

EXAO : quelques exemples d'expérimentation assistée par ordinateur

Édition au 23-mars-14 ATTENTION CETTE VERSION EST EN TRAVAUX !!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!

Cette partie, issue de l'ouvrage initial, a été écrite par Guy DURLIAT et en partie par Didier HIROU.
Une mise à jour devrait être faite sérieusement vu que nombre de données datent de quelques années !

L'expérimentation assistée par ordinateur (EXAO) est d'un apport considérable en sciences physiques (physique, chimie) et biologiques (biochimie, physiologie, microbiologie...) par les possibilités qu'elle offre de mise en évidence et d'étude de phénomènes en temps réel d'une part, et de leur exploitation allant jusqu'à la modélisation mathématique des lois qui les régissent d'autre part. Elle est aussi le moyen d'approcher l'automatisation de chaînes de mesures.

Les exemples suivants en donneront une idée ; les connexions - par les sorties analogiques via une interface ou directement par les prises RS232C - et le réglage des configurations, étant propres aux appareils ou capteurs et au matériel et logiciel d'acquisition, nous réduirons cet aspect au minimum nécessaire, ainsi que les modes opératoires : on trouvera des descriptions dans la bibliographie.

Sauf indication contraire, les résultats présentés ont été obtenus avec les centrales d'acquisition Orphy (GTS 8 bits, GTI 14 bits de temps de conversion respectifs 50 et 3,2 ms), les capteurs et différentes versions du logiciel d'acquisition et de traitement Régressi (pour Orphy, pour RS232, versions DOS ou Windows), matériel issu des travaux du groupe Évariste et distribué par la société Micrélec. Montages et traitements sont évidemment transposables, au moins en partie, à tout autre équipement.

pHMÉTRIE INFORMATISÉE

Les manipulations de potentiométrie visent à obtenir des courbes de neutralisation $\text{pH} = f(\text{volume})$ pour des dosages par les points d'équivalence, et afin d'étudier les espèces et réactions par la détermination des pK, l'équation de parties de courbes, ou encore la comparaison des résultats expérimentaux avec les prévisions théoriques.

Le pHmètre étant connecté à l'ordinateur, il faut coupler à l'acquisition du pH celle du volume, ce qu'on peut concevoir avec des niveaux d'automatisation plus ou moins avancés. L'exploitation des résultats - elle aussi plus ou moins avancée - est ensuite indépendante du mode d'acquisition.

Mode point par point ou "semi-automatique"

C'est la transition de la méthode manuelle : l'ordinateur capte le pH affiché par le pHmètre, l'opérateur entre au clavier les volumes successifs du réactif titrant qu'il délivre à la burette.

Montage

La figure 8 le schématise. La liaison étant configurée pour l'appareil (voie, grandeur, échelle ... dans le cas de l'interface, protocole de communication dans le cas d'une liaison par RS232), les réglages sont enregistrés dans un fichier de configuration au nom de l'appareil qu'on n'aura qu'à rappeler lors d'une connexion ultérieure. L'ordinateur est prêt pour l'acquisition : le pointeur marque le pH sur l'axe des ordonnées y de l'écran.

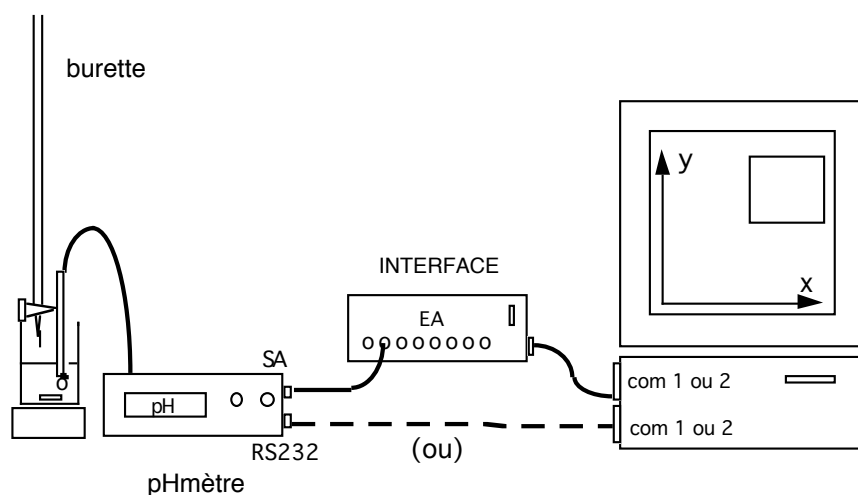


Fig. 8 : Schéma des montages possibles pour une pHmétrie semi-automatique.

SA : sortie analogique

EA : entrées analogiques

RS232 : sortie numérique

com : port série de l'ordinateur

Acquisition des couples pH/volume

On opte dans le menu d'acquisition du logiciel pour la saisie au clavier de l'abscisse x. On en définit le symbole (v) et en fixe les bornes (0 - 20 mL par exemple, cette valeur venant d'un calcul approximatif préalable).

À chaque addition de la solution titrante, on attend la stabilisation du pH et tape le volume lu sur la burette. La courbe se construit point par point à l'écran comme le montre la figure 9. Les données sont sauveées en fin d'acquisition.

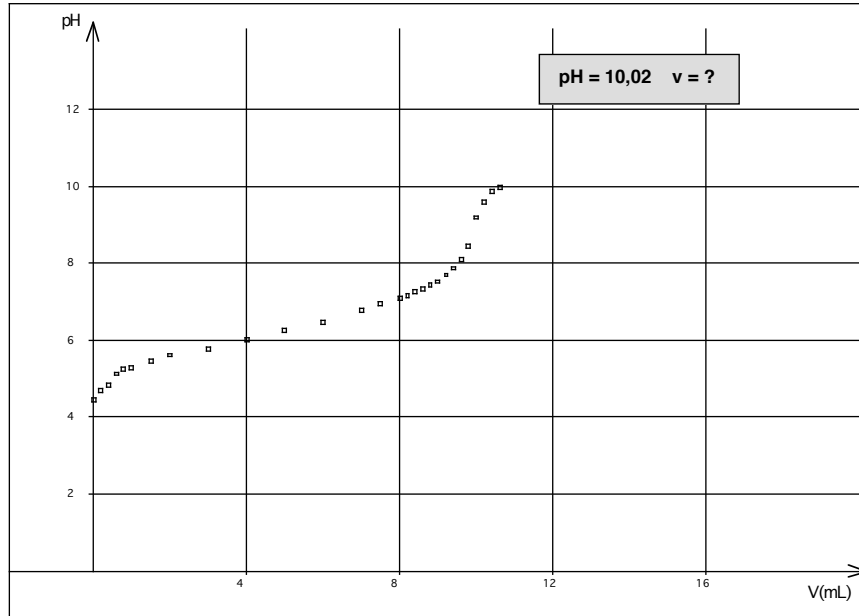


Fig. 9 : Courbe point par point pH/volume en cours d'acquisition.

Mode automatique

La chaîne d'acquisition des deux variables se rapproche d'un titrimètre. La grandeur v est acquise :

- indirectement par une mesure de temps (procédé que nous prenons comme exemple),
- ou directement à partir d'une sortie - analogique ou informatique - du distributeur du réactif.

Montage pour une acquisition pH/temps

Le réactif est apporté dans le vase à réaction par un distributeur à débit constant et connu (pompe péristaltique, seringue pour perfusion, burette automatique). Les électrodes de pH constituant un capteur à temps de réponse relativement long et un temps minimum d'homogénéisation du milieu étant requis, ce débit ne peut être élevé : de l'ordre de 1 mL/min. La figure 10 précise les éléments du montage.

