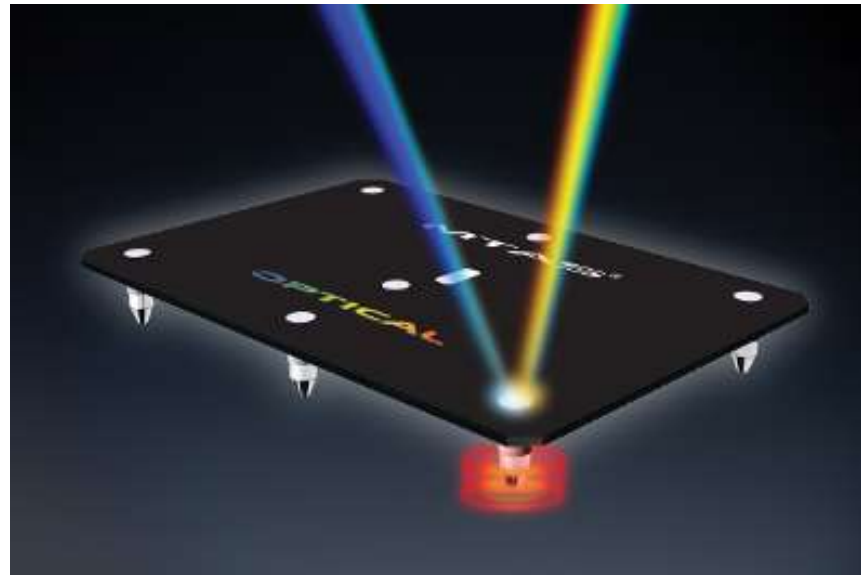


# Caractérisation optique des instruments de PCR Temps réel

Les Brevets #EP 2581728 et US Patent 61/545.264 couvrent la technologie employée pour ces caractérisations optiques

## Sonde de caractérisation optique

La sonde de caractérisation optique permet la mesure de température dans le bloc de l'instrument. Cette mesure est nécessaire pour discriminer les déviations optiques des déviations thermiques, notamment lors des courbes de fusion. De plus, les capteurs de température sont en communication avec des LED's étalonnées qui permettent de simuler l'émission de fluorescence. Ces LEDs, disposées sur le dessus de la sonde, ont un spectre (360 à 780 nm) et une intensité connue. Les LEDs embarquées sont résistantes à la température, pour éviter et minimiser une dérive du spectre. Tous les paramètres sont finement réglés et optimisés pour fournir des niveaux d'émission de lumière justes et définis.



## La raison de l'étalonnage optique des thermocycleurs qPCR

Les signaux générés dans les thermocycleurs PCR temps réel sont influencés par :

Des facteurs chimiques de réaction

Les performances en température du bloc de réaction

Les performances en température du couvercle chauffant

Les lentilles, miroirs et chemin(s) optique(s)

La sensibilité du détecteur optique

Les tolérances mécaniques des mécanismes en place

Les paramètres de traitement du signal, du logiciel, comme la ligne de base, la correction de ligne de base, la détection du rapport signal/bruit, etc.

Pour comprendre si et comment les résultats sont influencés par des "facteurs chimiques non primaires", les thermocycleurs PCR temps réel doivent être caractérisés pour la température et l'optique.

## Méthodes d'étalonnage optique actuellement utilisées

### **Plaques d'essai biologique avec un ou plusieurs colorants (non traçables)**

Principe : un produit identique doit donner des valeurs de Ct similaires

### **Plaques d'essai de colorant (cristal) (non traçables)**

Principe : un produit identique doit fournir des données brutes similaires

### **Plaques d'essai de fusion (non traçables)**

Principe : un produit identique doit fondre (courbe de fusion) et doit donner des valeurs de fusion similaires

### **Plaque de sonde optique de température combinée (traçable)**

Principe : mesure précise de la température combinée et en communication avec la LED, transformée en lumière proportionnelle.

