

De l'histoire naturelle de la QPCR à ses développements actuels



Jean-José Maoret



Frédéric Martins

[Contact : GeT-TQ@genotoul.fr](mailto:GeT-TQ@genotoul.fr)

Plan de la présentation.

- **1- Introduction**
- **2- Projet de QPCR : quelles étapes? Comment les valider?**
- **3- Retro Transcription**
- **4- PCR**
 - Rappel du principe
 - PCR versus QPCR
- **5- QPCR**
 - Choix de la chimie
 - Choix des réactifs
 - Multiplexage
 - Fast / Non Fast
 - Efficacité
 - Quantification relative
- **5- QPCR à Haut Débit**
- **6- Outils d'analyse disponibles sur le plateau**

La QPCR : Une Histoire qui n'en finit pas...

1970 : Co-découverte de l'ADN polymérase ARN dépendante par Temin HM et Baltimore D (prix Nobel de physiologie ou médecine en 1975).

1986 : Première publication publique sur la PCR par Kary Mullis (prix Nobel de chimie en 1993).

1988 : Première PCR réalisée avec une ADN polymérase thermostable, provenant de *Thermus aquaticus*, par Saiki RK.

1991 : Première détection du produit de PCR par sonde (sonde d'hydrolyse) par Holland PM.

1992 : Invention de la PCR en temps réel par Higuchi R.

- **1995: premiers appareils QPCR**

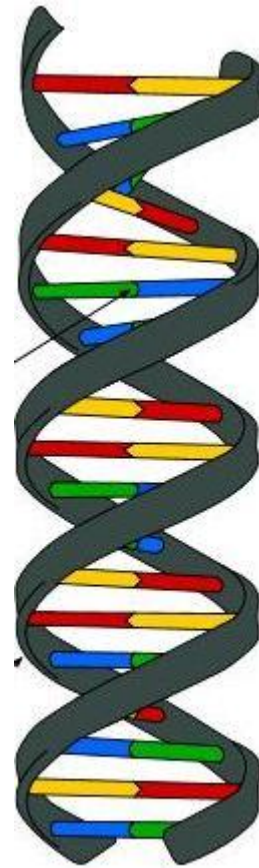
De 1 point à 96 points en deux heures.

- **2012: QPCR Haut Débit**

10000 points en 40 mn.

Le principe est inchangé et les précautions à prendre aussi!!

La QPCR est un photocopieur??



DNA

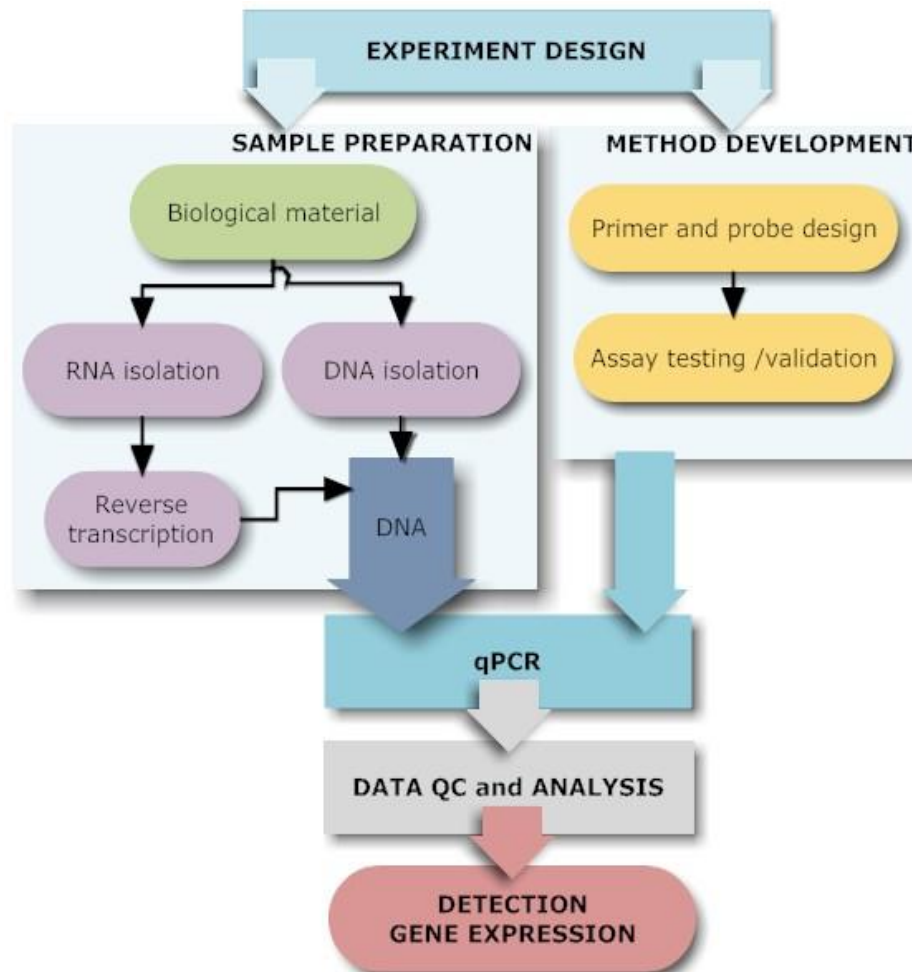


DNA



DNA

Projet de QPCR. Quelles étapes?



Projet de QPCR. Quelles étapes?

Clinical Chemistry 55:4
611–622 (2009)

Special Report

The MIQE Guidelines: Minimum Information for Publication of Quantitative Real-Time PCR Experiments

Stephen A. Bustin,^{1*} Vladimir Benes,² Jeremy A. Garson,^{3,4} Jan Hellemans,⁵ Jim Huggett,⁶
Mikael Kubista,^{7,8} Reinhold Mueller,⁹ Tania Nolan,¹⁰ Michael W. Pfaffl,¹¹ Gregory L. Shipley,¹²
Jo Vandesompele,⁵ and Carl T. Wittwer^{13,14}

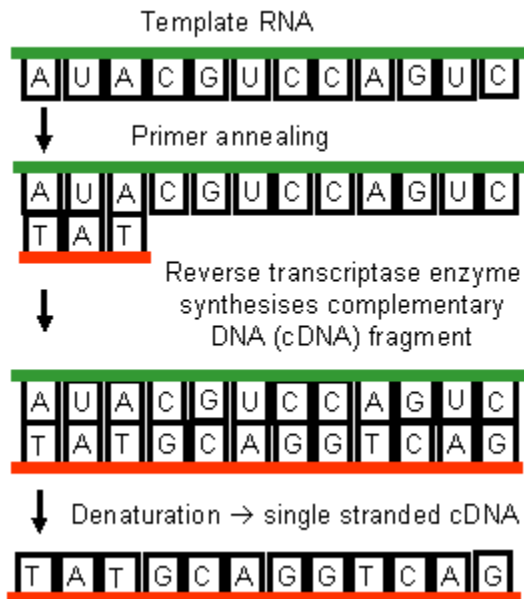
REVERSE TRANSCRIPTION

Complete reaction conditions	E
Amount of RNA and reaction volume	E
Priming oligonucleotide (if using GSP) and concentration	E
Reverse transcriptase and concentration	E
Temperature and time	E
Manufacturer of reagents and catalogue numbers	D
Cqs with and without RT	D*
Storage conditions of cDNA	D

qPCR TARGET INFORMATION

If multiplex, efficiency and LOD of each assay.	E
Sequence accession number	E
Location of amplicon	D
Amplicon length	E
<i>In silico</i> specificity screen (BLAST, etc)	E
Pseudogenes, retropseudogenes or other homologs?	D
Sequence alignment	D
Secondary structure analysis of amplicon	D
Location of each primer by exon or intron (if applicable)	E
What splice variants are targeted?	E

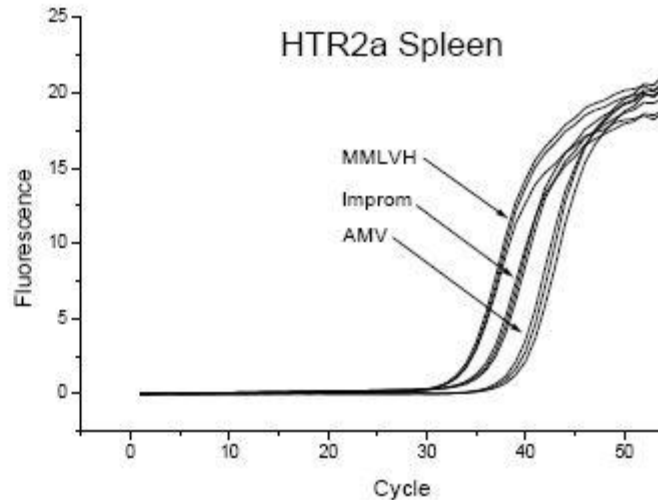
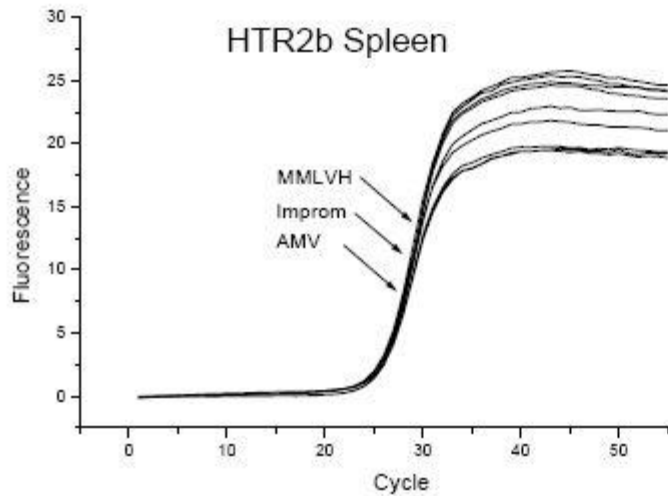
Transcription inverse.1



- Choix de l'enzyme
- Quelle quantité d'ARNs?
- Quel amorçage?
 - oligodT.
 - Hexamers.
 - Déca/Pentadecamers.
 - Oligos spécifiques des gènes d'intérêt.

Transcription inverse.2

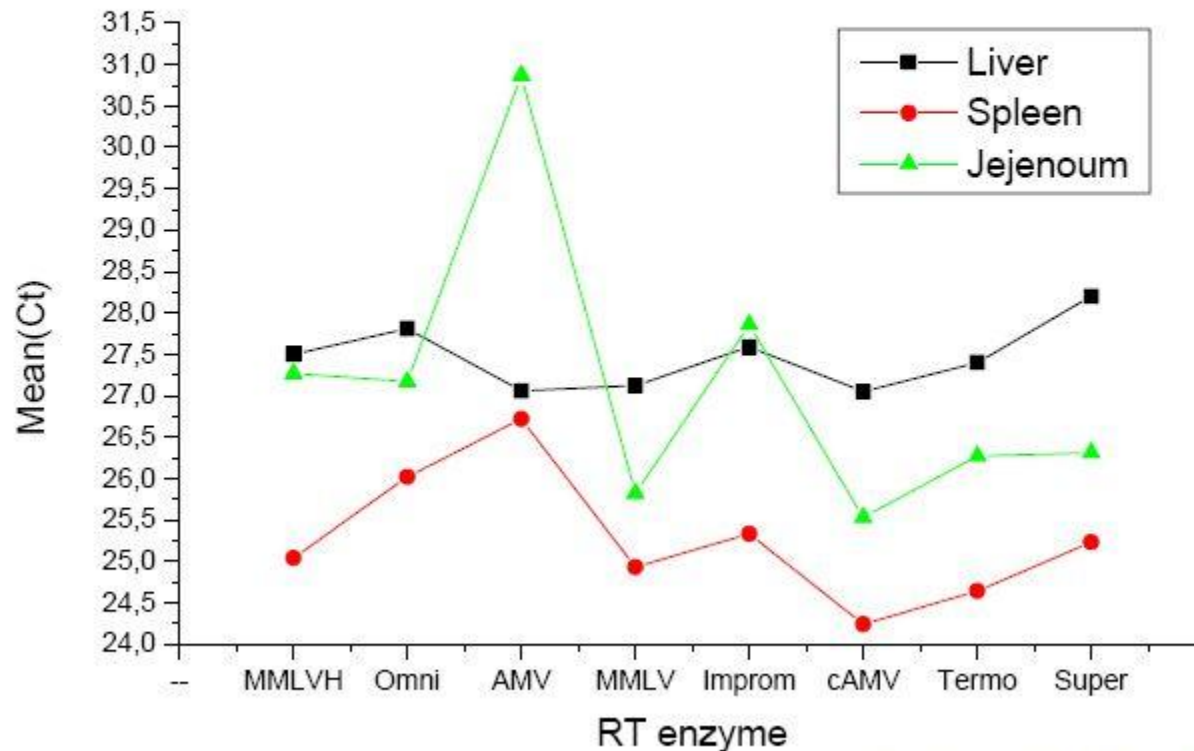
RT efficiency depends on enzyme and gene



Stahlberg et al., Clin Chem. 50(9) 2004

Transcription inverse.3

RT enzyme and "*tissue background matrix*" affect the RT efficiency



Stahlberg et al., Clin Chem. 50(9) 2004

Transcription inverse. 4

RNAs
Tampon
Enzyme
dNTPs
DTT



Amorçage

Amorces aléatoires?

- hexamères

-decamères

-pentadécamères

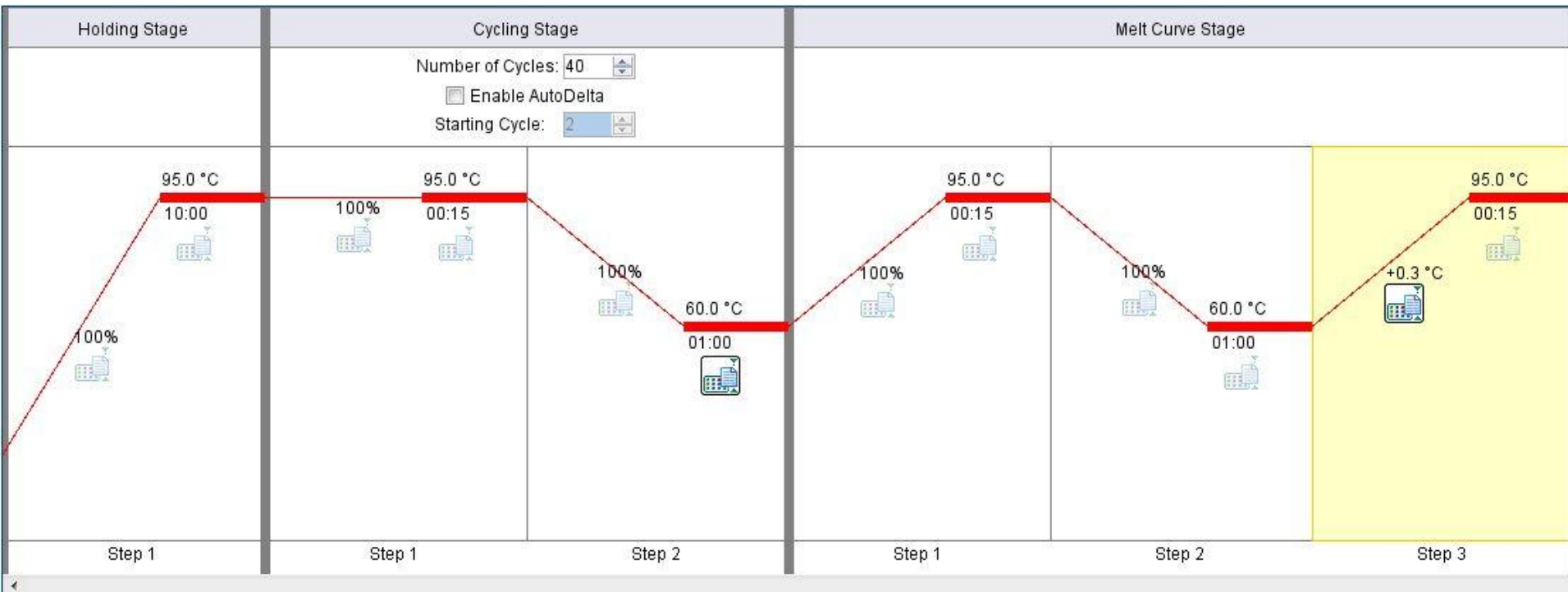
Amorce spécifique?

