

## CHAPITRE 3

# SPECTROPHOTOMÉTRIE & TURBIDIMÉTRIE

### Objectifs :

- Comprendre le principe de la spectrophotométrie et de la turbidimétrie.
- Identifier la grandeur mesurée et le type de signal obtenu.
- Distinguer absorbance, atténuation et diffusion lumineuse.
- Reconnaître le domaine de mesure, la limite de linéarité et les points critiques de la technique.
- Comprendre le rôle de l'étalonnage dans un dosage spectrophotométrique

La **spectrophotométrie** et la **turbidimétrie** sont parmi les techniques les plus utilisées en biologie médicale. Elles permettent d'obtenir rapidement un signal fiable à partir d'un échantillon, en exploitant l'interaction entre la **lumière** et la **matière**. Qu'il s'agisse de doser une enzyme, mesurer une concentration en protéines, suivre une réaction enzymatique ou évaluer la présence de particules en suspension, ces méthodes sont au cœur de nombreux automates et protocoles de routine.

La spectrophotométrie repose sur la mesure de la **lumière absorbée** par une solution, tandis que la turbidimétrie mesure la **lumière atténuée** lorsqu'un échantillon contient des particules. Ces deux approches permettent d'obtenir un signal proportionnel à la quantité d'analyte ou au degré de trouble de la solution.

Ce chapitre vous aidera à comprendre comment ces techniques fonctionnent, quel type de signal elles produisent, quelles sont leurs limites, et comment les utiliser correctement pour obtenir un résultat fiable. Vous verrez également en quoi elles sont essentielles à de nombreux dosages rencontrés au laboratoire.

# ABSORBANCE, ATTÉNUANCE ET DIFFRACTION

## 1 L'ABSORBANCE : LA LUMIÈRE ABSORBÉE PAR LA SOLUTION

### DÉFINITION

L'**absorbance** correspond à la quantité de lumière **absorbée** par les molécules dissoutes dans une solution **claire**, sans particules en suspension. La lumière incidente d'intensité  $I_0$  traverse l'échantillon et ressort avec une intensité diminuée  $I$ .

Lorsque la lumière traverse un échantillon, une partie de l'intensité est absorbée :

- $I_0$  = intensité incidente (avant l'échantillon)
- $I$  = intensité transmise (après l'échantillon)

On définit alors :

- **Transmittance** :  $T = I / I_0$
- **Absorbance** :  $A = -\log_{10}(T)$

Plus la solution absorbe la lumière, plus  $I$  diminue et plus  $A$  augmente.

Dans des conditions idéales, l'absorbance suit la **loi de Beer-Lambert** :

$$A = \varepsilon \cdot l \cdot c$$

où  $\varepsilon$  est le coefficient d'extinction molaire,  $l$  la longueur du trajet optique, et  $c$  la concentration.

Cette relation permet d'établir un lien direct entre absorbance mesurée et concentration de l'analyte.

## 2 L'ATTÉNUANCE : LA PERTE TOTALE D'INTENSITÉ LUMINEUSE

L'**atténuation** représente la perte globale de lumière lorsqu'un faisceau traverse un échantillon. Elle tient compte de tous les phénomènes qui réduisent l'intensité lumineuse :

- **absorption**,
- **diffusion ou diffraction**,
- réflexion,
- déviation du faisceau.

Mathématiquement, elle s'exprime de la même façon que l'absorbance :

$$D = -\log_{10}(I / I_0)$$

Cependant, **l'atténuation n'est pas assimilable à une absorbance pure** lorsqu'il existe des particules dans l'échantillon. Elle est utilisée en **turbidimétrie**, où l'échantillon n'est pas limpide. Dans ce cas, la lumière "perdue" n'est pas uniquement absorbée : elle est surtout déviée hors du trajet optique, ce qui réduit l'intensité détectée.

### 3 LA DIFFRACTION/DIFFUSION : LA LUMIÈRE DÉVIÉE PAR LES PARTICULES

La **diffraction** (souvent appelée diffusion au laboratoire) correspond à la **dévi-ation de la lumière** lorsqu'elle rencontre :

- des particules (cellules, complexes antigène-anticorps, bactéries, latex...),
- des agrégats,
- ou toute structure dispersée en solution.

Cette lumière est envoyée dans des directions différentes du détecteur. Pour l'appareil, cette lumière est "perdue", ce qui fait diminuer  $I$  même si aucune absorption n'a eu lieu.

Ce phénomène dépend :

- de la **taille** des particules,
- de leur **nombre**,
- de leur **forme**,
- de la **longueur d'onde** utilisée.

