

# La spectroscopie infrarouge non dispersive, une alternative à la spectrométrie de masse isotopique, cas du test respiratoire à l'urée $^{13}\text{C}$

W. Elbast et J.L. Brazier

Chaire Médicaments et Grossesse, Faculté de Pharmacie, Université de Montréal, CP 6128 succursale centre-ville, Montréal, H3C 3J7, Québec

The diagnosis of *Helicobacter pylori* infection has given a boost for the development of breath tests using  $^{13}\text{C}$  labelled urea and dedicated instrumentations. Benchtop isotope ratio mass spectrometers have been developed for such an application and thus, isotope ratio mass spectrometry came out into laboratories of clinical biochemistry. In this field, the major commercial application of breath test is indisputably the  $^{13}\text{C}$  urea breath test since infection by *Helicobacter pylori* is the most widely spread infection over the world. This potentially large market of non-invasive diagnosis contributes to the development of other techniques for  $^{13}\text{C}$  isotopic analysis from expired  $\text{CO}_2$ . So non dispersive infrared spectroscopy is now an alternative to isotope ratio mass spectrometry for breath analysis. This paper compares the specifications of both techniques for the diagnosis of *Helicobacter pylori* infection using  $^{13}\text{C}$  urea breath test and discusses advantages and drawbacks of these technologies.

## Introduction

*Helicobacter Pylori* est une bactérie de forme spiralée ou en S avec des extrémités arrondies. Elle présente en général 4 à 6 flagelles à l'une de ses extrémités. Cette forme lui autorise un déplacement rapide dans l'estomac et la pénétration dans la muqueuse. Pour survivre dans le milieu hostile et acide, qu'est l'estomac, *Helicobacter pylori* se crée un environnement protégé au sein du mucus et contre la paroi où il développe des adhérences. Sa présence entraîne le plus souvent un phénomène inflammatoire important (gastrite). Le développement ultérieur d'ulcère ou de cancer n'intervient que chez une fraction de la population infectée. La contribution de *Helicobacter pylori* n'est pas univoque ni exclusive et d'autres facteurs sont impliqués dans le développement de l'ulcère (stress, habitudes alimentaires ou médicamenteuses, hygiène de vie). L'indication de la recherche de *Helicobacter pylori* se pose chez des malades ayant des symptômes digestifs : douleurs gastriques, symp-

tomatologie de reflux, syndrome dyspeptique (lenteur de la digestion).

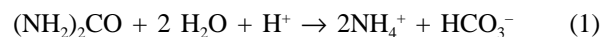
Pour le diagnostic de la présence de *Helicobacter pylori*, deux grands groupes de méthodes sont définis selon qu'elles utilisent ou non le matériel biopsique :

**Les méthodes invasives** : elles font suite à des prélèvements biopsiques réalisés au cours d'une endoscopie, de préférence au niveau antral à deux centimètres du pylore voire au niveau fundique ou duodéal. Ces biopsies sont le complément d'un examen endoscopique de la muqueuse gastrique. Parmi les méthodes pratiquées sur la biopsie on peut citer : l'examen microscopique et histologique après coloration argentique, le test colorimétrique à l'urée et le PCR (Polymerase Chain Reaction).

**Les méthodes non invasives** : elles recherchent la présence de *Helicobacter pylori* au niveau de différents fluides biologiques : sang, air expiré, urines, fèces. Les deux techniques les plus utilisées sont la sérologie et le test respiratoire.

La sérologie est basée sur la recherche d'IgG, anticorps circulants, produits lors de la réaction de l'organisme face à la stimulation antigénique de *Helicobacter pylori*. La limite de cette technique est la séronégativité lente (supérieure à six mois) en cas d'éradication de la bactérie. Les faux-négatifs (estimés à 2 %) seraient dus à une immunité exclusive locale (au niveau gastrique) ou à un prélèvement en phase aiguë de l'infestation avant l'apparition des IgG.

Le test respiratoire est basé sur l'activité intense et rapide de l'uréase qui est le moyen fondamental de la survie de *Helicobacter pylori*. Cette enzyme hydrolyse l'urée en ions bicarbonate et ammonium selon la réaction (1) :



L'ion bicarbonate est absorbé au niveau intestinal puis véhiculé par le sang. Il s'équilibre alors dans le pool Bicarbonate/ $\text{CO}_2$  et il est rejeté par la respiration dans le gaz expiré.

Lorsqu'on administre de l'urée marquée au  $^{13}\text{C}$  (isotope stable du carbone) à un patient porteur de *Helicobacter pylori* au niveau de la muqueuse gastrique, le schéma réactionnel est le même et il en résulte un enrichissement en

$^{13}\text{CO}_2$  du  $\text{CO}_2$  expiré qui peut être objectivé par une augmentation du rapport  $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ .

Les valeurs des rapports isotopiques obtenues lors de l'analyse isotopique du  $\text{CO}_2$  sont comparées à un standard international qui est le P.D.B. (Pee Dee Belemnite). Il s'agit d'un carbonate de calcium en provenance de Dee Pee (USA), dont l'abondance en  $^{13}\text{C}$  est très élevée ( $^{13}\text{C}/^{12}\text{C} = 1,12372$ ). On accède ainsi à l'enrichissement mesuré exprimé en delta pour mille ( $\delta\%$ ) et calculé selon la relation (1) :

$$\delta\% = 1000 \times [(^{13}\text{C}/^{12}\text{C})_{\text{éch}} / (^{13}\text{C}/^{12}\text{C})_{\text{std}} - 1] \quad (1)$$

où  $(^{13}\text{C}/^{12}\text{C})_{\text{éch}}$  est le rapport isotopique de l'échantillon

$(^{13}\text{C}/^{12}\text{C})_{\text{std}}$  est le rapport isotopique du standard.

Pour chaque sujet testé, un prélèvement de gaz expiré recueilli avant la prise d'urée marquée permet la mesure du niveau « basal » de l'enrichissement en  $^{13}\text{C}$ , et tous les prélèvements postérieurs à celui-ci sont exprimés par rapport à ce prélèvement basal. On mesure alors la différence d'enrichissement entre ces échantillons et l'échantillon basal selon la relation (2).

$$\text{À un temps } T_i : \delta\%_{\text{exc}} = \delta\%_{T_i} - \delta\%_{\text{basal}} \quad (2)$$

Donc, la différence d'enrichissement du  $\text{CO}_2$  expiré entre les sujets infectés par *Helicobacter pylori* (HP+) et les sujets qui ne le sont pas (HP-) est la conséquence de la métabolisation de l'urée par *Helicobacter pylori* qui se traduit par une augmentation de la valeur  $\delta\%$  mesurée lors du test.

Le test respiratoire à l'urée marquée par le  $^{13}\text{C}$  a été proposé pour la première fois en 1987 par Graham et al. [1]. En 1994, cet auteur a démontré que les maladies gastriques reviennent dans 80 à 100 % chez les patients qui sont infectés par *Helicobacter pylori* [2]. En se basant sur ces résultats, le National Institute of Health (NIH) aux États-Unis a recommandé l'éradication de *Helicobacter pylori* pour les traitements de l'ulcère de l'estomac en février 1994 et l'International Agency for Research on Cancer (IARC), la World Health Organisation (WHO) ont classé définitivement *Helicobacter pylori* comme cancérigène de classe I en juin 1994.

### Spectrométrie de masse à rapport isotopique

La mesure de l'enrichissement isotopique en  $^{13}\text{C}$  fait généralement appel à la spectrométrie de masse isotopique ou Isotope Ratio Mass Spectrometry (IRMS). En effet, cette technique permet de mesurer de très faibles variations du rapport isotopique  $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$  (1 ppm) [3].

L'échantillon à analyser est introduit dans une source d'ionisation. Par transfert d'énergie (bombardement électronique), les molécules qui le composent sont ionisées puis

accélérées dans un tube analyseur. Le détecteur est un spectromètre de masse magnétique à champ fixe. Il trie les ions issus des isotopomères du  $\text{CO}_2$  selon leur masse (masse 44 pour  $^{12}\text{C}^{16}\text{O}_2$ , masse 45 pour  $^{13}\text{C}^{16}\text{O}_2$  et  $^{12}\text{C}^{16}\text{O}^{17}\text{O}$ , masse 46 pour  $^{12}\text{C}^{16}\text{O}^{18}\text{O}$ ,  $^{13}\text{C}^{16}\text{O}^{17}\text{O}$  et  $^{12}\text{C}^{17}\text{O}_2$ ). En effet, ces différents ions parcourent, dans le champ magnétique, des trajectoires circulaires différentes dont les rayons dépendent du rapport  $m/z$  (masse/charge).

Ainsi les différents isotopomères sont séparés et recueillis dans 3 collecteurs différents (cage de Faraday). L'intensité des signaux due aux trois isotopomères est mesurée de façon spécifique, et donne ainsi accès au rapport  $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$  [4].

Dans les dernières années, les développements technologiques et méthodologiques ont permis de mettre sur le marché des spectromètres de masse isotopiques de petites dimensions (benchtop) dédiés à l'analyse des gaz expirés. Ainsi cette nouvelle technologie peut-elle maintenant rentrer dans les laboratoires de biologie médicale.

