

La métrologie des thermocycleurs

Thierry Hachet¹

Résumé

Une sonde spéciale a été développée pour contrôler la température des plaques à puits des thermocycleurs et l'homogénéité de sa répartition. Une procédure de vérification est présentée.

Cet article a fait l'objet d'une présentation aux Journées de la Mesure et la Métrologie en octobre 2004 : <http://www.inra.fr/qualite/seminaire/j2m/j2m2004.htm>

Mots clés

thermocycleur, PCR, température, métrologie, sonde de température, vérification, contrôle, assurance qualité.

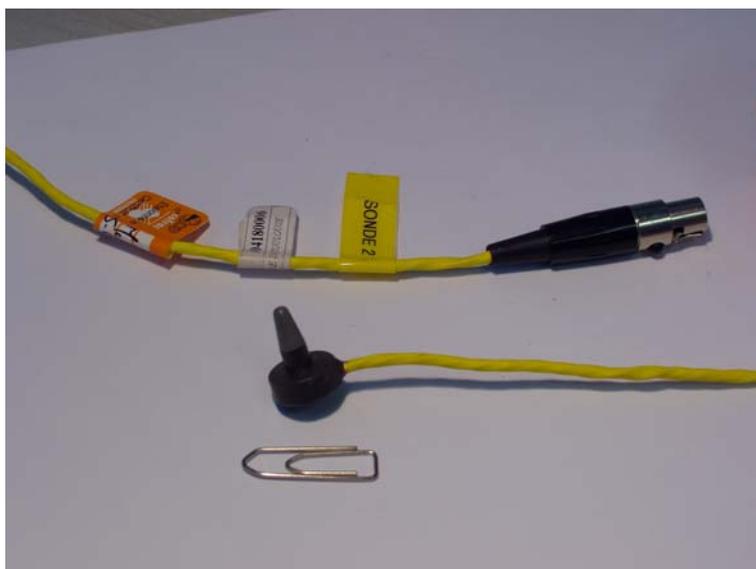


Photo de la sonde (photo INRA)

1. Introduction

Dans le cadre de l'Assurance Qualité, le raccordement des équipements aux étalons nationaux est une obligation définie par le paragraphe 5.3.3 du référentiel niveau 1 de l'INRA concernant la maîtrise des équipements de l'Unité (cf. <http://www.inra.fr/qualite/>).

Les thermocycleurs ont été classés *Equipements stratégiques* de notre unité et, à ce titre, ils doivent être vérifiés à intervalles définis. Nous avons choisi un intervalle de 6 mois.

¹ INRA, Laboratoire de Pharmacologie - Toxicologie BP3 31931 Toulouse cedex 9 - hachet@toulouse.inra.fr

2. Qu'est-ce qu'un thermocycleur ?

Un thermocycleur est un appareil qui réalise automatiquement des *Polymerase Chain Reaction* (PCR). Ces Réactions de Polymérisation en Chaîne permettent la multiplication par deux des brins d'ADN à chaque cycle.

Pour cela, une plaque comportant de 48 à 384 puits dans lesquels sont posés les tubes contenant les échantillons est alternativement chauffée et refroidie à des températures comprises entre +40°C et +98°C. Un couvercle est fermé par-dessus les échantillons. Ce couvercle est chauffé à +104°C environ de manière à éviter la condensation sur les obturateurs des tubes au cours des cycles. Après exécution de l'ensemble des cycles les tubes sont conservés à +4°C.

Plusieurs types d'appareils existent :

- Appareil à tubes fixes. La plaque à puits est alternativement chauffée par des résistances électriques et refroidie par un dispositif à compresseur ou à effet Peltier.
- Appareil à tubes mobiles. L'appareil est constitué de plusieurs plaques à puits à température fixe et réglée. Les tubes sont déplacés par un bras qui les transporte de plaque en plaque pour changer leur température.

Dans les deux cas la vérification métrologique de l'appareil est identique. Il faut vérifier :

- La correspondance entre la température en un point central de la plaque et la température programmée.
- L'homogénéité de la température sur tous les puits de la plaque.
- La durée des plateaux de température.

La précision nécessaire des mesures est de $\pm 0,75^\circ\text{C}$ pour la température et $\pm 0,5\text{s}$ pour les temps. Les utilisateurs considèrent en général que des écarts supérieurs à $1,5^\circ\text{C}$ ou 1 s sont les limites pour le bon déroulement des PCR, aussi bien en fiabilité qu'en reproductibilité. Bien évidemment des tolérances plus faibles peuvent être nécessaires dans certain cas.

