

(12) DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIÉE EN VERTU DU TRAITÉ DE COOPÉRATION EN MATIÈRE DE BREVETS (PCT)

(19) Organisation Mondiale de la
Propriété Intellectuelle
Bureau international

(43) Date de la publication internationale
02 janvier 2025 (02.01.2025)



(10) Numéro de publication internationale
WO 2025/003077 A1

(51) Classification internationale des brevets :
G16B 5/30 (2019.01) G16B 25/20 (2019.01)

(21) Numéro de la demande internationale :
PCT/EP2024/067690

(22) Date de dépôt international :
24 juin 2024 (24.06.2024)

(25) Langue de dépôt : français

(26) Langue de publication : français

(30) Données relatives à la priorité :
FR2306813 28 juin 2023 (28.06.2023) FR

(71) Déposant : BIOMÉRIEUX [FR/FR] ; 69280 MARCY
L'ETOILE (FR).

(72) Inventeurs : **DRAZEK, Laurent** ; 6 rue Louis et Auguste
Lumière, 38100 GRENOBLE (FR). **PAILLIER, François**
; CircaGene DNA Genetic Testing, 7 Bell Yard, WC2A2JR
LONDRES (FR). **VIDAL, Céline** ; 17 rue des bleuets,
38180 SEYSSINS (FR).

(81) États désignés (sauf indication contraire, pour tout titre de
protection nationale disponible) : AE, AG, AL, AM, AO,
AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA,
CH, CL, CN, CO, CR, CU, CV, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO,
DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN,
HR, HU, ID, IL, IN, IQ, IR, IS, IT, JM, JO, JP, KE, KG,
KH, KN, KP, KR, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY,
MA, MD, MG, MK, MN, MU, MW, MX, MY, MZ, NA,
NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO,
RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, ST, SV, SY, TH,

(54) Title: MANUFACTURE OF POLYMERASE CHAIN AMPLIFICATION KITS OPTIMIZING AN AMPLIFICATION DENATURATION PHASE

(54) Titre : FABRICATION DE KITS D'AMPLIFICATION EN CHAÎNE PAR POLYMERASE OPTIMISANT UNE PHASE DE DENATURATION DE L'AMPLIFICATION

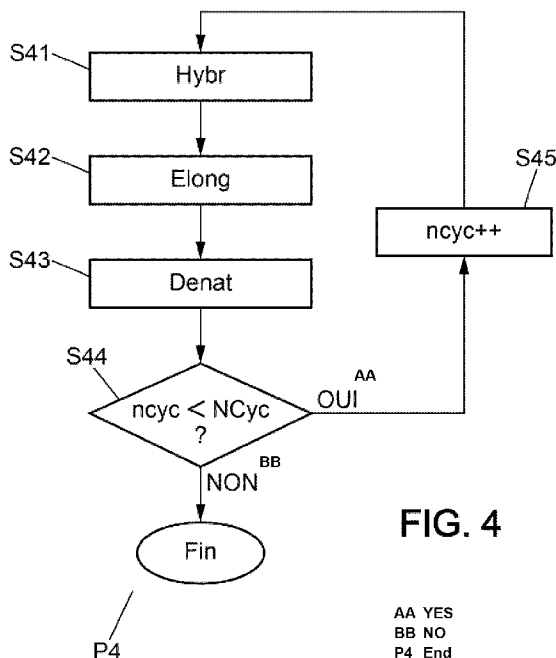


FIG. 4

(57) Abstract: Disclosed is a method for digitally simulating a polymerase chain amplification of at least one target, comprising the simulation of a plurality of successive cycles of the amplification, each cycle comprising, sequentially: a hybridization phase; an elongation phase; then a denaturation phase; wherein, for each cycle: the hybridization phase comprises: obtaining, for the cycle, an initial value of a vector of concentrations of a plurality of nucleic acid molecules in the form of single strands; calculating a matrix of concentrations of partial duplexes formed by the hybridization of the plurality of nucleic acid molecules in the form of single strands; the denaturation phase comprises: multiplying a vector of the concentration of elongated duplexes resulting from the application of the

TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, WS,
ZA, ZM, ZW.

(84) **États désignés** (*sauf indication contraire, pour tout titre de protection régionale disponible*) : ARIPO (BW, CV, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SC, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), eurasién (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), européen (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, ME, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Publiée:

- avec rapport de recherche internationale (Art. 21(3))
- en noir et blanc ; la demande internationale telle que déposée était en couleur ou en échelle de gris et est disponible sur PATENTSCOPE pour téléchargement.

elongation phase to the concentrations of duplexes, by an elongated duplex denaturation tensor.

(57) **Abrégé** : Procédé de simulation numérique d'une amplification en chaîne par polymérase d'au moins une cible, comprenant la simulation d'une pluralité de cycles successifs de l'amplification, chaque cycle comprenant, de manière séquentielle : une phase d'hybridation; une phase d'élongation; puis une phase de dénaturation; dans lequel, pour chaque cycle : la phase d'hybridation comprend : l'obtention d'une valeur initiale pour le cycle d'un vecteur de concentrations d'une pluralité de molécules d'acide nucléique sous forme de simples brins; le calcul d'une matrice de concentrations de duplexes partiels formés par l'hybridation de la pluralité de molécules d'acide nucléique sous forme de simples brins; la phase de dénaturation comprend : la multiplication d'un vecteur de concentration de duplexes élongués, résultant de l'application de la phase d'élongation aux concentrations de duplexes, par un tenseur de dénaturation des duplexes élongués.

Description

Titre : FABRICATION DE KITS D'AMPLIFICATION EN CHAÎNE PAR POLYMERASE OPTIMISANT UNE PHASE DE DENATURATION DE L'AMPLIFICATION

Domaine technique

- 5 [0001] La présente divulgation relève du domaine de l'amplification en chaîne par polymérase. Plus précisément, la présente divulgation relève du domaine de la simulation et de la fabrication de kits d'amplification en chaîne par polymérase

Technique antérieure

- 10 [0002] Une amplification en chaîne par polymérase (également appelée réaction en chaîne par polymérase, et abrégée « PCR », de l'anglais « Polymerase Chain Reaction » est une réaction permettant la multiplication de molécules d'acide nucléique (par exemple ADN ou ARN). A chaque cycle de réaction, chaque molécule d'acide nucléique est dupliquée. L'amplification PCR permet donc de multiplier les molécules d'acide nucléique de manière exponentielle, la concentration d'acide nucléique pouvant doubler à chaque cycle de réaction.
- 15 [0003] Ceci permet à l'amplification PCR de parvenir, à partir de quantités d'acides nucléiques mêmes très faibles, à des concentrations relativement importantes, permettant leur détection. Ainsi, l'amplification PCR est utilisée dans de nombreuses applications biomédicales, notamment la détection et la caractérisation d'agents pathogènes, car elle permet de transformer des quantités infimes d'acides nucléiques représentatifs d'un agent pathogène en des quantités détectables.
- 20 [0004] Une amplification PCR est dite « singleplexe » lorsqu'elle vise à amplifier un seul acide nucléique, ou « multiplexe » lorsqu'elle vise à amplifier une pluralité d'acides nucléiques différents simultanément. Les molécules à amplifier peuvent être appelées « cibles » et les molécules amplifiées « amplicons », étant entendu qu'un amplicon peut lui-même être amplifié à un ou plusieurs cycles ultérieurs.
- 25 [0005] L'amplification PCR est généralement réalisée dans un kit PCR appliquant différentes températures afin de déclencher les étapes successives des cycles d'amplification. Le kit PCR contient initialement des amorces permettant d'enclencher l'amplification.
- [0006] Le succès et la rapidité de l'amplification PCR dépendent de nombreux paramètres du kit PCR, notamment les durées et températures des différentes étapes de la réaction, les séquences
- 30 des amorces initialement présentes dans le kit, leur concentration, les concentrations de sels monovalents et divalents, des oligonucléotides en solution, la longueur des amplicons attendus (des amplicons plus courts permettant des durées de cycles plus courtes également), etc.
- [0007] De manière générale, lors de la conception d'un kit PCR, le concepteur réalise les étapes suivantes :
- 35 a) identifie pour chaque microorganisme une liste de cibles potentielles spécifiques (i.e. non partagée avec les autres microorganismes) ;

b) choisit en fonction de son expérience, des amorces potentielles dans une liste d'amorces possibles ;

c) fait des essais en condition réelle ;

d) réitère le processus si les performances de la PCR ne sont pas satisfaisantes.

5 **[0008]** Cette méthodologie s'avère d'autant plus ardue lorsque plusieurs cibles sont visées. La conception d'un kit est donc longue et complexe et repose sur une expertise métier propre à chaque concepteur.

[0009] Une anticipation des réactions sur papier est également impossible, car le concepteur est très vite dépassé par le nombre de réactions de sorte qu'il est impossible pour l'esprit humain de
10 simuler sur le papier ce qui se déroulera réellement lors de la PCR.

[0010] Par exemple, il est impossible de résoudre a priori un système d'équations différentielles représentant la phase d'hybridation, prenant en compte le fait que l'hybridation entre les différentes molécules peuvent s'être réalisée en différents endroits. Les méthodes de l'état de l'art ne permettent pas non plus d'effectuer de simulations numériques d'un tel système dans un temps raisonnable, du
15 fait de la présence de nombreuses équations différentielles liées les unes aux autres. Ceci réduit considérablement les possibilités de conception et donc d'amélioration de kits PCR.

[0011] Il y a donc besoin d'une méthode de conception de kits PCR permettant de prévoir le déroulement de phases de dénaturation y compris en cas d'hybridations multiples afin de faciliter la sélection de paramètres facilitant l'amplification d'une ou plusieurs cibles visées.

20 **Résumé**

[0012] La présente divulgation vient améliorer la situation.

[0013] Il est proposé un procédé de simulation numérique d'une amplification en chaîne par polymérase d'au moins une cible, ledit procédé comprenant la simulation d'une pluralité de cycles successifs de l'amplification, chaque cycle comprenant, de manière séquentielle : une phase
25 d'hybridation entre l'au moins une cible et une pluralité d'amorces ; une phase d'élongation ; puis une phase de dénaturation ; dans lequel la phase d'hybridation comprend pour chaque cycle : l'obtention d'une valeur initiale pour le cycle d'un vecteur de concentrations d'une pluralité de molécules d'acide nucléique sous forme de simple brins comprenant l'au moins une cible et la pluralité d'amorces ; l'initialisation d'une matrice de concentrations de duplexes formés par
30 l'hybridation de la pluralité de molécules d'acide nucléique sous forme de simples brins; le calcul, par pas de temps successifs, de l'évolution de ladite matrice de concentrations au cours de la phase d'hybridation, par l'application à la matrice de concentrations d'une équation différentielle matricielle représentant la cinétique de formation desdits duplexes en fonction des concentrations de la pluralité de molécules d'acide nucléique, ladite équation différentielle matricielle étant paramétrée par au
35 moins une matrice d'association comprenant les constantes d'associations associées à chaque duplex et une matrice de dissociation comprenant les constantes de dissociation associées à chaque duplex.

[0014] On entend par "au moins une cible" au moins un acide nucléique d'une séquence à amplifier. Selon différents modes de réalisation de l'invention, l'amplification peut concerner une unique cible, auquel cas l'amplification est dite « singleplexe », ou une pluralité de cibles, auquel cas l'amplification est dite « multiplexe ».

- 5 **[0015]** On entend par "molécule d'acide nucléique sous forme de simples brins" une molécule d'acide nucléique sous forme de simple brins non appariée à une molécule simple brin complémentaire.

- [0016]** On entend par « constante d'association » (également appelée « constante de taux d'association », ou « constante de vitesse d'association », en anglais « association rate constant »),
10 généralement notée k_{on} , une constante de vitesse représentant la vitesse de la réaction d'association de deux molécules d'acide nucléique sous forme de simples brins en un duplexe.

- [0017]** On entend par « constante de dissociation » (également appelée « constante de taux dissociation », ou « constante de vitesse dissociation », en anglais « association rate constant »),
généralement notée k_{off} , une constante de vitesse représentant la vitesse de la réaction de
15 dissociation d'un duplexe en deux molécules d'acide nucléique sous forme de simples brins.

[0018] Ceci permet de simuler l'ensemble des phases d'hybridations (c'est-à-dire d'équilibre entre réactions d'association et de dissociation) s'effectuant entre les cibles, les amplicons et les amorces. L'ensemble de la dynamique d'une amplification en chaîne par polymérase peut donc être modélisée, intégrant les réactions croisées avec les produits intermédiaires.

- 20 **[0019]** Cette modélisation spécifique d'une amplification en chaîne par polymérase permet ainsi de valider le design d'un dispositif d'amplification en chaîne par polymérase, ou au contraire d'identifier des réactions indésirables et de modifier en fonction les paramètres influant la réaction d'amplification (concentration initiale des amorces, des sels, durée et température des phases, etc.).

- [0020]** Par ailleurs, la simulation de la phase d'hybridation selon une unique équation différentielle
25 matricielle permet une résolution de la cinétique du système à l'aide de capacités de calcul conventionnelles.

- [0021]** Selon un autre aspect, il est proposé un procédé de fabrication d'un kit pour la caractérisation de microorganismes compris dans un échantillon par utilisation d'une réaction d'amplification en chaîne par polymérase, ledit kit comprenant une pluralité d'amorces validées, procédé dans lequel
30 la pluralité d'amorces et le vecteur de concentrations pour ladite pluralité d'amorces sont obtenus par un procédé de simulation selon l'un des modes de réalisation de l'invention.

[0022] Ceci permet de fabriquer un dispositif reproduisant la réaction telle que simulée. Le dispositif ainsi produit permettra donc la multiplication des cibles telle qu'elle a été simulée précédemment.

- [0023]** Selon un autre aspect, il est proposé un kit pour l'amplification en chaîne par polymérase
35 fabriqué par un procédé de fabrication selon l'un des modes de réalisation de l'invention.

[0024] Selon un autre aspect, il est proposé un programme informatique comportant des instructions pour la mise en œuvre de tout ou partie d'un procédé tel que défini dans les présentes lorsque ce programme est exécuté par un processeur.

[0025] Selon un autre aspect, il est proposé un support d'enregistrement non transitoire, lisible par un ordinateur, sur lequel est enregistré un tel programme.

[0026] Selon un autre aspect, il est proposé un procédé de caractérisation de microorganismes compris dans un échantillon, comprenant : la préparation de l'échantillon de manière à réaliser sur l'échantillon préparé une PCR, ladite préparation comprenant une étape d'ajout d'un kit fabriqué conformément à un procédé de fabrication d'un kit tel que défini dans les présentes; la mise en œuvre de la PCR sur l'échantillon préparé ; la caractérisation des microorganismes en fonction des résultats de la PCR.

[0027] Les caractéristiques exposées dans les paragraphes suivants peuvent, optionnellement, être mises en œuvre, indépendamment les unes des autres ou en combinaison les unes avec les autres :

[0028] Avantageusement, dans lequel l'équation différentielle intègre des équations de conservation de masse de la forme :

$$T_{i0} = T_i(t^*) + \sum_l H_{il}(t^*) + \sum_k H_{ki}(t^*) - H_{i,i}(t^*)$$

$$T_{j0} = T_j(t^*) + \sum_k H_{kj}(t^*) + \sum_l H_{jl}(t^*) - H_{j,j}(t^*)$$

Dans lesquelles : t^* représente le temps écoulé depuis le début de la phase d'hybridation ; les notations T_i et T_j désignent respectivement les concentrations de deux molécules d'acide nucléique sous forme de simple brins d'indices i et j dans le vecteur $\bar{T}$ de concentrations d'une pluralité de molécules d'acide nucléique ; la notation H_{xy} désigne la concentration d'un duplexe formé par l'hybridation de la paire de molécules d'acide nucléique sous forme de simple brins d'indices x et y dans le vecteur $\bar{T}$ de concentrations d'une pluralité de molécules d'acide nucléique ; les notations T_{i0} et T_{j0} désignent les valeurs de T_i et T_j à $t^* = 0$; ou toute autre formulation mathématiquement équivalente.

[0029] Ceci permet d'obtenir une simulation plus précise de la phase d'hybridation, car la conservation de masse est prise en compte.

[0030] Avantageusement, lequel l'équation différentielle matricielle est de la forme suivante :

$$\frac{dH}{dt} = K_{on} \odot [(T_0 - (H\mathbb{I}_{N,1}) - {}^t(\mathbb{I}_{1,N}H) + \text{diag}(H))]^t [T_0 - {}^t(\mathbb{I}_{1,N}H) - (H\mathbb{I}_{N,1}) + \text{diag}(H)] - K_{off} \odot H$$

dans laquelle : H est la matrice de concentration des duplexes ; T_0 est la valeur initiale pour le cycle du vecteur de concentration de la pluralité de molécules ; K_{on} est la matrice d'association ; K_{off} est la matrice de dissociation ; l'opérateur $\mathbb{I}_{i,j}$ représente une matrice en deux dimensions comprenant i lignes et j colonnes dont tous les éléments sont égaux à 1 ; l'opérateur « diag() » désigne un

opérateur prenant en paramètre une matrice carrée et extrayant à partir de cette matrice carrée un vecteur ayant pour dimension le nombre de lignes ou de colonnes de la matrice carrée et contenant tous les éléments de la diagonale de la matrice carrée.

[0031] Par exemple, l'opérateur $\mathbb{I}_{1,N}$ représente un vecteur horizontal de dimension N ne comprenant que des 1, et l'opérateur $\mathbb{I}_{N,1}$ représente un vecteur vertical de dimension N ne comprenant que des 1.

[0032] Par exemple, l'opérateur $\text{diag}(H)$ transforme une matrice carrée H de dimension NxN en un vecteur de dimension N comprenant tous les éléments de la diagonale de N, dans l'ordre. Par

exemple, si $H = \begin{bmatrix} 1 & 2 & 3 \\ 4 & 5 & 6 \\ 7 & 8 & 9 \end{bmatrix}$, alors $\text{diag}(H) = \begin{bmatrix} 1 \\ 5 \\ 9 \end{bmatrix}$,

[0033] Ceci permet d'intégrer les équations différentielles relatives à toutes les réactions d'hybridation dans une seule équation matricielle, le remplacement de T par T_0 dans l'équation permettant d'obtenir des calculs matriciels plus rapides.

[0034] Avantageusement, chaque matrice d'association ou de dissociation comporte des éléments, et chaque élément de la matrice d'association, ou chaque élément de la matrice de dissociation associé à une paire de molécules appartenant à ladite pluralité de molécules est : nul, si la variation d'enthalpie libre associée à la réaction d'hybridation des molécules formant la paire est supérieur à un seuil ; respectivement égal à une constante d'association, ou à une constante de dissociation de la réaction d'hybridation de la paire de molécule sinon.

[0035] Ceci permet de ne prendre en compte dans la simulation que les réactions d'hybridation dominantes. Ceci permet à la fois d'obtenir une meilleure précision de la cinétique des réactions d'hybridation prises en compte, et de diminuer la complexité de résolution de l'équation différentielle. Ceci permet également de tenir compte des dynamiques différentielles entre les différentes réactions suivant que la valeur d'enthalpie libre est favorable ou défavorable entre deux réactions d'intérêt.

[0036] Avantageusement, la valeur dudit seuil est choisie parmi au moins deux valeurs de seuil prédéfinies, la valeur de seuil la plus faible étant réservée aux paires de molécules comprenant un amplicon et une amorce appariés.

[0037] Les seuils et variation d'enthalpie libre étant négatifs, la valeur de seuil la plus élevée correspond à une valeur du seuil plus faible. Les réactions d'hybridation entre amorces et amplicons seront donc préférentiellement prises en compte. Par « valeur de seuil plus faible », on entend une valeur plus proche de zéro. Les seuils et variation d'enthalpie libre étant négatifs, cela correspond également à une valeur absolue du seuil plus basse.

[0038] Ceci permet de prendre en compte de manière préférentielle dans la simulation les hybridations entre les amorces et les amplicons, par rapport aux réactions d'hybridation entre les amorces et d'autres amorces par exemple, ce qui permet de simuler les premiers cycles d'hybridation amplicon-amorce, au cours desquels la concentration des amplicons est beaucoup plus faible que celle des amorces.

[0039] Avantageusement, le procédé comprend une étape préalable de définition de la pluralité de molécules comprenant : une initialisation de la pluralité de molécules d'acide nucléique sous forme de simple brins comme étant les molécules initialement présentes dans l'amplification en chaîne par polymérase; une simulation initiale d'une pluralité de cycles de l'amplification en chaîne par polymérase, chaque cycle de la simulation initiale comprenant: une obtention des réactions d'hybridation des molécules formant chaque paire de molécules parmi ladite pluralité de molécules ayant une affinité inférieure à un seuil ; une simulation d'une phase d'hybridation mettant en œuvre lesdites réactions d'hybridation ; une simulation d'une phase d'élongation ; une simulation d'une phase de dénaturation ; un ajout à ladite pluralité de molécules des molécules additionnelles obtenues à l'issue des phases d'hybridation, d'élongation et de dénaturation.

[0040] On entend par "molécules additionnelles" les molécules qui n'étaient pas présentes au début d'un cycle, et qui sont générées à l'issue du cycle d'hybridation, élongation et dénaturation.

[0041] Ceci permet de construire un vecteur de concentration, et des matrices d'association et de dissociation, ne prenant en compte que les molécules qui seront effectivement rencontrées avec des affinités significatives lors de l'amplification en chaîne par polymérase. Ceci permet donc une simulation à la fois plus fiable et moins gourmande en ressources de la ou des réactions d'amplification PCR.

[0042] Avantageusement, l'étape préalable de définition de la pluralité de molécules comprend l'exécution d'un nombre cycles de la simulation initiale compris entre 3 et 7.

[0043] Ceci fournit un bon compromis entre le nombre de molécules ajoutées et leur importance. Par exemple, des molécules ajoutées après le 3^e, 5^e ou 7^e cycle peuvent être considérées comme non susceptibles de donner lieu à des réactions significatives. Un nombre de cycle prédéfini compris entre 3 et 7, et par exemple égal à 5 permet donc de limiter le nombre de molécules pour la simulation, et réduire la complexité de calcul associée, tout en préservant la fiabilité de la simulation.

[0044] Avantageusement, le procédé comprend, à l'issue de la simulation de ladite pluralité de cycles, une étape ultérieure d'affichage de l'évolution temporelle de la concentration d'au moins une desdites molécules.

[0045] Ceci permet de visualiser l'évolution de la concentration d'au moins une des molécules, par exemple un amplicon, et de valider ou modifier en fonction le design de l'amplification en chaîne par polymérase.

[0046] Avantageusement, le procédé comprend une étape ultérieure de validation ou de modification de la pluralité d'amorces et de la valeur initiale du vecteur de concentrations pour ladite pluralité d'amorces au premier cycle de la réaction par comparaison d'une valeur représentative de la cinétique d'une réaction à un seuil.

[0047] Ceci permet de valider que les amorces initialement présentes, et concentrations associées, permettent bien la multiplication des cibles désirées avec une cinétique de réaction suffisamment forte, et d'éviter la génération de réactions non souhaitées avec une cinétique forte ou au contraire modifier la liste des amorces et/ou leur concentrations.

[0048] Avantageusement, la valeur représentative de la cinétique est une valeur choisie parmi: un cycle seuil ; un point de croisement ; une concentration finale d'une molécule d'acide nucléique amplifiée par la réaction ; une concentration d'amplicons en fin de réaction

5 **[0049]** On entend par "cycle seuil" (en anglais "cycle threshold" ou "Ct", également appelé "Cycle of quantification", ou "Cq") un nombre de cycles requis pour qu'une concentration d'un amplicon atteigne une concentration de référence. Le seuil peut par exemple correspondre à une concentration à partir de laquelle la molécule est détectable.

10 **[0050]** On entend par "point de croisement" (en anglais "Crossing Point" ou "Cp, ou encore "Take Off Point" ou "TOP"), le cycle auquel la valeur de la dérivée seconde de la concentration d'un amplicon atteint son point maximum.

[0051] On entend par « concentration d'amplicons en fin de réaction » une concentration d'amplicons lorsque la réaction est considérée comme terminée, par exemple lorsqu'un plateau de concentration est atteint. Un tel plateau peut par exemple être détecté grâce à une régression linéaire sur une droite affine.

