papier. Conçus avant les développements de la micro-informatique, les premières générations d'appareils ne comportent pas à proprement parler de système de traitement des informations et seuls les trois premiers sous-ensembles sont

individualisables : prélèvement et traitement de l'échantillon (généralement par dialyse, STE), chauffage et incubation (STD) ; mesure et enregistrement (STM).

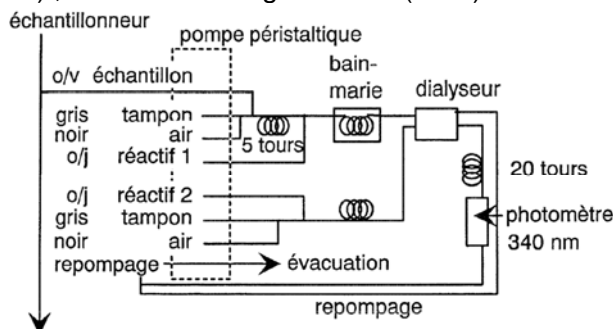


Figure V-10 : Réalisation d'une analyse sur un analyseur en flux continu: diagramme des flux. (D'après document Technicon).

c. Problèmes de l'écoulement liquidien

Un liquide circulant à vitesse constante dans un tuyau dont la surface interne est parfaitement régulière adopte un comportement "laminaire". A cause de la tension superficielle du liquide circulant et de celle du solide, les "lames" de liquide s'écoulent moins vite à la périphérie qu'au centre du tuyau (Figure V-11.1) : il existe ainsi un flux central rapide et un flux annulaire plus lent. La présence des bulles d'air régularise le flux laminaire et minimise le flux annulaire sans le faire disparaître totalement (Figure V-11.2). La contamination entre segments liquidiens est inévitable, mais la plupart du temps peu gênante: la mesure effective des hauteurs des pics ou des plateaux est réalisée sur les segments centraux du dosage, les moins contaminés.

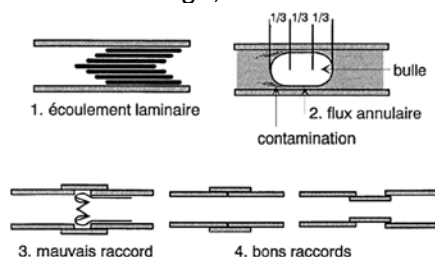


Figure V-11 : Les écoulements liquidiens en flux continu.

La qualité des raccords entre tuyaux est importante: des raccords mal faits créent des perturbations qui perturbent l'écoulement et favorisent la contamination (Figure V-11.3). De bons raccords (Figure V-11.4) minimisent ces turbulences.

2. Le bullage

Le bullage est ainsi l'une des grandes originalités du système. Tous les flux liquidiens (échantillons, réactifs, eau de rinçage entre échantillons) sont divisés en un grand nombre de segments distincts. Les tuyaux d'introduction d'air sont aussi installés sur la pompe péristaltique ; un système supplémentaire de compression de ces tuyaux d'air ("air-bar") associé au fonctionnement de la pompe, ouvre et ferme régulièrement l'écoulement de l'air.

Les fonctions de ces bulles sont variées :

- les bulles remplissent complètement la lumière des tubes, maintenant l'intégrité de chacun des aliquotes en minimisant le flux annulaire et donc les contaminations d'un échantillon à un autre. Cependant, le risque de contamination reste non négligeable, lorsque deux échantillons voisins présentent, l'un, une valeur très élevée et le suivant, une valeur très basse. Pour être efficaces, les bulles doivent avoir une configuration précise (3 segments de 1/3 ; figure V-11.2).

- de plus, par leur pression sur la paroi, elles contribuent à l'auto nettoyage du système, diminuant encore la contamination.

- dans chaque segment, la réaction se passe dans les mêmes conditions analytiques (temps, débit, température, surface, etc.). Après lecture, le résultat donnera donc en fait une moyenne de mesure d'une même réaction chimique répétée de nombreuses fois sur le même échantillon.

Avant le passage au photomètre, les bulles sont éliminées très simplement du fait de la différence évidente de densité entre liquide et air ; le circuit horizontal se raccorde à une tubulure verticale : le liquide descend vers la cuve de mesure et les bulles montent dans la branche verticale raccordée à un tuyau d'évacuation via la pompe (Figure V-12.4).

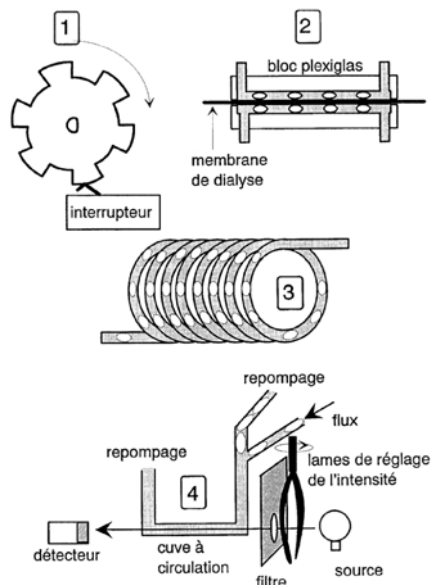


Figure V-12 : Différents éléments des analyseurs en flux continu.

1. Contrôle du bras de prélèvement des échantillons par une came. 2. Principe du dialyseur. 3. Bobine. 4. Débullage et lecture photométrique.

3. Diagramme des flux

La pompe péristaltique est l'élément central du système, assurant la circulation permanente des fluides dans les tuyaux, circulation indispensable au fonctionnement des autres sous-ensembles. La pompe tournant à vitesse constante, la précision des volumes mis en jeu dépend de la précision du diamètre interne des tubes. Les temps entre les différentes étapes de l'analyse (addition des réactifs, incubation) sont simplement réglés par la longueur du circuit entre deux opérations. Si des temps longs sont nécessaires, l'utilisation de bobines permet un réglage simple.

Une analyse élémentaire est décrite entièrement par le diagramme des flux : c'est un schéma théorique, se traduisant en pratique par un jeu de tubes, appelé manifold ou cassette, adapté sur une seule pompe (Figure V-10). Le diagramme doit préciser le diamètre de chaque tube, repéré en pratique par un double manchon de couleur près de chaque extrémité (orange-vert, blanc-violet, etc...) ; il doit préciser la longueur des bobines, la température du bain-marie, la longueur d'onde du spectrophotomètre.

B. Le traitement de l'échantillon

a. L'échantillonneur ("sampler")

Les échantillons, disposés dans des petits godets sur un plateau circulaire, sont prélevés à l'aide d'une aiguille portée par un bras à déplacement "cylindrique". La fréquence des prélèvements ainsi que la durée relative du prélèvement et du rinçage de l'aiguille sont commandées très simplement à l'aide d'une came actionnant l'interrupteur de contrôle de l'aiguille de prélèvement. La fréquence habituelle est 60-1/1, ce qui signifie 60 échantillons à l'heure et un

temps de rinçage identique à celui du prélèvement, soit 30 s chacun (Figure V-12.1). D'autres types de came permettent de varier la fréquence du prélèvement et le rapport prélèvement/rinçage.

b. La dialyse

La dialyse permet le passage des molécules diffusibles dans les solutions contenant les réactifs. Ce procédé évite les interférences et les erreurs dues à la présence de macromolécules, aussi bien au niveau de la réaction elle-même, qu'au niveau de la lecture au photomètre. Là encore, le temps de dialyse est réglé par la longueur du tuyau, mais il dépend également de la température (Figure V-12.2).

Le rendement de la dialyse dépasse rarement 50 %, ce qui n'est pas gênant si la calibration est réalisée dans les mêmes conditions. Si le liquide de contre dialyse est le réactif lui-même, le rendement de la dialyse est cependant bien meilleur, car il y a réalisation d'un piégeage chimique et mécanique qui déplace l'équilibre de dialyse.

C. Le traitement du dosage

a. Les bobines (Figure V-12.3)

Tubulures en verres disposées en spirale et de longueur variable, elles permettent de régler facilement les différents temps de la réaction et assurent en outre d'autres fonctions : disposées verticalement, elles provoquent à chaque tour un brassage du milieu à l'intérieur de chaque segment, contribuant à assurer un bon mélange des réactifs.

Bobines et tuyaux sont disposés sur une cassette analytique facilement accessible, démontable ou interchangeable, et parfaitement visible. Toute perturbation est immédiatement détectée par un technicien expérimenté.

b. Le bain-marie

Le temps d'incubation au bain-marie est réglé par la longueur du tube plongeant dans le liquide ou inclus dans l'élément chauffant solide.

D. Le traitement des mesures

De nombreux types d'appareils de mesure ont été adaptés en flux continu ; les plus utilisés en routine ont été essentiellement la photométrie d'absorption et la photométrie de flamme pour la mesure des ions. D'autres adaptations sont réalisables (fluorimétrie et néphélométrie notamment).

a. Analyseur monocanal

L'enregistrement continu du signal dans les analyseurs à un seul canal fournit une succession de pics sur l'enregistreur relié au détecteur photométrique. Les mesures brutes ainsi enregistrées renseignent directement sur les erreurs analytiques : prélèvement insuffisant, contamination, dérive, mauvais bullage, etc...

b. Analyseurs multicanaux

Dans ces appareils, une petite partie seulement de l'état constant est mesurée sur chaque canal et reportée sur un unique enregistreur donnant un diagramme en "marches d'escalier". Tout plateau anormal est facilement repéré et renseigne sur la cause éventuelle : mauvais phasage, bullage défectueux, etc... Le phasage est l'opération consistant à décaler légèrement les plateaux de l'état constant de chaque canal, afin de réaliser dans chaque canal l'enregistrement du plateau au meilleur endroit (Figure V-9) avec un seul enregistreur. Ce décalage est réalisé par l'interposition de bobines de longueur appropriée avant le passage au colorimètre.

E. Conclusions

Méthode déjà ancienne et très fiable, l'analyse en flux continu présente cependant quelques inconvénients et n'est pas adaptée à tout :

- on ne peut mesurer qu'en point final ou en un ou deux points pour les enzymes (au moins pour les deux premières générations d'appareil), d'où pertes de temps lorsqu'il faut diluer, absence de données sur la cinétique enzymatique ;

- bien adaptée aux bilans et aux séries (analyseur non sélectif), elle n'est pas idéale pour le dosage d'un paramètre isolé en urgence : grande consommation de réactifs de plus en plus coûteux. Dans ces systèmes, on parle d'ailleurs en sérums analysés par heure de fonctionnement, alors que dans les autres systèmes, on parle en analyses élémentaires ou tests par heure.

- nécessité d'une quantité de sérum assez importante (2 ml sur SMA 12), mais les miniaturisations récentes ont résolu ce problème (200 µl pour 9 paramètres sur SMA 9). Sur l'analyseur de troisième génération (SMAC), 20 paramètres peuvent être déterminés simultanément sur 400 µl d'échantillon.

Mais il y a aussi des avantages :

- facilité d'adaptation à de très nombreux dosages ;
- possibilité de travailler en absence d'oxygène, car le circuit est totalement fermé ;
- visualisation permanente de toutes les étapes et donc détection facile des ennuis ;
- robustesse à toute épreuve, car les parties mécaniques sont peu nombreuses et simples (échantillonneur avec plateau rotatif et bras de prélèvement, pompe péristaltique, enregistreur).

F. Extensions ultérieures

1. Le flux continu de troisième génération

Les analyseurs en flux continu de troisième génération (SMAC pour SMA + computer) présentent des innovations importantes dans trois domaines :

- l'hydrodynamique : la vitesse d'analyse passe de 60 à 150 ou 200 échantillons à l'heure. La fréquence du bullage est trois fois plus grande que pour les analyseurs de première et deuxième génération décrits précédemment, et faite à partir d'air pressurisé, ce qui confère aux bulles un volume et une forme parfaitement constants.

- optique : la transmission de la lumière incidente et après traversée de la cuve à l'aide de fibres optiques permet de simplifier considérablement l'aspect mécanique et réduit de façon importante l'encombrement du système.

- informatique : la gestion par ordinateur d'un système bâti sur les mêmes principes que ceux des autres analyseurs à flux continu de première et deuxième génération conduit à une amélioration des performances. Chaque canal est interrogé par l'ordinateur plusieurs fois par seconde, ce qui entraîne la suppression du phasage, qui est une opération fastidieuse. De plus, le débullage est inutile, l'ordinateur supprimant les valeurs aberrantes dues aux bulles. La présence continue des bulles, y compris dans la cellule de mesure, limite encore davantage les contaminations entre échantillons.

L'ordinateur remplace l'enregistrement graphique: chaque canal est interrogé 4 fois par seconde, ce qui fournit environ 72 points pour la courbe d'une réaction. L'ordinateur n'a plus qu'à comparer avec la courbe idéale mémorisée et à rejeter ou enregistrer le signal en fonction des fourchettes d'erreur tolérables qui lui ont été fournies.

2. Le flux capsulaire

L'encapsulation des segments liquidiens par un liquide spécial permet la circulation permanente à débit élevé de capsules réactionnelles dans une voie analytique unique, sans risque de contamination entre les dosages. Cette technologie, développée pour le Chem 1 par la Société Technicon, permet sur cet automate la réalisation de 720 tests par heure, chiffre porté à 1800 si une voie analytique annexe pour les électrodes sélectives est utilisée.

a. Principes

La voie analytique principale est constituée par un tube de téflon d'environ 5,60 m, avec un diamètre interne de 1 mm, puis de 1,5 mm dans l'enceinte thermostatée où ont lieu réactions et lectures optiques. Le téflon présente une tension superficielle très basse et la surface interne du tube est entièrement tapissée par un mince film d'huile fluorocarbonée : la tension superficielle de cette huile est plus basse que celle du téflon et permet à ce liquide de s'étaler totalement sur la surface du tube. Cette huile, non miscible aux solutions aqueuses d'échantillons et de réactifs, va les encapsuler totalement : l'absence complète de contamination entre les segments liquidiens encapsulés permet ainsi la réalisation de dosages sur de très petits volumes. Un dosage est représenté par un "train" de capsules (Figure V-13) :

- une première capsule comporte 1 μ l d'échantillons et 7 μ l d'un premier réactif. Le "blanc" de la réaction est mesuré sur cette capsule avant le mélange à la deuxième capsule;
- une petite capsule d'air (3 μ l) sépare cette première capsule d'une deuxième capsule contenant 7 μ l d'un deuxième réactif dont le mélange au premier réactif déclenchera la réaction.

Ces trois capsules constituant un test sont séparées du train de capsules du test suivant par la succession d'une capsule d'air (3 μ l), d'une capsule de tampon (4 μ l) et d'une autre capsule d'air (3 μ l).

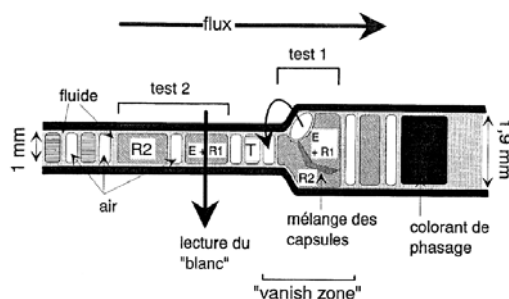


Figure V-13 : Le train de capsule en chimie capsulaire dans le Chem 1.

Une capsule de colorant vert, absorbant à 830 nm (longueur d'onde à laquelle les éléments contenus dans les autres capsules n'absorbent pas) est insérée au début et à la fin de chaque séquence d'analyses. Elle permet à l'appareil de réaliser un phasage assurant l'identification précise de chaque test. Un système de détection des capsules liquidiennes et gazeuses contrôle en continu la qualité du flux analytique. La circulation permanente des capsules est assurée par une pompe péristaltique située à l'extrémité de la voie analytique.

Le dosage des ions par électrodes sélectives est réalisé sur une autre voie analytique selon des principes similaires. L'échantillon est mélangé à une solution de dilution dans un petit bol tapissé par le fluide, puis aspiré dans une tubulure où l'ensemble forme une capsule de 161 μ l, séparée de la capsule suivante d'un autre échantillon par trois capsules : air, liquide de stabilisation des électrodes, air.

b. Le système de traitement de l'échantillon: constitution du flux analytique

Le circuit est alimenté en fluide capsulaire par écoulement du fluide sur les parois extérieures de la sonde de prélèvement, à un débit de 3 μ l/mn. Ces microquantités se déposent à la surface des échantillons et des réactifs et sont aspirées en même temps qu'eux pour tapisser ensuite l'ensemble de la voie analytique. L'intégrité de l'extrémité de la sonde de prélèvement est fondamentale pour la réalisation de capsules correctes. Le flux passe devant quatre petites diodes qui repèrent les capsules et gèrent quatre électrovannes à segmentation dont les fonctions sont diverses (Figure V-14) :

- vanne 1 : raccordement de la sonde de prélèvement à la petite pompe pneumatique à déplacement positif pour le prélèvement de 1 μ l d'échantillon ;
- vanne 2 : segmentation pour le contrôle des volumes de réactifs et de l'air ;
- vanne 3 : introduction du tampon entre les tests ;

- vanne 4 : introduction de solution d'attente entre les différentes séquences d'analyses. La disponibilité permanente de l'automate dépend en effet de la continuité du film de fluide fluorocarboné et impose un fonctionnement continu de la voie analytique, même en dehors des dosages.

Une autre valve à segmentation, située sous le bol de dilution du module des électrodes spécifiques, assure l'introduction du liquide de stabilisation des électrodes entre les capsules d'échantillons.

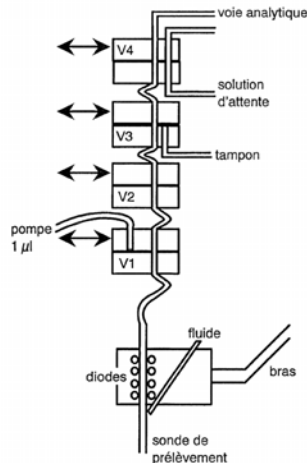


Figure V-14 : Les électrovannes à segmentation du Chem 1.

Grâce à un électro-aimant la partie supérieure de chaque valve glisse sur la partie inférieure et permet de modifier la continuité du flux.

c. Le traitement des dosages

Le mélange des deux capsules constituant chaque test est assuré par un brusque élargissement à 1,9 mm de la voie analytique ("vanish zone" ; figure V-13) : la bulle d'air séparant les deux capsules du test monte ("s'évanouit") et permet le mélange du contenu des deux capsules. Cette bulle d'air sera éliminée par combinaison avec la bulle d'air suivante séparant les deux tests. L'homogénéité du mélange est obtenue par passage dans une bobine appropriée.

d. Le traitement des mesures

Après le mélange des deux capsules, la capsule réactionnelle passe devant 8 détecteurs, permettant de suivre la cinétique de la réaction : les quatre premières mesures sont à 30 secondes d'intervalle, les quatre suivantes à 90 secondes. Dans chaque détecteur, une mesure de densité optique sur la partie centrale de la capsule est réalisée toutes les 100 millisecondes aux six longueurs d'onde disponibles.

Dans les détecteurs (Figure V-15), le diamètre de la voie analytique se rétrécit à 1,5 mm, ce qui constitue le trajet optique du détecteur. La lumière est transportée par des fibres optiques et lue par des diodes. La possibilité de lecture néphélométrique ou fluorimétrique par mesure à 90° n'est pas encore exploitée actuellement.

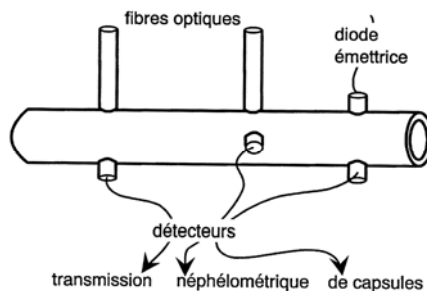


Figure V-15 : Les détecteurs sur la voie analytique en chimie capsulaire.

III. Les analyseurs centrifuges

L'analyseur centrifuge est de conception et de développement plus récent que l'analyseur en flux continu, puisque les prototypes ont vu le jour en 1968 ; les premiers développements commerciaux ont commencé en 1973. Toutes les possibilités de ce type d'appareil ne sont pas encore parfaitement maîtrisées ou commercialement exploitées et d'intéressants développements restent possibles. Ce type d'analyseur fait largement appel à une électronique sophistiquée et ne peut se concevoir que couplé à un ordinateur, qui est une partie indispensable de la machine.

A. Caractéristiques générales

1. Principe

Le principe de l'analyse centrifuge a été développé à partir de 3 grandes idées :

- réalisation d'un véritable automate dont toutes les opérations soient effectuées en temps réel, de manière simultanée et non séquentielle (gain de temps) ;
- grande souplesse d'utilisation, pour les méthodes courantes et les méthodes à venir ;
- cadence d'analyse élevée pour répondre à la demande, en même temps que micro volume d'échantillon, de réactifs, pendant un temps court.

Le principe repose sur l'utilisation de la force centrifuge :

- pour ajouter simultanément de manière discrète un aliquote de réactif à un aliquote d'échantillon ;
- pour déplacer le mélange réactionnel dans la cuve de mesure.

2. L'évolution des rotors (Figure V-16)

Les générations d'appareil se sont rapidement succédées. Les premiers disques conçus ne comportaient pas de cuvette de lecture intégrée dans le disque, d'où des problèmes de contamination et de rinçage. Très rapidement, celle-ci a été incluse à la périphérie du rotor. L'évolution des formes et des techniques peut être schématisée ainsi :

- les premières formes ont dérivé des rotors de centrifugation classique, avec des godets creusés dans la masse (Figure V-16.1) comme sur le GEMSAEC ;
- la diminution des volumes d'échantillon et de réactif nécessaires à l'analyse a permis l'utilisation de simples plateaux où, au repos, la tension superficielle des liquides suffit à éviter l'étalement des gouttes et le mélange. Ceci a permis de réduire l'épaisseur des disques, facilitant le moulage et entraînant une baisse du prix de revient (Centrifichem, Rotochem ; figure V-16.2).
- sont apparus ensuite des systèmes de cuvettes en plastique, reliées entre elles par un petit pont fracturable. L'ensemble est disposé sur un support permettant la reconstitution d'un disque entier à partir des cuvettes non utilisées des disques précédents (Cobas de la Société Roche; figure V-16.3).
- la gestion manuelle des rotors précédents est remplacée par une gestion automatisée de mini-rotors (Figure V-16.4) dans le Monarch (Allied Technology).

Dans tous les cas, le nombre de godets ou de plateaux sur le disque impose le choix de la méthode de dosage: ce doit être une méthode mono ou biréactif.

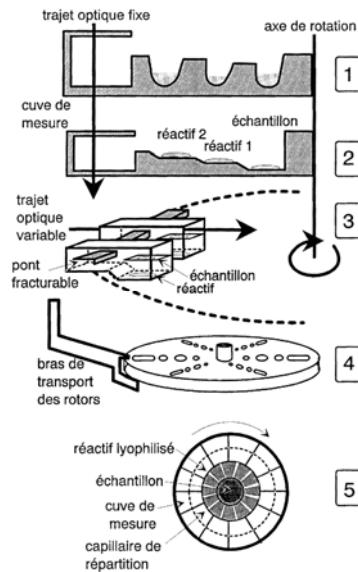


Figure V-16 : L'évolution des rotors dans les automates centrifuges.

1. Godets creusés dans la masse du disque. 2. Disque avec plateau pour les gouttes de réactifs et échantillons. 3. Rotor constitué de cuves reliées par de petits ponts en plastique fracturables. 4. Rotors gérés automatiquement par l'automate à partir d'un stock. 5. Rotor miniaturisé pour la réalisation d'un bilan chez un patient : introduction du sérum à la partie centrale du rotor; chaque cuvette contient le réactif nécessaire à la réalisation d'un dosage différent.

B. Le traitement des échantillons

L'introduction des échantillons et réactifs dans les godets ou sur les plateaux du rotor est encore l'étape limitante de l'analyse, puisqu'il est nécessaire d'attendre que tous les éléments de la séquence d'analyse aient été distribués avant que l'analyse puisse commencer. En dehors du pipetage manuel nécessaire sur certains petits appareils, il existe des possibilités d'automatisation faisant appel à des solutions techniques spécifiques ou non spécifiques.

1. Techniques de chargement non spécifiques

L'introduction des échantillons et réactifs sur les rotors est effectuée par un bras mobile portant aiguille et tuyau et relié à une micro seringue de précision ou une pompe péristaltique.

2. Techniques de chargement spécifique

Bien que relativement peu utilisées, les possibilités de chargement utilisant le principe même du transfert centrifuge des liquides conduisent à des applications intéressantes.

a. Chargement dynamique

Le chargement dynamique consiste à introduire le liquide à la partie centrale du rotor; la force centrifuge le répartit également dans les cuvettes si les diamètres des canaux d'entrée de chaque cuvette sont identiques. Les applications en sont nombreuses : réactif peu stable ou réactif d'initiation; eau pour reconstituer des réactifs lyophilisés, dans des disques vendus prêts à l'emploi (une gestion économique de tels disques supposerait que toutes les cuvettes soient utilisées chaque fois). Cette technique est utilisée dans l'Analyst de la Société DuPont de Nemours : un rotor par patient permet ainsi la réalisation d'un bilan complet pour ce patient (Figure V-16.5).

b. Siphonage.

Le siphonage peut avoir deux applications :

- utilisation de volumes non mesurés, qui sont ensuite ajustés avec précision lors de la centrifugation, grâce à un drain qui évacue le surplus ; le volume ajusté est alors aspiré dans la

cuvette réactionnelle à travers un siphon capillaire, grâce à l'application d'une dépression (Figure V-17 .haut).

- utilisation de sang total qui est centrifugé ; le plasma est alors prélevé automatiquement par siphon capillaire grâce à un principe voisin du précédent. Il peut aussi être transféré par la force centrifuge après rotation du module échantillon (Figure V-17. bas).

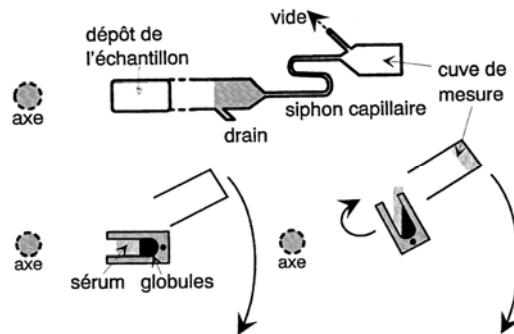


Figure V-17 : Utilisation des propriétés spécifiques de l'analyseur centrifuge pour le chargement du rotor.

En haut : principe de l'ajustement des volumes par drainage et siphonage. En bas : utilisation de sang total centrifugé dans le rotor et récupération du sérum.

C. Le traitement des dosages

Le mélange des échantillons et réactifs se fait de manière simultanée, par accélération rapide, jusqu'à 3000 t/mn, puis freinage brusque et nouvelle accélération jusqu'à la vitesse de croisière de 500 à 1500 t/mn, ou en faisant le vide dans la chambre du rotor, ce qui crée des bulles.

Les premiers disques conçus ne comportaient pas la cuvette de lecture. Dans les appareils de deuxième génération, celle-ci est incluse dans le disque et les mesures peuvent commencer immédiatement après le mélange (3 à 5 s suffisent pour un bon mélange). Grâce à l'électronique, chaque fois qu'une cuvette passe devant le lecteur, une dizaine de mesures de quelques millisecondes peuvent être réalisées et la moyenne établie.

La régulation de la température reste en fait le point le plus délicat de cette méthodologie. Cette régulation va dépendre du matériau employé pour le disque et de son inertie thermique. On peut envisager :

- courant d'air pulsé ;
- circulation d'eau ;
- élément de chauffage incorporé ;
- émetteur infra-rouge.

L'ordinateur fait partie intégrante du système, bien que les premiers prototypes s'en soient passés, se contentant d'un tracé sur oscilloscope. Cependant, le développement commercial et l'exploitation des possibilités de la méthode (enregistrement de la vitesse initiale) ne peuvent se concevoir sans l'ordinateur. Un disque de 15 cuvettes à 600 t/mn peut fournir 9600 points de mesure par minute !

D. Le traitement des mesures

Les possibilités de lecture sont les mêmes que pour les autres types d'automates (photométrie, fluorimétrie, néphélométrie). Les analyseurs centrifuges présentent même l'avantage d'avoir la simplicité des appareils simple faisceau, tout en pouvant être utilisés comme double faisceau, si la cuvette n° 1 est remplie de blanc réactif.

Des fentes, disposées sur le pourtour du disque, permettent la synchronisation et le repérage précis de chaque cuvette.

Deux types de lecture sont possibles :

- à trajet optique fixe, le premier et le plus couramment utilisé. La cuvette étant forcément horizontale, le faisceau lumineux est perpendiculaire au plan du disque.
- à trajet optique variable: le trajet optique est parallèle au plan du disque. Cette technologie permettant un trajet optique plus important a conduit à l'utilisation de lampes très puissantes (lampe Xénon en mode "flash" produisant des éclairs de 5 μ s) et à la détection par photodiodes dont la réponse est plus rapide que celle d'un photomultiplicateur, mais imposant un éclairage plus important.

E. Avantages et applications

Ce système peut s'adapter à de nombreux types de mesure :

- mesure de substrat en point final. Dans ce cas on peut s'affranchir du témoin, l'ordinateur pouvant calculer le zéro par régression parabolique, puisque la cinétique de la réaction est enregistrée dès les premières secondes (Figure V-18).

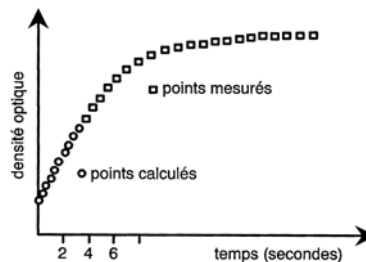


Figure V-18 : Calcul du zéro en analyse centrifuge.

- mais la conception de l'analyseur centrifuge comme automate rapide fait préférer des mesures cinétiques, pour dosages d'enzymes ou de substrats.
 - la technique a été retenue par la NASA pour les dosages dans l'espace en apesanteur.
- Enfin, la miniaturisation est possible. Il existe des appareils portables avec des disques à réactifs lyophilisés, ce qui repose le problème de l'utilisation par des non biologistes, mais qui peut rendre de grands services en certaines circonstances : catastrophes, guerres, etc

Le Satellit 900, automate centrifuge portable de 13 kg, commercialisé en 1989 par la société Kis et de conception française, peut réaliser 1 à 5 paramètres, sur 0,1 ml de sang capillaire prélevé au doigt ou lobe de l'oreille. Des applications sont également possibles pour l'étude de la coagulation et les groupages sanguins, l'immunologie, etc.

IV. les appareils à transfert

On range dans cette catégorie les appareils ne répondant pas aux deux principes précédents (continu ou centrifuge) de déplacements liquidiens. Les volumes adéquats de sérum et de réactifs sont pipetés (par pompe péristaltique et/ou à l'aide de micro seringues de précision) et transportés par des bras mobiles. Les premières générations de ce type d'appareillage comportent donc de simples robots qui effectuent un certain nombre de gestes à la place du technicien. Ce principe de base existe toujours dans de petits appareils mono paramétriques, réservés à l'urgence ou aux petits laboratoires.

Mais actuellement, l'introduction des ordinateurs dans la gestion de ces automates a rendu possible de très nombreux développements, notamment d'appareils multiparamétriques, d'utilisation très souple. Elle a également permis la mise en oeuvre de principes très divers, si bien que les classifications sont difficiles. On peut cependant distinguer trois grands types d'automates à transfert.

A. Transfert dans un module analytique spécialisé

A partir d'un plateau contenant les godets d'échantillons, une aiguille prélève la quantité de sérum nécessaire pour réaliser les analyses programmées, et la distribue dans les cuves réactionnelles de

modules spécialisés dans la réalisation d'une seule analyse. Chaque module comporte tout le système nécessaire à l'arrivée des réactifs, tampons, eaux de lavage, etc. Les modules doivent être changés avec tout changement de méthode.

Les ions sont mesurés à l'aide d'électrodes spécifiques. Les réactions calorimétriques ou en UV sont lues par le photomètre compris dans chacun des modules. Chaque module ne disposant que d'une cuve réactionnelle, la cadence d'analyses peut devenir relativement faible en dehors des bilans, lorsque la même analyse isolée est demandée de nombreuses fois ; mais ces systèmes répondent aux exigences d'économie de réactifs, de souplesse d'utilisation et aux conceptions évolutives actuelles.

Le Parallele (de la Société American Monitor) peut être considéré comme le plus gros des automates de ce type actuellement disponible. Il peut doser 30 paramètres en parallèle sur 240 échantillons par heure, soit une capacité théorique de 7200 tests par heure. Le principe est simple et repose sur des technologies éprouvées. Un module analytique est représenté par l'ensemble des éléments (distribution de réactifs, photomètres, éléments de lavage des cuves) disposés en ligne sur un plateau, qui peut s'abaisser et se lever, et l'ensemble des cuvettes réactionnelles qui défilent devant chacun de ces éléments (Figure V-19) :

- 30 seringues de précision sont disposées en parallèle et peuvent prélever 30 échantillons à la fois à partir de la chaîne de tubes primaires. Les prélèvements sont distribués dans 30 cuvettes appartenant à chacun des 30 modules. Le déplacement de la chaîne de tubes fait passer chaque tube devant chacun des modules.

- le déplacement du rack de 30 cuvettes toutes les 15 secondes va faire passer la cuvette devant les distributeurs de réactifs (6 possibles) puis les photomètres de chaque module. Dans les photomètres, le liquide est aspiré et la densité optique est lue. Les cinétiques sont réalisées à l'aide de deux photomètres plus ou moins éloignés. Les temps d'incubation varient de 15 s en 15 s par le positionnement des distributeurs et des photomètres sur le plateau multitrous.

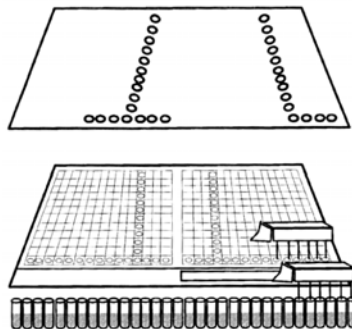


Figure V-19 : Schéma d'organisation et de fonctionnement du Parallele. (D'après document de la Société American Monitor).

Il y a ainsi que deux éléments mécaniques : le système de circulation des racks et le système abaissant ou relevant périodiquement toutes les 15 s le plateau multitrous portant les distributeurs, aspirateurs et photomètres.

La précision et la rapidité de la distribution des volumes sont assurées par la pressurisation des flacons de réactifs : les temps d'ouverture des électrovannes contrôlent donc les volumes distribués. Les cuves et les embouts de prélèvement sont rincés et réutilisés.