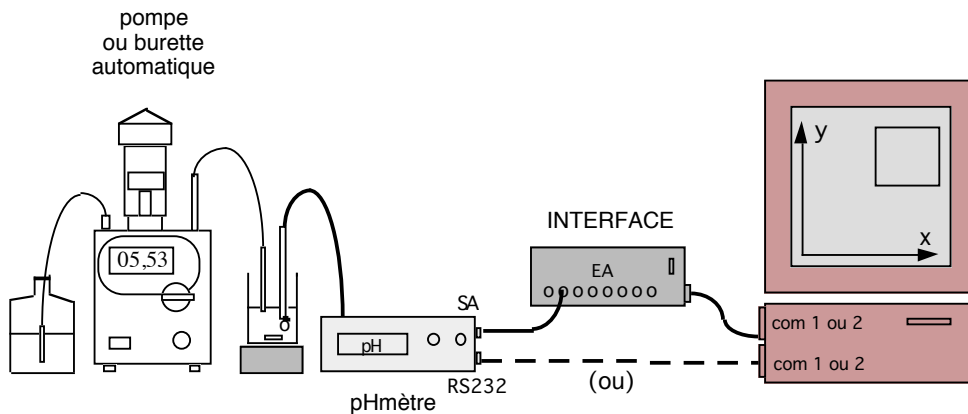


Fig. 10 : Schéma des montages possibles pour une pHmétrie automatique.

Programme d'acquisition

C'est l'abscisse temps qui est choisie, avec une durée maximale prédéterminée en fonction du débit par un calcul ou un essai préalables donnant le volume total à verser.

L'acquisition est déclenchée au moment de la mise en action du distributeur (par la frappe d'une touche, ou dans des montages plus élaborés par un signal envoyé par le distributeur). La courbe pH/t se trace à l'écran sans autre intervention. Les données sont sauvegardées. La figure 11 en représente l'aspect.

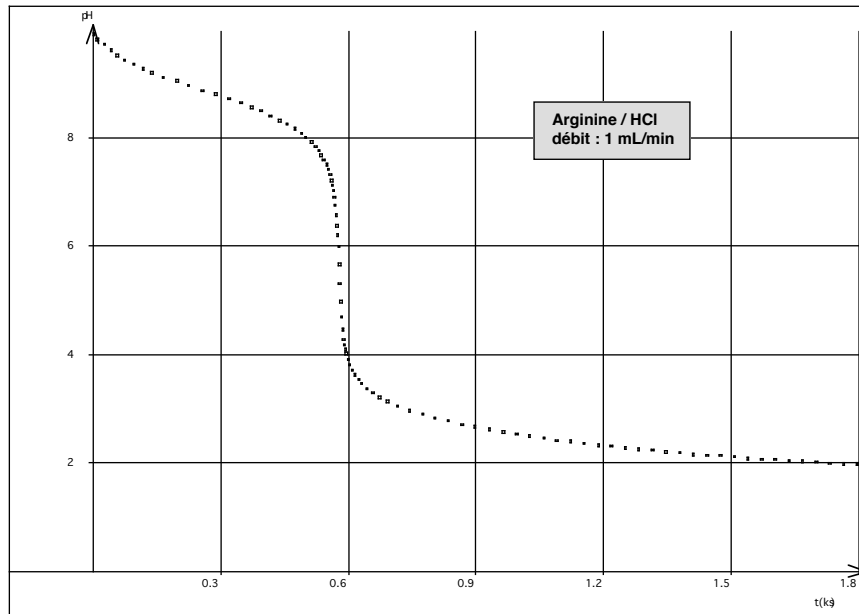


Fig 11 : Courbe pH/volume obtenue en continu.

Le premier acte du traitement va consister à créer la variable calculée v à partir du temps et du débit pour obtenir la courbe $\text{pH} = f(v)$.

Traitement des résultats

Les points sont d'abord reliés par un tracé moyen de **lissage** dont on peut choisir l'ordre, c'est à dire la puissance : plus l'ordre est élevé, plus l'algorithme donne "le droit" à la courbe de s'éloigner des points expérimentaux.

L'exploitation de base vise la détermination des points d'équivalence, ce qui peut être fait par un procédé graphique ou des calculs et superpositions.

Procédé graphique

Il est la reproduction à l'écran de la détermination - discutée ! - des points d'inflexion par la construction graphique dite des tangentes parallèles. L'activation d'un curseur "tangente" permet de positionner la tangente précédent le saut de pH ; le logiciel calcule sa parallèle et affiche les coordonnées d'équivalence. La figure 12 montre le résultat pour le dosage automatique de l'arginine, acide aminé basique, par un acide fort.

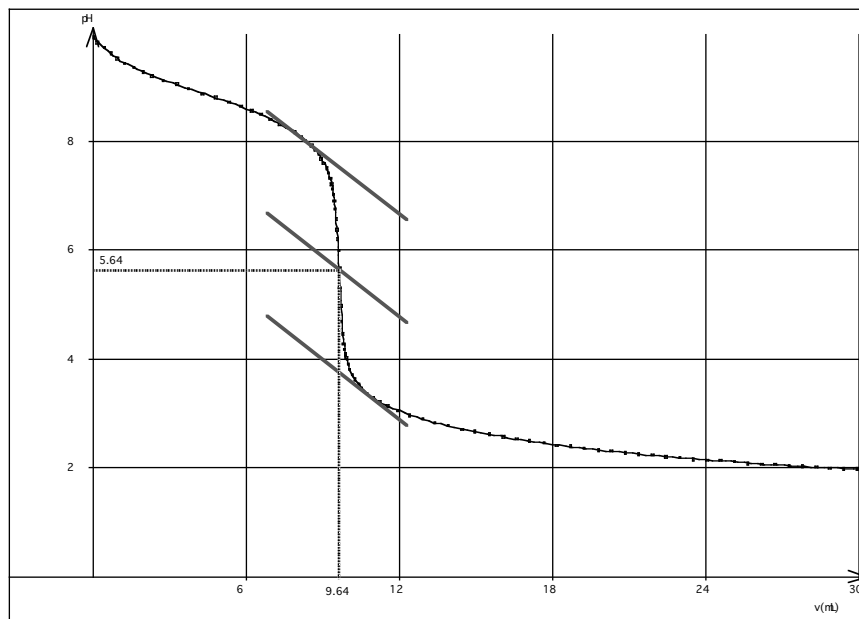


Fig. 12 : Détermination graphique des coordonnées d'équivalence par la méthode graphique des tangentes parallèles (Arginine/HCl).

Calcul des dérivées

On complète le tableau des données pH/v par le calcul de la dérivée première dpH/dv . On superpose cette variable à la courbe pH : un réticule-écran permet de projeter le maximum - ou minimum - de la courbe dérivée sur la courbe pH. Un zoom affinerait la détermination. On procède de la même façon pour la dérivée seconde.

La figure 13 reproduit l'emploi de la dérivée première pour la détermination de l'équivalence de la neutralisation par l'hydroxyde de sodium d'un acide aminé neutre, la glycine (ou glycocolle), en absence et en présence de méthanal (formol-titration de Sørensen).

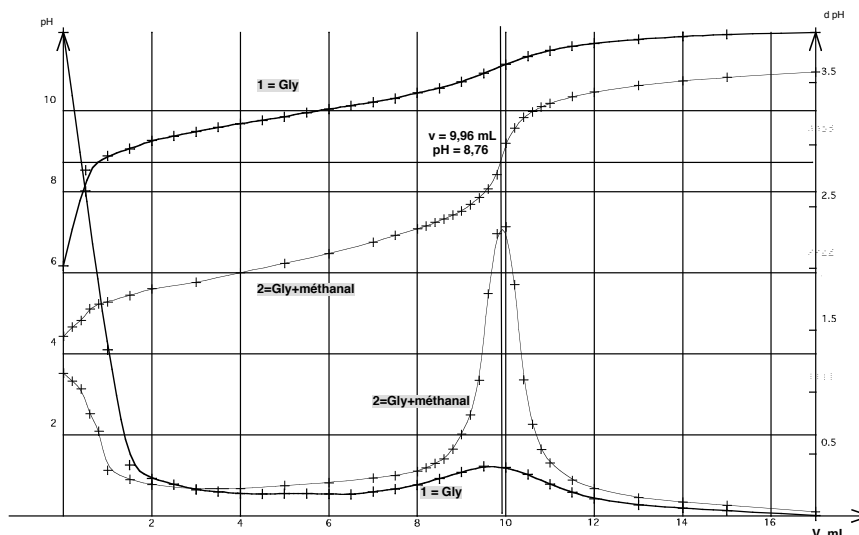


Fig 13 : Détermination des coordonnées d'équivalence par superposition des dérivées dpH/dv (Glycine/NaOH sans et avec addition de méthanal).