Les signaux LED identiques et calibrés générés par la sonde doivent donner des résultats identiques détectés et analysés par le Thermocycleur temps réel.

## Eléments mesurés avec une plaque de sonde optique brevetée combinée température-optique

### Température

Multi-canaux, 4Hz, températures statiques, températures dynamiques, précision, uniformité, statique et dynamique, taux de rampes, overshoots, undershoots, temps de maintien, température du couvercle chauffé et conditions environnementales.

### Optique

Multivoies, détection des Ct (homogénéité et justesse), saturation optique, linéarité de détection, précision de la courbe de fusion, homogénéité de la courbe de fusion, rapport des Tm et facteur de sensibilité et de linéarité.

Le principe de fonctionnement est le suivant : La sonde émet dans une gamme de longueurs d'onde pour simuler dans un premier temps une amplification avec une ligne de base à 20% d'intensité de la sonde, puis une phase d'augmentation progressive pour la détection des Cts, puis une phase exponentielle jusqu'à saturation à 100 % d'intensité. A l'issue de la phase d'amplification, l'intensité lumineuse redescend à 60% pour simuler ensuite une phase de dissociation, le Tm généré a une valeur connue, à l'issue de la dissociation l'intensité lumineuse est redescendue à 20%. A l'issue du test, les données lues par l'instrument de PCR temps réel sont analysées.

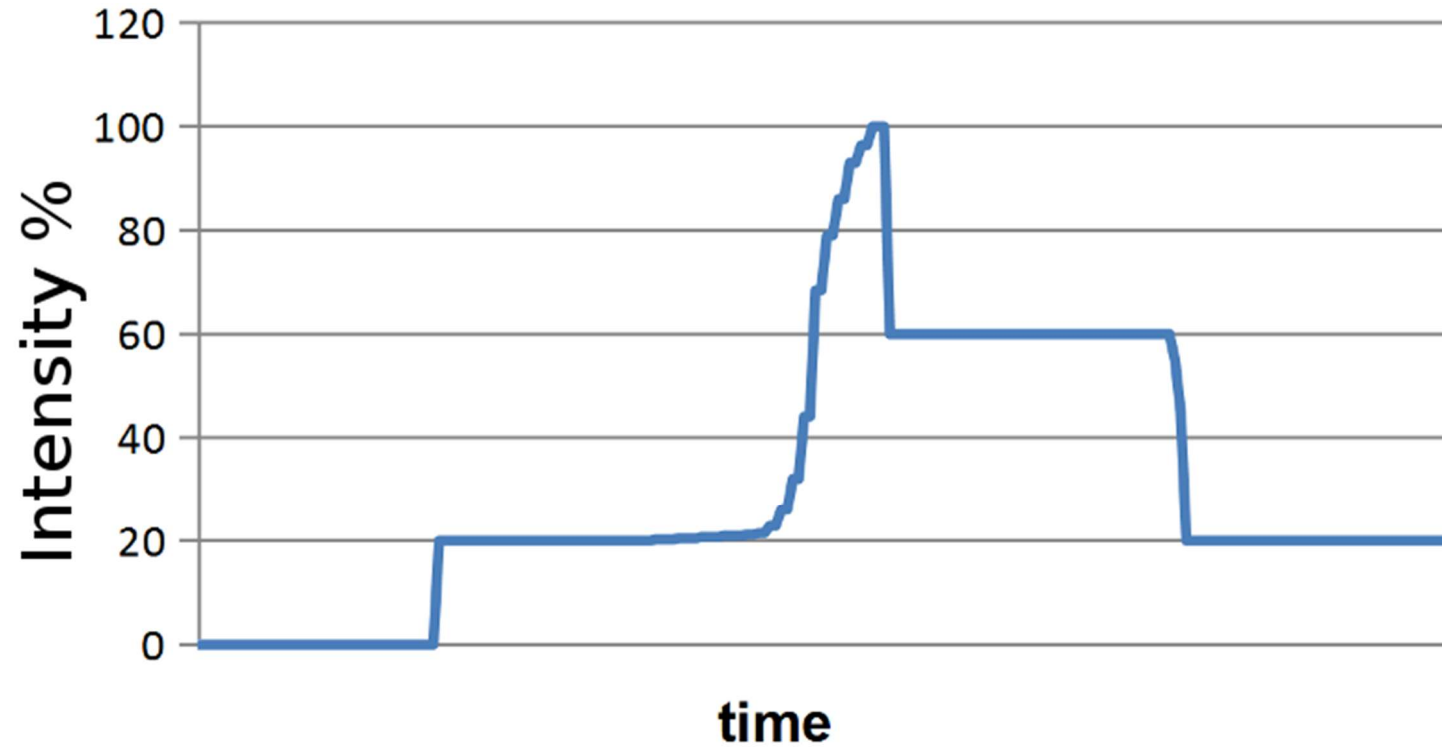
## Protocole type d'un instrument utilisé avec une sonde combinée Température-Optique