OligodT?

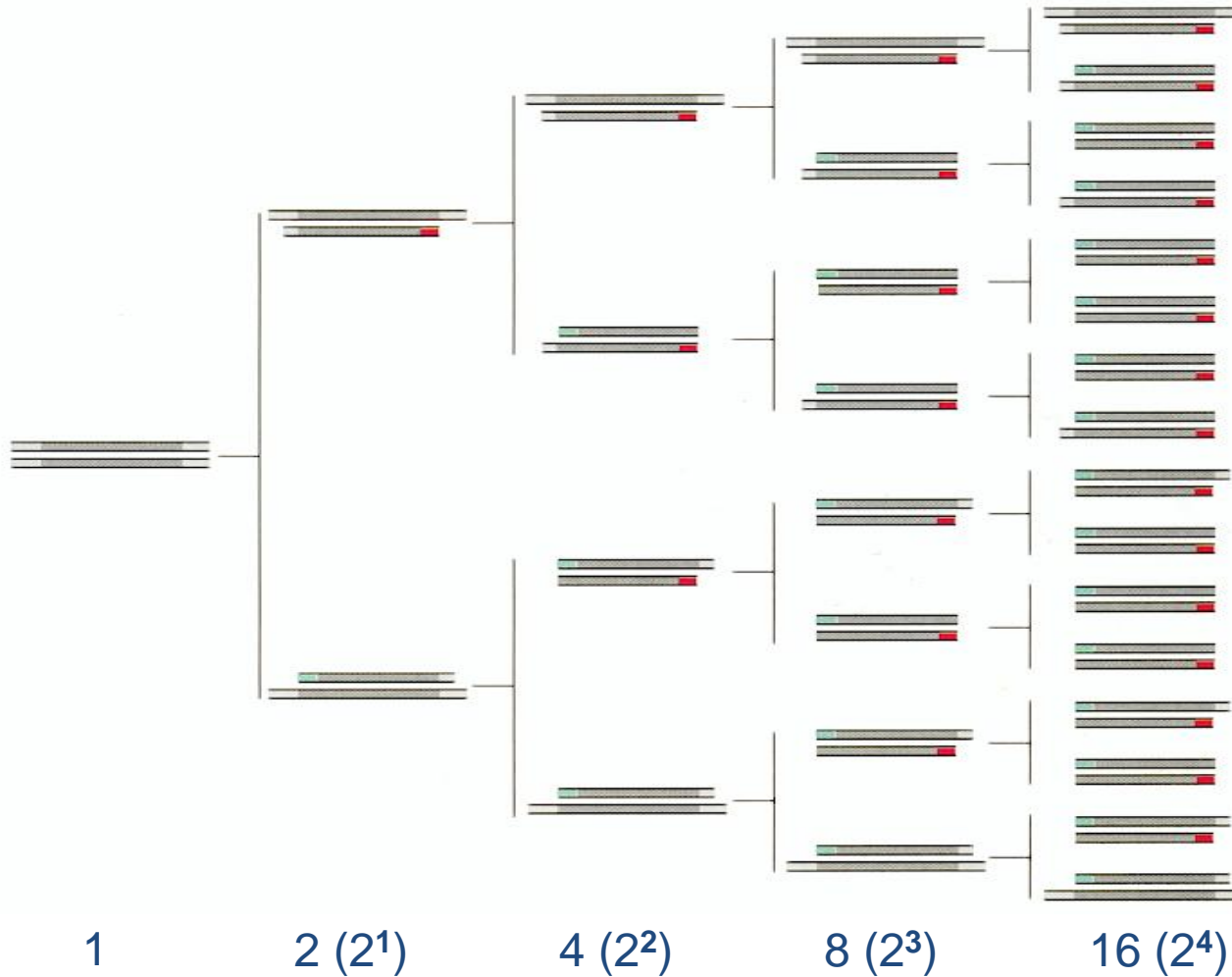
65° -----> 4°C -----> 37- 42°C

Toujours diluer les produits de RT avant de faire QPCR!!!

PCR- Rappel du principe-1



PCR- Rappel du principe-3



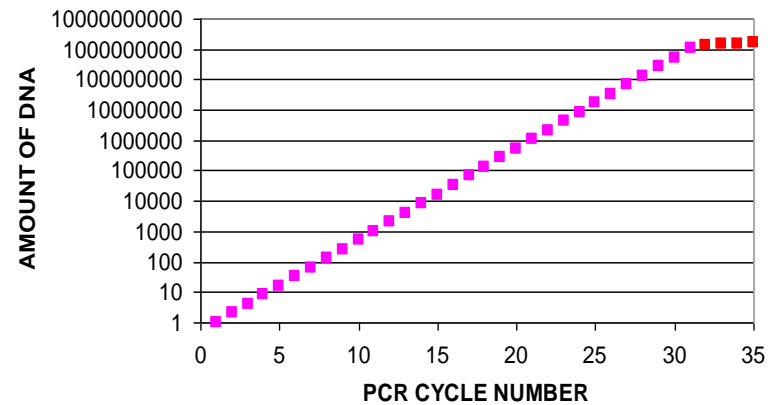
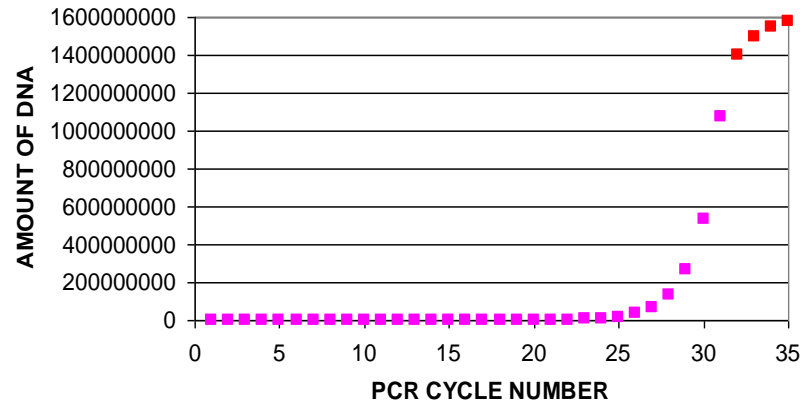
exponential
amplification

..... → 35 cycles

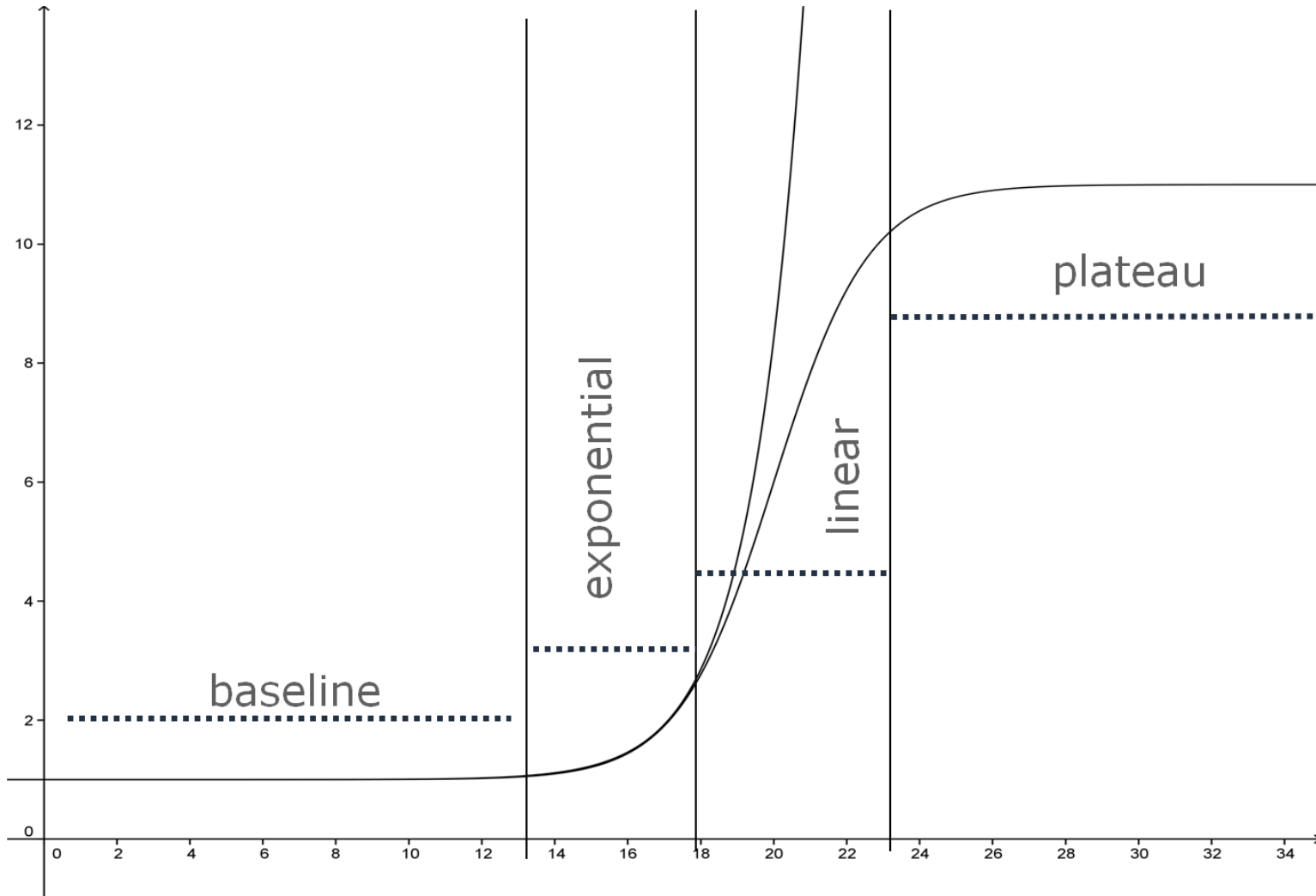
$$2^{35} = 68 \times 10^9$$

PCR- Rappel du principe-2

CYCLE NUMBER	AMOUNT OF DNA
0	1
1	2
2	4
3	8
4	16
5	32
6	64
7	128
8	256
9	512
10	1,024
11	2,048
12	4,096
13	8,192
14	16,384
15	32,768
16	65,536
17	131,072
18	262,144
19	524,288
20	1,048,576
21	2,097,152
22	4,194,304
23	8,388,608
24	16,777,216
25	33,554,432
26	67,108,864
27	134,217,728
28	268,435,456
29	536,870,912
30	1,073,741,824
31	1,400,000,000
32	1,500,000,000
33	1,550,000,000
34	1,580,000,000