Le dispositif décrit dans ces pages ne tient pas compte des temps de montée ou descente en température (gradient thermique). Pour mesurer ces gradients, il faut impérativement placer une sonde sans inertie thermique dans un tube identique à ceux utilisés dans les PCR et rempli de la même quantité du même liquide.

Toute modification dans les conditions de mise en œuvre peut perturber gravement la mesure des gradients :

- contact thermique entre le tube et la plaque
- nature des matières plastiques constituant le tube
- épaisseur des parois des tubes
- valeur de la masse calorifique liquide à chauffer ou refroidir
- couleur de la solution pour l'absorption des infrarouges.

Dans de nombreux cas la mesure des gradients n'est pas critique. Chaque utilisateur décidera de l'impact possible du gradient thermique sur ses expérimentations et de la nécessité de le mesurer.

3. Cahier des charges de la sonde

La sonde doit avoir la forme conique d'un puits de plaque, s'y emboîter parfaitement sans jeu afin d'obtenir un excellent contact thermique avec la plaque.

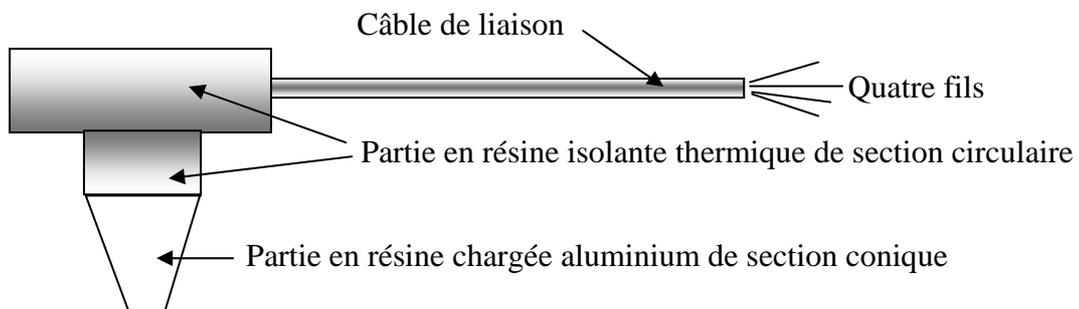
La partie inférieure conique de la sonde doit posséder une excellente conduction de la chaleur et une très faible inertie thermique. Un des meilleurs matériaux possédant ces propriétés est l'aluminium

La partie supérieure de la sonde doit posséder une très faible conduction thermique afin de ne pas se faire chauffer par le couvercle du thermocycleur qui est à +104°C environ. Les meilleurs matériaux sont des résines synthétiques polymérisables de la famille époxy.

Le câble de la sonde doit être suffisamment petit pour passer sous le couvercle lorsque celui-ci est fermé. Un diamètre inférieur à 1,5mm est nécessaire. Le câble doit aussi résister à des températures comprises entre 0°C et +104°C sous une « certaine » pression due à l'écrasement du joint du couvercle. Les isolants à base de matériaux fluorés sont les mieux adaptés. Le silicone pourrait également être utilisé mais sa résistance au déchirement est un peu faible.

Le capteur de température doit posséder une précision et une stabilité supérieures à 0,1°C dans la gamme 0°C à +100°C. Les capteurs sont très sollicités mécaniquement par les cycles thermiques successifs. La technologie PT100 s'impose, elle est constituée d'une résistance de fil de platine de 100 ohms à 0°C. Les thermocouples ou thermistances sont complètement inadaptés. La précision et la fiabilité demandées nécessitent pour ce capteur un montage à quatre fils. Ces quatre fils sont regroupés dans une gaine unique en polymère polyoléfine rétractable, le tout constituant le câble de la sonde avec les contraintes énumérées ci-dessus.

4. Constitution et fabrication de la sonde



La sonde en vue latérale

La partie inférieure de la sonde est réalisée à partir de résine époxy liquide chargée à la poudre d'aluminium de type Devcon, Aluminium F-2 Liquid, (www.devcon.com)

La partie supérieure est réalisée par une résine époxy liquide de type 3M, Scotch -Weld DP 460, (www.3m.com).

Dans un premier temps, il faut réaliser un moulage d'un puits d'une plaque à l'aide d'un caoutchouc silicone liquide auto démoulant bi composant de type Framet, Flexcomet 30SA, (www.loctite.fr) ou similaire.