### Programme

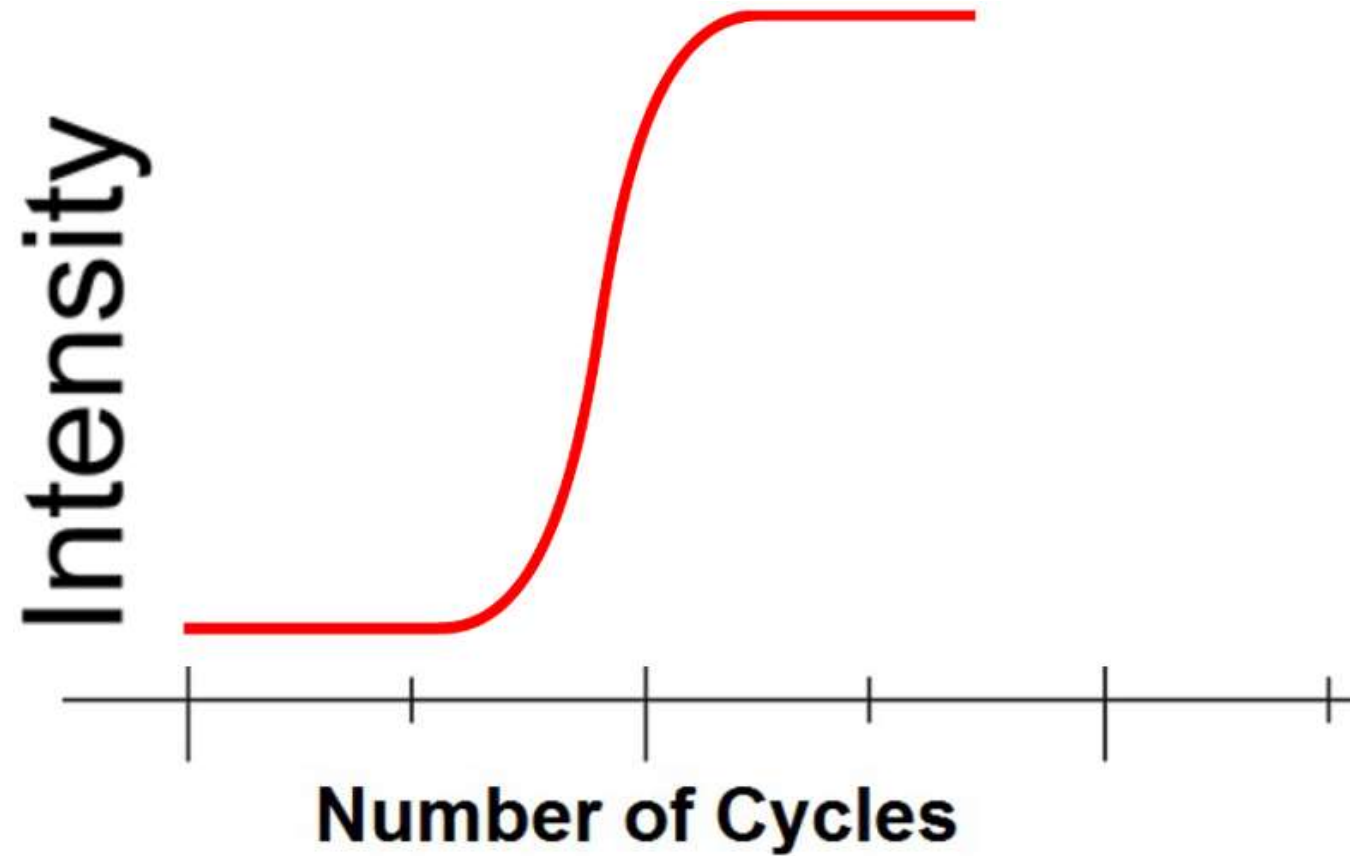
Température °C	Durée (s)	Phase
30.0	60	Préchauffage
95.0	60	Préchauffage
30.0	60	Préchauffage
30.0	60	Cycle de température
95.0	180	Cycle de température
30.0	120	Cycle de température
90.0	180	Cycle de température

