

## Augmentation de la reproductibilité des dilutions en série

Michael Beier\*

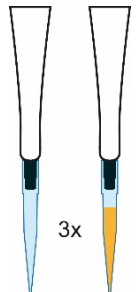
### Résumé

Pipeter des dilutions en série de manière reproductible peut s'avérer difficile car cette méthode est chronophage et, par conséquent, souvent sujette à erreurs, en particulier dans les plaques de 384 puits. En partant du principe que vos pipettes sont correctement entretenues et étalonnées, l'influence humaine a le plus fort impact sur les résultats du pipetage. Le fait de respecter les bonnes pratiques de pipetage aide énormément à améliorer la reproductibilité et la précision. Dans cet article, nous mettons l'accent sur une sélection de bonnes techniques de pipetage qui, si elles sont respectées, offrent les meilleures chances d'augmenter et de maintenir la reproductibilité de vos dilutions en série. Le mélange est un élément essentiel des protocoles de dilution ; dans cet article, nous examinerons donc également différents paramètres de mélange afin de vous aider à obtenir un échantillon homogène. L'automatisation du processus offre de nombreux avantages permettant de maximiser la cohérence des dosages de dilution. Pour garantir des dilutions en série hautement reproductibles, nous décrivons quelles caractéristiques un système de pipetage automatisé devrait avoir et présentons le VIAFLO ASSIST - un produit spécialement conçu à cet effet.

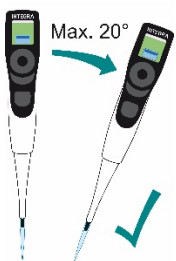
### Introduction aux bonnes pratiques de pipetage

Les bonnes pratiques de pipetage décrivent des principes généraux s'appliquant aux techniques de base pour assurer que les pipettes sont utilisées de manière optimale et reproductible.

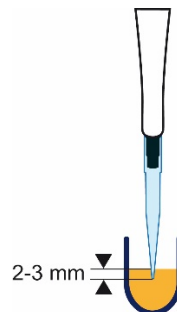
Avant de préparer votre dosage, vous devez pré-mouiller vos pointes de pipette. Pour ce faire, aspirez et distribuez 2-3 fois la totalité du volume. Cette procédure équilibrera non seulement les différences de température entre le liquide et la pointe mais humidifiera également l'espace d'air mort dans la pipette et la pointe. Si l'on néglige d'effectuer une pré-humidification, le volume de distribution peut être plus petit dans les premières distributions, causant ainsi des erreurs dans vos étapes de dilution ultérieures.



Le volume de liquide dans la pointe dépend également de l'angle d'inclinaison de la pipette pendant l'aspiration du liquide.



Il est important de tenir votre pipette avec un angle constant, maximum 20°, pendant toute la série de dilutions.



Plongez la pointe de la pipette juste en dessous de la surface du liquide pour permettre au volume souhaité d'être aspiré. Si l'embout est immergé trop profondément, le risque de débordement augmente du fait des gouttes de liquide accrochées à la surface extérieure de la pointe.

Malheureusement, les règles de bonnes pratiques de pipetage ne sont pas toujours suivies dans les faits, même par le personnel de laboratoire le plus consciencieux. Votre technique pourrait devenir non conforme, surtout lorsque vous êtes fatigué ou travaillez dans l'urgence. De plus, le risque d'erreurs de transfert augmente. On peut facilement oublier une rangée dans une plaque de 96 ou 384 puits, surtout lorsqu'on manipule des liquides incolores, ce qui peut ruiner l'intégralité d'une plaque et vous forcer à recommencer. Il n'est donc pas étonnant que différents utilisateurs qui utilisent la même pipette obtiennent des résultats de pipetage différents en fonction de leur niveau de formation, leur expérience et leur ancienneté dans le travail.