Une informatique élaborée est nécessaire pour la gestion sélective et le contrôle d'une telle machine, qui n'est réellement utile que pour de très gros laboratoires.

B. Transfert dans un module analytique polyvalent

1. Système de traitement des dosages

Dans ces systèmes, toute cuvette réactionnelle peut réaliser n'importe quel dosage et les systèmes dispensant échantillons et réactifs sont centralisés. De nombreuses solutions techniques

ont été appliquées à ce schéma général, présentant chacune des avantages ou des inconvénients variés.

a. Le plateau réactionnel central

La forme la plus adaptée aux gros automates est celle d'un plateau réactionnel central, variable dans son matériau ou dans sa conception, comportant toutes les cuvettes réactionnelles. Ces automates vont ainsi se présenter avec trois plateaux (Figure V-20 et figure V-20a) :

- un plateau central de réaction et de mesure,
- un plateau porte-échantillons ou un tiroir réfrigéré,
- un plateau porte-réactifs.

Entre chacun des plateaux, se trouve un bras mobile de pipetage, avec aiguille et tuyau, relié le plus souvent à des microseringues de précision.

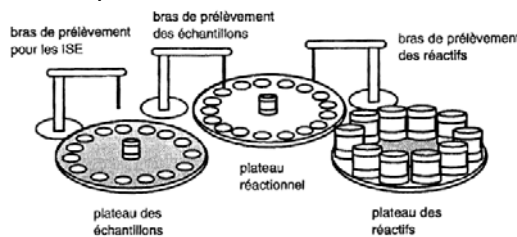


Figure V-20 : Conception générale des automates avec plateau réactionnel central.

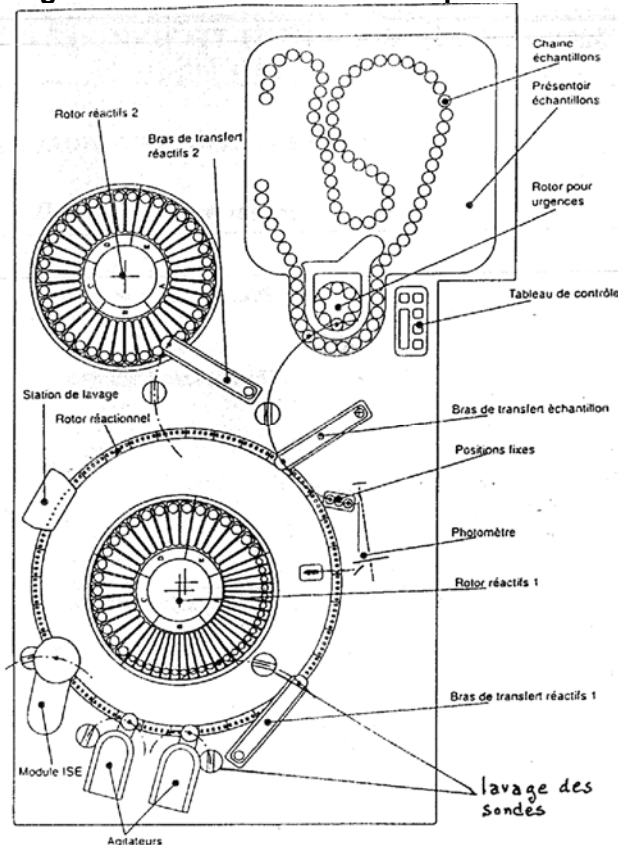


Figure V-20a : Une mise en œuvre, automate Méga (Société Merck).

Le rotor réactif est placé à l'intérieur du plateau réactionnel central, permettant de placer un deuxième plateau réactif.

La conception d'un tel plateau central est très variable :

- plateau en polymère, à usage unique, avec un nombre variable de cuvettes, selon la taille des cuvettes et le diamètre du plateau (80 à 120 cuves par exemple). Ce plateau a été conçu dans

certaines cas fractionnable et reconstituable permettant l'utilisation de toutes les cuvettes (automates de la Société Hitachi et CI7000 de la Société).

- plateau avec cuves réutilisables après lavage, formé de cuves en plastique ou en quartz. Le plateau est réalisé en un seul bloc ou en segments indépendants, permettant des changements rapides et économiques en cas d'anomalies sur certaines cuves ne permettant plus leur réemploi.

- plateau support de tubes : le plateau comporte de simples emplacements recevant des tubes à usage unique (Perspective de la Société American Monitor).

b. Le ruban de cuvettes réactionnelles

Dans le modèle 400 de la Société Greiner (Figure V-21), les cuvettes réactionnelles forment une chaîne continue où chaque cuvette est réutilisable après lavage. A la fin de la réaction, il y a un nouveau transfert du milieu réactionnel dans le module de mesure.

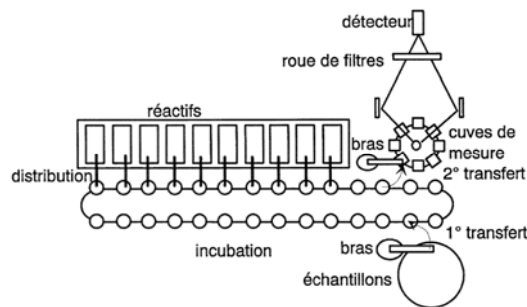


Figure V-21 : Automate à double transfert.

(D'après document de la Société Greiner).

Les rubans de cuvettes en plastique à usage unique sont utilisés sous deux modalités :

- ruban de cuvettes préformées (Paramax, de la Société)

- ruban de cuvettes thermoformées au fur et à mesure des besoins (Dimension de la Société Dupont de Nemours, figure V-22). Un rouleau de film permet la réalisation de 14000 cuvettes réactionnelles.

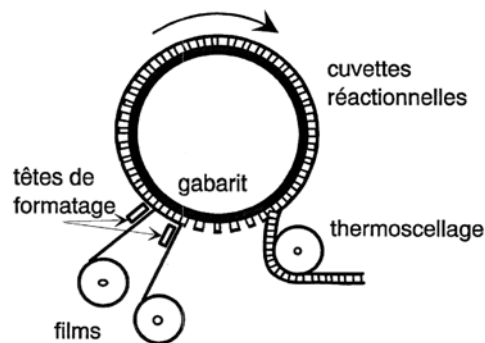


Figure V-22 : Thermoformage du ruban de cuvettes réactionnelles. (D'après document de la Société Dupont de Nemours).

Dans ces deux derniers systèmes, après la fin des mesures, les cuvettes sont scellées par thermosoudage, ce qui facilite l'élimination des déchets et diminue considérablement les risques de pollution et de contamination du personnel. Cependant, le défilement des cuves étant continu, les durées d'incubation se situent dans des limites plus étroites que pour les plateaux circulaires.

Pour de plus petits automates, une autre possibilité est celle de barrettes de cuves.

c. Les avantages

Une telle centralisation fait que le même plateau de cuves sert à des analyses très différentes et permet :

- d'augmenter la cadence d'analyses en effectuant de nombreux dosages en même temps sur des échantillons différents : il existe 120 cuves dans le système DACOS (de la Société Coultronics) ;

le système Dax, commercialisé par Bayer Diagnostics, comporte 4 cercles concentriques de x cuvettes.

- de simplifier les systèmes optiques : un seul système centralisé est nécessaire, les cuves défilant successivement devant ce système ;

- de simplifier les systèmes de prélèvement de réactifs et d'échantillons, avec seulement deux pompes ;

En contrepartie, la gestion par ordinateur doit être plus performante pour prélever les quantités correctes des bons échantillons et des bons réactifs. L'ordinateur gère lui-même l'affectation des échantillons dans les cuves. Une attention particulière doit être portée aux problèmes des contaminations des réactifs les uns par les autres, puisqu'ils sont tous prélevés avec le même système. L'existence d'un seul plateau réactionnel entraîne une perte de souplesse : création de contraintes de temps pour les additions de réactifs, les mélanges et la lecture des résultats.

Un poste supplémentaire avec prélèvement souvent indépendant est prévu pour le dosage des ions qui, dans tous les appareils récents, est réalisé à l'aide d'électrodes sélectives.

L'augmentation des performances et de la gestion informatique a permis de réaliser des appareils modulaires, juxtaposant jusqu'à 4 automates identiques dépendant d'un seul distributeur d'échantillon (automate Dax). Selon les besoins du laboratoire, la cadence d'analyse pourra évoluer de 2700 tests/h (un seul module) à 10200 tests/h (4 modules).

2. Le système de traitement des mesures

Les systèmes optiques sont très variés et certains des principes utilisés sont schématisés sur la figure V-23 :

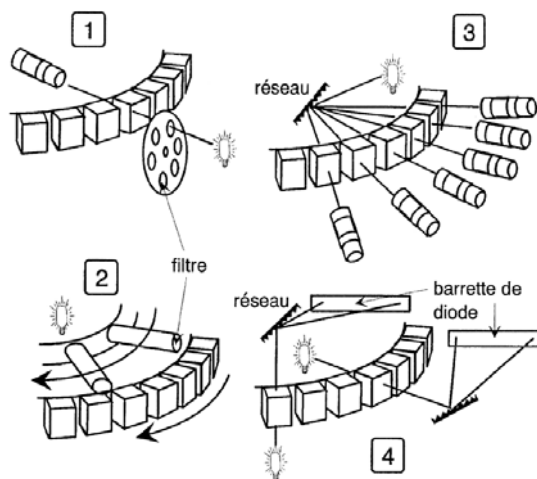


Figure V-23 : Différents systèmes centralisés de mesures optiques dans les systèmes avec plateau réactionnel central.

1. D'après document de la Société Technicon. 2. D'après document de la Société Coultronics. 3. D'après document de la Société 4. D'après documents des Sociétés Abbott (trajet optique fixe, horizontal) et Wako (trajet optique variable, vertical).

- un seul système centralisé, avec une roue de filtres interférentiels ; les cuves seront lues successivement lors de leur passage devant le système (Figure V-23.1). Il est difficile de réaliser un bi- ou polychromatisme vrai.

- dans le système DACOS, l'originalité consiste à faire tourner indépendamment l'un de l'autre le disque des cuves et l'ensemble optique, qui se présente sous la forme d'une étoile à 6 branches, dont chacun des bras porte un filtre différent et balaie une à une les 120 cuves de réaction toutes les 8 secondes (Figure V-23.2). On réalise ainsi 92 points de mesure pour chaque dosage à 6 longueurs d'onde différentes. Par contre les 15 détecteurs photométriques de l'ERIS (de la Société Merck) disposés autour de la couronne de 72 cuvettes sont fixes.

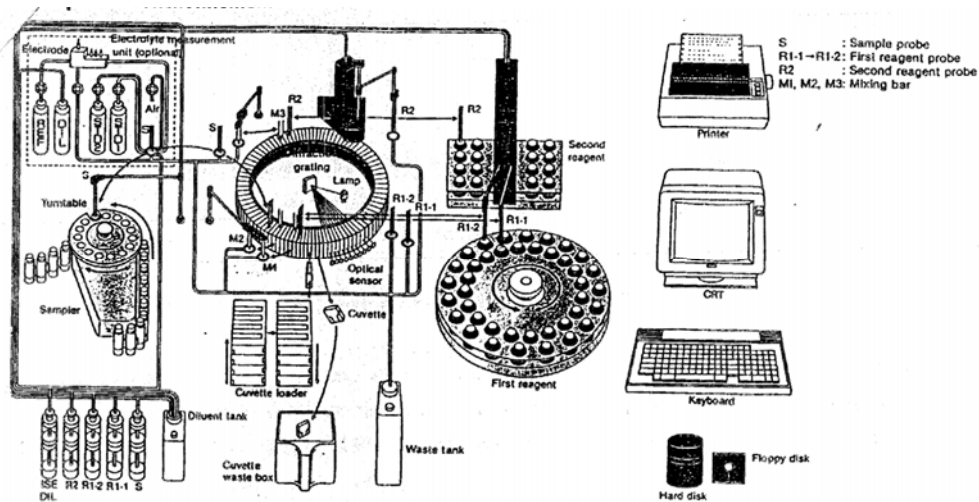
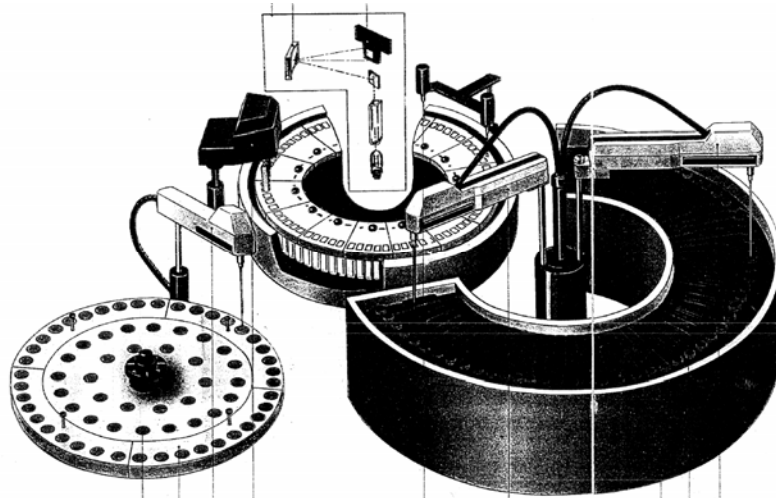


Figure V-23a : Polychromatisme, avec détecteurs fixes positionnés sur des cuves successives.

- dans le système de l'AU51 a (de la Société), la lumière est décomposée avant le passage dans la cuve et 10 longueurs d'ondes sont utilisées sur 10 cuves successives (figure V-23.3 e V-23a).

- le principe de la photométrie inverse (Figure V-23.4 et V-23b) est utilisé avec trajet optique variable dans le système Wako (de la Société) et avec un trajet optique fixe dans le système Spectrum de la Société Abbott. La lumière blanche transmise à travers la cuve est décomposée par un réseau : 16 longueurs d'onde sont analysées simultanément par une barrette de diodes, pour la correction des interférences ou les twin-tests.



FigureV-23b : Automate de la société Wako (photométrie inverse et à trajet optique variable).

- dans certains systèmes, la lumière est transportée par fibres optiques, ce qui permet de miniaturiser le système optique et supprime les variations thermiques à l'intérieur de la cuve, apportées par la source de lumière proche.

- le CI-7000 utilise le type de technologie dite DRP ("double rotor photometric system"), qui consiste à faire tourner en sens inverse le plateau et le système optique. Selon ses concepteurs, un tel système procure un gain de temps car il permet la réalisation simultanée et non plus séquentielle des 2 groupes de tâches de l'analyseur (la gestion des liquides et la photométrie).

La possibilité d'obtention d'un grand nombre de points pour chaque dosage, comme en analyse centrifuge, confère à ces systèmes une adaptabilité aux méthodologies modernes de dosages cinétiques ou enzymatiques, tout en gardant une cadence d'analyse élevée.

C. Analyseur à réactifs prédistribués

Dans ce type d'automates, tous les réactifs nécessaires à l'analyse sont conditionnés dans un sachet à usage unique, qui permet la réalisation d'une seule analyse déterminée. Il faut disposer d'autant de sachets différents que d'analyses demandées. On résout donc ainsi totalement le problème de la contamination entre les échantillons et entre les réactifs, au prix cependant de quelques inconvénients:

L'augmentation du coût du consommable, le conditionnement en sachets rigoureusement dosés revenant plus cher que le conditionnement "en vrac" utilisable sur les autres types d'automates; il faudrait cependant analyser l'ensemble des coûts induits par le fonctionnement de ces appareils et pas seulement celui des réactifs: pas de cuve à nettoyer, pas de tuyaux à changer, simplicité et facilité de manipulation, disponibilité réellement permanente, etc.: tout ceci peut générer des économies de personnel (qui représente la plus grande partie des dépenses d'un laboratoire).

La dépendance totale du biologiste vis à vis de son fournisseur. La réaction est livrée sans possibilités de modifications en fonction de conceptions scientifiques ou de problèmes spécifiques posés au biologiste par le type d'échantillon qu'il traite. Il lui est difficile en outre de participer à la recherche technique, soit dans le but de j'optimisation d'une réaction, soit dans le but de mise au point de réactions nouvelles. Enfin, il faut citer le problème de gestion des stocks, le dépannage par des réactifs "maison" étant impossible.

Ce principe de base a reçu deux développements assez différents.

1. En chimie liquide

Dans l'ACA, mis au point par la Société Dupont de Nemours, le sachet plastique comporte des alvéoles dans lesquelles sont placés, à l'état lyophilisé ou liquide, les réactifs appropriés à l'analyse. Le sachet peut comporter en outre une petite colonne permettant l'élimination des substances interférentes par échange d'ions ou tamisage moléculaire et pouvant remplacer la dialyse (Figure V-24). Des systèmes d'aiguilles et de pompes injectent dans le sachet les quantités nécessaires de diluant et d'échantillon. Le sachet est ensuite transporté aux différents postes de l'automate (Figure V-25): il passe dans un premier broyeur, qui par pression fait éclater les alvéoles et assure le mélange des réactifs. Après un temps d'attente programmé, le sachet passe dans un deuxième broyeur, puis dans le photomètre, qui comporte un système permettant la formation d'une cuve de trajet optique défini dans l'épaisseur du sachet non encore utilisée. La qualité optique du système est renforcée par la mise en place d'un petit film d'huile entre les parois du sachet et la fenêtre en quartz du photomètre. La méthode opératoire codée, inscrite sur la tête du sachet, indique à chaque étape à l'ordinateur couplé à la machine, les opérations exactes à effectuer

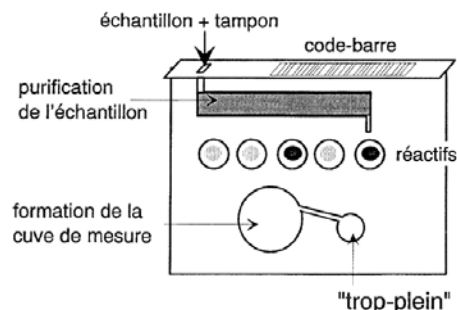


Figure V-24 : Le sachet à réactifs prédistribués de l'ACA.

(D'après document de la Société Dupont de Nemours).

En pratique, les paramètres biologiques d'un malade sont déterminés de la façon suivante :

- porte-échantillon, comportant sous forme codée l'identification positive du sérum à analyser ;
- autant de sachets qu'il existe d'analyses à effectuer sur ce sérum, dans un ordre quelconque.

Le traitement des urgences est ainsi grandement facilité par rapport à d'autres appareils, puisqu'il suffit d'introduire des sachets, sans avoir à modifier un programme de travail déjà entré en mémoire.

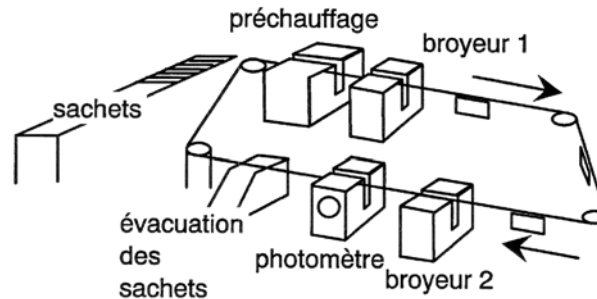


Figure V-25 : Principe d'organisation de l'automate ACA.
(D'après document de la Société Dupont de Nemours).

2. En chimie sèche

L'EKTACHEM de la Société Kodak, introduit en 1984, utilise le principe de la chimie sèche, le seul liquide étant celui du sérum à analyser. Le sérum est déposé sur une plaque réactionnelle ("timbre"), dont la surface comporte les réactifs nécessaires à l'analyse. La réaction produit une coloration du film qui est mesurée par réflectométrie lambertienne à travers le support. En pratique, on peut ainsi réaliser des dosages colorimétriques ou potentiométriques.

a. Dosages colorimétriques

Le "timbre" comporte plusieurs couches, en nombre variable selon le dosage à réaliser, mais au moins au nombre de deux (Figure V-26.1) :

- la couche d'étalement, permettant une répartition homogène de l'échantillon et retenant les substances de poids moléculaire élevé. Cette couche joue également un rôle de réflecteur diffus lors de la mesure optique.
- la couche de réactif, contenant tous les produits nécessaires au développement de la réaction colorée : enzymes ou réactifs chimiques. Il y a parfois plusieurs couches superposées, par exemple : enzyme - membrane semi-perméable ou retenant d'autres substances interférentes - couche chromogène proprement dite.

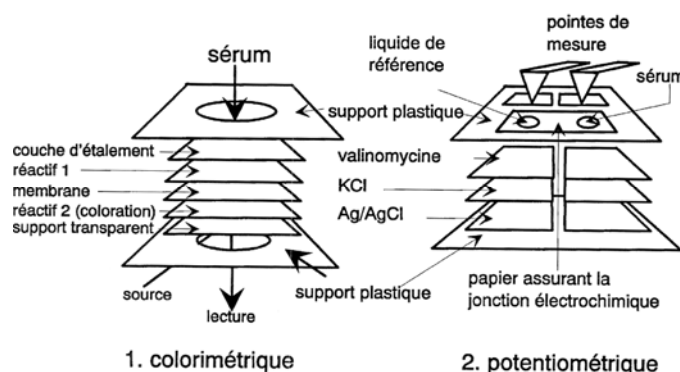


Figure V-26 : Les "timbres" analytiques utilisés par l'Ektachem en "chimie sèche". (D'après documents de la Société Kodak).

La lecture optique est réalisée par photométrie de réflexion à travers le support optique transparent des couches réactionnelles. Le faisceau lumineux traverse un filtre interférentiel sélectionné en fonction du dosage et est projeté sur la plaque à 45°. La lumière réfléchiée perpendiculairement à la plaque est mesurée.

b. Dosages potentiométriques

Des électrodes sélectives à usage unique sont constituées par l'empilement de couches : par exemple pour le potassium, on a d'abord une membrane sélective comportant le ionophore (la valinomycine), la couche constituant le pont salin au KCl saturé, la couche de référence au chlorure d'argent et argent, enfin le support. Un pont en papier au niveau du dépôt du sérum et du liquide de référence permet la réalisation de la jonction électrochimique entre les deux électrodes. Des électrodes d'un voltmètre à haute impédance pénètrent dans la couche d'argent et mesurent la ddp entre les deux demi cellules (Figure V-26.2).

c. L'appareil

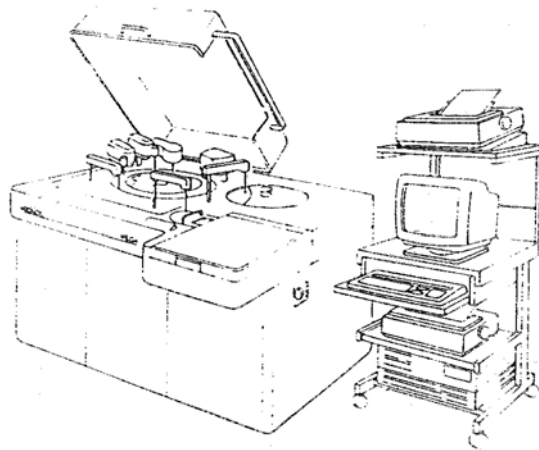
La conception générale de l'appareil comporte 5 postes spécialisés autour d'une tourelle centrale portant les timbres :

- distribution des timbres
- distribution de l'échantillon
- incubation
- lecture colorimétrique
- lecture potentiométrique

L'absence totale de contamination entre deux échantillons successifs est obtenue par l'utilisation d'embouts de pipette plastiques à usage unique. Pour faciliter les manipulations, le rotor porte-échantillon et embouts est divisé en quatre parties indépendantes. 500 dosages par heure sont réalisables.

Les méthodes cinétiques sont adaptables à ce genre d'appareil, grâce à l'introduction d'un poste spécialisé supplémentaire.

Quelques limitations subsistent, liées à l'existence du problème de l'imbibition du support sec (influence de la viscosité, de la concentration en protéines ou en lipoprotéines...) ou à l'existence de zones de linéarité encore étroite qui ne permettent pas pour le moment l'application aux dosages urinaires, où les variations des concentrations physiologiques sont plus importantes que dans le sérum.



V. les automates pour les dosages immunologiques

L'évolution des méthodes immunologiques décrites dans le chapitre précédent a conduit à une amélioration de la sensibilité (immuno-fluorescence, luminescence...) et de la spécificité (anticorps monoclonaux). Mais la réponse à la demande croissante suscitée par ces développements ne peut être résolue que par l'automatisation. Avec les automates courants décrits précédemment, on peut automatiser tout ou certaines parties des réactions immunologiques :

- repérage direct du complexe antigène - anticorps par mesure turbidimétrique (avec un photomètre classique) ou néphélométrique (lecture à 90°). Beaucoup d'automates modernes réalisent ces types d'immunodosages.

- réalisation automatique de la mesure enzymatique, dernière étape des mesures immunoenzymatiques, les étapes précédentes n'étant pas directement adaptables sur ces automates.

L'automatisation complète amène les fabricants à concevoir des automates spécifiques réalisant toutes les étapes. En effet, la mise en oeuvre manuelle de ces méthodes consomme du "temps personnel" très coûteux. Des appareils spécialisés ont été mis au point pour les méthodes immunoenzymatiques (technique ELISA, la plus couramment utilisée, technique sandwich), pour l'immunofluorescence ou l'immunoluminescence.

L'automatisation de ces techniques a été réalisée sur des automates à transfert dont la plupart sont inspirés pour de nombreuses fonctions des automates décrits dans les paragraphes précédents. En dehors de l'automatisation des dosages en plaque de microtitration, nécessitant des appareils spécifiques et surtout utiles aux laboratoires ayant de très gros débits d'immunoanalyses, on distinguera les appareils travaillant en milieu liquide (mais en phase hétérogène) de ceux utilisant la chimie sèche.

A. En milieu liquide

Les tubes tapissés par l'anticorps ou contenant la phase hétérogène indépendante tapissée d'anticorps sont portés par une chaîne qui va les présenter aux différents postes de travail de l'automate :

- addition de l'échantillon et tampon ;
- addition de l'Ag-Enzyme en séquentiel ou simultané ;
- incubation à température constante ;
- lavage pour éliminer l'Ag-Enzyme n'ayant pas réagi avec l'anticorps ;
- addition du substrat de la réaction enzymatique ;
- incubation et mesure colorimétrique, fluorimétrique ou luminométrique.

Le concept de cassette propre à chaque dosage (réactifs prédistribués, Figure V-2.7.1) est également bien développé dans ces types d'automates (SR1 de Serono, Affinity de Becton-Dickinson, Vidas de Bio-Mérieux).

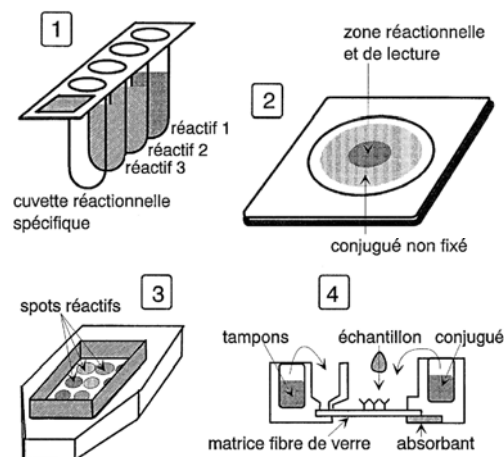


Figure V-27 : Différents systèmes d'immunodosages spécialisés.

En chimie liquide avec réactifs prédistribués (1) et en chimie sèche, avec réactifs indépendants de la plaquette réactionnelle (2, d'après document de la Société Baxter ; 3, d'après document de la Société). 4. Cassette analytique autonome à réactifs prédistribués (d'après document de la Société Behring).

L'utilisation de billes magnétiques recouvertes d'anticorps permet une séparation facile de la phase hétérogène. Une application a été développée avec initiation de la réaction de révélation par un réactif activé au niveau d'une électrode (figure V-28).

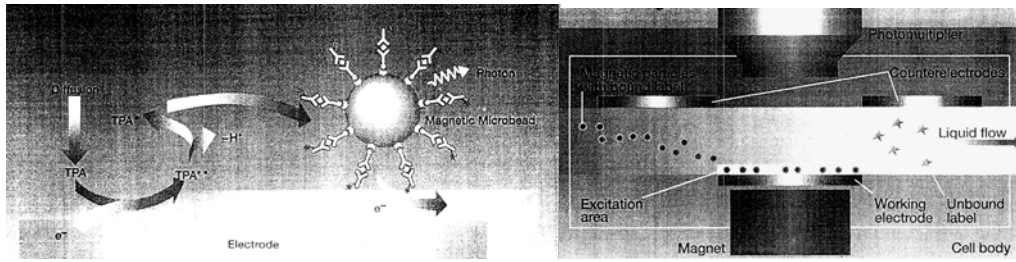


Figure V-28 : Dosage immunoélectromagnétique.

B. En immunochimie sèche

Des principes voisins de ceux de la "chimie sèche" sont applicables aux méthodes immunologiques. Deux types d'automates sont rencontrés.

1. A réactifs indépendants

Dans ces automates, les plaques réactionnelles sèches et les réactifs liquides sont indépendants.

a. Le Stratus

Cet automate de la Société Baxter utilise une méthode ELISA enzymofluorimétrique. La plaque réactionnelle, automatiquement chargée à partir d'un magasin, est entraînée sur une piste circulaire et passe devant les différents distributeurs :

1. l'échantillon est déposé sur le papier filtre de la plaquette sur lequel est fixé l'anticorps ; ce papier filtre est supporté par une tablette plastique.
2. l'antigène couplé à la phosphatase alcaline est ajouté en excès ;
3. le liquide de lavage déplace vers la périphérie du papier filtre les antigènes n'ayant pas réagi (libres ou couplés à l'enzyme) et apporte le substrat fluorescent (4-méthyl ombelliféryl-phosphate).
4. la cinétique est suivie par fluorimétrie sur la partie centrale de la tablette. La coloration due à l'antigène marqué par l'enzyme et non couplé à l'anticorps apparaît alors comme un anneau à la périphérie de la plaquette (Figure V-27. 2).

b. Les multitest

Des dosages multiples pour le dépistage de sensibilité à divers allergènes ont également été proposés sur support sec (Figure V-27.3) et automatisés dans un appareil approprié. La mesure est effectuée par réflectance sur chaque spot.

2. A cassettes spécialisées

Le film support de la réaction immunologique est inclus une minicassette comportant tous les réactifs nécessaires au déroulement de la réaction (Figure V-27.4). Comme en immunochimie liquide, cette technique donne une très grande souplesse aux automates spécialisés qui les gèrent.

VI. Conclusion générale

Tous ces automates à transfert sont d'apparition récente mais représentent une part de plus en plus grande du marché. L'innovation a été très forte ces dernières années et de nouveaux automates de plus en plus performants sont en cours de réalisation dans le secret des laboratoires de recherche des grands groupes industriels. On peut déplorer que dans certains cas, il y ait un peu "vente forcée" de la réaction avec l'appareil, le biologiste n'ayant plus aucune possibilité d'intervention sur le dosage, livré "clé en mains". Ceci peut cependant s'apprécier de manière positive comme un pas vers une plus grande standardisation des résultats inter laboratoires et une plus grande sécurité des analyses. Ainsi, comme beaucoup d'autres professionnels, le biologiste serait amené à une reconversion ou plutôt à un retour aux sources, l'interprétation, la définition des besoins, la recherche, etc... Après tout, c'est en principe sa vocation première et il laisserait ainsi

aux ingénieurs ou techniciens de Génie Biologique et Médical la routine technologique et la gestion de l'intendance... Selon Férard et Métais⁴, « Il faut limiter l'automatisation passive qui banalise les tâches du biologiste au profit d'appareils souples et transparents qui lui permettent de faire intervenir ses connaissances, ses capacités d'observation et son savoir-faire. On peut ajouter que cette approche permet de maintenir suffisamment d'interventions humaines pour que ces appareils soient bien acceptés par le personnel du laboratoire. »

⁴ Revue Française des Laboratoires 150 (1986) 10

Chapitre VI

Les procédés de séparation

Les techniques et les appareillages décrits dans les chapitres précédents donnent des résultats globaux de taux de substrat ou d'enzyme. Par exemple, on obtient la concentration totale de LDH, de protéines ou de cholestérol. Mais dans de nombreux cas pathologiques, on a parfois besoin de données plus précises qu'il est possible d'obtenir par la séparation de ces composés en sous-classes : isoenzymes pour la LDH, sous-classe de protéines (chacune pouvant être spécifique d'un groupe d'affections), ou type de lipoprotéine transportant le cholestérol. Les biologistes ont donc été amenés au développement de techniques plus fines, parfois sophistiquées dans leurs principes bien que de réalisation simple. Chacune de ces techniques a donné lieu au développement d'appareillages spécifiques.

Les méthodes physiques de séparation sont très nombreuses. On peut les classer en deux grands groupes : chromatographie et électrophorèse. Dans les deux cas, les molécules séparées sont ensuite repérées par une de leurs propriétés: affinité pour un colorant spécifique, activité enzymatique ou immunologique, mesure de radioactivité,... L'avantage de ces méthodes par rapport au dosage isolé des molécules individuelles est de fournir en une seule analyse une vue d'ensemble du "profil" d'une classe de molécules. Par calibration, elles permettent une quantification fiable. Ces deux groupes de techniques peuvent être mis en oeuvre de manière analytique ou de manière préparative, pour la production de molécules purifiées. Les principes sont les mêmes dans les deux cas; seuls les procédés analytiques seront évoqués, les problèmes techniques liés au facteur d'échelle en technique préparative ne seront pas traités.

Enfin, nous développerons un certain nombre de techniques "mixtes", couplant chromatographie ou électrophorèse à une autre technique: en chromatographie, le couplage aux méthodes de spectrométrie de masse, en électrophorèse, le couplage aux techniques immunologiques. Ces couplages augmentent le nombre, la diversité et la puissance des techniques analytiques.

I. La chromatographie: définitions et classifications

La chromatographie est une méthode de séparation de composés fondée sur l'entraînement de ces composés par une phase mobile, appelée éluant ou solvant, ces composés étant séparés les uns des autres par des interactions plus ou moins forte avec une phase dite fixe ou stationnaire. En fin de chromatographie, on obtient un chromatogramme ou profil chromatographique ou profil d'éluion du mélange. Selon la nature des molécules séparées, on parle de protéinogramme pour les protéines, de lipidogramme pour les lipoprotéines...

On peut classer les méthodes chromatographiques selon trois critères : en fonction de la nature des phases, en fonction des mécanismes mis en jeu au niveau moléculaire, en fonction des technologies pratiques mises en oeuvre, Ces classifications sont complémentaires et permettent de décrire complètement un procédé.