95.0	180	Cycle de température
50.0	180	Cycle de température
70.0	180	Cycle de température
60.0	180	Cycle de température
30.0	180	Cycle de température
85.0	1	32 cycles entre 85 / 60 avec détection des "amplicons"
60.0	30	Avec détection optique
95.0	15	Dénaturation
60.0	30	Rampe de fusion
	95	Détection optique de dissociation (Melt-curve)
95.0	15	





En fait, la sonde simule donc, en fonction de la température mesurée, un profil d'intensité lumineuse de PCR temps réel typique de la quantification absolue.



Le graphe peut être divisé suivant les séquences ci-dessous :

- Ligne de base
- S/B (Signal / Bruit)
- Partie Linéaire
- Partie Exponentielle
- Partie Saturation

## Quelles sont les unités de traçabilité mesurées ou générées par la sonde ?

Température d'entrée : °C (EIT-90)

Lumière et intensité en W/sr : C'est-à-dire, intensité du rayonnement [W/sr] en watt par stéradian (radian carré) (flux radiométrique par unité d'angle solide)

Description : Puissance rayonnante d'une source émise dans une certaine direction.

## Détection de Cq ou Ct

Le thermocycleur PCR temps réel analyse l'intensité lumineuse générée par la sonde et calcule les valeurs de Ct pour chaque canal. La sonde fournit des signaux identiques pour les 10 premiers cycles, dans le cadre d'une "ligne de base". Après 10 cycles, la sonde démarre lentement en augmentant "l'intensité lumineuse" tandis que le thermocycleur doit capter toutes les variations d'intensité lumineuse. L'instrument peut alors détecter et calculer une valeur de Ct pour ce canal. Un cyclé idéal avec une optique idéale devrait donc présenter des analyses avec des valeurs de Ct identiques pour chaque canal. Les valeurs de Ct sont exprimées en nombre de cycles de PCR nécessaires pour atteindre un niveau minimum de détection du signal.

## Validation des valeurs de Cq ou Ct

Les valeurs de Ct doivent être identiques pour chaque canal. Le laboratoire doit définir dans quelle mesure la tolérance entre les valeurs de Ct est acceptable. Par exemple, le laboratoire peut accepter une tolérance maximale de 10 %. De plus, la vérification peut être effectuée en comparant les valeurs absolues de Ct détectées avec les valeurs de Ct du même type d'équipement (marque et modèle), ce qui donne une indication de la façon dont le thermocycleur PCR temps réel testé se compare à un équipement similaire.