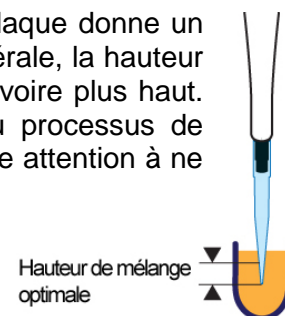
## Optimisation des paramètres de mélange

Mélanger soigneusement le contenu de chaque puits dans votre microplaque est une étape indispensable dans la préparation d'une série de dilution. Un mélange non-homogène introduit une erreur importante qui se reportera ensuite dans les étapes de dilution ultérieures. La concentration obtenue sera différente de la concentration théorique présumée sur l'ensemble de la plaque. Il est donc important que vous optimisiez les paramètres de mélange tels que la hauteur de mélange, le nombre d'étapes de mélange nécessaires ainsi que les vitesses de mélange pour un liquide particulier.

Il peut être nécessaire d'adapter la vitesse de pipetage en fonction de la viscosité du liquide. Il vaut mieux pipeter lentement des liquides visqueux pour que le liquide puisse passer à travers le petit orifice de l'embout.

Le fait de mélanger avec l'extrémité de la pointe tout au fond d'un puits de microplaque donne un mélange plus pauvre, car cela ne génère pas assez de tourbillons. De manière générale, la hauteur de mélange la plus efficace se situe au milieu de la colonne de liquide d'un puits, voire plus haut. Idéalement, le liquide est distribué au sommet et aspiré du milieu au cours du processus de mélange. Cependant, cela peut être difficile à faire manuellement et vous devez faire attention à ne pas sortir les pointes du liquide pendant le mélange pour éviter d'aspirer de l'air.

Le nombre de cycles de mélange et le volume de mélange ont également des répercussions importantes sur le résultat du mélange. Des cycles de mélange plus nombreux et un plus grand volume de mélange donnent un mélange plus homogène, mais peuvent augmenter considérablement le temps de préparation des tests.



## Les bénéfices de l'automatisation

Il est difficile de respecter tous ces facteurs de bonnes pratiques de pipetage et de mélange pendant que l'on effectue des dilutions en série à la chaîne avec une pipette manuelle. Entreprendre une dilution en série dans une plaque de 96 puits avec 5 cycles de mélange par rangée nécessite un total de 110 mouvements manuels du piston et comporte un risque de tension potentielle sur votre pouce et votre poignet si cela est pratiqué sur de longues périodes de temps. L'utilisation d'une pipette électronique peut améliorer ce processus parce que vous avez la possibilité de définir le nombre de cycles de mélange (y compris les vitesses) ; la pipette les exécutera alors automatiquement sans que vous ayez à appuyer plusieurs fois sur le piston.

En automatisant votre processus de pipetage, vous éliminez les questions relevant des pratiques de pipetage et du mélange et générerez ainsi un flux de production parfaitement constant. Un système d'automatisation optimal gère l'ensemble du processus de dilution et vous permet simplement de définir les paramètres clés pour des dilutions en série telles que les hauteurs et les vitesses de mélange.



L'automatisation requise pour de nombreuses applications de dilution ne demande pas l'investissement élevé et le personnel dédié que nécessite un robot de laboratoire ou un système de manipulation de liquides entièrement automatisé. À un coût nettement plus avantageux, VIAFLO ASSIST d'INTEGRA offre toutes les fonctionnalités, la vitesse et l'automatisation qu'il vous faut. En y adaptant une pipette électronique multicanaux VIAFLO II, VIAFLO ASSIST devient un assistant de pipetage fiable, infatigable et toujours respectueux des bonnes pratiques de pipetage. Il effectuera les dilutions en série à votre place, de la distribution du diluant à la dilution de l'échantillon.

Selon Lauren Anderson Dring, chercheur et chef de projet chez Pulmocide, « *Le VIAFLO ASSIST est devenu partie intégrante de notre processus de dépistage de composés. Nous l'utilisons chaque jour pour faire des dilutions précises et reproductibles de médicaments à moyen débit* ».