Le capteur est constitué d'un dépôt de platine sur une plaque de silice de 2 x 2,3mm. Le dépôt est ensuite gravé au laser pour former un serpentín de 100 ohms de résistance relié à deux fils de 0,25 mm de diamètre, (www.correge.fr).

La résine époxy chargée à l'aluminium est conductrice de l'électricité. Après soudure des fils sur le capteur et pour éviter un court circuit, il faut donc isoler ceux ci avec un vernis en couche mince de type Vishay, M-Coat D, (www.vishay.com).

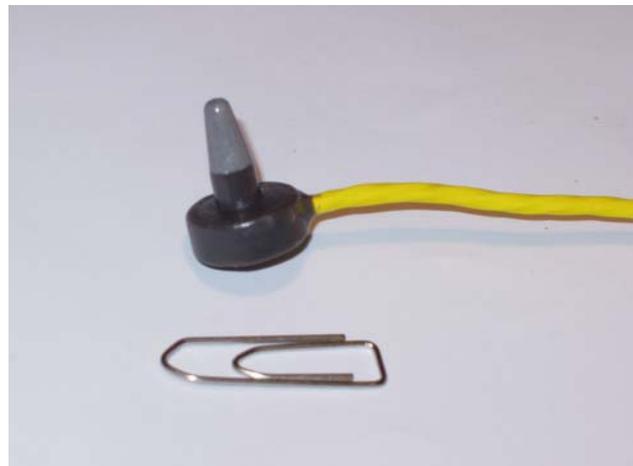
Le capteur est ensuite coulé au fond du moule, dans la partie conique, avec la résine chargée à l'aluminium. Après quatre heures à +20°C, la résine n'est pas encore dure et il est possible de terminer le remplissage du moule avec la résine isolante thermique. Le délai de coulée est important pour assurer l'adhérence des deux résines. La sonde est démoulée après 24 heures et cuite au four à +105°C pendant 3 heures, avec un gradient de montée en température de +1°C à la minute.

Bien entendu, de nombreux détails de fabrication ou de savoir-faire ne sont pas retranscrits dans ces pages par manque de place.

La sonde et son thermomètre sont ensuite étalonnés en chaîne complète sur trois points : 0°C, +42°C, +95°C. D'autres points peuvent s'avérer utiles.

Cette sonde est commercialisée par le Laboratoire de Pharmacologie – Toxicologie pour les unités INRA qui seraient intéressées.

Une trentaine d'exemplaires ont été fabriqués pour différents départements et unités de recherche de l'INRA.



5. Procédure de vérification

En annexe (pp. 49-56) est donnée, à titre d'exemple, une procédure de vérification d'un thermocycleur. Chaque utilisateur doit valider cette procédure après l'avoir adaptée à son contexte personnel.

**INRA
LABORATOIRE DE XXXXXXXXXXXXXXXX
URYU**

Référence : xxxx/yyyyyyy/nnn/Vmm

Titre : Procédure de vérification des thermocycleurs

Objet : Cette procédure permet de vérifier les températures des puits et les temps écoulés pour chaque plateau de température. A l'issue de ces tests un constat de vérification est rempli.

	Nom	Date	Signature
Rédacteur			
Vérificateur			
Correspondant Qualité			
Approbateur			

Annule et remplace la version précédente

Date d'application :

1. Sommaire

Page de garde	page 1
1. Sommaire	page 2
2. Objet, Domaine d'application, Diffusion, Définition, Fréquence	page 2
3. Sécurité, Matériel, Vérification	page 3
4. Constat de vérification	page 2

2. Objet

Cette procédure permet de vérifier les températures des puits des thermocycleurs et les temps écoulés pour chaque plateau de température. A l'issue de ces tests un constat de vérification est rempli et la machine est soit utilisable, soit condamnée pour réparation (Voir *Procédure de condamnation du matériel*).

Cette procédure permet de vérifier deux paramètres fondamentaux des thermocycleurs : la température et le temps.

3. Domaine d'application

Cette procédure s'applique à tous les modèles de thermocycleurs quels que soient leur origine, leur marque, leur mode de fonctionnement (modules Peltier ou compresseur).