### Spectrométrie d'absorption infrarouge non dispersive

En 1994, Haisch et al. [5] ont utilisé pour la première fois la spectrométrie d'absorption infrarouge non dispersive ou Non Dispersive Infrared Spectrometry (NDIRS) pour le test respiratoire à l'urée marquée par le  $^{13}\text{C}$ . Cette technique a été présentée comme une alternative moins chère et plus facile à utiliser que l'IRMS et depuis, les travaux utilisant cette technique ne cessent de se multiplier.

La spectrométrie infrarouge conventionnelle mesure l'absorption d'un gaz quelconque à une longueur d'onde bien déterminée en utilisant un faisceau étroit de lumière séparée par un réseau ou un interféromètre. Par contre, la NDIRS mesure l'absorption d'un gaz à différentes longueurs d'ondes non séparées en utilisant un faisceau large de lumière.

L'analyse du  $^{13}\text{CO}_2$  et du  $^{12}\text{CO}_2$  dans le gaz expiré, par NDIRS, utilise le fait que les fréquences des bandes constituant les spectres d'absorption (élongation asymétrique  $\nu_3$ ) des deux isotopomères de  $\text{CO}_2$ , dans la zone située entre  $2200\text{ cm}^{-1}$  et  $2400\text{ cm}^{-1}$  sont presque complètement séparées. Le détecteur est un spectromètre opticoacoustique. Il est constitué d'une cellule remplie par le gaz à analyser et d'un microphone condensateur. En traversant la cellule, une partie de la lumière est absorbée, ceci provoque une augmentation de la température qui se traduit par une augmentation de la pression qui est détectée par le microphone condensateur. Pour chaque type de gaz à analyser, il faut une cellule remplie par le même gaz et un trajet optique différent [5].

Comme pour la spectrométrie de masse isotopique, des systèmes compacts apparaissent sur le marché de l'instrumentation biomédicale.

## Étude comparative de la NDIRS et de l'IRMS

Avant de comparer la NDIRS et l'IRMS dans le cas du test respiratoire à l'urée marquée par le  $^{13}\text{C}$ , il est important de rappeler quelques définitions sur les paramètres qui permettent de comparer la qualité et l'efficacité des méthodes de diagnostic : sensibilité et spécificité ainsi que précision selon les relations (3), (4) et (5). Une méthode (X) à évaluer est toujours comparée à une méthode considérée comme méthode de référence (réf).

$$\text{Sensibilité (\%)} = (\text{nombre HP+})_X \times 100 / (\text{nombre HP+})_{\text{réf}} \quad (3)$$

$$\text{Spécificité (\%)} = (\text{nombre HP-})_X \times 100 / (\text{nombre HP-})_{\text{réf}} \quad (4)$$

$$\text{Précision (\%)} = [(\text{nombre HP+}) + (\text{nombre HP-})]_X \times 100 / [(\text{nombre HP+}) + (\text{nombre HP-})]_{\text{réf}} \quad (5)$$

Nous donnons ci-dessous les paramètres de qualité relevés dans la littérature comparant spectrométrie de masse isotopique et spectroscopie infrarouge non dispersive pour pratiquer le test respiratoire à l'urée  $^{13}\text{C}$  dans le cas du diagnostic de l'infection par *Helicobacter pylori*.

Haisch et al. (1994) :

- précision NDIRS / IRMS :  $\pm 0,4 \delta\%$ ,
- reproductibilité NDIRS (échantillon analysé 120 fois) :  $\pm 0,4 \delta\%$ ,
- écart type des différences entre  $\delta\%$  IRMS et  $\delta\%$  NDIRS :  $0,36 \delta\%$ .

Koletzko et al. (1995) :

- nombre de sujets étudiés : 51,
- coefficient de corrélation ( $\delta\%$  NDIRS /  $\delta\%$  IRMS) : 0,976.

Braden et al. (1996) :

- nombre de sujets étudiés : 538,
- sensibilité NDIRS / IRMS : 98,3 %,
- spécificité NDIRS / IRMS : 98,6 %,
- moyenne des différences entre  $\delta\%$  IRMS et  $\delta\%$  NDIRS :  $-1,9 \delta\%$ ,
- écart type des différences entre  $\delta\%$  IRMS et  $\delta\%$  NDIRS :  $2,7 \delta\%$ ,
- coefficient de corrélation ( $\delta\%$  IRMS /  $\delta\%$  NDIRS) : 0,950.