A. Classification selon la nature des phases

On reconnaît différents types de chromatographie, selon la nature des phases mises en jeu: la phase mobile est liquide ou gazeuse ; la phase fixe est liquide ou solide. On distingue ainsi les chromatographies liquide-solide ou liquide - liquide et les chromatographies gaz - liquide ou gaz - solide.

Dans les chromatographies liquides, on améliore la qualité des séparations en jouant sur la nature de la phase mobile (figure VI-1) :

- la composition de l'éluant peut être constante, identique pendant toute la chromatographie : chromatographie isocratique ;
- la composition de l'éluant change au cours de la chromatographie : on réalise un gradient d'éluant. Le gradient peut être réalisé de deux façons :
 - + gradient discontinu : changement de composition par paliers brusques.
 - + gradient continu : changement progressif dans la composition de la phase. Les gradients continus peuvent être linéaires ou non linéaires (convexes ou concaves). Les systèmes actuels pilotés par informatique permettent de réaliser des programmations complexes de gradients en forme et en composition de solvants (binaires, ternaires, quaternaires).

Figure VI-1 : Les modes d'éluant en chromatographie.

Les représentations concernent des gradients binaires. Une représentation similaire à n dimensions serait applicable à des gradients complexes à n composants.

B. Classification selon la nature des mécanismes moléculaires

1. chromatographie d'adsorption

L'adsorption des molécules à séparer est réalisée sur une surface solide, par des mécanismes plus ou moins précis, pas toujours connus et maîtrisés : interactions de Van der Waals, liaison hydrogène, etc. La chromatographie sur phase greffée telle que la chromatographie hydrophobe peut être considérée comme un cas particulier. Elle repose sur des interactions hydrophobes entre les molécules à séparer et une phase greffée : chaîne carbonée plus ou moins longue (et donc plus ou moins hydrophobe) ou cycle phényle par exemple.

Figure VI-2 : Différents mécanismes de chromatographie.

1. Chromatographie de partage. 2. Chromatographie d'échange d'ions (ici, échange d'anions). 3. Chromatographie d'exclusion diffusion.

2. Chromatographie de partage (Figure VI-2.1)

Les molécules à séparer se différencient par leur coefficient de partage entre la phase mobile et la phase stationnaire retenue sur un support plus ou moins inerte (couche polaire entourant le grain de silice). Ces deux phases sont réalisées par l'adsorption différente sur le support des éléments d'un solvant au moins binaire (exemple : éthanol/eau). Le coefficient de partage K représente le rapport des solubilités du composé dans chacune de ces phases.

3. Chromatographie d'échange d'ions (Figure VI-2.2)

Des groupements chargés sont fixés sur un support (résine polystyrène, cellulose, ou gel de tamis moléculaire) et neutralisés par un ion de charge opposée. Les ions de la solution peuvent s'échanger contre ces ions neutralisants :

- si les groupements de la résine sont chargés positivement, ils vont retenir les anions : échangeurs d'anions, réalisés par exemple avec des dérivés ammonium quaternaires (DEAE : diéthyl-amino-éthyl) ;
- si ces groupements sont chargés négativement, ils vont retenir les cations : échangeurs de cations, réalisés par exemple avec des dérivés carboxyliques ou des acides sulfoniques.

La séparation des molécules dépend ainsi de leur charge, c'est à dire en fait du pH du solvant par rapport à leur point isoélectrique. La force ionique de la solution présente également une grande importance, car elle contrôle en dernier ressort la charge superficielle efficace de la molécule et du groupement échangeur. Lors de l'étape de fixation, on est ainsi amené à utiliser une force ionique faible. Les molécules fixées sont déplacées du support et éluées soit par changement du pH (les charges des molécules se modifient), soit par changement de la force ionique (la charge efficace des

molécules est modifiée) soit par une combinaison des deux méthodes, permettant d'utiliser des conditions plus douces ne dénaturant pas les molécules complexes comme les protéines. Les applications existent en biologie clinique : séparation des isoenzymes de la créatine-phospho-kinase (dans le diagnostic de l'infarctus du myocarde), séparation de l'hémoglobine glycosylée de l'hémoglobine normale chez les diabétiques dans le contrôle au long cours de "équilibre de leur diabète.

4. Chromatographie d'exclusion - diffusion (Figure VI-2.3)

Elle utilise un tamis moléculaire constitué par un polymère réticulé dont la taille des mailles est définie statistiquement par les conditions de polymérisation. Ces polymères sont présentés sous formes de microbilles ou microsphères calibrées. Les petites molécules pénètrent dans le gel et sont ralenties, d'autant plus qu'elles sont plus petites et peuvent diffuser dans un plus grand nombre de mailles vers le centre des billes; les grosses molécules sont exclues du gel, contournent les billes et sortent en tête de la colonne. Les polymères utilisés sont soit des polysaccharides (Sephadex®, Sepharose®) soit de l'acrylamide (Biogel®) soit des polymères mixtes. Par étalonnage, on peut estimer le poids moléculaire apparent en solution d'une molécule (Figure VI-3). Il y a cependant des anomalies :

- dues à la forme de la molécule : l'étalonnage n'est valable que pour des molécules sphériques. Des molécules elliptiques ou très allongées auront une masse apparente supérieure à leur masse réelle, car elles ne peuvent diffuser dans le gel que si elles sont convenablement orientées ;
- dues à des interactions plus ou moins spécifiques et intenses entre les molécules à séparer et le gel: interactions ioniques, hydrophobes ou reposant sur l'affinité.

Figure VI-3 : Étalonnage d'une chromatographie d'exclusion diffusion.

Les points représentent les volumes d'élution de protéines de calibration, de masse moléculaire connue.

5. La chromatographie de paire d'ions

On forme une paire d'ions entre les constituants ionisés du mélange à analyser et un contre-ion (par exemple alkyl-ammonium). Les paires vont se distribuer entre les phases mobiles et fixes.

6. La chromatographie d'affinité (figure VI-4)

Contrairement aux autres types de chromatographie où le support est polyvalent, la chromatographie d'affinité nécessite la préparation d'un support spécifique de la molécule à purifier: on fixe sur un support (gel, résine,...), généralement par l'intermédiaire d'un bras, une molécule présentant une affinité pour la molécule à purifier (substrat, anticorps, récepteur, inhibiteur, etc...). Seule la molécule intéressante sera fixée puis élue :

- soit de manière non spécifique, par des changements de pH ou de force ionique, qui modifient les interactions entre la molécule et le ligand ;
- soit de manière spécifique, par l'utilisation d'une autre molécule ayant une affinité pour la molécule à purifier et entrant en compétition avec le ligand.

Le bras éloignant le ligand du support facilite l'interaction des molécules avec le ligand. L'utilisation d'une force ionique élevée limite l'intervention des facteurs non spécifiques dans la fixation au ligand.

Figure VI-4 : Principe de la chromatographie d'affinité.

7. la chromatographie chirale

Pour les molécules biologiques présentant des isomères optiques, l'organisme ne reconnaît, ne synthétise ou n'utilise qu'un seul de ces isomères; le problème de leur séparation ne se pose pas en routine. La chromatographie chirale commence à se développer essentiellement dans l'étude des

molécules exogènes (ou xénobiotiques, tels que médicaments ou toxiques). Ces produits peuvent être utilisés ou métabolisés par l'organisme sous formes de différents isomères optiques, dont les propriétés biologiques ou toxiques peuvent être très différentes: la séparation de ces isomères est alors capitale. Elle intervient dans un deuxième temps, après la purification de la molécule, pour séparer les isomères optiques. Cette séparation est possible si la molécule peut se fixer par trois de ses groupements au support. Empiriquement, de nombreuses molécules sont employées, par exemple des protéines greffées sur le support. Actuellement, l'utilisation des cyclodextrines naturelles ou modifiées est très étudiée.

C. Classification selon la nature des technologies appliquées

La nature de la phase mobile (liquide ou gaz) impose des technologies très différentes. Les autres paramètres technologiques pris en compte sont représentés par la nature du support et la pression de travail utilisée.

1. Selon le support

a. La chromatographie sur papier

Elle est réalisée sur une feuille de papier de grande taille (50 x 50 cm) : le solvant migre par capillarité, généralement de manière descendante (Figure VI-5.1).

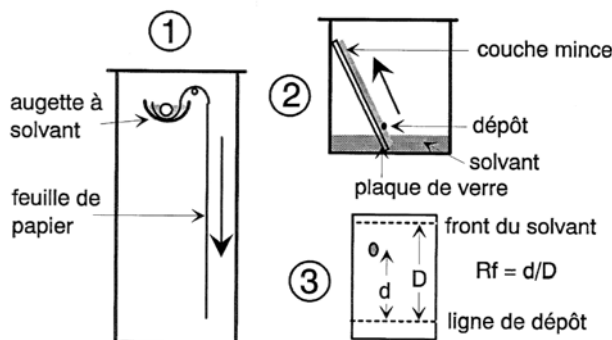


Figure VI-5 : Chromatographie sur papier et couche mince

1. Chromatographie descendante sur papier. 2. Chromatographie ascendante sur couche mince. 3. Révélation de la couche mince et calcul de la référence frontale R_f .

b. La chromatographie sur couche mince

Dans cette technique, appelée CCM ou TLC ("thin layer chromatography"), le solvant migre par capillarité à travers le support, de manière ascendante (Figure VI-5.2). Sur une plaque de verre, une feuille d'aluminium ou de plastique, on étale différents types de milieux (gel de silice, cellulose, gel réticulé) sous forme d'une couche mince (0,25 mm d'épaisseur). La solidité du support est renforcée par l'inclusion d'un liant tel que le plâtre. Par rapport au papier, l'existence d'un support inerte tel que le verre limite la taille des chromatogrammes, ce qui est d'ailleurs largement compensé par une meilleure résolution. Sur papier ou couche mince, la cuve de chromatographie doit être saturée par les vapeurs du solvant, afin d'éviter que l'évaporation du solvant le plus volatil au cours de la migration ne modifie la composition de la phase mobile.

Après repérage des molécules (lumière UV, colorant spécifique,...), on mesure la distance de migration des composés, qui est comparée à la distance de migration du front de la phase mobile, ce qui permet de définir la référence frontale ou R_f (Figure VI-5.3), caractéristique d'un composé dans des conditions précises de support, de solvant et de température. La chromatographie descendante permet de laisser couler le solvant dans la cuve et le front du solvant n'est plus mesurable. On peut alors définir un R_f relatif par rapport à un composé de référence.

c. La chromatographie sur colonne

On réalise une percolation de l'éluant à travers le support sous l'effet d'une pression hydrostatique, ou hydrodynamique, ou par un flux gazeux. La migration d'un composé est caractérisée par son volume d'éluion dans des conditions précises, c'est à dire la quantité de phase mobile qu'il faut utiliser pour faire sortir le composé de la colonne. Lorsque les conditions de débit de la phase mobile sont bien contrôlées (chromatographie gazeuse ou liquide haute performance), ce volume est remplacé par un temps (temps de rétention). En chromatographie liquide, et notamment en exclusion - diffusion, le volume d'éluion est très dépendant des caractéristiques géométriques de la colonne (diamètre et longueur). Le volume d'éluion V_e mesuré est souvent transformé en facteur de capacité K_{av} par la prise en compte du volume d'exclusion de la colonne V_0 (volume minimum nécessaire pour éluer des composés non retenus) :

$$K_{av} = (V_e - V_0) / V_0$$

En chromatographie liquide, la récupération de l'éluat est facile, grâce à un collecteur de fractions, fonctionnant selon différentes modalités :

- réglage du temps de récupération, le plus simple
- réglage en volume, souvent sous la forme d'un compteur de gouttes
- réglage en fonction des pics d'absorption de la lumière, grâce à la mesure de la densité optique en continu par un photomètre à cuve à circulation. Le couplage du photomètre enregistreur et du collecteur est associé à un marquage des changements de tube.

Figure VI-6 : Chromatographie sur colonne à basse pression.

La pression hydrostatique est réglée par la différence de niveau entre la surface du solvant dans la colonne et la sortie du tube. Le passage du solvant du réservoir sur la colonne est réalisé par siphonage. Une détection photométrique (cuve à circulation) peut être intercalée sur la tubulure de sortie de la colonne.

2. Selon la pression de travail

a. Pression hydrostatique

La pression appliquée est la seule pression hydrostatique, représentée par la différence de niveau liquidien entre la tête de colonne et la sortie. Dans les gels traditionnels, cette pression est limitée par le tassement des gels avec des limites autour de 10-15 cm de pression pour les gels les plus compressibles (Figure VI-6). La mise en oeuvre est aisée et économique, ne nécessitant que des colonnes (en verre ou plastique) et des tuyaux. Les dimensions des colonnes les plus couramment utilisées varient de 10 cm à 2 m de longueur, pour un diamètre de l'ordre de 0,5 à 5 cm. Pour les techniques analytiques sur de petites quantités de sérum au laboratoire médical, les dimensions les plus faibles sont utilisées.

b. Pression hydrodynamique

Le solvant est propulsé à pression élevée à travers le support, ce qui a nécessité la mise au point de supports spéciaux capables de résister sans déformation ni bouchage à des pressions élevées. Bien que la pression de travail soit élevée, le sigle HP de HPLC indique actuellement le caractère haute performance de cette méthodologie (cf paragraphe III, A). Ces techniques nécessitent des appareillages particuliers, plus ou moins complexes et onéreux, qui seront décrits dans les paragraphes ultérieurs. Elles sont de plus en plus utilisées dans les laboratoires d'analyse médicale et sont présentes en routine dans la plupart des laboratoires de recherche.

L'OPLC ("Overpressure liquid chromatography"), de diffusion encore très restreinte, est utilisée en couche mince. La pression est appliquée non sur la phase mobile, mais sur l'ensemble de la plaque de chromatographie, par de l'eau dans un sac souple (Figure VI-7). Cette technique améliore la qualité de la séparation et élimine le problème de la phase vapeur de la cuve de chromatographie.

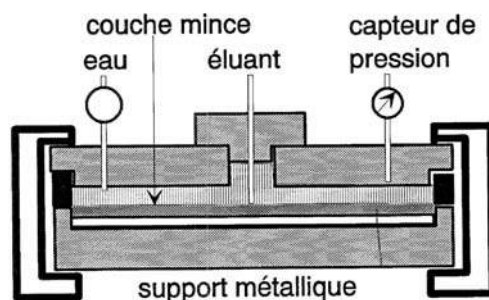


Figure VI-7 : Principe d'un appareil de chromatographie sur couche mince à haute pression (OPLC)

D. Les qualités d'une séparation chromatographique

La qualité d'une séparation chromatographique a été théorisée. On peut définir la qualité d'une colonne pour un constituant donné par le nombre de plateaux théoriques et apprécier la qualité chromatographique de la séparation de plusieurs composés par les critères de résolution et de sélectivité.

La théorie des plateaux est née de la recherche d'un modèle pour décrire le fonctionnement d'une séparation et découle des notions précédemment mises au point en distillation. On considère que le déplacement de la phase mobile n'est pas continu, mais se fait par transfert successif d'un plateau à un autre. Un équilibre de concentration des molécules à séparer entre la phase mobile et la phase fixe est atteint à chaque plateau. On pourra ainsi définir soit le nombre de plateaux théoriques par unité de longueur, soit la longueur d'un plateau théorique ("HETP : height equivalent of theoretical plate").

Cette notion de plateau théorique est illustrée par une séparation fictive en chromatographie de partage entre deux composés A et B de coefficients de partage très différents (Figure VI-8). Cet exemple caricatural met en évidence plusieurs notions importantes en chromatographie :

- une bonne séparation nécessite soit des coefficients de partage très différents, soit un grand nombre de plateaux théoriques;
- plus les composés sont retenus sur la colonne, plus les pics obtenus à la sortie de la colonne ont tendance à s'élargir. L'utilisation de gradients permet de pallier à cet inconvénient ;
- la séparation dépend des transferts de masse entre les deux phases. Ces transferts sont influencés par la température et par le débit de la phase mobile :
 - + un débit trop rapide ne permet pas l'équilibre à chaque plateau et diminue l'efficacité de la colonne.
 - + un débit trop faible entraîne également une perte d'efficacité par rétrodiffusion entre les plateaux.

Figure VI-8 : Séparation chromatographique théorique.

On dépose un mélange de deux composés A et B, de coefficient de partage entre phase fixe et mobile de 0,1 et 0,9 respectivement. Analyse sur trois plateaux théoriques.

Pour éliminer l'influence des caractères géométriques d'une colonne, l'expression du débit en ml/mn est remplacée par l'expression en débit linéaire exprimé en cm/s (obtenu par la division du débit mesuré par la surface de la colonne), qui permet la comparaison de colonnes différentes.

Le nombre de plateaux théoriques est défini par rapport à l'élution d'un composé, sous forme d'un temps, d'un volume ou d'une unité quelconque, et à la variance de cette valeur :

$$N = \frac{(X/\sigma_x)^2}{\sigma_x^2}$$

En pratique, le nombre de plateaux se calcule à partir d'une courbe expérimentale (Figure VI-9) selon la formule :

$$N = a \cdot (V_e / l)^2$$

V = volume d'éluion d'un pic (mesuré au sommet du pic) ; c'est le volume de solvant nécessaire pour faire sortir le composé de la colonne.

I = largeur du pic

a = constante dont la valeur dépend de la hauteur à laquelle on mesure (au point d'inflexion, $a = 4$; à mi hauteur, $a = 5,5$; au niveau de la tangente, $a = 16$).

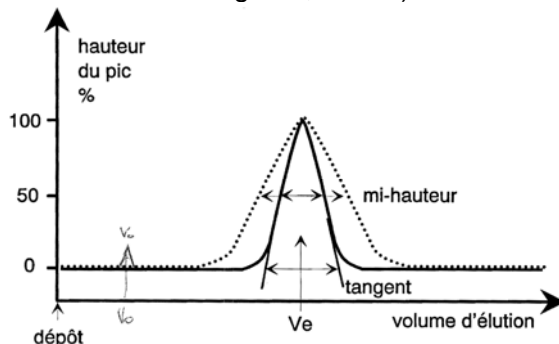


Figure VI-9 : Mesure pratique du nombre de plateaux théoriques.

La colonne donnant le tracé plein est meilleure que celle conduisant au tracé en pointillé, alors que les facteurs de capacité du pic sont identiques.

La sélectivité, traduisant par un coefficient l'importance de la séparation entre deux pics, est le rapport des facteurs de capacité de la colonne pour les deux produits :

$$\alpha = k_2 / k_1 = (V_{e2} - V_J) / (V_{e1} - V_J)$$

Le paramètre global regroupant tous les autres s'appelle la résolution R , selon la formule :

$$R = \left(\frac{2}{\sqrt{N}} \right) \cdot \left(\frac{\alpha - 1}{\alpha} \right) \cdot \left(\frac{k_2}{k_2 + 1} \right)$$

où k_2 est le facteur de capacité du dernier pic élué.

E. Calibration

Des résultats quantitatifs sont obtenus sur chacun des pics élués de la colonne après étalonnage ou calibration, par comparaison des surfaces mesurées pour les pics de chaque composé avec la surface obtenue avec une quantité connue de produit. Les microordinateurs pilotant les appareils actuels peuvent effectuer les transformations des surfaces en concentrations ou quantités absolues par calibration selon deux grandes modalités.

1. Calibration externe

Un mélange témoin, de même composition qualitative que les échantillons, est analysé à différents niveaux de concentration. Des courbes d'étalonnage peuvent ainsi être établies pour chaque composé. Ces courbes permettent aussi de définir le facteur de réponse du système analytique, éventuellement différent selon le composé.

2. Calibration interne

Une quantité connue d'un composé non présent dans le mélange à analyser, est ajoutée à chaque échantillon. Le rapport des surfaces des pics à déterminer par rapport à ce standard interne permet une quantification plus précise et plus rigoureuse. Il est conseillé d'incorporer ce standard le plus tôt possible dans les différentes étapes de préparation de l'échantillon, ce qui élimine les erreurs dues aux pertes à chaque étape. Le comportement d'un tel standard lors de ces étapes doit être identique à celui des composés à analyser: son choix judicieux est un facteur capital de qualité.

II. La chromatographie en phase gazeuse

La chromatographie en phase gazeuse (CPG) est aussi repérée par d'autres sigles : CPV (chromatographie en phase vapeur), GC ("gas chromatography"), GLC ("gas liquid chromatography").

C'est une technique déjà ancienne, qui a bénéficié de considérables améliorations des appareils (informatique et traitement du signal) ainsi que d'une baisse importante de leur coût. Au point de vue analytique, le développement des colonnes capillaires a permis des améliorations importantes des qualités des séparations. La CPG est fréquemment utilisée dans des laboratoires de biochimie clinique spécialisés, où elle est souvent en concurrence actuellement avec l'HPLC, car les applications biologiques des deux techniques sont comparables. C'est un instrument de routine dans la plupart des laboratoires de recherche.

A. Principes

Les définitions générales de la chromatographie s'appliquent évidemment à cette technique. Les deux points principaux sont l'utilisation d'un gaz vecteur et la nécessité de pouvoir rendre gazeux les molécules à analyser.

1. Les gaz vecteurs

Les gaz les plus couramment utilisés sont l'azote, l'hélium ou l'hydrogène (le premier étant plus économique, le dernier étant plus dangereux 1). Avec l'hélium ou l'hydrogène, la résolution est meilleure dans une gamme plus large de débit linéaire, permettant l'utilisation de débits plus élevés et donc un gain de temps (Figure VI-10). Les gaz sont purifiés par passage sur des adsorbants pour éliminer les traces d'oxygène et d'eau qui dégraderaient les colonnes et/ou les produits, par des réactions d'oxydation favorisées par la température élevée. Pour les gros utilisateurs, certains fabricants proposent des générateurs de gaz de qualité chromatographique (azote et hydrogène notamment).

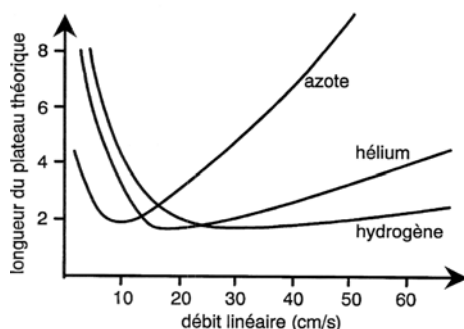


Figure VI-10 : Influence de la nature du gaz et de son débit sur la longueur du plateau théorique (HETP) en chromatographie en phase gazeuse.

Les débits des gaz sont réglables; mesurés manuellement en sortie de colonne ou par des capteurs appropriés, ils sont en général maintenus constants tout au long de la chromatographie. L'amélioration d'une séparation est plus facilement obtenue de manière reproductible en jouant sur la température qu'en jouant sur les débits des gaz.

Figure VI-11 : Réalisation de l'étanchéité des connexions en CPG ou HPLC.

Comme dans toute chromatographie sur colonne, l'étanchéité du système est capitale. Les joints sont assurés par des ferrules en graphite ou composites, écrasées entre les écrous (Figure VI-11). La normalisation des pas de vis en pouces (1/4", 1/8", 1/16") permet le libre choix de nombreux éléments de CPG entre différents fabricants.

2. La préparation des échantillons

Les produits à séparer doivent pouvoir passer facilement à l'état gazeux. Les produits volatils ou volatilisés à une température inférieure à 400°C sans être dégradés peuvent être analysés directement. Les autres produits doivent être transformés en dérivés volatils par une réaction chimique.

Les réactions utilisables doivent satisfaire certaines contraintes : faciles à réaliser ; rapides et totales; identiques pour tous les composants de l'échantillon. De ce fait, seul un petit nombre de réactions de dérivatisations est employé: par exemple méthylation pour les acides gras, acétylation pour les sucres, triméthylsilylation pour les acides aminés.

La récupération des produits est plus difficile qu'en chromatographie liquide, voire impossible avec les détecteurs classiques par ionisation de flamme qui détruisent les molécules.

B. Les éléments du chromatographe

L'organisation générale d'un système de CPG est représentée dans la figure VI-12. La gestion informatisée comporte le pilotage de l'appareil (les principaux éléments seront décrits à chaque paragraphe) et le traitement des données (qui sera décrit de manière globale à la fin du chapitre).

Figure VI-12 : Schéma d'ensemble d'un chromatographe en phase gazeuse.

1. Le four

Le four est une enceinte isolée dans laquelle se trouve la colonne. Sa température est réglée et programmable, le plus souvent entre la température ambiante et 400° C. Un ventilateur permet de maintenir une répartition homogène de la température. Des volets permettent une évacuation rapide de la chaleur entre deux chromatographies lorsque des gradients de température sont utilisés.

Le réglage des gradients fait intervenir différents paramètres :

- les températures initiales et finales, ainsi que les durées à chaque palier de température ;
- la vitesse de modification de la température, en °C/minute. Selon les capacités de contrôle de l'appareil des gradients plus ou moins complexes avec différents paliers sont réalisables.

Les variations de température vont influencer les transferts de masse entre les phases et la viscosité du gaz (modification du débit).

2. Les colonnes

Les dimensions du four sont limitées (de l'ordre de 30 x 30 x 30 cm), imposant l'utilisation de colonnes enroulées sur elles-mêmes.

a. Les types de colonne

Deux types de colonnes sont utilisés :

Colonnes remplies : les colonnes les plus anciennement utilisées sont métalliques ou en verre, remplies d'un support (silice ou autre) sur lequel on peut adsorber ou greffer différentes phases selon les séparations à réaliser. La résolution dépend comme toujours du nombre de plateaux théoriques, qui est fonction de la longueur de la colonne: entre 1 et 3 m. Des colonnes trop longues sont difficiles à remplir de manière homogène ; de la granulométrie du support, exprimée en mesh (nombre inversement proportionnel à la taille des grains) : généralement entre 60 et 100 ; un remplissage correct est plus difficile avec des granulométries trop fines. Les débits de gaz utilisés varient entre 20 et 40 ml/mn. Le diamètre interne de la colonne (2-4 mm) influence surtout la quantité d'échantillon pouvant être analysée.

Colonnes capillaires : D'importants progrès dans la résolution et la rapidité ont été réalisés avec le développement des colonnes capillaires en silice fondue, de longueur variable (entre 20 et 100 m), et de diamètre interne variable (entre 0,25 et 0,75 mm). La surface d'échange est représentée par la paroi interne du capillaire. Du fait de la petite taille de la section de la colonne, la résistance à l'écoulement du gaz est grande. Ainsi, les débits gazeux sont beaucoup plus faibles à travers ces colonnes (quelques ml/min) et ne sont réglables que dans des limites assez étroites, en jouant sur la pression en tête de colonne. Les débits faibles sont plus difficiles à mesurer: on les calcule généralement à partir du temps de rétention d'un composé non retenu et des caractéristiques géométriques de la colonne :

$$\text{débit} = (\text{longueur} \times \text{surface de la section}) / \text{temps de rétention}$$

Récemment, des colonnes multicapillaires ont été développées (figure VI-12a) : elles présentent les avantages résolutifs des colonnes capillaires, tout en permettant une charge importante et l'utilisation d'un débit linéaire élevé. La sensibilité des analyses est ainsi très augmentée.

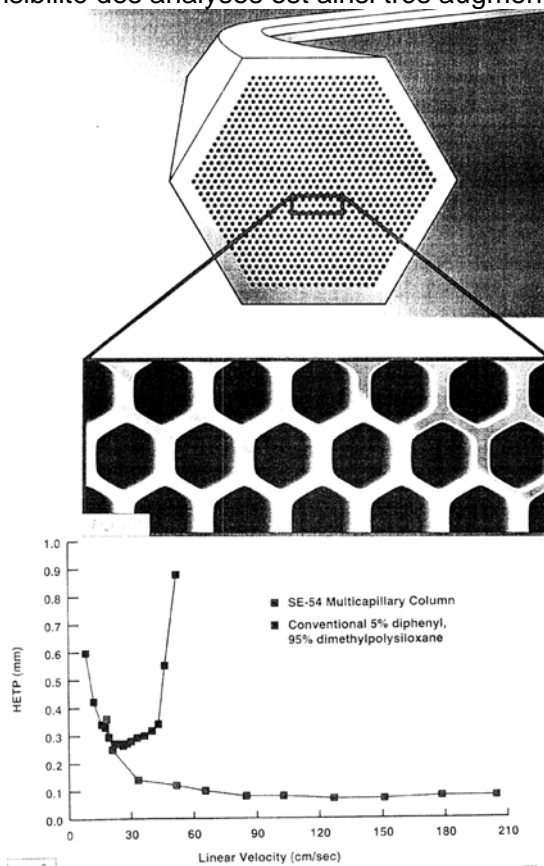


Figure VI-12a : Colonne multicapillaire

b. les types de phase fixe

De nombreux types de phases fixes, molécules chimiques plus ou moins complexes caractérisées par des polarités et des stabilités très variables, ont été développés pour des applications spécifiques (sucres, acides gras, hydrocarbures, pesticides, etc...). Le choix de la phase est l'élément principal de la qualité :

- phase adsorbée ou phase stationnaire : le constituant dissous dans un solvant est mis en contact avec le support; après évaporation du solvant, il reste adsorbé sur ce support. Dans les colonnes capillaires des films de 20 à 25 μm d'épaisseur recouvrent la paroi interne. La préparation des colonnes remplies est aisée, facilement réalisable au laboratoire. La stabilité des phases stationnaires est limitée : chaque phase possède une température limite d'utilisation, au-delà de laquelle les performances de la séparation chutent très vite, soit par évaporation et élimination de la phase, soit par dégradation de sa structure chimique.

- phase greffée : la phase fixe est greffée par liaison covalente au support. La stabilité est meilleure que celle des phases stationnaires.

3. L'injecteur

Dans l'injecteur, l'échantillon à analyser est instantanément volatilisé et entraîné par le gaz vecteur. Pour cette raison, la température de l'injecteur doit être supérieure à celle du four. L'injection est réalisée grâce à des seringues (de 1 à 5 μl) munies d'une aiguille perforant un septum en matériau rétractable (type téflon) permettant le maintien de l'étanchéité (Figure VI-13). Un flux de gaz nettoie en permanence la face inférieure du septum, évitant les contaminations entre analyses par des molécules

adsorbées sur le septum. Ce septum doit être régulièrement changé; aussi d'autres types d'injecteurs, à durée de vie plus longue, sont actuellement proposés :

Figure VI-13 : Injecteur de chromatographie en phase gazeuse. L'étanchéité du point d'injection est réalisée par un septum.

- le septum en "bec de canard" (Figure VI-14.1), dont la fermeture est assurée par un ressort; un joint-guide étanche évite les fuites pendant l'injection.
- le système à billes magnétiques en carbure de tungstène (Figure VI-14.2). Contrairement aux systèmes en polymères organiques, il n'y a pas de relargage de molécules même à température élevée.

Figure VI-14 : Systèmes alternatifs à l'utilisation du septum.

1. Système à "bec de canard".
2. Système à billes magnétiques.

L'injection est manuelle ou réalisée de manière programmée pour les applications en routine par un module d'injection automatique (comme en HPLC). Dans les deux cas, on utilise des microseringues de précision de 1 à 5 μl . Pour les très petits volumes, un mandrin fixé au piston, remplit l'aiguille d'injection dont le volume interne est supérieur au volume injecté (Figure VI-15).

Figure VI-15 : Seringue d'injection CPG de 1 μl .

Le montage des injecteurs est différent selon le type de colonne (Figure VI-13) :

- pour les colonnes remplies, l'injection est réalisée soit dans un petit tube de verre ("liner", contenant éventuellement une petite quantité du matériau de garnissage de la colonne pour protéger celle-ci), soit directement en tête de colonne (injection en ligne ou "on line"). La totalité de l'échantillon est entraînée dans la colonne.
- pour les colonnes capillaires, les capacités de charge sont plus réduites. Un injecteur spécial permet d'éliminer une partie du volume injecté (diviseur ou "split"), de manière réglable. Le facteur de division est mesuré par le rapport des débits à travers la colonne et à travers le diviseur. On peut ainsi faire passer sur la colonne quelques nanolitres seulement d'échantillon.

4. Le détecteur

Les détecteurs sont très variables: détruisant ou non les molécules à analyser, ils sont sensibles à la quantité de matière (détecteurs de masse) ou à la concentration des analytes.

a. Les détecteurs à flamme

Ce sont des détecteurs qui détruisent les molécules et présentent la même structure générale :

- le détecteur à ionisation de flamme ou FID ("flame ionization detector", figure VI-16.1) est le plus classique et certainement le plus répandu des détecteurs utilisés en chromatographie gazeuse. Une flamme d'air et hydrogène brûle les molécules en sortie de colonne, générant des ions qui sont collectés par l'anode. Le signal obtenu (picoampères) est ensuite amplifié et enregistré. Le réglage de l'atténuation (en puissance de 2, de 2^{-4} à 2^{20} environ) permet de régler la hauteur des pics à l'enregistrement ;

Figure VI-16 : Différents types de détecteurs utilisés en CPG.

1. Ionisation de flamme, avec brûleur.
2. Capture d'électrons.
3. Photoionisation.
4. Conductivité thermique (catarrhomètre).

- le détecteur FPD ("flame photometry detector") est utilisé pour les composés soufrés ; il fonctionne comme un photomètre d'émission (cf chapitre III).

- le détecteur thermoionique ou NPD ("nitrogen phosphorus detector") : au-dessus de la flamme, une petite bille de silicate imprégnée d'un métal alcalin est chauffée par un filament de platine. Les sels alcalins libérés de la bille se combinent fortement aux produits de la combustion dans la flamme des hétéroatomes, azote et phosphore essentiellement. Ces complexes deviennent ionisés car ils capturent fortement des électrons et ils sont collectés sur l'anode.

b. Les autres détecteurs

Détecteur à capture d'électrons (ECD : "electron capture detector"; figure VI-16.2) : des particules β émises par du nickel 63 ionisent le gaz vecteur. Les ions et électrons sont entraînés et collectés à l'anode, grâce à l'application d'un voltage pulsé dont la fréquence est asservie pour maintenir un courant constant. Un flux de gaz accessoire est injecté en même temps pour optimiser le résultat. Si une espèce absorbe les électrons (composés électrophiles tels que les hydrocarbures chlorés), elle diminue le courant; j'augmentation de la fréquence des pulsations pour maintenir le courant constant constitue le signal mesuré.

Détecteur à photoionisation (PIO : "photoionization detector" ; Figure VI-16.3) : les composés ont ionisés par une source ultraviolette et le courant produit par le flux d'ions est mesuré.