4. Diffusion

Cette procédure doit être diffusée à tous les utilisateurs de thermocycleur

5. Définitions

- **PCR** : Polymerase Chain Reaction. Cette machine permet la multiplication des fragments d'ADN.
- **Cycle thermique**: un cycle thermique est une alternance d'une température chaude suivie d'une température plus froide.
- **Nombre de cycles** : nombre de répétitions d'un cycle
- **Température finale** : température à laquelle les échantillons sont conservés dans les puits du thermocycleur. La température finale est habituellement de +4°C
- **Puits** : trou de forme conique existant dans la plaque de puits subissant les cycles thermiques
- **Plaque de puits** : ensemble des puits de forme conique. Une plaque de puits peut compter de 24 à 96 puits.
- **Couvercle** : plaque chauffante venant couvrir les échantillons et évitant la condensation dans leur couvercle. Sa température est d'environ +104°C

6. Fréquence

Les vérifications doivent être exécutées deux fois par an. Elles sont consignées sur un constat de vérification dont un modèle est fourni en fin de cette procédure.

7. Sécurité

Les plaques et le couvercle de puits du thermocycleur travaillent à des températures variables entre +4°C et +104°C. Un contact, même temporaire, avec ces parties qui peuvent être brûlantes à certains moments du cycle peut provoquer des lésions graves.

8. Matériel nécessaire

Pour exécuter cette procédure il est indispensable de posséder

- **un thermomètre étalon** équipé d'une sonde possédant une forme adaptée à la mesure de la température dans les puits de thermocycleur.

Cette sonde possède une forme conique analogue à celle des flacons utilisés dans le thermocycleur lui-même. Ce thermomètre doit être vérifié et se trouver en cours de validité au moment du test de vérification du thermocycleur.

- **un chronomètre étalon** au dixième de seconde, vérifié, en cours de validité au moment du test de vérification du thermocycleur.

- **un conducteur thermique liquide**. Sans être indispensable, il améliore considérablement la précision des résultats. Celui-ci peut être :

- une huile minérale à base de silicone (les meilleurs résultats)
- une huile organique aliphatique ou aromatique
- de la glycérine déshydratée
- tout autre corps validé par des essais

- **une boîte de cotons-tiges**

- **un couvercle** constitué d'une plaque en matière plastique de 4 à 5 mm d'épaisseur équipée de rebords. Elle sera de mêmes dimensions que la plaque de puits et capable de supporter +104°C sans se déformer. Ses rebords seront de hauteur identique à la partie émergente de la sonde lorsqu'elle est placée dans un puits. Cette plaque est placée sur la plaque de puits par dessus la sonde et son rôle est d'éviter les courants d'air qui pourraient perturber la mesure de température en ventilant la sonde.

9. Vérification

Les tests de vérification sont au nombre de trois :

1. Test de contrôle de température qui permet de vérifier que les différentes températures utilisées sont conformes aux spécifications dans un puits situé au centre de la plaque de puits.

2. Test d'homogénéité de température qui permet de vérifier l'homogénéité de la température dans tous les puits de la plaque de puits.

3. Test de vérification des temps des plateaux de température qui permet de vérifier que les temps des paliers de température sont conformes aux spécifications. Les temps de montée et de descente en température ne sont pas vérifiés dans le cadre de cette procédure.

9.1. Test de contrôle de température

Préparation

- Programmer le thermocycleur pour effectuer un seul cycle défini comme suit :
 - Température = +42°C pendant 1 mn
 - Température = +60°C pendant 1 mn
 - Température = +72°C pendant 1 mn
 - Température = +95°C pendant 1 mn
- Enduire le puits central avec un coton tige imprégné de conducteur thermique liquide.
- Mettre le thermomètre étalon sous tension.
- Placer la sonde dans le puits central.
- Placer le couvercle sur la sonde.

Exécution

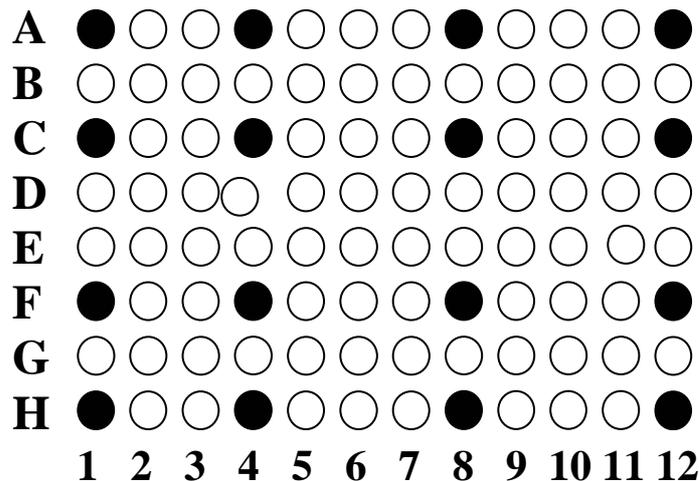
1. Lancer le programme du thermocycleur
2. Lorsque le plateau +42°C s'est déroulé durant 55s, lire la température affichée par le thermomètre étalon et la recopier sur le constat de vérification.
3. Lorsque le plateau +60°C s'est déroulé durant 55s, lire la température affichée par le thermomètre étalon et la recopier sur le constat de vérification.
4. Lorsque le plateau +72°C s'est déroulé durant 55s, lire la température affichée par le thermomètre étalon et la recopier sur le constat de vérification.
5. Lorsque le plateau +95°C s'est déroulé durant 55s, lire la température affichée par le thermomètre étalon et la recopier sur le constat de vérification.