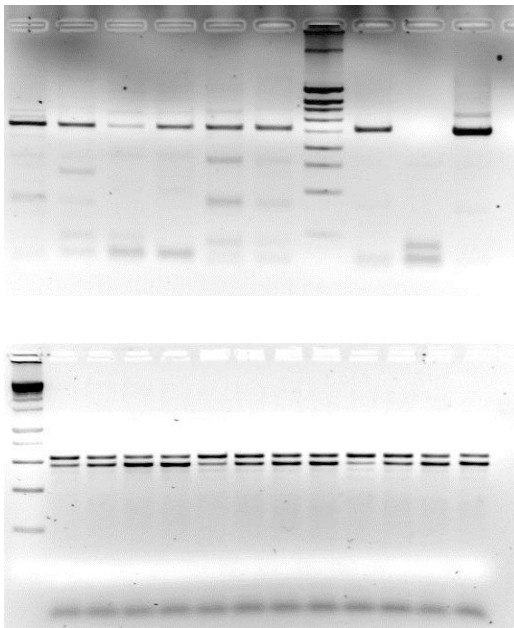


PCR- Rappel du principe-4

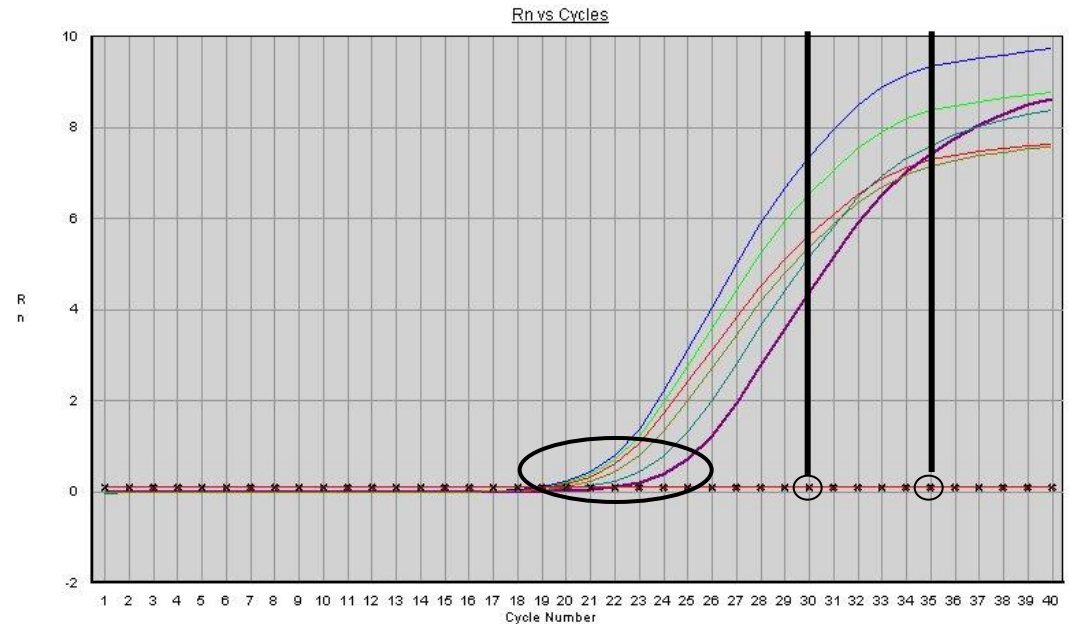


PCR versus QPCR-1

PCR point final



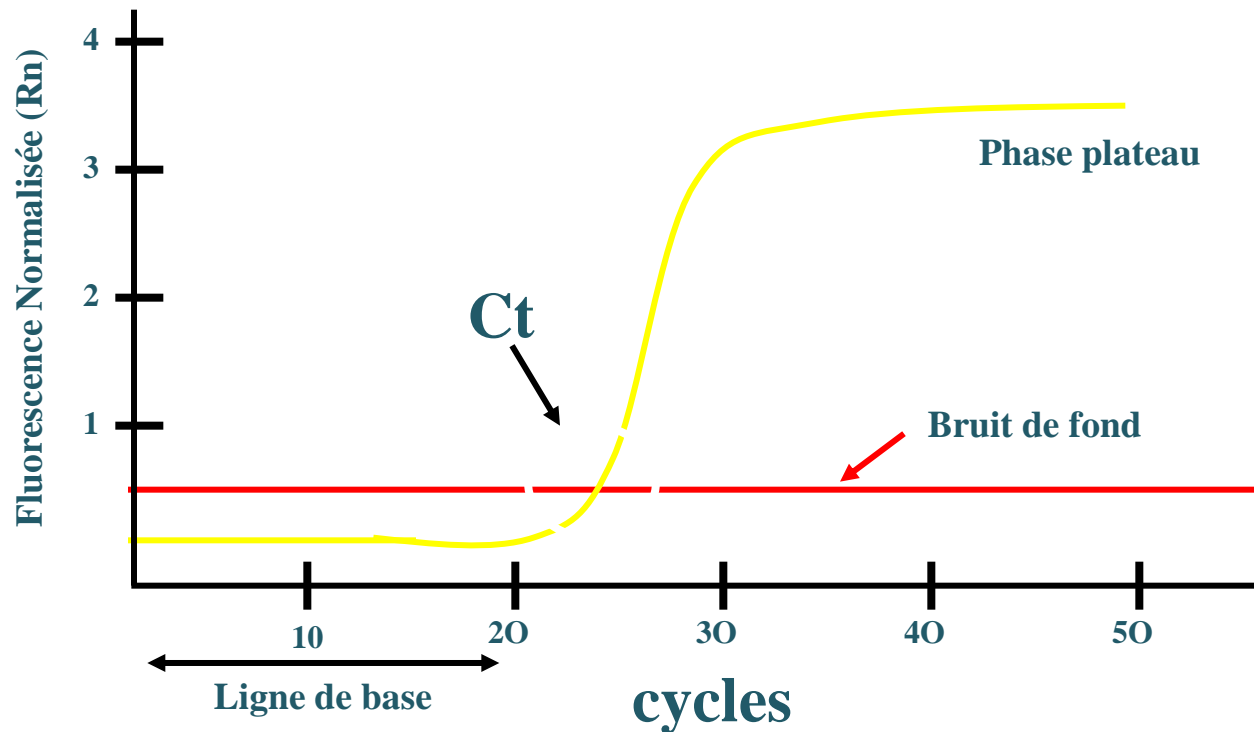
PCR temps réel



Limites: sensibilité (BET)
linéarité
quantification lourde

La PCR en temps réel est basée sur la détection
 d'un signal fluorescent généré tout au long de
 l'amplification du produit PCR.

Détermination du Ct (cycle seuil)



La valeur de Ct est déterminée dans la phase exponentielle, à l'intersection de la ligne de bruit de fond avec la courbe de fluorescence

PCR versus QPCR-3

- la technologie de la PCR en temps réel est basée sur la détection et la quantification d'un « reporter » fluorescent.
- on peut suivre la quantité de fluorescence émise à chaque cycle.
- l'augmentation du signal fluorescent est directement proportionnelle à la quantité d'amplicons générés.
- la quantité d'amplicons est directement proportionnelle à la quantité initiale de la matrice.

QPCR : mise en place-1

Choix de la chimie utilisée pour quantifier:

- Sondes Taqman
- Oligos , Sybr Green, EvaGreen
- Autres

Choix des réactifs.

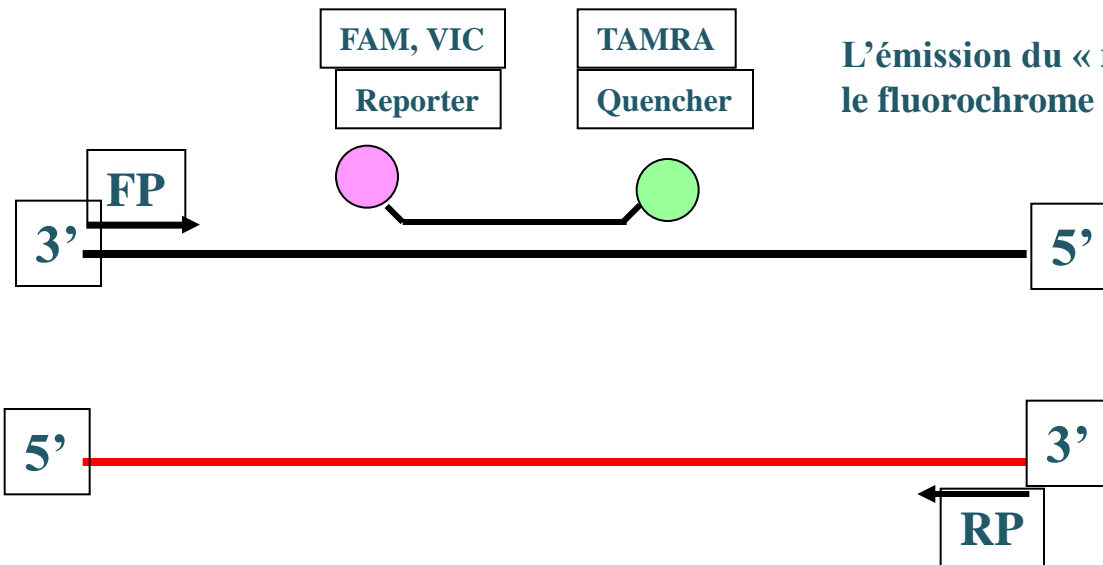
- Masters Mix spécifiques
- Fast versus non Fast

QPCR : mise en place-2

PCR quantitative avec une sonde TaqMan®

Cette méthode repose sur deux principes :

- la technologie FRET (fluorescence resonance energy transfer)
- l'activité 5'-exonucléase (spécifique double brin) de la Taq Pol



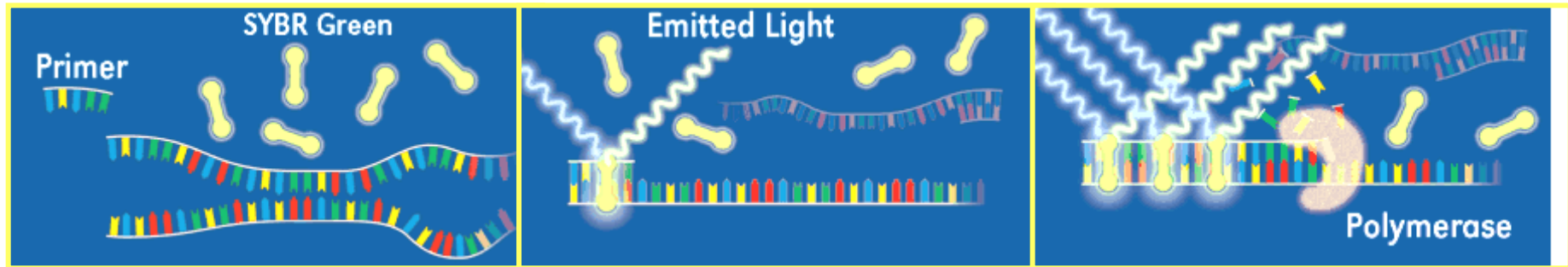
L'émission du « reporter » est inhibée par le fluorochrome quencher

Triple spécificité:

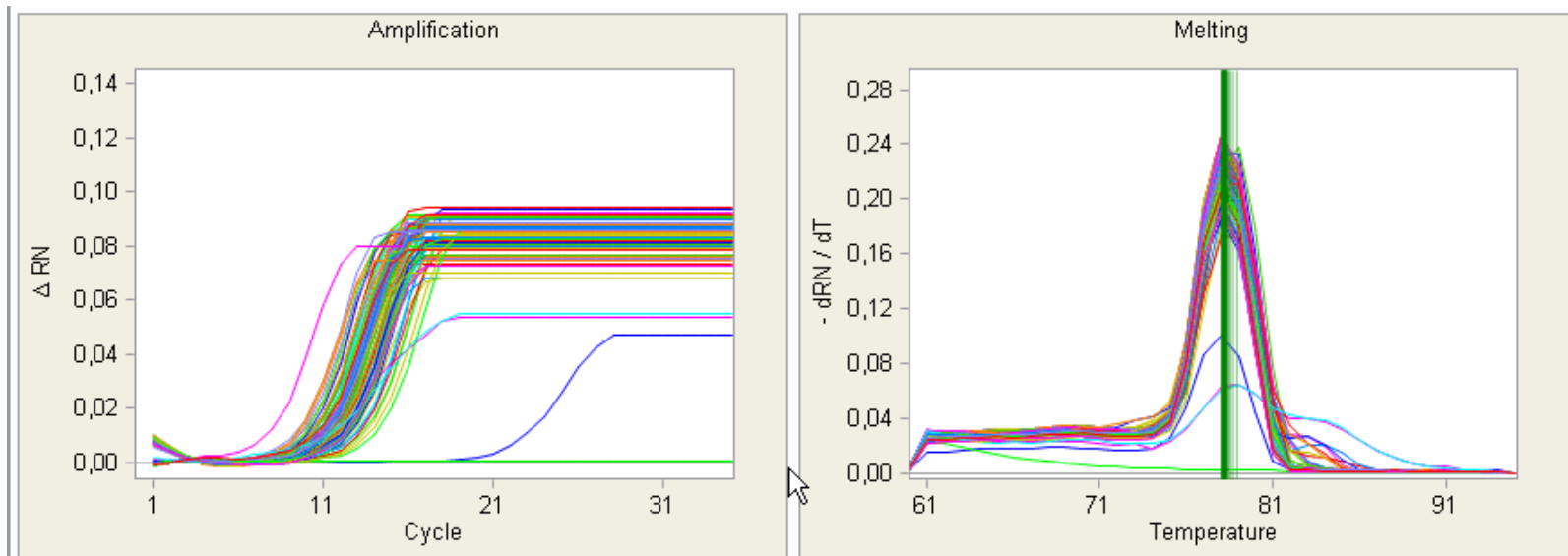
- Spécificité des amorces pour la PCR
- Spécificité de l'hybridation de la sonde TaqMan à une TM>TM oligos