Détecteur de conductibilité thermique ou TCD ("thermal conductivity detector" ; figure VI-16.4) : ce détecteur mesure la différence de conductivité thermique entre le gaz vecteur dans un canal de référence et le même gaz à la sortie de la colonne, dans un deuxième canal. Dans chaque canal, des filaments de tungstène - rhénium identiques sont portés à une certaine température et sont connectés de manière équilibrée, la présence d'un composé en plus du gaz vecteur modifie leur résistance et le déséquilibre entre les deux canaux produit un signal mesuré. Il existe des détecteurs à 2 canaux ou à 4 canaux (2 de mesure et 2 de référence).

Détecteur de conductivité électrolytique ou EICD ("electrolytic conductivity detector"), spécifique des halogènes : l'effluent de la colonne est mélangé à l'hydrogène. Dans un petit four catalytique, les composés sont réduits en acides halogénés (HCl, HBr,...), qui sont dissout dans du n-propanol, dont la conductivité, modifiée par ces acides, est mesurée. Le n-propanol est régénéré par passage sur une petite colonne d'échange d'ions et recyclé.

Détecteur de radioactivité : l'effluent de la colonne traverse un petit tube en quartz rempli d'oxyde de cuivre et porté à 850°C où les molécules sont oxydées en CO₂ et H₂O, l'une ou l'autre de ces molécules est piégée, selon que l'isotope à mesurer est le carbone 14 ou le tritium. La radioactivité de la molécule non piégée est ensuite mesurée en continu dans une cellule appropriée. Le rendement de comptage est de 15 à 40 % pour le tritium et peut aller jusqu'à 80 % pour le carbone 14.

C. Les couplages

La chromatographie gazeuse est facilement couplée avec d'autres procédés analytiques, ce qui augmente d'autant la puissance des méthodes. La spectrométrie de masse est fréquemment utilisée, selon deux modalités :

1. Spectrométrie de masse organique

CPG-SM ou GC-MS ("gas chromatography - mass spectrometry"). Les molécules séparées sont envoyées sur un spectromètre de masse où elles sont fragmentées en ions de masse variables ; la séparation des fragments est réalisée en fonction de leur masse. Cette technique est utile pour l'identification des composés (comparaison avec des spectres connus en bibliothèque informatique) et la mesure de l'enrichissement isotopique en une position définie de la molécule.

2. Spectrométrie de masse isotopique

CPG-SMI ou GC-IRMS (gas chromatography - isotope ratio mass spectrometry"). Cette technique est utilisée pour l'étude des isotopes stables et notamment du carbone 13. A la sortie du chromatographe, le pic étudié est brûlé dans un capillaire en quartz rempli de cuivre (conversion en CO₂ + H₂O), l'eau est ensuite piégée à -90°C et le CO₂ est analysé pour ses trois isotopes 44, 45 et 46. Le rapport des pics des différents isotopes est comparé au rapport d'un standard international (PDB : Pee Dee Belemnite). Cette mesure ne permet pas de déterminer un enrichissement isotopique sur un

carbone particulier mais est plus sensible que la précédente (0,001 % d'enrichissement contre 0,5 %). Elle présente un intérêt lorsque les isotopes radioactifs ne sont pas disponibles pour un produit donné ou pour des études *in vivo* chez l'homme (on élimine les risques dus à la radioactivité). Cette technique est directement applicable aux gaz respiratoires et n'est pas invasive. De nombreux développements sont en cours dans les études métaboliques en physiologie humaine et dans le développement de méthodes diagnostiques.

III. La chromatographie liquide haute performance, HPLC

Bien que encore limitée à des laboratoires de biochimie clinique spécialisés, l'HPLC se développe de plus en plus pour de très nombreuses molécules (hormones, vitamines, médicaments,...). C'est un appareil de base indispensable dans tous les laboratoires de recherche. Le "Journal of Chromatography, Biomedical Applications" est presque devenu en pratique le "Journal of HPLC" !

Le sigle HPLC, d'origine anglaise (High Performance Liquid Chromatography) est pratiquement le seul utilisé dans la pratique orale et écrite des laboratoires; la version française CLHP (chromatographie liquide Haute performance) n'est guère rencontrée que dans les documents officiels écrits en français.

A. Principes

Par rapport à la chromatographie traditionnelle sur colonne, une résolution très supérieure est obtenue :

- la pression élevée favorise les transferts de masse entre les phases fixes et stationnaires. Les systèmes actuels permettent fréquemment d'obtenir des pressions jusqu'à 6000 psi (420 bars). Cependant, le terme "haute performance" remplace maintenant le premier terme utilisé de "haute pression" : dans de nombreux domaines, surtout celui des molécules d'intérêt biologique et notamment les protéines, on travaille plus souvent à pression basse (1.-20 bars) ou moyenne qu'à haute pression.

- l'utilisation de microsphères calibrées capables de résister à ces pressions offre une surface d'échange considérable, d'autant plus grande que les microsphères sont plus petites: les diamètres les plus couramment employés se situent entre 3 et 10 microns. La silice est un des matériaux les plus utilisés, étant donné sa résistance mécanique et les nombreuses possibilités de greffage de fonctions chimiques sur les groupements silanols. l'application de l'HPLC aux macromolécules telles que les protéines a été d'abord limitée par la porosité des billes de silice; la mise au point de gels de silice poreux ou de nouveaux polymères à pores plus large permet actuellement l'analyse des protéines par ce moyen.

L'appareillage est plus complexe et plus onéreux qu'en chromatographie liquide traditionnelle, mais la rapidité d'exécution et la résolution de la méthode sont incomparablement supérieures et compensent largement le coût. On trouve couramment des colonnes de 10 à 100.000 plateaux théoriques. Une telle résolution est également possible en chromatographie gazeuse, mais l'HPLC permet la récupération facile des produits et la réalisation de gradients d'élutions complexes par leur forme ou leur composition. Elle ne nécessite pas au préalable la synthèse de dérivés particuliers, mais l'utilisation de tels dérivés (en dérivatisation pré- ou post-colonne) peut reculer considérablement la limite de détection.

B. Les composants de l'appareil

Le schéma général de l'organisation d'un appareillage HPLC est donné dans la figure VI-17. Les matériaux de l'ensemble du système, et notamment celui des tubulures, doivent être capables de supporter les pressions employées. Dans les premiers appareils, la plupart des éléments étaient réalisés en acier, avec plusieurs inconvénients :

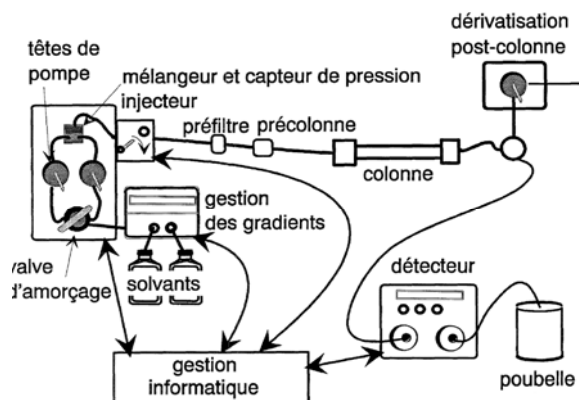


Figure VI-17 : Schéma d'ensemble d'un système de chromatographie liquide haute performance (HPLC).

- la gestion de l'étanchéité, qui transformait souvent le technicien en plombier, avec clés à molette et clés anglaises, pour serrer les raccords, les ferrules en acier étant évidemment moins malléables que les ferrules en graphite utilisées en CPG (cf figure VI-11) ;
- des problèmes d'incompatibilités, notamment avec les tampons aqueux chargés en sels qui corrodent l'acier, créent une usure prématurée du matériel, des problèmes d'étanchéité et de bouchage, par relargage de microparticules des parois.

La mise au point de polymères nouveaux, résistants et compatibles avec de très nombreux solvants, y compris aqueux, a considérablement simplifié ces problèmes. Ces polymères varient selon les fabricants (PEEK : "polyether etherketone", mais aussi polypropylène, résines diverses,...). En HPLC analytique, le diamètre des tubulures utilisées sont très faibles: selon leur position dans le système, ils varient de 0,1 à 1 mm (soit un volume interne de l'ordre de 0,1 à 8 $\mu\text{l}/\text{cm}$).

1. Les pompes

Les pompes permettent de propulser la phase mobile en assurant la pression nécessaire. Un piston aspire le solvant du réservoir et l'envoie dans le système. Le volume des pistons est de l'ordre de quelques dizaines de microlitres en HPLC analytique. L'unidirectionnalité du mouvement liquidien est assuré par des dispositifs anti-retour : un rubis parfaitement calibré et complémentaire de la surface d'un coussinet ne permet la circulation que dans un seul sens (Figure VI-18). Les pompes sont en acier ou titane; le piston est métallique ou en polymère synthétique. La précision et l'exactitude de la vitesse du piston conditionnent la qualité du débit liquidien: en chromatographie analytique, les débits les plus utilisés se situent entre 1 et 5 ml/minute. La constance du débit dépend également de la compressibilité des liquides, qui peut varier lors de gradients : ce paramètre est pris en compte par la plupart des logiciels de pilotage.

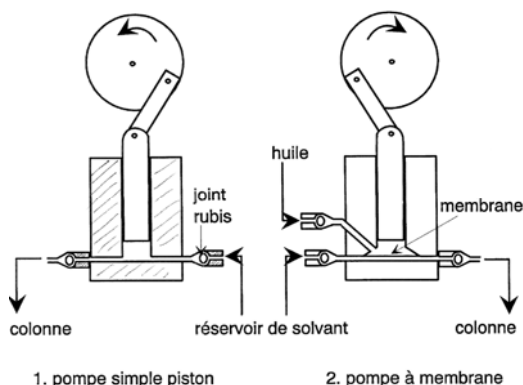


Figure VI-18 : Les pompes HPLC à simple piston.

a. Pompes à simple piston (Figure VI-18)

Faciles à piloter et robustes, car techniquement très simples, les pompes à simple piston ont l'inconvénient de générer des à-coups de pression, la pression chutant brutalement lors du remplissage du piston. Ces à-coups sont diminués par l'utilisation de pompes à membranes : lors de la poussée, le solvant comprime un liquide dans une chambre fermée par une membrane. Lors du remplissage du piston, ce liquide se détend et assure un certain maintien de la pression la membrane protège en outre le piston de "attaque par des solvants éventuellement agressifs.

Un capteur a la sortie des pompes permet de vérifier en continu la stabilité de la pression et de détecter immédiatement les anomalies : désamorçage de pompe, colmatage d'un filtre ou de la colonne. Lorsque la pression dépasse un certain seuil, réglable, le mouvement des pistons est aussitôt arrêté pour protéger le système.

b. Pompes à double piston (Figure VI-19)

Dans les pompes à double piston, un piston assure le débit et la pression pendant que l'autre se remplit. les deux pistons étant en phase opposée, la pression obtenue est pratiquement constante, mais de petites irrégularités persistent lors du changement de sens simultané des deux pistons. Pour éliminer cet inconvénient, certains modèles utilisent une légère accélération en fin de course du piston: la petite surpression ainsi créée compense la baisse de pression au changement de course du piston.

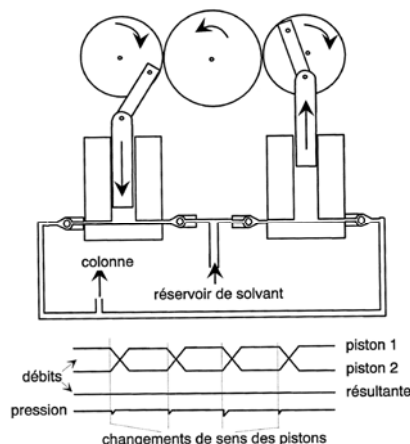


Figure VI-19 : Système de pompe HPLC à double piston.

En dessous, diagramme des débits et des pressions.

c. Les gradients

La réalisation des gradients est réalisée selon deux modalités :

- utilisation d'une pompe affectée à chaque solvant : le réglage du gradient est précis, mais le système est coûteux.
- utilisation d'une seule pompe : les proportions requises de chaque solvant sont obtenues par l'ouverture pendant un temps déterminé du circuit de chaque solvant grâce à une électrovanne. Les valeurs sont moins précises, surtout aux extrémités du gradient, mais le système permet de réaliser des gradients complexes avec une seule pompe.

d. Pompes annexes

La dérivation des éléments en post-colonne, après la séparation et avant la détection, permet d'augmenter la sensibilité de la mesure, mais impose une pompe supplémentaire afin de propulser dans le circuit le réactif de dérivation.

2. Les colonnes

Le contenu et le contenant ont tous deux une influence sur la qualité des séparations. La taille utile des particules contenues dans la colonne peut être influencée par le contenant, selon que la paroi est rigide ou non.

Figure VI-20 : Types de colonne HPLC.

1. A paroi rigide, avec compression axiale des billes en technique préparative. 2. A paroi souple : compression radiale de la paroi dans un module spécial, soit à mâchoire métallique, soit par un liquide.

a. Paroi rigide (Figure VI-20.1)

La colonne est en acier ou en polymère rigide. L'entassement des billes peut laisser persister des vides le long de la paroi, d'autant plus importants que la granulométrie est plus élevée. Ces vides sont responsables d'effets de bords: la migration plus rapide à ce niveau crée un chemin préférentiel et le front de solvant n'est pas linéaire mais en ménisque. Il se produit un élargissement des bandes qui diminue la résolution. Dans les colonnes de grande dimension et notamment en HPLC préparative, ce problème est minimisé en améliorant la qualité du remplissage par compression axiale.

b. Paroi souple (Figure VI-20.2)

Une paroi souple comprimée radialement s'adapte à la surface des billes et fait disparaître l'effet de bord. La taille utile apparente des particules est alors inférieure à leur taille réelle. L'efficacité devient de 25 % supérieure à un support de même granulométrie sans compression. Le coût plus bas et la grande versatilité de ce système sont cependant limités par la taille utilisable du module de compression des particules.

c. Le contenu

Le contenu le plus couramment utilisé consiste en microbilles de silice qui présentent les caractéristiques mécaniques nécessaires pour fonctionner utilement aux hautes pressions. La taille (de 3 à 10 μm de diamètre) et l'homogénéité de la répartition de taille sont des facteurs importants de la résolution. La silice présente en outre à sa surface des groupements polaires de type silanol Si-OH, qui peuvent être ou non utilisés pour fixer des groupements chimiques. Ceci permet de distinguer deux grands types de chromatographie (Figure VI-21) :

- phase normale (Figure VI-21.1) : les groupements ne sont pas modifiés et les particules sont plus polaires que le solvant ; ce type de support est très utilisé pour les petites molécules pour lesquels des solvants organiques sont utilisables.

- phase inverse ("reverse phase" ou "RP" ; figure VI-21.2) : des groupements non polaires sont greffés sur les particules, par exemple des chaînes hydrocarbonées de 8 à 18 atomes de carbone ou des groupements phényles. Le solvant doit être plus polaire que les particules. On peut ainsi utiliser des solvants aqueux, indispensables pour de nombreuses molécules d'intérêt biologique.

Des supports particuliers permettent la réalisation des autres types de chromatographie décrits dans les premiers paragraphes :

- l'échange d'ions, par greffage de fonctions chargées :
 - + charges positives pour les échangeurs d'anions (Figure VI-21.3). Les échangeurs forts sont réalisés par greffage de groupements ammonium quaternaires ($-\text{NR}_3^+$) tels que le groupe triméthyl ammonium ($-\text{N}^+(\text{CH}_3)_3$) ; les échangeurs faibles sont réalisés par des amines protonées ($-\text{N}^+ \text{HR}_2$), le plus couramment employé étant le groupement diéthyl-amino-éthyl (DEAE : $-\text{C}_2\text{H}_5-\text{N}^+ \text{H}(\text{C}_2\text{H}_5)_2$).
 - + charges négatives pour les échangeurs de cations (Figure VI-21.4). Les échangeurs forts utilisent la fonction sulfonate ($-\text{SO}_3^-$) et les échangeurs faibles la fonction carboxylate ($-\text{COO}^-$).

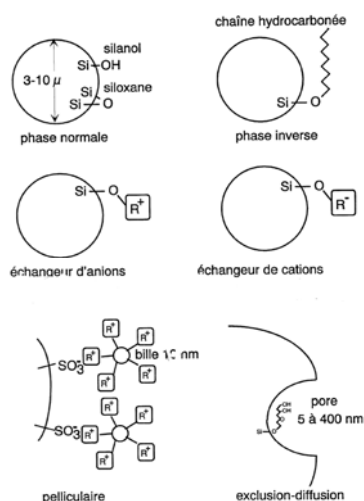


Figure VI-21 : Différents types de support en HPLC.

La capacité des échangeurs faibles est très dépendante du pH : des variations modérées de pH suffisent à éluer les molécules fixées. Au contraire, la capacité des échangeurs forts est indépendante du pH sur une large gamme de valeur : des modifications de force ionique sont nécessaires pour éluer les molécules.

Plus récemment, des supports "pelliculaires" ont été mis au point, qui augmentent encore la surface d'échange : la surface d'une bille de silice de quelques microns est greffée par des fonctions chargées sur lesquelles se lient des "nanosphères" de 100 nm, elles-mêmes greffées (Figure VI-21.5). Ce type de support doit être conservé à pH alcalin pour éviter que les nanosphères ne se détachent des billes.

La chromatographie de perméation ("GPC : gel permeation chromatography") équivalent de la chromatographie d'exclusion - diffusion. On utilise des microbilles poreuses dont les pores ont de 5 à 400 nm de diamètre selon la gamme de poids moléculaire à étudier :

- soit des gels de styrène - divinylbenzène
- soit des gels de silice poreux dont la surface a été désactivée pour limiter les interactions non spécifiques et rendue hydrophile par différents groupements (tels que le groupe isopropyl-glycérol ; figure VI-21.6) pour permettre l'utilisation de tampons aqueux. Le choix des colonnes à utiliser en fonction de ce que l'on désire séparer est actuellement bien codifié (voir tableau VI-22).

Figure VI-22 : Principes du choix d'un support en HPLC, selon les caractéristiques des molécules à séparer.

Certains fabricants proposent des enceintes thermostatées (four ou jaquette entourant la colonne). Une température constante améliore la reproductibilité des séparations; une température élevée réduit la viscosité de la phase mobile, augmente le transfert de masse entre les phases et la solubilité de l'échantillon, conduisant soit à une meilleure résolution soit à une durée d'analyse réduite.

3. L'injecteur

L'injecteur (Figure VI-23) est une tubulure de diamètre et de longueur variables (de 20 microlitres à 1 ml pour les systèmes analytiques). Avant l'injection, cette tubulure est isolée du flux continu de solvant. La calibration précise de cette boucle permet d'injecter des volumes très exacts: l'échantillon remplace le solvant dans la boucle et l'excès d'échantillon est éliminé. La remise de la tubulure dans la continuité du flux circulatoire déclenche automatiquement l'enregistrement. Des injecteurs automatiques pour les analyses de routine s'adaptent sur beaucoup d'appareils.

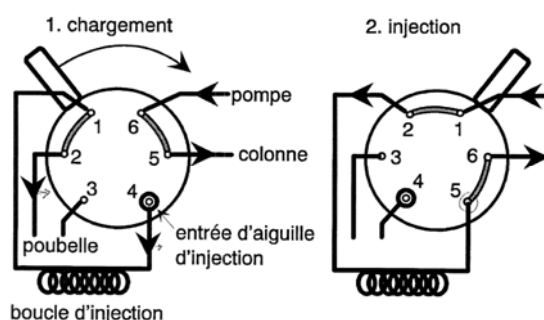


Figure VI-23 : Principe de l'injecteur en HPLC.

Le volume interne de la boucle d'injection définit avec précision le volume injecté (d'après document de la Société Waters).

4. Le détecteur

Il existe une grande diversité de détecteurs en fonction du but poursuivi, bien que les méthodes photométriques soient les plus couramment employées. Les principes décrits dans le chapitre III sont adaptables (et adaptés) en HPLC. D'autres techniques sont plus spécifiques. Certains fabricants proposent un système de régulation de contre-pression à la sortie du détecteur, pour améliorer la qualité de la ligne de base en empêchant la formation de bulles par dégazage, possible lorsque cette sortie est à pression atmosphérique. Le signal est visualisé le plus souvent en temps réel sur écran; l'impression papier intervient seulement dans un deuxième temps après validation ou retraitement des chromatogrammes.

Dans les méthodes isocratiques, le détecteur peut être couplé à un recycleur de solvant : le solvant pur, avant le premier pic et entre les pics, est réutilisé. C'est une technique intéressante pour des solvants coûteux ou polluants.

a. Méthodes photométriques

Tous les détecteurs possèdent une cuve à circulation. Les plus simples n'utilisent qu'une seule longueur d'onde. Les détecteurs à barrette de diodes facilitent l'identification des composés car un spectre de chaque pic est obtenu en quelques millisecondes. Les barrettes contiennent entre 70 et 512 diodes dont l'arrangement spatial conditionne la résolution (cf chapitre III). On peut ainsi générer des chromatogrammes à n'importe quelle longueur d'onde ou à plusieurs dimensions (Figure VI-24). Les sensibilités se rapprochent actuellement de celles des détecteurs monochromatiques classiques.

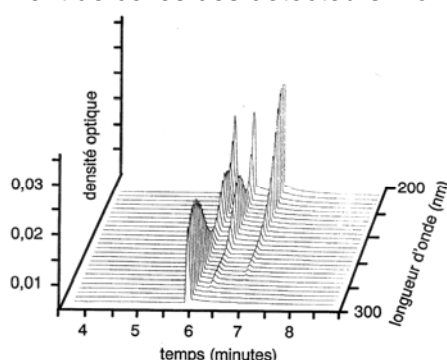


Figure VI-24 : Profil d'élué tridimensionnel en HPLC, obtenu grâce à un détecteur photométrique à barrette de diodes.

Une informatique adaptée est nécessaire pour gérer le grand nombre de données ainsi obtenues.

D'autres détecteurs photométriques sont possibles tels que ceux utilisant la fluorescence ou la réfractométrie par exemple. Un des plus récents est le détecteur à diffusion de lumière après

évaporation ou ELSD ("evaporative light scattering detector"). Le liquide en sortie de colonne est mélangé il de l'azote et nébulisé dans un tube chauffant où le solvant s'évapore. Les particules solides dues à la présence de composé diffusent la lumière d'une source laser. La lumière diffusée est détectée à 90° (Figure VI-25).

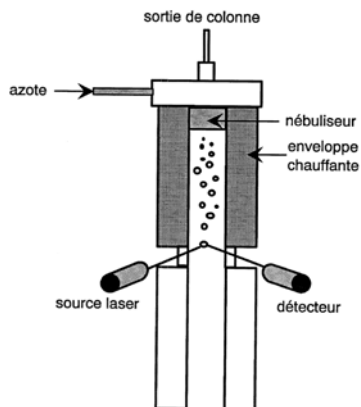


Figure VI-25 : Détecteur HPLC à diffusion de lumière après évaporation (ELSD).

b. Autres techniques

D'autres procédés de détection sont utilisés pour des applications plus spécifiques :

- détecteur de radioactivité pour le repérage de molécules marquées. Ils fonctionnent avec un scintillateur solide: une petite colonne remplie d'un scintillant solide tel que l'anthracène est traversée par le solvant ;

- avec un scintillateur liquide, ajouté au flux liquidien il la sortie de la colonne grâce il une pompe supplémentaire.

- détection ampérométrique pulsée ("PAD : pulse amperometric detection") : une électrode (Figure VI-26.1) est soumise à des impulsions de potentiel différentes plusieurs fois par seconde (Figure VI-26.2) :

- + potentiel E1 pour réduire ou oxyder les molécules à repérer. La valeur de ce potentiel, défini en fonction des molécules à analyser, de la nature des tampons et des conditions chromatographiques, assure la sélectivité de la détection. Le signal est mesuré à la fin de l'application de ce potentiel.

- + potentiel E2 pour détruire les composés obtenus lors de la réaction précédente;

- + potentiel E3 pour régénérer la surface de l'électrode.

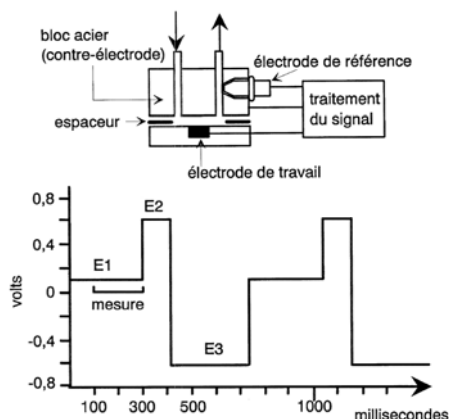


Figure VI-26 : Détection ampérométrique pulsée.

En haut schéma d'un système en acier. En bas : principe de la mesure à l'aide d'une électrode de travail en or dans l'analyse des sucres.

5. Précautions analytiques

La sensibilité de la méthode et la durée de vie des colonnes imposent des précautions.

a. Dégazage

Le dégazage des solvants est indispensable pour éviter la formation intempestive de bulles dans le système, gênantes au niveau de la colonne, mais aussi dans le système de détection. Plusieurs techniques sont employées :

- dégazage en dehors de l'appareil: en soumettant les solvants à un vide plus ou moins poussé ou à l'action des ultra-sons. Après mise en place dans le système, les solvants se rechargent progressivement en gaz atmosphériques.

- dégazage permanent du solvant : beaucoup d'appareils modernes proposent un dégazage permanent ou réglable des solvants pendant le fonctionnement de l'appareil, grâce à un flux d'hélium qui solubilise et entraîne les gaz dissous. Cette solution assure une qualité constante aux solvants quelle que soit la durée des analyses.

- dégazage en ligne : les solvants traversent une tubulure perméable aux gaz enfermée dans une petite chambre à vide. Une pompe à vide et un capteur assurent le maintien du vide dans la chambre.

Certains appareils proposent en outre des modules de contre-pression à la sortie du système, qui limitent également la formation des bulles.

b. Filtration

Les échantillons et les solvants ne doivent pas contenir d'impuretés solides susceptibles de colmater le système, augmentant la pression et obligeant à diminuer le débit. Le nettoyage des liquides est réalisé par filtration sur membrane, la porosité utilisée étant généralement de 022 ou 0,45 μm . Pour les échantillons de faible volume, des membranes sont montées sur des filtres à usage unique à faible volume mort et adaptables sur des seringues.

Malgré ces précautions, on ajoute toujours d'autres éléments sur le système analytique: un préfiltre (crépine à 2 microns) puis une précolonne très courte et remplie du même support que la colonne. Cette précolonne se comporte comme une tête de colonne, facile à changer.

IV. L'électrophorèse

A. Principe

a. La mobilité électrophorétique

Une particule de charge Ne placée dans un champ électrique E subit une force calculée selon la loi de Coulomb:

$$F = Ne \times E$$

La particule est mise en mouvement et atteint une vitesse limite v quand les forces de frottement sont égales à la force de Coulomb :

$$f \cdot v = -NeE$$

La mobilité électrophorétique de la particule va s'écrire :

$$\mu = v/E = -Ne/f$$

Pour des molécules simples, supposées sphériques, telles que les protéines globulaires du sérum, le coefficient de friction f a pour valeur:

$$f = 6 \pi \eta r$$

dans laquelle r est le rayon de la sphère $f-r$ η la viscosité du solvant.

En pratique, la molécule est entourée d'une atmosphère ionique et aqueuse qui modifie sa charge réelle et son rayon. Comme pour l'échange d'ions, le pH est très important: on doit se placer loin du pH isoélectrique où la migration de la molécule serait nulle. Ainsi, toutes les protéines du sérum migrent dans un champ électrique vers l'anode lorsqu'on se place à pH 8,6.

b. Les flux perturbateurs

Sur un support solide, d'autres phénomènes interviennent sur la mobilité réelle de la molécule (Figure VI-27) :

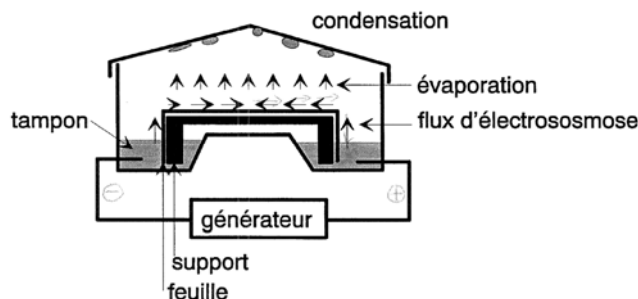


Figure VI-27 : Électrophorèse classique sur papier ou acétate de cellulose et flux perturbateurs.

- l'électro-osmose : lorsqu'on impose une différence de potentiel aux extrémités d'un segment de substance poreuse imbibée d'électrolytes, il s'établit un déplacement liquidien vers l'un des pôles, dû à la formation d'une couche de charges électriques, généralement négatives, à la surface des canaux de la surface poreuse. L'électrolyte possède alors un excès de charges positives et se dirige vers la cathode. Cet effet dépend du potentiel de la double couche qui se constitue ainsi à la surface des capillaires, qui dépend à son tour de la nature du matériau poreux utilisé, du champ électrique appliqué, de la force ionique de l'électrolyte et de sa viscosité. Ce phénomène peut être notablement diminué par quelques artifices, tels que l'utilisation d'une membrane semi-perméable pour envelopper les supports au niveau des électrodes, ou l'utilisation d'un flux hydrodynamique inverse et compensateur.

- l'électro-rhéophorèse est un flux liquidien résultant de l'évaporation du liquide induite par la chaleur dégagée. Un simple couvercle sur la cuve suffit à limiter le phénomène en électrophorèse à basse tension (230 V) utilisée en pratique clinique courante. En électrophorèse à haut voltage (supérieur à 1000 V) un système de refroidissement est nécessaire.

c. Les applications

Les applications des différents types d'électrophorèse sont innombrables, aussi bien en conditions préparatives, dans l'industrie ou au laboratoire de recherche, qu'en conditions analytiques. En biochimie médicale courante, les applications concernent essentiellement les protéines, sériques et urinaires, ou provenant d'autres liquides biologiques. La migration des protéines dépend de leur taille (rayon) et de leur point isoélectrique (valeur de pH pour lequel elles possèdent autant de charges positives que de charges négatives). La révélation des protéines séparées fait appel à de nombreuses techniques :

- les plus courantes utilisent des colorants spécifiques (rouge ponceau, noir amide, bleu de Coomassie,...) qui permettent une quantification des fractions séparées; des colorants plus sensibles sont utilisés dans le domaine de la recherche essentiellement (nitrate d'argent, or...); certaines protéines sont révélées par la mise en évidence de leur propriété biologique, notamment enzymatique;

- la révélation par des techniques immunologiques est à la base de procédés sensibles et spécifiques décrits dans le paragraphe V.

Les acides nucléiques sont séparables également par électrophorèse. Les développements des techniques de biologie moléculaire (cf chapitre VII) ont conduit à la mise au point d'appareils spécifiques.

B. Les supports

1. La veine liquide et le papier

L'électrophorèse en veine liquide a été la première décrite par Tiselius pour la séparation des protéines du sérum. Elle n'est plus utilisée, mais est encore considérée comme une référence pour la mesure de la mobilité électrophorétique vraie, étant donnée l'absence de flux hydrodynamiques perturbateurs et l'absence d'interférences avec un support.

Le papier a représenté le premier support solide utilisé, mais il est actuellement dépassé par des matériaux plus résolutifs et plus pratiques. Il a permis néanmoins des avancées intéressantes (par exemple la classification de Frederickson des dyslipoprotéinémies).

2. L'acétate de cellulose

C'est le support habituel pour la séparation des protéines sériques en routine. Une petite quantité de sérum est déposée à la surface de la feuille d'acétate de cellulose sous forme d'une fine ligne, grâce à un applicateur spécial: le sérum est retenu par sa tension superficielle entre deux fils métalliques. Après migration (30 mn à 230 V) et coloration des protéines, ce support présente l'avantage de pouvoir être rendu transparent ("transparisé") lors du séchage, ce qui facilite considérablement la lecture densitométrique des résultats. La figure VI-28 illustre ces résultats pour les protéines sériques: cinq classes de protéines sont nettement séparées et peuvent être quantifiées.

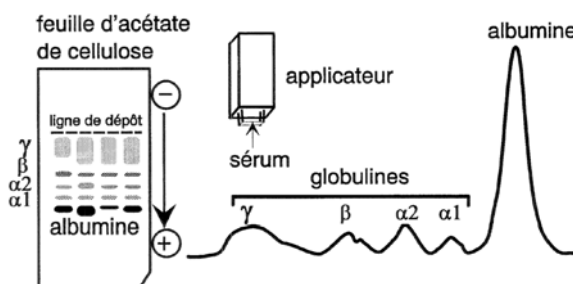


Figure VI-28 : Électrophorèse sur acétate de cellulose.

A gauche: aspect de l'électrophorégramme (protéinogramme) après migration dans la cuve de la figure VI-27 et coloration. A droite : lecture densitométrique d'une piste.

3. Le gel de polyacrylamide

L'électrophorèse en gel de polyacrylamide ("PAGE: polyacrylamide gel electrophoresis") utilise un gel réticulé obtenu par la copolymérisation d'acrylamide et de N-N'-méthylène bis-acrylamide par réaction radicalaire à la lumière en présence d'un catalyseur tel que le persulfate d'ammonium ou la riboflavine (Figure VI-29.haut). La taille des mailles du gel est définie statistiquement par la proportion relative des deux constituants et le pourcentage d'acrylamide (figure VI-29.bas). Les gels courants pour la séparation des protéines comportent de 7 à 12 % d'acrylamide ; il est possible de réaliser des gradients de concentration d'acrylamide, continus (par exemple de 4 à 30 %) ou discontinus. Moyennant quelques précautions car "acrylamide est neurotoxique, les gels sont faciles à préparer au laboratoire.

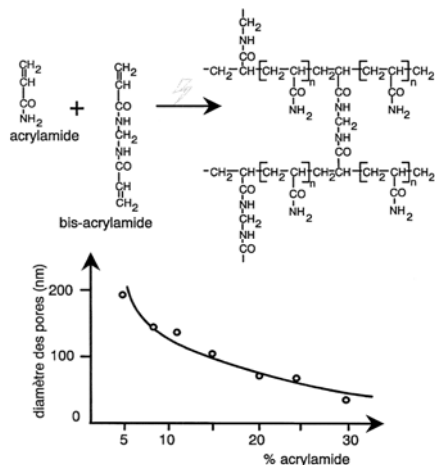


Figure VI-29 : Le gel d'acrylamide.

En haut : polymérisation radicalaire à la lumière d'un mélange d'acrylamide et de N,N'-méthylène bisacrylamide. En bas : influence de la concentration en acrylamide sur le diamètre moyen des pores du réseau.

