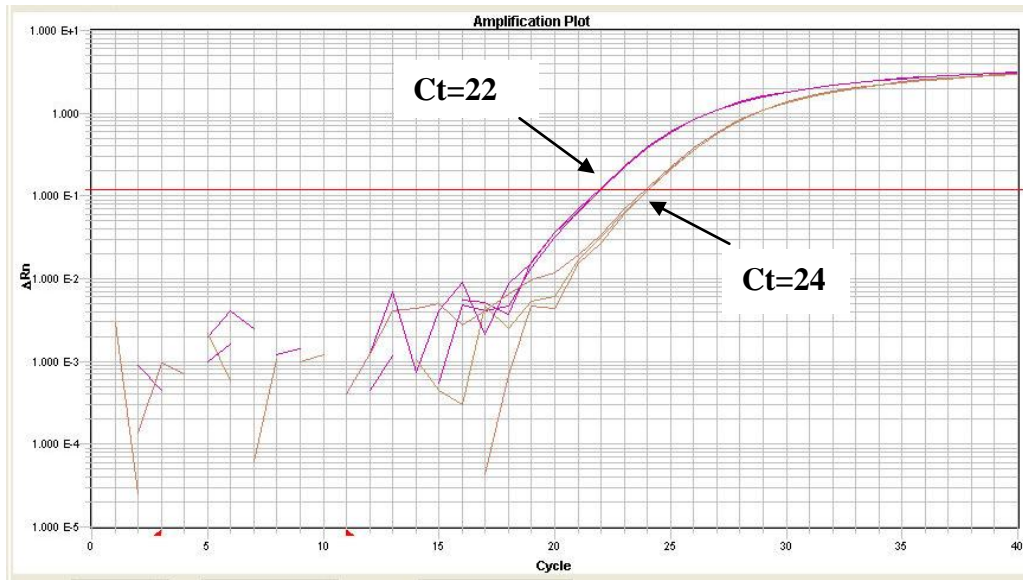


Comprendre des résultats de qPCR



Qu'est-ce que le qPCR mesure?

Si vous mesurez l'expression d'un gène, le qPCR vous dira combien il y a d'un ARNm spécifique dans vos échantillons. Vous amplifiez une région de l'ARNm avec des oligos seulement (si vous êtes en SYBR), ou avec des oligos et une sonde fluorescente (si vous êtes en Taqman). La machine qPCR mesure l'intensité de fluorescence émise à chaque cycle PCR. Pendant les premiers cycles, il n'y a pas assez de fluorescence pour être détectée, mais rapidement la réaction produit de plus en plus d'amplicons et la courbe démarre. Une courbe PCR a typiquement une phase exponentielle suivie d'une phase plateau.

La mesure de **Ct** est un cycle PCR donné et représente toute l'expérience. Elle est prise dans la phase exponentielle, là où la pente est linéaire. On place le **seuil** (ligne rouge) dans cette phase, et le Ct se mesure là où la courbe PCR **croise** le seuil. Le seuil est différent pour chaque essai qPCR (chaque gène testé), et il est le même pour tous les échantillons testés avec ce gène spécifique.

Le principe du qPCR est basé sur le fait qu'à chaque cycle PCR le nombre de produits PCR double. Donc, s'il y a une différence de 2 cycles entre deux réactions (voir image), on peut dire qu'il y a 4 fois plus de copies dans la réaction rose que dans la réaction orange.

La plupart du temps, une expérience de qPCR exprime une « expression relative », c'est-à-dire une variation de l'expression d'un gène entre deux échantillons. Il est aussi possible de déterminer une quantification absolue (nombre de copies) d'un gène, mais cette technique requiert un standard : typiquement le clonage du cDNA du gène dans un vecteur.

Définitions des termes retrouvés dans le fichier excel de résultats

Contrôle endogène

Le contrôle endogène est le gène qui ne varie pas entre les échantillons testés.
Par exemple : GAPDH, ACTB, TBP, HPRT, PPIA, YWHAZ

Calibrateur

Le calibrateur est l'échantillon auquel tous les autres sont comparés.

C'est l'échantillon « non traité » ou « temps zéro ». Le RQ du calibrateur donne 1 car il ne varie pas par rapport à lui-même.