QPCR : mise en place-3

PCR quantitative SYBR®Green ou EvaGreen

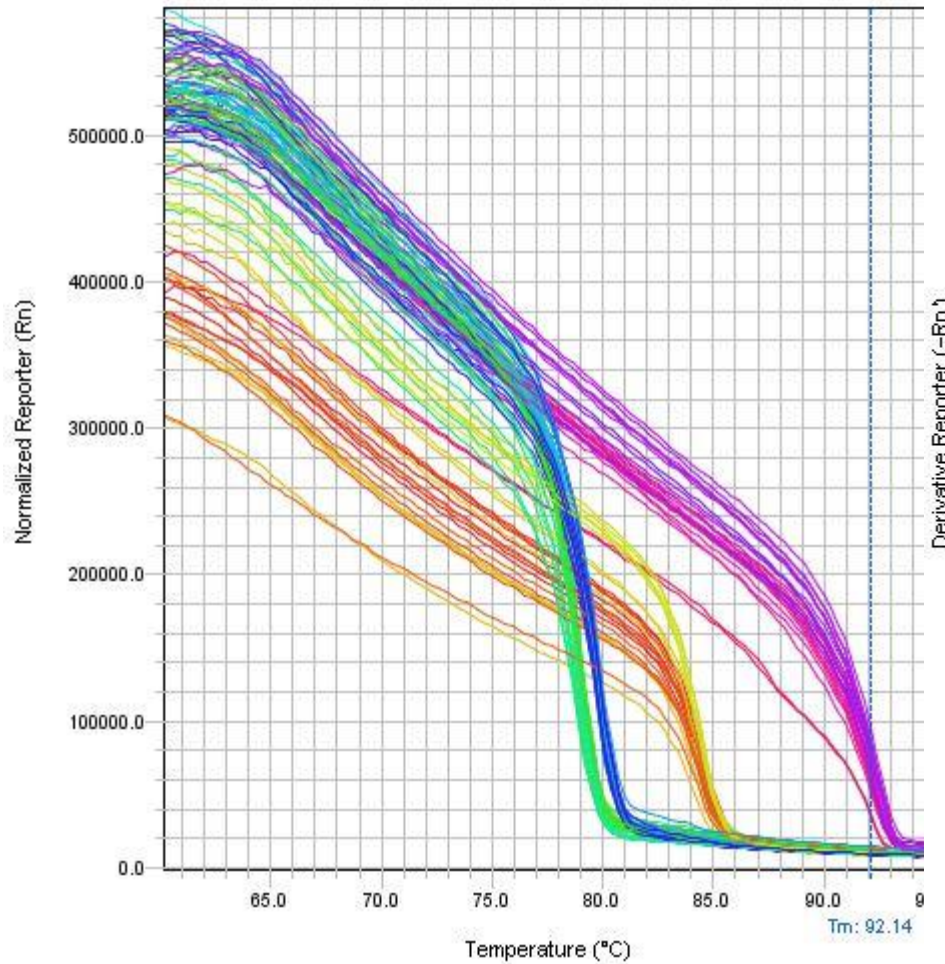


Mesure de la fluorescence en fin d'élongation

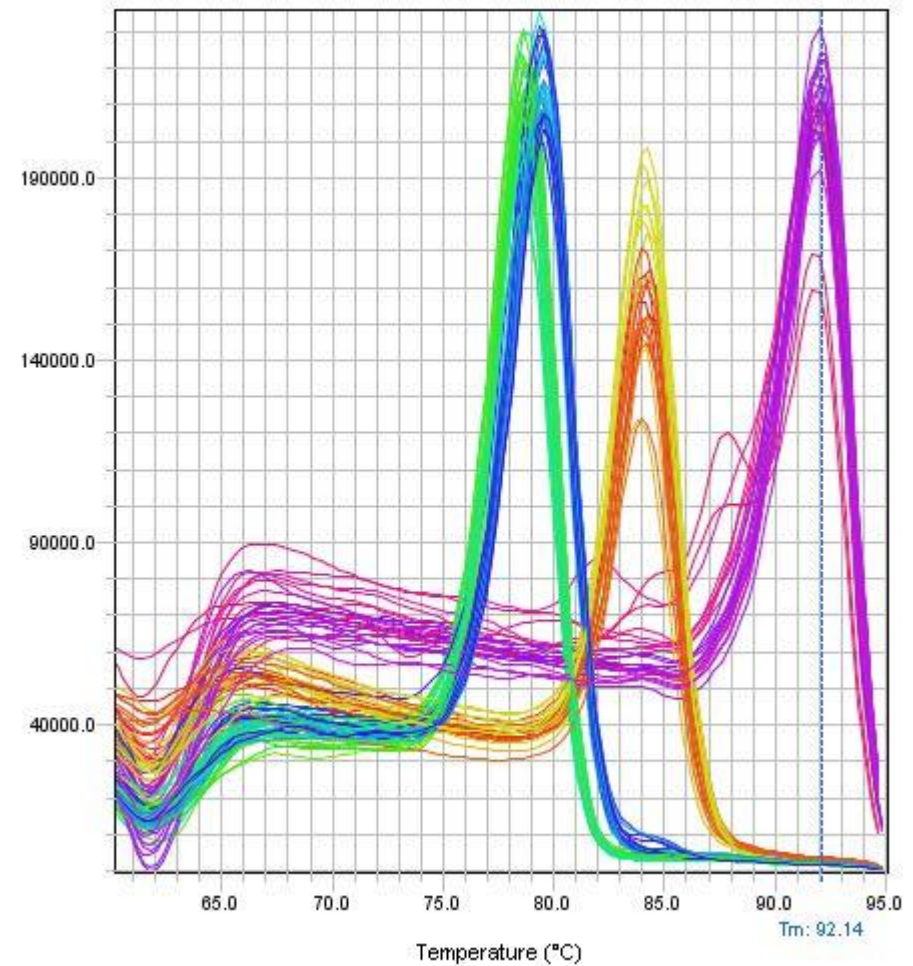


QPCR : mise en place-4

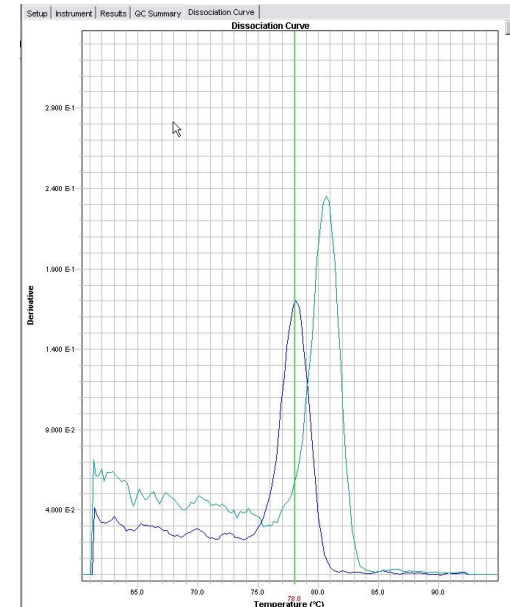
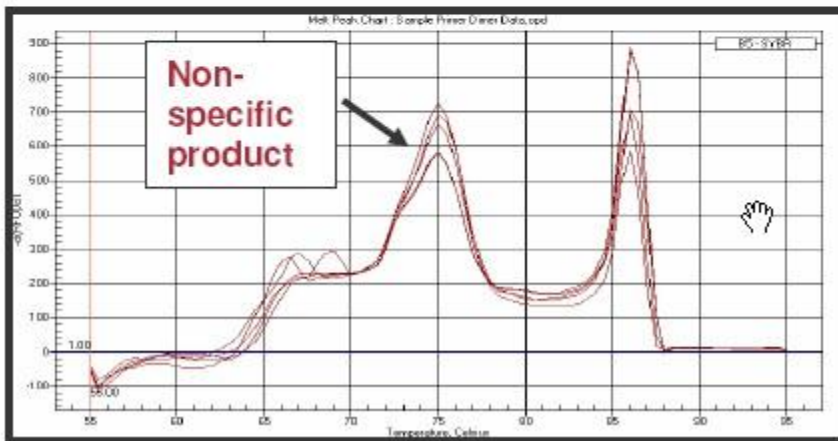
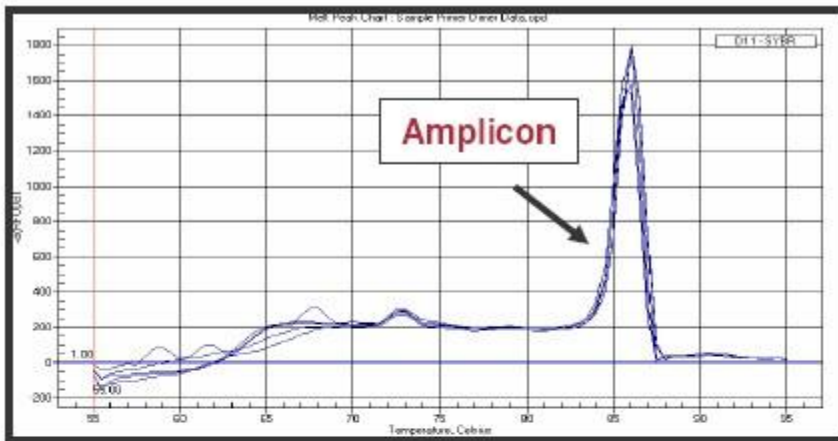
Melt Curve



Melt Curve

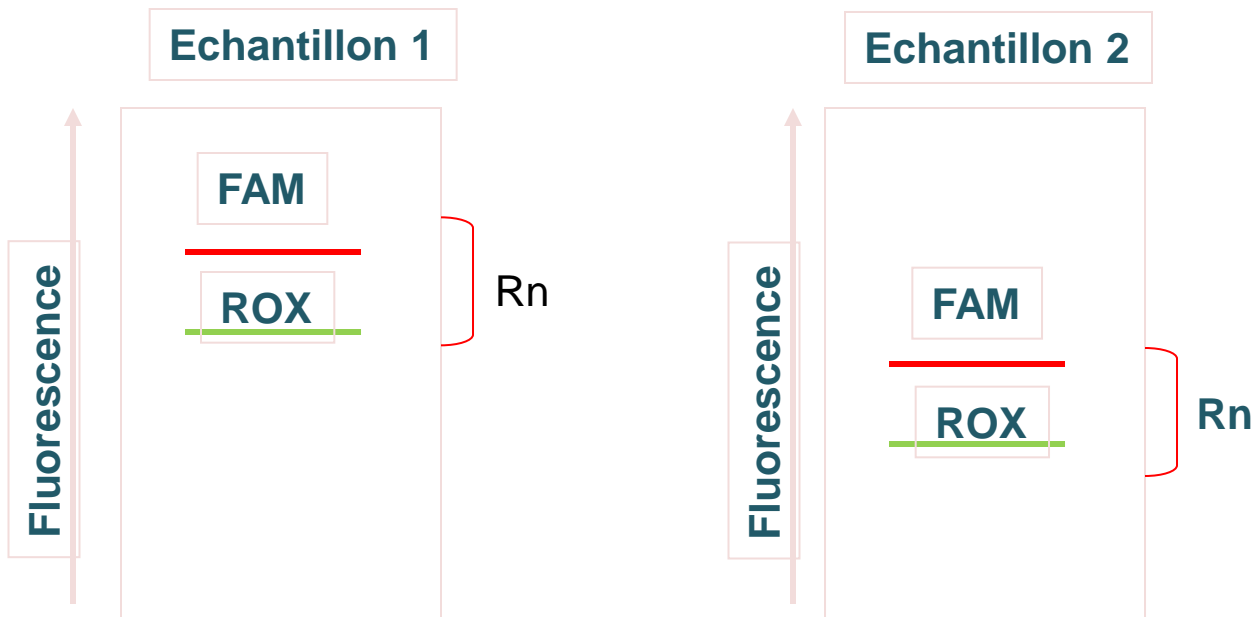


QPCR : mise en place-5



QPCR : mise en place-6

Le marqueur fluorescent ROX™ permet de normaliser les variations de fluorescence non reliées à la PCR (fluorescence des plaques ou tubes, contamination du bloc PCR,...)



Vérifier si le ROX est présent dans votre Master Mix!!

$R_n = \text{Reporter} / \text{Passive référence}$

QPCR : mise en place-7

Choix d'oligos et de sondes à l'aide de logiciels dédiés

Critères de recherche pour des oligos:

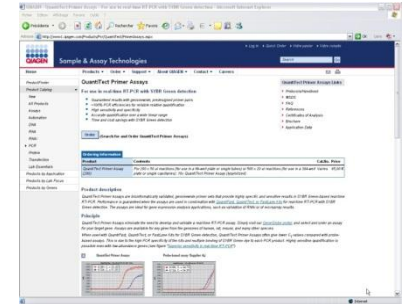
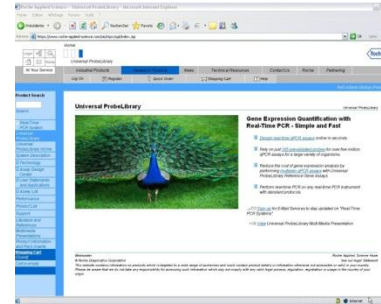
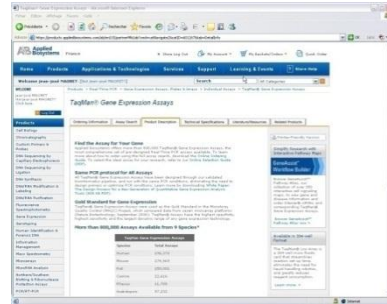
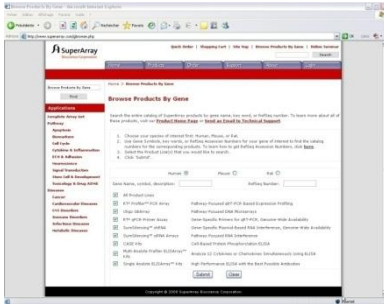
- Travailler sur un amplicon court (75 à 150 bp)
GC compris entre 30 et 70%
- Limiter les répétitions d'un même nucléotide (pas plus de trois)
- Limiter les complémentarités entre vos amorces (dimers)
- Pas plus de 2C ou G dans les 5 dernières bases de votre amorce
- Entre deux exons

Critères de recherche pour des sondes:

- Identiques à celles du dessin des amorces +
- La T_m de la sonde doit être de 7-8 degrés supérieur à celle du couple d'amorces
- Le 5' de la sonde ne doit pas commencer par un G (effet de quenching associé)
- Plus de C que de G dans la sonde

QPCR : mise en place-8

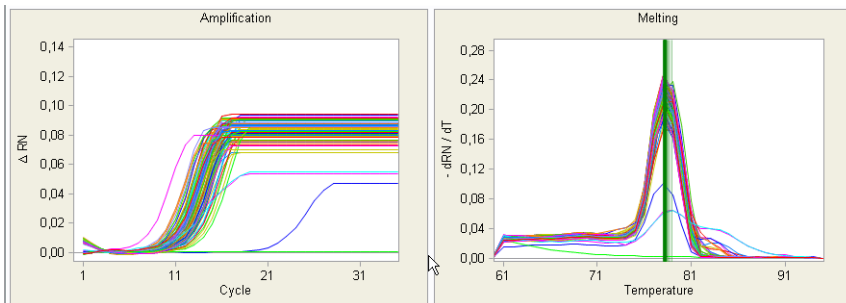
BANQUES COMMERCIALES



Précaution:

Toujours vérifier le profil de thermocyclage (température d'annealing, temps d'élongation) donné par le fabricant et l'appliquer à votre machine.

BANQUE Plateau GeT-TQ



Base de données des oligos dont le design a été fait par Fluidigm et validé sur le Biomark.

QPCR : mise en place-9

TaqMan ® versus SYBR ® Green - EvaGreen

	TaqMan ®	SYBR ® Green
Spécificité	<ul style="list-style-type: none">-fixation des amorces,-hybridation de la sonde,-conditions PCR	<ul style="list-style-type: none">-fixation des amorces,-conditions PCR
Flexibilité	<ul style="list-style-type: none">-multiplex,-détection de SNP,	<ul style="list-style-type: none">-vérifier la formation de dimers d'amorces
Optimisation	<ul style="list-style-type: none">-standardisée	<ul style="list-style-type: none">-vérification de l'efficacité-dépend du gène ciblé

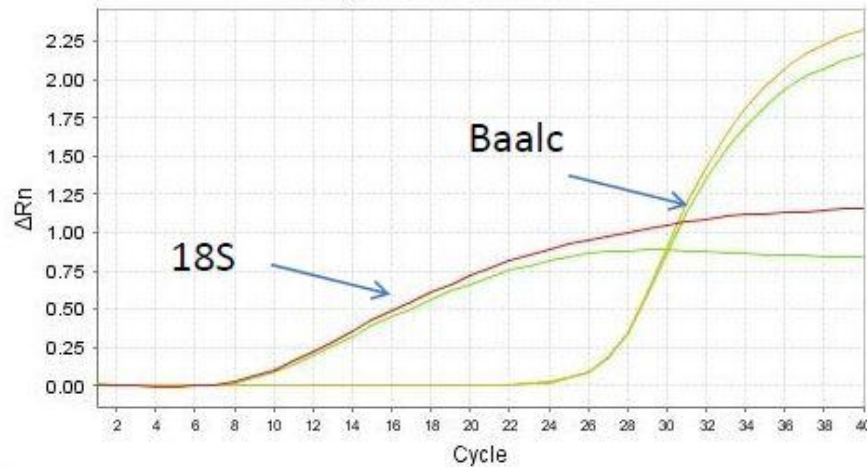
Multiplexage: mythe ou réalité?

Conditions pour réaliser un dosage en multiplexage:

- Utiliser deux sondes marquées par des fluorochromes différents.
- Avoir un différentiel minimum de 3 CT entre l'expression des 2 gènes étudiés
- Avoir une efficacité de 100% pour chacun des dosages
- Déterminer en croisant les gammes de dilution, la partie de la gamme où l'amplification d'un gène n'interfère pas avec l'amplification de l'autre.
- Utiliser une des sondes en version « primer limitant »