Plusieurs techniques sont utilisées (Figure VI-30) :

- gel coulé en tube de verre de 5 à 10 cm de long sur 0,5-0,8 mm de diamètre ("disk electrophoresis" ; figure VI-30.2) ; il faut un tube par échantillon.
- gel coulé entre deux plaques de verre ("slab gel electrophoresis" ; figure V6-30.3) permettant une comparaison plus facile entre échantillons, car les conditions électrophorétiques sont strictement identiques pour tous les échantillons. La taille des plaques est variable: généralement de 8 à 15 cm en largeur sur 8 à 20 cm de hauteur. Les gels utilisés pour le séquençage des acides nucléiques sont beaucoup plus longs (jusqu'à 30 à 40 cm) que ceux utilisés pour la séparation des protéines. L'épaisseur des gels est réglée par des espaceurs appropriés: les gels les plus couramment employés ont entre 0,75 et 2,5 mm d'épaisseur. Les puits de dépôt sont réalisés à l'aide d'un "peigne" en plastique inséré entre les deux plaques de verre lors de la polymérisation. Des plaques de gel prêtes à l'emploi sont commercialisées.

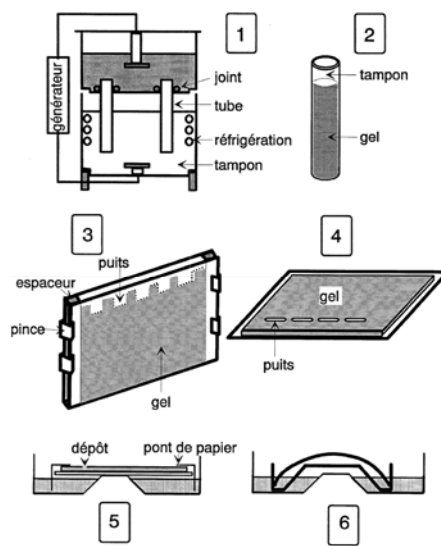


Figure VI-30 : Électrophorèse en gel d'acrylamide.

1. Cuve pour électrophorèse verticale des gels en tubes (2) ou en plaques (3). 4. Gel horizontal sur film plastique. 5. Connexions électriques pour un gel horizontal à l'aide de ponts en papier filtre. Connexions électriques pour gel horizontal par cintrage sur un support spécial.

- gel coulé sur un film plastique (Figure VI-30A) : l'échantillon est appliqué soit dans des puits de dépôt creusés dans le gel soit à la surface du gel ; il est alors nécessaire de laisser diffuser dans le gel avant d'appliquer le champ électrique.

Dans les deux premiers types de gels, la migration est verticale et nécessite une cuve spéciale (figure VI-30.1). Pour les gels coulés sur film plastique, les cuves utilisées pour l'acétate de cellulose conviennent bien : le contact avec les tampons est réalisé soit par l'utilisation de petits ponts de papier filtre (Figure VI-30.5) soit par cintrage du film dans un support spécial (Figure VI-30.6).

Le volume des dépôts est limité, de 1 à 20 μ l en général. la quantité de protéines déposée dépend de l'épaisseur du gel, inférieure en général à 100 μ g par puits pour une bonne résolution.

Dans un gel réticulé de polyacrylamide, les molécules sont séparées en fonction de leur taille (donc approximativement selon leur masse moléculaire) et de leur charge. En fait, deux modalités sont appliquées :

- Électrophorèse en conditions non dénaturantes : dans un gel à porosité constante, les deux paramètres de taille et de charge interviennent sur la migration des protéines. Dans un gel à gradient d'acrylamide, seule la taille intervient : les protéines sont bloquées en fonction de leur taille au niveau où les pores du gel sont trop étroits pour permettre leur passage. Pour les lipoprotéines (Figure VI-31), on utilise un gel à deux couches de concentration différente en acrylamide (gradient discontinu) : la première couche, peu concentrée, présente des mailles larges, qui n'arrêtent que les grosses molécules (chylomicrons) ; la deuxième couche, plus concentrée en acrylamide, arrête les molécules un peu moins grosses (VLDL : "very low density lipoproteins" ou lipoprotéines de très basse densité) et laisse passer les petites molécules qui seront alors séparées selon leur taille et leur charge en LDL ("low density lipoproteins" : lipoprotéines de basse densité) et HDL ("high density lipoproteins" : lipoprotéines de haute densité). Ainsi on obtient de manière très nette la séparation des lipoprotéines en 4 classes dont la signification diagnostique et pronostique est très différente. La séparation est aussi bonne que celle obtenue par la technique de référence qu'est l'ultracentrifugation, avec certains avantages : la possibilité de traiter de nombreux échantillons, un important gain de temps et un investissement en matériel bien moindre.

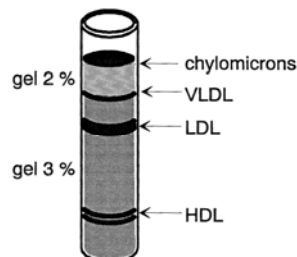


Figure VI-31 : Électrophorèse des lipoprotéines sériques pré colorées sur un gradient discontinu d'acrylamide.

- Électrophorèse en conditions dénaturantes : les protéines sont dénaturées à chaud dans une solution comportant des agents réducteurs (tels que le β -mercapto-éthanol) qui rompent les ponts disulfures et un détergent, le dodécyl-sulfate de sodium ou SDS ("sodium dodecyl sulfate"). Ce détergent ionique se lie à la surface des protéines, leur conférant à toutes pratiquement la même charge négative. La migration des protéines ainsi traitées dans un gel d'acrylamide dépend alors pratiquement uniquement de leur poids moléculaire. Cette méthode (appelée couramment SDS-PAGE) est simple, rapide et précise et a pratiquement remplacé la plupart des méthodes physiques (ultracentrifugation analytique, diffusion de la lumière...) dans l'estimation du poids moléculaire apparent d'une protéine. Comme en chromatographie d'exclusion - diffusion, la distance de migration de la protéine est proportionnelle au logarithme de la masse moléculaire. Récemment, le bromure de cétyl-triammonium (CTAB) a été proposé en remplacement du SDS, car permettant une relative récupération de l'activité biologique après électrophorèse, ce qui est généralement impossible avec le SDS.

4. Autres gels

Le gel d'amidon et le gel d'agarose sont obtenus par chauffage puis refroidissement d'amidon ou d'agarose, qui sont des polymères glucidiques. Il n'y a pas d'effet de tamis moléculaire aussi net qu'en acrylamide, mais la grande taille des pores de ces gels permet des révélations enzymatiques. Par rapport au papier ou à l'acétate de cellulose, l'épaisseur du gel permet un dépôt plus important.

C. Mise en oeuvre

La mise en oeuvre de l'électrophorèse est simple en biochimie clinique courante et ne nécessite qu'un matériel peu onéreux :

- un générateur de courant continu, permettant d'obtenir une ddp de 100 à 400 volts. Pour les gels d'acrylamide, les intensités utilisées sont de l'ordre de 5 à 10 mA/gel. Les générateurs sont réglés pour maintenir un des paramètres constants : le voltage, l'ampérage ou la puissance.

- une cuve à électrophorèse :

- + soit horizontale pour l'acétate de cellulose (Figure VI-27) ou les gels d'acrylamide en couche mince sur films plastiques (Figure VI-30.5.6) ;

- + soit verticale pour les gels d'acrylamide en tubes ou en plaques (Figure VI-30.1). Les migrations en gel d'acrylamide étant plus longues (jusqu'à plusieurs heures), un système de refroidissement est nécessaire : il est réalisé de manière simple grâce, par exemple, à une tubulure dans laquelle circule un fluide refroidi par un cryostat.

- différentes cuves pour les opérations de coloration et décoloration.

Des automates réalisant toutes les phases de la technique sur acétate de cellulose sont actuellement commercialisés.

D. L'électrofocalisation

Il s'agit d'une électrophorèse réalisée dans un gradient de pH. Les composés migrent en fonction de leur point isoélectrique et s'arrêtent dans la zone de pH correspondant à leur point isoélectrique. Le gradient de pH est réalisé au cours de l'électrophorèse même par un mélange d'un grand nombre d'acides aminés particuliers de points isoélectriques différents (ampholytes). Selon la composition de ce mélange, on va obtenir des gammes de pH plus ou moins étendues et donc une résolution plus ou moins bonne.

Ce procédé peut être mis en oeuvre de deux façons :

- soit en milieu liquide, dans une colonne (Figure VI-32.1) ; le gradient de pH est stabilisé par un gradient de saccharose. Une version récente propose un appareil dont la cuve est divisée en compartiments par des membranes semi-perméables (Figure VI-32.2). La vidange parallèle de chaque compartiment permet d'éviter les remélages lors de la récupération des fractions. L'avantage du milieu liquide est la récupération des fractions permettant une mesure ultérieure de l'activité biologique.

- soit en milieu solide, sur un gel (agarose ou acrylamide). La firme LKB a proposé des ampholytes spéciaux qui peuvent être greffés sur le gel à la fin de la formation du gradient qui est ainsi stabilisé (immobilines). Les quantités de protéines pouvant être analysées sont plus faibles qu'en veine liquide, mais la résolution est plus fine et on a une visualisation des protéines après coloration.

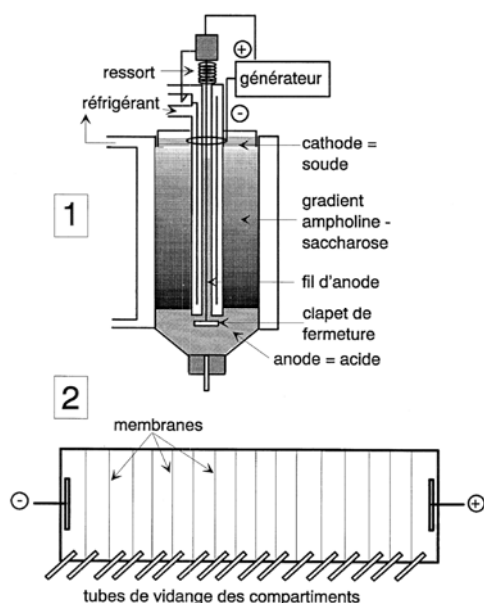


Figure VI-32 : Systèmes d'électrofocalisation en veine liquide.

1. Système vertical. 2. Système horizontal compartimenté.

Le mécanisme de migration des protéines ou des ampholytes lors de la réalisation du gradient de pH est le suivant :

- si le pH de la zone dans laquelle se trouve la protéine ou l'ampholyte est supérieur à son pH_i , la charge globale est négative et la protéine ou l'ampholyte migre vers l'anode jusqu'à ce qu'elle rencontre le pH correspondant à son pH_i . Elle est alors immobilisée dans cette zone.

- le phénomène analogue a lieu en sens inverse pour une protéine ou un ampholyte qui se trouve dans une zone de pH inférieur à son pH_i . En exerçant un effet tampon supérieur à celui des protéines (puisque en outre leur concentration est plus grande) les ampholytes créent le gradient de pH.

L'anode est constituée par un acide et la cathode par une base. Les voltages utilisés sont plus importants qu'en électrophorèse classique, de l'ordre de 1000 à 2000 volts et un système de réfrigération est nécessaire. La fin de la focalisation (équilibre) est facilement repérée par la stabilisation de l'intensité: forte au début, celle-ci diminue progressivement, au fur et à mesure que les molécules atteignent leur zone de point isoélectrique, puis se stabilise.

Cette méthode est surtout utilisée en recherche pour sa très grande résolution dans la biochimie des protéines. En effet, contrairement à beaucoup d'autres méthodes où il existe une diffusion des protéines, favorisée par l'effet joule, il y a dans cette méthode une concentration des protéines. Un des risques est la précipitation des protéines qui sont très concentrées en bandes étroites et qui, en outre, sont généralement moins solubles à leur point isoélectrique. Des applications sont cependant réalisables en clinique, notamment dans le domaine de la séparation d'isoformes de protéines (phénotypage des apolipoprotéines E par exemple).

E. Électrophorèse bidimensionnelle

L'électrophorèse bidimensionnelle (Figure VI-33) consiste à faire deux migrations électrophorétiques dans deux directions perpendiculaires. Pour obtenir un maximum de résolution, toutes les combinaisons sont possibles: acrylamide - agarose, focalisation et électrophorèse simple, etc... En pratique, on réalise une focalisation dans la première dimension, dans un tout petit "boudin" qui économise les ampholytes coûteux et un gel d'acrylamide - SDS dans la deuxième dimension. Le problème est plus dans l'interprétation que dans l'aspect purement technique ! En effet, le transfert du petit boudin souple sur le gel de deuxième dimension peut modifier sa longueur de manière difficile à contrôler: la reproductibilité de l'emplacement des taches n'est pas satisfaisante. Une firme a proposé un système où cette longueur est stabilisée par l'incorporation d'un fil dans ce petit boudin.

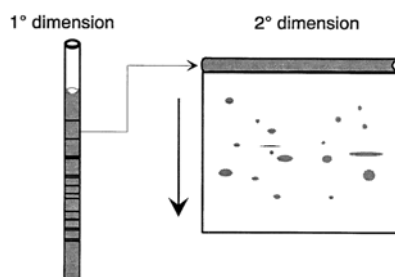


Figure VI-33 : Principe de l'électrophorèse bidimensionnelle.

Electrofocalisation dans un gel de faible diamètre (1) qui est transféré sur le gel d'acrylamide pour une électrophorèse en conditions dénaturantes (2) dans une direction perpendiculaire à celle de la focalisation.

Le très grand nombre d'informations et la finesse de l'analyse limitent l'utilisation pratique de cette technique. Mais, l'analyse automatique d'image permet de rendre utilisable cette méthode en analyse clinique de routine. Des systèmes automatisés d'analyse d'image ont été conçus. Cependant, la qualité de l'interprétation automatique dépend de la rigueur technique et notamment de la reproductibilité de l'emplacement des tâches. La maîtrise de ces éléments constitue maintenant la base de la protéomique, étude du protéome (ensemble des protéines d'une cellule, d'un tissu ou d'un organisme).

Les possibilités de transfert sur nitrocellulose suivi de révélation immunologique (cf paragraphe V.8), réalisables dans de nombreux laboratoires, ont cependant facilité la diffusion de la méthode pour des applications spécifiques (étude d'anomalies protéiques, par exemple des immunoglobulines).

E. L'électrophorèse capillaire

Les gels d'acrylamide ou autre, décrits dans les paragraphes précédents ont constitué un important moyen de stabiliser le milieu d'électrophorèse et de diminuer l'élargissement des bandes séparées. L'avènement de microcapillaires (de 10 à 100 μm de diamètre interne) permet actuellement des séparations aussi efficaces en un temps très court et un coût unitaire très bas. L'utilisation de ces capillaires augmente le rapport surface / volume facilitant l'évacuation de la chaleur générée par l'électrophorèse et limitant la diffusion par effet joule.

Dans l'électrophorèse capillaire de zone (Figure VI-34), les groupements silanols du capillaire se déprotonisent, donnant une surface négative. Les cations du tampon migrent vers cette surface: la surface du liquide devient chargée positivement et migre vers la cathode. Les solutés neutres migrent à la vitesse de ce front d'électro-osmose; les solutés chargés positivement migrent plus vite ou moins vite selon leur charge; les solutés chargés négativement sont inversement plus ou moins freinés.

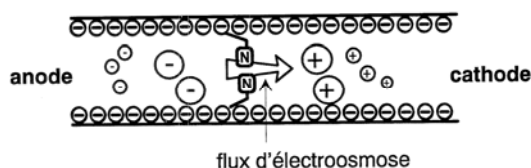


Figure VI-34 : Principe de l'électrophorèse capillaire de zone : utilisation du flux d'électro-osmose.

La résolution dépend du voltage, du coefficient de diffusion, des mobilités électrophorétiques et du flux électro-osmotique.

Un capillaire de 50 μm x 50 cm a un volume interne de 982 nllitres : le volume déposé doit être de quelques nanolitres. Le chargement de ce petit volume fait appel :

- à l'électromigration (figure VI-35.1) elle est imparfaite, car dépendante de la charge et de la mobilité des solutés à séparer ;
- à l'hydrodynamique :

- + en appliquant une pression sur le compartiment échantillon à l'entrée du capillaire (Figure VI-35.2) ;
- + en appliquant une dépression sur le compartiment de sortie (Figure VI-35.3) ;
- + par siphonnage (Figure VI-35.4) : l'extrémité d'entrée du capillaire trempe dans l'échantillon, à une hauteur supérieure à l'extrémité de sortie; à viscosité égale, le contrôle de cette hauteur et du temps de trempage commande de manière reproductible le volume chargé.

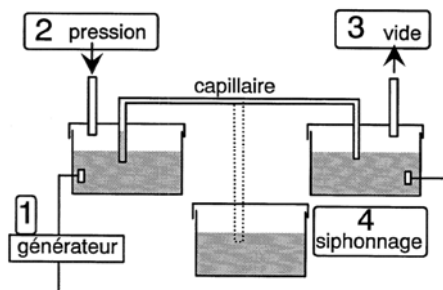


Figure VI-35 : Procédés d'introduction de l'échantillon en électrophorèse capillaire. 1. Procédé électro-cinétique. 2,3,4 : Procédés hydrodynamiques.

Compte tenu des quantités injectées, la détection doit être très sensible. Elle fait appel à des techniques classiques (absorption, fluorescence), dont la sensibilité et la précision peuvent être augmentées :

- au niveau des substances, par la dérivation (pré ou post-capillaire) ;
- au niveau des sources (utilisation de lasers).

Les limites actuellement atteintes se situent dans la zone 10^{-18} - 10^{-21} moles.

Des raffinements ont déjà été décrits, utilisant des surfactants ou détergents (chromatographie capillaire électrocinétique micellaire), des capillaires remplis de gels ("capillary gel electrophoresis") ou d'ampholytes ("capillary isoelectrofocusing").

La petite taille des quantités utilisées et la rapidité des séparations (quelques minutes au maximum) permettent la réalisation de très nombreux essais facilitant l'optimisation du procédé pour une application donnée. Avec l'apparition commerciale explosive d'appareils intégrés à un coût raisonnable, cette technique est en train de devenir un standard en microanalyse. Son utilisation est encore limitée en biochimie clinique: analyse des acides aminés du sérum par exemple.

F. L'électrophorèse en champ pulsé

Cette technique a été développée pour résoudre les problèmes de séparation de gros fragments d'ADN en biologie moléculaire et commence à être appliquée aux protéines. Dans les gels classiques, cette séparation est impossible : des gels à maille suffisamment large pour permettre le criblage de ces fragments n'ont aucune tenue mécanique et ne sont pas manipulables.

Le principe de l'électrophorèse en champ pulsé est de changer périodiquement la direction et le sens du champ électrique, ce qui réoriente les gros fragments linéaires d'ADN et leur permet de franchir des mailles relativement étroites (Figure VI-36). Cette réorientation est d'autant plus facile que le fragment est plus petit. Les fragments seront donc bien séparés en fonction de leur taille.

On trouve des appareils avec des champs orthogonaux ou hexagonaux (Figure VI-37). Le pilotage par microprocesseur permet une grande souplesse de programmation, qui est à optimiser dans chaque cas particulier, en fonction des tailles des fragments à séparer.

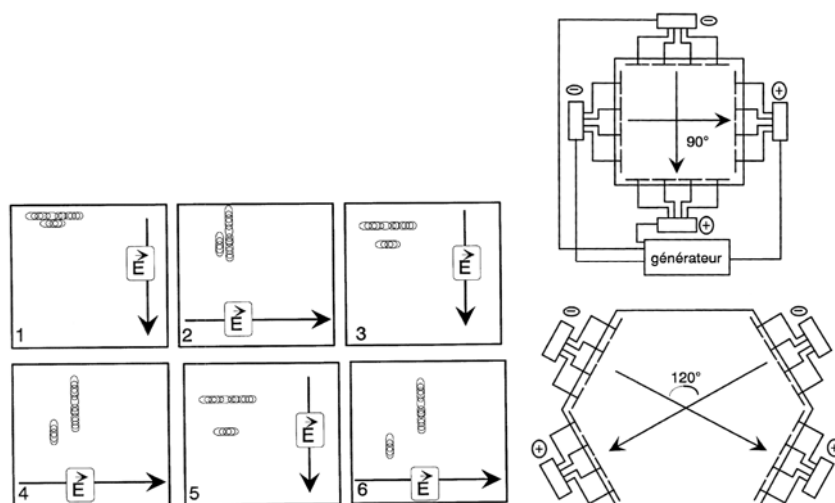


Figure VI-36 (à gauche) : Principe de l'électrophorèse en champ pulsé.

1 à 6 : succession de changements de direction du champ électrique et réorientation des molécules.

Figure VI-37 (à droite) : Systèmes d'électrophorèse en champ pulsé à champ orthogonal (en haut) et hexagonal (en bas).

Les électrodes de chaque champ sont portées à des potentiels croissants pour assurer une meilleure homogénéité du champ électrique.

V. Électrophorèse et affinité

Ces méthodes, à la différence des méthodes immunologiques de dosage précédemment étudiées dans le deuxième chapitre, sont des méthodes qualitatives et non quantitatives.

A. Les méthodes directes sur gel

1. Immunoélectrophorèse

L'immunoélectrophorèse est réalisée en gel d'agarose sur une lame de microscope (Figure VI-38) coulé au laboratoire ou sur gel commercial coulé sur un film plastique et prêt à l'emploi, permettant l'analyse- simultanée de plusieurs échantillons. L'immunoélectrophorèse associe deux étapes successives :

- l'électrophorèse dans un premier temps: les protéines sont séparées par électrophorèse à partir d'un petit puits de dépôt creusé dans un gel tel que l'agarose. Ainsi, chaque protéine est répartie sur une ellipse plus ou moins allongée.

- l'immunodiffusion dans un deuxième temps. Dans une gouttière creusée parallèlement à la direction de la première étape, un anti-sérum est déposé, qui diffuse perpendiculairement à la gouttière. Les protéines séparées diffusent également à partir de la tache obtenue après l'électrophorèse. Au point d'équivalence, il apparaît ainsi un arc de précipitation. la visualisation est facilitée si nécessaire après coloration des protéines. C'est une méthode analytique très employée car elle est très résolutive: elle permet l'identification d'au moins trente protéines sériques grâce à un antisérum de mouton antiprotéines humaines totales. Elle permet la détection d'anomalies qualitatives ou quantitatives importantes, mais ne permet pas de chiffrer une augmentation ou une diminution de concentration. L'interprétation exige cependant une grande habitude et est facilitée par la comparaison des profils obtenus chez les patients avec des échantillons de référence traités en parallèle. L'anomalie détectée peut être précisée par la même méthode à l'aide d'une batterie d'anticorps monospécifiques. La complexité de lecture à l'aide d'anti-sérums totaux l'a peut-être fait trop rapidement abandonnée au profit de l'immunofixation pour la caractérisation des anomalies des immunoglobulines. Avec des anti-sérums moins complexes (pentavalents, contre les cinq classes

d'immunoglobulines), elle serait cependant plus sensible que l'immunofixation pour les anomalies mineures.

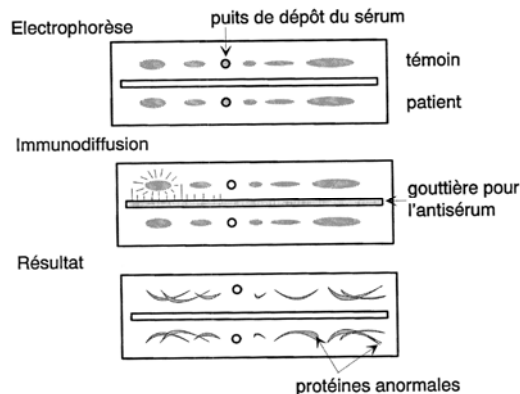


Figure VI-38 : Principe de l'immuno-électrophorèse.

2. L'immunofixation

Six dépôts d'un même sérum sont effectués sur une plaque de gel. Après migration, on applique un cache plastique permettant de révéler chaque piste par un antisérum spécifique des chaînes lourdes et des chaînes légères. Après coloration, l'identification de l'immunoglobuline anormale, repérée par électrophorèse sur acétate de cellulose, est immédiate (Figure VI-39).

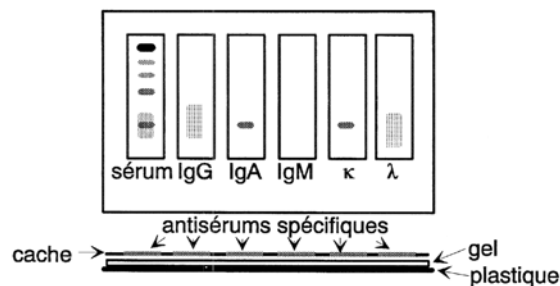


Figure VI-39 : Principe de l'immuno-fixation.

En haut: réalisation de l'immunorévélation après l'électrophorèse. En bas, résultat: l'immunoglobuline anormale détectée parmi les protéines totales (à gauche) est une IgA à chaîne légère kappa.

3. l'immunoélectrophorèse bidimensionnelle

La première dimension électrophorétique est réalisée comme pour l'immunoélectrophorèse simple. La deuxième dimension se fait (comme dans la technique de Laurell) dans une autre partie du gel contenant un antisérum humain total ou un antisérum spécifique. La surface des pics est proportionnelle à la quantité de protéines, mais est difficile à mesurer (Figure VI-40).

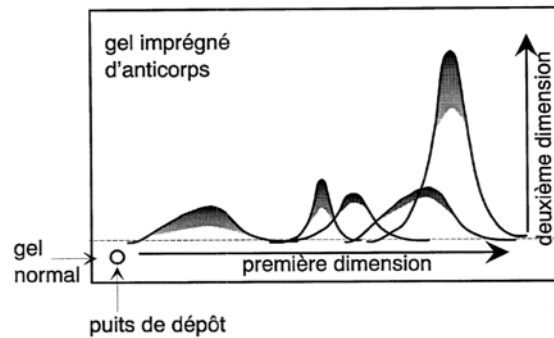


Figure VI-40 : Principe de l'immuno-électrophorèse bidimensionnelle.

B. Les méthodes indirectes après transfert sur membrane

Dérivées des méthodes de transfert sur membrane mises au point primitivement pour l'ADN par Southern ("Southern blot") et appliquées également à l'ARN ("northern blot"), les techniques de transfert sur membranes appliquées aux protéines portent le nom générique de Western blot. L'intérêt de ce transfert des protéines après leur séparation par électrophorèse en gel de polyacrylamide est de permettre différents types de révélation par incubation de la membrane. La membrane est plus facile à manipuler qu'un gel.

1. Le transfert sur membrane

Le transfert est réalisé par électrophorèse dans un sens perpendiculaire à la surface du gel, selon deux modalités :

- transfert en milieu liquide (Figure VI-41.1) ; contrairement à "étape d'électrophorèse, les voltages utilisés sont faibles, mais les intensités fortes (de 1 à 2 A) ;
- transfert *se mi-sec* : les seuls liquides sont ceux qui imbibent le gel, la membrane et les feuilles de papier filtre (Figure VI-41.2).

Dans les deux systèmes, plusieurs gels peuvent être transférés en même temps, puisque les protéines sont bloquées sur la membrane.

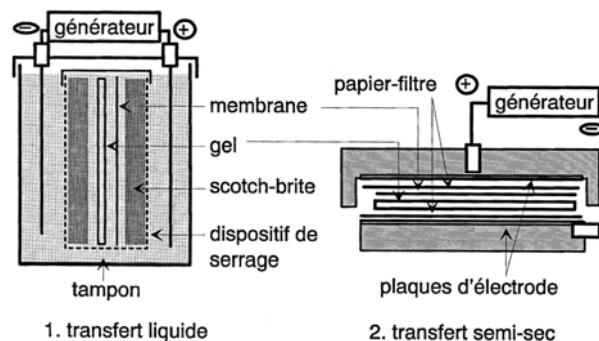


Figure VI-41 : Les procédés de transfert des protéines sur membrane.

2. Les procédés de détection

Les protéines sont colorées, soit au rouge ponceau, peu sensible mais réversible et permettant de s'assurer de la qualité du transfert, soit à l'or colloïdal, très sensible et irréversible (quelques microgrammes de protéines en mélange).

a. L'immunodétection ou Western-blot

Le rapide développement du syndrome d'immunodéficience acquise (SIDA) a induit le développement commercial de cette technique, déjà largement utilisée dans les laboratoires de

recherche. Elle représente la technique de confirmation des résultats globaux obtenus avec les méthodes ELISA. Le test de confirmation de l'encéphalopathie spongiforme bovine (ESB) fait également appel à cette technique.

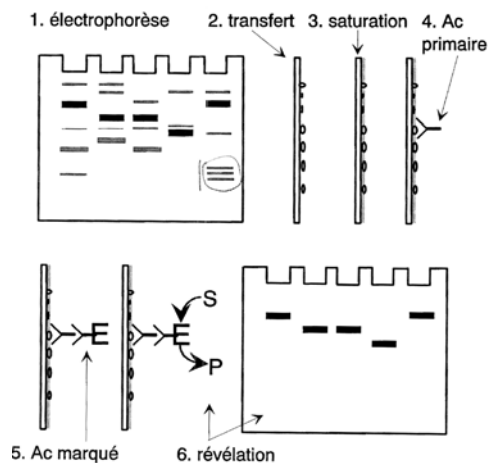


Figure VI-42 : Principe de l'immunodétection sur membrane (Western-blot).

Avant la réalisation des étapes de détection, les sites de la membrane non occupés par des protéines sont saturés à l'aide d'autres protéines (Figure VI-42), de façon à ce que les protéines spécifiques utilisées pour la détection ne s'adsorbent pas, ce qui créerait un bruit de fond trop important. On utilise soit des solutions d'albumine, soit beaucoup plus simplement et plus économiquement du lait écrémé en poudre. Après rinçage, la révélation spécifique est réalisée :

- dans un premier temps, la feuille de nitrocellulose est incubée en présence de l'anticorps (ici le sérum du malade)
- dans un deuxième temps, l'anticorps primaire fixé est révélé par un deuxième anticorps, anticorps anti-immunoglobulines humaines, marqué par une enzyme, selon les divers procédés décrits au deuxième chapitre. Il apparaît des bandes colorées là où se trouvent les antigènes si le sérum contient les anticorps correspondants.

On a ainsi une analyse précise en une seule expérience de la composition en anticorps du sérum du malade contre le groupe de protéines séparées.

b. L'étude des structures glucidiques des protéines

De très nombreuses protéines sont modifiées de manières post-traductionnelle par la fixation de chaîne glycaniques. La présence de ces chaînes peut être mise en évidence sur membrane. Les sucres sont spécifiquement coupés par l'acide periodique, libérant des fonctions aldéhyde pouvant fixer une molécule de digoxigénine. On révèle ensuite par un anticorps anti-digoxigénine couplé à un enzyme.

L'utilisation de lectines marquées par une enzyme et spécifique d'un ose permet d'étudier spécifiquement la composition de ces glycanes (affinodétection). Ces techniques sont également très employées (avec les variantes technologiques adaptées!) pour les détections in situ des glycoprotéines en microscopie optique ou électronique.

V. L'analyse des résultats

Les techniques anciennes, peu instrumentales, sont relativement limitées dans le traitement des résultats. En chromatographie traditionnelle sur colonne, la lecture de la densité optique de chaque tube est réalisée manuellement. En chromatographie sur papier ou couche mince, il est possible de récupérer les taches après coloration et d'évaluer leur densité optique. Pour l'analyse des données chromatographiques ou électrophorétiques, les signaux fournis par les détecteurs et les densitomètres sont enregistrés et peuvent être exploités manuellement. Ces méthodes anciennes présentent de très nombreuses limitations et sont totalement dépassées par les développements informatiques.

A. Densitomètres intégrateurs

Les densitomètres permettent la lecture de la densité optique des bandes et fonctionnent selon le principe du spectrophotomètre (Figure VI-43) : source lumineuse, filtre de sélection de la longueur d'onde en fonction de la coloration utilisée, photomultiplicateur, enregistreur et calculateur, imprimante. Certains appareils peuvent fonctionner en transmission pour les supports transparents, mais aussi en réflexion par mesure spéculaire sur les supports opaques. L'augmentation de la résolution des séparations a nécessité la conception d'appareils plus performants que ceux classiquement utilisés en biochimie clinique. C'est ainsi que le laser est de plus en plus utilisé: il permet d'avoir un faisceau très fin, très intense, et de ne pas perdre lors de l'enregistrement l'information obtenue lors de l'électrophorèse.

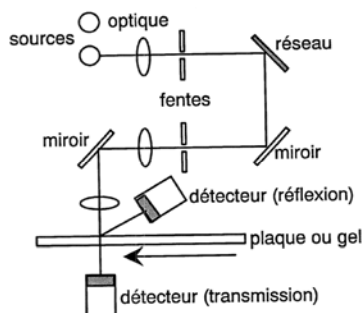


Figure VI-43 : Principe du densitomètre pour lecture des chromatogrammes ou électrophorégrammes en transmission ou en réflexion.

Les scanners de micro-ordinateurs peuvent être maintenant transformés en intégrateurs à l'aide de logiciels appropriés. La qualité du résultat dépend de la résolution spatiale du numériseur et de sa sensibilité aux différents niveaux de gris ou de couleur.

B. La gestion informatique et le traitement des courbes

La transformation du signal analogique en signaux digitaux stockables et gérables de manière de plus en plus performante grâce à l'informatique s'est très rapidement imposée. La qualité de la conversion dépend de la résolution, par le nombre de bits affectés à chaque valeur, et de la fréquence d'acquisition des données. Les capacités de stockage et les vitesses de traitement de plus en plus grandes permettent des fréquences très grandes d'acquisition.

Les performances des programmes incluent de manière constante (Figure VI-45) :

- la définition de la ligne de base, valeur mesurée dès la mise en route de la chromatographie, avant tout pic. La ligne de base est reconnue par l'absence de fluctuation du signal au-delà de limites préétablies par rapport à cette valeur initiale ;

- la reconnaissance des pics : plusieurs points mesurés au-delà des limites précédentes peuvent marquer le début d'un pic. Un pic sera réellement détecté si la succession des valeurs dépasse une valeur seuil pour la hauteur ("threshold") et pour la largeur du pic à mi-hauteur. La détermination du sommet du pic, par reconnaissance de la valeur maximale, permet de fixer le temps de rétention du pic;

- calcul des surfaces des pics; application des procédures éventuelles de calibration interne ou externe ;

- retraitement des courbes :

- + le déplacement des points "topographiques" définissant la ligne de base, le début ou la fin d'un pic permet la prise en compte d'un pic "oublié" par l'intégration automatique, la séparation de pics anormalement fusionnés ou la fusion de pics réunis à tort lors de l'intégration automatique;

- + la modification du mode de calcul de la surface permet une quantification plus précise, par exemple calcul tangentiel comme pour le dernier pic à droite du tracé de la figure VI-44.