Taniguchi et al. (1996) :

- nombre de sujets étudiés : 181,
- sensibilité NDIRS / histologie : 97,8 %,
- spécificité NDIRS / histologie : 74,4 %,
- coefficient de corrélation ( $\delta\%$  IRMS /  $\delta\%$  NDIRS) : 0,996.

Hildebrand et al. (1997) :

- nombre de sujets étudiés : 40,

- moyenne des différences entre  $\delta\%$  IRMS et  $\delta\%$  NDIRS :  $-0,23 \delta\%$ ,
- écart type des différences entre  $\delta\%$  IRMS et  $\delta\%$  NDIRS :  $1,11 \delta\%$ ,
- coefficient de répétabilité NDIRS :  $1,64 \delta\%$ .

Kajiwara et al. (1997) :

- nombre de sujets étudiés : 399,
- sensibilité NDIRS / histologie : 95,3 %,
- spécificité NDIRS / histologie : 73,3 %,
- précision NDIRS / histologie : 87,2 %.

Kajiwara et al. (1997) :

- nombre de sujets étudiés : 129,
- coefficient de corrélation ( $\delta\%$  IRMS /  $\delta\%$  NDIRS) : 0,991.

Ohara S. et al. (1998) :

- nombre de sujets étudiés : 433,
- sensibilité NDIRS / IRMS : 96,2 %,
- spécificité NDIRS / IRMS : 88,5 %,
- précision NDIRS / IRMS : 95,1 %,
- moyenne des différences entre  $\delta\%$  IRMS et  $\delta\%$  NDIRS :  $0,42 \delta\%$ ,
- écart type des différences entre  $\delta\%$  IRMS et  $\delta\%$  NDIRS :  $2,16 \delta\%$ ,
- coefficient de corrélation ( $\delta\%$  NDIRS /  $\delta\%$  IRMS) : 0,996.

On peut constater que dans un certain nombre de travaux les méthodes d'analyse ont simplement été comparées l'une à l'autre quant à leur efficacité pour diagnostiquer la présence de *Helicobacter pylori*. Dans certaines études, en outre, les méthodes ont été évaluées par rapport au test qui constitue encore le gold standard : l'examen histologique de la biopsie.

On constate à la vue de ces résultats de comparaison que la NDIRS et l'IRMS offrent à la médecine un excellent outil de diagnostic de l'infection à *Helicobacter Pylori*. Ces méthodes permettent la mesure du rapport isotopique  $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$  dans le gaz expiré avec très hautes précisions, exactitude et sensibilité satisfaisantes pour estimer les différences d'enrichissements entre les valeurs basales et celles suivant la prise d'urée en cas de positivité. Dans la plupart des tests utilisés à l'heure actuelle, le prélèvement basal et le prélèvement après prise d'urée  $^{13}\text{C}$  sont séparés de 30 minutes. Dans les tests qui utilisent une dose d'urée  $^{13}\text{C}$  de 75 mg la valeur d'enrichissement discriminante permettant de distinguer des sujets HP+ et des sujets HP- est de l'ordre de 2.5 à 3  $\delta\%$ .

Cependant, pour chacune de ces deux techniques ses points forts et ses points faibles.

### Appareillage

L'appareillage nécessaire à la NDIRS est plus petit et moins encombrant que le spectromètre de masse isotopique (en moyenne,  $45 \times 32 \times 30$  cm pour NDIRS contre  $100 \times 95 \times$

90 cm « spectromètre de masse » et 90 × 60 × 50 cm « passeur d'échantillon » pour IRMS), il est moins cher (en moyenne, 40000 \$ américains pour NDRIS contre 70000 à 90000 \$ pour IRMS), et ne nécessite pas de gaz auxiliaire supplémentaire comme c'est le cas pour l'hélium nécessaire pour l'IRMS [5].

Le passeur automatique de l'IRMS est généralement plus grand et peut contenir jusqu'à 220 échantillons.

### Échantillon à analyser

Le diagnostic en IRMS nécessite de collecter deux tubes de 10 mL de gaz expiré ( $T = 0$  et  $T = 30$  min). Ces tubes sont faciles à transporter et à stocker et il est possible de les analyser jusqu'à 10 fois car la prise d'essai analytique est très faible (#100  $\mu$ L). Il est donc possible avec cette technique d'effectuer des contre-expertises.

En NDIRS, le volume de l'échantillon est compris entre 500 et 1500 mL ce qui pose des problèmes de remplissage (surtout chez les enfants, les femmes enceintes et les vieillards), de transport et de stockage. Ces échantillons sont analysés « en-ligne » d'où l'impossibilité de les réutiliser pour effectuer d'autres analyses plus tard. En outre la technique étant moins sensible l'échantillon analytique est plus volumineux.