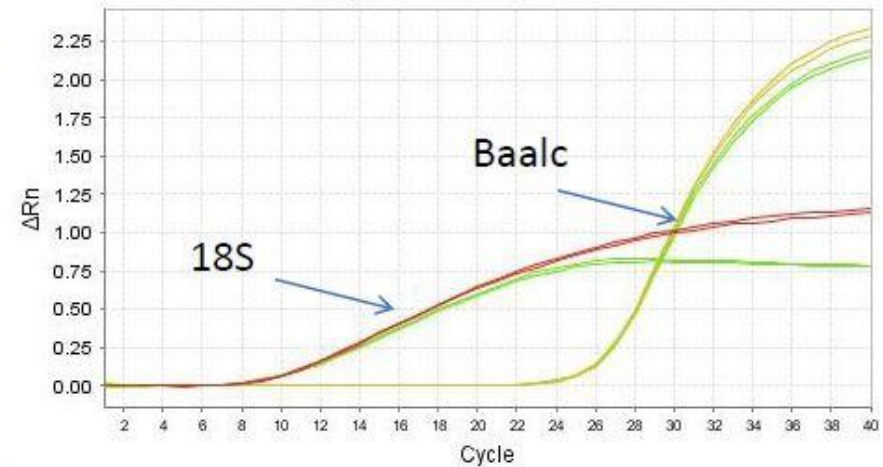
QPCR : mise en place-11

Amplification Plot



Simplex

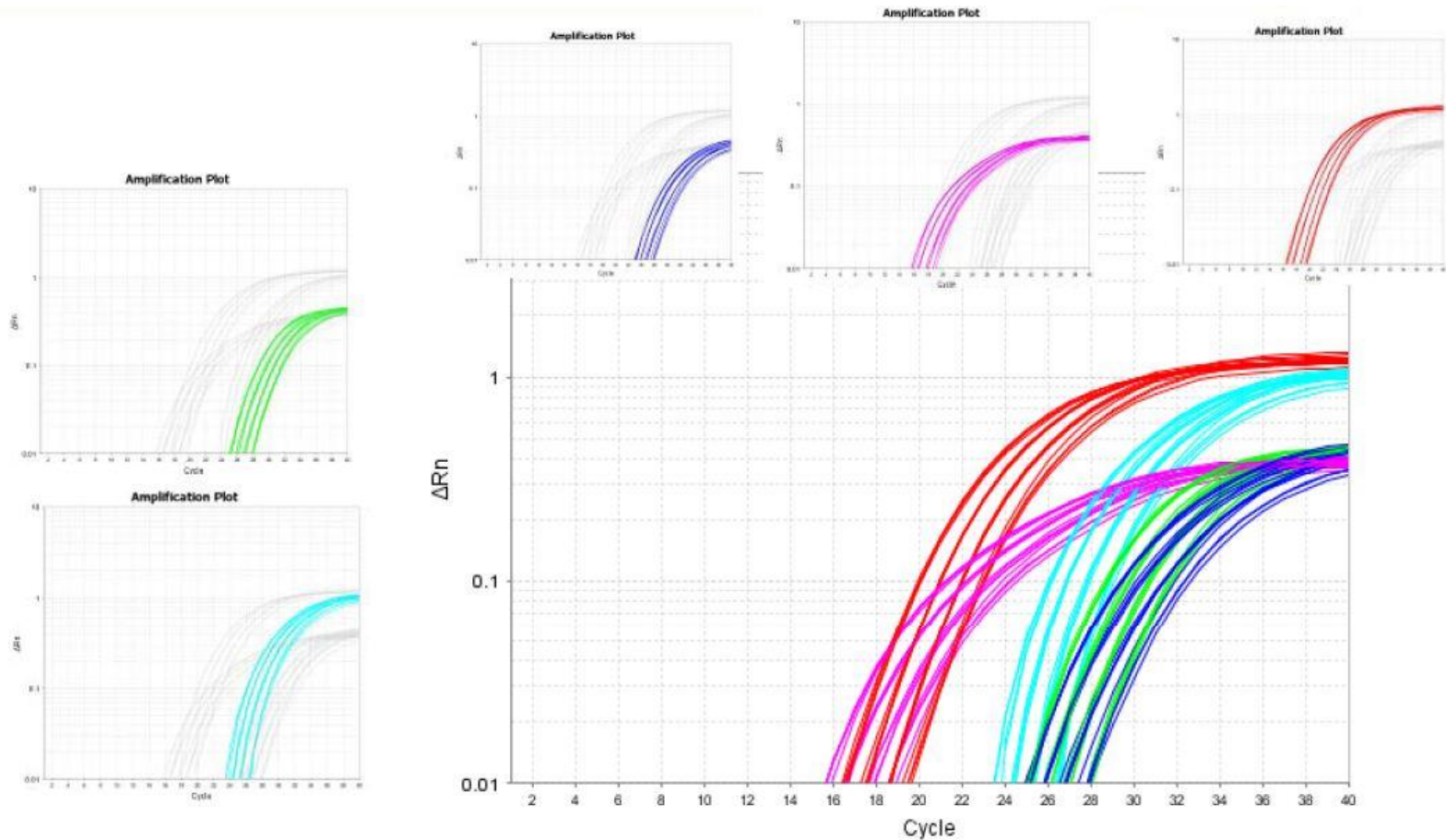
Amplification Plot



Multiplex

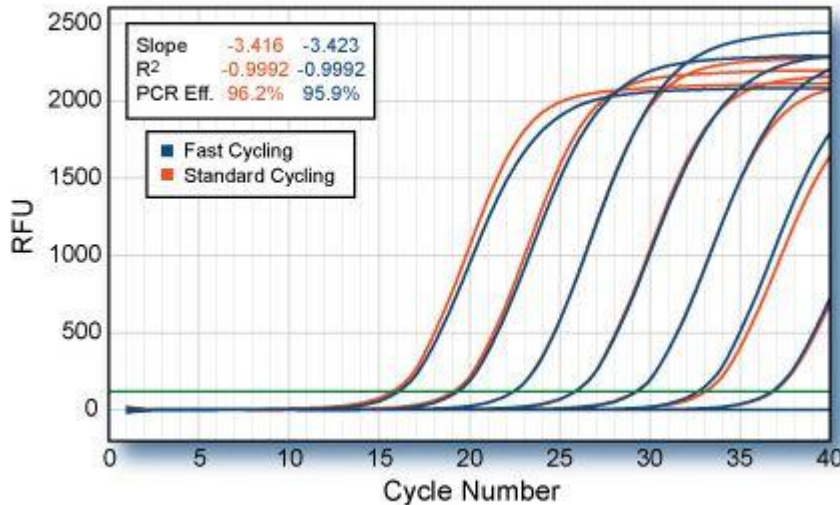
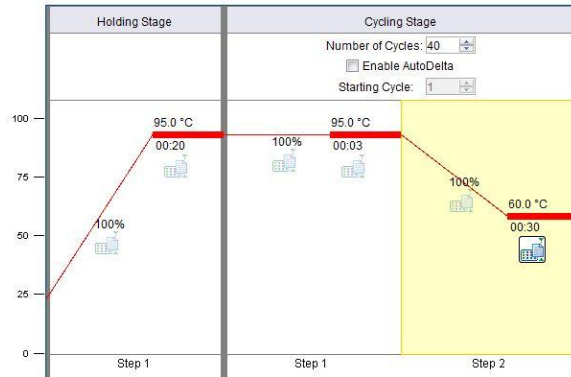
	18S Simplex	Baalc Simplex	Multiplex 18S	Multiplex Baalc	Δ CT Simplex	Δ CT multiplex
RT 500	8.8	26.22	8.96	26.14	17.42	17.18
RT 200	9.5	25.63	9.63	25.54	16.13	15.91

QPCR : mise en place-12



MULTIPLEXAGE 5 Gènes sur ViiA7

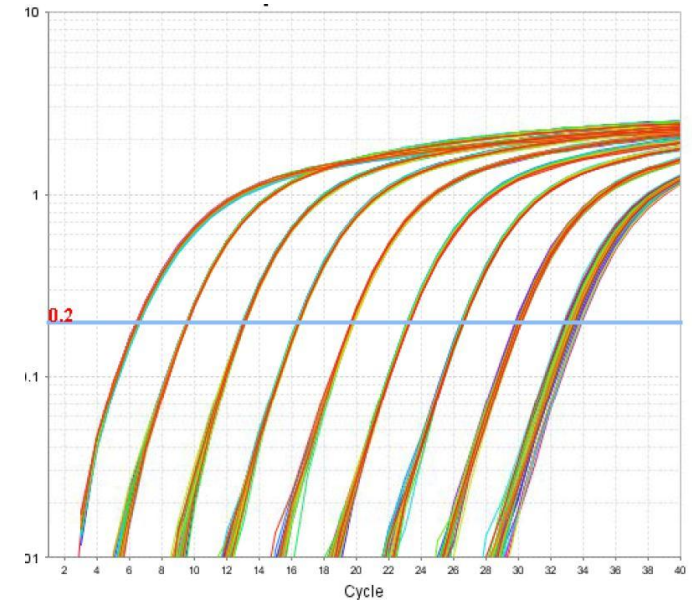
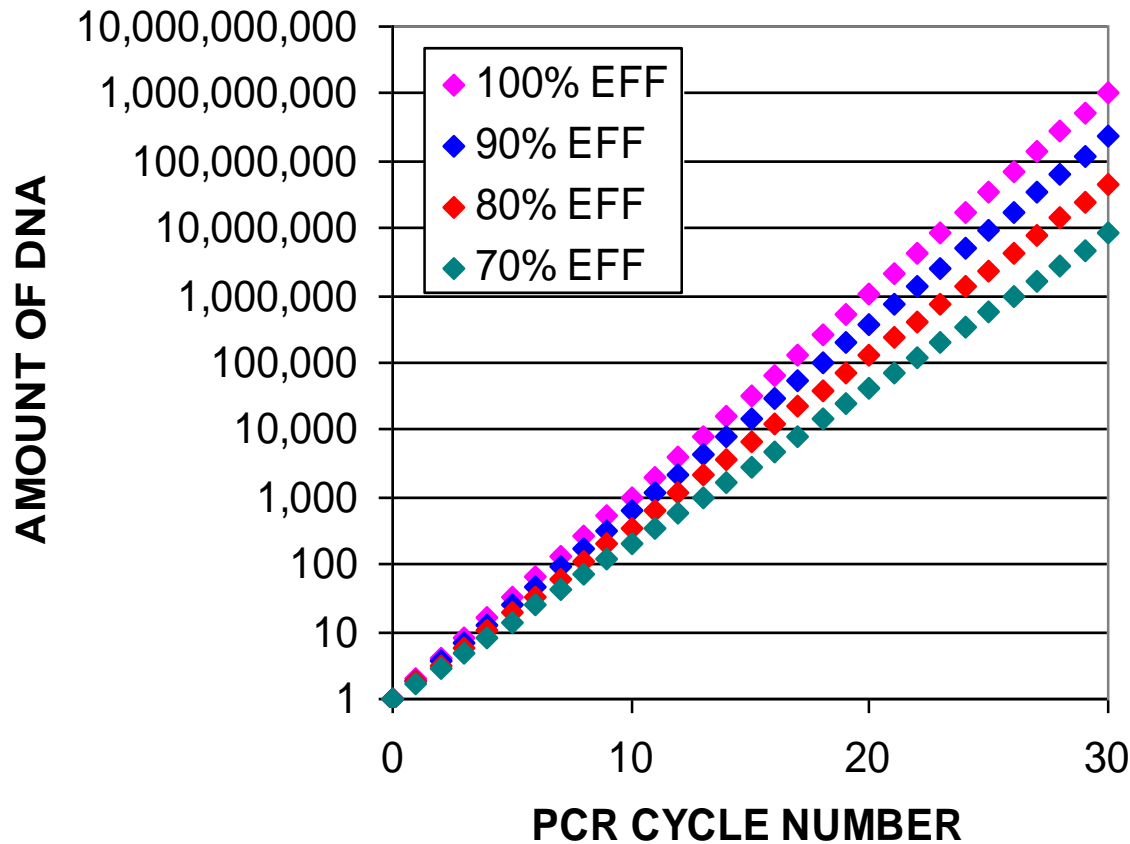
QPCR : mise en place-13



Mode Fast ou Mode Standard:
 Des Oligos robustes et
 efficaces en mode standard le
 seront aussi en mode Fast

PCR: efficacité-1

L'efficacité est le reflet du doublement du nombre d'amplicons à chaque cycle



PCR: efficacité-2

AMOUNT OF DNA 100% EFFICIENCY	AMOUNT OF DNA 90% EFFICIENCY	AMOUNT OF DNA 80% EFFICIENCY	AMOUNT OF DNA 70% EFFICIENCY
1	1	1	1
2	2	2	2
4	4	3	3
8	7	6	5
16	13	10	8
32	25	19	14
64	47	34	24
128	89	61	41
256	170	110	70
512	323	198	119
1 024	613	357	202
2 048	1 165	643	343
4 096	2 213	1 157	583
8 192	4 205	2 082	990
16 384	7 990	3 748	1 684
32 768	15 181	6 747	2 862
65 536	28 844	12 144	4 866
131 072	54 804	21 859	8 272
262 144	104 127	39 346	14 063
524 288	197 842	70 824	23 907
1 048 576	375 900	127 482	40 642
2 097 152	714 209	229 468	69 092
4 194 304	1 356 998	413 043	117 456
8 388 608	2 578 296	743 477	199 676
16 777 216	4 898 763	1 338 259	339 449
33 554 432	9 307 650	2 408 866	577 063
67 108 864	17 684 534	4 335 959	981 007
134 217 728	33 600 615	7 804 726	1 667 711
268 435 456	63 841 168	14 048 506	2 835 109
536 870 912	121 298 220	25 287 311	4 819 686
1 073 741 824	230 466 618	45 517 160	8 193 466

Après 1 CYCLE

100% = 2.00

90% = 1.90x

80% = 1.80x

70% = 1.70x

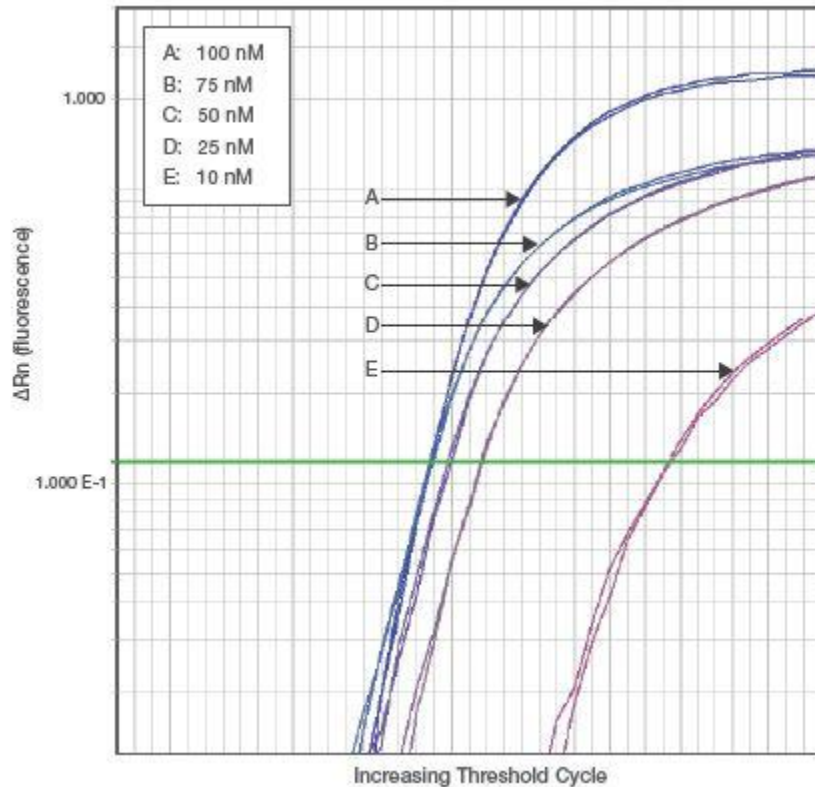
Après N CYCLES:

fold increase = (efficiency)ⁿ

Pour Comparer deux résultats de QPCR les efficacités doivent être identiques et égales à 100%

Mes oligos ne sont pas efficaces à 100% je fais quoi?

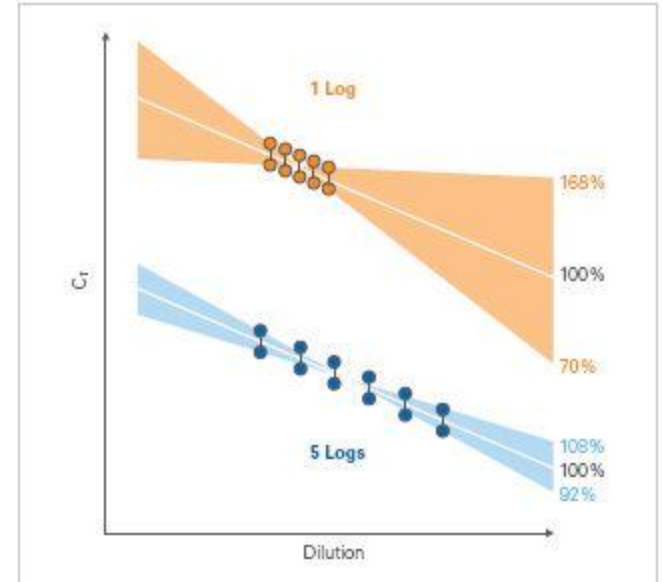
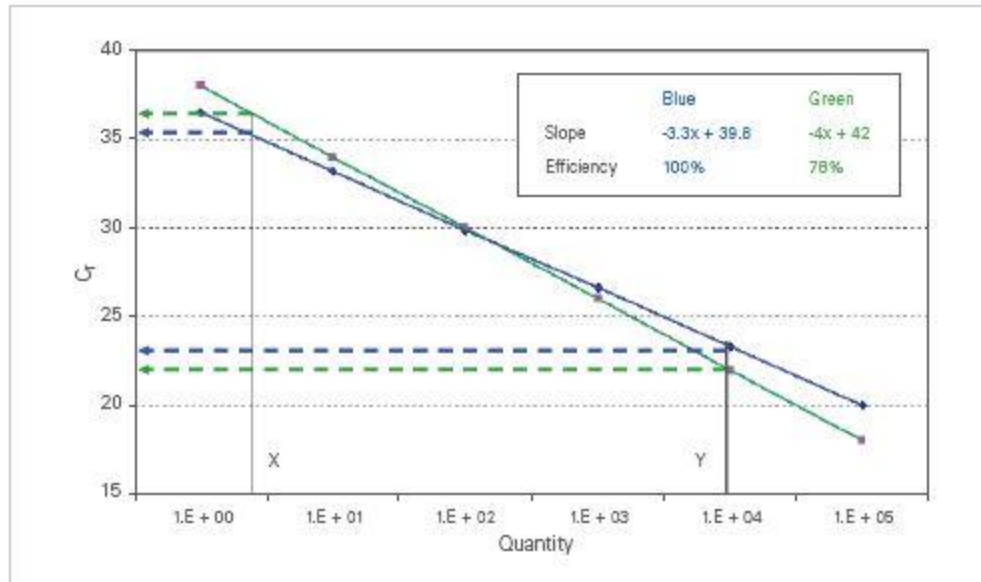
PCR: efficacité-3



Je réfléchis

1 – la [c] est-elle la meilleure?