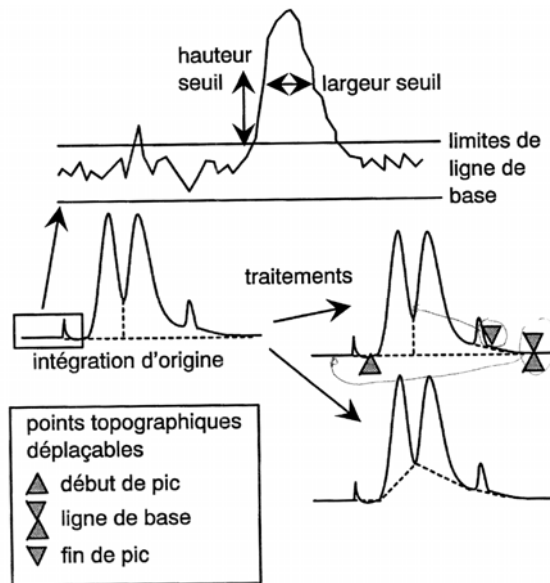


Figure VI-44 : Traitement des courbes par les intégrateurs automatiques. Exemple de retraitements possibles des courbes d'origine.

Chapitre VII

Les techniques de Biologie Moléculaire

Le terme de biologie moléculaire a été introduit dans les années 60 par J. Monod pour désigner les études biochimiques portant sur les acides nucléiques constitutifs du message génétique. Bien que ce terme soit assez impropre, puisque toute la biologie moderne s'occupe en définitive de molécules, il est largement consacré par l'usage. La biologie moléculaire s'intéresse aux acides nucléiques et donc aux gènes. La puissance diagnostique de cet outil est potentiellement énorme : repérage et étude fine de gènes ou de mutations de gènes spécifiques d'une maladie, d'une tumeur, d'un agent pathogène, étude de l'expression des gènes, sans parler des perspectives de thérapies géniques pour de nombreuses maladies. Le marché des sondes d'ADN a représenté en 1991 un marché mondial de 60 millions de dollars, en croissance de 35 % par an, avec une évaluation autour de 220 millions de dollars pour 1995. Au salon international du laboratoire à Munich en 1992, sur 1000 exposants, plus de 50 % proposaient des produits reliés aux biotechnologies et aux techniques des gènes. Les tendances n'ont fait que se confirmer et s'amplifier depuis ces dates.

Cependant, la biologie moléculaire ne remplace pas la biochimie traditionnelle qui a fait l'objet des premières parties de ce cours. En effet, son champ d'application est essentiellement le domaine étiologique, celui de la cause : une fois le diagnostic causal établi, le domaine du suivi des symptômes revient à la biochimie classique. Par exemple, la biologie moléculaire pourra bientôt faire le diagnostic génétique de certains diabètes; mais l'équilibration correcte de ces diabètes aura toujours besoin des dosages réguliers de la glycémie. Paradoxalement donc, c'est plus dans le domaine de la cancérologie, de la bactériologie, de la virologie, que dans le domaine de la biochimie, que la biologie moléculaire trouve ses applications quotidiennes les plus fréquentes, et pour les deux derniers exemples se développent aussi dans le domaine sanitaire et alimentaire (aliments et eaux). Mais, fille de la biochimie classique, la biologie moléculaire trouve sa place dans un cours de techniques d'analyses biochimiques. Ce chapitre ne veut être qu'une introduction synthétique, permettant de définir les principes fondamentaux et les principaux outils utilisés avec leurs implications diagnostiques prévisibles et la place du GBM en ce domaine. Car les principes sont relativement simples, même si l'application pratique apparaît sophistiquée, méticuleuse... et encore coûteuse.

Au-delà des kits de la première époque, où la formation GBM n'était sans doute pas la plus performante, l'explosion de techniques nouvelles impose le développement d'appareillages spécifiques très sophistiqués pour lesquels la formation GBM peut s'avérer intéressante. On n'évoquera pas le développement de la bioinformatique, devenue indispensable avec l'accroissement considérable des informations fournies par ces techniques (telles que les puces à ADN).

1 – Les données biologiques de base

Quelques notions structurales et métaboliques simples sont nécessaires (et suffisantes) pour comprendre l'essentiel.

1. Les acides nucléiques

Les acides nucléiques sont le support de l'information génétique et tirent leur nom de leur localisation essentiellement nucléaire (noyau de la cellule). On distingue deux grands groupes :

- les ADN (ou DNA en anglais) : acides désoxyribonucléiques
- les ARN (ou RNA en anglais) : acides ribonucléiques

a. Les nucléotides

Les acides nucléiques sont des polymères d'unités de base appelées nucléotides. Un nucléotide comporte trois molécules constitutives (figure VII-1) :

- une base cyclique, dite purique (dérivée de la purine : Adénine A, guanine G), pyrimidique (dérivée de la pyrimidine : thymine T, cytosine C; dans les ARN, la thymine est remplacée par l'uracile U). Les bases absorbent fortement dans l'Ultraviolet, avec un pic caractéristique autour de 260 nm. La mesure de l'absorption des acides nucléiques est ainsi très utilisée :

+ pour quantifier les acides nucléiques : une $DO=1$ correspond environ à une concentration de 1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$;

+ pour vérifier la pureté des acides nucléiques lorsqu'on les a extraits des tissus : les protéines ont, elles, un pic maximal d'absorption à 280 nm. Un rapport de $DO\ 260/280$ supérieur à 2,2 signe un acide nucléique pur.

+ pour mesurer la température de fusion d'un acide nucléique double brin (voir ci-dessous).

- un sucre (pentose) : le ribose pour les ARN et le 2'-désoxyribose pour les ADN (une fonction $-\text{OH}$ remplacée par un H sur le carbone 2 : les atomes de carbone du sucre sont numérotés avec l'exposant « prime » pour les différencier de la numérotation des atomes de la base). La molécule base - ose porte le nom de nucléoside.

- une, 2 ou 3 molécules d'acide phosphorique estérifiant la fonction alcool 5' du sucre, donnant les nucléosides monophosphate, diphosphate et triphosphate respectivement. On a par exemple pour les nucléotides à adénine : AMP, ADP, ATP (Figure VII-1), dAMP, dADP, dATP.

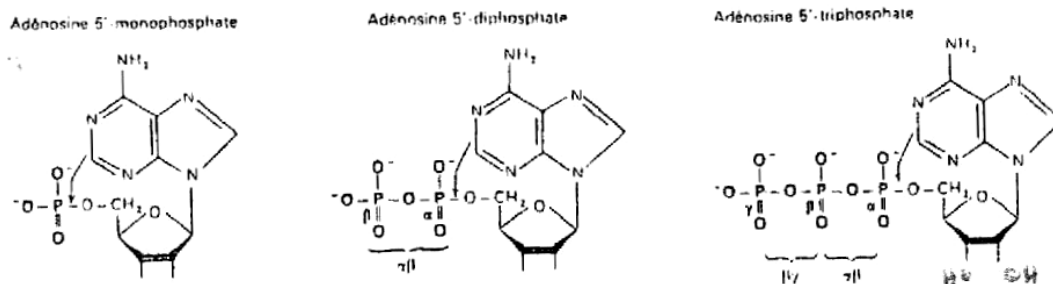


Figure VII-1 : Nucléotide mono, di et triphosphate (base = adénine, A).

b. Les acides nucléiques

La polymérisation des nucléotides résulte de la formation d'une liaison phosphodiester entre un groupement phosphorique porté par le carbone 5' du sucre d'un nucléotide triphosphate et la fonction 3' du sucre de l'autre nucléotide (Figure VII-2). La réalisation de la liaison élimine 2 phosphates, seul le premier reste. En utilisant un nucléotide marqué au P32 sur ce phosphate, on obtient des acides nucléiques radioactifs faciles à repérer.

Du fait de ce mode de synthèse, les chaînes d'acides nucléiques ont un sens, représenté par convention de gauche à droite :

extrémité 5' -phosphate libre $\rightarrow\rightarrow$ extrémité 3' OH libre

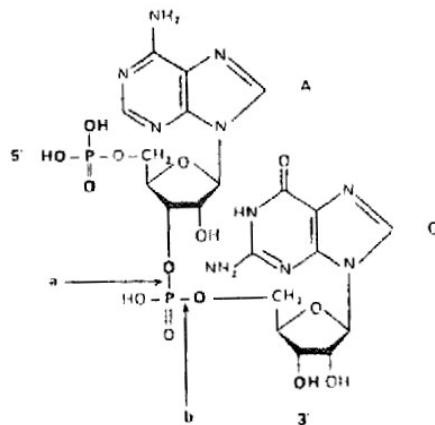


Figure VII-2 : La liaison phosphodiester entre deux nucléotides. Extrémité 5' libre (en haut à gauche) et 3' libre (en bas à droite).

c. Les appariements entre bases

Les bases sont capables de créer entre elles des liaisons hydrogène (liaison H : interaction électrostatique faible entre molécules ayant un moment dipolaire du fait de la présence d'atomes électronégatifs tels que l'oxygène ou l'azote), donnant naissance à des paires de bases (base pair ou bp, unité de mesure de la biologie moléculaire) (figure VII-3). Ces appariements sont rigoureusement spécifiques :

A = T ou A = U : 2 liaisons Hydrogène entre les deux bases
 G ≡ C : 3 liaisons Hydrogène entre les deux bases

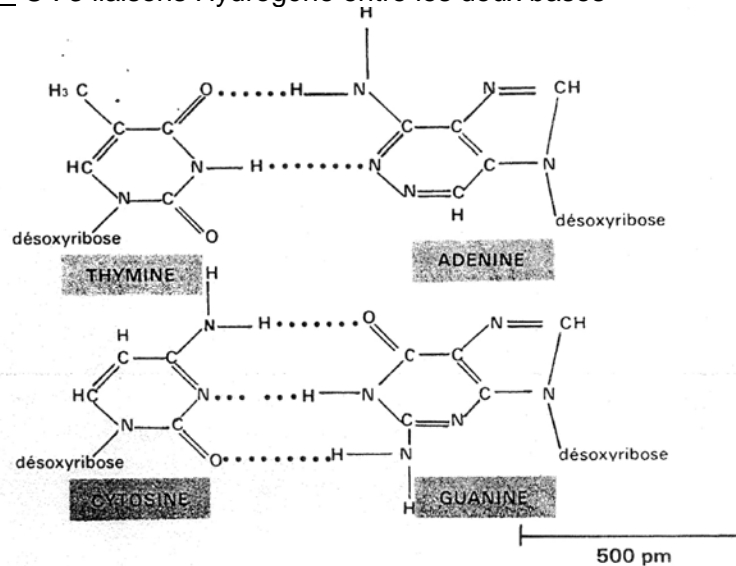


Figure VII-3 : L'appariement spécifique entre les bases

L'appariement GC est donc plus solide que l'appariement AT ou AU.

On appelle séquence complémentaire une séquence capable de s'apparier par de telles liaisons H à une autre séquence :

Séquence	5'AGCTGCCT3'
Séquence complémentaire	3'TCGACGGA5' si ADN
Séquence complémentaire	3'UCGACGGA5' si ARN

Deux brins complémentaires s'apparient pour former une structure en double hélice de caractéristiques précises, décrite par Watson et Crick (Figure VII-4). Ces brins sont alors antiparallèles (Figure VII-5) :

brin 5' → 3'
brin complémentaire 3' → 5'

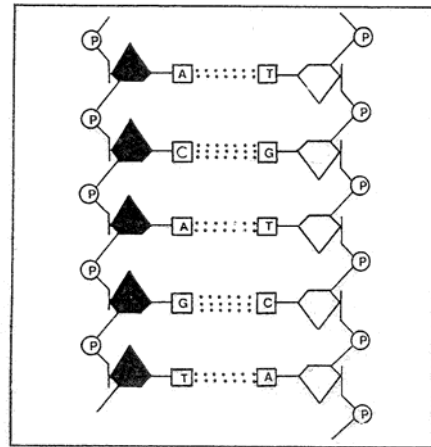
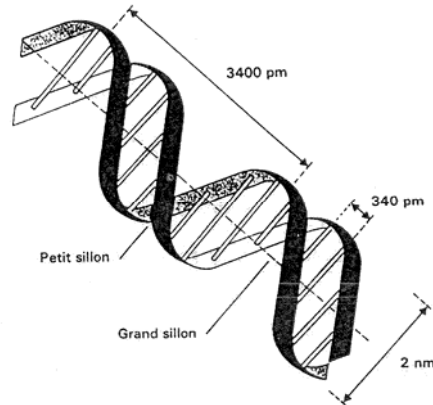


Figure VII-4 (à gauche) : Les caractéristiques de la double hélice d'ADN

Figure VII-5 (à droite) : Les brins antiparallèles et les appariements entre bases.

Le brin 5'-3' est souvent le brin sens (codant pour une protéine) ; il est le seul écrit, les appariements permettant de retrouver sans problème l'autre brin (ou brin antisens).

Un brin d'ARN peut s'associer à un brin d'ADN s'il lui est complémentaire : c'est le phénomène d'hybridation. Ce terme a en fait été étendu à toute liaison entre deux séquences complémentaires : cette liaison est d'autant plus forte que la complémentarité est meilleure. La technique qui découle de cette propriété est une des techniques fondamentales de la biologie moléculaire: elle permet le repérage de gènes ou de séquences spécifiques au milieu de milliers d'autres grâce à l'utilisation de sondes et sera décrite ultérieurement.

A une certaine température, appelée température de fusion, les chaînes complémentaires se dissocient. En dessous de cette température, l'association est extrêmement forte: pour environ 300 bp, la constante de dissociation est de l'ordre de 10^{-23} (une seule molécule dissociée sur 10^{23} molécules), que l'on peut comparer aux constantes de dissociation Ag-Ac ou Enzyme-Substrat, qui sont du domaine 10^{-3} à 10^{-9} . La température de fusion dépend du pourcentage d'appariements GC dans une chaîne double brin et est caractéristique de cette chaîne.

2. Les processus biologiques fondamentaux

Les processus biologiques fondamentaux comportent trois étapes que l'on sait parfaitement reproduire *in vitro* dans des systèmes purifiés et permettent l'expression des gènes sous formes de protéines ayant diverses activités biologiques. Ils sont décrits ici de façon très schématique, simplement parce que leur reproduction en tube à essai dans des systèmes simplifiés est à la base des techniques de biologie moléculaire.

En effet, la très longue chaîne d'ADN subit de nombreux enroulements, en association avec des protéines, pour pouvoir tenir dans le petit volume d'un noyau cellulaire. Ces enroulements sont à la base de la structure des chromosomes, visibles, eux, en microscopie optique (Figure VII-6). Pour que les processus biologiques puissent avoir lieu, il faut évidemment des systèmes complexes capables de défaire localement ces structures complexes.

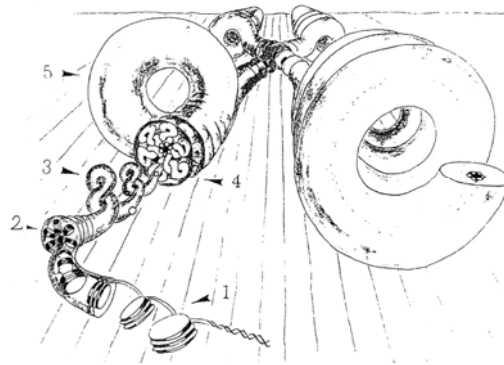


Figure VII-6 : De la double hélice (en bas) au chromosome, enroulements et superenroulements.

a. La réplication

La réplication est la copie d'un ADN sous forme d'un ADN, grâce à une ADN-polymérase ADN-dépendante ; elle se produit lorsqu'une cellule se divise en deux cellules filles. C'est un processus complexe maintenant bien connu, faisant intervenir de nombreuses protéines et enzymes (figure VII-7). La réplication est dite semi-conservative : en effet, les 2 brins sont copiés simultanément par le même système enzymatique de sorte que la molécule fille comporte un brin d'origine et un brin complémentaire nouveau. La synthèse nécessite la mise en place d'une amorce (*primer*) d'ARN qui est ensuite coupée par la ribonucléase H.

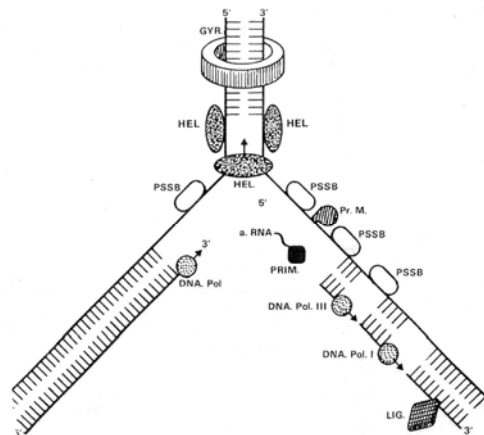
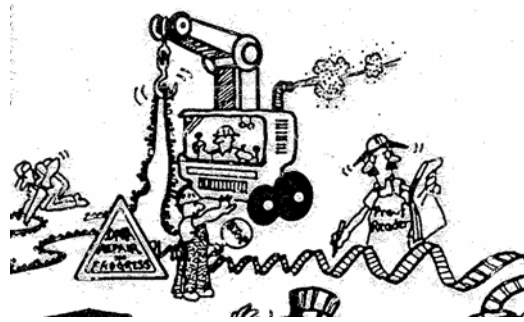


Figure VII-7 : La réplication de l'ADN. Mécanisme de copie différent pour chacun des brins, du fait de leur sens opposé.

La réplication est un mécanisme de haute fidélité, les erreurs éventuelles d'appariements étant facilement détectées (un appariement purine – purine ou pyrimidine pyrimidine conduit à une double hélice de largeur plus grande ou plus petite que les appariements normaux qui sont toujours de type purine – pyrimidine). Elles sont réparées par des systèmes spécialisés complexes. Malgré tout, la probabilité d'erreur est non nulle : elle est estimée de l'ordre de 10^{-10} . De ce fait, des mutations spontanées sont toujours possibles, notamment dans les cellules qui se divisent très souvent.

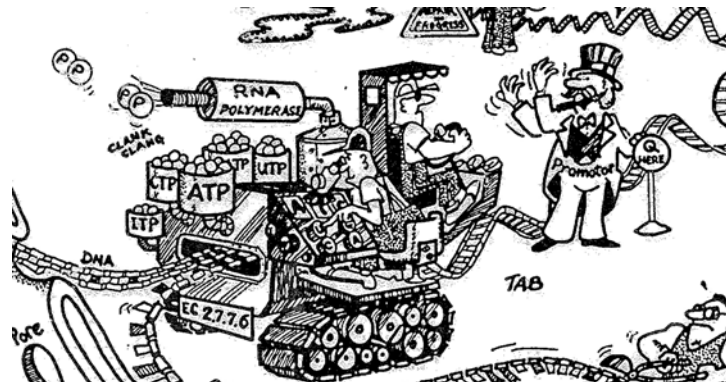


Légende du panneau routier : « DNA repair in progress ».

Sur le T-shirt de l'ouvrier « proof reader ».

b. La transcription

C'est la copie d'un ADN sous forme d'un ARN messenger ou ARNm, grâce à une ARN-polymérase ADN-dépendante. Elle nécessite la présence en amont du gène d'une séquence particulière appelée promoteur. Ce promoteur contient des séquences de reconnaissance où se fixe la machinerie enzymatique de transcription, ainsi que des séquences particulières appelées éléments de réponse spécifiques qui, sous l'action de molécules issues de signaux biologiques extérieurs, vont déclencher le mécanisme de transcription. L'ARN obtenu est appelé transcrit primaire.



Vision humoristique de la synthèse de l'ARN par l'ARN polymérase

Avant d'être exporté hors du noyau, où se déroule la synthèse des protéines, il subit un processus de maturation complexe :

- des séquences non codantes pour des protéines incluses dans les gènes sont éliminées : ce sont les introns (comme intrus). Ce processus de maturation appelé excision - épissage ("splicing") (figure VII-8) rétablit la continuité des séquences codantes ou exons (qui seront traduites en protéines) et donc du gène. Selon les tissus, des introns différents peuvent être sélectionnés, aboutissant à la synthèse de protéines différentes bien que issues d'un même gène.

- des modifications sont également apportées à la tête (chapeau) et à la queue de l'ARNm (séquence polyA) : cette séquence comportant de nombreuses adénines permet de purifier très facilement les ARNm d'un mélange par chromatographie d'affinité sur une petite colonne d'un gel sur lequel on a fixé la séquence complémentaire poly- T.

L'ARN mature est alors ARN messenger ou ARNm, qui sera traduit en une protéine.

c. La traduction ("translation")

C'est la transformation du message génétique porté par l'ARNm en un enchaînement d'acides aminés caractéristique de la protéine. Du fait qu'il y a seulement 4 bases, mais 20 acides aminés présents dans les protéines, une seule base ou une succession de 2 bases sont insuffisantes pour coder les 20 acides

aminés. Chaque acide aminé est ainsi codé dans ce message par une succession de trois bases caractéristiques (triplet ou codon, 64 sont possibles avec 3 bases), un même acide aminé pouvant être codé par plusieurs codons. Les correspondances codons - acides aminés constituent le code génétique universel (Figure VII-10). Trois des 64 codons sont interprétés par le système enzymatique de traduction comme des codons stop, mettant fin à la traduction et permettant de libérer la protéine.

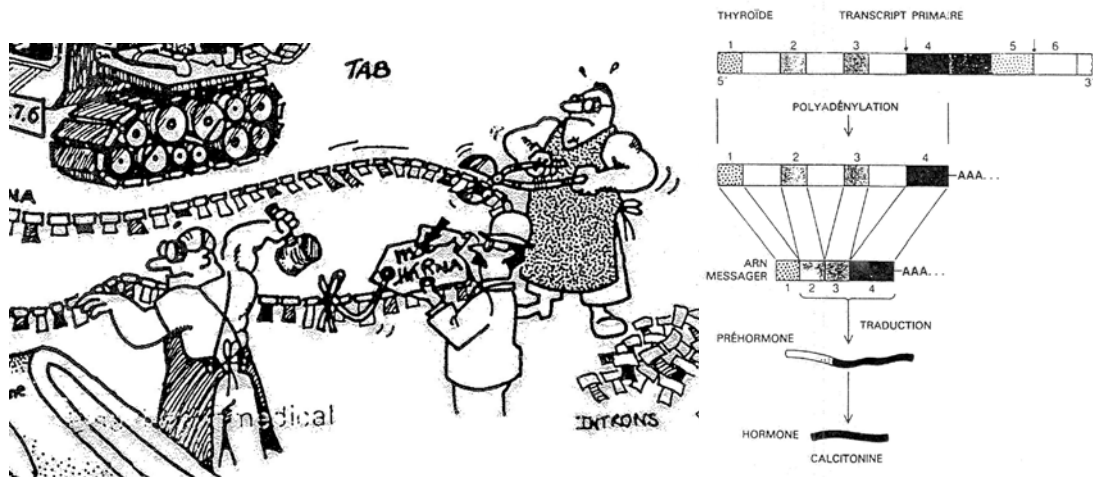


Figure VII-8 : Deux visions de la maturation de l'ARN messenger

La traduction (Figure VII-9) est un processus complexe qui a lieu sur des structures ribonucléoprotéiques appelées ribosomes. Les acides aminés sont correctement positionnés parce qu'ils sont transportés par un ARN particulier spécifique de chacun d'eux qui lit l'ARNm, appelé ARN de transfert ou ARNt, porteur d'un anticodon spécifique reconnaissant le codon correspondant à l'acide aminé. De nombreux facteurs protéïques interviennent.

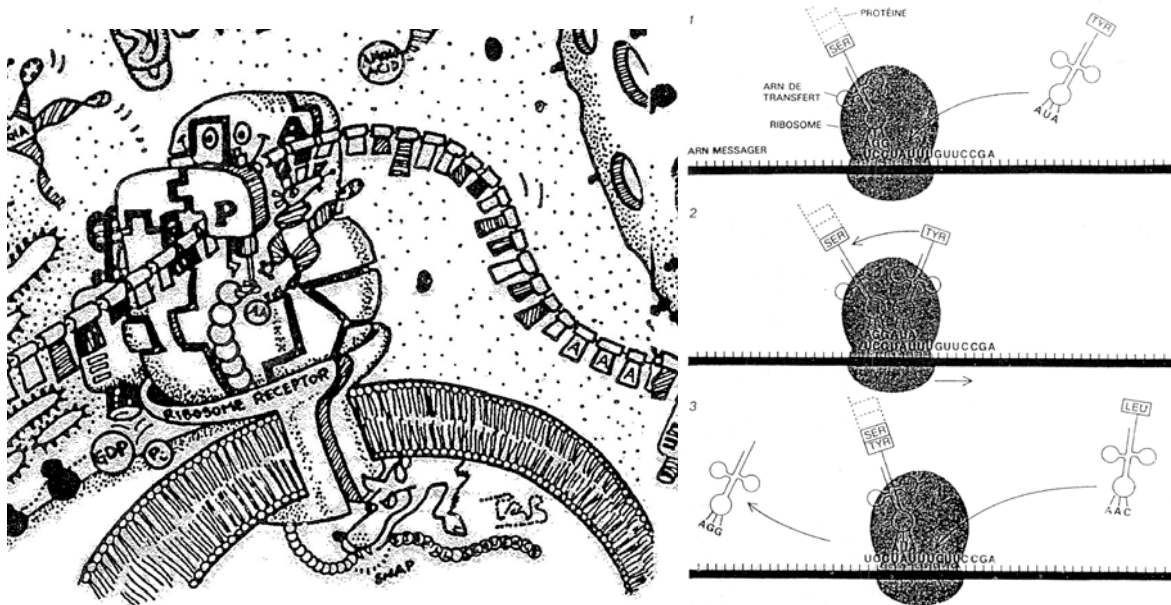


Figure VII-9 : Deux visions de la traduction : lecture de l'ARN messenger sur le complexe des ribosomes et fixation des acides aminés apportés par les ARN de transfert, en suivant le code génétique.

L'activité des acides nucléiques (ou information génétique) est donc portée par la séquence des bases. Dans les protéïnes au contraire, l'activité est portée par la conformation tridimensionnelle de la

protéine, dépendant évidemment de l'enchaînement des acides aminés, mais dont la stabilité est beaucoup plus faible et sensible à de nombreux agents extérieurs. Les manipulations des acides nucléiques sont donc beaucoup plus « faciles » que celles des protéines, car le risque de perte d'activité est moindre.

premier nucléotide	deuxième nucléotide				troisième nucléotide
	U	C	A	G	
U	PHE	SER	TYR	CYS	U
	PHE	SER	TYR	CYS	C
	LEU	SER	Ocre	Ombre	A
	LEU	SER	Ambre	TRP	G
C	LEU	PRO	HIS	ARG	U
	LEU	PRO	HIS	ARG	C
	LEU	PRO	GLN	ARG	A
	LEU	PRO	GLN	ARG	G
A	ILE	THR	ASN	SER	U
	ILE	THR	ASN	SER	C
	ILE	THR	LYS	ARG	A
	MET	THR	LYS	ARG	G
G	VAL	ALA	ASP	GLY	U
	VAL	ALA	ASP	GLY	C
	VAL	ALA	GLU	GLY	A
	VAL	ALA	GLU	GLY	G

Figure VII-10 : Le code génétique porté par l'ARN messager.

Grille de lecture : le codon AUG code pour l'acide aminé MET (méthionine). Ocre, ambre et ombre sont des codons stop, arrêtant la traduction.

d. Les variations du message génétique

Le génome

L'ADN humain constitue le génome de l'homme, qui contient environ 3 milliards de bp (4 millions seulement pour *E. coli*). Dans cet enchaînement gigantesque de seulement quatre bases, on trouve trois catégories de séquences : les séquences hautement répétées et les séquences moyennement répétées, de fonctions pratiquement inconnues, à côté de séquences peu ou pas répétées constituant les parties codantes, les gènes proprement dits, présentant un "cadre ouvert de lecture" (*open reading frame*), lu lors de la traduction de ce gène en protéine. On connaît les signaux (séquences) de début et de fin (codons stop) de gènes, de même que les signaux de début et de fin d'introns. Le séquençage complet du génome humain a révélé que l'homme possède moins de gènes que ce qui était attendu (environ 30.000, alors qu'on pensait autour de 100.000), ce qui ne le différencie pas d'autres espèces : l'originalité de l'homme tient davantage à l'organisation, au fonctionnement et à la régulation de ces gènes qu'à leur nombre absolu.

Les variations normales

Les gènes des organismes supérieurs eucaryotes (leurs cellules ont un noyau, comme celles de l'homme) sont découpés: il existe des parties codantes (exons) séparées par des parties non codantes (introns). Ces exons et introns se retrouvent dans l'ARNm natif. Tous ces types de séquence diffèrent légèrement d'un individu à un autre, lui conférant un caractère unique, d'autant plus que l'ensemble de ses gènes est en deux exemplaires : un exemplaire fourni par le père et un exemplaire fourni par la mère. La reproduction sexuée permet ainsi une diversité génétique plus grande que la reproduction non sexuée. Ces petites différences caractérisent le polymorphisme. Lorsqu'elles portent sur des gènes, on parlera d'allèles (un allèle maternel et un allèle paternel).

La plupart de ces variations alléliques n'ont pas de conséquences à court et moyen terme ; certaines en ont à long terme : on connaît la susceptibilité plus grande à certaines maladies que confère la présence de certains allèles, alors même que la fonction de la protéine est apparemment normale.

Les variations pathologiques

Certaines des variations du message génétique sont plus rares et correspondent à des mutations, soit transmises (maladies génétiques héréditaires) soit acquises sous l'effet d'agressions physiques (rayons X, radioactivité, rayons UV) ou chimiques (produits cancérigènes par exemple) ou résultant d'erreurs

non réparées lors de la réplication. Dans ce dernier cas, elles sont à l'origine de maladies acquises comme les cancers. On distingue plusieurs types de mutations :

- le remplacement d'une base par une autre : sans conséquence si elle ne change pas le sens de la traduction (l'acide aminé reste le même), elle peut avoir des conséquences très diverses, mais souvent pathologiques, lorsqu'elle conduit soit à l'apparition d'un codon stop (protéine tronquée inactive) soit au remplacement d'un acide aminé par un autre (protéine moins active). Les bases des gènes étant numérotées depuis le début du gène, l'indication sera de type AR508G : la base 508, normalement une Adénine, est remplacée par une Guanine.

- la délétion, représentée par la lettre grecque majuscule delta (Δ suivi du numéro de la base délétée) consiste en la suppression d'une ou plusieurs bases. La suppression d'une ou deux bases entraîne un décalage du cadre de lecture : tous les acides aminés qui suivent sont anormaux. La délétion de 3 bases ou d'un multiple de 3 bases entraîne simplement la suppression des acides aminés correspondant dans la protéine.

- l'insertion (représentée par la lettre I) consiste en l'ajout d'une ou plusieurs bases. Selon le nombre de bases insérées, les conséquences sont les mêmes que pour la délétion.

La mutation peut ne se produire que sur un allèle (patient dit hétérozygote : les allèles d'origine paternelle et maternelle sont différents). Elle peut être soit totalement compensée par le fonctionnement normal de l'autre allèle (porteur sain, pouvant cependant transmettre la maladie à sa descendance, maladie dite récessive), soit non totalement compensée et la maladie s'exprime sous une forme plus ou moins atténuée (maladie dite dominante). La mutation peut se produire sur les deux allèles, de façon identique (homozygote vrai) ou différente (double hétérozygote). La maladie s'exprime alors lorsque la mutation est récessive, ou s'exprime sous une forme intense lorsque la maladie est dominante.

Les interactions entre les gènes

Tous les processus biologiques conduisant à l'expression d'un gène nécessitant l'intervention de nombreuses protéines, dont chacune est le produit d'un gène, l'altération d'un gène peut conduire à des résultats extrêmement variés selon le rôle de ce gène. On est ainsi conduit à distinguer plusieurs types de maladies :

- les maladies monogéniques, résultant de l'altération d'un seul gène : elles sont très nombreuses, mais chacune est relativement rare, même si leur fréquence est très variable : de quelques cas décrits dans le monde à 1 cas pour 500 naissances pour l'hypercholestérolémie familiale (une des maladies génétiques les plus fréquentes) ou 1 cas pour 2000 naissances pour la mucoviscidose (en France 700 à 800 000 naissances par an). On connaît plusieurs milliers de ces maladies, chacune pouvant correspondre à plusieurs dizaines ou centaines de mutations différentes). C'est pour ce type de maladies monogéniques que les espoirs de la thérapie génique sont importants et commence à se concrétiser.

- les maladies polygéniques, résultant d'anomalies plus mineures sur plusieurs gènes, dont l'association conduit à la maladie ;

- les maladies apparaissant sur un terrain génétique particulier prédisposant à l'expression de la maladie.

Dans les deux derniers cas, l'expression de la maladie n'est généralement pas obligatoire et dépend fréquemment de l'exposition à des facteurs environnementaux particuliers (physiques, chimiques, viraux, bactériens, parasitaires, alimentaires,...). Dans ces deux derniers cas aussi, la biologie moléculaire est surtout utilisée pour le diagnostic ou la prédiction, les possibilités thérapies géniques paraissant hors de portée actuellement. Une meilleure connaissance des mécanismes moléculaires permet cependant de mettre au point de façon plus précise des médicaments appropriés.

3. Les outils de la biologie moléculaire : les enzymes

Les succès de la biologie moléculaire ont été rendus possibles par la mise au point d'outils performants, permettant de reproduire in vitro et gouverner à volonté et avec précision les processus biologiques.

1. Les polymérases

Les polymérases sont les enzymes de synthèse réalisant la liaison phosphodiester entre deux nucléosides-triphosphates, avec élimination de pyrophosphate. En utilisant un nucléotide marqué au phosphore 32 sur le premier groupe phosphate (phosphate alpha), on obtient un acide nucléique radioactif. Elles synthétisent un brin d'acide nucléique qui est la copie de l'original ou matrice (qui peut être simple ou double brin). Selon la nature des nucléotides utilisés et de la matrice, on distingue deux grandes classes.

a. Les ADN-polymérases

Les ADN-polymérases synthétisent de l'ADN à partir des désoxynucléotides. Selon la nature de la matrice, on sépare :

- les ADN-polymérases ADN-dépendantes : elles répliquent l'ADN en ADN. Elles sont de plusieurs types. Par exemple, l'ADN-polymérase I d'*Escherichia coli* possède également une activité de vérification et de coupure (exonucléase), permettant la réparation immédiate d'un mauvais appariement; après traitement protéolytique ménagé de cet enzyme, on obtient un fragment de polymérase, appelé fragment de Klenow, dépourvu d'activité exonucléase, et très utilisé en biologie moléculaire. Elles ne peuvent fonctionner qu'en allongeant une amorce (*primer*, courte séquence de 6 à 8 bases) d'ARN ou d'ADN.