15 **[0052]** Avantageusement, la modification de la pluralité d'amorces comprend : l'identification d'une cible à favoriser en fonction des résultats de la simulation de l'amplification en chaîne par polymérase; l'identification, à partir de la matrice d'association ou de la matrice de dissociation, d'une molécule d'acide nucléique sous forme de simple brin formant une paire avec une amorce associée à ladite cible ; la réalisation d'au moins une modification de l'amplification en chaîne par polymérase
20 choisie parmi : une diminution, dans le vecteur de concentration initiale, de la concentration initiale de ladite molécule d'acide nucléique sous forme de simple brin formant une paire avec l'amorce associée à ladite cible ; une modification de la concentration de sels ; une modification de la température d'hybridation pour au moins un cycle ; une modification de la durée d'hybridation d'au moins un cycle.

25 **[0053]** Ceci permet d'identifier les réactions entre les molécules présentes lors de la réaction PCR qui font concurrence à l'amplification d'une cible donnée, et de réduire la concentration initiale de la ou des molécules qui génèrent ces réactions, ou de modifier en conséquence la séquence de la /des molécule(s) incriminée(s) afin de favoriser l'amplification de de la cible donnée.

30 **[0054]** Avantageusement, l'échantillon est prélevé sur un animal ou un être humain, ledit procédé comprenant le choix d'un antimicrobien en fonction de la caractérisation des microorganismes présent dans ledit échantillon, et l'administration dudit anti-microbien audit animal ou être humain.

[0055] Avantageusement, l'échantillon est prélevé sur un objet inanimé, ledit procédé comprenant le choix d'un antimicrobien en fonction de la caractérisation des microorganismes présent dans ledit échantillon, et l'application dudit anti-microbien audit objet inanimé.

35 **[0056]** Il est proposé un procédé de simulation numérique d'une amplification en chaîne par polymérase d'au moins une cible, ledit procédé comprenant la simulation d'une pluralité de cycles successifs de l'amplification, chaque cycle comprenant, de manière séquentielle : une phase d'hybridation entre l'au moins une cible et une pluralité d'amorces ; une phase d'élongation ; puis

une phase de dénaturation ; dans lequel, pour chaque cycle : la phase d'hybridation comprend : l'obtention d'une valeur initiale pour le cycle d'un vecteur de concentrations d'une pluralité de molécules d'acide nucléique sous forme de simples brins comprenant l'au moins une cible et la pluralité d'amorces ; le calcul d'une matrice de concentrations de duplexes partiels formés par l'hybridation de la pluralité de molécules d'acide nucléique sous forme de simples brins, chaque élément de ladite matrice représentant la concentration des duplexes formés par l'hybridation d'une paire de ladite pluralité de molécules d'acide nucléique sous forme de simples brins, indépendamment de la position d'hybridation de ladite paire ; la phase de dénaturation comprend : la multiplication d'un vecteur de concentration de duplexes élongués, résultant de l'application de la phase d'élongation aux concentrations de duplexes, par un tenseur de dénaturation des duplexes élongués afin d'obtenir une valeur initiale de vecteur de concentrations d'une pluralité de molécules d'acide nucléique sous forme de simples brins pour le cycle suivant.

[0057] L'utilisation d'une unique valeur de concentration pour l'ensemble des duplexes entre une paire de molécules d'acide nucléique quelle que soit la position d'appariement permet de réduire le nombre d'équations à résoudre pour le calcul de la dénaturation, et de rendre le problème de la simulation de la dénaturation soluble.

[0058] Selon un autre aspect, il est proposé un procédé de fabrication d'un kit pour la caractérisation de microorganismes compris dans un échantillon par utilisation d'une réaction d'amplification en chaîne par polymérase, ledit kit comprenant une pluralité d'amorces validées, procédé dans lequel la pluralités d'amorces et le vecteur de concentrations pour ladite pluralité d'amorces sont obtenus par un procédé de simulation tel que défini dans les présentes.

[0059] Ceci permet de fabriquer un dispositif reproduisant la réaction telle que simulée. Le dispositif ainsi produit permettra donc la multiplication des cibles telle qu'elle a été simulée précédemment.

[0060] Selon un autre aspect, il est proposé un kit pour l'amplification en chaîne par polymérase fabriqué par un procédé tel que défini dans les présentes.

[0061] Selon un autre aspect, il est proposé un programme informatique comportant des instructions pour la mise en œuvre de tout ou partie d'un procédé tel que défini dans les présentes lorsque ce programme est exécuté par un processeur.

[0062] Selon un autre aspect, il est proposé un support d'enregistrement non transitoire, lisible par un ordinateur, sur lequel est enregistré un tel programme.

[0063] Selon un autre aspect, il est proposé un procédé de caractérisation de microorganismes compris dans un échantillon, comprenant : la préparation de l'échantillon de manière à réaliser sur l'échantillon préparé une PCR, ladite préparation comprenant une étape d'ajout d'un kit fabriqué conformément à un procédé tel que défini dans les présentes; la mise en œuvre de la PCR sur l'échantillon préparé ; la caractérisation des microorganismes en fonction des résultats de la PCR.

[0064] Les caractéristiques exposées dans les paragraphes suivants peuvent, optionnellement, être mises en œuvre, indépendamment les unes des autres ou en combinaison les unes avec les autres :

[0065] Avantageusement, au moins un duplexe résulte de l'appariement entre deux amorces ; la phase d'élongation simule la concentration de chaque duplexe résultant de l'appariement entre deux amorces en une unique concentration de duplexe élongué résultant de l'appariement entre deux amorces ; les coefficients du tenseur de dénaturation sont définis de manière à répartir chaque

5 concentration de duplexe élongué résultant de l'appariement entre deux amorces en molécules d'acide nucléique sous formes de simples brins correspondant à une élongation du duplexe résultant de l'appariement entre les deux amorces dans les deux sens.

[0066] Ceci permet de simplifier la simulation des réactions issues de l'appariement entre deux amorces, afin de réduire encore la complexité de calcul de la simulation.

10 [0067] Avantageusement, pour chaque réaction d'hybridation entre deux amorces : les concentrations de duplexes élongués comprennent une concentration d'un duplexe virtuel élongué égale à la somme des concentrations des duplexes élongués formés par l'élongation dans chacun des deux sens du duplexes formés par l'hybridation des deux amorces ; les coefficients du tenseur de dénaturation des duplexes élongués correspondant à la distribution de la concentration du

15 duplexe virtuel élongué vers chacune des deux amorces, et chacun des deux acides nucléiques sous forme de simple brins résultant de l'élongation dans un des deux sens sont tous égaux à 0,5.

[0068] Ceci permet de simuler de manière efficace les réactions résultant d'hybridations entre amorces, tout en limitant la complexité de la simulation.

[0069] Avantageusement, pour chaque ensemble de réaction d'hybridations multiples d'un acide nucléique à simple brin par une amorce en plusieurs emplacements respectivement : les concentrations de duplexes et les concentrations de duplexes élongués comprennent respectivement une concentration d'un duplexe virtuel égale à la somme des concentrations des duplexes formés par les réactions d'hybridations multiples, et une concentration d'un duplexe virtuel élongué égale à la somme des concentrations des duplexes élongués formés par l'élongation des

20 duplexes formés par les réactions d'hybridations multiples ; les coefficients du tenseur de dénaturation des duplexes élongués correspondant à la distribution de la concentration du duplexe virtuel élongué vers chaque acide nucléique sous forme de simple brin associé à une des réactions d'hybridation multiple sont respectivement égaux au ratio entre l'énergie d'interaction de la réaction d'hybridation multiple divisée par la somme des énergies d'interactions de toutes les réactions

25 d'hybridations multiples avec ledit acide nucléique à simple brin.

[0070] Par « concentration d'un duplexe virtuel », on entend une concentration d'un duplexe ne correspondant pas à une molécule réelle, mais à plusieurs duplexes résultant de l'hybridation d'une même amorce sur une même molécule d'acide nucléique sous forme de simple brin en plusieurs emplacements distincts. La concentration du duplexe virtuel est alors égale à la somme des

35 concentrations des duplexes réels créés par les réaction d'hybridation de l'amorce avec la molécule d'acide nucléique sous forme de simple brin dans les différentes positions.

[0071] Par « concentration d'un duplexe virtuel élongué », on entend une concentration d'un duplexe élongué ne correspondant pas à une molécule réelle, mais à plusieurs duplexes élongués résultant

de l'hybridation d'une même amorce sur une même molécule d'acide nucléique sous forme de simple brin en plusieurs emplacements distincts, puis de l'élongation des duplexes ainsi formés. La concentration du duplexe virtuel élongué est alors égale à la somme des concentrations des duplexes réels élongués créés par les réaction d'hybridation de l'amorce avec la molécule d'acide nucléique sous forme de simple brin dans les différentes positions, puis l'élongation des duplexes ainsi formés.

[0072] On entend par « acide nucléique sous forme simple brin associé à une des réactions d'hybridation multiple » l'acide nucléique résultant de la dénaturation d'un duplexe élongué lui-même issu de l'élongation du duplexe formé par une des hybridations multiple, c'est-à-dire une hybridation de l'amorce en un emplacement particulier.

[0073] Ceci permet de simuler des hybridations multiples avec un même acide nucléique comme s'il s'agissait d'une réaction unique, tout en obtenant une estimation fiable des concentrations d'acides nucléiques générés par ces hybridations multiples en fin de cycle.

[0074] Ceci permet donc de faciliter considérablement, voire de rendre possibles, les calculs de l'évolution des concentrations, tout en conservant une précision satisfaisante de la simulation.

[0075] Avantageusement, la phase d'élongation comprend : l'obtention des concentrations des duplexes élongués par multiplication des concentrations des duplexes par des coefficients d'élongation.

[0076] On entend par « coefficient d'élongation » la fraction, comprise entre 0 et 1, des molécules d'un duplexe donné qui sont élongués durant une phase d'élongation.

[0077] Ceci permet de prendre en compte chaque différence possible du processus d'élongation des différents duplexes.

[0078] Avantageusement, la phase d'élongation comprend de plus la mise à jour du vecteur de concentration des duplexes, représentant à l'issue de la phase d'élongation la concentration des duplexes non-élongués ; la phase de dénaturation comprend de plus la multiplication dudit vecteur de concentration des duplexes par un tenseur de dénaturation des duplexes non-élongués pour mettre à jour la valeur initiale pour le cycle suivant du vecteur de concentrations de la pluralité de molécules d'acide nucléique sous forme de simples brins.

[0079] Ceci permet de simuler la dénaturation des duplexes qui n'ont pas été élongués, et d'intégrer les concentrations de duplexes non-élongués et dénaturés dans les conditions initiales du cycle suivant.

[0080] L'analyse du tenseur permet également de s'assurer que la dénaturation est sous contrôle.

[0081] Avantageusement, lors de la phase de dénaturation, un même coefficient de dénaturation est appliqué à un duplexe non-élongué et au duplexe élongué correspondant pour mettre à jour le vecteur de concentrations de la pluralité de molécules d'acide nucléique sous forme de simples brins, et les concentrations de duplexes pour le cycle suivant.

[0082] On entend par « coefficient de dénaturation » la fraction, comprise entre 0 et 1, des molécules d'un duplexe donné qui sont dénaturées durant une phase de dénaturation.

[0083] Ceci permet de simuler de manière précise la phase de dénaturation.

[0084] Avantageusement, le procédé comprend une étape ultérieure de validation ou de modification de la pluralité d'amorces et de la valeur initiale du vecteur de concentrations pour ladite pluralité d'amorces au premier cycle de la réaction par comparaison d'une valeur représentative de la cinétique d'une réaction à un seuil.

[0085] Ceci permet de valider que les amorces initialement présentes, et concentrations associées, permettent bien la multiplication des cibles désirées avec une cinétique de réaction suffisamment forte, et d'éviter la génération de réactions non souhaitées avec une cinétique forte ou au contraire modifier la liste des amorces et/ou leur concentrations.

10 [0086] Avantageusement, l'échantillon est prélevé sur un animal ou un être humain, ledit procédé comprenant le choix d'un antimicrobien en fonction de la caractérisation des microorganismes présent dans ledit échantillon, et l'administration dudit anti-microbien audit animal ou être humain.

[0087] Avantageusement, l'échantillon est prélevé sur un objet inanimé, ledit procédé comprenant le choix d'un antimicrobien en fonction de la caractérisation des microorganismes présent dans ledit échantillon, et l'application dudit anti-microbien audit objet inanimé.

Brève description des dessins

[0088] D'autres caractéristiques, détails et avantages apparaîtront à la lecture de la description détaillée ci-après, et à l'analyse des dessins annexés, sur lesquels :

Fig. 1

20 [0089] [Fig. 1] montre des exemples de kit pour l'amplification en chaîne par polymérase pour la fabrication duquel l'invention peut être mise en œuvre.

Fig. 2

[0090] [Fig. 2] montre un exemple de réaction d'amplification en chaîne par polymérase pouvant être simulée selon un ensemble de modes de réalisation.

25 Fig. 3

[0091] [Fig. 3] montre un exemple de variation de température au cours d'un cycle d'amplification PCR

Fig. 4

[0092] [Fig. 4] montre un exemple d'une méthode selon un ensemble de modes de réalisation de l'invention.

Fig. 5

[0093] [Fig. 5] montre un exemple d'une phase d'hybridation dans un ensemble de modes de réalisation de l'invention.

Fig. 6

[0094] [Fig. 6] montre un exemple d'une phase de dénaturation dans un ensemble de modes de réalisation de l'invention.

Fig. 7

- 5 **[0095]** [Fig. 7] montre un exemple de réactions d'hybridation, élongation et dénaturation sur 3 cycles successifs d'amplification PCR dans un ensemble de modes de réalisation de l'invention.

Fig. 8

[0096] [Fig. 8] montre un exemple d'une méthode selon un ensemble de modes de réalisation de l'invention intégrant une validation ou modification des paramètres de l'amplification PCR.

10 **Fig. 9**

[0097] [Fig. 9] montre un exemple d'une méthode selon un ensemble de modes de réalisation de l'invention intégrant une validation ou modification des paramètres de l'amplification PCR, et une fabrication d'un kit d'amplification PCR validé.

Fig. 10

- 15 **[0098]** [Fig. 10] montre un exemple d'une méthode de caractérisation d'un microorganisme utilisant un kit d'amplification PCR fabriqué selon un ensemble de modes de réalisation de l'invention.

Fig. 11

[0099] [Fig. 11] montre un exemple de visualisation de la cinétique de plusieurs réaction PCR selon un ensemble de modes de réalisation de l'invention.

20 **Fig. 12**

[0100] [Fig. 12] montre un exemple de visualisation de la cinétique de plusieurs réaction PCR dans deux conditions expérimentales distinctes selon un ensemble de modes de réalisation de l'invention.

Description des modes de réalisation

[0101] Il est maintenant fait référence à la figure 1.

- 25 **[0102]** La figure 1 représente un exemple de kit K1 pour l'amplification en chaîne par polymérase pour la fabrication duquel l'invention peut être mise en œuvre, par exemple un kit utilisé pour les plateformes FilmArray et Spotfire fabriquées et commercialisées par la Demanderesse. Un tel kit est par exemple décrit dans le document US 8,394,608 ou US 9 932 634 incorporé par référence.

- [0103]** Le kit K1 fait partie d'un équipement de test Tst1 ayant pour but de tester la présence d'un
30 ou plusieurs microorganismes, par exemple par un ou plusieurs virus, bactéries, champignons et gènes de résistances à des antibiotiques.

[0104] A cet effet, l'équipement de test Tst1 comprend un écouvillon Ecv1 permettant d'effectuer un prélèvement nasal sur un patient.

[0105] L'échantillon peut ensuite être fourni en entrée du kit K1 afin d'effectuer une amplification PCR, afin d'amplifier un ou plusieurs acides nucléiques représentatifs du ou des microorganismes dont la présence est recherchée, par exemple telle que décrite dans les documents susvisés. Ainsi, même si la concentration initiale de microorganismes dans l'échantillon prélevée est faible, la
5 quantité d'acide nucléique en sortie de l'amplification PCR sera suffisante pour détecter leur présence, et donc par exemple la présence du ou des microorganismes dans l'échantillon prélevé.

[0106] Au fur et à mesure de l'amplification PCR, les amplicons peuvent générer une fluorescence de plus en plus importante, par exemple via l'intégration de fluorophores par la formation d'une séquence double-brin le nombre de séquences double-brin intégrant des fluorophores augmentant
10 avec l'amplification.

[0107] Le kit de test Tst1 permet donc de détecter la présence de microorganismes, même si leur concentration dans l'échantillon initial est très faible.

[0108] Le kit de test Tst1 est fourni à titre d'exemple non-limitatif uniquement, et l'invention pourra être appliquée à différents types de kit de tests, associés à différents moyens de prélèvement. Par
15 exemple, le prélèvement pourra s'effectuer sur un être humain, un animal ou encore un objet inanimé, et pourra aboutir à la caractérisation d'un ou plusieurs microorganismes. La caractérisation d'un ou des microorganismes pourra permettre le choix d'un antimicrobien, en vue de son administration à un être humain ou un animal, ou son application à l'objet inanimé. De manière similaire l'invention s'applique à l'étape d'amplification par PCR d'une partie ciblée de génomes avant leur séquençage
20 complet, par exemple une amplification de portion r16S dans le cadre d'une identification métagénomique microbienne.

[0109] La figure 2 montre un exemple de réaction d'amplification en chaîne par polymérase pouvant être simulée selon un ensemble de modes de réalisation.

[0110] La réaction d'amplification en chaîne par polymérase (PCR) comprend plusieurs cycles
25 successifs Cyc21, Cyc22, Cyc23...Cyc2n. Afin d'améliorer la lisibilité de la figure, seul le premier cycle Cyc21 sera détaillé.

[0111] La réaction PCR2 s'effectue dans un kit PCR, par exemple au sein du kit K1. Le kit PCR contient initialement :

- des acides nucléiques d'une ou plusieurs séquences à amplifier, ou « cible », par exemple
30 la cible Cib2 représentée en figure 2. Les acides nucléiques des séquences à amplifier peuvent être initialement issus d'un prélèvement, par exemple via l'écouvillon Ecv1 ;
- des nucléotides dNTP2 ;
- de la polymérase PolyM2 ;
- des amorces (en anglais « primers ») AM2.

[0112] La réaction PCR représentée ici est une réaction dite « singleplexe » visant à amplifier une
35 unique cible Cib2. Cependant, l'invention n'est pas restreinte à cet exemple, et peut également

s'appliquer à des réactions dites « multiplexes » visant à amplifier simultanément plusieurs cibles distinctes.

[0113] Chaque cycle d'amplification PCR comprend :

- 5 - une phase de dénaturation, notée Denat21 pour le cycle Cyc21, au cours de laquelle les acides nucléiques sous forme de doubles brins sont séparés en deux acides nucléiques sous forme de simples brins. Dans l'exemple du cycle Cyc21, une cible Cib2 est initialement présente sous forme d'acide nucléique à doubles brins. Lors de la phase de dénaturation, elle est séparée en deux acides nucléiques sous forme de simple brins Nuc21 et Nuc22 ;
- 10 - une phase d'hybridation, notée Hybr21 pour le cycle Cyc21, au cours de laquelle des amorces viennent s'hybrider aux acides nucléiques sous forme de simple brins. Dans l'exemple de la phase Hybr21, les amorces AM21 et AM22 viennent respectivement s'hybrider avec les acides nucléiques sous forme de simples brins Nuc21 et Nuc22 ;
- 15 - une phase d'élongation, notée Elong21 pour le cycle 21, au cours de laquelle des nucléotides viennent compléter les amorces pour former des acides nucléiques sous forme de doubles brins identiques à la cible initiale, nommés amplicons, Amp21 et Amp22 dans le cas de la phase Elong21.

[0114] Ainsi, à l'issue d'un cycle d'amplification PCR, une unique cible Cib2 a permis de générer deux amplicons identiques Amp21 et Amp22, qui pourront eux-mêmes être dupliqués au cycle suivant. A chaque cycle d'amplification, les amplicons sont ainsi dupliqués : une unique cible Cib2
20 entraîne la génération de deux amplicons à l'issue du 1^e cycle Cyc21, quatre amplicons à l'issue du 2^e cycle Cyc22, huit amplicons à l'issue du 3^e cycle Cyc23, etc.

[0115] Il convient de noter que l'amplification représentée en figure 2 est fournie à titre d'exemple non-limitatif uniquement d'une amplification pouvant être simulée par l'invention.

[0116] D'autres amplifications peuvent être simulées, comme par exemple une amplification
25 multiplexe multipliant différents types de cibles. Il a été décrit l'application de l'invention à une PCR particulière. L'invention s'applique à une séquence d'un nombre quelconque de PCRS, l'entrée d'une PCR consistant en la sortie de la PCR précédente.

[0117] L'ordre des phases peut également être différent. Par exemple, la simulation peut démarrer pour chaque cycle avec la phase d'hybridation plutôt que la phase de dénaturation. Dans ce cas, un
30 cycle sera représenté par une phase d'hybridation, suivie d'une phase d'élongation et enfin une phase de dénaturation.

[0118] Il est maintenant fait référence à la figure 3.

[0119] La figure 3 représente un exemple de variation de température au cours d'un cycle d'amplification PCR.

35 **[0120]** Le graphe Grph3 représente plus précisément l'évolution de la température en fonction du temps, pour un exemple de deux cycles successifs Cyc31 et Cyc32 d'amplification PCR. En effet, les différentes phases de l'amplification PCR sont activées par des variations de températures dans

le kit d'amplification. Dans cet exemple, le profil de température est identique entre les cycles, et sera détaillé pour le cycle cyc31.

[0121] De manière générale, la température évolue de la manière suivante lors d'un cycle d'amplification PCR :

- 5
- elle est initialement à une première température lors de la phase d'hybridation, simultanée avec la phase d'élongation ;
 - puis augmente rapidement pour atteindre une deuxième température, plus élevée, déclenchant la phase de dénaturation, avant de redescendre au niveau de la première température pour la phase d'hybridation du cycle suivant.

10 **[0122]** Dans l'exemple du cycle Cyc31 :

- les phases d'hybridation et d'élongations Hybr31 sont activées par une première température de 60° pendant une durée T_{hybr} ;
- la phase de dénaturation Denat31 est activée par une température plus élevée, dans cet exemple, de 96°.

15 **[0123]** Les durées et températures représentées dans la figure 3 sont fournies à titre d'exemple non limitatif uniquement, et l'invention est applicable à des amplifications PCR réalisées pour des durées et températures très différentes. Si dans l'exemple de la figure 3 les phases d'hybridation et d'élongations sont simultanées, dans d'autres réactions d'amplification PCR, trois températures distinctes sont utilisées pour déclencher respectivement les phases d'hybridation, d'élongation et de
20 dénaturation. Les températures et durées des différentes phases influent sur la réaction d'amplification.

[0124] La ou les réactions d'amplification sont donc impactées par de nombreux paramètres tels que :

- 25
- les températures et durée de chaque phase de la réaction (pouvant être fixes ou varier selon les cycles) ;
 - le choix et les concentrations des amorces ;
 - les concentrations de sels monovalents et divalents ;
 - la longueur des amplicons attendus ;
 - etc ;

30 **[0125]** Ces différents facteurs peuvent également favoriser des réactions inattendues telles que par exemple :

- la formation de dimères d'amorces, lorsque deux amorces s'hybrident mutuellement ;
- des réactions de multi-hybridation lorsque des amorces s'hybrident non seulement à une extrémité d'un acide nucléique sous forme de simple brins, mais également à d'autres

emplacements, par exemple au milieu d'un brin. Dans ce cas l'élongation s'effectuera sur une partie seulement du brin, et donnera lieu à la création d'un nouvel amplicon..