Compléments et développements possibles

Concernant l'exploitation des courbes

- la détermination graphique à l'écran des pK expérimentaux est rapide.
- en posant la relation théorique, les intervalles entre équivalences sont modélisables. L'équation, paramétrée par le logiciel, donne le pK et une courbe représentative qu'on superpose à la courbe expérimentale.
- le calcul des pourcentages des espèces chimiques donne une représentation linéarisée de la courbe de neutralisation ; ce qui rappelle la relation de la grandeur pH avec la concentration des protons. La figure 14 le montre pour le dosage des anions carbonates par un acide fort.
- le calcul par points de la courbe théorique correspondant au dosage - exercice classique en chimie - conduit à sa superposition à la courbe expérimentale : on révèle les limites des approximations et de la réponse des électrodes dans les zones extrêmes acide et alcaline.

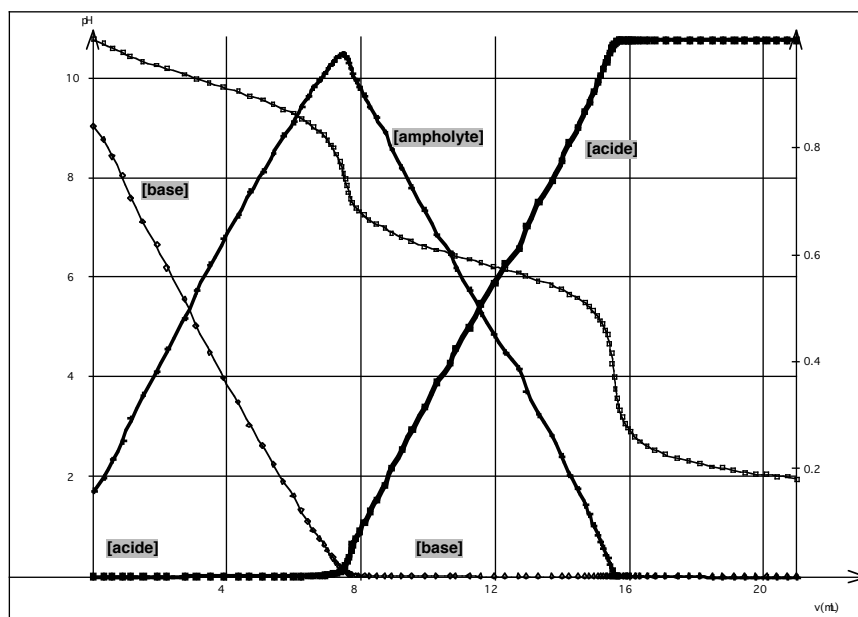


Fig. 14 : Dosage du carbonate de sodium par le chlorure d'hydrogène HCl.

Les concentrations relatives des formes basique, ampholyte et acide sont superposées à la courbe pH/v.

Concernant l'acquisition

- La connexion d'un pHmètre-millivoltmètre est l'occasion d'aborder par la pratique la question des sorties analogiques bipolaires (la sortie potentiel d'électrode) et de leur modification par les constructeurs, sur les appareils analogiques, en différentes sorties amplifiées et à zéro décalé.
- Une première courbe pH/temps peut être obtenue en laissant s'écouler la burette, ralentie, dans le vase de titration. L'équation de la fonction de vidange - donnée ou à établir - permet le passage à pH/v.
- Les courbes idéales sont celles qui ont une densité relative de relevés augmentée dans les zones d'équivalence, ce qu'on tente de faire en manipulation manuelle en réduisant les volumes de réactif ajouté. En acquisition informatique, différentes solutions sont proposées :
 - a) Le logiciel relève un maximum de valeurs pendant l'acquisition à débit constant et les trie ensuite sur le critère de la variation de la dérivée. Le mode "automatique" de Régressi procède ainsi en relevant en mémoire 1000 couples des variables.
 - b) Comme dans les titrimètres professionnels, le logiciel pilote le distributeur et asservit son débit à la variation du pH. C'est le principe du logiciel "Seraphin" (M. Schwing, distribution Logedic) pour lequel :
 - le pHmètre (Soléa-Tacussel) est connecté par sa sortie RS232 à l'ordinateur.
 - la burette automatique (Shott) est connectée par sa sortie analogique à l'interface Orphy (GTS ou GTI) : le logiciel la pilote. Deux niveaux de variation du pH sont proposés pour l'acquisition des points successifs.
- -Ces méthodologies sont applicables aux manipulations de conductimétrie, polarographie

CINÉTIQUE ENZYMATIQUE

L'acquisition en fonction du temps se prête naturellement au suivi des réactions enzymatiques par les méthodes dites cinétiques, c'est à dire sans arrêt de la réaction. L'objectif va de la simple détermination d'une activité à l'étude plus ou moins complète de la cinétique réactionnelle, cas que nous envisagerons. Les logiciels dédiés produisent directement les résultats graphiques et numériques (logiciel Enzymologie, D. Loncle, Langage et Informatique) alors que le traitement se fait pas à pas dans les logiciels ouverts (Régressi).

Le système paranitrophénylphosphate (pNPP)-phosphatase alcaline (PAL) est un des bons modèles : l'hydrolyse du substrat libère du paranitrophénol (pNP), produit coloré mesurable par spectrophotométrie. Il nous sert ici pour montrer les étapes de la détermination des constantes cinétiques V_{max} et K_m et l'étude d'un effecteur chimique : le phosphate minéral.

La chaîne d'acquisition

Le spectrophotomètre est connecté à l'ordinateur par sa sortie analogique et une interface ou directement par sa prise RS232. Les réglages faits, l'absorbance affichée par le spectrophotomètre est marquée sur l'écran de l'ordinateur par le pointeur y. La figure 14 schématise le montage.

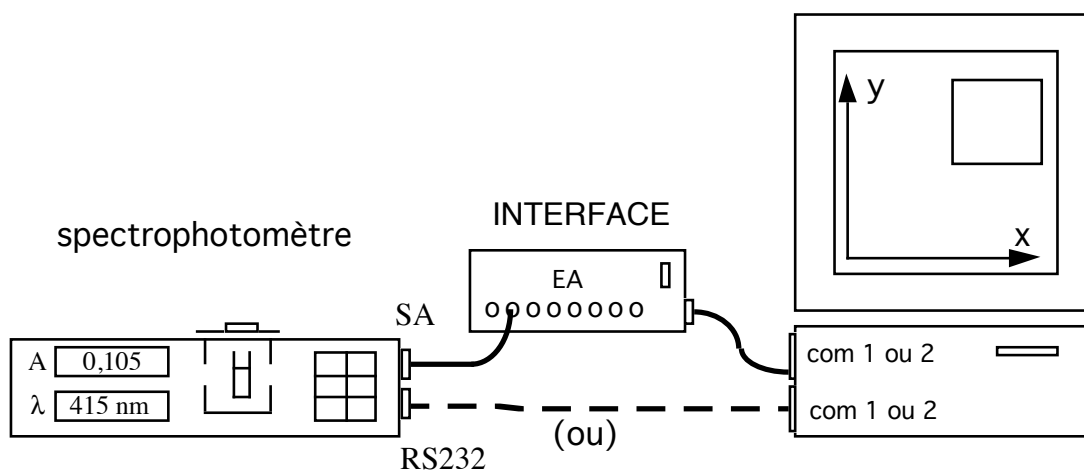


Fig. 14 : Schéma des montages possibles pour le suivi d'une réaction enzymatique dont le substrat est un chromogène.

L'acquisition à concentration croissante du substrat

L'abscisse temps est sélectionnée, avec une durée d'acquisition de 2 à 3 minutes. La gamme de concentration du substrat pNPP préparée, on déclenche la réaction pour chacun des milieux par l'addition de l'enzyme. Les acquisitions $A = f(t)$ successives sont enregistrées en les affectant de la concentration c_s du substrat. On obtient la figure 16a.

La série est reproduite en ajoutant aux milieux un volume identique d'une solution de phosphate.

Le traitement des résultats

Trois étapes : détermination des vitesses initiales v_i , étude de la fonction $v_i = f(c_s)$ puis mise en oeuvre de procédés de linéarisation.

Graphe primaire et vitesses initiales

Le module "modélisation" du logiciel permet de borner le début de chacune des courbes pour en obtenir par régression linéaire les tangentes à l'origine : les pentes sont les vitesses initiales v_i . Le faisceau des courbes à cette étape est reproduit à la figure 16b.