## Phase de Saturation

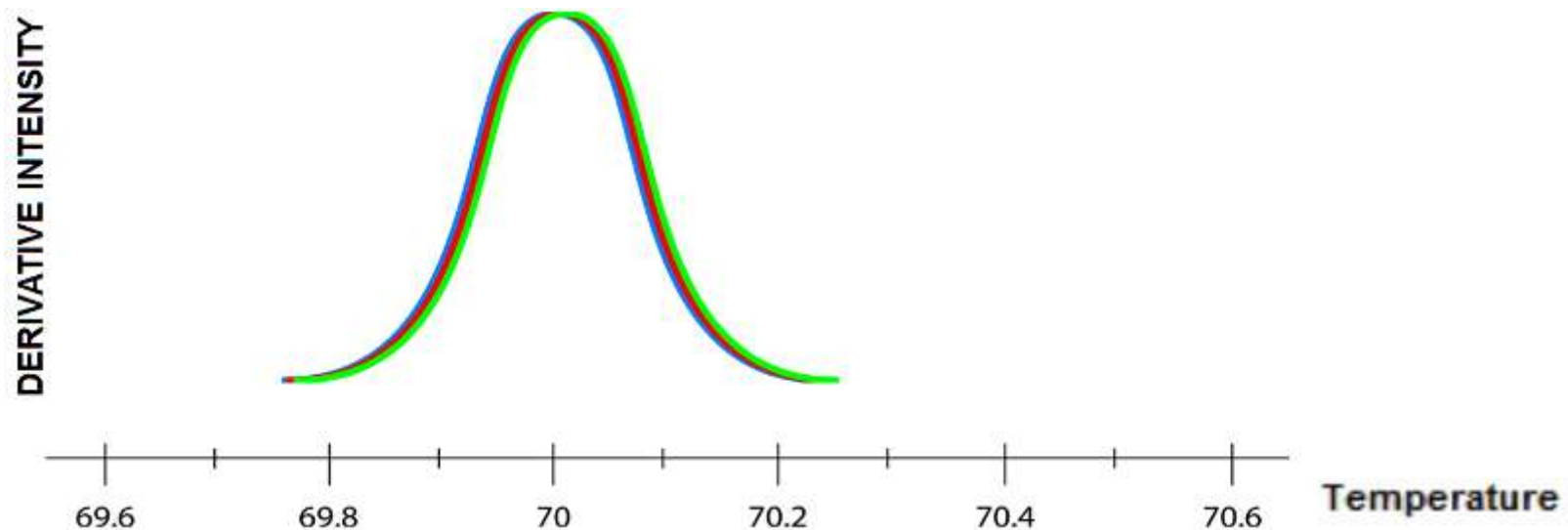
Les données brutes recueillies par l'instrument au maximum de l'amplification (100 % d'intensité lumineuse) fournies par la sonde servent à déterminer la sensibilité linéaire du signal de l'instrument.



## Courbe de fusion

Pendant que le thermocycleur PCR temps réel augmente lentement sa température de bloc, l'optique du thermocycleur surveille les variations de l'intensité lumineuse. La sonde positionnée dans l'instrument mesure dynamiquement la température de chaque canal. La température mesurée est traitée et convertie proportionnellement en une quantité définie de lumière.

Pour un thermocycleur idéal, chaque puits est identique en température et des lectures optiques identiques sont détectées sur chaque canal. Idéalement, il devrait y avoir un pic, où tous les signaux de tous les canaux se superposent et l'intensité du signal détecté par le thermocycleur devrait être identique pour tous les canaux. Les points de fusion sont exprimés en  $T_m$  et en °C.



Exemple de thermocycleur PCR temps réel avec une courbe de fusion idéale

Durant la courbe de fusion des paramètres tels que les déviations de  $T_m$  (décalage de pics), les hauteurs de pics, permettent de tirer des conclusions sur la qualité de l'optique, du logiciel d'analyse, de la qualité des trajets optiques, de la sensibilité et de la linéarité entre canaux ...