5 [0126] Les paramètres de l'amplification peuvent donc faciliter, ou au contraire ralentir une amplification souhaitée, dite réaction spécifique, voire empêcher le bon développement d'une réaction, lorsque des réactions non souhaitées / inattendues, dites réactions non spécifiques, lui font obstacle. L'un des objectifs de la simulation d'une réaction d'amplification PCR est donc de modéliser de manière aussi précise que possible la réaction d'amplification en fonction des paramètres environnementaux de la réaction, afin de valider, ou au contraire de modifier le design d'un kit (c'est-à-dire les valeurs de paramètres utilisés pour favoriser une réaction d'amplification donnée – e.g. choix et concentration des amorces, température et durée des phases de réaction, concentration des sels, etc.).

15 [0127] Cependant, la complexité de la cinétique des réactions d'amplification PCR, et notamment l'interaction entre de nombreux produits et sous-produits de réaction, rend une telle simulation difficile en pratique. L'un des objectifs de la divulgation est donc de fournir une méthode de simulation d'une réaction d'amplification PCR pouvant être mise en œuvre en pratique pour simuler une réaction PCR selon des paramètres donnés, et valider ou modifier en fonction les paramètres de la réaction.

[0128] La figure 4 montre un exemple d'une méthode selon un ensemble de modes de réalisation de l'invention.

20 [0129] Le procédé P4 est un procédé de simulation numérique d'une amplification en chaîne par polymérase d'au moins une cible. Selon différents modes de réalisation de l'invention, il peut s'agir d'une amplification d'une cible unique, ou amplification « singleplexe », ou d'une amplification d'une pluralité de cibles, ou amplification « multiplexe ».

25 [0130] La simulation comprend une pluralité de cycles successifs d'amplification, chaque cycle comprenant successivement une phase d'hybridation S41, une phase d'élongation S42 et une phase de dénaturation S43.

[0131] La simulation peut être effectuée pour un nombre limité de cycles. Par exemple, chaque cycle peut être identifié par un index de cycle ncyc, incrémenté lors d'une étape S45 entre chaque cycle.

[0132] A l'issue de chaque cycle, un critère d'arrêt peut être vérifié. Par exemple :

- 30 - la simulation peut être effectuée pendant un nombre de cycle prédéfini NCyc. Dans ce cas, à l'issue de chaque cycle, l'index du cycle ncyc peut être comparé au nombre de cycle prédéfini NCyc, et le critère validé si $ncyc \geq NCyc$ (ou au contraire, un nouveau cycle enclenché si $ncyc < NCyc$) ;
- 35 - les concentration des amplicons peuvent être comparées entre deux cycles, et la simulation stoppée lorsqu'un nombre de cycle minimal est atteint, et que la différence entre les concentrations des amplicons à l'issue de deux cycles successifs est inférieure à un seuil

prédéfinie. Autrement dit, ce critère consiste à détecter le cycle à partir duquel la réaction est considérée comme terminée ;

- la simulation peut être arrêtée dès que la concentration d'un amplicon donné est supérieure à un seuil, par exemple un seuil de détectabilité de l'amplicon ;

5 - etc.

[0133] La figure 4 représente un exemple où le critère d'arrêt est l'atteinte d'un nombre de cycles NCyc. Cependant, cet exemple est fourni à titre d'exemple non limitatif uniquement. Comme indiqué ci-dessus, un ou plusieurs critères différents peuvent être utilisés pour détecter la fin de la simulation.

10 **[0134]** Dans la suite de la description, plusieurs exemples de simulation seront décrits, en utilisant certaines notations introduites ci-dessous.

[0135] Les concentrations des molécules d'intérêt seront notées dans un vecteur noté $\bar{T}$ représenté ci-dessous :

$$\bar{T} = \begin{pmatrix} Amp_1 \\ \vdots \\ Amp_\beta \\ AM_1 \\ \vdots \\ AM_\alpha \end{pmatrix}$$

Équation 1

15

[0136] Dans le vecteur ci-dessus, les éléments $Amp_1, \dots, Amp_\beta$ représentent les concentrations des amplicons possibles (spécifiques et non spécifiques) produits durant l'amplification PCR. Il est à noter ici que, les cibles et amplicons correspondant à la même molécule, ces valeurs correspondent à la sommes des concentrations des cibles et amplicons pour une cible donnée. Les éléments $AM_1, \dots, AM_\alpha$ représentent quant à eux les concentrations des amorces possibles. Les unités des éléments du vecteur peuvent être des mol.L⁻¹.

20

[0137] La pluralité de molécules dont les concentrations sont notées dans le vecteur $\bar{T}$ peuvent être obtenues de différentes manières, et inclut notamment la concentration des amplicons, et de la pluralité d'amorces présente dans le kit simulé.

25 **[0138]** Par exemple, la pluralité de molécules dont les concentrations sont notées dans le vecteur $\bar{T}$ peut être issue d'une liste de molécules définie par un utilisateur expert.

[0139] Cependant, il peut être difficile d'estimer a priori l'ensemble des molécules se formant lors d'une réaction PCR, compte tenu de l'ensemble des réactions possibles, par exemple entre sous-produits de réactions.

30 **[0140]** A cet effet, la pluralité de molécules dont la concentration est notée dans le vecteur $\bar{T}$ est déterminée par le biais d'une simulation initiale d'un nombre limité de cycles. Cette simulation initiale

a pour unique but de déterminer les molécules présentes dans le kit d'amplification au bout du nombre limité de cycles, indépendamment de leur concentration.

[0141] A cet effet, la pluralité de molécules peut être initialisée comme les molécules initialement présentes dans l'amplification en chaîne par polymérase (notamment amplicons et amorces), puis
5 la simulation initiale peut comprendre la simulation d'une pluralité de cycle successifs des étapes suivantes:

- obtention des réactions d'hybridation des molécules formant chaque paire de molécules parmi ladite pluralité de molécules ayant une affinité inférieure à un seuil (ou supérieure en valeur absolue, les affinités étant des valeurs négatives). Dit autrement, cette étape consiste
10 à identifier, à partir des molécules initialement présentes dans le cycle de la simulation initiale, les paires de molécules ayant une affinité inférieure à un seuil (ou supérieure en valeur absolue), c'est-à-dire les paires de molécules dont on peut considérer qu'elles vont réagir ensemble ;
- simulation d'une phase d'hybridation mettant en œuvre lesdites réactions d'hybridation.
15 Cette phase d'hybridation de simulation initiale consiste uniquement à identifier les duplexes formés par les réactions d'hybridation identifiées ;
- simulation d'une phase d'élongation. Cette phase d'hybridation de simulation initiale consiste uniquement à identifier les duplexes élongués obtenus à partir des duplexes identifiés à l'étape précédente;
- simulation d'une phase de dénaturation. Cette simulation initiale de la phase de dénaturation
20 consiste à identifier les molécules obtenues par la dénaturation des duplexes, et duplexes élongués, obtenus aux deux étapes précédentes ;
- un ajout à ladite pluralité de molécules des molécules additionnelles obtenues à l'issue des phases d'hybridation, d'élongation et de dénaturation. Cette étape consiste à ajouter à la
25 pluralité de molécules les molécules qui sont obtenues à l'issue d'un cycle et qui n'y étaient pas encore présentes.

[0142] Ainsi, à chaque cycle, de nouvelles molécules issues des réactions du cycle précédent peuvent être ajoutées à la pluralité de molécules déjà identifiées, ces nouvelles molécules étant elles-mêmes susceptibles de générer de nouvelles réactions. Ainsi, il est possible au bout d'un
30 nombre limité de cycles de simulation initial de connaître l'ensemble des molécules qui pourront jouer un rôle significatif dans la simulation.

[0143] Le nombre de cycles de la simulation initiale peut être défini de différentes manières. Par exemple :

- il peut s'agir d'un nombre de cycles prédéfini de simulation initiale ;
- le nombre de molécules ajoutées à l'issue de chaque cycle peut être compté, et la simulation
35 initiale peut être stoppée lorsque le nombre de molécules ajoutées à l'issue d'un cycle donné

est nul ou faible, par exemple si le nombre de molécules ajoutées est inférieur à un seuil donné.

- Etc.

5 [0144] Les inventeurs ont constaté que le nombre de cycles de simulation initiale peut être compris entre 3 et 7, et par exemple égale à 5, nombre suffisant pour obtenir une liste définitive de molécules ayant un impact significatif sur les résultats de la PCR.

10 [0145] Ceci fournit un bon compromis entre le nombre de molécules ajoutées et leur importance. Par exemple, des molécules ajoutées après le 3^e, 5^e ou 7^e cycle peuvent être considérées comme non susceptibles de donner lieu à des réactions significatives. Un nombre de cycle prédéfini compris entre 3 et 7, et par exemple égale à 5 permet donc de limiter le nombre de molécules pour la simulation, et réduire la complexité de calcul associée, tout en préservant la fiabilité de la simulation.

15 [0146] Par ailleurs, une simulation sur un nombre limité de cycles est suffisante, car les molécules qui n'apparaîtraient qu'au bout de quelques cycles ne seraient pas susceptibles de générer des réactions significatives, par rapport à des réactions ayant déjà démarré depuis plusieurs cycles. En effet, leur concentration très faible comparativement aux molécules déjà présentes avec lesquelles elles sont en compétition dans le mélange ne leur permet pas de se multiplier de manière significative.

[0147] Cette simulation initiale permet donc de ne prendre en compte que les molécules qui seront effectivement rencontrées en nombre significatif lors de la réaction d'amplification. Ceci permet donc une simulation à la fois plus fiable et moins gourmande en ressources de la réaction.

20 [0148] Il est maintenant fait référence à la figure 5.

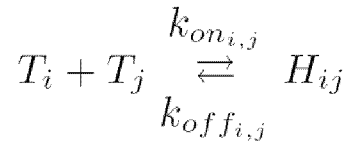
[0149] La figure 5 représente un exemple d'une phase d'hybridation dans un ensemble de modes de réalisation de l'invention.

25 [0150] Dans l'exemple de la figure 5, la phase d'hybridation S41 pour un cycle donné comprend une première sous-étape S411 d'obtention d'une valeur initiale $\bar{T}_0$ pour le cycle d'un vecteur de concentrations d'une pluralité de molécules d'acide nucléique sous forme de simples brins comprenant la pluralité d'amplicons et la pluralité d'amorces.

[0151] Le vecteur de concentrations peut par exemple être le vecteur $\bar{T}$ mentionné plus haut. La valeur initiale $\bar{T}_0$ du vecteur peut par exemple correspondre :

- 30
- aux concentrations initiales des molécules avant le démarrage de la réaction d'amplification, si le cycle simulé est le premier cycle ; et 0 pour les molécules apparaissant aux cycles suivants
 - aux concentrations des molécules à l'issue du cycle précédent, si le cycle n'est pas le premier cycle.

35 [0152] La simulation de la phase d'hybridation a alors pour but de modéliser les réactions d'hybridation ayant lieu au cours du cycle. L'hybridation est régie par des relations d'équilibre suivantes entre chaque paire de molécules T_i et T_j susceptibles de s'hybrider :



Équation 2

[0153] Il convient ici de noter qu'une telle équation doit donc être établie en tenant compte pour chaque réaction d'hybridation possible entre une paire de molécules d'indices i et j (i et j pouvant être égaux), en fonction des molécules présentes dans le vecteur $\bar{T}$.

[0154] Ces équations d'équilibre peuvent être ré-écrites sous la forme des équations différentielles suivantes :

$$\frac{dH_{ij}}{dt} = k_{on_{ij}} T_i T_j - k_{off_{ij}} H_{ij}$$

Équation 3

[0155] Dans les équations ci-dessus :

- les notations T_i et T_j désignent respectivement les concentrations d'une paire de molécules d'acide nucléique sous forme de simple brins d'indices i et j dans le vecteur $\bar{T}$ intervenant dans une réaction d'hybridation donnée;
- la notation H_{ij} désigne la concentration d'un duplexe formés par l'hybridation de la paire de molécules d'acide nucléique sous forme de simple brins d'indices i et j dans le vecteur $\bar{T}$;
- les notations $k_{on_{ij}}$ et $k_{off_{ij}}$ désignent respectivement les constantes d'association et de dissociation de la réaction d'hybridation de la paire de molécules d'acide nucléique sous forme de simples brins d'indices i et j dans le vecteur $\bar{T}$.

[0156] Les équations différentielles notées ci-dessus s'appliquent à chaque réaction entre une paire de molécules du vecteur $\bar{T}$ dont on considère qu'elles produisent une réaction d'hybridation. Le nombre d'équations différentielles peut donc dans certains cas s'avérer très élevé.

[0157] Ces paires de molécules dont on considère qu'elles produisent une réaction d'hybridation peuvent par exemple être celles dont la réaction d'hybridation est associée à une variation d'enthalpie libre ΔG inférieure à un seuil prédéfini (ou supérieure en valeur absolue, la variation d'enthalpie libre étant négative).

[0158] Ainsi, seules les réactions d'hybridation dominantes seront prises en compte dans la simulation. Ceci permet à la fois d'obtenir une meilleure précision de la cinétique des réactions d'hybridation, et de diminuer la complexité de résolution du système d'équations différentielles. Ceci permet également de tenir compte des dynamiques différentielles entre les différentes réactions suivant que la valeur d'enthalpie libre est plus ou moins favorable entre deux réactions d'intérêt.

[0159] Le seuil prédéfini peut être identique pour toutes les réactions, ou choisi parmi différents seuils en fonction des cas. Par exemple, la valeur du seuil peut être choisie parmi au moins deux valeurs de seuil prédéfinies, la valeur de seuil la plus faible étant réservée aux paires de molécules comprenant un amplicon et une amorce appariés.

- 5 **[0160]** Dit autrement, le seuil de variation d'enthalpie libre au-dessus duquel une réaction d'hybridation n'est pas prise en compte dans la simulation est plus faible (plus proche de 0) pour les réactions d'hybridation entre un amplicon et une amorce que pour les autres (et donc également plus faible en valeur absolue, les seuils de variation d'enthalpie libre étant négatifs). Ceci permet de prendre en compte de manière préférentielle dans la simulation les hybridations entre les amorces et les amplicons d'une part, et les amorces et d'autres amorces d'autre part, ce qui permet de simuler les premiers cycles d'hybridation amplicon-amorce, au cours desquels la concentration des amplicons est beaucoup plus faible que celle des amorces

[0161] Dans un ensemble de modes de réalisation de l'invention, les équations différentielles intègrent des équations de conservation de masse de la forme suivante :

$$15 \quad T_{i0} = T_i(t^*) + \sum_l H_{il}(t^*) + \sum_k H_{ki}(t^*) - H_{i,i}(t^*)$$

Équation 4

$$T_{j0} = T_j(t^*) + \sum_k H_{kj}(t^*) + \sum_l H_{jl}(t^*) - H_{j,j}(t^*)$$

Équation 5

[0162] Dans lesquelles :

- 20 - t^* représente le temps écoulé depuis le début de la phase d'hybridation ;
- les notations T_i et T_j désignent respectivement les concentrations de deux molécules d'acide nucléique sous forme de simple brins d'indices i et j dans le vecteur $\bar{T}$ de concentrations d'une pluralité de molécules d'acide nucléique ;
- 25 - la notation H_{xy} désigne la concentration d'un duplexe formé par l'hybridation de la paire de molécules d'acide nucléique sous forme de simple brins d'indices x et y dans le vecteur $\bar{T}$ de concentrations d'une pluralité de molécules d'acide nucléique ;
- les notations T_{i0} et T_{j0} désignent les valeurs de T_i et T_j à $t^* = 0$.

- [0163]** Les équations ci-dessus lient les concentrations de chaque molécule d'acide nucléique sous forme de simple brins aux concentrations de l'ensemble des duplexes à la formation desquels elles contribuent via des réactions d'hybridation, pour mettre en évidence qu'une réaction d'hybridation ne modifie pas le nombre total de simples brins de chaque type. Une équation de conservation de la masse de ce type peut être établie pour chaque molécule d'acide nucléique sous forme de simple brin présente dans le vecteur $\bar{T}$.
- 30

[0164] Il convient de noter que les équations de conservation de la masse notées ci-dessus sont fournies à titre d'exemple non-limitatif uniquement. Selon différents modes de réalisation de l'invention, des formulations équivalentes d'équations de conservation de la masse, c'est-à-dire d'autres équations traduisant que l'évolution des concentrations des molécules d'acide nucléique sous forme de simples brins et de duplexes ne modifie pas le nombre total de simples brins de chaque type, peuvent être utilisées.

[0165] L'intégration des équations de conservation de masse dans les équations différentielles permet de compléter les équations permettant la simulation plus précise de la phase d'hybridation, afin d'obtenir autant d'équations que d'inconnues.

[0166] L'injection, dans une équation différentielle d'une réaction d'hybridation entre une paire de molécules d'acide nucléique sous forme de simple brin telle que l'équation 3, des deux équations de conservations de la masse des deux molécules de la paire permet de réécrire l'équation sous la forme suivante :

$$\frac{dH_{ij}}{dt} = k_{on_{ij}} [T_{i0} - \sum_l H_{il} - \sum_k H_{ki} + H_{i,i}] [T_{j0} - \sum_k H_{kj} - \sum_l H_{jl} + H_{j,j}] - k_{off_{ij}} H_{ij}$$

Équation 6

[0167] Afin de résoudre le système d'équations différentielles, l'un des principes de la simulation de la phase d'hybridation telle que représentée en figure 5 est de représenter ces équations sous forme d'une équation différentielle matricielle.

[0168] A cet effet, dans l'exemple de la figure 5 la simulation de la phase d'hybridation S41 comprend une sous deuxième étape S412 d'initialisation d'une matrice de concentrations H , ou $\bar{H}$ des duplexes formés par l'hybridation de la pluralité de molécules d'acide nucléique sous forme de simples brins.

[0169] La matrice peut-être une matrice $N \times N$ (N étant la longueur du vecteur $\bar{T}$) formée de la manière suivante :

- chaque ligne et chaque colonne correspond à une molécule d'acide nucléique ;
- chaque cellule comprend la concentration du duplexe formé par l'hybridation de la paire de molécules d'acides nucléiques de la ligne et de la colonne auxquelles la cellule appartient. Une forme triangulaire peut être adoptée pour ne compter qu'une seule fois la concentration d'un duplexe donné, qui serait sinon compté à la fois dans une cellule de coordonnées i, j et j, i .

[0170] La matrice $\bar{H}$ peut donc s'écrire:

$$\bar{\bar{H}} = \begin{pmatrix} H_{11} & \cdots & \cdots & H_{1N} \\ 0 & \ddots & H_{ij} & \vdots \\ \vdots & \ddots & \ddots & \vdots \\ 0 & \cdots & 0 & H_{NN} \end{pmatrix}$$

Équation 7

[0171] Dans l'exemple de la figure 5, la phase d'hybridation S41 pour un cycle donné comprend ensuite une troisième sous-étape S413 de calcul, par pas de temps successifs, de l'évolution de la matrice de concentrations au cours de la phase d'hybridation, par l'application à la matrice de concentrations d'une équation différentielle matricielle représentant la cinétique de formation desdits duplexes en fonction des concentrations de la pluralité de molécules d'acide nucléique sous forme de simples brins.

[0172] Le calcul de l'évolution de la matrice peut par exemple s'effectuer de la manière suivante :

- 10 - le calcul est effectué pour un nombre de pas de temps Npdt correspondant à la durée de la phase d'hybridation. Un pas de temps peut par exemple avoir une durée comprise entre 1 et 10 millisecondes. Un pas de temps pourra par exemple être choisi pour trouver un compromis entre convergence du calcul, vitesse de calcul et précision du résultat ;
- un indice de pas de temps npdt est initialisé à 1 ;
- 15 - à chaque pas de temps, la sous-étape S413 de calcul de l'évolution de la matrice de concentrations est effectuée ;
- à l'issue du calcul, une sous-étape S414 vérifie que l'indice du pas de temps npdt est bien inférieur au nombre de pas de temps Npdt ;
- si l'indice du pas de temps npdt est inférieur au nombre de pas de temps Npdt, l'indice du pas de temps npdt est incrémenté à la sous-étape S412, puis une nouvelle itération de la sous-étape S413 de calcul l'évolution de la matrice de concentrations est effectuée ;
- 20 - lorsque l'indice du pas de temps npdt est égal au nombre de pas de temps Npdt, la simulation de la phase d'hybridation est terminée, et la simulation de la phase d'élongation S42 est enclenchée.

25 **[0173]** Ainsi, la simulation de la phase d'hybridation peut se faire par la simulation de Npdt pas de temps successifs des réactions d'hybridation, chaque pas de temps comprenant le calcul de l'équation différentielle matricielle sur la base des concentrations des molécules dans le vecteur $\bar{T}$ à l'issue du pas de temps précédent.

30 **[0174]** Cet exemple de boucle de calculs successifs est fourni à titre d'exemple non-limitatif uniquement d'une boucle de calcul de la phase d'hybridation. De manière plus générale, toute boucle de calcul permettant de simuler la phase d'hybridation selon le nombre de pas de temps souhaité peut être utilisé dans le cadre de l'invention. Par exemple, l'indice de pas de temps peut être initialisé à 0 et la condition de sortie de la boucle à l'étape S414 adaptée, etc.

[0175] L'équation différentielle matricielle est paramétrée par au moins une matrice d'association comprenant les constantes d'associations associées à chaque duplexe et au moins une matrice de dissociation comprenant les constantes de dissociation associées à chaque duplexe.

[0176] Les matrices d'association contiennent ainsi tous les coefficients d'association intervenant dans les équations 3 et 5. Les coefficients d'association et de dissociation peuvent être intégrés dans les matrices d'association et de dissociation selon le même principe que les concentrations dans la matrice $\bar{H}$ (e.g les matrices d'association et de dissociations sont des matrices carrées dans lesquelles chaque ligne et chaque colonne correspondent à des molécules, chaque cellule de la ou des matrice(s) d'association comprend la constante d'association entre les molécules de la ligne et de la colonne vers un duplexe partiel, et chaque cellule de la matrice de dissociation comprend la constante de dissociation associée à la réaction de dissociation du duplexe vers la paire de molécules associées à la ligne et la colonne).

[0177] Les matrices d'association et de dissociation peuvent donc s'écrire respectivement :

$$\overline{\overline{K_{on}}} = \begin{pmatrix} k_{on_{11}} & \dots & \dots & k_{on_{1N}} \\ 0 & \ddots & k_{on_{ij}} & \vdots \\ \vdots & \ddots & \ddots & \vdots \\ 0 & \dots & 0 & k_{on_{NN}} \end{pmatrix}$$

Équation 8

Pour la matrice d'association, et :

$$\overline{\overline{K_{off}}} = \begin{pmatrix} k_{off_{11}} & \dots & \dots & k_{off_{1N}} \\ 0 & \ddots & k_{off_{ij}} & \vdots \\ \vdots & \ddots & \ddots & \vdots \\ 0 & \dots & 0 & k_{off_{NN}} \end{pmatrix}$$

Équation 9

Pour la matrice de dissociation.

[0178] Les unités des constantes d'association peuvent être des $\text{m}^3 \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ (ou $\text{L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$), alors que les unités des constantes de dissociation peuvent être des s^{-1} .

[0179] Comme indiqué ci-dessus, dans un ensemble de modes de réalisation de l'invention, seules certaines réactions d'hybridation sont prises en compte. Dans ce cas, les constantes d'association et de dissociation ne sont donc intégrées que pour les réactions considérées comme suffisamment importantes, c'est-à-dire les réactions qui auront le plus d'impact sur la simulation. Ceci peut par

exemple se faire en définissant chaque élément de la matrice d'association, ou chaque élément de la matrice de dissociation associé à une paire de molécules appartenant comme étant :

- nul, si la variation d'enthalpie libre (ΔG) associé à la réaction d'hybridation des molécules formant la paire est supérieure à un seuil (ou inférieure en valeur absolue) ;
- 5 - respectivement égal à une constante d'association, ou à une constante de dissociation de la réaction d'hybridation de la paire de molécule sinon.

[0180] Dit autrement, les valeurs des constantes d'association et de dissociation dans les matrices seront égales à 0 pour les réactions moins importantes, par exemple si la variation d'enthalpie libre (ΔG) associé à la réaction d'hybridation des molécules formant la paire est supérieure à un seuil donné (ou inférieure en valeur absolue) .

[0181] Ainsi, seules les réactions dominantes seront prises en compte, ce qui permet de réduire la complexité de la simulation, tout en bénéficiant d'une bonne précision de la simulation.