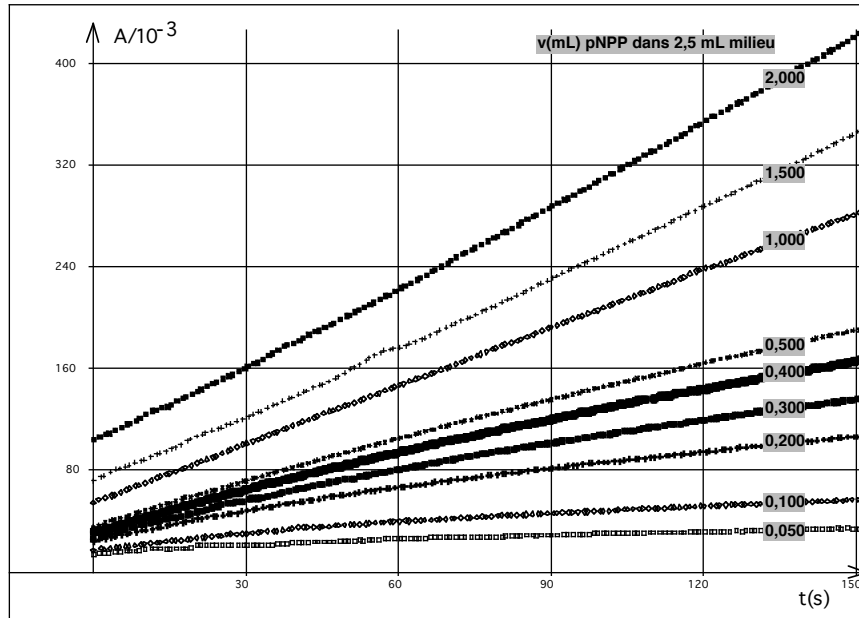


Fig. 16 : Effet de la concentration du substrat sur une réaction enzymatique.

a : Faisceau des courbes Absorbance du produit/temps pour une gamme de concentration du substrat.

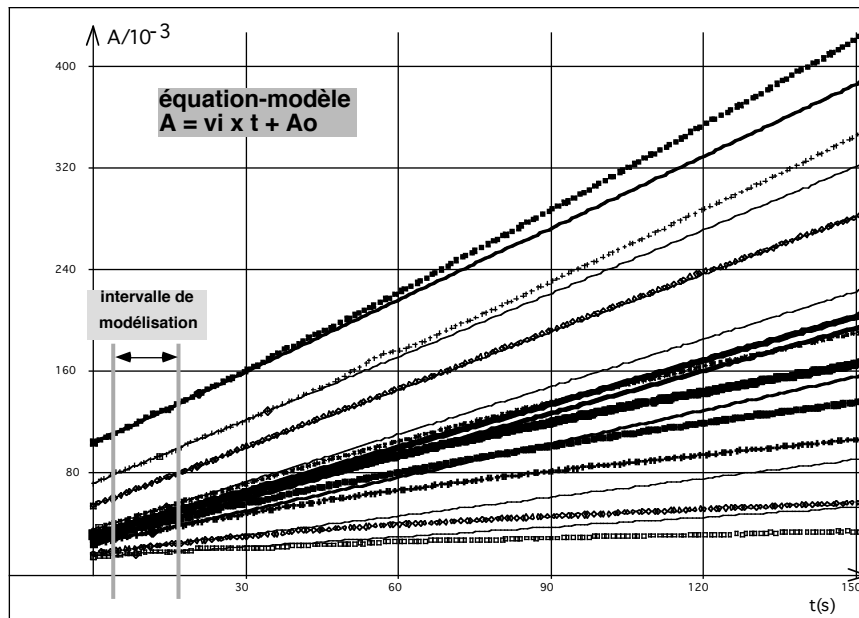


Fig. 16 : Effet de la concentration du substrat sur une réaction enzymatique.

b : Détermination des vitesses initiales par modélisation linéaire des début d'enregistrements.

Graphe secondaire et fonction $v_i = f(c_s)$

Le logiciel récapitule dans un tableau secondaire les paramètres des régressions (pente et ordonnée à l'origine) pour les concentrations successives du substrat. On représente alors $v_i = f(c_s)$ à l'écran et commande la modélisation par l'équation-modèle hyperbolique de Michaëlis. Pour cette modélisation non linéaire, l'ordre de grandeur des paramètres V_m et K_m - lisible à l'écran - doit être introduit.

La figure 17 montre ce traitement pour les résultats de l'expérience en absence et en présence de phosphates.

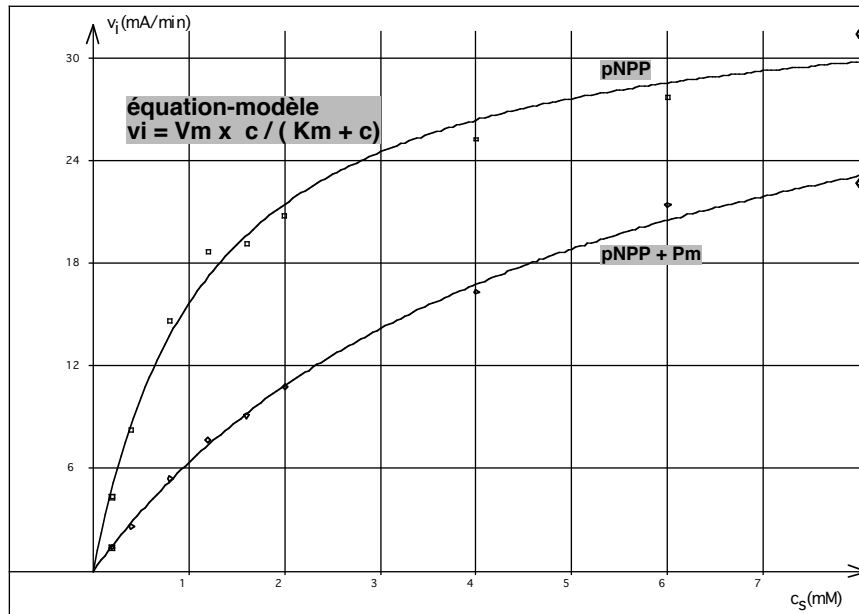
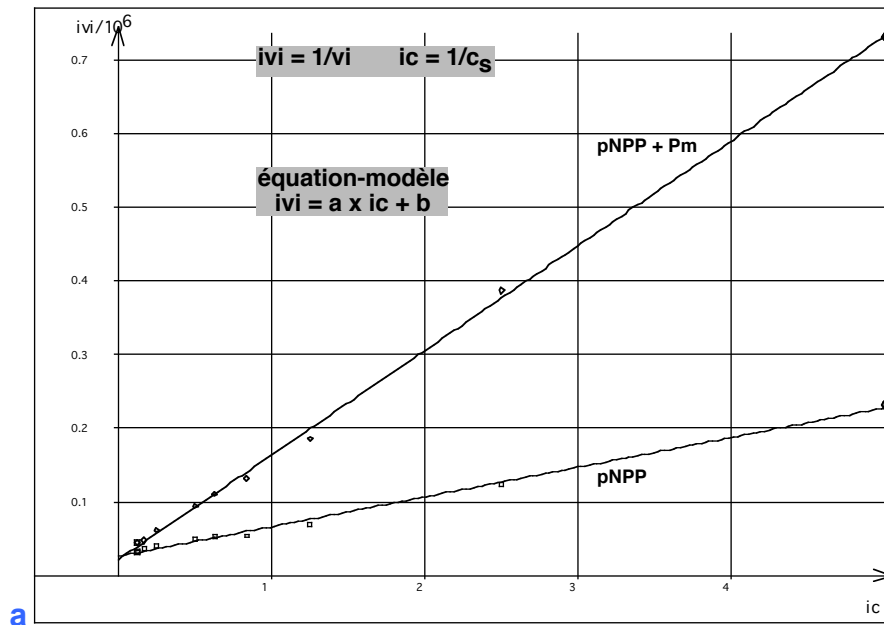


Fig. 17 : Superposition d'une modélisation hyperbolique aux données expérimentales v_i/c_s .