La diffraction est le principe clé de la **turbidimétrie**, où l'on suit l'augmentation du trouble d'une solution.

À RETENIR

#### Résumé des différences

En **spectrophotométrie classique** :

- la solution est claire → peu ou pas de particules
- la perte de lumière est due à l'absorption des molécules
- la loi de Beer-Lambert est applicable
- l'appareil mesure une **absorbance réelle**

En **turbidimétrie** :

- l'échantillon contient des particules → solution trouble
- la perte de lumière est majoritairement due à la **diffraction/diffusion**
- la loi de Beer-Lambert ne s'applique pas
- l'appareil mesure une **atténuation**, même si l'écran affiche "Abs"

# DOMAINE DE MESURE

---

## 1 DÉFINITION GÉNÉRALE

Le **domaine de mesure** correspond à l'intervalle de valeurs dans lequel une méthode spectrophotométrique ou turbidimétrique fournit des résultats **fiables, proportionnels et interprétables**. En dehors de cet intervalle, le signal n'est plus représentatif de la concentration réelle de l'analyte.

Ce domaine n'est pas arbitraire : il dépend du **matériel**, du **principe réactionnel**, et des **caractéristiques optiques** de la méthode (absorbance ou atténuation).

## 2 LA LIMITE INFÉRIEURE : LE SEUIL DE DÉTECTABILITÉ

La limite basse du domaine de mesure est déterminée par le **seuil de détection**.

En spectrophotométrie :

- si l'absorbance est trop faible, elle se confond avec le **bruit de fond** ou l'imprécision du blanc.

En turbidimétrie :

- si trop peu de particules sont présentes, la **diffusion/diffraction** est trop faible pour produire une atténuation interprétable.

En dessous de cette limite, on **ne peut plus affirmer la présence de l'analyte avec fiabilité**.

## 3 LA LIMITE SUPÉRIEURE : LA LIMITE DE LINÉARITÉ

La limite haute du domaine de mesure est fixée par la **perte de linéarité** :

- En spectrophotométrie, l'absorbance cesse d'être proportionnelle à la concentration lorsque la solution devient trop absorbante (I devient trop faible pour être mesuré correctement).
- En turbidimétrie, une suspension trop concentrée dévie tellement la lumière que le détecteur n'en reçoit plus assez : l'atténuation "sature"

Au-delà, une même variation de concentration ne se traduit plus par une variation proportionnelle du signal.

Résultat : la méthode **surestime**, **sous-estime** ou **écrase** les valeurs.

## 4 ADAPTER L'ÉCHANTILLON AU DOMAINE DE MESURE

Lorsque la concentration réelle dépasse les limites du domaine de mesure, le technicien doit ajuster l'échantillon pour revenir dans la zone fiable :

- **Diluer** l'échantillon si la concentration est trop élevée (valeur hors linéarité).
- **Concentrer** ou utiliser une méthode plus sensible si la concentration est trop faible.

Un résultat n'est valide **que si le signal se situe dans le domaine de mesure** défini par l'appareil et le protocole.

### Pourquoi ce domaine est essentiel ?

Comprendre le domaine de mesure permet :

- d'éviter des résultats **faux mais techniquement "corrects"** ;
- d'identifier un signal **hors limites** (absorbance trop forte, atténuation saturée) ;
- d'adapter la manipulation ;
- d'assurer une **interprétation fiable** du résultat.

## ÉTALONNAGE : RÔLE, CONSTRUCTION ET VALIDATION

### 1 RÔLE DE L'ÉTALONNAGE

L'étalonnage est une étape indispensable de toute méthode spectrophotométrique ou turbidimétrique. Son rôle est d'établir la **relation entre le signal mesuré** (absorbance ou atténuation) et la **concentration réelle** de l'analyte. Cette relation est nécessaire car l'appareil ne "connaît" pas spontanément la signification d'une absorbance de 0,35 ou d'une atténuation de 0,60 : il s'agit simplement de valeurs physiques.

L'étalonnage transforme ces valeurs en une **échelle interprétable**, grâce à des étalons de concentrations connues.

Sans étalonnage, la méthode ne permettrait pas de quantifier un échantillon, et la fiabilité du résultat serait impossible à garantir. Il sert également de point de référence pour contrôler la performance du matériel, vérifier la stabilité des réactifs et détecter d'éventuelles dérives lors des mesures quotidiennes.