[0182] Comme indiqué ci-dessus, le seuil pour prendre en compte une réaction d'hybridation, et donc intégrer les constantes d'association et de dissociation dans les matrices, peut être identique pour toutes les réactions, ou différent selon que la réaction est une réaction d'hybridation amplicon-amorce ou une autre réaction d'hybridation (amorce-amorce par exemple).

[0183] L'évolution de la matrice de concentration des duplexes peut donc, grâce aux matrices d'association et de dissociation, être écrite sous forme d'équation différentielle matricielle, et la sous-étape S413 peut ainsi consister en la résolution de l'équation différentielle matricielle pour un pas de temps donné.

[0184] La résolution de l'équation différentielle matricielle permet ainsi de modéliser l'ensemble de la dynamique de l'amplification en chaîne, y compris les réactions croisées avec les produits intermédiaires. La résolution d'une unique équation différentielle matricielle permet également la résolution de la cinétique du système à l'aide de capacité de calcul conventionnelles.

[0185] La possibilité de simuler de manière complète l'amplification, et notamment les réactions d'hybridation qui n'étaient pas simulées de manière satisfaisante dans les solutions de l'état de l'art, permet ainsi une validation ou au contraire une modification des paramètres influant la réaction d'amplification (concentration initiale des amorces, des sels, durée et température des phases, etc.).

[0186] Lorsque les équations de conservation de la masse sont prises en compte, l'équation différentielle matricielle peut s'écrire, en intégrant les équations différentielles telles que l'équation 6 pour chaque réaction :

$$\frac{dH}{dt} = K_{on} \odot [(T_0 - (H\mathbb{I}_{N,1}) - {}^t\mathbb{I}_{1,N}H) + \text{diag}(H)] [T_0 - {}^t\mathbb{I}_{1,N}H - (H\mathbb{I}_{N,1}) + \text{diag}(H)] - K_{off} \odot H$$

Équation 10

[0187] Dans laquelle :

- 35 - H est la matrice de concentration des duplexes ;

- T_0 est la valeur initiale pour le cycle du vecteur de concentration de la pluralité de molécules ;
- K_{on} est la matrice d'association ;
- K_{off} est la matrice de dissociation ;

$$\mathbb{I}_{N,1} = \begin{pmatrix} 1 \\ \vdots \\ 1 \end{pmatrix}$$

- $\mathbb{I}_{N,1}$ est la matrice identité de taille N

- 5
- $\odot$ est le produit de Hadamard ;
 - $\text{diag}()$ représente l'opérateur diagonal convertissant une matrice carrée de taille N x N en un vecteur de taille N comprenant tous les éléments de la diagonale de la matrice. Ainsi,

$$\text{diag}(\mathbf{H}) = \begin{pmatrix} H_{1,1} \\ \vdots \\ H_{i,i} \\ \vdots \\ H_{N,N} \end{pmatrix}$$

10 **[0188]** On peut noter que T a été remplacée par T0 dans l'équation différentielle, ce qui permet d'obtenir des calculs matriciels plus rapides.

[0189] Il est maintenant fait référence aux figures 6 et 7.

[0190] La figure 6 montre un exemple de deux phases d'élongation et de dénaturation dans un ensemble de modes de réalisation de l'invention.

15 **[0191]** La figure 7 montre un exemple d'un ensemble de réactions d'hybridation, d'élongation et de dénaturation se déroulant au cours de trois cycles successifs de réaction d'amplification PCR, les réactions représentées en figure 7 permettant de mieux illustrer les étapes des simulations des phases d'élongation et de dénaturation représentées en figure 6.

[0192] La figure 7 représente un exemple simplifié d'une réaction d'amplification d'une unique cible.

20 **[0193]** La figure 7 représente plus spécifiquement des séries de réactions d'hybridation, élongation, dénaturation se produisant dans un contexte donné, avec de nouvelles réactions apparaissant successivement au cycle 2 puis au cycle 3, à mesure que de nouveaux sous-produits sont générés.

[0194] Dans l'exemple de la figure 7, la simulation comprend initialement (début de la phase d'hybridation du cycle 1) :

- 25
- des acides nucléiques sous formes de simple brin « sens » et « anti-sens » de la cible, respectivement T_{FWD} et T_{REV} ;
 - une amorce « sens » P_{1FWD} , et deux amorces « anti-sens » P_{1REV} et P_{2REV} ;

[0195] Lors du premier cycle les réactions sont les suivantes :

- réaction React71 : T_{REV} s'apparie avec l'amorce P_{1FWD} en une première position pour donner le duplexe H_{STFWD}^1 , qui sera ensuite élongué en un duplexe élongué H_{STFWD}^{1*} , qui sera dénaturé en deux acides nucléiques sous forme de simple brin T_{REV} et ST_{FWD}^1 ;
- réaction React72 : T_{REV} s'apparie avec l'amorce P_{1FWD} en une deuxième position pour donner le duplexe H_{STFWD}^2 , qui sera ensuite élongué en un duplexe élongué H_{STFWD}^{2*} , qui sera dénaturé en deux acides nucléiques sous forme de simple brin T_{REV} et ST_{FWD}^2 . Bien que les molécules appariées soient les mêmes dans les réactions React71 et React72, ces réactions sont distinctes, car l'appariement se fait en deux position distinctes, l'élongation se fait donc sur une distance plus courte dans le cas de la réaction React72. On parle dans ce cas de « multi-hybridation ». Les variations d'enthalpie libre ΔG associée à ces deux réactions peuvent par ailleurs être différentes. Les réactions React71 et React72 génèrent donc respectivement deux molécules sous forme simples brins distinctes ST_{FWD}^1 et ST_{FWD}^2 ;
- réaction React73 : T_{FWD} s'apparie avec l'amorce P_{1REV} pour donner le duplexe H_{STREV} , qui sera ensuite élongué en un duplexe élongué H_{STREV}^* , qui sera dénaturé en deux acides nucléiques sous forme de simple brin T_{FWD} et ST_{REV} ;
- réaction React74 : P_{1FWD} s'apparie avec P_{2REV} pour donner le duplexe H_{PDREV} , qui sera ensuite élongué en un duplexe élongué H_{PDREV}^* , qui sera dénaturé en deux acides nucléiques sous forme de simple brin PD_{REV} et P_{1FWD} ;
- réaction React75 : P_{1FWD} s'apparie avec P_{2REV} pour donner le duplexe H_{PDFWD} , qui sera ensuite élongué en un duplexe élongué H_{PDFWD}^* , qui sera dénaturé en deux acides nucléiques sous forme de simple brin $PDFWD$ et P_{2REV} . Bien que les amorces appariées dans les réactions React74 et React75 soient les mêmes, ces réactions sont distinctes, car l'élongation ne se produit pas sur le même brin : dans le cas de la réaction React74 c'est le brin « anti-sens » qui est élongué, alors que dans le cas de la réaction React75 c'est le brin « sens » qui est élongué.

[0196] A l'issue de ce deuxième cycle, de nouveaux sous-produits de réaction sont donc ajoutés aux produits déjà présents : ST_{FWD}^1 , ST_{FWD}^2 , ST_{REV} , PD_{REV} , $PDFWD$.

[0197] Au deuxième cycle, la présence de ces nouveaux sous-produits génère 6 nouvelles réactions, en plus des 5 réactions React71 à React75 ayant déjà lieu au premier cycle :

- réaction React76 : ST_{FWD}^1 s'apparie avec l'amorce P_{1REV} pour donner le duplexe $H_{A/STREV}^1$ qui sera ensuite élongué en un duplexe élongué $H_{A/STREV}^{1*}$ qui sera dénaturé en deux acides nucléiques sous forme de simple brin A_{REV}^1 et ST_{FWD}^1 ;
- réaction React77 : ST_{FWD}^2 s'apparie avec l'amorce P_{1REV} pour donner le duplexe $H_{A/STREV}^2$ qui sera ensuite élongué en un duplexe élongué $H_{A/STREV}^{2*}$ qui sera dénaturé en deux acides nucléiques sous forme de simple brin A_{REV}^2 et ST_{FWD}^2 ;

- réaction React78 : ST_{REV} s'apparie avec l'amorce P_{1FWD} en une première position pour donner le duplexe $H_{A/STFWD}^1$, qui sera ensuite élongué en un duplexe élongué $H_{A/STFWD}^{1*}$, qui sera dénaturé en deux acides nucléiques sous forme de simple brin ST_{REV} et A_{FWD}^1 ;
 - réaction React79 : ST_{REV} s'apparie avec l'amorce P_{1FWD} en une deuxième position pour donner le duplexe $H_{A/STFWD}^2$, qui sera ensuite élongué en un duplexe élongué $H_{A/STFWD}^{2*}$, qui sera dénaturé en deux acides nucléiques sous forme de simple brin ST_{REV} et A_{FWD}^2 . Bien que les molécules appariées soient les mêmes dans les réactions React78 et React79, ces réactions sont distinctes, car l'appariement se fait en deux position distinctes, l'élongation se fait donc sur une distance plus courte dans le cas de la réaction React79. On parle dans ce cas de « multi-hybridation ». Les réactions React78 et React79 génèrent donc respectivement deux molécules sous forme simples brins distinctes A_{FWD}^1 et A_{FWD}^2 ;
 - réaction React710 : PD_{FWD} s'apparie avec P_{2REV} pour donner le duplexe $H_{A/PDREV}$, qui sera ensuite élongué en un duplexe élongué $H_{A/PDREV}^*$, qui sera dénaturé en deux acides nucléiques sous forme de simple brin PD_{REV} et PD_{FWD} ;
 - réaction React711 : P_{1FWD} s'apparie avec PD_{REV} pour donner le duplexe $H_{A/PDFWD}$, qui sera ensuite élongué en un duplexe élongué $H_{A/PDFWD}^*$, qui sera dénaturé en deux acides nucléiques sous forme de simple brin PD_{REV} et PD_{FWD} . Bien que les produits des réactions React710 et React711 soient les mêmes, ces réactions sont distinctes, car les molécules appariées sont différentes et l'élongation ne se produit pas sur le même brin : dans le cas de la réaction React710 c'est le brin « anti-sens » qui est élongué, alors que dans le cas de la réaction React711 c'est le brin « sens » qui est élongué. Il convient également de noter que, bien que $H_{A/PDREV}^*$ et $H_{A/PDFWD}^*$ soient considérées pour les besoins de la simulation comme deux molécules différentes associées à deux concentrations différentes, il s'agit en réalité de la même molécule.
- [0198]** A l'issue de ce deuxième cycle, de nouveaux sous-produits de réaction sont donc ajoutés aux produits déjà présents : A_{REV}^1 , A_{REV}^2 , A_{FWD}^1 et A_{FWD}^2
- [0199]** Au troisième cycle, la présence de ces nouveaux sous-produits génère 4 nouvelles réactions, en plus des 11 réactions React71 à React711 ayant déjà lieu au deuxième cycle :
- réaction React712 : A_{FWD}^1 s'apparie avec l'amorce P_{1REV} pour donner le duplexe $H_{A_{REV}}^1$, qui sera ensuite élongué en un duplexe élongué $H_{A_{REV}}^{1*}$, qui sera dénaturé en deux acides nucléiques sous forme de simple brin A_{REV}^1 et A_{FWD}^1 ;
 - réaction React713 : A_{FWD}^2 s'apparie avec l'amorce P_{1REV} pour donner le duplexe $H_{A_{REV}}^2$, qui sera ensuite élongué en un duplexe élongué $H_{A_{REV}}^{2*}$, qui sera dénaturé en deux acides nucléiques sous forme de simple brin A_{REV}^2 et A_{FWD}^2 ;

- réaction React714 : A_{REV}^1 s'apparie avec l'amorce P_{1FWD} pour donner le duplexe H_{AFWD}^1 , qui sera ensuite élongué en un duplexe élongué H_{AFWD}^{1*} , qui sera dénaturé en deux acides nucléiques sous forme de simple brin A_{REV}^1 et A_{FWD}^1 . Bien que les produits des réactions React712 et React714 soient les mêmes, ces réactions sont distinctes, car les molécules appariées sont différentes et l'élongation ne se produit pas sur le même brin : dans le cas de la réaction React712 c'est le brin « anti-sens » qui est élongué, alors que dans le cas de la réaction React714 c'est le brin « sens » qui est élongué. Il convient également de noter que, bien que $H_{A_{REV}}^{1*}$ et $H_{A_{FWD}}^{1*}$ soient considérées pour les besoins de la simulation comme deux molécules différentes associées à deux concentrations différentes, il s'agit en réalité de la même molécule ;
- réaction React715 : A_{REV}^2 s'apparie avec l'amorce P_{1FWD} pour donner le duplexe H_{AFWD}^2 , qui sera ensuite élongué en un duplexe élongué H_{AFWD}^{2*} , qui sera dénaturé en deux acides nucléiques sous forme de simple brin A_{REV}^2 et A_{FWD}^2 . Bien que les produits des réactions React713 et React715 soient les mêmes, ces réactions sont distinctes, car les molécules appariées sont différentes et l'élongation ne se produit pas sur le même brin : dans le cas de la réaction React713 c'est le brin « anti-sens » qui est élongué, alors que dans le cas de la réaction React715 c'est le brin « sens » qui est élongué. Il convient également de noter que, bien que $H_{A_{REV}}^{2*}$ et $H_{A_{FWD}}^{2*}$ soient considérées pour les besoins de la simulation comme deux molécules différentes associées à deux concentrations différentes, il s'agit en réalité de la même molécule.

[0200] L'un des principes de la simulation des phases d'hybridation et de dénaturation dans les exemples de modes de réalisation de l'invention représentés en figure 6 et exemplifiés en figure 7 consiste à simuler plusieurs réactions d'hybridation multiples (par exemple, les réaction React71 et React72, ou encore les réactions React76 et React77) comme une seule réaction générant plusieurs produits de réaction, puis utiliser un tenseur de dénaturation pour répartir les concentrations des produits des réactions d'hybridation multiple en vue du prochain cycle de simulation. Les concentrations des duplexes et duplexes élongués correspondant à différentes positions d'appariement sont donc représentées par une valeur unique.

[0201] L'utilisation d'une unique valeur de concentration pour l'ensemble des duplexes entre une paire de molécules d'acide nucléique quelle que soit la position d'appariement permet de réduire le nombre d'équations à résoudre pour le calcul de la dénaturation, et de rendre le problème de la simulation de la dénaturation soluble.

[0202] Dans un ensemble de modes de réalisation de l'invention, certaines réactions résultent de l'appariement entre deux amorces en un duplexe. Dans ce cas, l'élongation peut s'effectuer dans les deux sens. C'est par exemple le cas des réactions React74 et React75. Dans ce cas, dans certains modes de réalisation de l'invention, la phase d'élongation simule l'élongation d'un tel duplexe en un unique duplexe élongué, et les coefficients du tenseur de dénaturation sont définis de sorte que la

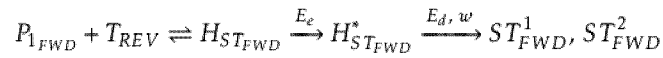
concentration de l'unique duplexe élongué résultant de l'appariement des deux amorces génère des produits de réaction correspondant aux élongations dans les deux sens.

[0203] Ceci permet de simplifier la simulation des réactions issues de l'appariement entre deux amorces, afin de réduire encore la complexité de calcul de la simulation.

5 **[0204]** Dans l'exemple de la figure 7, les réactions peuvent donc être représentées par les équations suivantes, dans lesquelles :

- E_e représente une constante d'élongation liée à chaque réaction ;
 - E_d représente une constante de dénaturation liée à chaque réaction ;
 - w représente les poids respectifs associées aux molécules issues de plusieurs réactions, lorsque pour les besoins de la simulation une concentration de duplexe élongué représente en fait la concentration de plusieurs duplexes distincts ;
 - les trois flèches successives pour chaque réaction représentent l'hybridation, l'élongation et la dénaturation ;
 - les molécules à droite de la dernière flèche représentent donc les produits de la dénaturation.
- 15 Afin d'améliorer la lisibilité des équations, seules les nouvelles molécules ont été indiquées.

[0205] Les réactions React71 et React72 peuvent être représentées par l'équation :



Équation 11

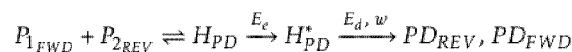
20 **[0206]** On note que, dans le cas de cette hybridation multiple, les deux concentrations de duplexes $H_{ST_{FWD}}^1$ et $H_{ST_{FWD}}^2$ sont représentées par une unique concentration $H_{ST_{FWD}}$, les deux concentrations de duplexes élongués $H_{ST_{FWD}}^{1*}$ et $H_{ST_{FWD}}^{2*}$ sont représentées par une unique concentration $H_{ST_{FWD}}^*$, et que l'applications des poids respectifs w dans le tenseur de dénaturation permet de mettre à jour les concentrations des deux molécules ST_{FWD}^1 et ST_{FWD}^2 à pour prendre en compte les poids respectifs des réactions issues des deux appariements.

25 **[0207]** La réaction React73 est représentée par l'équation :



Équation 12

[0208] Les réactions React74 et React75 peuvent être représentées par l'équation :



30

Équation 13

[0209] On note que, dans cette réaction issue de l'appariement de deux amorces (dimère d'amorces), les deux concentrations de duplexes élongués $H_{PD_{REV}}$ et $H_{PD_{FWD}}$ sont représentées par une unique concentration H_{PD} , les deux concentrations de duplexes élongués $H_{PD_{REV}}^*$ et $H_{PD_{FWD}}^*$ sont représentées par une unique concentration H_{PD}^* , et que l'application des poids respectifs w dans le tenseur de dénaturation permet de mettre à jour les concentrations des deux molécules PD_{REV} et PD_{FWD} .

[0210] L'utilisation des poids se fait par exemple de la manière suivante : une équation représentant plusieurs réactions, telle que l'équation 13 peut être associée à plusieurs poids, par exemple stockés dans le tenseur de dénaturation, représentant l'importance relative des différentes réactions. Par exemple, pour l'équation 13, les réactions React74 et React75 peuvent être associées respectivement à un poids $w_{React74}$ et $w_{React75}$. A l'issue de chaque cycle, la concentration unique H_{PD}^* est répartie en concentrations des produits de la réaction. Par exemple, pour l'équation 13, la concentration de la molécule PD_{REV} serait augmentée en fin de cycle de $w_{React74} * H_{PD}^*$, et la concentration de la molécule PD_{FWD} serait augmentée en fin de cycle de $w_{React75} * H_{PD}^*$. La somme des poids $w_{React74}$ et $w_{React75}$ doit donc être égale à 1, afin que $w_{React74}$ et $w_{React75}$ représentent l'importance respective des réactions React74 et React75. Par exemple, des poids $w_{React74} = 0,5$ et $w_{React75} = 0,5$ indiqueraient que les réactions React74 et React75 sont aussi fréquentes l'une que l'autre

[0211] La réaction React76 est représentée par l'équation :



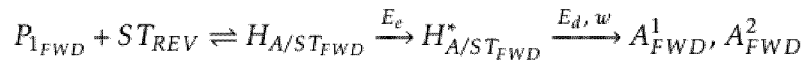
Équation 14

[0212] La réaction React77 est représentée par l'équation :



Équation 15

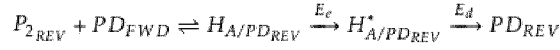
[0213] Les réactions React78 et React79 peuvent être représentées par l'équation :



Équation 16

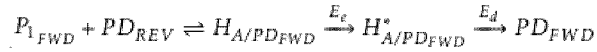
[0214] On note que, dans le cas de cette hybridation multiple, les deux concentrations de duplexes $H_{A/ST_{REV}}^1$ et $H_{A/ST_{REV}}^2$ sont représentées par une unique concentration $H_{A/ST_{REV}}$, les deux concentrations de duplexes élongués $H_{A/ST_{REV}}^{1*}$ et $H_{A/ST_{REV}}^{2*}$ sont représentées par une unique concentration $H_{A/ST_{REV}}^*$, et que l'application des poids respectifs w dans le tenseur de dénaturation permet de mettre à jour les concentrations des deux molécules A_{REV}^1 et A_{REV}^2 à pour prendre en compte les poids respectifs des réactions issues des deux appariements.

[0215] La réaction React710 est représentée par l'équation :



Équation 17

5 [0216] La réaction React711 est représentée par l'équation :



Équation 18

[0217] La réaction React712 est représentée par l'équation :



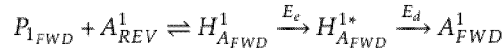
Équation 19

[0218] La réaction React713 est représentée par l'équation :



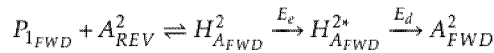
Équation 20

15 [0219] La réaction React714 est représentée par l'équation :



Équation 21

[0220] La réaction React715 est représentée par l'équation :



20 Équation 22

[0221] Dans un ensemble de modes de réalisation de l'invention :

- chaque molécule intervenant dans la simulation est associée à un indice dans le vecteur $\bar{T}$;
- les concentrations des duplexes issues de la phase d'hybridation sont notées dans une matrice carrée $\bar{\bar{H}}$ où chaque ligne et chaque colonne représente une des molécules, dans l'ordre de leurs indices dans le vecteur $\bar{T}$.

25

[0222] Dans l'exemple de la figure 7, la matrice $\bar{\bar{H}}$ peut par exemple s'écrire :

[illegible]

Équation 23

[0223] Dans la représentation ci-dessus, les molécules sous forme de simples brins liées à chaque colonne et ligne sont respectivement notées au-dessus de chaque colonne et à gauche de chaque ligne. Conformément aux équations notées ci-dessus, en cas de multi-hybridation, une unique concentration de duplexe est notée dans la matrice, représentant en fait la concentration de plusieurs duplexes correspondant à plusieurs positions d'appariement. Par exemple :

- 10 - la cellule correspondant à la ligne « P_{1FWD} » et la colonne « ST_{REV} » comprend la concentration $H_{A/ST_{FWD}}$, représentant en fait la somme des concentrations $H_{A/ST_{FWD}}^1$ et $H_{A/ST_{FWD}}^2$.

[0224] Il convient de noter que ces exemples sont donnés pour des multi-hybridations selon deux positions d'appariement distinctes, mais ce principe peut être généralisé à des multi-hybridations avec des appariements selon n'importe quel nombre de positions distinctes supérieur ou égal à 2.

[0225] Dans un ensemble de modes de réalisation de l'invention, l'obtention des concentrations des duplexes élongués lors de la simulation S42 de la phase d'élongation se fait par multiplication des concentrations des duplexes par des constantes d'élongation.

[0226] Par exemple les constantes d'élongation peuvent être listées dans un tenseur d'élongation construit sur le même principe que la matrice $\bar{H}$, c'est-à-dire que chaque cellule du tenseur d'élongation $\bar{E}_e$ contient un coefficient d'élongation du duplexe de la cellule correspondante de la matrice $\bar{H}$. Dans l'exemple de la figure 7 le tenseur d'élongation serait donc :

[illegible]

Équation 24

[0227] La numérotation des constantes d'élongations fait ici référence aux indices des molécules d'acide nucléique sous forme de simples brins dans le vecteur $\bar{T}$. Par exemple, la constante $E_{e_{11,1}}$, notée à la 1^e colonne et la 11^e ligne du tenseur $\bar{E}_e$, représente le coefficient d'élongation du duplexe formé par l'hybridation des molécules d'indice 1 et 11 dans le vecteur $\bar{T}$ (donc les molécules ST_{FWD}^1 et P_{REV}^1), c'est-à-dire $H_{A/ST_{REV}}^1$, également notée à la 1^e colonne et la 11^e ligne de la matrice $\bar{H}$. Les constantes d'élongations peuvent par exemple être lues dans une base de données, ou obtenues expérimentalement.

[0228] Chaque coefficient d'élongation représente donc le coefficient, compris entre 0 et 1, des molécules d'un duplexe donné qui sont élongués durant une phase d'élongation. Par exemple, un coefficient de 0,5 pour un duplexe donné signifie que la moitié des molécules de ce duplexe sont élongués lors de la phase d'élongation. La concentration des duplexes élongués à l'issue de la phase d'élongation sera donc la moitié de la concentration des duplexes non-élongués au début de la phase d'élongation. Le tenseur d'élongation est donc constitué de coefficients d'élongation compris entre 0 et 1.