Les linéarisations

On sait que la représentation de la fonction de saturation $v_i = f(c_s)$ est insuffisante pour la détermination des constantes - quoique le traitement informatique apporte des éléments nouveaux. Les transformations des variables v_i et c_s pour produire des graphes linéaires sont multiples : le tableur-modélisateur est idéal pour les commander rapidement.

La figure 18a montre le résultat de la représentation classique en double inverse de Lineweaver-Burk. Le traitement par la méthode de Eadie-Hofstee (figure 18b) apporte des avantages notables : c'est l'équivalent cinétique de la représentation de Scatchard, les vitesses sont pondérées par la concentration du substrat, et, concernant le traitement informatique, l'obtention des constantes est directe.



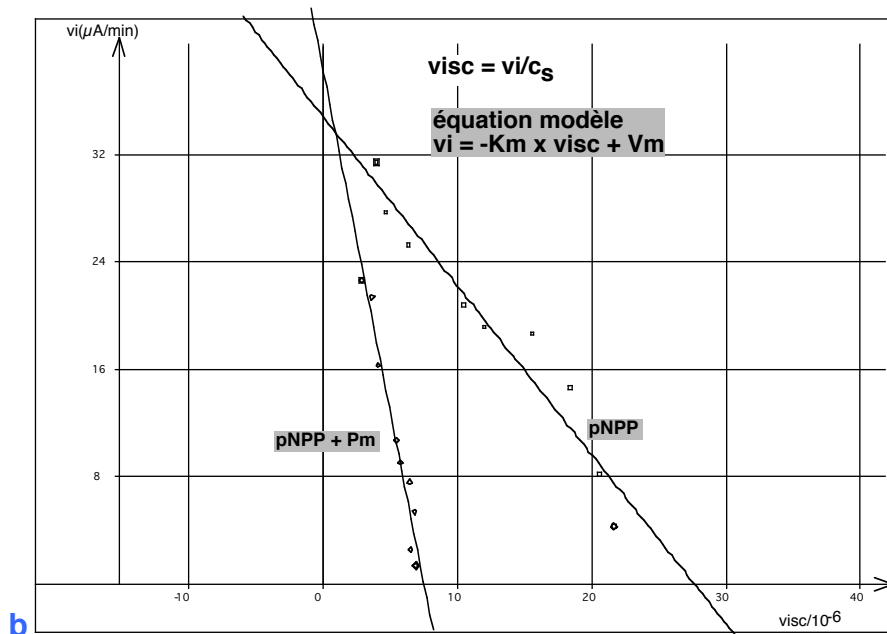


Fig 18 : Linéarisations de la fonction hyperbolique de saturation v_i/c_S .

a : par la méthode des doubles inverses : $1/v_i = f(1/c_S)$

b : par la méthode d'Eadie-Hofstee : $v_i = f(v_i/c_S)$.

Ici, l'ensemble permet de conclure à l'inhibition compétitive du système par l'effecteur étudié.

Compléments, développements

Concernant l'exploitation des résultats

Les différents procédés graphiques sont l'occasion d'une étude poussée : comparaison des superpositions modèle-points expérimentaux et des couples de constantes produits ; on leur ajoutera la représentation de Cornish-Bowden, qui s'appuie sur un traitement statistique des couples v_i/c_S (logiciel Enzymologie et version Windows de Régressi).

La courbe de Hill testera le caractère allostérique du système.

En acquisition

- Dans le cas où l'expérience est faite sans thermostatisation, une sonde de température placée dans le compartiment-cuves du spectrophotomètre contrôlera ce facteur physique. On programme alors la double acquisition Absorbance + température.
- Le choix de systèmes et de capteurs et des adaptations des protocoles ouvrent de nombreuses applications d'enzymologie. Par exemples :

a - l'oxymètre permet de suivre les réactions consommatrices ou productrices de dioxygène telles que l'oxydation du glucose par la glucose-oxydase, l'action de la catalase sur le peroxyde d'hydrogène ou encore la décomposition de l'eau de Javel par la lumière dont on mesurera l'intensité par un luxmètre connecté à l'ordinateur. Il est aussi le détecteur électrochimique le plus simple pour la confection de biocapteurs enzymatiques expérimentaux tels que l'électrode à glucose.

b - un coffret pour le dosage colorimétrique du glucose par la glucose-oxydase est utilisable pour :

- suivre à l'écran, puis étudier, la disparition d'un substrat en même temps que l'apparition du produit : on monte l'acquisition simultanée de la détection du dioxygène par l'électrode de Clark et de l'absorbance du milieu.
- démontrer les principes et établir les conditions du dosage enzymatique d'un substrat par les méthodes en point final d'une part, cinétiques - linéaire et non linéaire - d'autre part.

FERMENTATION DE GLUCIDES PAR LA LEVURE

Un montage artisanal - que la figure 19 schématise - est un bon moyen pour mettre en évidence les problèmes que pose le suivi en ligne des fermenteurs professionnels. Le réacteur est un ballon à plusieurs cols qu'on équipe d'un jeu de capteurs détectant et mesurant des paramètres intéressants pour caractériser le phénomène :

- alcool : capteur de gaz.
- dioxyde de carbone : électrodes de pH.
- dioxygène : "électrode" à oxygène.
- température : sonde thermométrique.

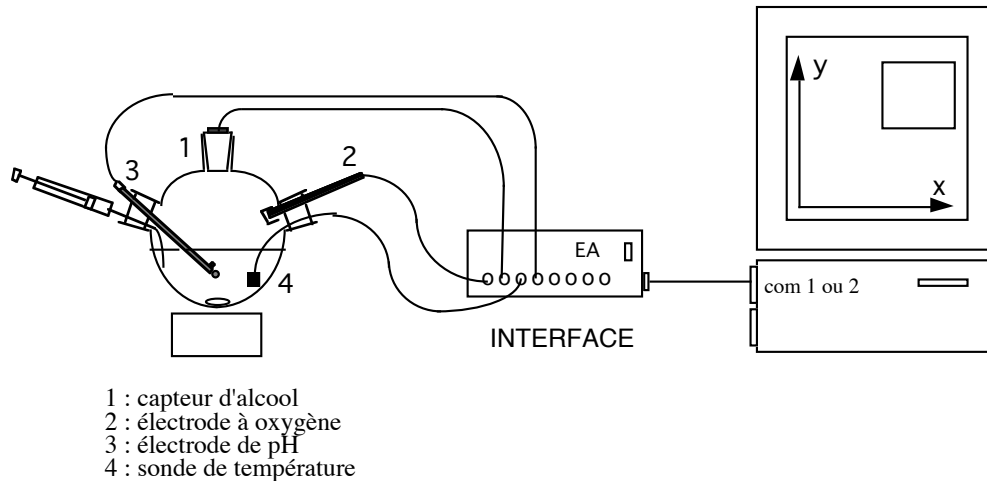


Fig. 19 : Schéma d'un montage expérimental pour le suivi mutiparamétrique d'une fermentation.

Le capteur de gaz, très sensible à l'alcool est le seul à donner une réponse en tension de forme non linéaire avec la grandeur physique. On peut en préalable poser le problème de son étalonnage.

Étalonnage du capteur d'alcool

Acquisition

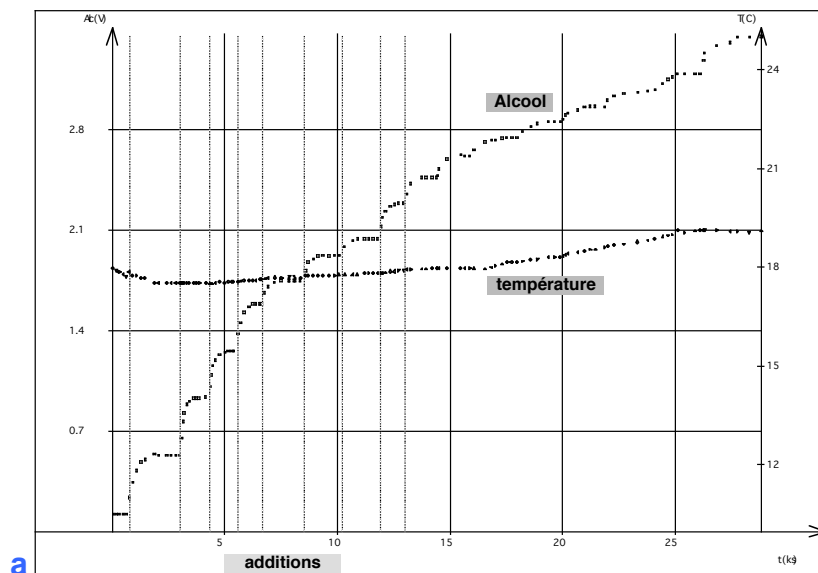
Le montage de la figure précédente est allégé de ses capteurs de pH et dioxygène, le milieu est de l'eau agitée. Un des moyens d'élever la concentration de l'éthanol est l'addition par fractions, à la seringue, d'une solution connue d'éthanol. L'acquisition de la tension délivrée par le capteur en fonction du temps donne la courbe en escalier de la figure 20a.