PCR: efficacité-4



Je réfléchis

2 – la gamme de dilution est-elle cohérente?

Nucleic Acids Research Advance Access published January 6, 2012

Nucleic Acids Research, 2012, 1–10
doi:10.1093/nar/gkr1259

Correction of RT-qPCR data for genomic DNA-derived signals with ValidPrime

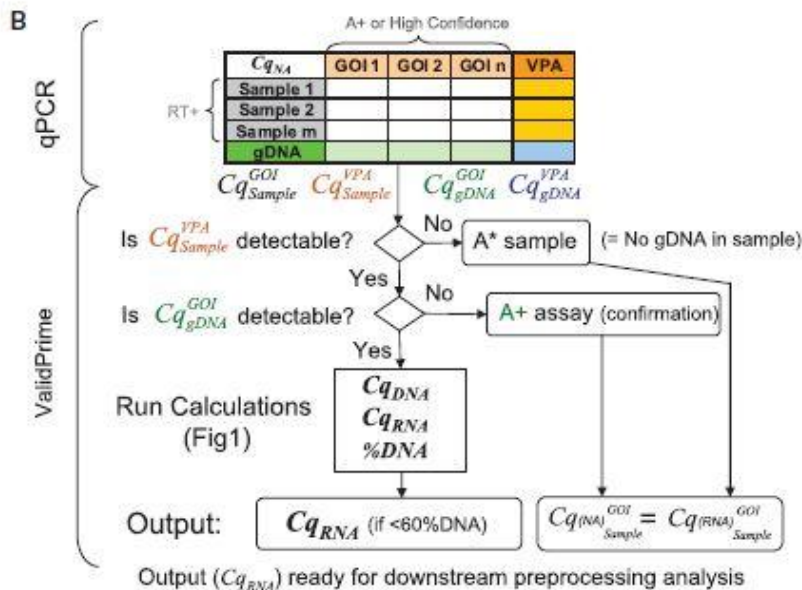
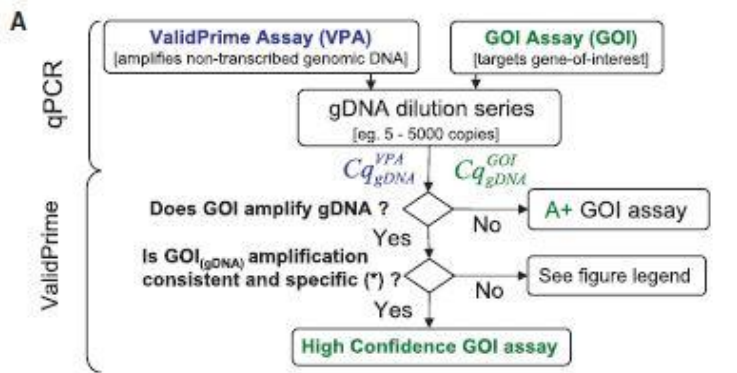
Henrik Laurell^{1,*}, Jason S. Iacovoni¹, Anne Abot¹, David Svec^{2,3}, Jean-José Maoret^{1,4}, Jean-François Arnal^{1,5} and Mikael Kubista^{2,3}

¹Inserm/Université Paul Sabatier UMR1048, Institut des Maladies Métaboliques et Cardiovasculaires (I2MC), BP84225, 31432 Toulouse cedex 4, France, ²Laboratory of Gene Expression, Institute of Biotechnology, Academy of Sciences of the Czech Republic, Prague, ³TATAA Biocenter AB, Göteborg, Sweden, ⁴Plateforme GeT (Génome et Transcriptome) du Génopole Toulouse, Toulouse, France and ⁵Faculté de Médecine, Université de Toulouse III and CHU de Toulouse

Je réfléchis

3 – échantillons contaminés par de l'ADN Génomique?
Pourquoi ne pas essayer ValidPrime?

PCR: efficacité-6



Permet de tester/valider les amorces de qPCR par rapport à leur sensibilité à amplifier de l'ADNg génomique.

Normalement il ne sont pas censés d'amplifier d'ADNg si : a) elles sont dans deux exons différents séparés par un intron >800bp ou b) un des primer est chevauchant entre deux exons. MAIS tous cela est la théorie - il faut le tester dans le tube !

- 1) Si tous les primers sont insensibles à l'ADNg, l'histoire s'arrête là ! Plus besoin de faire des traitements à la DNase, ni des corrections (la suite).
- 2) Si les primers amplifient l'ADNg (de façon spécifique et avec une bonne efficacité), ValidPrime permet de calculer le signal provenant de l'ADNg (CqDNA) et de le soustraire du signal total. Cela donne le CqRNA (= signal provenant de l'ADNc). La correction marche bien à condition que le signal de l'ADNg ne dépasse pas 60% du signal total.

- 3) si l'amplification de l'ADNg est non-spé ou bizarre, deux options : a/ redessiner des primers (pipe-line pour cela sera développé) ou : b/ traiter à la DNase).

VP remplace les contrôles RT- en réduisant le nombre de contrôles.

- 4/ Avec VP, le traitement à la DNase devient superflu pour le plus grand nombre d'expériences en qPCR.

Pour utiliser ValidPrime il faut simplement inclure le VPA (côté assays) et l'ADNg (côté échantillons) dans le plan expérimental. La VPA sont de primers optimisés amplifiant spécifiquement un amplicon non-transcrit présent à une copie par génome haploïde. L'ADNg doit être de la même espèce (ou cellules, si transformées car risque de aneuploïdie) que l'ADNc.

Les données sortant du ValidPrime rentre en suite dans le pipe-line classique (=normalisation avec des gènes de référence etc.)

Jason a développé un programme qui permet de faire l'analyse en quelques cliques : <http://code.google.com/p/gh-validprime/downloads/list>

Une version pour "R" sera bientôt développée

PCR: efficacité-7

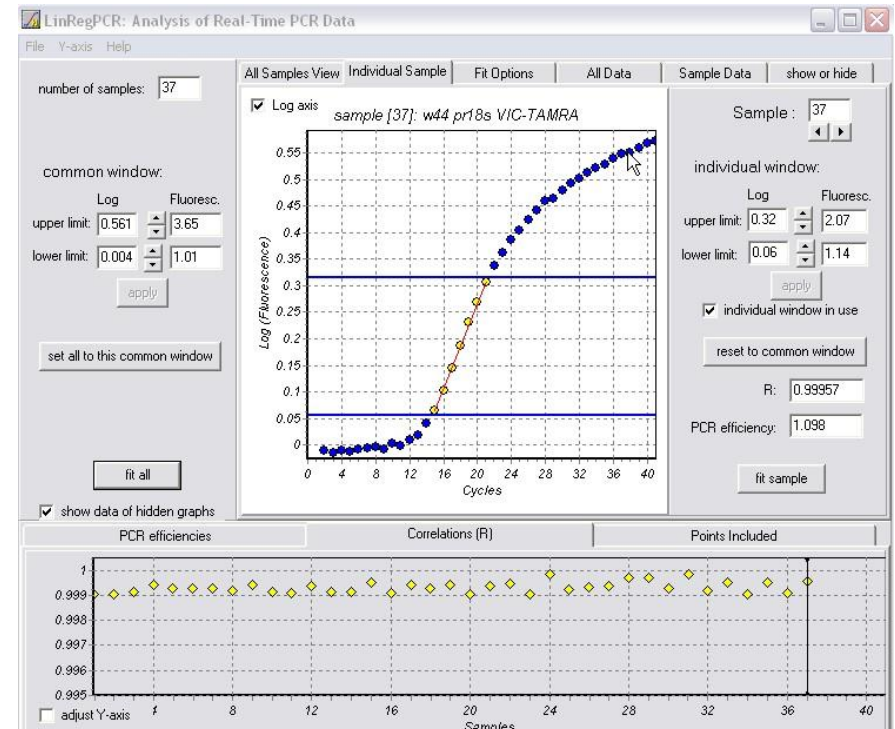
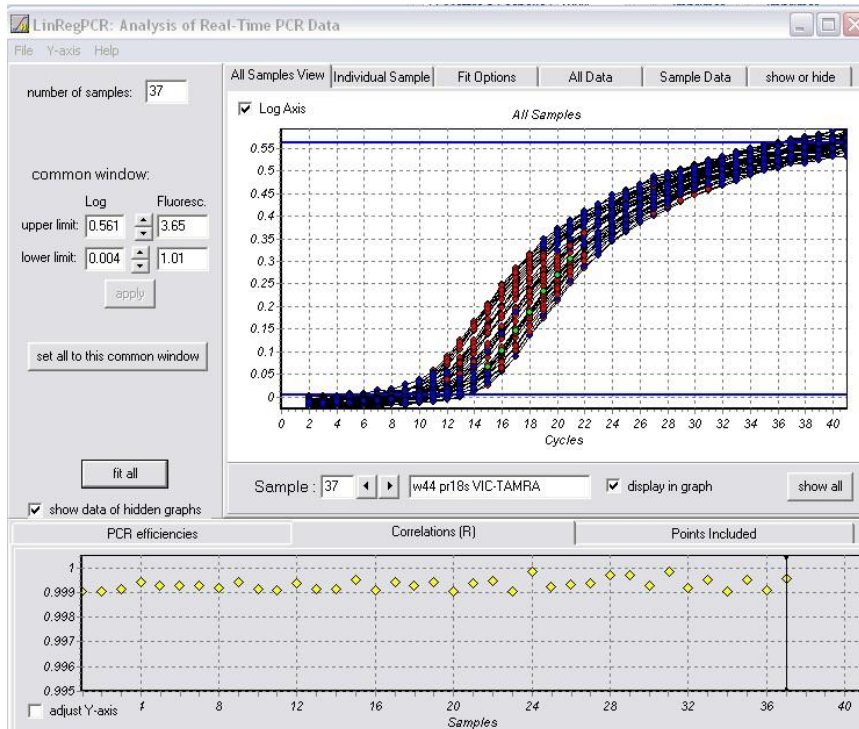
Travailler avec des écarts de Cq les plus faibles réduit l'erreur induite par une mauvaise efficacité.

Erreur commise avec la méthode des $2^{-\Delta C_t}$ pour une PCR d'efficacité < 100% en fonction de l'écart de C_t

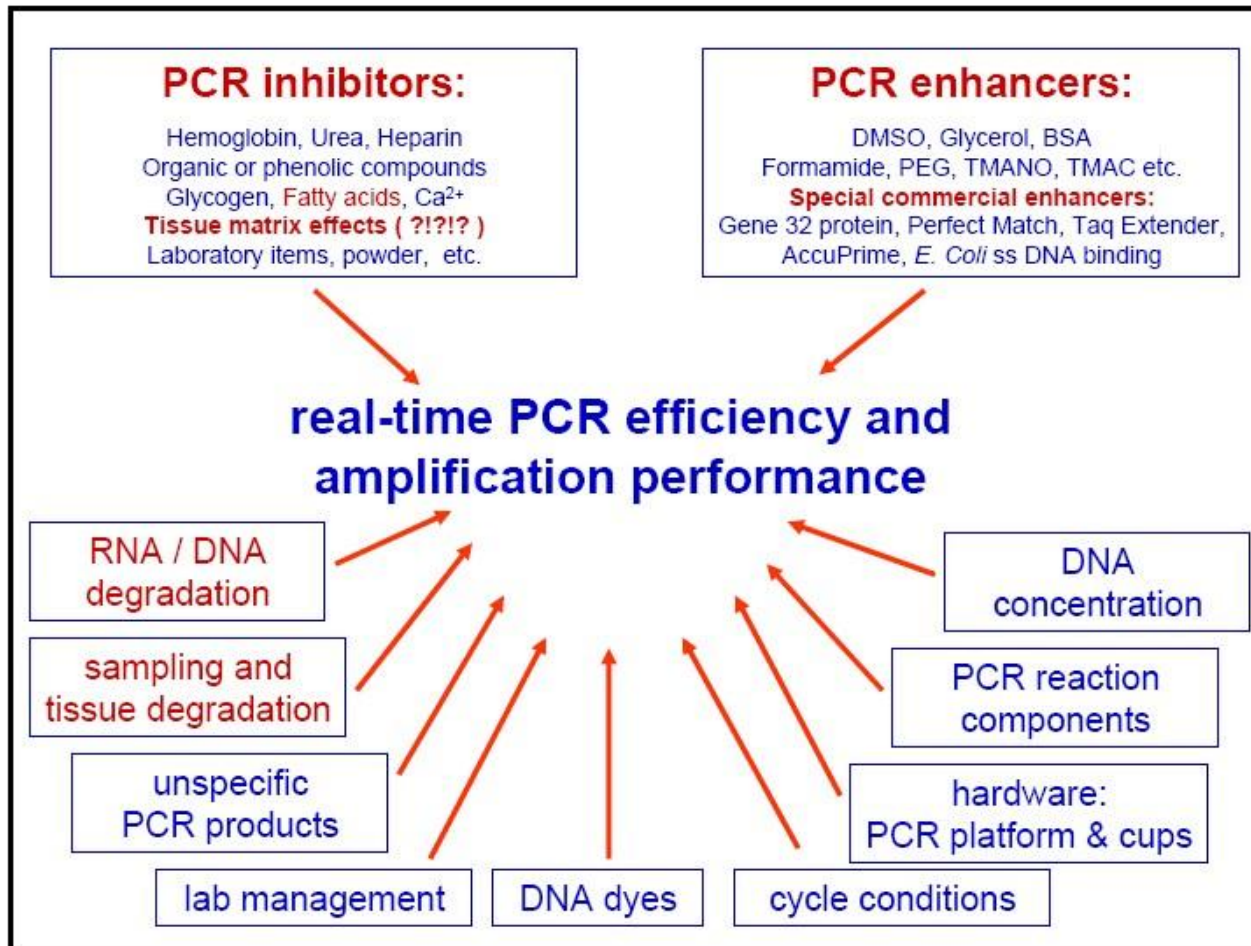
				Efficacité							
				99%	95%	90%	85%	80%	75%	70%	
				1	1%	3%	5%	8%	11%	14%	18%
	ΔC_t	1		2	1%	5%	11%	17%	23%	31%	38%
				3	2%	8%	17%	26%	37%	49%	63%
	Efficacité calculée	85%		3.32	2%	9%	19%	30%	42%	56%	72%
				4	2%	11%	23%	37%	52%	71%	92%
	% d'erreur (quantité) :	8%	ACT	5	3%	13%	29%	48%	69%	95%	125%
				6	3%	16%	36%	60%	88%	123%	165%
				7	4%	19%	43%	73%	109%	155%	212%
				8	4%	22%	51%	87%	132%	191%	267%
				9	5%	26%	59%	102%	158%	233%	332%
				10	5%	29%	67%	118%	187%	280%	408%

LinReg

Considère chaque point d'une PCR comme un point de dilution pour calculer la régression linéaire.