[0229] Plus généralement, la phase simulation de la phase d'élongation peut se réaliser par une étape S421 de multiplication de la matrice de concentration des duplexes non-élongués par le tenseur d'élongation :

$$\bar{H}^{*C}(\Delta t) = \bar{E}_e \circ \bar{H}^C(\Delta t)$$

20

Équation 25

[0230] Dans laquelle :

- C représente l'indice du cycle d'amplification PCR;
- $\Delta t_{\text{[]}}$ représente la durée de la phase d'élongation ;
- $\bar{H}^C$ représente la matrice de concentration des duplexes non-élongués au C-ième cycle d'amplification PCR ;
- $\bar{H}^{*C}$ représente la matrice de concentration des duplexes élongués au C-ième cycle d'amplification PCR ;
- $\bar{E}_e$ représente le tenseur d'élongation.

[0231] L'intégralité des duplexes n'ayant en général pas été élongués au cours de la phase d'élongation, la concentration des duplexes non-élongués en fin de cycle est donc égale à la concentration des duplexes non-élongués en début de cycle moins la concentration des duplexes élongués en fin de phase. Par exemple :

$$\bar{H}^{C+1}(0) = \bar{H}^C(0) - \bar{H}^{*C}(\Delta t_{\text{[]}})$$

Équation 26

[0232] La phase d'élongation a ici été illustrée par le biais d'un produit matriciel de Hadamard. Cependant, ce n'est pas la seule manière de simuler une phase d'élongation. Par exemple, la phase d'élongation peut être de manière plus générale simulée en multipliant la concentration de chaque

5 Par exemple, les concentrations des duplexes non élongués peuvent être intégrées dans un vecteur de concentration des duplexes non-élongués, et ce vecteur peut être multiplié par un vecteur de coefficients d'élongation.

[0233] La phase de dénaturation peut en pratique comprendre deux étapes :

- 10 - une étape S431 de multiplications des concentrations de duplexes élongués et éventuellement non-élongués par un ou plusieurs tenseurs de dénaturation représentant la répartition des duplexes en molécules d'acide nucléiques sous forme de simples brins ;
- une étape S432 de multiplication des concentrations des duplexes, ou du produit des concentrations des duplexes par le ou les tenseurs de dénaturation par un ou plusieurs coefficients de dénaturations représentant le taux de duplexes effectivement dénaturés
- 15 pendant la phase de dénaturation.

[0234] Dans un ensemble de modes de réalisation de l'invention, la phase de dénaturation comprend la multiplication des concentrations de duplexes élongués par un tenseur de dénaturation des duplexes élongués. Le tenseur de dénaturation des duplexes élongués représente en pratique la redistribution des duplexes élongués vers les molécules d'acides nucléiques sous forme de

20 simples brins lors de la phase de dénaturation.

[0235] Ceci permet de simuler la dénaturation des duplexes qui ont été élongués, et d'intégrer les concentrations de duplexes élongués et dénaturés dans les conditions initiales du cycle suivant.

[0236] Dans un ensemble de modes de réalisation de l'invention, la phase de dénaturation comprend de plus la multiplication des concentrations de duplexes non-élongués par un tenseur de dénaturation des duplexes non-élongués.

25

[0237] Ainsi, la simulation de la phase de dénaturation prend en compte à la fois la dénaturation des duplexes élongués, mais également la dénaturation des duplexes qui n'ont pas été élongués, permettant ainsi d'obtenir un résultat de simulation plus précis.

[0238] Lors de la simulation de la phase de dénaturation, un coefficient de dénaturation peut également être appliqué aux concentrations de duplexes élongués/non-élongués et/ou aux concentrations d'acide nucléiques sous forme de simples brins résultant de la multiplication des concentrations de duplexes élongués/non-élongués par les tenseurs de dénaturation.

30

[0239] Les coefficients de dénaturation représentent la proportion des duplexes d'un type donné qui sont effectivement dénaturés lors de la phase de dénaturation. Les coefficients de dénaturation peuvent par exemple être lus dans une base de données, ou obtenus expérimentalement.

35

[0240] Chaque coefficient de dénaturation représente donc le coefficient, compris entre 0 et 1, des molécules d'un duplexe donné qui sont dénaturés durant une phase de dénaturation. Par exemple,

un coefficient de 0,5 pour un duplexe donné signifie que la moitié des molécules de ce duplexe sont dénaturés lors de la phase dénaturation.

[0241] Selon différents modes de réalisation :

- un même coefficient de dénaturation peut être appliqué à un duplexe élongué donné, et au duplexe non-élongué correspondant. Ceci permet une bonne approximation de la dénaturation, tout en simplifiant les calculs ;
- deux coefficients de dénaturation distincts peuvent être appliqués respectivement à un duplexe élongué donné, et au duplexe non-élongué correspondant. Ceci permet une simulation plus précise, dans des cas où la dénaturation se produit de manière différente pour le duplexe élongué et le duplexe non élongué.

[0242] Les coefficients de dénaturation peuvent par exemple être appliqués par le biais de multiplications matricielles. Par exemple, la phase de dénaturation peut être simulée par les équations suivantes :

$$\bar{H}^{C+1}(0) = (\bar{Id} - \bar{E}_d) \circ \bar{H}^C(\Delta_t)$$

15

Équation 27

$$\bar{H}^{*C+1}(0) = (\bar{Id} - \bar{E}_d) \circ \bar{H}^{*C}(\Delta_t)$$

Équation 28

$$\bar{T}_{full}^{C+1}(0) = \bar{T}_{full}^C(\Delta_t) + \bar{E}_d \circ [\bar{\psi}_d^* \cdot \bar{H}_{vect}^{*C}(\Delta_t) + \bar{\psi}_d \cdot \bar{H}_{vect}^C(\Delta_t)]$$

Équation 29

[0243] Dans lesquelles :

- $\circ$ représente le produit de Hadamard ;
- $\bar{Id}$ est la matrice identité ;
- $\bar{E}_d$ est une matrice de dénaturation comprenant des coefficients de dénaturation associés à chaque duplexe ;
- $\bar{E}_e$ est la matrice d'élongation ;
- $\bar{H}^C(\Delta_t)$ est la matrice de concentration de duplexes non-élongués en fin de phase de dénaturation au cycle C ;
- $\bar{H}^{*C}(0)$ est la matrice de concentration de duplexes élongués en début de phase de dénaturation au cycle C ;
- $\bar{H}^{C+1}(0)$ est la matrice de concentration des duplexes non-élongués au début du cycle suivant C+1 ;
- $\bar{H}^{*C+1}(0)$ est la matrice de concentration des duplexes élongués au début du cycle suivant C+1 ;

- $\cdot$ représente le produit tensoriel;
- $\bar{\bar{\psi}}_d^*$ est le tenseur de dénaturation des duplexes élongués ;
- $\bar{\bar{\psi}}_d$ est le tenseur de dénaturation des duplexes non-élongués ;
- $\bar{H}_{vect}^{*C}(\Delta_t)$ est la concentration des duplexes élongués en fin de phase d'élongation, mise sous forme de vecteur ;
- $\bar{H}_{vect}^C(\Delta_t)$ est la concentration des duplexes non-élongués en fin de phase d'élongation, mise sous forme de vecteur ;
- $\bar{T}_{full}^C(\Delta_t)$ représente le vecteur de concentration des molécules d'acide nucléique sous forme de simple brins en fin de phase d'élongation au cycle d'amplification PCR C ;
- $\bar{T}_{full}^{C+1}(0)$ représente le vecteur de concentration des molécules d'acide nucléique sous forme de simple brins en début du cycle d'amplification PCR suivant C+1 ;

[0244] L'Équation 27 représente la concentration des duplexes non élongués et non-dénaturés se retrouvant en début du cycle d'amplification suivant C+1.

[0245] L'Équation 28 représente la concentration des duplexes élongués et non-dénaturés se retrouvant en début du cycle d'amplification suivant C+1.

[0246] L'Équation 29 représente la distribution en acides nucléiques sous forme de simples brins des duplexes dénaturés en début du cycle d'amplification suivant C+1. Plus spécifiquement :

- $\bar{\bar{\psi}}_d^* \cdot \bar{H}_{vect}^{*C}(\Delta_t)$ représente la distribution des duplexes élongués en acides nucléiques sous forme de simples brins par application du tenseur de dénaturation des duplexes élongués ;
- $\bar{\bar{\psi}}_d \cdot \bar{H}_{vect}^C(\Delta_t)$ représente la distribution des duplexes non élongués en acides nucléiques sous forme de simples brins par application du tenseur de dénaturation des duplexes non élongués ;
- $\bar{\bar{E}}_d^\circ$ représente l'application du tenseur de dénaturation à la distribution des acides nucléiques sous forme de simples brins ;
- le terme $\bar{\bar{E}}_d^\circ [\bar{\bar{\psi}}_d^* \cdot \bar{H}_{vect}^{*C}(\Delta_t) + \bar{\bar{\psi}}_d \cdot \bar{H}_{vect}^C(\Delta_t)]$ représente donc la variation des acides nucléiques sous forme de simples brins au cours du cycle d'amplification PCR d'indice C.

[0247] Il convient de noter que les exemple fournis ci-dessus sont fournis à titre d'exemples non-limitatifs uniquement, et que d'autres formulations pourraient être appliquées pour simuler la phase de dénaturation. Par exemple, des formules équivalentes de distribution des duplexes vers les molécules sous forme de simple brins, et de multiplication par des constantes de dénaturation peuvent être utilisées. Par exemple, la multiplication par les constantes de dénaturation peut se faire sous la forme de multiplications vectorielles.

[0248] Dans l'exemple des Équation 28 et Équation 29, les constantes de dénaturation sont listées dans un tenseur de dénaturation construit sur le même principe que la matrice $\bar{\bar{H}}$, c'est-à-dire que

chaque cellule du tenseur d'élongation $\overline{\overline{E_d}}$ contient un coefficient d'élongation du duplexe de la cellule correspondante de la matrice $\overline{\overline{H}}$. Dans l'exemple de la figure 7 le tenseur de dénaturation serait donc :

$$\overline{\overline{E_d}} = \begin{matrix} & \begin{matrix} ST_{FWD}^1 & ST_{FWD}^2 & ST_{REV} & A_{FWD}^1 & A_{FWD}^2 & A_{REV}^1 & A_{REV}^2 & PD_{FWD} & PD_{REV} & P_{1FWD} & P_{1REV} & P_{2FWD} & P_{2REV} & T_{FWD} & T_{REV} \end{matrix} \\ \begin{matrix} ST_{FWD}^1 \\ ST_{FWD}^2 \\ ST_{REV} \\ A_{FWD}^1 \\ A_{FWD}^2 \\ A_{REV}^1 \\ A_{REV}^2 \\ PD_{FWD} \\ PD_{REV} \\ P_{1FWD} \\ P_{1REV} \\ P_{2FWD} \\ P_{2REV} \\ T_{FWD} \\ T_{REV} \end{matrix} & \begin{pmatrix} 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & E_{d_{10,3}} & 0 & 0 & E_{d_{10,6}} & E_{d_{10,7}} & 0 & 0 & E_{d_{9,10}} & 0 & 0 & E_{d_{10,13}} & 0 & E_{d_{10,15}} \\ E_{d_{11,1}} & E_{d_{11,2}} & 0 & E_{d_{11,4}} & E_{d_{11,5}} & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & E_{d_{11,14}} & 0 \\ 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & E_{d_{13,8}} & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 \end{pmatrix} \end{matrix}$$

5

Équation 30

[0249] La numérotation des constantes d'élongations fait ici référence aux indices des molécules d'acide nucléique sous forme de simples brins dans le vecteur $\overline{T}$. Par exemple, la constante $E_{d_{11,1}}$,

notée à la 1^e colonne et la 11^e ligne du tenseur $\overline{\overline{E_d}}$, représente le coefficient de dénaturation du duplexe formé par l'hybridation des molécules d'indice 1 et 11 dans le vecteur $\overline{T}$ (donc les molécules

10 ST_{FWD}^1 et P_{REV}^1), c'est-à-dire $H_{A/ST_{REV}}^1$, également notée à la 1^e colonne et la 11^e ligne de la matrice $\overline{\overline{H}}$.

Dans cet exemple, un même coefficient de dénaturation est appliqué aux duplexes et aux duplexes élongués correspondants (par exemple $H_{A/ST_{REV}}^1$ et $H_{A/ST_{REV}}^{*1}$). Cependant, dans d'autres modes de

réalisation de l'invention, des coefficients de dénaturation distincts peuvent être appliqués à certains duplexes et duplexes élongués, par exemple si la dynamique de dénaturation est significativement

15 différente entre les deux versions. Les coefficients de dénaturation peuvent par exemple être lus dans une base de données, ou obtenus expérimentalement.

[0250] Chaque coefficient de dénaturation représente donc le coefficient, compris entre 0 et 1, des molécules d'un duplexe donné qui sont dénaturées durant une phase de dénaturation. Par exemple,

un coefficient de 0,5 pour un duplexe donné signifie que la moitié des molécules de ce duplexe sont

20 dénaturées pendant la phase d'élongation. La concentration des duplexes élongués/non-élongués à l'issue de la phase de dénaturation sera donc la moitié de la concentration des duplexes élongués/non-élongués au début de la phase de dénaturation. Le tenseur de dénaturation est donc constitué de coefficients de dénaturation compris entre 0 et 1.

[0251] Dans le cas des duplexes non-élongués (c'est-à-dire les duplexes résultant de l'hybridation de deux molécules d'acide nucléique sous forme de simples brins n'ayant pas été élongués), les molécules n'ont pas été transformées, et la dénaturation a pour effet de restaurer les deux molécules d'acide nucléique sous forme de simple brins hybridées.

25

[0252] Dans l'exemple de la figure 7, la dénaturation des duplexes élongués est résumée dans le tableau ci-dessous, où chaque ligne comprend la référence d'un duplexe partiel, son indice dans le vecteur $\overline{H}_{vect}$, les deux molécules d'acide nucléique sous forme de simple brin dont l'hybridation a

30

permis de former le duplexe, et qui sont re-crées à l'issue de la phase de dénaturation, et les indices de ces deux molécules :

Ref. in $\mathbf{H}^{\text{vec}}$	Index in $\mathbf{H}^{\text{vec}}$	Ref. in $\mathbf{T}$	Indices in $\mathbf{T}$
H_{STFWD}	12	P_{FWD} T_{REV}	10 14
H_{STREV}	11	P_{REV} T_{FWD}	11 13
H_{PD}	10	P_{FWD} P_{REV}	12 11
$H_{A/STREV}^1$	1	P_{REV} ST_{FWD}^1	11 1
$H_{A/STREV}^2$	2	P_{REV} ST_{FWD}^2	11 2
$H_{A/STFWD}$	3	P_{FWD} ST_{REV}	10 3
$H_{A/PDREV}$	8	P_{REV} PD_{FWD}	11 8
$H_{A/PD_{FWD}}$	9	P_{FWD} PD_{REV}	12 9
H_{AREV}^1	4	P_{REV} A_{FWD}^1	11 4
H_{AREV}^2	5	P_{REV} A_{FWD}^2	11 5
H_{AFWD}^1	6	P_{FWD} A_{REV}^1	10 6
H_{AFWD}^2	7	P_{FWD} A_{REV}^2	10 7

Tableau 1

5 **[0253]** Le tenseur de dénaturation des duplexes non-élongués $\bar{\psi}_d$ peut donc s'écrire dans cet exemple :

[illegible]

Équation 31

10 **[0254]** Le tenseur de dénaturation des duplexes non-élongués $\bar{\psi}_d$ est dans cet exemple un tenseur
de taille 12x14 : il comprend 12 lignes correspondant respectivement aux 12 duplexes dans le
vecteur $\bar{H}_{vect}$. Les 12 duplexes sont notés à gauche de chaque ligne correspondante, et notés dans
l'ordre de leurs indices dans le vecteur $\bar{H}_{vect}$. Il comprend également 14 colonnes correspondant
respectivement aux 14 molécules d'acide nucléique sous forme de simple brin dans le vecteur $\bar{T}$.
15 Les 14 molécules d'acide nucléique sous forme de simple brins sont notés au-dessus de chaque
colonne correspondante, et notés dans l'ordre de leurs indices dans le vecteur $\bar{T}$. La valeur « 1 » est

inscrite dans chaque cellule appartenant à la ligne d'un duplexe, et la colonne d'un acide nucléique sous forme de simple brins généré par la dénaturation de ce duplexe élongué.

[0255] Le tenseur de dénaturation permet ainsi de distribuer les concentrations de molécules de $\bar{H}_{vect}$ vers $\bar{T}$ en vue du prochain cycle en une seule simple opération algébrique. La forme du tenseur de dénaturation permet aussi de vérifier que la réaction est correcte en sommant chaque ligne. En effet, la somme des éléments de chaque ligne doit être égale à 2 (puisque chaque duplexe génère lors de la phase de dénaturation deux molécules d'acide nucléique sous forme de simples brins).

[0256] Le tenseur de dénaturation des duplexes élongués est également dans notre exemple de taille 12x14, chaque ligne représentant un duplexe élongué dans l'ordre de leurs indices dans le vecteur $\bar{H}_{vect}^*$, et chaque colonne représentant une molécule d'acide nucléique sous forme de simple brin dans l'ordre de leurs indices dans le vecteur $\bar{T}$. Pour les cas de duplexes correspondant à une unique réaction d'hybridation en un seul emplacement, il est construit comme le tenseur de dénaturation, en inscrivant la valeur « 1 » dans chaque cellule appartenant à la ligne d'un duplexe élongué, et la colonne d'un acide nucléique sous forme de simple brins généré par la dénaturation de ce duplexe élongué.

[0257] Dans un ensemble de modes de réalisation de l'invention, le tenseur de dénaturation des duplexes élongués contient aussi des coefficients spécifiques en cas d'hybridations multiples, c'est-à-dire d'hybridation d'une même amorce en plusieurs emplacements d'un même acide nucléique sous forme de simple brins, comme par exemple dans le cas des réactions React71 et React72, ou des réactions React78 et React79 par exemple.

[0258] Dans ce cas, la dénaturation génère non pas deux mais au moins trois acides nucléiques sous forme de simple brins. Dans le cas des React71 et React72, ou des réactions React78 et React79, la dénaturation produira trois acides nucléiques sous forme de simples brins car l'hybridation multiple s'est réalisée en deux positions, mais le même principe peut être étendu à un plus grand nombre de produits de dénaturation en cas d'hybridations en un plus grand nombre de positions.

[0259] Dans ce cas, les concentrations de duplexes et les concentrations de duplexes élongués comprennent respectivement une concentration d'un duplexe virtuel égale à la somme des concentrations des duplexes formés par les réactions d'hybridations multiples, et une concentration d'un duplexe virtuel élongué égale à la somme des concentrations des duplexes élongués formés par l'élongation des duplexes formés par les réactions d'hybridations multiples.

[0260] Par exemple :

- dans le cas des réactions de multi-hybridation React71 et React72 :
 - les concentrations de duplexes non-élongués comprennent la concentration de duplexe virtuel $H_{ST_{FWD}}$ représentant la somme des concentrations $H_{ST_{FWD}}^1$ et $H_{ST_{FWD}}^2$;

- les concentrations de duplexes élongués comprennent la concentration de duplexe virtuel élongué $H_{ST_{FWD}}^*$ représentant la somme des concentrations $H_{ST_{FWD}}^{1*}$ et $H_{ST_{FWD}}^{2*}$;
 - dans le cas des réactions de multi-hybridation React78 et React79 :
 - les concentrations de duplexes non-élongués comprennent la concentration de duplexe virtuel $H_{A/ST_{FWD}}$ représentant la somme des concentrations $H_{A/ST_{FWD}}^1$ et $H_{A/ST_{FWD}}^2$;
 - les concentrations de duplexes élongués comprennent la concentration de duplexe virtuel élongué $H_{A/ST_{FWD}}^*$ représentant la somme des concentrations $H_{A/ST_{FWD}}^{1*}$ et $H_{A/ST_{FWD}}^{2*}$.
- 10 **[0261]** Dans ce cas, les coefficients du tenseur de dénaturation des duplexes élongués correspondant à la distribution de la concentration du duplexe virtuel élongué vers chaque acide nucléique sous forme de simple brin associé à une des réactions d'hybridation multiple peuvent être respectivement égaux au ratio entre l'énergie d'interaction de la réaction d'hybridation multiple divisée par la somme des énergies d'interactions de toutes les réactions d'hybridations multiples
- 15 avec ledit acide nucléique à simple brin.

[0262] Par exemple, dans le cas des réactions de multi-hybridation React71 et React72, le duplexe virtuel $H_{ST_{FWD}}^*$ sera dénaturé :

- d'une part, vers T_{REV} , qui était présent dans les deux réactions React71 et React72. Le coefficient associé sera donc 1 ;
- d'autre part, vers ST_{FWD}^1 et ST_{FWD}^2 , correspondant aux réactions React71 et React72. Les coefficients associés aux molécules ST_{FWD}^1 et ST_{FWD}^2 doivent donc correspondre aux importances respectives des réactions React71 et React72, c'est-à-dire à l'importance respective de l'hybridation de React71 et l'hybridation de React72. A cet effet, ces deux coefficients peuvent être respectivement égaux à l'énergie d'interaction de l'hybridation de React71 divisée par la somme des énergies d'hybridation de React71 et React72, et l'énergie d'interaction de l'hybridation de React72 divisée par la somme des énergies d'hybridation de React71 et React72.

[0263] Par exemple, si la réaction d'hybridation de React71 a une énergie d'interaction ΔG^1 , et la réaction d'hybridation de React72 une énergie d'interaction ΔG^2 , les poids associés à ST_{FWD}^1 et ST_{FWD}^2 dans le tenseur de dénaturation des duplexes élongués seront respectivement égaux à :

- $w_1 = \frac{\Delta G^1}{\Delta G^1 + \Delta G^2}$ pour ST_{FWD}^1 ;
- et $w_2 = \frac{\Delta G^2}{\Delta G^1 + \Delta G^2}$ pour ST_{FWD}^2 .

[0264] Ainsi, les réactions d'hybridation multiple, et les élongations et dénaturation associées peuvent être simulées comme une seule série de réactions, tout en préservant l'exactitude de la

35 simulation.

[0265] Dans un ensemble de modes de réalisation de l'invention, le tenseur de dénaturation des duplexes élongués contient aussi des coefficients spécifiques en cas d'hybridations entre deux amorces, ou « dimère d'amorce ». En effet, dans ce cas, le duplexe formé par l'hybridation des deux amorces peut être élongué dans les deux sens, ce qui génère in fine des produits de dénaturation distincts, comme par exemple dans les réactions React74 et React75.

[0266] Dans ce cas, les concentrations de duplexes élongués comprennent une concentration d'un duplexe virtuel élongué égale à la somme des concentrations des duplexes élongués formés par l'élongation dans chacun des deux sens du duplexe formé par l'hybridation des deux amorces.

[0267] Par exemple, dans le cas des réactions React74 et React75, les concentrations des duplexes élongués peuvent comprendre une concentration d'un duplexe virtuel élongué H_{PD}^* , représentant la somme des concentrations de $H_{PD_{REV}}^*$ et $H_{PD_{FWD}}^*$. Ainsi, la concentration du duplexe virtuel élongué H_{PD}^* ne correspond pas à une concentration d'un duplexe réel, mais permet de faciliter la simulation.

[0268] Les coefficients du tenseur de dénaturation des duplexes élongués correspondant à la distribution de la concentration du duplexe virtuel élongué vers chacune des deux amorces, et chacun des deux acides nucléiques sous forme de simple brins résultant de l'élongation dans un des deux sens peuvent alors tous être égaux à 0,5, pour représenter le fait que l'élongation s'effectue sensiblement une fois sur deux dans chacun des deux sens. Par exemple, dans le cas des réactions React74 et React75, les produits de dénaturation sont les amorces PD_{REV} et PD_{FWD} , ainsi que les acide nucléiques $P_{1_{FWD}}$ et $P_{2_{REV}}$. Dans le tenseur de dénaturation des duplexes élongués, les cellules sur la ligne de H_{PD}^* et les colonnes de PD_{REV} , PD_{FWD} , $P_{1_{FWD}}$ et $P_{2_{REV}}$ seront donc tous égaux à 0,5.