## 2 CONSTRUCTION DE LA COURBE D'ÉTALONNAGE

L'étalonnage se construit en analysant une série d'**étalons**, c'est-à-dire des solutions dont la concentration en analyte est parfaitement connue. Ces étalons couvrent généralement tout le **domaine de mesure** de la méthode, de la valeur la plus faible jusqu'au maximum de linéarité.

Chaque étalon est mesuré dans les mêmes conditions que les échantillons, afin de garantir une comparaison valable. Pour chaque concentration, on recueille son signal (absorbance ou atténuation) puis on trace la **courbe d'étalonnage** :

- axe des abscisses : concentration connue
- axe des ordonnées : signal mesuré

Lorsque la méthode est bien maîtrisée et que la réaction se comporte idéalement, la courbe est **linéaire**, c'est-à-dire que le signal augmente proportionnellement à la concentration. Cela permet d'utiliser une équation simple (souvent une droite de type  $y = ax + b$ ) pour déterminer la concentration d'un échantillon inconnu à partir de son signal.

La construction de l'étalonnage nécessite une grande rigueur expérimentale : pipetage précis, préparation correcte des solutions, respect strict du protocole et utilisation d'un blanc. La moindre erreur dans ces étapes crée des décalages qui affecteront tous les résultats ultérieurs.

## 3 VALIDATION DE L'ÉTALONNAGE

Une fois la courbe d'étalonnage construite, il est essentiel de la **valider** avant de l'utiliser. La validation consiste à vérifier que la relation signal-concentration est cohérente, stable et suffisamment précise pour permettre des quantifications fiables.

Plusieurs critères sont évalués :

- **Linéarité** : la courbe doit suivre un modèle linéaire ou un modèle prévu par la méthode. Toute rupture de linéarité indique que certains étalons sont trop concentrés ou mal préparés.
- **Coefficient de corrélation (R ou R<sup>2</sup>)** : utilisé pour juger la qualité de l'ajustement ; une valeur proche de 1 garantit une bonne proportionnalité.
- **Stabilité du signal du blanc** : un blanc trop absorbant rend la courbe peu fiable.
- **Concordance avec les valeurs attendues** : les étalons doivent donner des signaux cohérents avec les spécifications du fabricant ou du protocole.
- **Absence d'anomalies** : aucun point ne doit s'écarter fortement de la tendance générale (pas de point "aberrant").

Si la validation échoue, il est obligatoire de **recommencer l'étalonnage**, car un étalonnage incorrect entraîne des résultats faux pour tous les échantillons analysés ensuite.

Quand la validation est réussie, l'étalonnage devient la référence pour déterminer la concentration d'un échantillon à partir de son signal, tant que les conditions expérimentales restent stables. Beaucoup d'automates imposent une fréquence minimale d'étalonnage afin de maintenir la qualité du système.

## POINTS CRITIQUES

---

### 1 UNE LUMIÈRE PARFAITEMENT MAÎTRISÉE

La première condition pour obtenir un résultat fiable, c'est une **source lumineuse stable**. Une lampe qui fluctue, un monochromateur encrassé ou une intensité instable suffisent à fausser toutes les lectures. En spectrophotométrie, cela modifie directement l'absorbance. En turbidimétrie, cela perturbe l'atténuation observée, surtout lorsque les variations de signal sont faibles. Résultat : même avec une manipulation impeccable, un appareil mal entretenu donne des valeurs trompeuses. La lumière doit donc être **propre, stable et calibrée**.

### 2 UN ÉCHANTILLON IRRÉPROCHABLE

Le contenu de la cuve est tout aussi critique. En spectrophotométrie, la solution doit être **claire, homogène et sans particules** : la moindre bulle d'air ou petit dépôt perturbe la lumière et modifie l'absorbance.

En turbidimétrie, au contraire, la présence de particules est normale... mais elles doivent être **uniformément réparties** ! Si la suspension décante, s'agglomère ou n'a pas été correctement mélangée, l'atténuation varie d'une mesure à l'autre.

Bref : un échantillon bien préparé = un signal fiable.

### 3 UNE CUVE PROPRE

La cuve est le "chemin" que la lumière emprunte. Si elle est sale, rayée, mal essuyée ou pleine d'empreintes, la lumière sera absorbée ou déviée par autre chose que l'échantillon. Résultat : valeurs incohérentes, reproductibilité catastrophique. De plus, une cuve mal orientée ou mal insérée modifie la longueur du trajet optique.

Une règle simple : **une cuve sale = un résultat faux**.