- les ADN-polymérases ARN-dépendantes ont été découvertes au début des années 80 et fabriquent de l'ADN en copiant de l'ARN, d'où leur nom de transcriptase inverse (ou *reverse transcriptase* RT). L'ADN synthétisé prend le nom de ADNc (ou ADN complémentaire) pour le différencier de l'ADN génomique. Cet enzyme existe dans tous les virus à ARN et explique leur activité (exemple du HIV du SIDA) et le nom de cette famille (rétrovirus).

b. Les ARN-polymérases

Elles sont ADN-dépendantes et sont responsables de la transcription.

2. Les enzymes de finition

La manipulation correcte des acides nucléiques exige souvent que la chaîne synthétisée présente certaines caractéristiques pour être pleinement fonctionnelle : des batteries d'enzymes permettent de nombreuses modifications mineures, ne touchant pas la séquence informative :

- addition ou suppression de groupes phosphates aux extrémités : kinases ou phosphatases ;
- addition de séquences répétitives aux extrémités : télomérases, terminal transférase, T4 polymérase
- liaison d'une chaîne à une autre chaîne ou circularisation de l'ADN : ligases

3. Les enzymes de restriction

C'est la découverte, la caractérisation et la commercialisation des enzymes de restriction qui ont permis en grande partie l'essor du génie génétique. On appelle endonucléase de restriction une enzyme qui coupe à l'intérieur de la chaîne d'ADN, en des endroits très précis, appelés sites de restriction, qui sont des séquences palindromiques (pouvant se lire dans un sens ou dans l'autre ; le plus connu en français et un des plus longs est la phrase *Esopo reste ici et se repose*) caractéristique de chaque enzyme (figure VII-11). La coupure peut être en face sur chaque brin (extrémités franches) lorsque les palindromes sont symétriques. Elle est décalée pour les palindromes non symétriques : on obtient alors des extrémités dites cohésives, pouvant rester appariées si on ne chauffe pas, très utiles pour introduire et lier un ADN étranger dans un vecteur. Il suffit de couper le vecteur avec le même enzyme de restriction que l'ADN étranger à introduire et celui-ci s'insère automatiquement grâce aux extrémités cohésives ; on ferme ensuite de manière covalente par l'action d'une ligase.

Enzyme	Séquence	Micro-organisme
AclI	GT/(C) ^(G) AC	<i>Acinetobacter calcoaceticus</i>
AluI	AG/CT	<i>Arthrobacter luteus</i>
Apal	GGGCC/C	<i>Acetobacter pasteurianus</i>
BamHI	G/GATCC	<i>Bacillus amyloliquefaciens H</i>
BstXI	CCA (N) ₂ /NTGG	<i>Bacillus stearothermophilus XI</i>
Clal	AT/CGAT	<i>Caryophanon latum L.</i> (<i>Bacillus sphaericus</i>)
(= Bsp106I)		
DraII	PuG/GNCCPy	<i>Deinococcus radiophilus</i> (<i>Escherichia coli</i>)
(= Eco0109I)		
EcoRI	G/AATTC	<i>Escherichia coli</i>
EcoRV	GAT/ATC	<i>Escherichia coli</i>
HaeIII	GG/CC	<i>Haemophilus aegyptius</i>
HincII	GTPy/PuAC	<i>Haemophilus influenzae serotype c. 1160</i> (<i>Haemophilus influenzae R₂</i>)
(= HindII)		
HindIII	A/AGCTT	<i>Haemophilus influenzae R₂</i>
HpaII	C/CGG	<i>Haemophilus parainfluenzae</i> (<i>Moraxella species</i>)
(= MspI)		
KpnI	GGTAC/C	<i>Klebsiella pneumoniae OK 8</i>
MstII	CC/TNAGG	<i>Microcoleus species (= algue bleue)</i>
NotI	GC/GGCCG	<i>Nocardia otitidis-caviarum</i>
PstI	CTGCA/G	<i>Providencia stuartii 164</i>
PvuI	CGAT/CG	<i>Proteus vulgaris</i>
SacII	CCGC/GG	<i>Streptomyces achromogenes</i>
SalI	G/TCGAC	<i>Streptomyces albus G</i>
Sau3A	/GATC	<i>Staphylococcus aureus 3A</i> (<i>Moraxella bovis</i>)
(= MboI)		
SmaI	CCC/GGG	<i>Serratia marcescens S₈</i>
SpeI	A/CTAGT	<i>Sphaerotilus species</i>
SphI	GCATG/C	<i>Streptomyces phaeochromogenes</i>
SstI	GAGCT/C	<i>Streptomyces stanford</i> (<i>Streptomyces achromogenes</i>)
(= SacI)		
XbaI	T/CTAGA	<i>Xanthomonas badrii</i>
XhoI	C/TCGAG	<i>Xanthomonas holcicola</i>
XmaI	C/CCGGG	<i>Xanthomonas malvacearum</i>
XmaIII	C/GGCCG	<i>Xanthomonas malvacearum</i> (<i>Enterobacter agglomerans</i>)
(= EagI)		

Les noms cités entre parenthèses dans la 1^{re} colonne de gauche sont ceux d'isoschizomères (enzymes provenant de souches bactériennes différentes mais coupant de la même manière le même site de restriction).

Figure VII-11 : Quelques enzymes de restriction

On connaît environ quatre cents enzymes de restriction dont une centaine est commercialisée. Ces enzymes sont nommés par des abréviations d'après la bactérie dont ils ont été isolés, suivi si besoin d'un numéro. Par exemple, Eco RI est l'enzyme de restriction numéro I isolé d'*Escherichia coli* (Figure VII-11).

4. Autres outils pour le futur : les ribozymes

L'action d'une endonucléase de restriction sur l'ADN humain produit des milliers voire des millions de fragments : cette multiplicité est due à la brièveté des séquences de restriction (en général 4 à 6 nucléotides : plus la séquence est courte, plus elle sera abondante dans l'ADN). Ce peut être un avantage (voir plus loin les empreintes génétiques) ; ce peut être aussi un inconvénient. On a découvert que certains ARN présentent une activité catalytique ou autocatalytique naturelle, mise à profit dans les processus de maturation de l'ARNm. Ces ARN ont été appelés ribozymes: on espère mettre rapidement au point des ribozymes artificiels capables de couper sélectivement à un endroit précis d'une seule séquence.

IV. Les outils de la biologie moléculaire : les vecteurs

Bien que n'appartenant pas au domaine de la pratique diagnostique, la notion de vecteur doit être connue, car elle est, avec les enzymes de restriction, une des clefs de la biologie moléculaire.

On appelle vecteur un élément capable de fixer un ADN étranger, de le transporter à l'intérieur d'un hôte (bactérie, cellule eucaryote) afin de permettre sa multiplication et éventuellement son expression. Ce sont les technologies dites des ADN recombinants, permettant de "cloner" un gène. La préparation des vecteurs et la culture de l'hôte font appel à des méthodes et matériels spécifiques, qui constituent autant de "marchés" et de "pistes" GBM, mais qui sortent du cadre de cet exposé.

1. Utilité des vecteurs

Les vecteurs présentent deux intérêts complémentaires: vecteurs de clonage (pour la multiplication d'une séquence spécifique) et vecteur d'expression (pour faire synthétiser une protéine).

a. Au niveau de l'ADN (vecteur d'amplification)

L'utilisation d'un vecteur permet la multiplication à un grand nombre d'exemplaire d'une séquence d'ADN, du fait de la multiplication de l'hôte. On peut ainsi constituer des collections de clones, représentant des "banques" d'ADN ("*libraries*"). Ces banques peuvent être génomiques (fabriquées à partir de l'ADN chromosomique) ou constituées d'ADNc. Ces dernières sont de plus petite taille, car ne contenant que les séquences codantes incluses dans lesARNm ayant servi de matrice pour synthétiser les ADNc. Elles sont donc plus faciles à cribler : le criblage est le processus qui consiste à repérer le gène que l'on cherche au milieu de tous les clones. L'amplification d'un gène dans une bactérie est illustrée dans la figure VII-12.

b. Au niveau des produits terminaux (protéines : vecteurs d'expression)

L'intérêt du vecteur est alors de faire exprimer chez l'hôte l'information apportée par l'ADN extérieur. C'est tout l'enjeu actuel des biotechnologies fondées sur la biologie moléculaire. L'expression d'un gène dans un hôte nécessite d'insérer en amont du gène un promoteur permettant la transcription. On peut utiliser des promoteurs universels (par exemple promoteur 35S dans de nombreux OGM actuellement cultivés) ou des promoteurs spécifiques (d'un tissu par exemple, ou possédant des éléments de réponse permettant de contrôler de l'extérieur l'expression du gène).

Parmi les nombreux exemples d'intérêt médical, on peut citer la production d'insuline humaine par des bactéries (pour le traitement du diabète). C'est un outil extraordinaire pour produire des structures connues, en créer de nouvelles (mutagenèse dirigée) ou créer de nouvelles fonctions. Les inquiétudes soulevées par la biologie moléculaire dans le domaine de la sécurité viennent en grande partie de ce dernier point. Les protéines produites par ces méthodes de génie génétique sont souvent appelées protéines "recombinantes" et identifiées par la lettre "r" : rH-IL2 signifie par exemple interleukine 2 d'origine humaine recombinante.

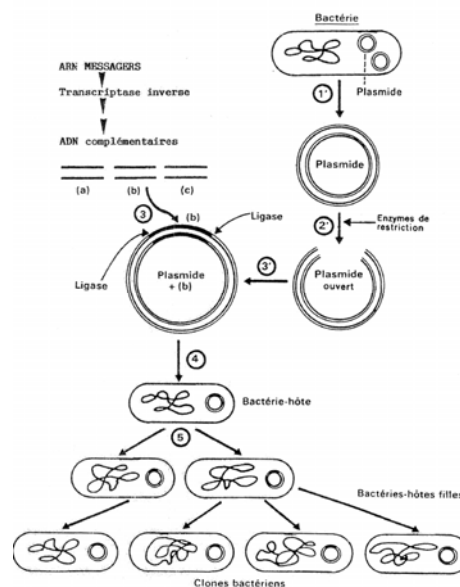


Figure VII-12 : Amplification d'un fragment d'ADN par insertion dans un plasmide, transféré et multiplié dans une bactérie

2. Les vecteurs utilisés

Plusieurs types de vecteurs sont utilisés : les plasmides pour les séquences courtes (<9 kbp) et les bactériophages pour les séquences plus longues (jusqu'à 45 kbp). Pour des séquences encore plus longues, on utilise les baculovirus et même des chromosomes artificiels dans la levure (YAC : yeast artificial chromosome).

a. Les plasmides

On appelle plasmide un morceau d'ADN bactérien circulaire non chromosomique, facilement échangeable entre les bactéries. Les plasmides sont introduits dans la bactérie, rendue "compétente" par des moyens chimiques (sels) ou physiques (électroporation), et ils sont reproduits avec la croissance de la bactérie (plusieurs centaines de plasmides par bactérie). Le rendement de ces méthodes n'est jamais très important : il est nécessaire de sélectionner les bactéries ayant incorporé le plasmide. Les premiers systèmes de sélection faisaient appel à l'addition d'un gène de résistance aux antibiotiques : il suffit de cultiver les bactéries sur un milieu contenant l'antibiotique : seules celles qui ont incorporé le plasmide se multiplieront. L'existence de ce gène de résistance dans les premières plantes génétiquement modifiées (OGM) a constitué une source d'inquiétude majeure (transfert de résistance, jamais démontré, aux bactéries de l'homme, pouvant ensuite poser des problèmes de traitement des maladies infectieuses humaines). Les systèmes de sélection actuels n'utilisent plus ce type de gène.

Les plasmides utilisés ont des caractéristiques précises : sites de coupures précis et connus pour des enzymes de restriction, présence de gènes marqueurs particuliers (résistance aux antibiotiques, aptitude à développer une coloration en présence de certains substrats) permettant de sélectionner facilement les bactéries recombinantes (ou transformées, c'est-à-dire ayant intégré le plasmide) par culture sur des milieux spéciaux. Un exemple de plasmide est donné sur la figure VII-13. De nombreux plasmides sont commercialisés. Les derniers développements sont la fabrication de plasmide entièrement synthétiques, intégrant les propriétés les plus intéressantes des plasmides naturels ou modifiés antérieurs.

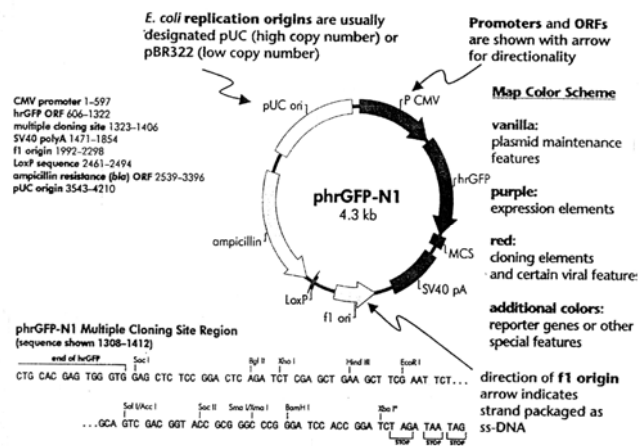


Figure VII-13 : Un plasmide (extrait d'un catalogue) et la description des gènes présents ainsi que des sites de coupure par les enzymes de restriction

b. Les bactériophages

Les bactériophages sont des virus infectant les bactéries et conduisant à la lyse de celles dans lesquelles ils se multiplient. Ils permettent l'intégration (par transfection) de plus gros fragments jusqu'à 45 kbp.

On appelle cosmides des structures intermédiaires synthétiques contenant les gènes marqueurs plasmidiques et certaines structures utiles d'un phage.

3. Les hôtes

Les hôtes permettant la multiplication et l'expression du gène étranger peuvent être très divers selon les buts recherchés. Ils permettent d'éliminer les risques, notamment viraux (virus lents, prions et rétrovirus) liés aux substances actives médicamenteuses obtenues par extraction (cf le scandale récent de l'hormone de croissance extractive ayant transmis la maladie de Creutzfeld-Jacob aux patients traités par cette hormone). On utilise :

- les bactéries : ce sont les premiers hôtes utilisés et les plus simples à manipuler. Toujours d'actualité pour le clonage de l'ADN, elles sont souvent inadaptées pour l'expression correcte de gènes humains. En effet, de nombreuses protéines utiles des organismes supérieurs subissent après leur synthèse des modifications qui les rendent fonctionnelles (glycosylation par exemple), modifications que les bactéries sont incapables de réaliser ; on risque alors d'obtenir des protéines inactives ou moins stables que les protéines naturelles obtenues par extraction. L'utilisation de bactéries infectant naturellement les plantes et capables de transmettre des parties de leur génome à la plante permet de réaliser les plantes génétiquement modifiées actuellement cultivées (les célèbres OGM, figure VII-14, VII-15, VII-16) : les gènes d'intérêt (résistance aux insectes, aux herbicides,...), flanqués d'un promoteur et accompagnés d'un gène de sélection sont insérés dans un plasmide ; le plasmide est transféré dans la bactérie (*Agrobacterium tumefaciens* le plus souvent), la bactérie est mise au contact des cellules de la plante en milieu de culture, puis la plante est régénérée. On peut ainsi obtenir des plantes avec les caractéristiques désirées de façon beaucoup plus rapide et plus sûre que par la sélection génétique classique (qui peut modifier des centaines ou des milliers de gènes dans un organisme). Cependant, on ne sait pas encore bien contrôler le site d'insertion d'un gène : de ce fait, l'insertion du gène pourrait modifier le fonctionnement d'autres gènes et conduire à des effets non voulus. Les inquiétudes du public, surtout en Europe, ont conduit à mettre en place des systèmes complexes d'évaluation de la sécurité de ces plantes avant leur culture en champ et leur commercialisation pour l'alimentation humaine.

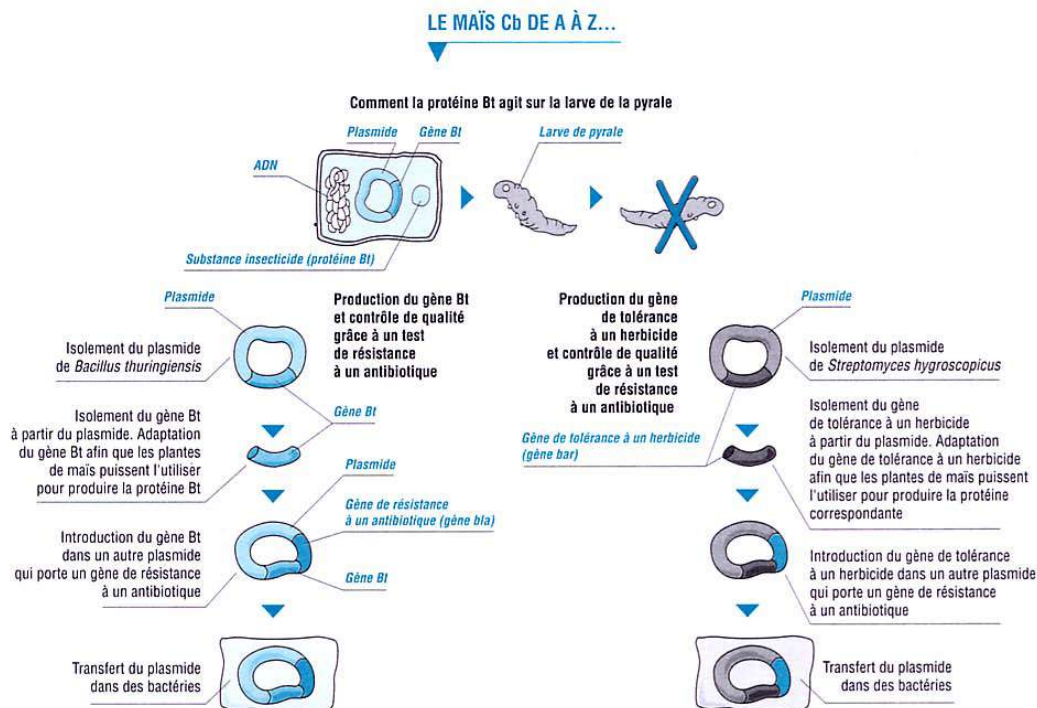


Figure VII-14 : Fabrication d'une plante OGM. Introduction des gènes d'intérêt (résistance à la pyrale (insecte) et tolérance au glyphosate (herbicide) dans la bactérie (document Novartis)

- les cellules eucaryotes : les plus simples à manipuler sont les levures, mais leur équipement enzymatique de modification des protéines est également incomplet. Les cellules d'organismes

supérieurs sont beaucoup plus difficiles à utiliser, mais de nombreuses recherches sont effectuées dans ce sens.

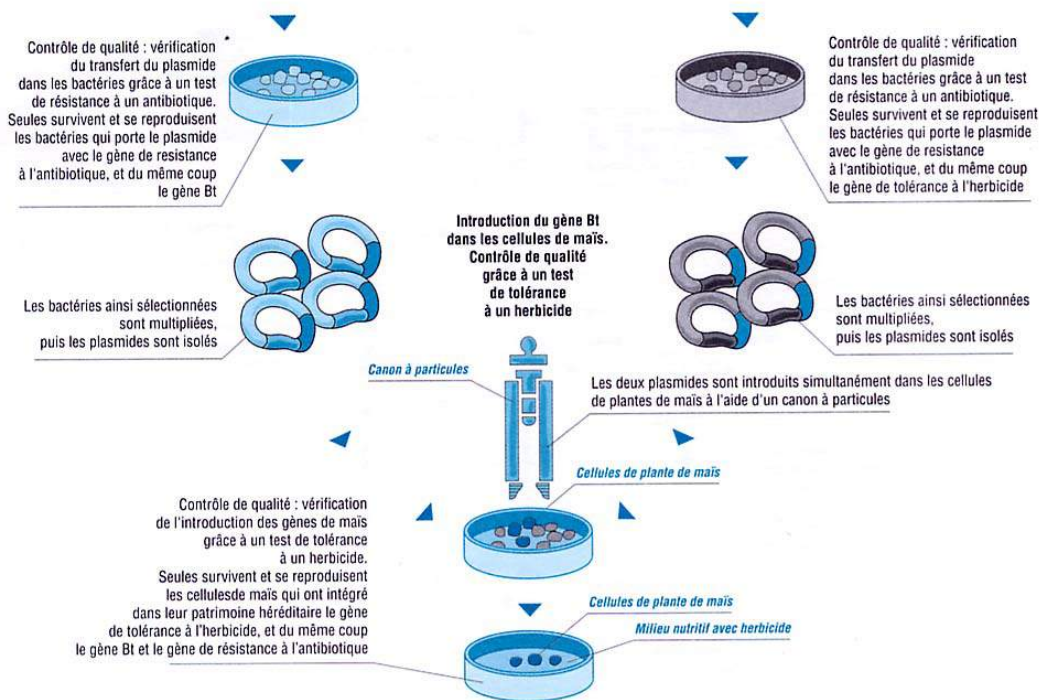


Figure VII-15. Sélection des bactéries ayant intégré le gène d'intérêt.

- les organismes entiers : certains organismes possèdent des organes spécialisés, sécrétant en grande quantité un seul type de protéine. L'idée est de remplacer le gène de cette protéine par celui que l'on veut exprimer. De nombreuses recherches sont ainsi effectuées sur les chenilles (ver à soie) ou les araignées ainsi que sur des végétaux (l'idée d'un champ d'insuline n'est pas déraisonnable !).

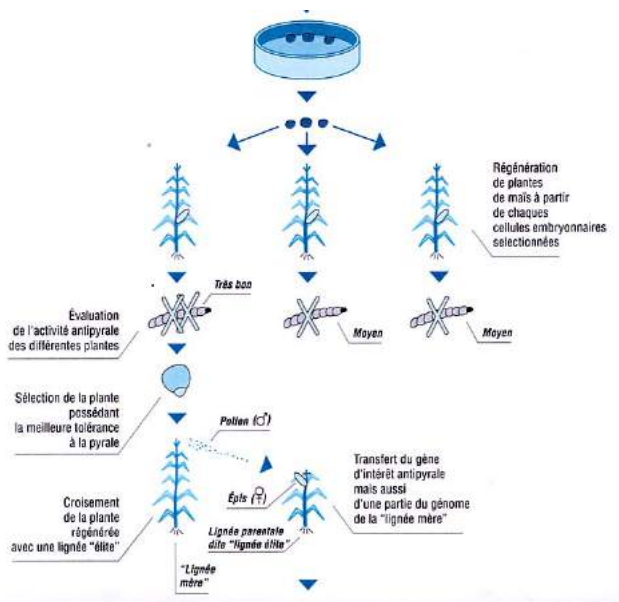


Figure VII-16 : Régénération de la plante OGM

V. Les outils de la biologie moléculaire : les sondes

On appelle sonde ("*probe*") un fragment d'ADN de séquence parfaitement connue permettant de repérer la séquence complémentaire (ou séquence cible) même unique au milieu de dizaines de milliers d'autres séquences. Deux problèmes sont à résoudre : la réalisation de la séquence rigoureusement spécifique et son marquage pour un repérage facile.

1. Réalisation de la sonde

Les problèmes rencontrés et les démarches exploitées peuvent être très divers selon le modèle étudié, mais se distinguent en fonction des deux principales démarches utilisées en génétique, la génétique directe et la génétique inverse.

a. La génétique directe

Dans la génétique dite directe, ou classique, on connaît la protéine produite par le gène (elle a été purifiée et séquencée : la séquence ou une partie de la séquence des acides aminés est connue) et on cherche à remonter au gène, pour l'isoler, le séquencer, l'utiliser, étudier sa régulation....

Deux types de sondes peuvent être fabriqués:

- Les sondes géniques sont préparées soit à partir du gène lui-même soit faites d'ADNc. Elles sont très spécifiques, car elles sont aussi longues que le gène. Les sondes d'ADNc sont plus difficiles à préparer, car elles sont synthétisées à partir de l'ARN messager : en effet, l'obtention d'un ARNm pur est délicate en dehors de cas particulier (cas de l'ARNm de l'hémoglobine constituant 95 % des ARNm des réticulocytes précurseurs des globules rouges). Ces sondes sont faciles à multiplier dans des vecteurs soit sous forme double brin soit sous forme simple grâce au phage M 13.

- Les sondes oligonucléotidiques synthétiques sont plus courtes (30 à 40 nucléotides), ce qui présente plusieurs avantages:

- + si elles sont bien choisies, elles sont aussi très spécifiques
- + elles sont très sensibles aux mutations : la mutation d'une seule base peut empêcher la fixation de la sonde, ce qui n'est pas forcément le cas avec les sondes géniques
- + la fixation sur l'ADN complémentaire (hybridation) est très rapide (30 minutes contre 4 à 16 heures pour les sondes géniques)
- + leur stabilité est excellente (supérieure à un an)
- + elles sont "faciles" à obtenir (voir ci-dessous)
- + cependant, leur sensibilité est plus faible que celle des sondes géniques, car les possibilités de marquage sont plus réduites. Cette limite est actuellement contournée par les techniques d'amplification (PCR, voir plus loin).

Pour réaliser une telle sonde, il faut connaître la séquence d'une petite partie de la protéine, ce qui est possible (même sans purification complète) par les techniques de micro séquençage applicables sur une bande ou une tache d'électrophorèse en gel d'acrylamide. A partir de cette séquence, on détermine sur ordinateur, à l'aide du code génétique, toutes les séquences nucléotidiques possibles. Il n'y a plus ensuite qu'à les synthétiser, manuellement ou automatiquement : des appareils performants existent ("synthétiseurs de gènes") fabriquant des sondes pour 5 à 15 € la base. Si un acide aminé est codé par plusieurs codons, on peut être amené à synthétiser un mélange de sonde possédant les différentes bases voulues à la position appropriée.

Il est prudent de vérifier auparavant dans les banques de données informatisées accessibles par internet que la séquence choisie est bien spécifique de la protéine et n'appartient pas aux vastes domaines des séquences ubiquitaires caractéristiques de certaines familles ou superfamilles de protéines. Cependant ce type de séquence homologue est fréquemment utilisé pour chercher les gènes de protéines appartenant à une même famille. Les banques de données comportent de nombreux programmes permettant de faire ces recherches.

b. La génétique inverse

En génétique inverse, on ne connaît pas la protéine produite à partir du gène ; aussi par des techniques purement génétiques, on essaie de proche en proche de cerner le gène et de le cloner. Dans l'application aux maladies, on étudie un grand nombre de malades en cherchant la liaison (*link*) entre la

présence de la maladie (et donc du gène) et la présence de marqueurs génétiques connus (voir plus loin les RFLP) : plus la liaison est forte, plus le marqueur est près du gène cherché. Une analyse statistique élaborée (*lod-score*) permet de quantifier le degré de liaison et chiffre la distance du marqueur au gène. Quand le gène est localisé, cloné, puis séquencé, on déduit la séquence de la protéine, mais aussi on peut réaliser directement une sonde unique spécifique soit génique, soit oligonuc1éotidique (en choisissant correctement comme précédemment la séquence caractéristique). C'est ainsi qu'a été trouvé le gène de la myopathie de Duchenne touchant un nouveau-né sur 3500 (la fonction exacte de la protéine (dystrophine) ainsi connue est encore du domaine de l'hypothèse) ; pour la mucoviscidose, le même processus est achevé (cette maladie touche un nouveau-né sur 2000; elle est la plus fréquente des "tares" génétiques : une personne sur 25 porterait le trait pathologique). Le laboratoire Généthon, retombée du Téléthon a accéléré ce processus de décryptage du génome humain.

Toutes ces techniques puissantes font que, maintenant, on connaît la séquence et éventuellement la structure (grâce à la modélisation sur ordinateur) de nombreuses protéines dont la fonction est encore inconnue. Le Généthon a fait appel à la mise en réseau de milliers d'ordinateurs de particuliers pour effectuer toutes les comparaisons possibles entre les séquences et essayer d'en déduire des fonctions.

2. Le marquage de la sonde

La liaison de la sonde à son brin complémentaire étant très forte, la sensibilité de la détection va dépendre de la facilité du repérage de la sonde et donc de la qualité et de l'intensité de son marquage. Deux types de marquage existent: le marquage radioactif (sondes chaudes) et le marquage non radioactif (sondes froides). Le premier type est le plus ancien et celui qui marche le mieux dans tous les cas ; mais, comme pour la radio-immunologie et l'immunoenzymologie, c'est le second type de marquage qui porte les plus grands espoirs de développements commerciaux.

a. Les sondes chaudes

Le marquage radioactif utilise le phosphore 32 pour les autoradiographies, mais aussi le Soufre 35, l'iode 125 et parfois le tritium pour les hybridations in situ. La demi-vie du phosphore est courte (14 jours contre 87 pour le soufre et 60 pour l'iode), ce qui oblige à de fréquentes préparations ; de plus, les sondes fortement marquées peuvent subir une radiolyse. L'avantage des sondes chaudes est que la marquage est intrinsèque et ne modifie en rien les propriétés de la sonde. Plusieurs techniques de marquage sont utilisées : les deux premières ne sont utilisables que sur les sondes double brin, la troisième est applicable aux sondes simple brin :

- la translation de césure ou "*nick-translation*" : on réalise des cassures dans la sonde grâce à la DNase I (diluée, pour ne pas la dégrader complètement) ; ces cassures sont ensuite réparées par l'incorporation de nucléotides radioactifs grâce à l'ADN-polymérase I. L'activité spécifique obtenue est "relativement" faible.

- la synthèse avec amorçage au hasard ou "*multi-random priming*" : on réalise de courtes séquences aléatoires (6 nucléotides) pouvant se positionner en plusieurs endroits de la séquence matrice et qui serviront d'amorce pour la synthèse du brin complémentaire par le fragment de Klenow travaillant avec des nucléotides radioactifs. Les activités spécifiques obtenues sont plus fortes que précédemment (9 à 24 bases radioactives pour une sonde de 15 à 30 nucléotides, contre quelques unes seulement pour la *nick-translation*, d'où des activités spécifiques de l'ordre de 10^9 cpm/pg).

On peut réaliser des sondes d'ARN chaud par transcription de l'ADN en ARN grâce à la polymérase SP6 en présence de ribonucléotides radioactifs.

- marquage à l'extrémité de la sonde par la T4 polymérase (extrémité 5') ou la désoxynucléotidyl-transférase (extrémité 3'). En utilisant dans ce dernier cas un didésoxynucléotide, on évite l'allongement aléatoire de la chaîne. Le marquage est plus faible que dans les deux cas précédents.

La détection est réalisée par autoradiographie si l'hybridation a lieu sur un support solide (exposition d'environ 18 heures pour une sonde fortement marquée) ou par comptage de la radioactivité si l'hybridation a lieu en milieu liquide (résultat beaucoup plus rapide).

b. Les sondes froides

Les sondes froides comportent un marquage extrinsèque, susceptible de modifier les propriétés de la sonde. Cependant, elles ont théoriquement de nombreux avantages : pas d'équipements spéciaux ni

d'habilitation réglementaire, sans danger pour l'utilisateur (si elles ne font pas appel à des produits cancérogènes), simples d'emploi et donnant des résultats rapides, durée de vie plus longue n'obligeant pas à des marquages répétés. Deux problèmes importants restent encore à résoudre: l'existence de nombreux faux positifs (fixation non spécifique ou bruit de fond, dépendant de la sonde elle-même ou des systèmes de révélation) et sensibilité inférieure (découlant en partie du problème précédent). De nombreux kits sont cependant déjà commercialisés. La détection fait appel à des systèmes enzymatiques bien maîtrisés, tels que la phosphatase alcaline ou la peroxydase. La fixation de ces enzymes sur la sonde, et donc le repérage, peut être indirecte (la première historiquement) ou directe (la plus intéressante). De nombreuses recherches sont en cours pour utiliser les phénomènes de chimiluminescence ou de bioluminescence.

- fixation indirecte: on incorpore dans la sonde un nucléotide modifié (par l'une des deux techniques précédemment décrite ou par une réaction photochimique pour la "photobiotine" qui sera ensuite repéré spécifiquement. Le nucléotide modifié peut être :

+ un biotine - nucléotide: la biotine est très spécifiquement reconnue par la streptavidine marquée à la phosphatase alcaline ;

+ un bromodésoxynucléotide (Institut Pasteur) reconnu par un anticorps monoclonal, lui-même révélé par un anticorps anti-souris marqué à la peroxydase ;

+ un digoxigénine - nucléotide (Boehringer) révélé par un anticorps spécifique marqué par un enzyme.

- fixation directe de l'enzyme sur la sonde, pour réduire au maximum le nombre et la durée des étapes intermédiaires : phosphatase alcaline attachée par un bras sur la thymine par exemple. Des systèmes enzymatiques d'amplification intégrée sont concevables, permettant d'abaisser le seuil de détection à 0,1 pg d'ADN (Bioprobe).

VI. Méthodologie, techniques et appareillages

Comme dans tous les domaines de la biochimie clinique et de la biologie en général, la tendance est à la mise sur le marché de produits les plus simples possibles dans leur utilisation, ne nécessitant pas d'extractions ou de purifications préalables. Mais avant d'atteindre ce but et de toutes façons pour certaines applications diagnostiques, des procédés plus ou moins sophistiqués doivent être mis en oeuvre.