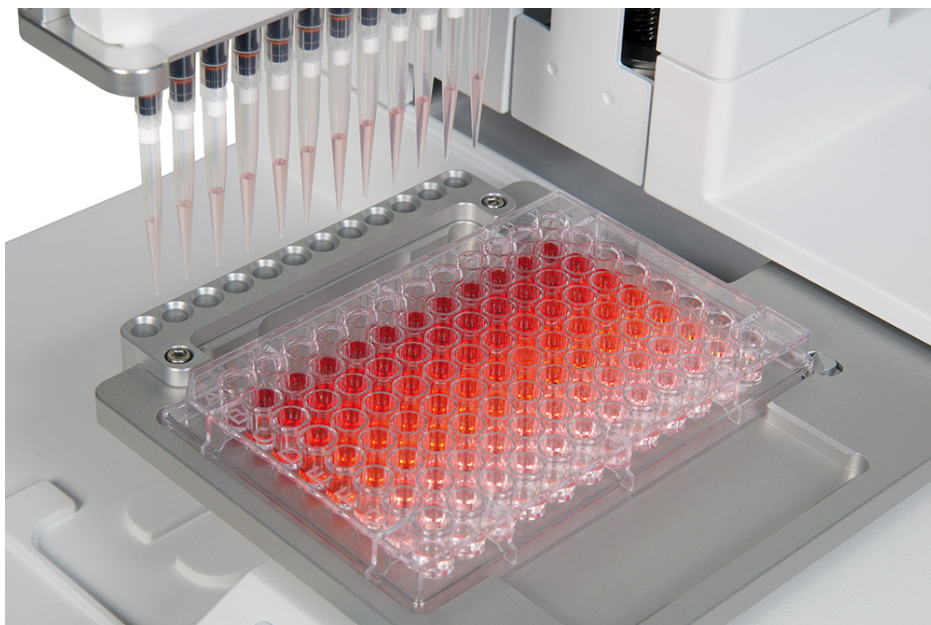
# INTEGRA

VIAFLO ASSIST vous permet de définir tous les paramètres importants pour un mélange efficace dans les dilutions en série : la hauteur de mélange, les vitesses de pipetage et le nombre de cycles de mélange. Mme Dring ajoute : « *Le VIAFLO ASSIST est particulièrement utile du fait qu'une multitude de paramètres peuvent être prédéfinis, tels que le volume et la vitesse de mélange de la pipette, nous permettant ainsi de définir et de sauvegarder plusieurs protocoles de dilution différents pour répondre à nos besoins* ».

En plus de définir une hauteur fixe, le VIAFLO ASSIST permet de contrôler le liquide à l'intérieur des puits des microplaques, sans avoir à immerger la pointe trop profondément, ce qui minimise les débordements potentiels. Pour respecter pleinement les bonnes pratiques de pipetage, une pré-humidification peut être faite soit manuellement avant le démarrage du programme, soit en l'intégrant dans le programme ASSIST.

## Conclusion

La préparation des tests de dilutions en série reproductibles n'est pas une tâche aisée car ils nécessitent beaucoup d'actions de pipetage et sont très dépendants de la technique et de l'expérience d'un opérateur. Respecter les bonnes pratiques de pipetage permet d'obtenir de meilleurs résultats de pipetage. Cependant, si votre objectif est de simplifier le processus de dilution en série tout en garantissant une reproductibilité maximum, alors un système de pipetage automatisé est indispensable.



Légende : Automatisation d'une dilution en série sur une plaque 96 puits avec VIAFLO ASSIST

VIAFLO ASSIST est une plate-forme automatisée de pipetage permettant de réaliser des dilutions en série en microplaques, qui est à la fois économique, très performante et facile à utiliser. Les paramètres importants, tels que les hauteurs et les vitesses de pipetage, peuvent être contrôlés avec précision, ce qui améliore les résultats de pipetage. Il améliore également la constance globale de pipetage en éliminant les erreurs humaines et les incohérences, se traduisant par une meilleure reproductibilité des dosages et des gains de temps.

**L'auteur** : Michael Beier est Chef-Produit Manipulation des Liquides chez INTEGRA Biosciences. Contactez-le sur [Michael.beier@integra-biosciences.com](mailto:Michael.beier@integra-biosciences.com) pour plus d'informations.