## 4 UNE MESURE AU BON MOMENT

En spectrophotométrie comme en turbidimétrie, le signal peut évoluer au cours du temps. Une réaction enzymatique progresse, un précipité se forme, un complexe antigène–anti-corps grossit... Lire la valeur trop tôt ou trop tard peut complètement changer le résultat.

Certaines méthodes exigent une lecture précise "à vitesse initiale", d'autres nécessitent un temps d'incubation strict.

Le respect des **temps** est un point critique majeur

## 5 UNE TEMPÉRATURE SOUS CONTRÔLE

La température influence presque tout :

- la vitesse des réactions,
- la solubilité des molécules,
- la formation des particules,
- la stabilité du signal.

Une variation de quelques degrés peut suffire à modifier l'absorbance ou l'atténuation. Pour cette raison, les mesures se font souvent à température contrôlée, dans un environnement stable, sans vibrations ni variations de lumière ambiante.

La température doit être **stable, constante et maîtrisée**.

## 6 DES RÉACTIFS FIABLES ET UN PIPETAGE PRÉCIS

Un blanc mal préparé ou un réactif dégradé fausse tout l'étalonnage. Le matériel de pipetage doit être correctement étalonné, car chaque microlitre compte. Les réactifs doivent être homogènes, frais, bien conservés et utilisés selon les recommandations du fabricant.

Si la préparation est approximative, le résultat le sera aussi.

"Bon réactif + bon pipetage = bon signal".

## 7 UN SIGNAL DANS LE BON DOMAINE DE MESURE

Même si tout a été fait correctement, un signal peut être **hors domaine de mesure** :

- trop faible → sous le seuil de détection ;
- trop fort → au-delà de la linéarité.

Dans les deux cas, l'appareil affiche une valeur... mais cette valeur n'a **aucune validité**.

Il faut alors diluer, concentrer, ou choisir une autre méthode.

Un signal interprétable est un signal **dans la zone fiable**.

## À RETENIR

Pour obtenir une mesure fiable en spectrophotométrie comme en turbidimétrie, plusieurs **points critiques** doivent absolument être maîtrisés. La **stabilité de la lumière** est essentielle : toute fluctuation fausse immédiatement le signal. L'échantillon doit être **homogène**, sans bulles ni dépôts, et la cuve **parfaitement propre** et bien orientée pour ne pas perturber le trajet optique. Il est indispensable de respecter les **temps du protocole**, car le signal évolue souvent pendant la réaction. La **température** doit rester constante pour éviter toute variation du signal. Les **réactifs** doivent être fiables, le **pipetage précis**, et le signal final doit se situer **dans le domaine de mesure** pour être interprétable.

## CONCLUSION

---

La spectrophotométrie et la turbidimétrie sont deux techniques incontournables du laboratoire de biologie médicale. Elles reposent toutes deux sur l'interaction entre la lumière et l'échantillon, mais exploitent des phénomènes différents : **l'absorption** pour la spectrophotométrie, et la **diffusion/diffraction** de la lumière pour la turbidimétrie. Comprendre la distinction entre **absorbance, atténuation et diffraction** est essentiel pour interpréter correctement les résultats et choisir la méthode la plus adaptée à l'analyse.

Ce chapitre vous a permis d'identifier les notions clés : domaine de mesure, seuil de détection, limite de linéarité, construction et validation d'un étalonnage. Vous avez également découvert que la fiabilité d'une mesure dépend autant de la qualité de la lumière et des réactifs que de la propreté des cuves, de l'homogénéité de l'échantillon et du respect strict du protocole.

Ces techniques constituent les bases de nombreux dosages enzymatiques, biochimiques et immunologiques. Maîtriser leur fonctionnement vous permettra d'aborder avec assurance les méthodes d'analyse qui suivent et d'interpréter les signaux lumineux avec précision, qu'ils proviennent d'une solution parfaitement limpide ou d'une suspension trouble.