[0269] Ceci permet de simuler de manière efficace les réactions résultant d'hybridations entre amorces, tout en limitant la complexité de la simulation.

[0270] Dans l'exemple de la figure 7, les coefficients du tenseur de dénaturation peuvent être définis pour chaque réaction de dénaturation d'un duplexe élongué, dans un tableau construit sur le même principe que le tableau pour les duplexes non élongués :

Ref. in $\hat{H}_{\text{vect}}^*$	Index in $\hat{H}_{\text{vect}}^*$	Ref. in $\hat{T}$	Indices in $\hat{T}$	w
$H_{ST_{FWD}}^*$	12	ST_{FWD}^1	1	0.8
		ST_{FWD}^2	2	0.2
		T_{REV}	14	1
$H_{ST_{REV}}^*$	11	ST_{REV}	3	1
		T_{FWD}	13	1
H_{PD}^*	10	PD_{FWD}	8	0.5
		PD_{REV}	9	0.5
		P_{1REV}	11	0.5
		P_{2FWD}	12	0.5
$H_{A/ST_{REV}}^{1*}$	1	A_{REV}^1	6	1
		ST_{FWD}^1	1	1
$H_{A/ST_{REV}}^{2*}$	2	A_{REV}^2	7	1
		ST_{FWD}^2	2	1
$H_{A/ST_{FWD}}^*$	3	A_{FWD}^1	4	0.8
		A_{FWD}^2	5	0.2
		ST_{REV}	3	1
$H_{A/PD_{REV}}^*$	8	PD_{REV}	9	1
		PD_{FWD}	8	1
$H_{A/PD_{FWD}}^*$	9	PD_{FWD}	8	1
		PD_{REV}	9	1
$H_{A_{REV}}^{1*}$	4	A_{REV}^1	6	1
		A_{FWD}^1	4	1
$H_{A_{REV}}^{2*}$	5	A_{REV}^2	7	1
		A_{FWD}^2	5	1
$H_{A_{FWD}}^{1*}$	6	A_{FWD}^1	4	1
		A_{REV}^1	6	1
$H_{A_{FWD}}^{2*}$	7	A_{FWD}^2	5	1
		A_{REV}^2	7	1

Tableau 2

[0271] On observe ici :

- La présence de coefficients correspondant aux réactions d'hybridation multiple, pour les duplexes virtuels élongués $H_{ST_{FWD}}^*$ et $H_{A/ST_{FWD}}^*$,
- la présence des coefficients correspondant à l'hybridation entre les amorces pour le duplexes partiel virtuel élongé H_{PD}^* .

[0272] Dans cet exemple, les coefficients associés aux deux paires de réactions d'hybridation multiples ont tous deux été définis à 0,8 et 0,2.

10 [0273] Ceci permet donc de construire le tenseur de dénaturation des duplexes élongués suivant :

$$\bar{\Psi}_d^* = \begin{pmatrix} ST_{FWD}^1 & ST_{FWD}^2 & ST_{REV} & A_{FWD}^1 & A_{FWD}^2 & A_{REV}^1 & A_{REV}^2 & PD_{FWD} & PD_{REV} & P_{1FWD} & P_{1REV} & P_{2FWD} & P_{2REV} & T_{FWD} & T_{REV} \\ H_{A/ST_{REV}}^{1*} & 1 & 0 & 0 & 0 & 0 & 1 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 \\ H_{A/ST_{REV}}^{2*} & 0 & 1 & 0 & 0 & 0 & 0 & 1 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 \\ H_{A/ST_{FWD}}^* & 0 & 0 & 1 & 0.8 & 0.2 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 \\ H_{A_{REV}}^{1*} & 0 & 0 & 0 & 1 & 0 & 1 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 \\ H_{A_{REV}}^{2*} & 0 & 0 & 0 & 0 & 1 & 0 & 1 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 \\ H_{A_{FWD}}^{1*} & 0 & 0 & 0 & 1 & 0 & 1 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 \\ H_{A_{FWD}}^{2*} & 0 & 0 & 0 & 0 & 1 & 0 & 1 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 \\ H_{A/PD_{REV}}^* & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 1 & 1 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 \\ H_{A/PD_{FWD}}^* & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 1 & 1 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 \\ H_{PD}^* & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0.5 & 0.5 & 0.5 & 0 & 0 & 0.5 & 0 & 0 \\ H_{ST_{REV}}^* & 0 & 0 & 1 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 1 & 0 \\ H_{ST_{FWD}}^* & 0.8 & 0.2 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 1 \end{pmatrix}$$

Équation 32

[0274] La forme de ce tenseur permet de distribuer les concentrations des duplexes élongués vers les molécules d'acide nucléique sous forme de simple brins par une simple opération algébrique.

[0275] De plus, il est possible de vérifier que la dénaturation est sous contrôle, en vérifiant que la somme des valeurs sur chaque ligne est égale à 2.

[0276] Il est maintenant fait référence à la figure 8.

[0277] La figure 8 montre un exemple d'un procédé selon un ensemble de modes de réalisation de
5 l'invention intégrant une validation ou modification des paramètres de l'amplification PCR.

[0278] Dans un ensemble de modes de réalisation de l'invention, les caractéristiques du kit PCR, par exemple le choix de la pluralité d'amorces et de la valeur initiale du vecteur de concentrations pour ladite pluralité d'amorces au premier cycle de la réaction, peuvent être validées ou modifiées en fonction des résultats de la simulation.

10 [0279] Par exemple, le procédé P8 comprend, en plus des étapes du procédé P4 :

- une étape S81 d'affichage des résultats de la simulation. Cet affichage peut par exemple comprendre un affichage de courbes d'évolution des concentrations des molécules, des valeurs représentatives de la cinétique de la réaction, etc ;
- 15 - une étape S82 de comparaison d'une valeur représentative de la cinétique d'une réaction à un seuil ;
- si la comparaison est positive, une étape S83 de validation des amorces et des concentrations initiales des amorces ;
- sinon, une étape S84 de modification des amorces et/ou des concentrations initiales des amorces.

20 [0280] A l'issue de l'étape S84, la simulation peut être réexécutée sur la base des paramètres modifiés.

[0281] Ceci permet donc de s'assurer que les paramètres des amorces et de leur concentration permettent bien de réaliser l'amplification désirée avec une cinétique suffisamment forte, ou au contraire les modifier pour satisfaire cette contrainte.

25 [0282] L'étape S82 de comparaison d'une valeur représentative de la cinétique d'une réaction à un seuil permet notamment de vérifier qu'une réaction donnée d'amplification sera suffisamment rapide pour être détectée. Par exemple, le seuil considéré peut être un des seuils suivants :

- un cycle seuil (Ct) ;
- un point de croisement (Cp) ;
- 30 - une concentration finale d'une molécule d'acide nucléique amplifiée par la réaction ;
- une concentration d'amplicons en fin de réaction.

[0283] Ainsi, l'étape S82 peut consister à vérifier qu'un Ct ou Cp pour une réaction d'amplification d'une cible donnée est supérieur à un seuil de référence (c'est-à-dire que le cycle seuil Ct, ou point de croisement Cp est trop élevé, ce qui signifie que la réaction d'amplification n'est pas assez rapide),
35 ce qui signifie que la réaction ne sera pas suffisamment rapide.

[0284] Si le procédé P8 comprend une étape S81 d'affichage, ceci est un exemple non limitatif. En effet, l'affichage peut par exemple permettre à un utilisateur expert de valider ou non les paramètres de la simulation, mais la comparaison à l'étape S82 peut également s'effectuer automatiquement, sans affichage préalable.

- 5 **[0285]** La mise en œuvre d'une modification à l'étape S84 peut s'effectuer de différentes manières. Par exemple, la modification peut être effectuée manuellement par un utilisateur expert. Alternativement, une modification peut être effectuée automatiquement, ou proposée à l'utilisateur expert en fonction des résultats de la simulation.

[0286] Un exemple de modification à l'étape S84 va être décrit ci-dessous.

- 10 **[0287]** Tout d'abord, l'étape S84 peut comprendre une sous-étape S841 d'identification d'une cible à favoriser en fonction des résultats de la simulation de l'amplification en chaîne par polymérase.

[0288] Par exemple, la cible à favoriser peut être une cible dont la cinétique n'est pas suffisamment rapide. Par exemple, une ou plusieurs des comparaisons discutées pour l'étape S82 peuvent être effectuées pour chaque cible, et une cible pour lequel la comparaison est négative (par exemple,

- 15 une cible dont le Ct ou Cp est supérieur à un seuil prédéfini) considérée comme une cible à favoriser, car la cinétique d'amplification est en l'état actuel des choses insuffisante.

[0289] L'étape S84 peut ensuite comprendre une deuxième sous-étape S842 d'identification, à partir de la matrice d'association ou de la matrice de dissociation, d'une molécule d'acide nucléique sous forme de simple brin formant une paire avec une amorce associée à ladite cible.

- 20 **[0290]** La sous-étape S842 consiste donc à identifier une molécule autre que la cible formant une paire avec une amorce associée à ladite cible, c'est-à-dire une molécule qui fera concurrence à la cible (et aux amplicons résultant de l'amplification de la cible) pour s'apparier avec l'amorce. Une telle molécule peut être identifiée grâce à la matrice d'association K_{on} , ou la matrice de dissociation K_{off} . En effet, ces matrices contiennent des coefficients pour chaque paire de molécules liées par
25 une réaction d'hybridation suffisamment forte. La molécule peut donc par exemple être identifiée comme une molécule ayant une constante d'association avec l'amorce, ou une constante d'association supérieure à un seuil avec l'amorce.

- [0291]** L'étape S84 peut ensuite comprendre la réalisation d'au moins une modification de l'amplification en chaîne par polymérase. L'au moins une modification de l'amplification en chaîne
30 par polymérase peut notamment comprendre au moins une modification choisie parmi :

- une diminution, dans le vecteur de concentration initiale, de la concentration initiale de ladite molécule d'acide nucléique sous forme de simple brin formant une paire avec l'amorce associée à ladite cible ;
- une modification de la concentration de sels ;
- 35 - une modification de la température d'hybridation pour au moins un cycle.

[0292] Ces modifications permettent notamment de défavoriser l'hybridation de la molécule d'acide nucléique sous forme de simple brin formant une paire avec l'amorce associée à ladite cible avec l'amorce, ce qui permet ainsi de favoriser l'hybridation de la cible (et des amplicons résultant de l'amplification de la cible) avec l'amorce, et donc la réaction d'amplification de la cible.

- 5 [0293] Cet exemple montre que la simulation de réaction d'amplification selon l'invention permet non seulement de vérifier qu'une amplification souhaitée est bien réalisée, mais également de modifier les paramètres de l'amplification afin de favoriser une réaction souhaitée. Si l'exemple des étapes S841 à S843 de la figure 8 est basé sur une identification de réaction concurrente via analyse de la matrice d'association K_{on} , ou la matrice de dissociation K_{off} , cet exemple n'est pas limitatif, et
- 10 d'autres procédés d'identification de freins à une réaction d'amplification peuvent être utilisés dans un ensemble de modes de réalisation de l'invention. Plus généralement, l'invention n'est pas limitée à un procédé particulier de modification des paramètres de la simulation.

[0294] Il est maintenant fait référence à la figure 9.

- [0295] La figure 9 montre un exemple d'un procédé selon un ensemble de modes de réalisation de l'invention intégrant une validation ou modification des paramètres de l'amplification PCR, et une
- 15 fabrication d'un kit d'amplification PCR validé.

[0296] La procédé P9 est un procédé de fabrication comprenant toutes les étapes du procédé P8.

- [0297] La procédé P9 comprend en plus, à l'issue de la validation à l'étape S83, une étape de fabrication d'un kit pour la caractérisation de microorganismes compris dans un échantillon par
- 20 utilisation d'une réaction d'amplification en chaîne par polymérase, ou « kit PCR » tel que le kit K1 représenté en figure 1 par exemple.

[0298] Le kit fabriqué par le procédé P9 comprend ainsi les amorces, et concentrations telles que validées par le procédé P8, c'est-à-dire dont la simulation a montré qu'une amplification souhaitée pourra être réalisée avec une cinétique satisfaisante.

- 25 [0299] Le procédé P9 permet donc de fabriquer un kit validé par la simulation, et permettant une amplification satisfaisante des cibles souhaitées.

[0300] Il est maintenant fait référence à la figure 10.

[0301] La figure 10 montre un exemple d'un procédé P10 de caractérisation d'un microorganisme utilisant un kit d'amplification PCR fabriqué selon un ensemble de modes de réalisation de l'invention.

- 30 [0302] La procédé P10 comprend une première étape S101 de préparation de l'échantillon de manière à réaliser sur l'échantillon préparé une PCR, ladite préparation comprenant une étape d'ajout d'un kit (K1) fabriqué conformément à un procédé tel que le procédé P9.

[0303] L'échantillon peut avoir été prélevé sur un humain, un animal, ou encore un objet inanimé.

- [0304] Le procédé P10 comprend ensuite une étape S102 de mise en œuvre de la PCR sur
- 35 l'échantillon prélevé. A l'issue de cette étape, les séquences d'acides nucléiques d'intérêt auront été amplifiées par la PCR, et sont présentes en quantités suffisantes pour être caractérisées.

[0305] Le procédé P10 comprend donc une troisième étape S103 de caractérisation des microorganismes en fonction des résultats de la PCR.

[0306] Un anti-microbien peut être choisi en fonction de la caractérisation et, soit administré à l'humain ou l'animal si l'échantillon a été prélevé sur un être vivant, soit appliqué sur un objet inanimé si l'échantillon a été prélevé sur un objet inanimé.

[0307] Le procédé P10 permet ainsi d'effectuer une PCR sur un échantillon, afin de caractériser un microorganisme contenu dans l'échantillon, et le cas échéant sélectionner un antimicrobien adapté à ce microorganisme.

[0308] Le kit ayant été validé par simulation pour permettre l'amplification des séquences d'acide nucléique caractéristiques de ce microorganisme, la méthode P10 permet une amplification, et donc une caractérisation efficace d'un microorganisme donné.

[0309] Il est maintenant fait référence à la figure 11.

[0310] La figure 11 montrée un graphe Gr11 représentant l'évolution du C_t pour une simulation d'amplification d'un acide nucléique issue de levure du champignon (*S. cerevisiae*) en fonction de la durée de la phase d'hybridation selon un procédé de simulation de l'invention.

[0311] Le graphe représente plus précisément :

- sur l'axe des abscisses, la durée de la phase d'hybridation t_{hybr} , en secondes ;
- sur l'axe des ordonnées, la différence ΔC_t entre le C_t correspondant au temps maximal testé de la phase d'hybridation (ici, 10 secondes), et le C_t pour une durée donnée de phase d'hybridation, plus courte.

[0312] Les simulations ont été réalisées pour 3 concentrations d'amorces, la concentration d'acide nucléique issue de levure du champignon étant maintenue constante :

- la courbe Crv110 représente l'évolution simulée du ΔC_t en fonction de t_{hybr} , pour une concentration de 0,4 μM ;
- la courbe Crv111 représente l'évolution simulée du ΔC_t en fonction de t_{hybr} , pour une concentration de 0,8 μM ;
- la courbe Crv112 représente l'évolution simulée du ΔC_t en fonction de t_{hybr} , pour une concentration de 2 μM .

[0313] Des expérimentations physiques correspondant à ces concentrations, pour certaines durées de la phase d'hybridation ont été menées, afin de mesurer la valeur ΔC_t sur des cas réels et comparer aux simulations.

[0314] Les mesures réelles sont représentées :

- par les mesures Mes1101, Mes1102, Mes1103 et Mes1104 pour les concentrations de 0,4 μM ;

- par les mesures Mes1111, Mes1112, Mes1113, Mes1114, Mes1115 et Mes1116, pour les concentrations de 0,8 μM ;
- par les mesures Mes1121, Mes1122, Mes1123, Mes1124 et Mes1125, pour les concentrations de 2 μM .

5 [0315] On constate sur la figure 11 que :

- les simulations fournissent des résultats précis, très proches des mesures réelles ;
 - lorsque la durée de la phase d'hybridation augmente, le Ct baisse rapidement puis plus lentement pour tendre vers une valeur minimale (représentée par $\Delta C_t = 0$) ;
 - le point d'inflexion de la durée d'hybridation t_{hybr} à partir duquel le Ct se rapproche de la
- 10 valeur minimale est plus élevé lorsque les concentrations sont faibles.

[0316] La simulation permet donc d'évaluer le Ct de manière précise et fiable. On constate donc que les simulations effectuées permettent d'optimiser la durée de la phase d'hybridation pour atteindre une valeur cible de Ct.

[0317] Il est maintenant fait référence à la figure 12.

15 [0318] La figure 12 montre un exemple de visualisation de la cinétique de plusieurs réaction PCR dans deux conditions expérimentales distinctes selon un ensemble de modes de réalisation de l'invention.

[0319] Dans l'exemple de la figure 12, deux simulations selon l'invention ont été exécutées pour reproduire :

- 20
- l'amplification d'une cible au sein d'une première amplification multiplexe, avec un premier ensemble d'amorces. Cette première simulation est représentée par les points « OPA » ,
 - l'amplification d'une cible au sein d'une deuxième amplification multiplexe, avec une modification du premier ensemble d'amorces. Cette première simulation est représentée par les points « OPB ».

25 [0320] La simulation a été effectuée dans ce cas, suite à la constatation que, dans un exemple d'amplification réelle, le Ct d'une amplification a été augmenté d'environ 5,5 cycles suite à a modification du premier ensemble d'amorces. Deux simulations, correspondant au premier ensemble d'amorces, et à la modification de l'ensemble, ont donc été conduites.

[0321] Les résultat de ces deux simulations sont représentés sur le graphe Gr12, avec :

- 30
- en abscisses, l'indice du cycle ;
 - en ordonnées, la concentration des amplicons résultant de l'amplification de la cible.

[0322] Les points « OPA » et « OPB » montrent donc les concentrations d'amplicons simulées à l'issue de chaque cycle, respectivement dans le cas où le premier ensemble d'amorce, et l'ensemble d'amorces modifié, sont utilisés.

[0323] On constate que la simulation permet également de détecter une différence de C_t ΔC_t d'environ 5,5 cycles.

[0324] Ce résultat démontre la capacité de la simulation d'amplification PCR selon l'invention à simuler de manière fiable le fonctionnement d'une amplification multiplexe. Ainsi, l'analyse des résultats de simulations permet d'optimiser le choix des paramètres d'amplifications, par exemple le choix des amorces, des concentrations d'amorces, ou des durées de phases afin de valider la capacité d'un kit d'amplification PCR construit selon les paramètres simulés à générer une amplification satisfaisante d'une cible donnée.

[0325] La présente divulgation ne se limite pas aux exemples de procédé, programme d'ordinateur, kit pour l'amplification en chaîne par polymérase ci-avant, seulement à titre d'exemple, mais elle englobe toutes les variantes que pourra envisager l'homme de l'art dans le cadre de la protection recherchée.

[0326] Grâce à l'invention, il est possible de déterminer si un choix initial des amorces et de leur concentration mène à une amplification appropriée des molécules d'acide nucléique cibles. Dans un tel cas, la conception d'un kit contenant lesdits amorces et leurs concentrations est validé et le kit peut passer en production pour sa commercialisation.

[0327] L'invention permet également d'adopter une approche systématique pour la conception de kits d'amplification PCR. Notamment, partant d'une liste d'amorces possibles préalablement identifiés et d'un intervalle de concentrations possibles pour ces derniers, une grille de paramètre initiaux est déterminée. Par exemple pour chaque ensemble d'amorces candidates pour un kit, leur intervalle de concentration est discrétisé avec un pas prédéterminé. Un paramètre initial est alors cet ensemble d'amorces avec des valeurs de concentrations dans lesdits intervalles. Une simulation est lancée pour chacun des paramètres et une fois l'ensemble de la grille parcouru, on retient le ou les paramètres donnant les meilleures performances, puis un ou plusieurs kits correspondants sont fabriqués.

[0328] L'invention permet également de tester un ensemble d'amorces dans le cadre d'une PCR multiplexe, et dans ce cas de tester et comparer des designs alternatifs afin d'atteindre les performances attendues.

[0329] Le kit fabriqué est ensuite utilisé d'une manière connue en soi. Dans le cadre d'une application clinique, comme par exemple la détection de microorganismes pathogènes dans un échantillon biologique prélevé sur un patient (ou un animal), le clinicien (resp. le vétérinaire) peut alors adapter sa thérapie, par exemple choisir un antibiotique adapté au pathogène détecté.

[0330] De manière privilégiée, les paramètres ΔG , ou de façon similaire les $\bar{K}_{on}$ et $\bar{K}_{off}$, peuvent être obtenues selon des méthodes de l'état de l'art, par exemple les méthodes dites « Nearest Neighbours » divulguées par exemple par SantaLucia Jr, J. (1998). A unified view of polymer, dumbbell, and oligonucleotide DNA nearest-neighbor thermodynamics. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 95(4), 1460-1465.

- [0331]** La simulation de l'amplification PCR est mise en œuvre par ordinateur, à savoir au moyen de circuits matériels comprenant des mémoires informatiques (cache, RAM, ROM...) et un ou plusieurs microprocesseurs ou processeurs, organisés ou non sous forme de nœuds de calcul, nécessaires à l'exécution d'instructions informatiques mémorisées dans les mémoires pour la mise
- 5 en œuvre de ladite simulation.

Revendications

[Revendication 1] Procédé (P4) de simulation numérique d'une amplification en chaîne par polymérase d'au moins une cible, ledit procédé comprenant la simulation d'une pluralité de cycles successifs de l'amplification, chaque cycle comprenant, de manière séquentielle :

- 5 - une phase d'hybridation (S41) entre l'au moins une cible et une pluralité d'amorces ;
- une phase d'élongation (S42) ;
- puis une phase de dénaturation (S43) ;

dans lequel, pour chaque cycle :

- la phase d'hybridation comprend :
 - 10 - l'obtention d'une valeur initiale pour le cycle d'un vecteur de concentrations d'une pluralité de molécules d'acide nucléique sous forme de simples brins comprenant l'au moins une cible et la pluralité d'amorces ;
 - le calcul d'une matrice de concentrations de duplexes partiels formés par l'hybridation de la pluralité de molécules d'acide nucléique sous forme de simples brins, chaque élément de ladite matrice représentant la concentration des duplexes
 - 15 formés par l'hybridation d'une paire de ladite pluralité de molécules d'acide nucléique sous forme de simples brins, indépendamment de la position d'hybridation de ladite paire ;
- la phase de dénaturation comprend :
 - 20 - la multiplication d'un vecteur de concentration de duplexes élongués, résultant de l'application de la phase d'élongation aux concentrations de duplexes, par un tenseur de dénaturation des duplexes élongués ($\bar{\Psi}_d^*$) afin d'obtenir une valeur initiale de vecteur de concentrations d'une pluralité de molécules d'acide nucléique sous forme de simples brins pour le cycle suivant.

25

[Revendication 2] Procédé selon la revendication précédente, dans lequel :

- au moins un duplexe résulte de l'appariement entre deux amorces ;
- la phase d'élongation simule la concentration de chaque duplexe résultant de l'appariement entre deux amorces en une unique concentration de duplexe élongué résultant de
 - 30 l'appariement entre deux amorces ;
- les coefficients du tenseur de dénaturation sont définis de manière à répartir chaque concentration de duplexe élongué résultant de l'appariement entre deux amorces en molécules d'acide nucléique sous formes de simples brins correspondant à une élongation du duplexe résultant de l'appariement entre les deux amorces dans les deux sens.

35

[Revendication 3] Procédé selon la revendication précédente, dans lequel, pour chaque réaction d'hybridation entre deux amorces :

- 5 - les concentrations de duplexes élongués comprennent une concentration d'un duplexe virtuel élongué égale à la somme des concentrations des duplexes élongués formés par l'élongation dans chacun des deux sens du duplexes formés par l'hybridation des deux amorces ;
- 10 - les coefficients du tenseur de dénaturation des duplexes élongués correspondant à la distribution de la concentration du duplexe virtuel élongué vers chacune des deux amorces, et chacun des deux acides nucléiques sous forme de simple brins résultant de l'élongation dans un des deux sens sont tous égaux à 0,5.