Traitement

On introduit dans un tableau les tensions aux paliers produites par les volumes ajoutés, desquels on déduit la concentration croissante de l'alcool. La représentation de la relation concentration/tension met on ne peut plus clairement en évidence la non-linéarité de la réponse du capteur (figure 20b).

Les spécifications techniques du capteur permettent de poser une relation théorique C/tension qu'on propose comme équation-modèle. Le logiciel la paramètre ; la superposition avec la courbe expérimentale est bonne (figure 20b).

La représentation en double logarithme, bien compatible avec une régression linéaire, confirme la réponse log/log du capteur dans la gamme de concentration testée (figure 20c).



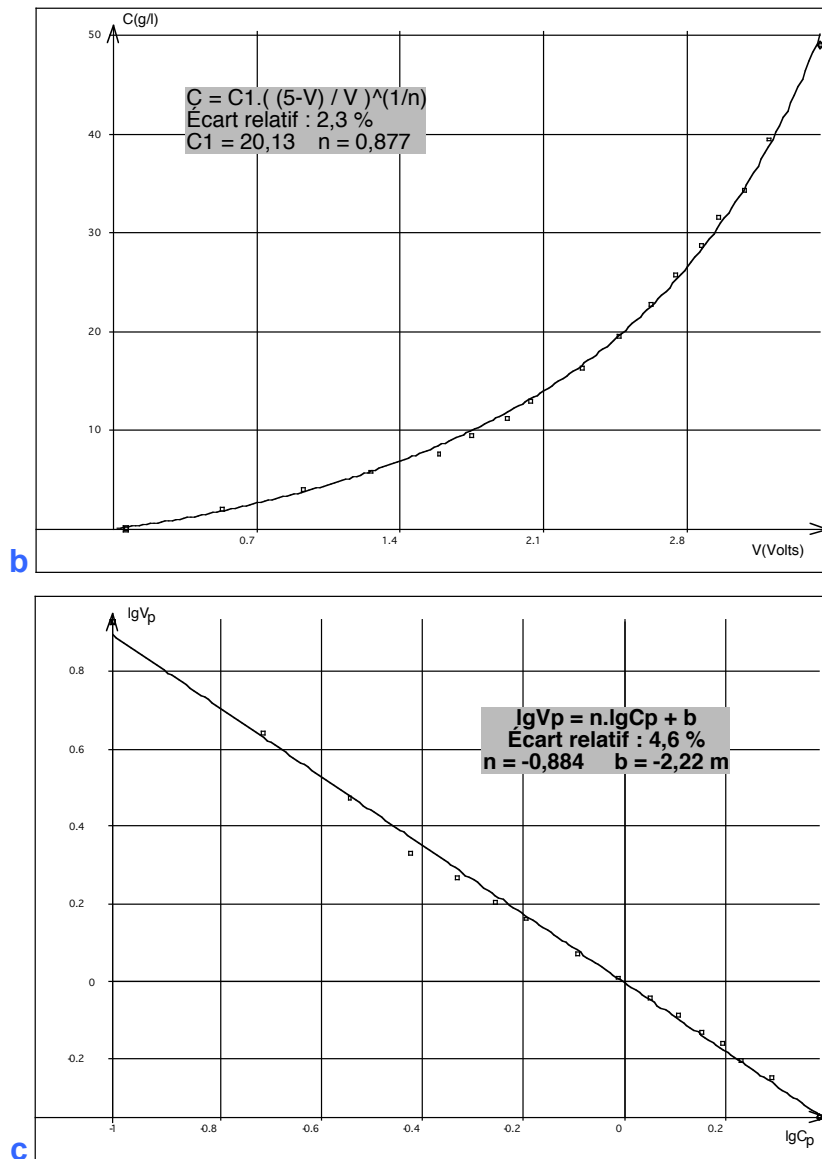


Fig 20 : Étalonnage préalable du capteur d'alcool non linéaire.
a : Réaction en tension (V) du capteur à des additions successives d'alcool.
b : Modélisation des données $C_{alcohol}/V$.
c : Transformation en fonction $\log V/\log C$ et régression linéaire.

Suivi multiparamétrique d'une fermentation

La suspension de levures introduite dans le ballon (avec un antimousse !), on programme et déclenche l'acquisition simultanée des quatre paramètres pour une durée de quelques heures. Après un temps de vérification des conditions initiales, on ajoute à la seringue quelques mL d'une solution concentrée de glucose en marquant le moment de l'addition d'un repère. L'évolution des quatre grandeurs choisies pour caractériser la fermentation est suivie à l'écran de l'ordinateur.

La figure 21 reproduit une manipulation. On voit clairement que l'ajout de l'ose à la suspension de levures provoque :

- la consommation d'oxygène : les cellules respirent le dioxygène disponible en équilibre entre les phases liquide et gazeuse.
- la baisse du pH et la production d'alcool : les levures font une fermentation du glucose en CO_2 et éthanol.
- une élévation de la température (qu'un zoom sur cette variable montrerait clairement) : le processus dégage de la chaleur.

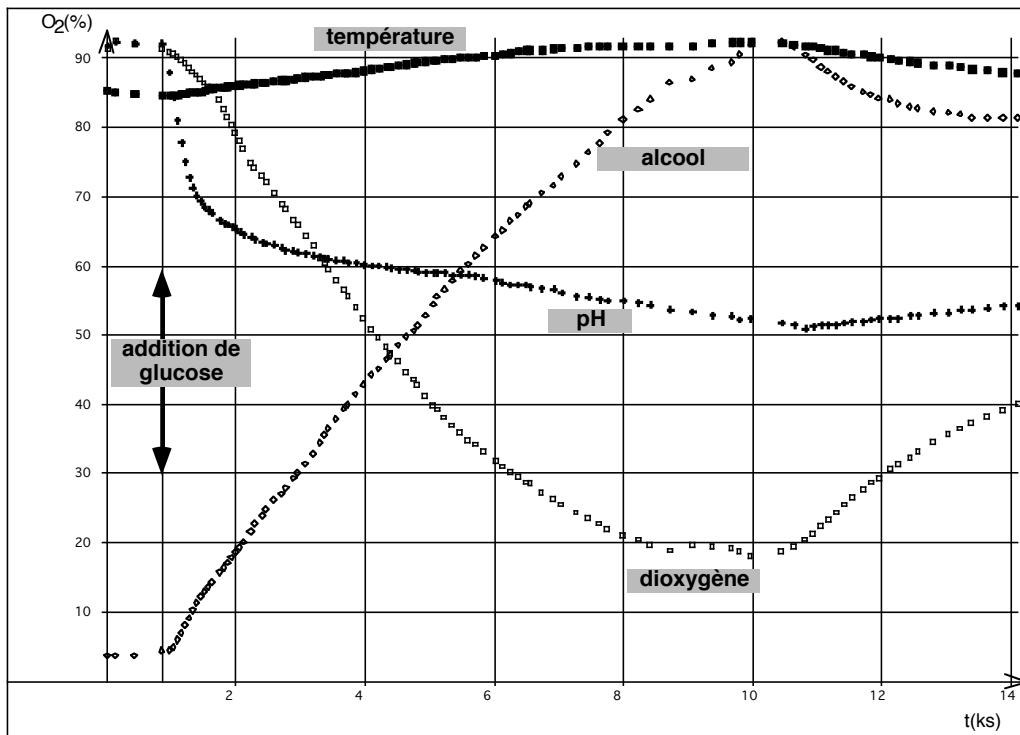


Fig. 21 : Acquisition continue des paramètres dioxygène, alcool, pH et température d'une fermentation de glucose (Glc) par les levures.