1. L'électrophorèse

L'électrophorèse est la technique la plus utilisée: elle sépare les fragments d'acides nucléiques en fonction de leur taille (donc de leur nombre de bases). Il existe plusieurs technologies; dans tous les cas l'ADN est révélé soit directement sur le gel, par autoradiographie s'il est radioactif, par des composés colorés ou fluorescents s'il n'est pas radioactif. Le bromure d'éthidium, qui en s'intercalant dans la double hélice permet de visualiser facilement l'ADN en lumière ultraviolette est très utilisé. Le repérage peut aussi être réalisé après transfert et hybridation par les sondes précédemment décrites. Les principes sont les mêmes que ceux décrits dans le chapitre sur les procédés de séparation, mais certains appareillages sont spécifiques (gels de très grande taille pour le séquençage par exemple).

a. L'électrophorèse classique en gel de polyacrylamide

Cette technique (PAGE : *polyacrylamide gel electrophoresis*) permet de séparer des fragments dont la taille diffère d'une seule base. Elle est utilisée pour le séquençage des acides nucléiques et la différenciation fine des fragments de restriction. L'étalonnage est réalisé avec des fragments de longueur connue. Les appareillages utilisés pour les gels de séquençage diffèrent sensiblement de ceux qui ont été décrits, car on utilise des gels de grande taille (plusieurs dizaines de cm), mais les principes restent les mêmes que ceux présentés dans le chapitre précédent.

b. L'électrophorèse en gel d'agarose

La migration est inversement proportionnelle au logarithme du nombre de bases. Moins résolutive que la précédente, elle est très utilisée pour l'étude des fragments de restriction, en les séparant jusqu'à 20-30 kbp.

c. L'électrophorèse en champ pulsé

Cette technique permet de séparer les gros fragments d'acides nucléiques. En effet, au dessus d'une certaine taille, les fragments d'ADN ne peuvent traverser les mailles du gel que s'ils sont convenablement orientés ; dans l'électrophorèse classique, cette orientation est aléatoire et la résolution est mauvaise. Le principe de l'électrophorèse en champ pulsé est de changer périodiquement le sens (polarité) et la direction du champ électrique, pour orienter convenablement tous les fragments. On réalise donc des appareils avec des champs orthogonaux ou hexagonaux, (figure II-12), fonctionnant avec des périodicités variables de chaque direction et polarité. L'appareil est piloté par microprocesseur et les meilleures conditions dans chaque cas particulier sont déterminées empiriquement.

d. L'électrophorèse capillaire

Elle est de plus en plus utilisée dans les appareils automatisés de séquençage, utilisant des didésoxynucléotides fluorescents (voir plus loin).

e. Des applications diagnostiques : SSCP

Dans certaines conditions, notamment ADN simple brin, la migration d'un ADN dans le gel va dépendre très fortement de sa forme, qui est déterminée par sa séquence. Une mutation dans la séquence entraîne un changement de forme et donc de migration : c'est le polymorphisme de conformation des chaînes simples ou *single strand chain polymorphism* SSCP. Cette technique permet de repérer facilement l'existence d'une mutation sans pouvoir évidemment dire de quelle mutation il s'agit, et permet ainsi de diminuer le nombre d'échantillons sur lequel des études plus poussées doivent être conduites pour caractériser la mutation. Sous le nom de DHPLC, cette propriété a été adaptée à l'analyse par HPLC par échange d'ions (voir le chapitre sur les procédés de séparation).

2. Le transfert

Les fragments d'ADN séparés sur gel sont transférés sur une membrane en nitrocellulose ou (de plus en plus) en nylon. Le transfert est réalisé par capillarité par un courant liquidien (technique de Southern, figure VII-17). Les fragments sont ensuite fixés sur la membrane par chauffage (nitrocellulose) ou irradiation (nylon). L'avantage du transfert est que les manipulations suivantes sont beaucoup plus aisées que sur un gel fragile et cassant. Il existe de nombreux types de membranes et de nombreuses recettes de transfert selon la taille des morceaux ou le but recherché. Appliquée aux ARN, cette technique de transfert a pris le nom de northern-blot.

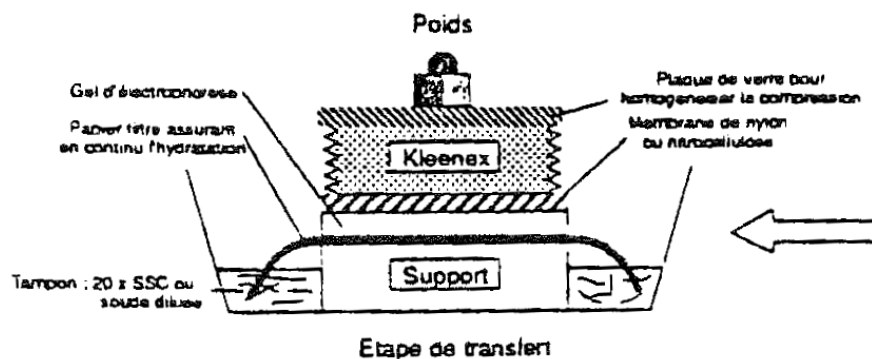


Figure VII-17 : Southern blot, transfert d'ADN sur membrane par capillarité.

Après une étape de préhybridation avec un ADN étranger, capitale pour saturer les sites de fixation de la membrane non occupés par l'acide nucléique étudié (sites responsables du bruit de fond), on réalise l'hybridation spécifique.

3. L'hybridation

L'hybridation est la fixation de la sonde sur sa cible. Il faut donc que la sonde et la cible soit sous forme simple brin : un chauffage préalable est nécessaire pour obtenir la fusion (dénaturation) des

doubles brins. Les conditions physico-chimiques ou conditions de stringence (pH, température, force ionique) doivent être très contrôlées lors des différentes étapes (préhybridation, lavages, hybridation, lavages) : pour assurer la spécificité de la fixation, éviter la réassociation des deux brins de la sonde entre eux (diminution de la sensibilité), éviter la dissociation de l'hybride spécifique. Ces conditions doivent être optimales pour assurer la fiabilité du résultat. De nombreuses techniques d'hybridation sont possibles ; les développements actuels ont conduit aux concepts de génocapteurs ou de puces à ADN (*DNAchips*, ou *DNA array*)

a. Sur membrane

- après électrophorèse et transfert sur membrane : c'est le *Southern blot technique mise au point par le Pr Southern, figure VII-17*).

- sans électrophorèse préalable : c'est la technique de *dot blot* (figure VII-18). Les cellules ou bactéries ou ADN à étudier sont lysés et déposés sur une membrane directement sous un petit volume si l'ADN est concentré ou par filtration si l'ADN est peu concentré. L'ADN est dénaturé et fixé, puis la sonde est hybridée et révélée. La technique peut être rendue semi-quantitative par étalonnage avec des dilutions successives du standard.

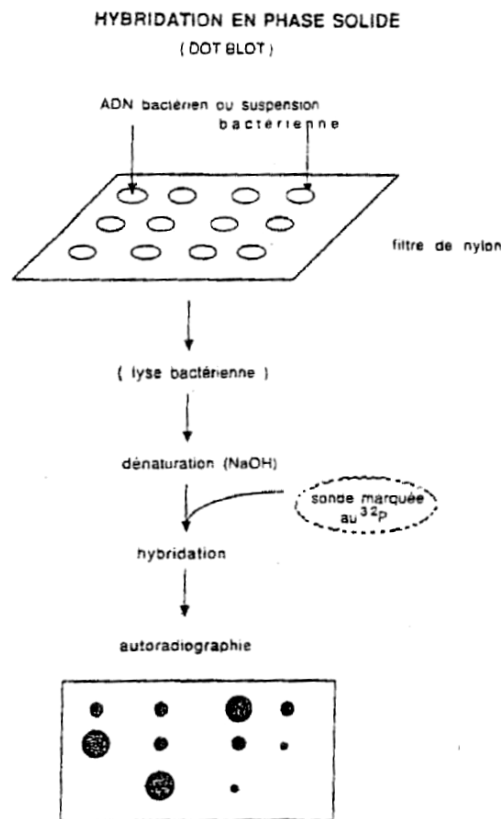


Figure VII-18 : Hybridation sur membrane sans électrophorèse (Dot blot)

b. En milieu liquide en phase hétérogène

C'est une technique plus rapide. L'ADN hybridé double brin se fixe assez sélectivement sur l'hydroxyapatite. Après sédimentation, il suffit de compter la radioactivité dans le culot. Des techniques plus élaborées ont également été proposées : billes sur lesquelles on a fixé de l'avidine, ou des anticorps spécifiques ; sonde fixée sur une phase hétérogène....

c. In situ

L'hybridation peut être réalisée directement sur coupe de tissu ou cellules, applicable en microscopie optique (à l'aide de produits fluorescents) ou en microscopie électronique (à l'aide de produits radioactifs ou de marquage à la ferritine). Cette technique permet la localisation chromosomique d'un gène; en

pathologie, elle permet par exemple d'établir une corrélation entre les lésions histologiques observées et la présence d'un agent pathogène.

d. Les génocapteurs

Une sonde spécifique d'une partie du gène à rechercher est fixée sur un support solide (bâtonnet, puits d'une plaque de microtitration à 96 puits,...). L'ADN à étudier est incubé avec le capteur ; après lavage, une sonde marquée (fluorescence, luminescence, enzyme,...) complémentaire de l'autre partie du gène est introduite et le signal mesuré (après lavage).

e. Les puces à ADN (biopuces, DNACHIPS, DNA arrays)

On fixe sur une surface des séquences connues d'ADN qui peuvent alors être hybridées avec des ADN ou des ARN inconnus, en général préalablement marqués par un composé fluorescent. On peut ainsi tester en une seule étape un grand nombre de réactions d'hybridation en repérant les zones de fluorescence. Il est possible actuellement de fixer plusieurs milliers voire dizaine de milliers de séquences sur quelques centimètres carrés. On trouve des puces commercialisées pour différents génomes ; mais il est aussi possible de faire fabriquer par des prestataires spécialisés des puces comportant les gènes qu'on souhaite. La technique la plus fréquente utilise les propriétés de dérivés photoactivables des nucléotides pour synthétiser les séquences in situ, directement sur la plaque de la puce. (Figure VII-19). L'essentiel du coût (de l'ordre de 20 000 euros) est lié à la réalisation des masques et dépend du nombre de séquences sur la puce ; le prix des puces individuelles variera de 100 à 500 euros en fonction du nombre commandé.

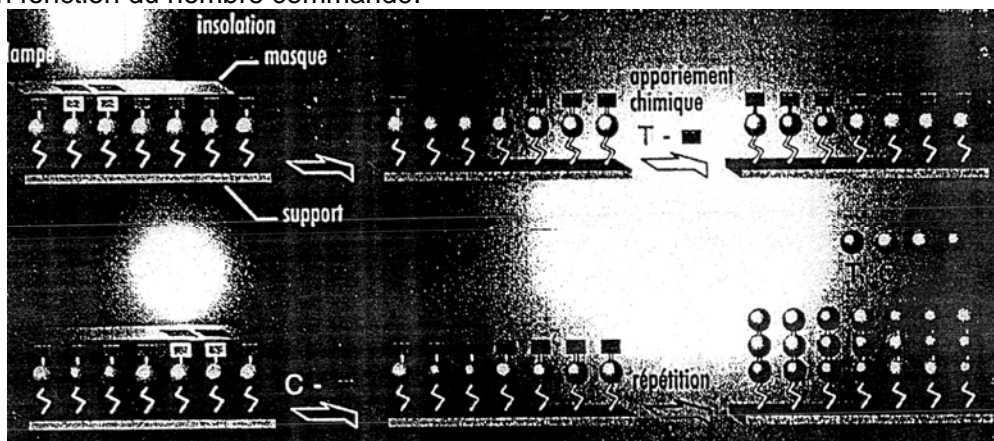


Figure VII-19 : Synthèse in situ des séquences nucléotidiques connues.

A chaque étape, quatre masques sont utilisés (un pour chaque base), permettant d'activer une zone parfaitement définie de la surface. Les bases ne pourront se lier que si la zone a été activée.

Une technique couramment utilisée en recherche permet de déterminer avec précision l'activation ou l'inhibition d'un grand nombre de gènes lors d'un processus biologique quelconque (intervention médicamenteuse ou nutritionnelle par exemple). Les ARN sont extraits des tissus contrôles et des tissus traités. Les ARN du contrôle sont ensuite marqués par un composé fluorescent (rouge par exemple) et ceux du tissu traité par un composé fluorescent d'une autre couleur (vert par exemple). Les deux mélanges d'ARN marqués sont ensuite déposés en quantité égale sur la puce : il y a compétition pour la fixation sur les séquences de la puce. L'identification et la quantification des couleurs permet d'évaluer la modification de l'expression des gènes dont la séquence est sur la puce : une tache rouge indiquera une inhibition de l'expression par le traitement (il y a plus d'ARN contrôle marqué en rouge qui s'est fixé) ; inversement une tache verte indique une augmentation de l'expression. Compte tenu du grand nombre de séquences présentes sur une puce, l'utilisation de programmes spécialisés de bioinformatique s'impose.

4. L'amplification génique, PCR ou Polymerase chain reaction

La PCR, ou réaction de polymérisation en chaîne, est une technique d'amplification in vitro du ADN sous forme de séquence relativement courte. Elle permet de s'affranchir des limitations quantitatives nécessaires pour l'hybridation et le repérage (on repère une cellule infectée sur un million de cellules !). Cette technique est couverte par un brevet ce qui est assez exceptionnel pour une technique aussi fondamentale.

Son principe est le suivant (figure VII-20) :

- on utilise deux amorces, se fixant chacune sur l'un des brins, aux deux extrémités de la séquence à amplifier. La technique marche bien si les deux amorces sont séparées de moins de 2 kbp. Si les amorces sont longues et spécifiques, on amplifie une séquence déterminée. Si les amorces sont aléatoires et courtes, on peut amplifier tout le ADN par petits fragments. Ces amorces sont mises en quantité excédentaire dans le milieu. Les banques de données génétiques publiques comportent des programmes permettant de sélectionner les meilleures amorces (les plus spécifiques) et leur synthèse peut être ensuite réalisée par des prestataires à un coût très faible (un à quelques dizaines d'euros par base, selon la quantité commandée) ;

- une polymérase allonge l'amorce en copiant le brin matrice

- par chauffage, on sépare la copie de la matrice. Lors du refroidissement, les amorces plus courtes se réassocient rapidement à chacun des deux brins et le cycle peut recommencer. A chaque cycle, on double la quantité d'ADN présente. Selon la quantité d'ADN de départ, 25 à 30 cycles peuvent être nécessaires pour une amplification correcte.

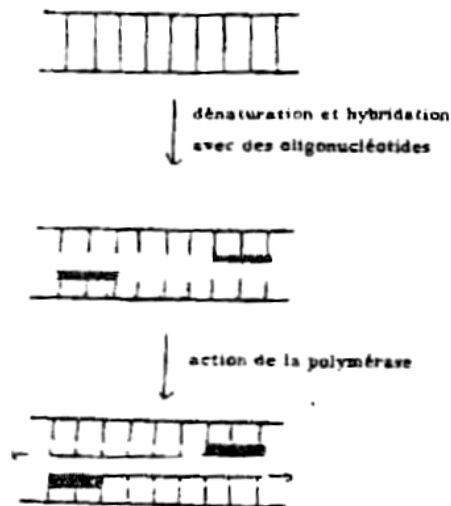


Figure VII-20 : Principe de la PCR

L'utilisation d'une polymérase thermorésistante (Taq polymérase, extraite d'une bactérie marine vivant près des sources chaudes du fond océanique) permet de conserver le même enzyme pour tous les cycles. La réaction est automatisable. L'ADN amplifié est ensuite étudié par les techniques précédemment décrites (dot, southern, sondes).

Si le principe est simple, la réalisation doit être minutieuse et rigoureuse, comme pour toute méthode ultrasensible (voir l'absorption atomique), car il traîne de l'ADN partout et les amorces courtes n'ont qu'une faible spécificité !

Le problème de la contamination entre échantillons dans les appareils automatiques n'est pas encore totalement réglé.

La PCR classique utilise de petits appareils (thermocycler) dont on peut programmer les différentes températures, les durées, les fréquences et le nombre des cycles. Le produit d'amplification est ensuite analysé par électrophorèse. On peut auparavant faire agir des enzymes de restriction pour rechercher des mutations (apparition ou disparition de sites de coupure).

Une évolution intéressante est la PCR en temps réel (real time PCR ou RT-PCR, aussi appelée QPCR, quantitative PCR, figure VII-21). Cette technique utilise un composé fluorescent dont la fluorescence n'est possible que s'il se fixe sur l'ADN en double hélice, en s'intercalant entre les plateaux des bases ; l'intensité de la fluorescence est ainsi proportionnelle à la quantité d'ADN double brin présente pendant la phase de polymérisation et elle est nulle pendant l'étape de dénaturation. On peut donc suivre en direct la cinétique de la polymérisation. A la fin de l'amplification, il est aussi possible de déterminer avec précision la température de fusion du produit d'amplification. Comme pour une cinétique enzymatique ou immunologique, la pente de la courbe et l'intensité de fluorescence après un nombre de cycle défini permettent la quantification : elles sont proportionnelles à la quantité d'ADN de départ.

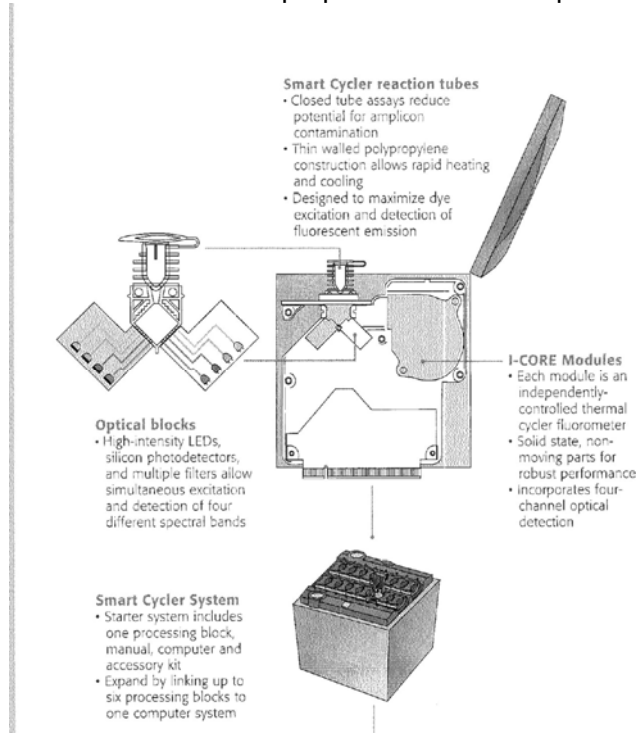


Figure VII-21 : Thermocycler

5. Le séquençage

On appelle séquençage la détermination de l'ordre d'enchaînement des quatre bases, permettant de lire le message codé. Considéré au départ comme beaucoup plus difficile que celui des protéines (4 bases contre 20 acides aminés), le séquençage du ADN est maintenant une technique de routine pour les laboratoires spécialisés, grâce à la mise au point de méthode puissante: c'est lui qui identifie en dernier ressort et sans ambiguïté un acide nucléique. Bien qu'il doive sans doute rester l'apanage de laboratoires spécialisés, il est intéressant d'en connaître les principes. Des appareils automatisés sont actuellement commercialisés (coût de l'ordre de 150 000 €). Comme pour les protéines, l'application des techniques décrites ci-dessous aux longues chaînes impose la coupure préalable par plusieurs types d'enzymes de restriction permettant ensuite le réalignement en bonne place des petits morceaux séquencés.

a. La méthode chimique de Maxam

Elle utilise des produits coupant sélectivement à la suite d'un nucléotide précis. Si le produit est employé à faible concentration, il y a apparition de fragments de différentes longueurs, mais se terminant tous par le même nucléotide que l'on marque au phosphore ³². On renouvelle l'opération pour chaque type de nucléotide et on réalise une électrophorèse en gel de polyacrylamide, en parallèle pour les quatre incubations. Après révélation par autoradiographie, la lecture est immédiate et peut même être

réalisée par stylo optique (le résultat de l'autoradiographie est l'équivalent d'un système code-barre). Cette technique est pratiquement abandonnée au profit de la méthode enzymatique de Sanger

b. La méthode enzymatique de Sanger (figure VII-22)

Elle utilise le fragment de Klenow, les nucléotides radioactifs permettant la synthèse et le marquage du brin complémentaire de celui dont on cherche la séquence, et une faible concentration d'un didésoxynucléotide (qui arrête la réplication). La séquence à déterminer est insérée dans le phage simple brin M13. Comme dans la méthode de Maxam, la faible concentration de didésoxynucléotide génère des fragments de longueur variable, mais se terminant tous par le même didésoxynucléotide. En renouvelant l'opération avec les trois autres didésoxynucléotides dans trois autres tubes, après électrophorèse du contenu des 4 tubes et autoradiographie, la séquence complémentaire est lue comme précédemment et on en déduit la séquence cherchée. Une modification astucieuse permet de simplifier les choses : on utilise des didésoxynucléotides portant un fluorochrome dont la couleur est spécifique d'une base ; une seule incubation dans un seul tube et une seule électrophorèse capillaire donnent directement la séquence complémentaire, qui peut être lue automatiquement par un faisceau laser en fin de capillaire, identifiant la couleur portée par le fragment.

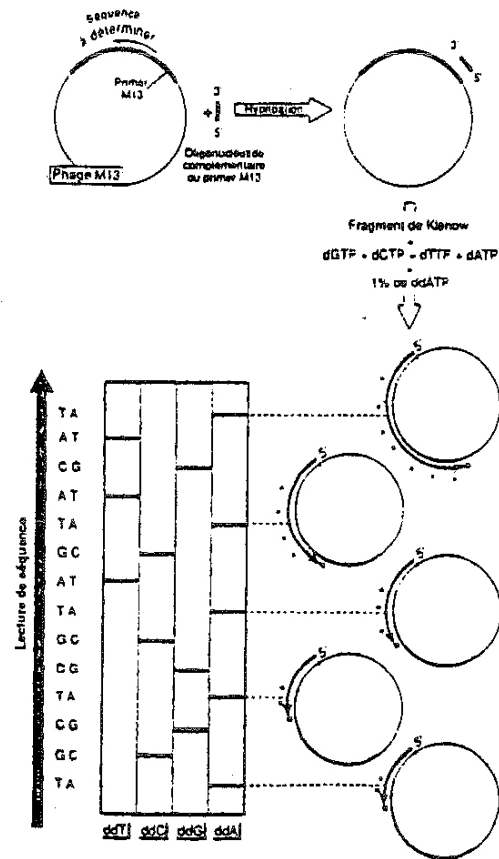


Figure VII-22 : principe du séquençage selon la technique de Sanger

VII. Quelques applications diagnostiques

Les applications diagnostiques sont potentiellement innombrables! Un nombre important et en croissance perpétuelle est déjà réalisé en routine dans les laboratoires spécialisés habilités à manipuler les radio-éléments (et à l'aide dans certains cas de kits commercialisés). Les plus grands développements et la diffusion des méthodes sont attendus de l'amélioration des sondes froides, de la simplification et de l'automatisation des méthodes, d'une meilleure connaissance en ce domaine du

corps médical et des biologistes. La diffusion des méthodes contribuera à faire baisser les coûts. Ce dernier point est très souhaitable, puisqu'il est fort probable que la plupart des examens, ou au moins un grand nombre, s'additionnera à ce qui est déjà réalisé, sans le remplacer totalement.

Les applications intéressent tous les domaines de la médecine ! On se limitera donc à une approche synthétique davantage fondée sur des données méthodologiques.

1. Techniques directes sur ADN total

Les techniques directes consistent dans la mise en évidence à l'aide d'une sonde d'une séquence particulière dans un ADN total (non fractionné). Il n'y a donc pas de traitement enzymatique ni de séparation électrophorétique. Ce sont les techniques appelées à recevoir les plus grands développements commerciaux, quand elles seront réalisables avec des sondes froides, directement sur le milieu biologique, sans extraction ni purification préalable de l'ADN.

Les méthodes appliquées sont l'hybridation sur support solide (dot blot), en milieu liquide ou in situ.

Schématiquement, on peut distinguer trois groupes de tests posant des problèmes techniques et d'interprétation parfois différents.

a. Tests de confirmation

Ces tests posent peu de problème, car le diagnostic est déjà pratiquement fait. Deux exemples :

- confirmation de l'identité d'un germe : ses caractéristiques morphologiques, culturelles et biochimiques déterminent les sondes à appliquer. L'ADN est en quantité suffisante. Ces tests présentent un intérêt pour une taxonomie précise et l'épidémiologie.

- confirmation du diagnostic d'une maladie génétique dont la mutation génique est connue, unique et fixe : on réalise des hybridations comparatives avec une sonde pour le gène muté et une sonde pour le gène normal.

b. Tests de détection

On recherche la présence ou l'absence d'un gène précis ; l'interprétation doit être nuancée: la présence d'un gène ne signifie pas qu'il soit exprimé ou même fonctionnel. Comme exemples (non exhaustifs !) :

- gène d'un agent infectieux soupçonné être à l'origine de la maladie (hybridotest Pasteur pour l'hépatite virale). La technique PCR permet de détecter le génome avant la conversion sérologique (diagnostic plus précoce), en l'absence de séroconversion (immunodéprimés), ou en présence des anticorps maternels chez le nouveau-né.

- gène révélant une potentialité pouvant orienter le traitement :

- + gène de la pénicillinase pour évaluer la possibilité de résistance d'une bactérie à la pénicilline : le test ne remplace pas pour le moment l'antibiogramme : le gène peut être absent et le germe résistant par un autre mécanisme; le gène peut être présent mais non exprimé et le germe est sensible.

- + gène de résistance spontanée aux anticancéreux: présence du gène de la glycoprotéine P

- + quantification de la surexpression ou de l'amplification d'un oncogène dans certaines tumeurs.

c. Tests d'identification

Dans ce genre de tests, on ne trouve que ce que l'on cherche: on fait donc appel à des batteries de sondes. Ces tests sont utiles quand on soupçonne la présence d'un agent pathogène poussant mal sur les milieux de culture standard ou présentant des caractères biochimiques peu fiables ou poussant très lentement (bacille de la tuberculose). Mais la présence de contaminants est un problème et ces tests sont à réserver à des types de prélèvements normalement stériles (sang, LCR), sinon on risque de toujours trouver quelque chose, mais qui n'aura peut être rien à voir avec la pathologie !

2. Techniques indirecte après fragmentation de l'ADN

Ces techniques indirectes font appel à la coupure du ADN, par des enzymes de restriction, suivie par la séparation électrophorétique des fragments. Ceci nécessite l'extraction, la purification et éventuellement l'amplification de l'ADN. On étudie ici le polymorphisme des fragments de restriction ou RFLP (sigle anglais consacré par l'usage : restriction fragment length polymorphism). Les fragments peuvent être étudiés dans leur totalité (empreinte génétique) ou après révélation par des sondes.

a. Empreinte génétique

La totalité des fragments séparés est révélée par un composé spécifique (bromure d'éthidium). La position et l'intensité des bandes sont caractéristiques d'un individu. L'utilisation de plusieurs enzymes de restriction donne une probabilité pratiquement nulle de trouver deux individus ayant les mêmes empreintes.

Ces tests commencent à être appliqués sur demande judiciaire et acquièrent une valeur juridique (ceci implique que les réalisateurs soient considérés comme experts, puisque les conséquences sont graves) :

- en identification positive (crime, viol) : comparaison de l'empreinte du suspect et de l'empreinte de l'ADN du sperme, du sang ou des cheveux prélevés sur la victime
- en identification négative, notamment dans les recherches ou exclusions de paternité: il faut comparer les empreintes du père, de la mère et de l'enfant pour pouvoir affirmer ou exclure la compatibilité de paternité.

b. Avec sonde

Les problèmes d'interprétation peuvent devenir très complexes et parfois il est même impossible de conclure. Deux situations tranchées sont possibles :

1. Le gène et sa séquence sont connus : c'est l'analyse directe.

- on utilisera une sonde génique (mettant en évidence les remaniements importants) ou oligonucléotidique (plus sensible aux mutations ponctuelles). Le cas le mieux connu et utilisé en diagnostic est celui d'une mutation ponctuelle fixe qui supprime ou ajoute un site de restriction (figure VII-23). Le gène muté sera coupé différemment du gène normal, donnant des fragments de longueur différente, séparés par électrophorèse et détectés par la sonde.

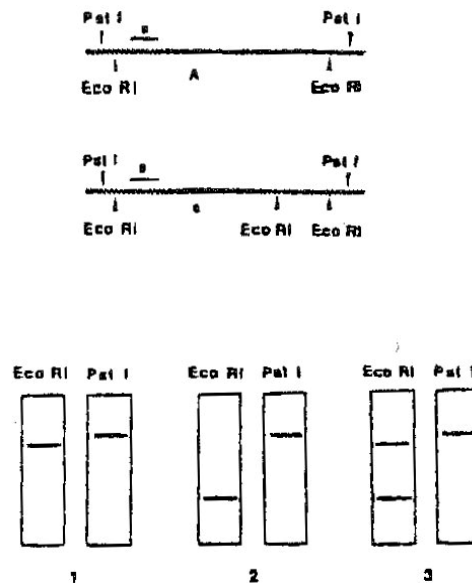


Figure VII-23 : Étude des fragments de restriction d'un fragment d'ADN, utilisant une sonde B et les enzymes Eco RI et Pst I.

La même technique peut être utilisée sans sonde, à partir d'un produit amplifié par PCR.

- les difficultés sont de plusieurs ordres: la grande taille de certains gènes, l'hétérogénéité génétique normale (un gène normal peut présenter plusieurs allèles différents) et pathologiques (60 types de mutation ont été décrits pour une maladie touchant la synthèse de l'hémoglobine, la thalassémie) .

- toute anomalie de résultat (position des bandes inhabituelle, absence de révélation par les sondes normales et mutées) conduira à réaliser le séquençage qui seul identifiera sans ambiguïté le gène et son anomalie.

2. Le gène et sa séquence ne sont pas connus

Seule l'analyse indirecte est possible, lorsque le gène est positionné par rapport à plusieurs marqueurs révélés par les enzymes de restriction (marqueur RFLP) ou par des sondes. De tels marqueurs RFLP révélés par des sondes dites anonymes (ne correspondant pas à un gène précis) sont régulièrement publiés pour servir dans ce but. Cette technique a déjà été évoquée à propos de la génétique inverse. L'interprétation en est délicate, et entachée de certaines incertitudes.

- les nécessités :

+ il est indispensable de pouvoir réaliser le test sur plusieurs membres de la famille, le plus grand nombre possible

+ il faut que les sujets soient informatifs: seuls les hétérozygotes, ayant un gène normal et un gène muté apportent une information valable

- les incertitudes proviennent de plusieurs causes et peuvent conduire à des erreurs diagnostiques:

+ les déséquilibres de liaison entre les marqueurs et le gène de la maladie (certains marqueurs sont plus liés au gène que d'autres et ont plus de valeur). Il est préférable aussi de disposer de marqueurs situés de part et d'autre du gène muté inconnu: leur présence simultanée est alors un argument intéressant.

+ on ne peut jamais exclure une mutation de novo (1/3 des hémophilies) : l'analyse des marqueurs a conclu à un gène normal, alors qu'il "vient" de muter

+ on ne peut pas exclure les recombinaisons (crossing-over) des marqueurs extragéniques, d'autant plus fréquente que la distance entre le gène et le marqueur est plus grande.

On estime que, actuellement, on connaît environ 1000 gènes humains et que 50 fois plus reste à découvrir: c'est dire que le domaine de l'analyse indirecte, malgré ses limites, a encore de beaux jours!

3. Techniques à partir des ARN messagers

Avec les techniques partant des ARNm, il est possible de quantifier l'expression d'un gène parfaitement normal. Reprenons l'exemple du gène de résistance des tumeurs aux agents anticancéreux. Ce gène est présent dans le patrimoine génétique des cellules et sera donc toujours retrouvé par les techniques partant de l'ADN, qu'il s'exprime ou non. La mesure de l'ARNm spécifique de ce gène permettra justement de voir s'il s'exprime de manière plus ou moins importante et donc si la tumeur risque d'être plus ou moins sensible. L'hypothèse sous-jacente bien souvent vérifiée est que la quantité de protéine produite responsable de l'action biologique est proportionnelle à la quantité de cet ARNm. Le principe est simple :

- isolement des ARNm, par chromatographie d'affinité sur un gel poly-T ; transcription de ces ARNm en ADNc par la transcriptase inverse ;

- amplification spécifique par PCR de la séquence correspondant au gène dont on étudie l'expression ;

- détermination de la quantité d'ADNc formé en un nombre donné de cycles de PCR ou mieux en QPCR, qui sera proportionnelle à la quantité d'ARN de départ.

- le niveau d'expression est apprécié souvent en comparant à l'expression d'autres ARNm dont on sait que la quantité est assez constante quelque soit le type cellulaire et son état physiologique. On utilise très souvent dans ce but les ARNm de protéines du cytosquelette, telles que l'actine ou la myosine.

Par rapport aux techniques immunologiques repérant la protéine, l'amplification par PCR donne un gain considérable de sensibilité et permet de faire l'analyse sur de très petits fragments de biopsies.

VIII - Conclusions

Les tests de biologie moléculaire ont des avantages incontestables, mais aussi des limites et des dangers qu'il vaut mieux connaître.

Ils sont réalisables pratiquement sur n'importe quelle cellule d'un individu, puisque les potentialités génétiques existent dans toute cellule, même si elles ne sont pas exprimées. Ceci simplifie beaucoup le problème du prélèvement: c'est avantageux par exemple en diagnostic prénatal (on ne fait pas courir de risque au fœtus s'il est non atteint).

On étudie le génotype et non l'expression (phénotype) qui est variable (dépendant parfois de facteurs extérieurs), difficile à appréhender ou absente (hétérozygote). Ceci présente un grand intérêt pour le

conseil génétique. Dans ce cas, on n'étudie que la potentialité génétique et non l'expression ou la régulation du gène. Une des craintes soulevées par la biologie moléculaire est qu'on se fonde sur l'existence de ces potentialités pour des pratiques de sélection ou d'eugénisme chez l'homme. Les techniques portant sur les ARNm élargissent le champ d'application à de nombreux domaines de maladies non héréditaires.

Depuis l'apparition de la technique PCR, la sensibilité de ces tests n'a pratiquement pas de limites. Le corollaire est l'attention sourcilleuse portée aux problèmes des contaminations et à la qualité des manipulations.

La spécificité est très grande, avec pour corollaire une autre limite dans de nombreux cas: on ne trouve que ce que l'on cherche.

Enfin, si les principes sont relativement simples, la pratique est souvent beaucoup plus délicate. Il n'est pas souhaitable d'assister à un développement anarchique des techniques les plus sensibles ou d'interprétation délicate. Les erreurs techniques ou d'interprétation (parfois conditionnées par les erreurs techniques) peuvent être lourdes de conséquence. Des contrôles de qualité devront être mis en place; l'étude des résultats des contrôles de qualité effectués sur des techniques anciennes (biochimie, hématologie, bactériologie,...) ne peut qu'inciter à la plus grande prudence en ce domaine. Ainsi, très prudemment, le législateur a considéré qu'un certain nombre de tests (recherche de paternité, identification de suspects,...) ne pouvaient être réalisés que sur prescription judiciaire dans des laboratoires accrédités pour leur réalisation. On trouve cependant sur internet, venant de pays qui n'ont pas des législations aussi restrictives, des offres commerciales pour la réalisation de ces tests : un test de paternité peut être réalisé à partir de quelques cellules contenues dans un peu de salive : coller un timbre peut conduire à un test ADN à l'insu du sujet colleur....