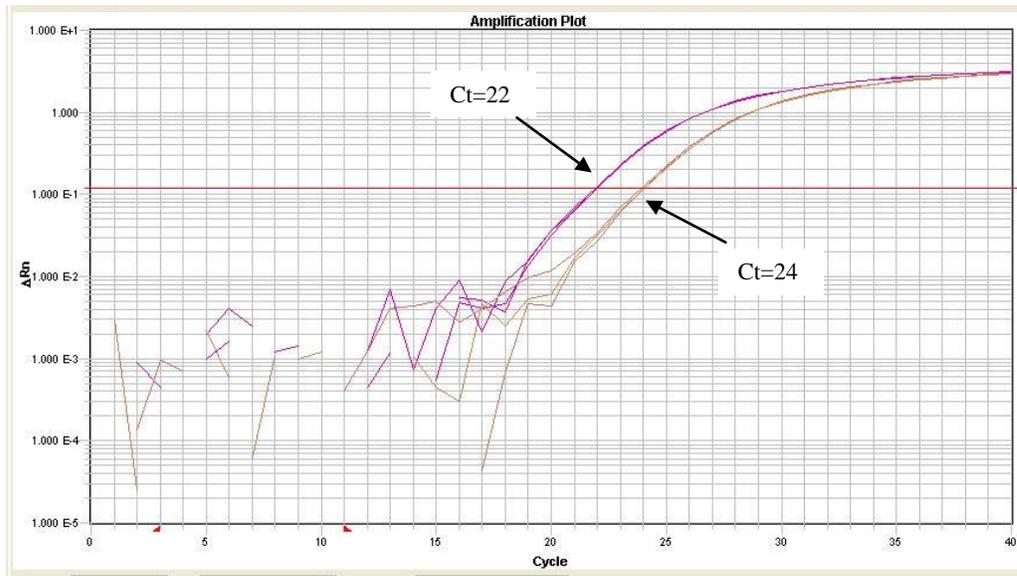


Quoi faire avec des résultats de qPCR



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 et une sonde fluorescente. 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 doit être 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.

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.

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.

$$\text{Delta Ct} = \text{Ct}_{\text{gène}} - \text{Ct}_{\text{contrôle endogène}}$$

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

Delta Ct SD = Standard Deviation

Écart type calculé par le logiciel. Cette erreur reflète la qualité des triplicatas 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 = $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$

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, probablement faire des quadruplicata, penser à utiliser 2 essais pour le même gène, et utiliser des contrôle positif avec des fold-change connus.

RQmin and RQmax = valeurs de RQ possible 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 de triplicata biologique. Ensuite, vous pouvez faire une moyenne des RQ ou des deltaCts des triplicatas. 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, regarder 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 croyez 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 (à l'intérieur de 0.5 cycles). Un 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 sont bizarres : 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

La plupart du temps, un seul contrôle endogène est utilisé. Mais utiliser 2 ou 3 contrôles endogènes est de plus en plus recommandé, et améliorera la précision de vos résultats. Simplement testez plusieurs contrôles et sélectionnez les gènes qui varient le moins entre les échantillons (le logiciel Genorm peut être utilisé pour cette sélection). Si vous utilisez le Lightcycler 480, l'analyse avec de multiples contrôles endogènes est possible directement avec le logiciel de base. Si vous utilisez le 7900HT, télécharger le logiciel DataAssist (www.appliedbiosystems.com), et importer une analyse « Individual Cts ». Ce logiciel peut aussi faire une analyse avec vos répliquats biologiques et faire un T test entre les groupes.

Article intéressant sur les méthodes à suivre en qPCR lorsqu'on veut publier les résultats.

The MIQE guidelines

The MIQE guidelines: minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments. Bustin SA, Benes V, Garson JA, Hellemans J, Huggett J, Kubista M, Mueller R, Nolan T, Pfaffl MW, Shipley GL, Vandesompele J, Wittwer CT. Clin Chem. 2009 Apr;55(4):611-22. Epub 2009 Feb 26

Pour faire l'analyse soi-même (7900HT) Comment utiliser le logiciel SDS 2.2.2

Procurez-vous le logiciel SDS 2.2.2 disponible pour le téléchargement dans votre compte sur notre site web (www.genomique.irc.ca). Lorsque nous analysons une plaque avec l'appareil 7900HT, le logiciel SDS 2.2.2 crée un fichier .sds avec les données brutes.

1. Ouvrir d'abord ce fichier et cliquer en haut sur la flèche verte (analyse de la plaque par le logiciel).
2. Dans l'onglet Setup, vérifier si les noms d'échantillons et les noms de gènes sont corrects. Vérifier si les contrôles endogènes sont bien identifiés dans la case « Task ». Fermer le fichier.
3. Ouvrir un nouveau fichier : Relative Quantification (delta delta Ct) Study
4. En bas à droite, cliquer sur le bouton *Add Plate* et sélectionner le ou les fichier(s) .sds correspondant(s).
5. Cliquer sur la flèche verte.
6. Cliquer sur l'onglet *Results* en haut à droite pour visualiser les résultats.
7. Décliquer l'icône graphique histogramme en haut de la fenêtre pour voir seulement les courbes PCR.
8. Pour visualiser un gène, sélectionner les puits correspondants, puis sélectionner le gène dans le menu déroulant *Detector* vers le bas de l'onglet *Results*.
9. Placer le *Baseline* en déplaçant la petite flèche rouge de droite en bas du graphique. Le *Baseline* correspond au bruit de fond de l'essai et doit se terminer juste avant que la première courbe commence.
10. Déplacer le Seuil (ligne rouge) dans la section linéaire des courbes. Note : Le Baseline et le Seuil sont spécifiques à chaque gène. Il est important de vérifier qu'un seul gène est sélectionné dans le menu Detector lorsqu'on fait des modifications.
11. Vérifier vos triplicata. Si vous voulez enlever un triplicata, sélectionner le puits, revenez à l'onglet *Setup* et cliquer dans la case *Omit Well*. Cette valeur ne sera pas considérée lors de l'analyse. Note : si vous avez plusieurs plaques dans votre Study, faites attention quand vous faites des modifications car les sélections de puits sur différentes plaques se superposent.
12. Après avoir fait une modification à l'analyse, toujours cliquer sur la flèche verte.
13. Cliquer maintenant sur la petite flèche verte à droite de l'autre, ce sont les paramètres d'analyse. Sélectionner votre contrôle endogène et votre échantillon calibrateur. Mettre l'intervalle de confiance à 95%. Si vous voulez avoir les valeurs individuelles des Ct, cocher la case *Individual Δ Cts*.
14. Dans le menu Fichier, sélectionner Export. Un fichier .txt sera produit.

15. Ouvrir le fichier exporté avec excel.