Compléments et développements possibles

À propos du montage et de la manipulation de fermentation

a) concernant l'acquisition et l'expérimentation :

- le montage est un bon exemple des problèmes que peut poser une acquisition multiparamétrique selon les capteurs et l'interface dont on dispose. Les branchements en parallèle de capteurs dépendent, on le sait, des calibres des entrées analogiques de l'interface, de la possibilité ou non d'entrées à la fois uni et bipolaires (le pHmètre peut imposer ce dernier type), et encore de l'incompatibilité de certains : l'électrode à oxygène est placée ici dans la phase gazeuse pour l'isoler de l'électrode de pH.
- la sonde de température (0 - 100 °C) peut être amplifiée pour adapter la fenêtre de sa réponse à la gamme de variation de la température de l'expérience.
- un autre protocole d'étalonnage du capteur est l'addition continue de l'alcool au moyen d'une pompe ou d'une burette automatique.
- on peut aller plus loin dans l'expérimentation :
 - en thermostatant le ballon, en étudiant l'effet de différents glucides ou de poisons aérobie ou anaérobie des levures
 - ou encore en procédant à des prélèvements du milieu liquide pour en faire l'analyse (dosages enzymatiques du glucose, de l'éthanol, Chromatographie Liquide Haute Performance ou Chromatographie en Phase Gazeuse des alcools).

b) concernant le traitement des résultats

- la fonction paramétrée issue de l'étalonnage du capteur d'alcool est appliquée à la tension enregistrée : on obtient la concentration de l'alcool dans la phase gazeuse ... avec des limites à discuter (équilibre des phases, spécificité, contrôles à envisager).
- la superposition des résultats de l'acquisition en ligne avec ceux des dosages sur prélèvements alimentera cette discussion.

Quelques autres manipulations à l'aide de ces capteurs

- le capteur de gaz peut être proposé pour la détermination du pourcentage d'alcool de solutions, boissons avec le problème de son étalonnage.
- l'oxymètre est un moyen idéal pour les études du métabolisme de suspensions cellulaires. Deux exemples :
 - les vitesses, quotient de respiration de levures, spécificité et inhibitions seront facilement étudiés par ce moyen. Un montage à double sortie - sortie analogique d'un oxymètre dirigée à la fois sur un enregistreur-papier et sur une interface couplée à l'ordinateur - permettra la comparaison entre les enregistrements analogique et numérique et leurs possibilités de traitement.
 - la mesure de la vitesse de la respiration de levures à jeun suivant immédiatement l'apport de glucose conduit à la mise en évidence d'une fonction de saturation dont la modélisation donne les paramètres : on obtient par ce moyen simple les caractéristiques cinétiques du transporteur membranaire du glucose de cet eucaryote.

ACQUISITION ET STATISTIQUES : LE CONTRÔLE DES MICROPIPETTES

Les Bonnes Pratiques de Laboratoire (BPL) imposent un contrôle rigoureux du matériel de mesure. La base en est l'analyse statistique d'une série de mesures.

Dans le cas des micropipettes automatiques, le manipulateur répète la distribution d'un même volume d'eau distillée dans des conditions physiques contrôlées : pression, température, humidité. La gravimétrie reste la référence pour l'évaluation des volumes, la balance de précision devant elle-même être préalablement étalonnée. Après les corrections nécessaires, le traitement statistique de la série produit les caractéristiques de précision (ou fidélité, ici de répétabilité) et d'exactitude (ou justesse). On les confronte aux spécifications du constructeur pour valider ou non la pipette.

L'apport de l'informatique

Sans entrer dans le détail des modalités (fréquence des contrôles, nombre de mesures, volumes à tester), on voit que le protocole peut être :

- complètement manuel : relevé des pesées dans un cahier, corrections et statistique à la calculette.
- partiellement informatisé : saisie des pesées dans un tableur avec lequel on traite la série.
- complètement informatisé : acquisition en ligne des valeurs puis corrections et statistiques par le logiciel.

Dans le cas de cette dernière option, la connexion de la balance ne peut se faire - en général - par sa sortie analogique. Son niveau (quelques Volts au mieux pour la portée totale) n'est pas compatible avec la précision requise (le dixième de mg pour les volumes supérieurs à 100 μ L). Seule une sortie RS232 convient. La figure 22 représente le montage. La balance (Précisa) offre le choix d'un certain nombre de paramètres de la transmission : vitesse, bits de données et d'arrêt, parité, envoi continu après stabilisation... qu'on enregistre dans le menu "configuration" du logiciel (Régressi versions Série ou Windows).

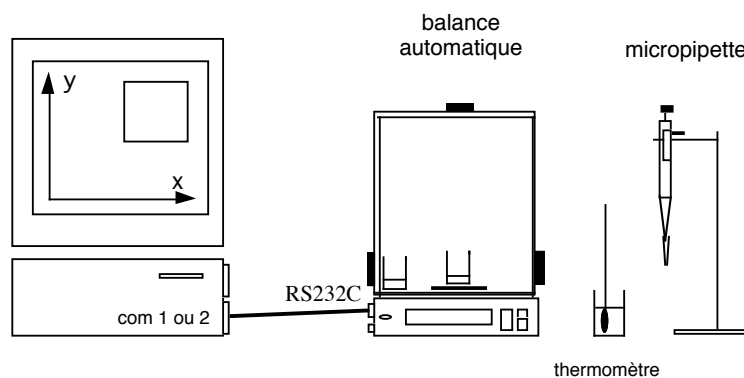


Fig. 22 : Dispositif pour le contrôle de micropipettes.

Un exemple de manipulation

Micropipette à contrôler : 1000 μ L à volume variable.

Points de contrôle : volume minimum ou "point bas" : 200 μ L.
volume maximal ou "point haut" : 1000 μ L.

Nombre de mesures : 30.

Conditions : température 25 °C (elle devrait être voisine de 21 °C).
pression atmosphérique : proche de 1013 hPa.

L'acquisition

Le matériel préparé - béccher d'eau pour saturer l'atmosphère de la balance, température de l'eau à prélever, cône de la pipette - et la communication balance-ordinateur vérifiée, on opte pour une acquisition avec abscisse "numéro" : les pesées successives (m) seront affectées d'un numéro (n) incrémenté. Pour chacune des distributions de l'eau, l'opérateur n'a qu'à accepter l'acquisition par la frappe d'une touche. L'écran montre le graphique des valeurs. L'enregistrement en fin de série donne les colonnes n/m du tableau 3.

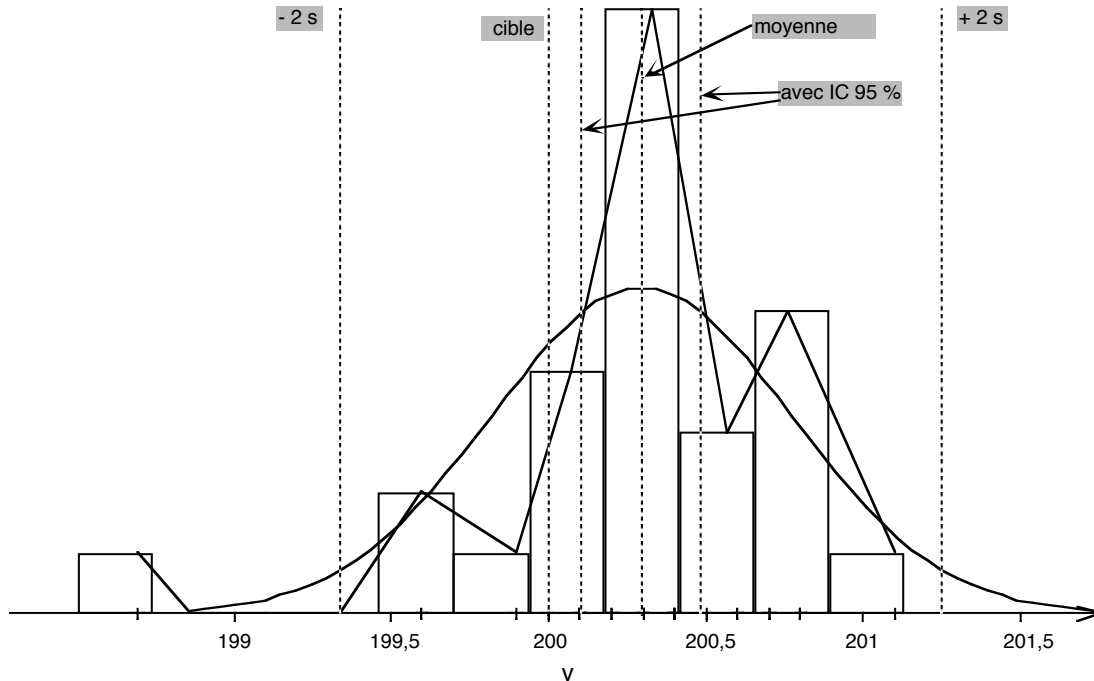
Tableau 3 : Aspect du tableau des données : les masses enregistrées sont transformées en volume par l'application d'un calcul.