Ct = Cycle Threshold

Valeur à laquelle la courbe PCR croise le seuil. Un qPCR comporte environ 40 cycles. Plus le Ct est élevé (30-35), moins l'ARNm détecté est présent, car il faut plus de cycles PCR pour pouvoir détecter l'amplification fluorescente. Si le Ct a une petite valeur (10-15), le gène est fortement exprimé. Les contrôles endogènes ont souvent un Ct plus petit que les autres gènes.

Delta Ct = Ct_{gène} - Ct_{contrôle endogène}

Delta Delta Ct = $\Delta Ct_{\text{échantillon1}} - \Delta Ct_{\text{calibrateur}}$

Delta Ct SD = Standard Deviation

Écart type calculé par le logiciel. Cette erreur reflète la qualité du triplicata technique pour le gène test et pour le gène endogène pour un même échantillon. Pour que la valeur soit considérée comme valide, la SD doit se situer sous 0.25. Si la SD est au-dessus de 0.25, la valeur du RQ est alors considérée comme moins fiable.

RQ = Relative quantification = $2^{-\Delta\Delta Ct}$

Il s'agit de votre *Fold change*. Le calibrateur est fixé à une valeur de 1. Les autres échantillons ont une valeur par rapport à ce calibrateur.

Une valeur de 10 signifie que l'expression de ce gène est de 10X plus que le calibrateur. Une valeur de 0,1 signifie que l'expression est de 10X moins que le calibrateur.

Nous considérons un résultat comme significatif lorsque le fold-change est de minimum deux, c'est-à-dire un RQ de plus de 2 ou moins de 0,5. Cet intervalle constitue la variation de la technique. C'est possible d'obtenir un RQ de 0.8 une journée et de 1.3 le lendemain. Si vous voulez observer un petit fold-change (1.5-2 fold), il vous faudra des échantillons parfaitement propres, des répliquats biologiques, peut-être utiliser 2 essais pour le même gène, et utiliser des contrôles positifs avec un fold-change connu.

RQmin and RQmax = valeurs de RQ possibles définies par l'écart-type des deltaCts. Intervalle de confiance placé à 95%. Si vous voulez obtenir une vraie erreur biologique sur la valeur du RQ, vous aurez besoin d'un triplicata biologique. Ensuite, vous pouvez faire une moyenne des RQs ou des deltaCts des triplicatas, et faire un test statistique (test Student). Si vous utilisez le 7900HT, le logiciel DataAssist peut le faire pour vous (www.appliedbiosystems.com).

Qualité générale des résultats

Lorsque vous analysez vos résultats, regardez les courbes d'amplification, elles doivent être belles et parallèles. Les répliquats techniques doivent être à l'intérieur de 0.5 cycles. Les Cts doivent être <35. Si vous voyez qu'une courbe est bizarre, enlevez-la de l'analyse. Si les courbes sortent après 35, ne les utilisez pas, ou soyez très prudent et assurez-vous que les répliquats sont beaux.

Si vous n'avez pas accès aux courbes d'amplification, utilisez le Ct SD ou le DeltaCt SD. Cette erreur vous dira si les répliquats sont beaux. DeltaCt SD < 0.25 est bon. Cette erreur ne peut pas valider la valeur biologique de vos résultats, elle valide la méthode de mesure. Afin d'obtenir des résultats valables statistiquement, il vous faut des répliquats biologiques.

Si tous vos gènes sortent très tard (spécialement les contrôles endogènes), et que l'ensemble des résultats est bizarre : vérifiez votre ARN. C'est la cause la plus commune de mauvais résultats. Vérifiez que votre ARN n'est pas dégradé (sur gel ou sur bioanalyseur) et vérifiez qu'il n'est pas contaminé (ratios 260/280 et 260/230).

Analyse avec plusieurs contrôles endogènes

Utiliser 2 contrôles endogènes ou plus est fortement recommandé, et améliorera la précision de vos résultats. Simplement testez plusieurs contrôles et sélectionnez les gènes qui varient le moins entre vos échantillons (le logiciel Genorm peut être utilisé pour cette sélection). Si vous utilisez le Via7, télécharger le logiciel Expression Suite (www.appliedbiosystems.com), et importer le fichier eds. Ce logiciel peut aussi faire une analyse avec vos répliquats biologiques. Si vous utilisez le Lightcycler 480, l'analyse avec de multiples contrôles endogènes est possible directement avec le logiciel de base.