Les températures relevées sont déclarées conformes si elle ne diffèrent pas de plus de $\pm 0,75^{\circ}\text{C}$ des températures demandées. Si une de ces températures n'est pas conforme, un contrôle du thermocycleur doit être exécuté.

9.2. Test d'homogénéité de température

Préparation

- Programmer le thermocycleur pour effectuer 99 cycles définis comme suit :
 - Température = +42°C pendant 1mn
 - Température = +95°C pendant 1mn
- Enduire avec un coton tige imprégné de conducteur thermique liquide un puits sur quatre environ pour chaque rangée et chaque colonne, en s'inspirant du schéma suivant issu d'une plaque à 96 puits où les points noirs représentent les puits enduits :



- Mettre le thermomètre étalon sous tension.
- Placer la sonde dans le puits A1.
- Placer le couvercle sur la sonde.

Exécution

1. Lancer le programme du thermocycleur
2. Lorsque le plateau +42°C s'est déroulé durant 55s, lire la température affichée par le thermomètre étalon et la recopier sur le constat de vérification.
3. Lorsque le plateau +95°C s'est déroulé durant 55s, lire la température affichée par le thermomètre étalon et la recopier sur le constat de vérification.
4. Soulever le couvercle et placer rapidement la sonde en A4
5. Remettre le couvercle
6. Lorsque le plateau +42°C s'est déroulé durant 55s, lire la température affichée par le thermomètre étalon et la recopier sur le constat de vérification.
7. Lorsque le plateau +95°C s'est déroulé durant 55s, lire la température affichée par le thermomètre étalon et la recopier sur le constat de vérification.
8. Procéder ainsi pour toutes les positions successives de la sonde.

Les températures relevées sont déclarées conformes si elle ne diffèrent pas de plus de $\pm 0,75^\circ\text{C}$ des températures demandées. Si une de ces températures n'est pas conforme, une calibration du thermocycleur doit être exécutée.

9.3. Test de vérification des temps des plateaux de température

Préparation

- Programmer le thermocycleur pour effectuer 4 cycles définis comme suit :
 - Température = +42°C pendant 1mn
 - Température = +95°C pendant 1mn
 - Température = +42°C pendant 5mn
 - Température = +95°C pendant 5mn

Exécution

1. Lancer le programme du thermocycleur
2. En regardant le tableau de bord du thermocycleur, déclencher le chronomètre lorsque le plateau +42°C débute et l'arrêter lorsqu'il se termine.
3. Exécuter cette mesure pour chacun des 4 temps programmés
4. Recommencer plusieurs fois si nécessaire car le déclenchement rigoureux du chronomètre demande un certain entraînement.
5. Recopier les résultats sur le constat de vérification.

Les temps sont déclarés conformes s'ils ne diffèrent pas de plus de 0,5s des temps demandés.

Les températures relevées sont déclarées conformes si elle ne diffèrent pas de plus de $\pm 0,75^{\circ}\text{C}$ des températures demandées

3. Test de vérification des temps des plateaux de température

	Temps mesuré au chronomètre étalon en s	Conforme : Oui/Non
Temps : 1mn à $+42^{\circ}\text{C}$		
Temps : 1mn à $+95^{\circ}\text{C}$		
Temps : 5mn à $+42^{\circ}\text{C}$		
Temps : 5mn à $+95^{\circ}\text{C}$		

Les temps sont déclarés conformes si ils ne diffèrent pas de plus de 0,5s des temps demandés.

4. Résultats des tests

Le thermocycleur est déclaré conforme si tous les tests sont conformes.

	Conforme : Oui/Non
Test de calibration	
Test d'homogénéité	
Test de vérification des temps des plateaux de température	
<u>Conformité globale du thermocycleur</u>	