contrôle P1000 H19886H ; novembre 96.		
25 °C, 1013 hPa : facteur Z = 1,0035		G.D.
n = numéro pesée ; m = masse ; v = volume		$v = m \cdot 1000 \cdot Z$
n	m (g)	v (μ L)
1	0,1980	198,7
2	0,1992	199,9
3	0,1997	200,4
4	0,1999	200,6
5	0,1994	200,1
6	0,2001	200,8
7	0,1999	200,6

6.4.2.2- Le traitement

- on élimine les points manifestement faux (dus à des erreurs grossières comme la non-remise à zéro de la balance).
- on commande la conversion des masses en volumes par l'application d'un coefficient Z - des tables le donnent. Sa valeur est fonction des masses volumiques de l'eau et de l'air dépendantes des conditions de pression et de température. On peut, à cette étape, prendre en compte l'effet d'évaporation pendant les mesures (on aura pesé un récipient d'eau maintenu dans la chambre de pesée en début et en fin de série).
- on ouvre le module statistique du logiciel pour obtenir :
 - l'histogramme des fréquences du volume et la précision - écart-type et coefficient de variation CV.
 - l'exactitude, après entrée de la cible - le volume affiché sur la pipette - mesurée par l'inexactitude absolue et relative.

La figure 23 représente le résultat d'une série pour le volume 200 μL .



taille	27
moyenne	200,29
IC à 95 %	200,11 - 200,48
IC à 99 %	200,04 - 200,55
étendue	198,69 - 201,10
écart-type (s)	478,42m
coeff de variation (CV)	0,24 %
cible	200,00
inexactitude	+ 294,88m
inexactitude relative	0,15 %

Fig. 23 : Histogramme des fréquences et caractéristiques de la distribution produits par le module "statistiques" du logiciel.

6.4.2.3- Le résultat

Le tableau 4 compare les résultats du contrôle avec les spécifications du fabricant (matériel Gilson). On voit que la micropipette est satisfaisante pour le volume 200 μL , mais que pour 1000 μL sa précision est en défaut (le nombre de mesures est réduit, il est vrai, mais les contrôles de routine préconisent 10 voire 5 essais).

Tableau 4 : Comparaison des résultats du contrôle avec les spécifications du constructeur.

pipette 1000 µL à volume variable			précision (fidélité) (erreur de répétabilité)		exactitude (erreur de justesse)	
			s (µL)	CV (%)	absolue (µL)	relative (%)
contrôle	n	Moyenne (µL)				
v = 200 µL	27	200,3 <i>200,9</i>	0,48 <i>0,48</i>	0,24 <i>0,24</i>	0,29 <i>0,87</i>	0,15 <i>0,44</i>
v = 1000 µL	14	998,1 <i>998,6</i>	2,02 <i>2,02</i>	0,20 <i>0,20</i>	- 1,91 <i>- 1,33</i>	0,19 <i>0,13</i>
Spécifications du constructeur						
v = 200 µL			< 0,6	< 0,30	± 3,0	± 1,5
v = 1000 µL			< 1,5	< 0,15	± 8,0	± 0,8
n : nombre de mesures s : écart-type, CV : coefficient de variation en italique : valeurs après correction d'évaporation.						

Compléments et développements possibles

6.4.3.1- Aspect acquisition :

- les performances de la balance peuvent être l'objet de réflexions sur la façon de l'étalonner ou la sensibilité requise (0,01 mg pour les volumes inférieurs à 100 µL par exemple).
- les données de sortie analogique de la balance et de capacité de conversion de l'interface disponible conduiront au calcul et à la discussion de la précision obtenue sur la grandeur physique (la masse) numérisée. Dans le cas de la balance Précisa du montage présenté, la sortie analogique est de 1 ou 10 V pour la portée de la balance : 200 g ; on emploie des interfaces 8, 12 ou 14 bits.
- l'envoi en continu par cette balance, d'une chaîne dont, par ailleurs, les valeurs numériques sont séparées par un caractère ASCII atypique posent des problèmes de réception et de tri par l'ordinateur qu'on pourra évoquer.

6.4.3.2- Aspect traitement

- Le tableur Régressi, ou tout autre, pourra être employé à la reconstitution des valeurs du coefficient Z en fonction d'une gamme de température (15 - 30 degrés C) et pour différentes pressions (de 800 à 1100 hPa) sur les données de la Norme ISO 4787 concernant la verrerie de laboratoire et les tables du Handbook of Physics and Chemistry. Beau problème qu'on peut résoudre de différentes façons allant de multiples saisies à l'établissement de fonctions modélisées qu'on introduit dans le calcul.
- La question de la correction des masses due à l'évaporation pendant la série de pipetages est un sujet à discuter tant dans la façon pratique de l'évaluer que dans celle de l'appliquer.
- Le programme statistique est l'occasion de poser le problème du traitement de séries réduites. Et d'évoquer les bases du contrôle de qualité (CQ) - des appareils et des méthodes - en général.

Indications bibliographiques

- J-A. Montagnon. Architecture des ordinateurs, tome 3 "Entrées-Sorties" (Éditions Masson).
- J. Campbell. L'interface RS232 (Éditions Sybex).
- H. Lilien. Interfaces pour microprocesseurs et micro-ordinateurs (Éditions Radio).
- B. Loriferne. La conversion analogique-numérique et numérique-analogique (Éditions l'Usine Nouvelle).
- N. Ichinose et T. Kobayashi. Guide pratique des capteurs (Éditions Masson).
- G. Ash. Les capteurs en instrumentation industrielle (Éditions Dunod).
- Brochures du groupe Évariste (DISTNB (Ministère de l'Éducation Nationale) - CNAM, 292, rue Saint Martin, 75141 Paris cedex 03) éditées par le CRDP de Champagne-Ardenne, 47, rue St Simon, 51100 Reims (en particulier tome 1 : Informatique et Électronique").
- Brochures "Interfaces à usages pédagogiques" et "Acquisitions et Analyse de données" de l'Union des Physiciens, 44, bd St Michel, Paris cedex 06.
- Brochure Apple "Acquérir, traiter, analyser", Apple Computer France, Z.A. de Courtaboeuf, 91956 Les Ulis cedex.
- Documentation technique de l'interface Candibus. Langage et Informatique, 8 avenue Edouard Serres, 31770 Colomiers.
- Documentation technique des interfaces Orphy et des capteurs Évariste-CNAM ; distribution Micrélec 4, place Abel Leblanc, 77120 Coulommiers.
- Logedic, 40 boulevard des Alliés, B.P.168, 70003 Vesoul cedex.
- Documentation technique concernant le contrôle des micropipettes des firmes :
 - Biohit, 2, rue du Grand Chêne, B.P. 5, 78830 Bonnelles.
 - Gilson, 72, rue Gambetta, B.P. 45, 95400 Villiers-le-Bel.

- Théorie et Protocoles de manipulations d'acquisition :
- l'Opéron, bulletin de l'UPBM (Union des professeurs de Physiologie, Biochimie et Microbiologie, Lycée La Martinière Duchère, avenue A. Sakharov, 69338 Lyon cedex 9). En particulier :
 - spécial informatique : XVI, 1990, n°3-4.
 - pHmétrie : XVII, 1991, n°2.
 - enzymologie : XVIII, 1992, n°1.
 - électrode O₂ : XIX, 1994, n°4.
 - capteur alcool : XX, 1995, n°3 et 4
 - contrôle des pipettes automatiques : à paraître.

Corrélat :