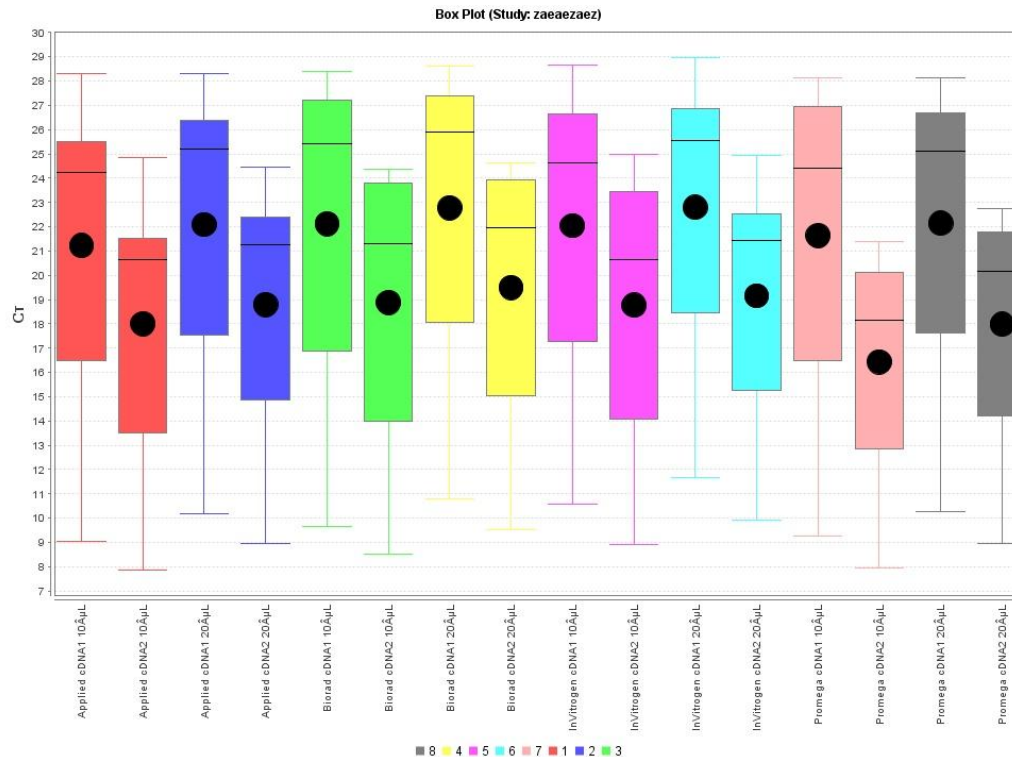


PCR: efficacité-9



Quantification Relative-1

Elle consiste en la comparaison directe de deux conditions données par la détermination du ratio de la quantité de cible entre les deux conditions. Cette approche nécessite la quantification en parallèle pour chaque condition de la quantité d'un gène de référence.



Quantification Relative-2

- pas besoin de courbe de standard
- calcul des résultats par comparaison des Ct
- nécessité de définir :
 - un gène domestique (ex GAPDH) servant de contrôle endogène
 - un calibrateur servant de standard
- ✓ le contrôle endogène permet de normaliser:
 - le dosage de l'ARN
 - la qualité de l'ARN
 - l'efficacité de la reverse transcription
- ✓ Le calibrateur :
 - représente l'état normal en terme physiologique
 - exemples: culture cellulaire non traitée
 - organe non atteint par une pathologie
 - lignée sauvage

Quantification Relative-3

Choix d'un gène de ménage:

Définition:

- Son expression doit être identique dans tous les échantillons de l'étude.
- Son niveau d'expression ne doit pas être affecté par un traitement expérimental
- Il subit toutes les étapes de la QPCR avec la même cinétique que les gènes d'intérêt.
- Il n'existe pas de gène de ménage « ubiquitaire ».
- Un gène de ménage n'a de valeur que pour une espèce, un tissu, un type cellulaire, un état physiologique donné.
- Bien souvent un seul gène de ménage n'est pas suffisant pour normaliser.
- Il est préférable d'utiliser une combinaison de plusieurs gènes.

Quantification Relative-4

Choix du (des) gènes de ménage:

- Recherche bibliographique. Design des amorces, validation des QPCRs (efficacité des amorces, essais sur les échantillons contrôles et traités,..)
- Utilisation de plaques dédiées.

Plaques contenant oligos ou sondes correspondant aux gènes de ménage couramment utilisés pour une espèce. Oligos ou sondes certifiés ayant une efficacité de 100% (??). Format de plaques 96 puits ou Microfluidique Card.

- Rechercher vos gènes de ménage dans une population représentative d'échantillons contrôles et traités (n>6 pour chaque population)
- Quelque soit la méthode choisie, la recherche des gènes de référence se fera à l'aide d'un logiciel: GeNorme, Normfinder, Best keeper, Genex

Gene Symbols	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	18S	GAPDH	HPRT1	GUSB	18S	GAPDH	HPRT1	GUSB	18S	GAPDH	HPRT1	GUSB
B	ACTB	B2M	HMBS	IPC8	ACTB	B2M	HMBS	IPC8	ACTB	B2M	HMBS	IPC8
C	PGK1	RPLP0	TBP	TFRC	PGK1	RPLP0	TBP	TFRC	PGK1	RPLP0	TBP	TFRC
D	UBC	YWHAZ	PPIA	POLR2A	UBC	YWHAZ	PPIA	POLR2A	UBC	YWHAZ	PPIA	POLR2A
E	CASC3	CDKN1A	CDKN1B	GADD45A	CASC3	CDKN1A	CDKN1B	GADD45A	CASC3	CDKN1A	CDKN1B	GADD45A
F	PUM1	PSMC4	EIF2B1	PES1	PUM1	PSMC4	EIF2B1	PES1	PUM1	PSMC4	EIF2B1	PES1
G	ABL1	ELF1	MT-ATP6	MRPL19	ABL1	ELF1	MT-ATP6	MRPL19	ABL1	ELF1	MT-ATP6	MRPL19
H	POP4	RPL37A	RPL30	RPS17	POP4	RPL37A	RPL30	RPS17	POP4	RPL37A	RPL30	RPS17

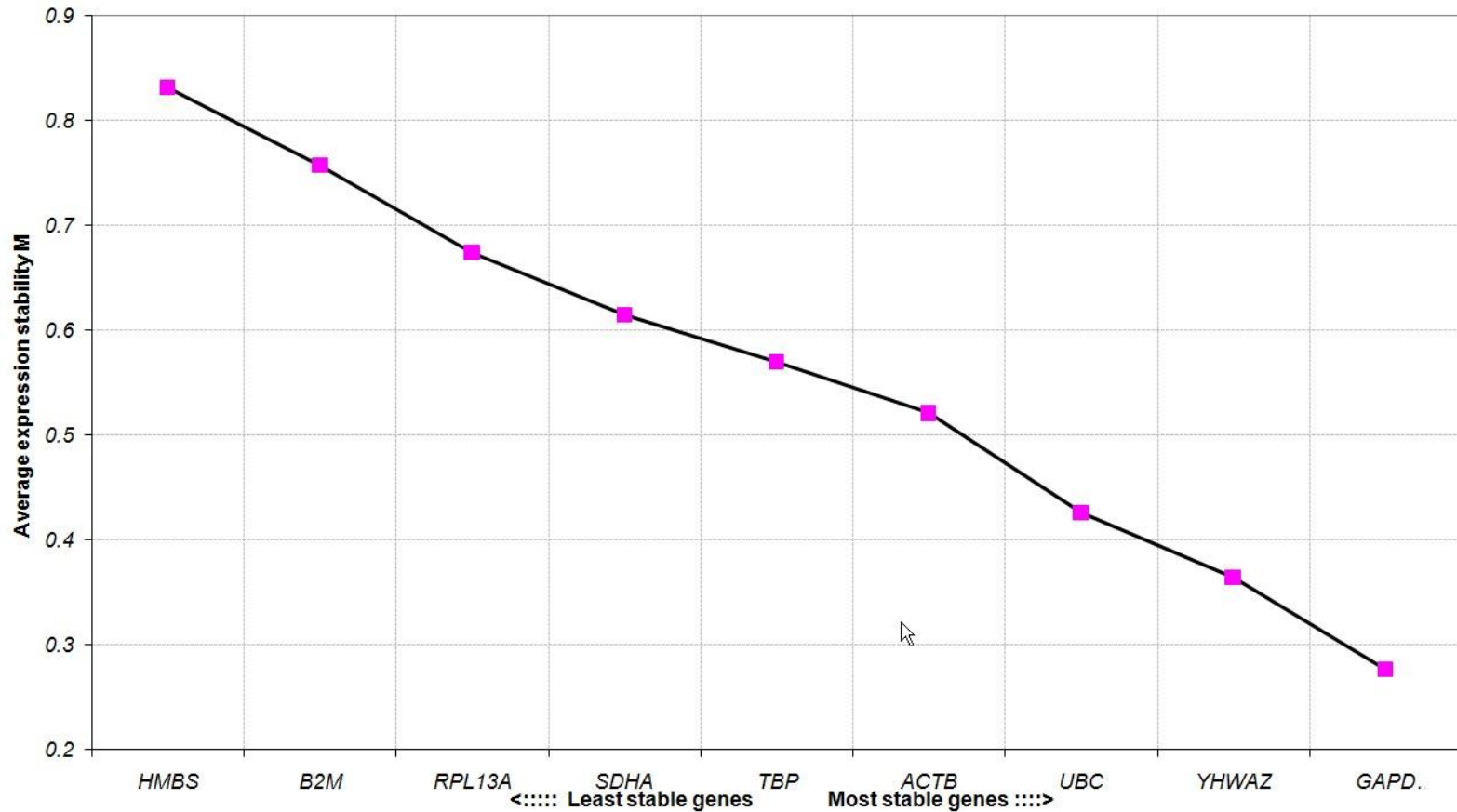
Quantification Relative-5



Change Data	GAPD	ACTB	B2M	HMBS	HPRT1	RPL13A	SDHA	TBP	UBC	YHWAZ
FIB1	5.16E-01	4.99E-01	3.28E-01	3.06E-01	4.83E-01	3.36E-01	3.94E-01	4.38E-01	4.47E-01	5.73E-01
FIB2	2.88E-01	2.39E-01	4.78E-01	1.16E-01	3.14E-01	2.40E-01	2.51E-01	2.36E-01	2.22E-01	3.52E-01
FIB3	1.61E-01	2.62E-01	4.78E-01	8.94E-02	1.48E-01	2.73E-01	2.41E-01	1.86E-01	1.78E-01	3.07E-01
FIB4	4.62E-01	1.51E-01	1.00E+00	2.08E-01	2.85E-01	2.77E-01	3.76E-01	1.15E-01	3.72E-01	2.22E-01
FIB5	6.95E-01	6.79E-01	6.00E-01	3.34E-01	7.66E-01	5.82E-01	5.54E-01	8.02E-01	5.73E-01	8.52E-01
FIB6	1.15E-03	1.60E-04	1.50E-03	5.94E-03	7.65E-04	1.55E-03	9.35E-04	9.60E-05	3.77E-04	6.90E-04
FIB7	4.88E-01	5.74E-01	5.90E-01	3.59E-01	5.13E-01	4.35E-01	4.38E-01	5.73E-01	4.18E-01	6.86E-01
FIB8	1.93E-01	1.84E-01	4.85E-01	7.72E-02	1.52E-01	6.33E-01	1.34E-01	1.09E-01	1.82E-01	1.70E-01
FIB9	3.94E-01	2.81E-01	5.86E-01	1.38E-01	3.86E-01	4.78E-01	3.81E-01	3.28E-01	4.11E-01	3.42E-01
FIB10	1.19E-02	5.50E-03	1.28E-02	6.14E-03	9.39E-03	2.03E-02	1.62E-02	8.90E-03	1.03E-02	1.23E-02
FIB11	1.68E-02	8.11E-03	2.32E-02	1.68E-02	1.37E-02	4.85E-02	4.25E-02	1.11E-02	2.25E-02	2.38E-02
FIB12	1.11E-02	1.43E-02	2.42E-02	8.55E-03	1.19E-02	3.11E-02	3.92E-02	1.37E-02	1.77E-02	1.54E-02
FIB13	8.44E-03	7.14E-03	1.47E-02	7.46E-03	9.68E-03	1.74E-02	2.00E-02	6.04E-03	1.06E-02	1.42E-02
FIB14	5.94E-01	6.97E-01	4.47E-01	4.93E-01	6.24E-01	5.39E-01	5.56E-01	5.57E-01	5.50E-01	7.09E-01
FIB15	2.84E-01	1.97E-01	1.30E-01	1.25E-01	2.18E-01	3.00E-01	2.09E-01	1.88E-01	4.46E-01	2.35E-01
FIB16	5.73E-01	4.24E-01	9.47E-02	3.32E-01	5.45E-01	3.95E-01	3.94E-01	2.76E-01	4.14E-01	5.28E-01
FIB17	7.21E-01	9.90E-01	7.21E-01	6.33E-01	8.78E-01	5.25E-01	8.81E-01	8.35E-01	8.81E-01	9.83E-01
FIB18	5.15E-01	5.04E-01	5.32E-01	4.58E-01	5.34E-01	5.96E-01	4.53E-01	5.08E-01	5.90E-01	4.67E-01
FIB19	1.00E+00	1.00E+00	7.26E-01	1.00E+00	1.00E+00	1.00E+00	1.00E+00	1.00E+00	1.00E+00	1.00E+00
FIB20	3.99E-01	3.16E-01	2.25E-01	2.54E-01	2.84E-01	2.97E-01	3.84E-01	3.36E-01	4.41E-01	3.49E-01
M < 1.5	0.687	0.864	1.076	1.128	0.651	0.873	0.762	0.928	0.700	0.651

Quantification Relative-6

Average expression stability values of remaining control genes



Quantification Relative-7

Comparaison de Cts

Etape 1: normalisation par rapport au contrôle endogène

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

Si plusieurs gènes de ménage:
faire la moyenne géométrique des Cts

Etape 2: normalisation par rapport au standard

$$\Delta Ct_{\text{échantillon}} - \Delta Ct_{\text{standard}} = \Delta\Delta Ct$$

Etape 3: détermination de la variation du nombre de copies du gène cible

$$2^{-\Delta\Delta Ct}$$

Quantification Relative-8

Contrôle

Gène endogène 18S rRNA Ct 14
Gène cible MCH Ct 32

Cellules traitées

Gène endogène 18S rRNA Ct 16
Gène cible MCH Ct 29

Quel échantillon d'ADN est le plus concentré et de combien de fois ?
18S rRNA étant utilisé comme contrôle endogène....

$$\Delta Ct_{18SrRNA} = 16 - 14 = 2 \quad \text{donc} \quad 2^{\Delta Ct_{18SrRNA}} = 2^2 = 4$$

La concentration d'ADN de l'échantillon contrôle est 4 x plus élevée que celle de l'échantillon traité.

Quantification Relative-9

Contrôle

Gène endogène 18S rRNA Ct 14
Gène cible MCH Ct 32

Cellules traitées

Gène endogène 18S rRNA Ct 16
Gène cible MCH Ct 29

Quel échantillon contient le plus grand nombre de copies d'ARNm MCH?

$$\Delta Ct_{\text{contrôle}} = 32 - 14 = 18 \quad \Delta Ct_{\text{traitées}} = 29 - 16 = 13$$

$$\rightarrow \Delta\Delta Ct = 18 - 13 = 5 \text{ donc } 2^{\Delta\Delta Ct} = 2^5 = 32$$

Le nombre de copies de l'ARNm MCH est 32 fois plus élevé dans l'échantillon de cellules traitées que dans le contrôle

Quantification Relative-10

Dosage d'un même échantillon sur différents appareils de la gamme ABI. Même différentiel.