[Revendication 4] Procédé selon l'une quelconque des revendications précédentes, dans lequel, pour chaque ensemble de réactions d'hybridations multiples d'un acide nucléique à simple brin par une amorce en plusieurs emplacements respectivement :

- 20 - les concentrations de duplexes et les concentrations de duplexes élongués comprennent respectivement une concentration d'un duplexe virtuel égale à la somme des concentrations des duplexes formés par les réactions d'hybridations multiples, et une concentration d'un duplexe virtuel élongué égale à la somme des concentrations des duplexes élongués formés par l'élongation des duplexes formés par les réactions d'hybridations multiples ;
- 25 - les coefficients du tenseur de dénaturation des duplexes élongués correspondant à la distribution de la concentration du duplexe virtuel élongué vers chaque acide nucléique sous forme de simple brin associé à une des réactions d'hybridations multiples sont respectivement égaux au ratio entre l'énergie d'interaction de la réaction d'hybridation multiple divisée par la somme des énergies d'interactions de toutes les réactions d'hybridations multiples avec ledit acide nucléique à simple brin.

[Revendication 5] Procédé selon l'une quelconque des revendications précédentes, dans lequel la phase d'élongation comprend :

- 30 - l'obtention des concentrations des duplexes élongués par multiplication des concentrations des duplexes par des coefficients d'élongation.

[Revendication 6] Procédé selon la revendication précédente, dans lequel :

- 35 - la phase d'élongation comprend de plus la mise à jour du vecteur de concentration des duplexes, représentant à l'issue de la phase d'élongation la concentration des duplexes non-élongués ;

- la phase de dénaturation comprend de plus la multiplication dudit vecteur de concentration des duplexes par un tenseur de dénaturation des duplexes non-élongués ($\bar{\bar{\Psi}}_d$) pour mettre à jour la valeur initiale pour le cycle suivant du vecteur de concentrations de la pluralité de molécules d'acide nucléique sous forme de simples brins.

5

[Revendication 7] Procédé selon la revendication précédente, dans lequel, lors de la phase de dénaturation, un même coefficient de dénaturation est appliqué à un duplexe non-élongué et au duplexe élongué correspondant pour mettre à jour le vecteur de concentrations de la pluralité de molécules d'acide nucléique sous forme de simples brins, et les concentrations de duplexes pour le cycle suivant.

10

[Revendication 8] Procédé (P8) selon l'une quelconque des revendications précédentes, comprenant une étape ultérieure de validation (S83) ou de modification (S84) de la pluralité d'amorces et de la valeur initiale du vecteur de concentrations pour ladite pluralité d'amorces au premier cycle de la réaction par comparaison (S82) d'une valeur représentative de la cinétique d'une réaction à un seuil.

15

[Revendication 9] Procédé de fabrication d'un kit pour la caractérisation de microorganismes compris dans un échantillon par utilisation d'une réaction d'amplification en chaîne par polymérase, ledit kit comprenant une pluralité d'amorces validées, procédé dans lequel la pluralité d'amorces et le vecteur de concentrations pour ladite pluralité d'amorces sont obtenus par un procédé de simulation selon l'une des revendications 1 à 7.

20

[Revendication 10] Kit pour l'amplification en chaîne par polymérase fabriqué par le procédé selon la revendication précédente.

25

[Revendication 11] Programme informatique comportant des instructions pour la mise en œuvre du procédé selon l'une des revendications 1 à 8 lorsque ce programme est exécuté par un processeur.

[Revendication 12] Support d'enregistrement non transitoire lisible par un ordinateur sur lequel est enregistré un programme pour la mise en œuvre du procédé selon l'une des revendications 1 à 8 lorsque ce programme est exécuté par un processeur.

30

[Revendication 13] Procédé de caractérisation de microorganismes compris dans un échantillon, comprenant :

35

- La préparation de l'échantillon de manière à réaliser sur l'échantillon préparé une PCR, ladite préparation comprenant une étape d'ajout d'un kit fabriqué conformément à un procédé de la revendication 1 à 8 ;
 - La mise en œuvre de la PCR sur l'échantillon préparé.
- 5 – La caractérisation des microorganismes en fonction des résultats de la PCR.

[Revendication 14] Procédé selon la revendication 13, dans lequel l'échantillon est prélevé sur un animal ou un être humain, ledit procédé comprenant le choix d'un antimicrobien en fonction de la caractérisation des microorganismes présent dans ledit échantillon, et l'administration dudit anti-
10 microbien audit animal ou être humain.

[Revendication 15] Procédé selon la revendication 13, dans lequel l'échantillon est prélevé sur un objet inanimé, ledit procédé comprenant le choix d'un antimicrobien en fonction de la caractérisation des microorganismes présent dans ledit échantillon, et l'application dudit anti-microbien audit objet
15 inanimé.

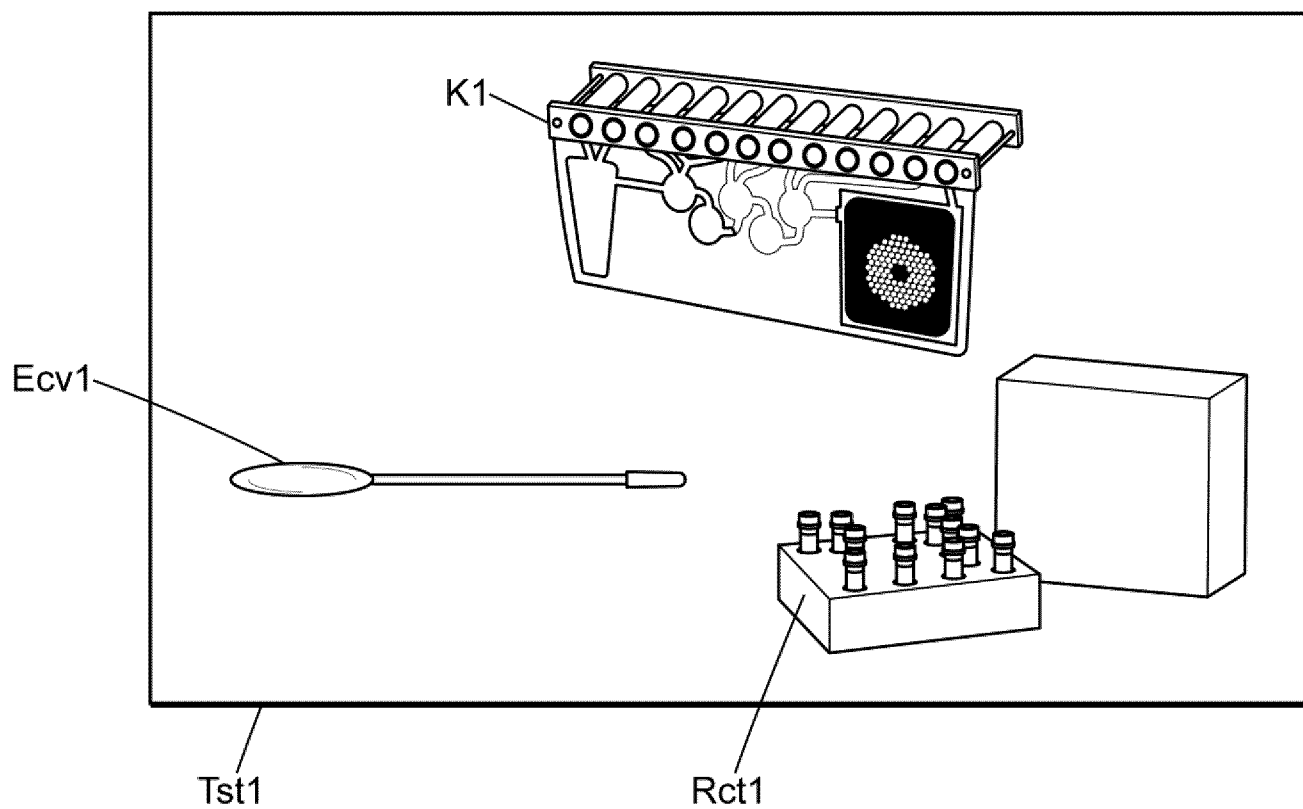


FIG. 1

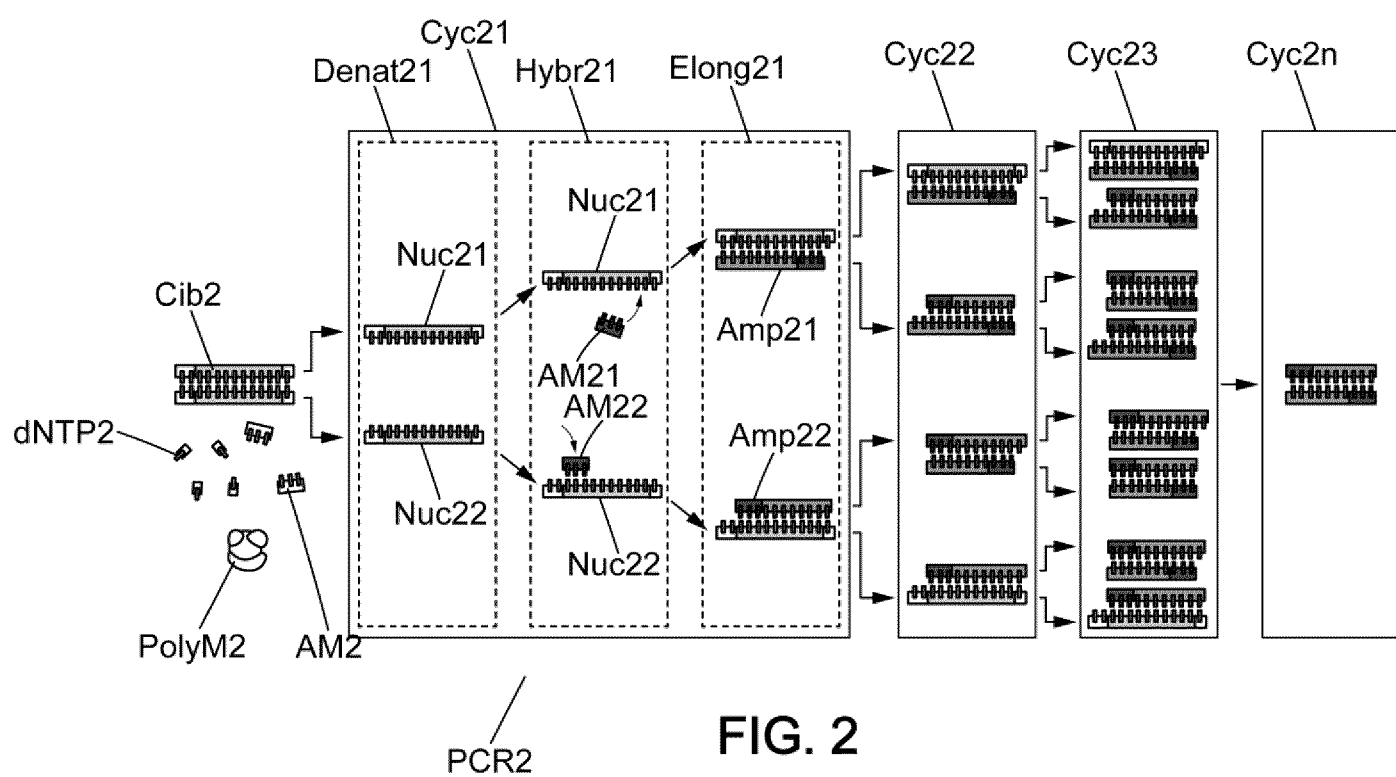


FIG. 2

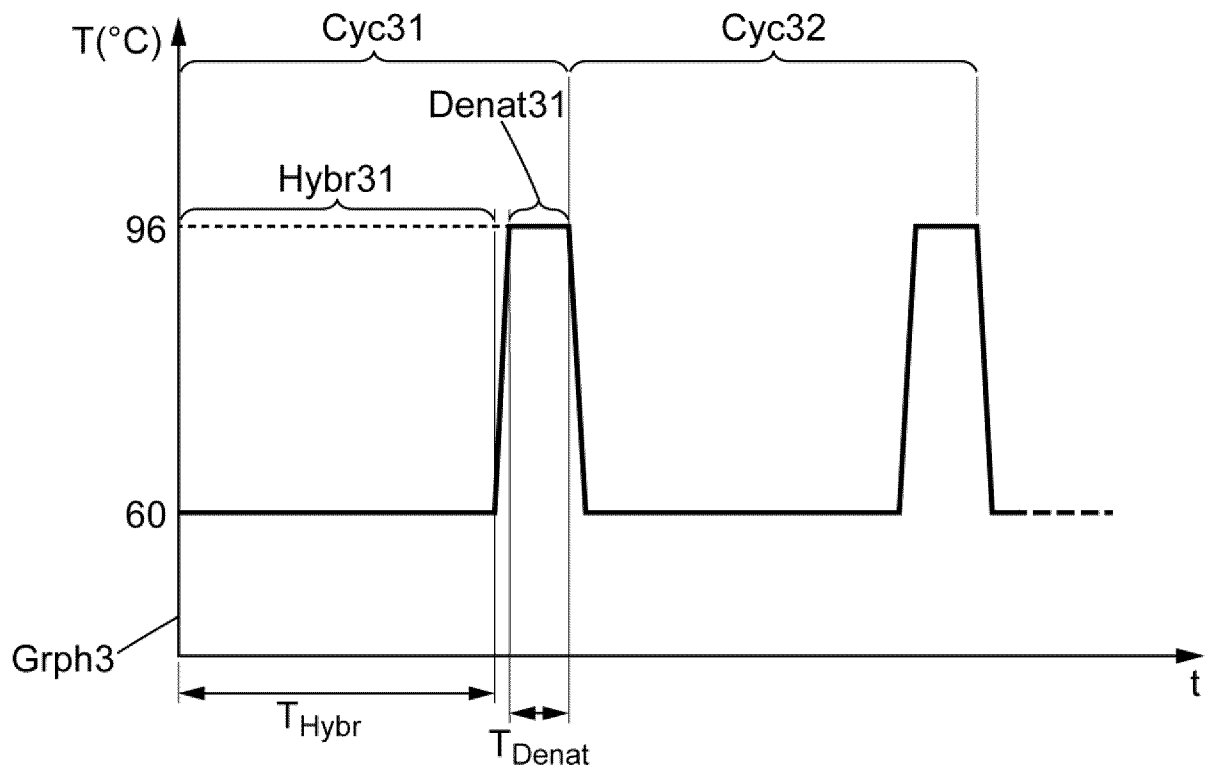


FIG. 3

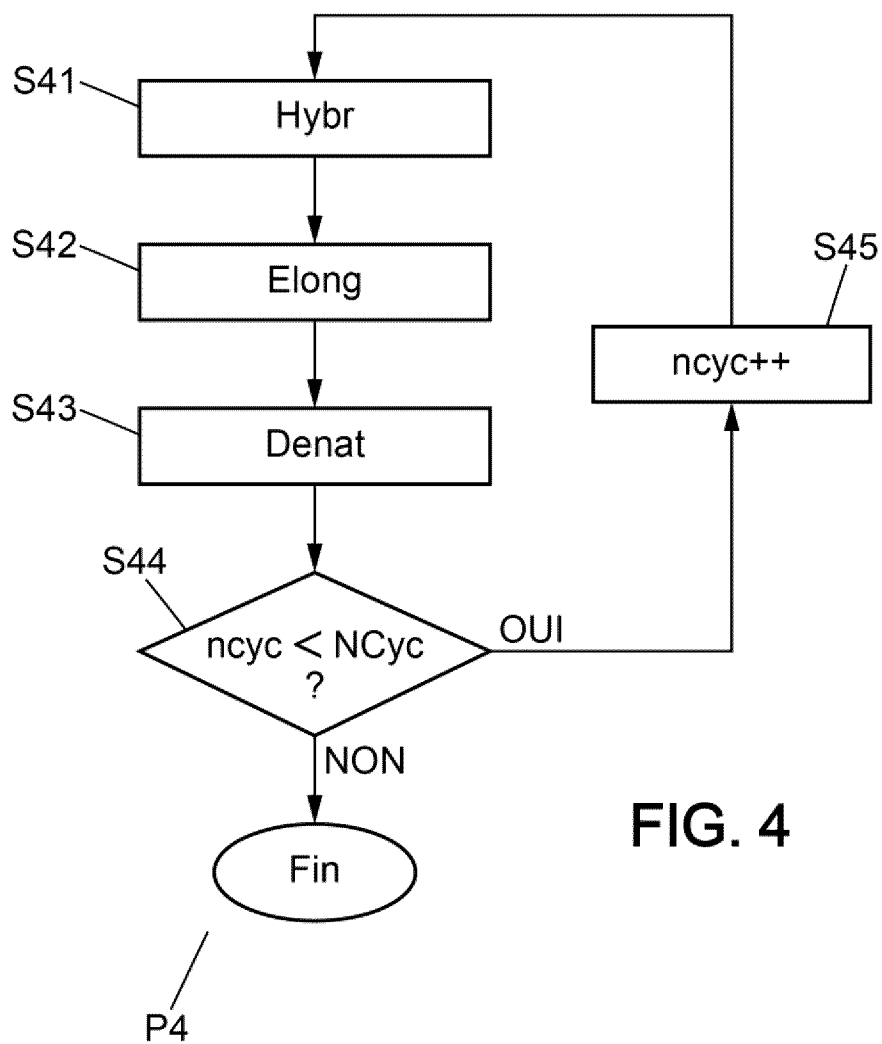


FIG. 4

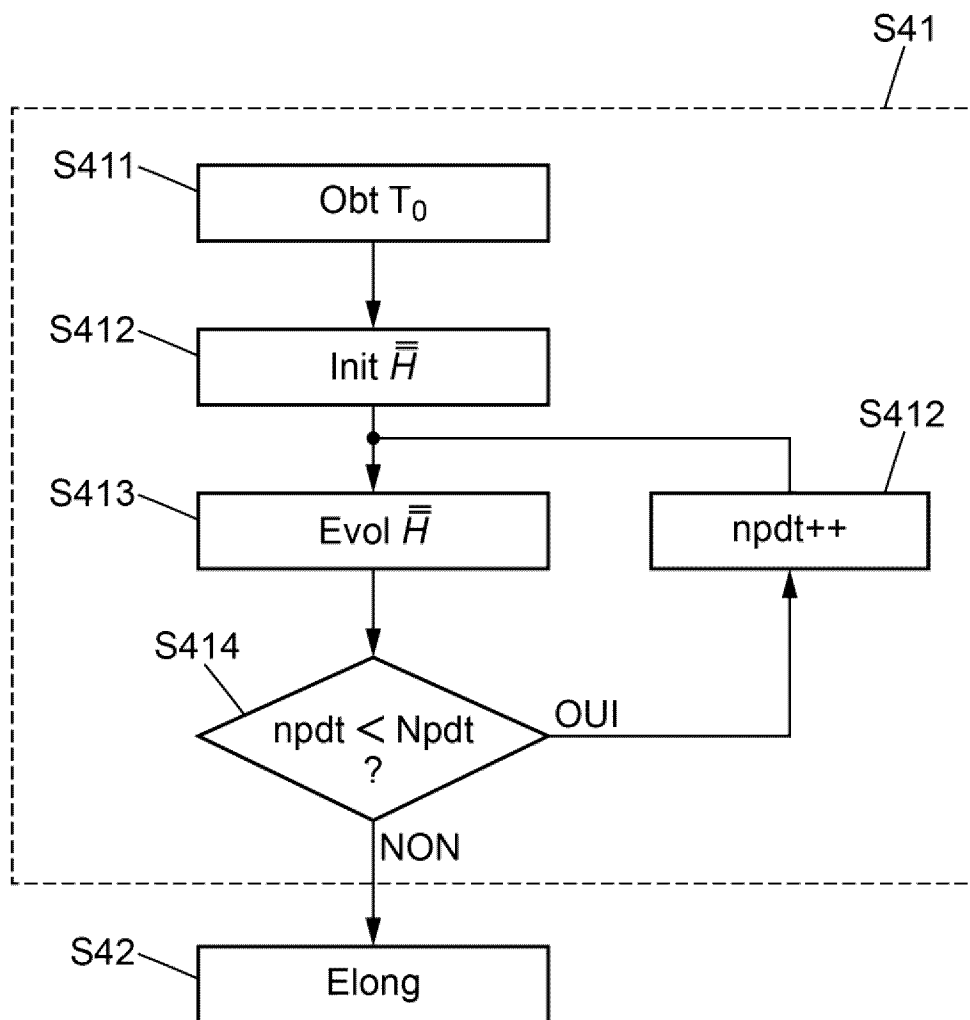


FIG. 5

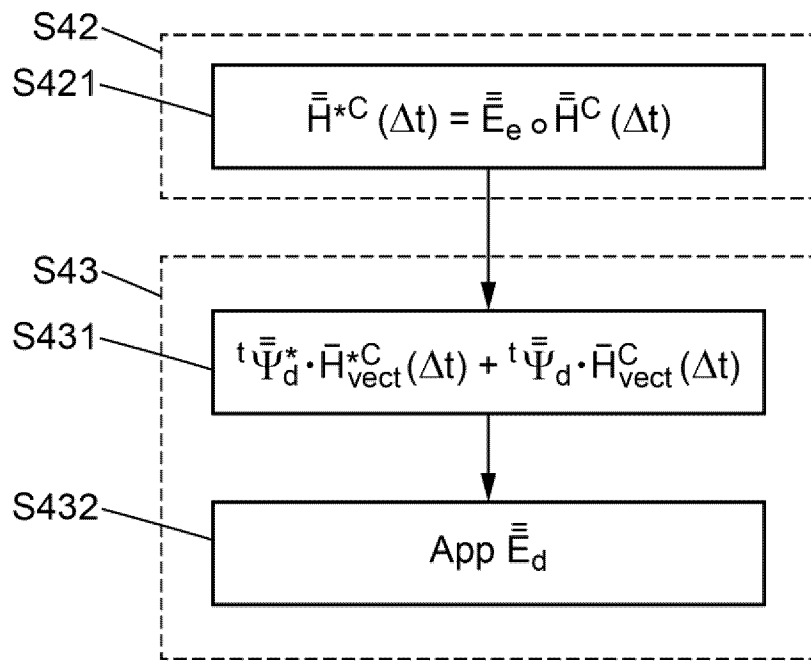
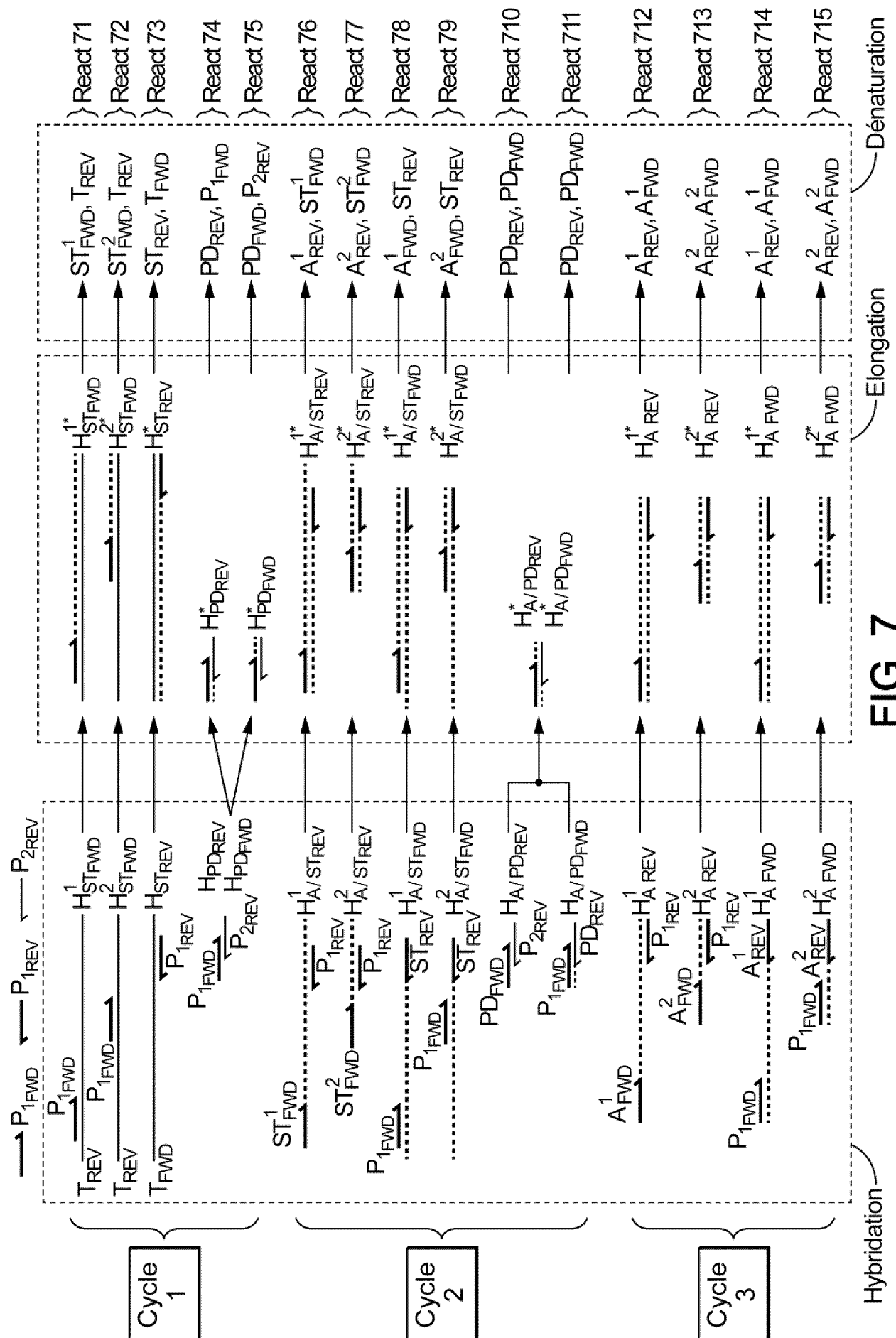