### Couplage avec une méthode de séparation

Le spectromètre de masse isotopique présente l'avantage de pouvoir être couplé à divers systèmes préparateurs d'échantillon (systèmes chromatographiques ou analyseurs élémentaires) cette possibilité n'est pas encore offerte par les spectromètres infrarouge.

Le couplage de l'IRMS avec des méthodes chromatographiques permet d'analyser des échantillons liquides et gazeux (GC-IRMS) ou solides après combustion (GC-C-IRMS). Il permet aussi de calculer des rapports  $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$  des différents métabolites d'un substrat marqué au  $^{13}\text{C}$  (caféine, aminopyrine, méthacine, ...) après séparation par chromatographie en phase gazeuse. Ainsi il est possible de réaliser des études dans le domaine de la pharmacologie (études de la maturation enzymatique hépatique, études des effets inducteurs ou inhibiteurs des xénobiotiques, études des voies métaboliques des xénobiotiques, ...), mais également des études cliniques (pathologies hépatiques ou intestinales, diagnostic bactériologique, ...). La dimension des échantillons analytiques utilisés par le spectromètre de masse isotopique offre aussi l'avantage de pratiquer des mesures d'enrichissement isotopique sur de micro-échantillons de  $\text{CO}_2$  provenant de micro-générateurs (chimiques, tissulaires et cellulaires).

### Conclusion

L'infection par *Helicobacter pylori* qui est l'infection bactérienne la plus large à l'échelle mondiale à ouvert un énorme marché au niveau du diagnostic médical. Le souci de développer des méthodes de diagnostic non invasives et non radioactives a naturellement lancé les chercheurs sur la voie des tests respiratoires utilisant le  $^{13}\text{C}$ . Les conséquences au niveau analytique et instrumental ont été la mise au point de systèmes compacts et dédiés utilisant la spectrométrie de masse isotopique. On assiste alors au même phénomène que celui qui a eu lieu il y a une quinzaine d'année avec le développement des détecteurs de masse quadripolaires qui ont fait entrer la spectrométrie de masse organique dans les laboratoires d'analyse biomédicale. Le relatif confort analytique du diagnostic isotopique de la présence de *Helicobacter pylori* par la modification de l'enrichissement en  $^{13}\text{C}$  du  $\text{CO}_2$  expiré voit maintenant rentrer en concurrence avec la spectrométrie de masse isotopique, la spectroscopie infrarouge et des systèmes laser qui sont développés pour donner accès à une instrumentation compacte et à un diagnostic si possible réalisé au lit du malade.

### Références

- Graham, D. Y.; Klein, P. D.; Evans, D. J.; Alpert, L. C.; Opekun, A. R. *Lancet* **1987**, *i*, 1174-1177.
- Graham, D. Y. *Ann. Intern. Med.* **1992**, *116*, 705-708
- Freedman, P.; Guillon, E.; Jumeau, J. *Int Lab.* **1988**, *7*, 22.
- Brazier, J. L. Breath test: drug metabolism studies. Stable isotope pharmaceutical research. Tr Browne, Elsevier Science B.W. Eds. **1997**, 379-403.
- Haisch, M.; Hering, P.; Fuss, W.; Fabinski, W. *Isotopenpraxis Environ. Health Stud.* **1994**, *30*, 247-251.
- Koletzko, S.; Haisch, M.; Seeboth, I.; Braden, B.; Hengels, K. *Lancet* **1995**, *345*, 961-962.
- Braden, B.; Schäfer, F.; Caspary, W. F.; Lembcke, B. *Scand. J. Gastroenterol.* **1996**, *31*, 442-445.
- Taniguchi, Y.; Kimura, K.; Sohara, H.; Shirasaki, A.; Kawada, H.; Satoh, K.; Kihira, K.; Mei Wang, X.; Takimoto, T.; Goto, Y.; Takatori, K.; Iida, K.; Kajiwara, M. *J. Gastroenterol.* **1996**, *31*(9), 37-40.
- Hildebrand, P.; Beglinger, C. *Clinical Infectious Diseases* **1997**, *25*, 1003-1005.
- Kajiwara, M.; Iida, K.; Takatori, K.; Taniguchi, Y.; Kimura, K. *Chim. Pharm. Bull.* **1997**, *45*(4), 741-743.
- Kajiwara, M.; Takatori, K.; Iida, K.; Noda, A.; Tachikawa, T.; Tsutsui, K.; Kubo, Y.; Mori, M. *American Clinical Lab.* **1997**, *16*, 28-29.
- Ohara, S.; Kato, M.; Asaka, M.; Toyota, T. *Helicobacter* **1998**, *1*, 49-53.