# TABLEAU RÉCAPITULATIF

## Spectrophotométrie & Turbidimétrie

Aspect	Spectrophotométrie	Turbidimétrie
Principe	Mesure de la <b>lumière absorbée</b> par une solution.	Mesure de la <b>lumière atténuée</b> par des particules en suspension.
Type de solution	Solution <b>claire</b> , sans particules.	Solution <b>trouble</b> , contenant des particules.
Phénomène mesuré	<b>Absorbance (A)</b> : lumière absorbée.	<b>Atténuation (D)</b> : lumière perdue (diffusion + diffraction + absorption).
Interaction lumière-matériau	Interaction entre photons et <b>molécules dissoutes</b> .	Interaction entre photons et <b>particules</b> (complexes immuns, cellules, latex...).
Relation signal-concentration	Souvent <b>linéaire</b> (loi de Beer-Lambert).	Relation <b>non linéaire</b> , dépend de la taille et du nombre des particules.
Signal faible	Absorbance trop faible = sous le <b>seuil de détection</b> .	Peu de particules = atténuation faible, difficile à distinguer.
Signal élevé	Absorbance trop forte = hors <b>limite de linéarité</b> → dilution nécessaire.	Atténuation saturée si la suspension est trop dense.
Étalonnage	Essentiel pour relier absorbance et concentration.	Essentiel pour relier atténuation et quantité de particules.
Applications typiques	Dosage d'ions, glucose, protéines, enzymes...	Dosage immunologique turbidimétrique, protéines totales, CRP, particules.
Points critiques spécifiques	Cuves propres, absence de bulles ou dépôts, lumière stable.	Homogénéité de la suspension, absence de décantation, agitation contrôlée.

## LEXIQUE



**Absorbance (A) :** Grandeur mesurant la fraction de lumière absorbée par une solution limpide. Proportionnelle à la concentration selon la loi de Beer-Lambert.

**Transmittance (T) :** Rapport entre la lumière transmise et la lumière incidente ( $T = I / I_0$ ). Utilisée pour calculer l'absorbance.

**Atténuation (D) :** Perte totale de lumière lors d'une mesure turbidimétrique (absorption + diffusion + diffraction). Mesurée dans les solutions troubles.

**Diffraction / Diffusion lumineuse :** Déviation de la lumière lorsqu'elle rencontre des particules en suspension. Phénomène clé en turbidimétrie.

Spectrophotométrie : Technique mesurant l'absorbance d'une solution claire à une longueur d'onde définie.

**Turbidimétrie :** Technique mesurant l'atténuation de la lumière causée par des particules en suspension (complexes immuns, agrégats, cellules...).

**Loi de Beer-Lambert :** Relation linéaire entre absorbance et concentration d'une solution limpide :  $A = \epsilon \times l \times c$ .

**Longueur d'onde :** Valeur (en nm) caractérisant la lumière utilisée. Doit correspondre au maximum d'absorption ou de détection du produit mesuré.

**Domaine de mesure :** Intervalle dans lequel la mesure est fiable et proportionnelle. Délimité par le seuil de détection et la limite de linéarité.

Seuil de détection : Plus petite valeur détectable, au-dessus du bruit de fond.

**Limite de linéarité :** Point à partir duquel la relation signal-concentration n'est plus proportionnelle, entraînant des résultats faussés.

**Étalonnage :** Procédure permettant de relier un signal mesuré (A ou D) à une concentration grâce à des étalons connus.

**Courbe d'étalonnage :** Graphique représentant le signal en fonction des concentrations standards. Sert à déterminer les concentrations inconnues.

**Blanc de mesure :** Solution sans analyte destinée à corriger l'absorbance ou l'atténuation due aux réactifs seuls.

**Bruit de fond :** Fluctuations lumineuses parasites pouvant perturber les signaux faibles.

**Point critique :** Élément du protocole pouvant fausser la mesure : cuves sales, bulles, mauvaise homogénéité, température non maîtrisée...

**Lampe / Source lumineuse :** Élément de l'appareil générant la lumière (halogène, LED...). Une source instable entraîne des mesures erronées.

**Monochromateur :** Système optique sélectionnant une longueur d'onde unique pour la mesure.



## Entraînez-vous !

*Corrigés en fin d'ouvrage*

### QCM

**1 En spectrophotométrie, l'absorbance augmente lorsque :**

- La transmittance augmente
- L'intensité lumineuse transmise diminue
- La concentration de l'analyte diminue
- La longueur de cuve diminue

**2 La loi de Beer-Lambert n'est applicable que si :**

- Le milieu est trouble
- La solution contient des particules en suspension
- La solution est limpide et l'absorption proportionnelle à la concentration
- L'atténuation est utilisée

**3 En turbidimétrie, la grandeur principalement exploitée est :**

- L'absorbance
- La transmittance
- L'atténuation
- La fluorescence

**4 Une valeur spectrophotométrique trop élevée peut indiquer :**

- Un signal hors linéarité
- Une solution sous le seuil de détection
- Une lumière trop stable
- Une augmentation artificielle du blanc

**5 Quelle est la principale cause de perte de lumière dans une suspension particulaire ?**

- L'absorption moléculaire
- La diffusion/diffraction
- La fluorescence induite
- L'instabilité de la source lumineuse