FIG. 6



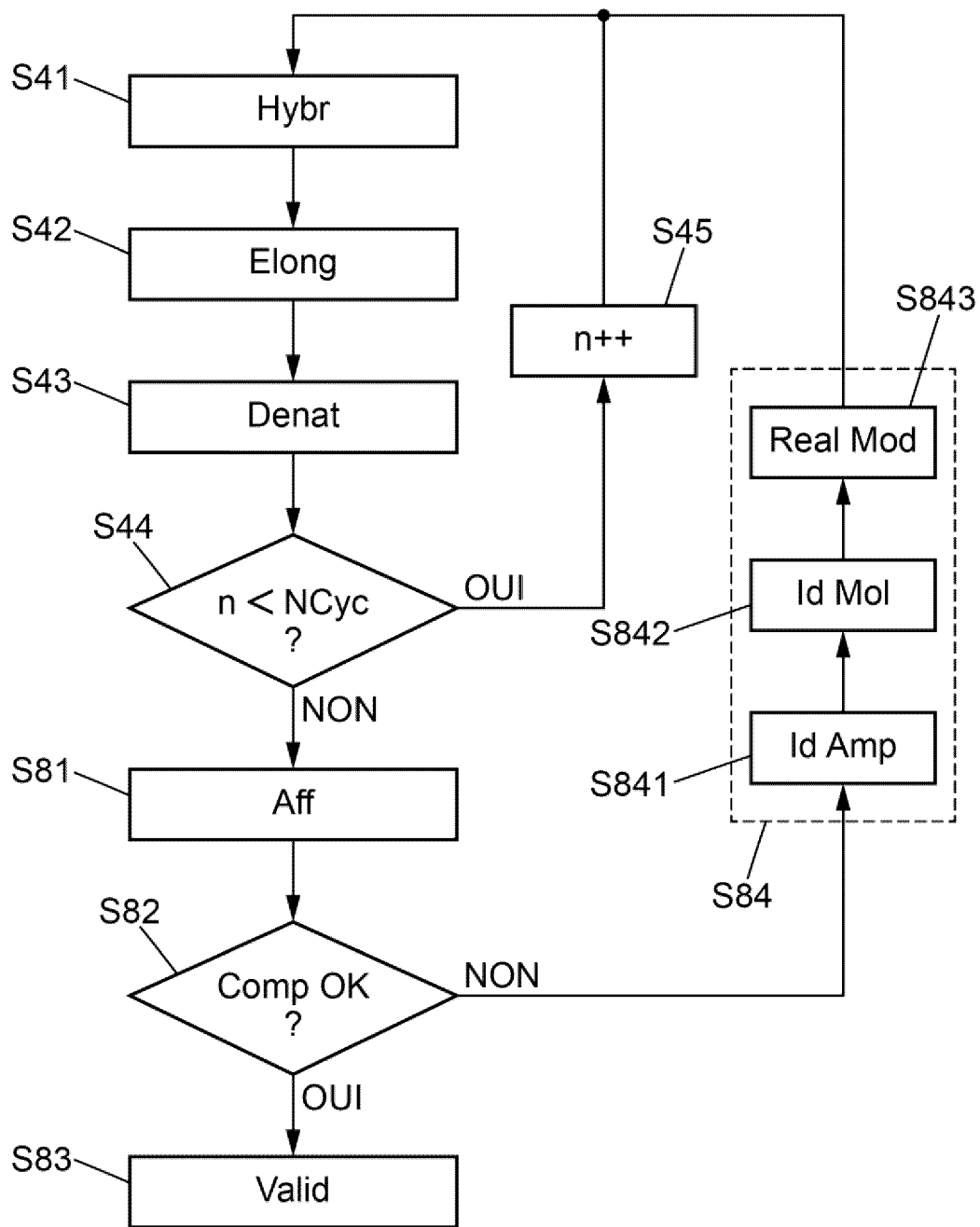


FIG. 8

P8

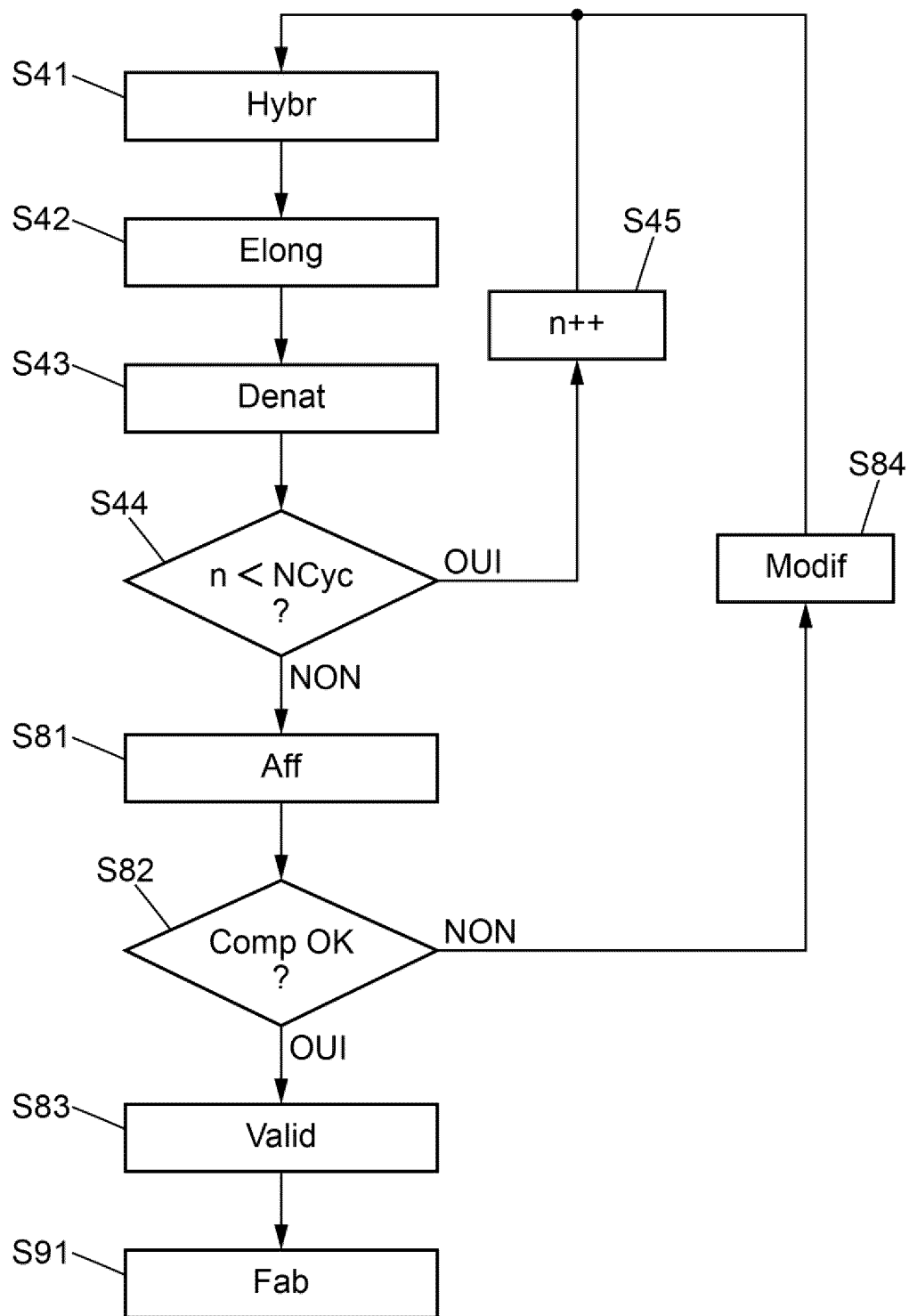


FIG. 9

P9

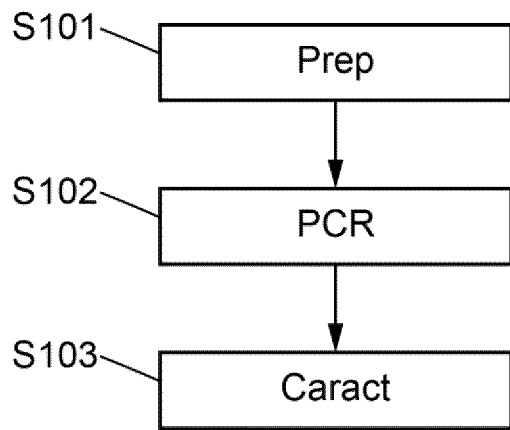


FIG. 10

P10

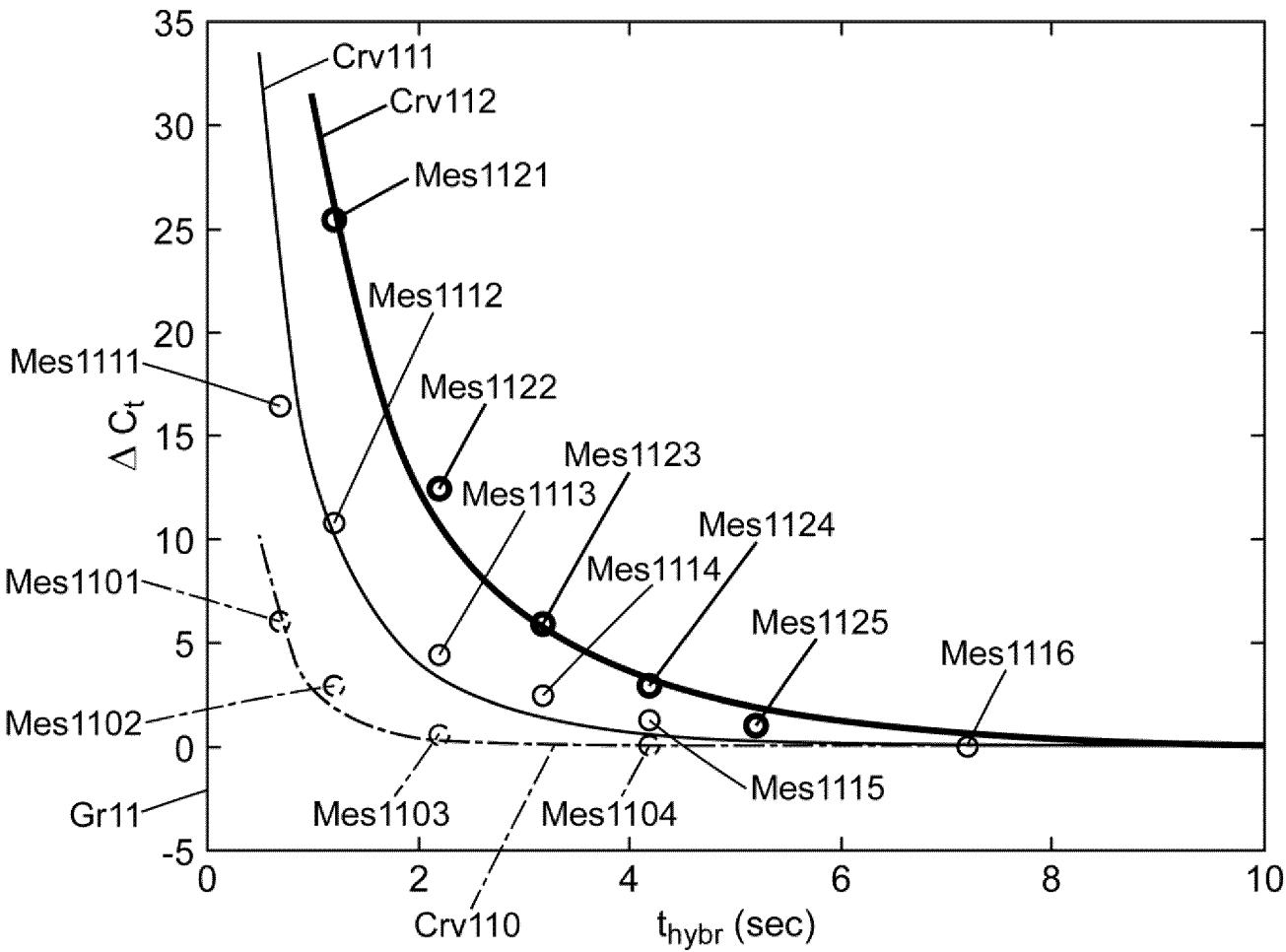


FIG. 11

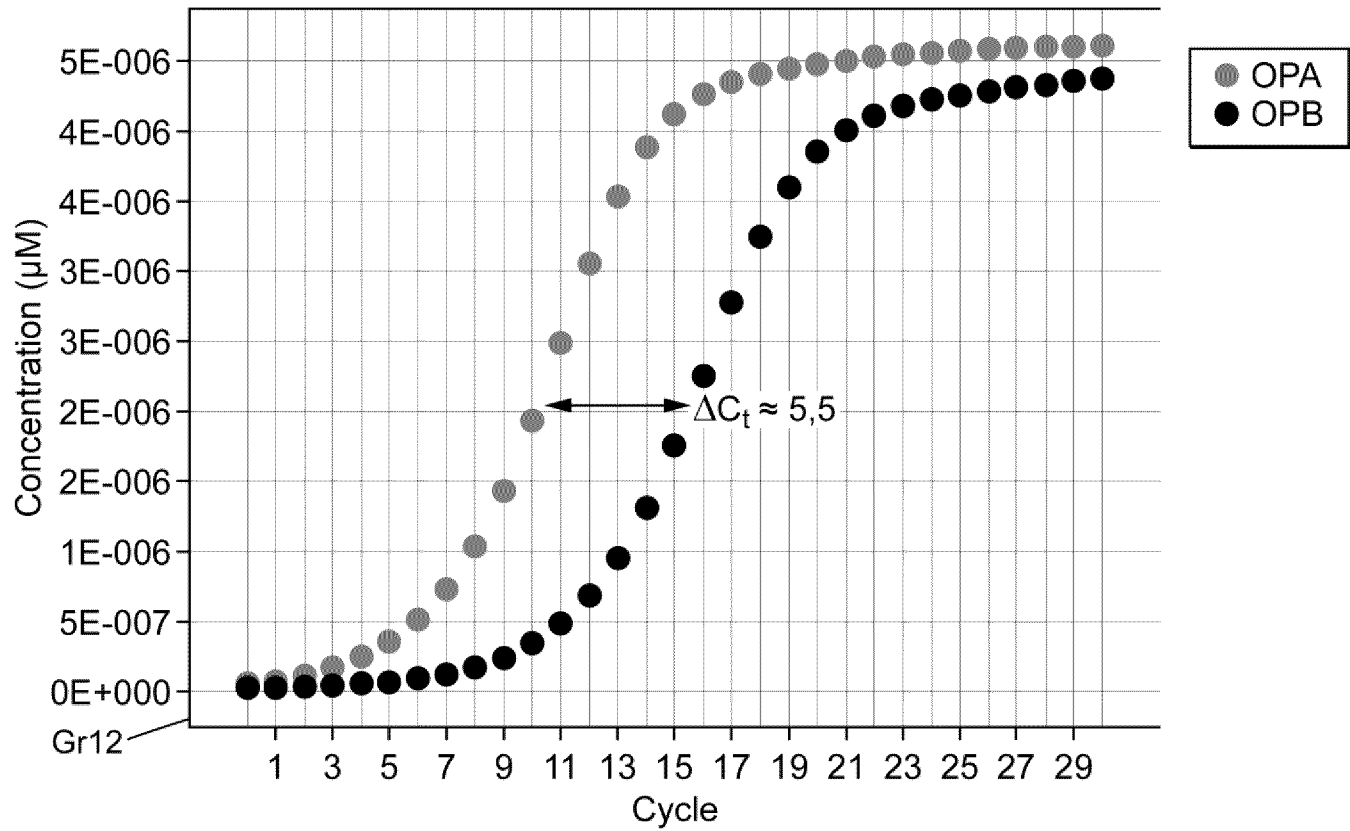


FIG. 12

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/EP2024/067690

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER <i>G16B 5/30</i> (2019.01)i; <i>G16B 25/20</i> (2019.01)i According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) G16B Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) EPO-Internal, WPI Data		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	SARIKA MEHRA ET AL. "A kinetic model of quantitative real-time polymerase chain reaction" <i>BIOTECHNOLOGY AND BIOENGINEERING</i> , Hoboken, USA, Vol. 91, No. 7, 30 September 2005 (2005-09-30), pages 848-860 DOI: 10.1002/bit.20555 ISSN: 0006-3592, XP055248998	1-3,5-15
A	abstract page 2, column 2, paragraph 4 - page 3, column 2; table 1 page 5, column 2, paragraph 3	4
X	CN 104662160 A (UNIV UTAH RES FOUND) 27 May 2015 (2015-05-27) abstract; claim 32	10,13
☒ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☒ See patent family annex.		
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 05 August 2024		Date of mailing of the international search report 16 August 2024
Name and mailing address of the ISA/EP European Patent Office p.b. 5818, Patentlaan 2, 2280 HV Rijswijk Netherlands (Kingdom of the) Telephone No. (+31-70)340-2040 Facsimile No. (+31-70)340-3016		Authorized officer Schmitt, Constanze Telephone No.

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	BOGDAN IULIA ET AL. "The Assessment of Multiplex PCR in Identifying Bacterial Infections in Patients Hospitalized with SARS-CoV-2 Infection: A Systematic Review" , Vol. 12, No. 3, 24 February 2023 (2023-02-24), page 465, ANTIBIOTICS (BASEL, SWITZERLAND) 2015, Retrieved from the Internet: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC10044563/pdf/antibiotics-12-00465.pdf DOI: 10.3390/antibiotics12030465 ISSN: 2079-6382, XP093136158 abstract page 7, paragraph 2 - page 8, paragraph 2	1-15

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/EP2024/067690

Patent document cited in search report			Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)			Publication date (day/month/year)
CN	104662160	A	27 May 2015	AU	2013266246	A1	18 December 2014
				CA	2873991	A1	28 November 2013
				CN	104662160	A	27 May 2015
				CN	108251271	A	06 July 2018
				DK	2855692	T3	14 October 2019
				DK	3539666	T3	13 September 2021
				EP	2855692	A2	08 April 2015
				EP	3539666	A1	18 September 2019
				EP	3957748	A1	23 February 2022
				ES	2749700	T3	23 March 2020
				ES	2889348	T3	12 January 2022
				JP	6316802	B2	25 April 2018
				JP	6731012	B2	29 July 2020
				JP	7032818	B2	09 March 2022
				JP	2015520614	A	23 July 2015
				JP	2018117632	A	02 August 2018
				JP	2020115878	A	06 August 2020
				PL	3539666	T3	31 January 2022
				PT	2855692	T	25 October 2019
				PT	3539666	T	23 September 2021
				SG	10201800645W	A	27 February 2018
				SG	10201810110R	A	28 December 2018
				SG	11201407427W	A	30 December 2014
				US	2015118715	A1	30 April 2015
				US	2018179581	A1	28 June 2018
				US	2019055591	A1	21 February 2019
				US	2021254132	A1	19 August 2021
				US	2024068021	A1	29 February 2024
				WO	2013177429	A2	28 November 2013

A. CLASSEMENT DE L'OBJET DE LA DEMANDE INV. G16B5/30 G16B25/20 ADD.		
Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB		
B. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTE		
Documentation minimale consultée (système de classification suivi des symboles de classement) G16B		
Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure où ces documents relèvent des domaines sur lesquels a porté la recherche		
Base de données électronique consultée au cours de la recherche internationale (nom de la base de données, et si cela est réalisable, termes de recherche utilisés) EPO-Internal, WPI Data		
C. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		
Catégorie*	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
X	SARIKA MEHRA ET AL: "A kinetic model of quantitative real-time polymerase chain reaction", BIOTECHNOLOGY AND BIOENGINEERING, vol. 91, no. 7, 30 septembre 2005 (2005-09-30), pages 848-860, XP055248998, Hoboken, USA ISSN: 0006-3592, DOI: 10.1002/bit.20555	1-3,5-15
A	abrégé page 2, colonne 2, alinéa 4 - page 3, colonne 2; tableau 1 page 5, colonne 2, alinéa 3 -----	4
X	CN 104 662 160 A (UNIV UTAH RES FOUND) 27 mai 2015 (2015-05-27) abrégé; revendication 32 ----- - / - -	10,13
☒ Voir la suite du cadre C pour la fin de la liste des documents ☒ Les documents de familles de brevets sont indiqués en annexe		
* Catégories spéciales de documents cités: "A" document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent "E" document antérieur, mais publié à la date de dépôt international ou après cette date "L" document pouvant jeter un doute sur une revendication de priorité ou cité pour déterminer la date de publication d'une autre citation ou pour une raison spéciale (telle qu'indiquée) "O" document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou tous autres moyens "P" document publié avant la date de dépôt international, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée "T" document ultérieur publié après la date de dépôt international ou la date de priorité et n'appartenant pas à l'état de la technique pertinent, mais cité pour comprendre le principe ou la théorie constituant la base de l'invention "X" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive par rapport au document considéré isolément "Y" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive lorsque le document est associé à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne du métier "&" document qui fait partie de la même famille de brevets		
Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée 5 août 2024		Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale 16/08/2024
Nom et adresse postale de l'administration chargée de la recherche internationale Office Européen des Brevets, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Fax: (+31-70) 340-3016		Fonctionnaire autorisé Schmitt, Constanze

C(suite). DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		
Catégorie*	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
A	BOGDAN IULIA ET AL: "The Assessment of Multiplex PCR in Identifying Bacterial Infections in Patients Hospitalized with SARS-CoV-2 Infection: A Systematic Review", ANTIBIOTICS (BASEL, SWITZERLAND) 2015 , vol. 12, no. 3 24 février 2023 (2023-02-24), page 465, XP093136158, ISSN: 2079-6382, DOI: 10.3390/antibiotics12030465 Extrait de l'Internet: URL:https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC10044563/pdf/antibiotics-12-00465.pdf df abrégé page 7, alinéa 2 - page 8, alinéa 2 -----	1 - 15

Renseignements relatifs aux membres de familles de brevets

PCT/EP2024/067690

Formulaire PCT/ISA/210 (annexe familles de brevets) (avril 2005)