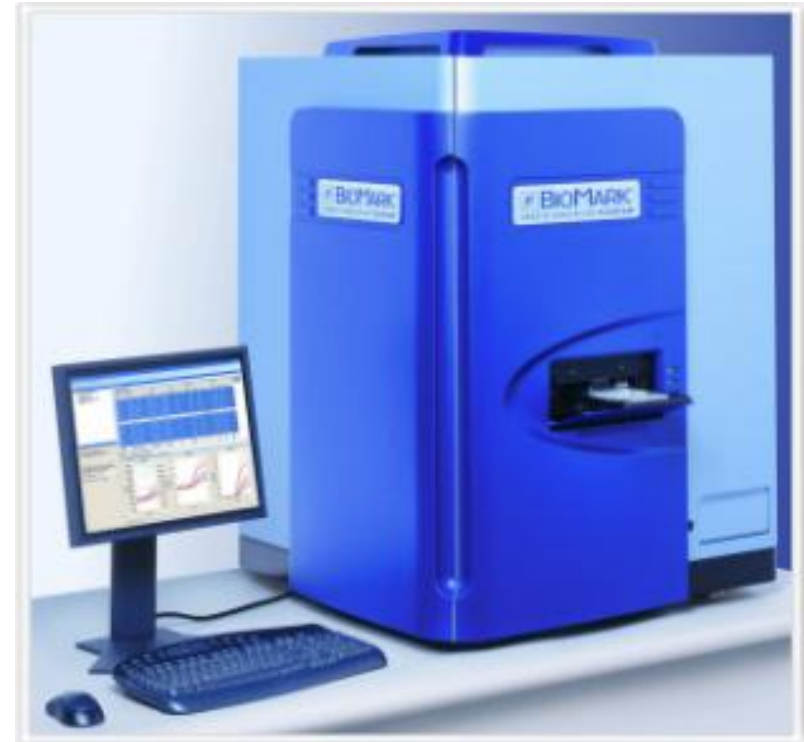
Echantillon calibrateur et gène de référence sur la même plaque.

	Ct 1	Ct 2	Δ Ct
5700	12.37	10.90	1.47
7000	12.05	10.47	1.58
7500	10.82	9.27	1.55
7900HT	10.64	9.12	1.52

QPCR Haut Débit-nanovolume-1

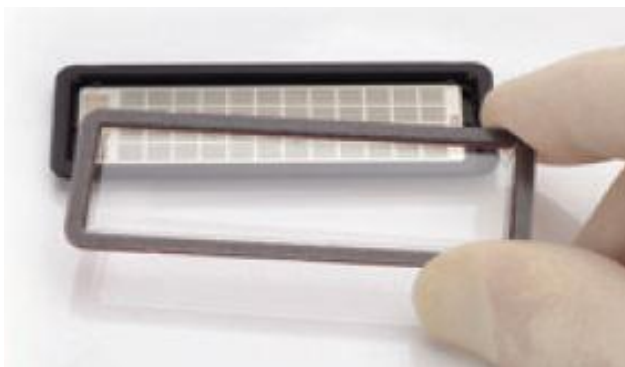
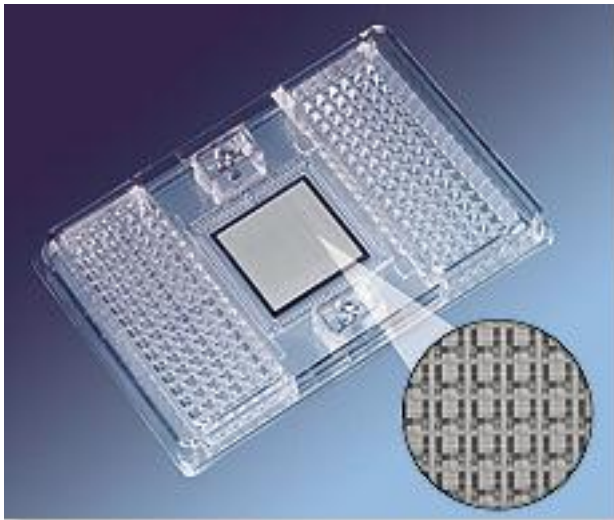


Quantstudio Lifetech
4 x 2700 points de dosage/run
7 nanoL/point



Biomark Fluidigm
9216 points de dosage/run
10 nanoL/point

QPCR Haut Débit-nanovolume-2



QPCR en nanovolume (7-10nanoL)

- Nanocircuits ou nanopuits
- Pas d'utilisation de robot de pipetage
- Faible consommation de master mix et sonde
- Peu de matrice nécessaire (5ng)
- 2 formats : 48X48 ou 96X96
- Très nombreux protocoles :
 - Single cell
 - miRNAs
 - Plus d'échantillons sur moins de gènes
 - Toutes chimies compatibles

QPCR Haut Débit-nanovolume-3

EXPRESSION

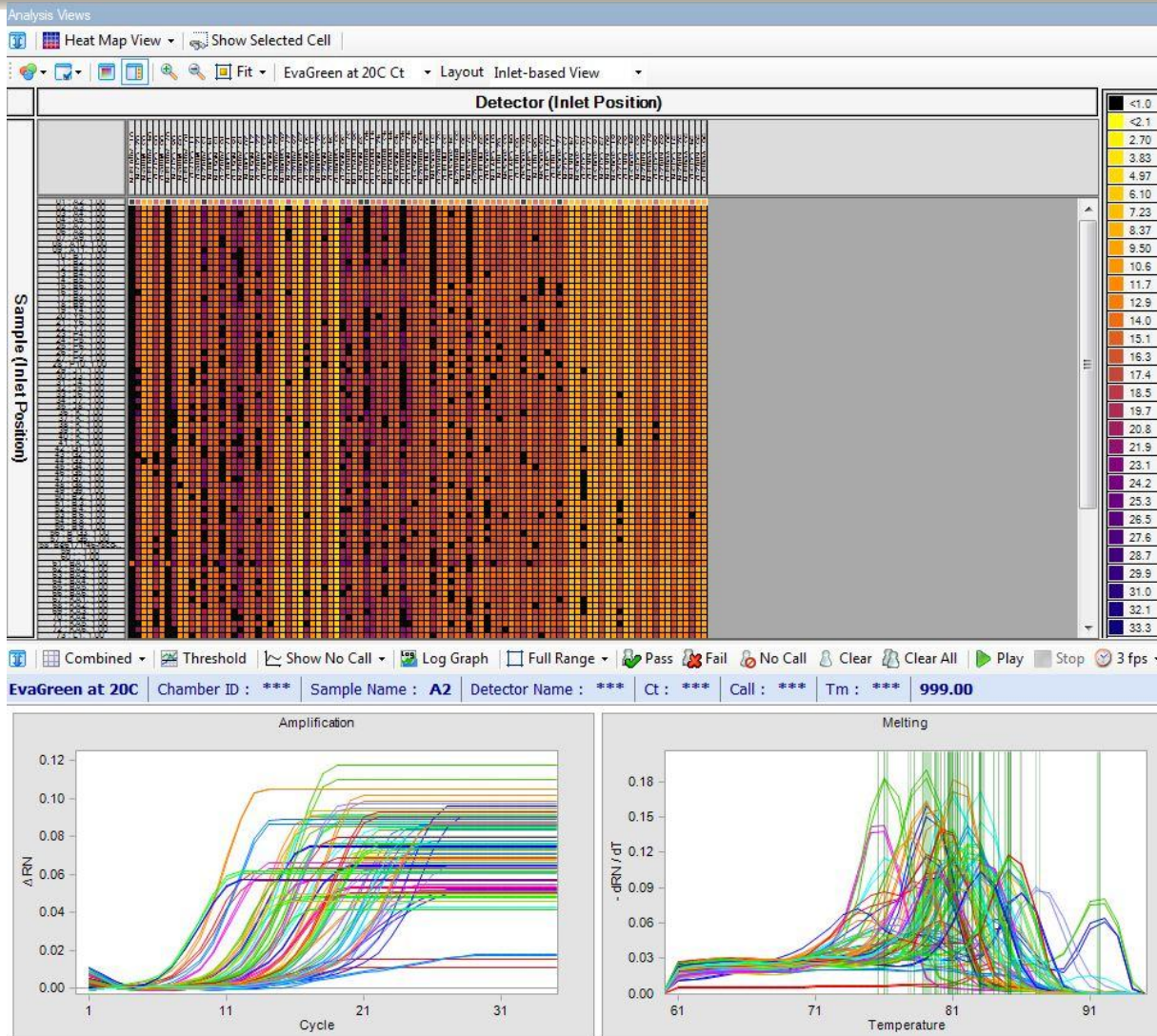
96 gènes x 96 échantillons
5ng RNAs / 96 dosages

385µL master mix

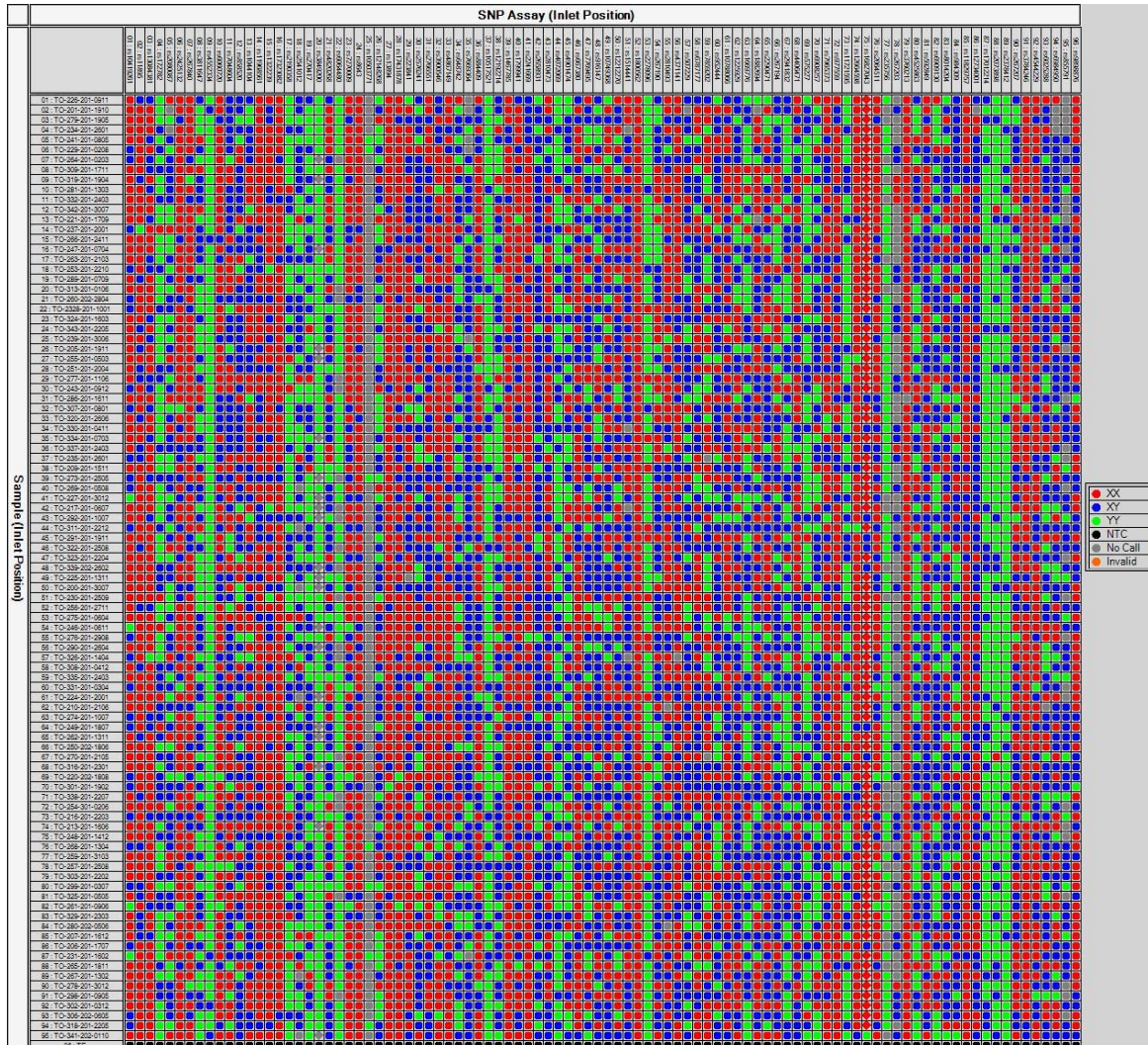
Toutes Chimies

- Taqman
- SybrGreen
- Evagreen
- UPL
- etc....

9216 ou 2034 points en 5h
Exemple: 20 échantillons en double
 + gamme efficacité sur 7 points + T Neg
 Sur 48 gènes d'intérêt sur 1 manip.



QPCR Haut Débit-nanovolume-4



GENOTYPAGE

96 SNPs x 96 échantillons
 5ng DNA / 96 dosages
 360µL master mix
 Toutes Chimies
 -Taqman
 - Kaspar
 - Fluidigm
 - etc....
 9216 points en 5h

Bilan et Conseils

- Apportez beaucoup de soin à la mise au point et à la validation de votre QPCR (Oligos, efficacité, robustesse).
- Soyez très rigoureux sur le choix de vos gènes de normalisation (nombre).
- Soyez vigilants aux paramétrages de vos machines QPCR
- Paramétrez correctement vos plans de plaque avant de lancer une analyse (puits vides, type de fluorescence, contrôles..)
- Quand un signal est faible et peu reproductible toujours pensez à diluer la matrice plutôt qu'à en augmenter la concentration.

ET SURTOUT...REGARDEZ VOS RESULTATS (COURBES D'AMPLIFICATION, COURBES DE DISSOCIATION, NIVEAU DE FLUORESCENCE DE LA REFERENCE PASSIVE,.....)

NE TRAVAILLER JAMAIS SUR LES Cts BRUTS EXPORTES A LA FIN DE LA PCR.

Quelques références:

PROTOCOL

Quantification of mRNA using real-time RT-PCR

Tania Nolan¹, Rebecca E Hands² & Stephen A Bustin²

¹Sigma-Aldrich, Homefield Road, Haverhill, UK. ²Institute of Cell and Molecular Science, Barts and the London, Queen Mary's School of Medicine and Dentistry, University of London, Whitechapel, London E1 1BB, UK. Correspondence should be addressed to S.A.B. (s.a.bustin@qmul.ac.uk).

Published online 9 November 2006; doi:10.1038/nprot.2006.236

Clinical Chemistry 55:4
611–622 (2009)

Special Report

The MIQE Guidelines: Minimum Information for Publication of Quantitative Real-Time PCR Experiments

Stephen A. Bustin,^{1*} Vladimir Benes,² Jeremy A. Garson,^{3,4} Jan Hellemsans,⁵ Jim Huggett,⁶
Mikael Kubista,^{7,8} Reinhold Mueller,⁹ Tania Nolan,¹⁰ Michael W. Pfaffl,¹¹ Gregory L. Shipley,¹²
Jo Vandesompele,⁵ and Carl T. Wittwer^{13,14}

Nucleic Acids Research Advance Access published January 6, 2012

Nucleic Acids Research, 2012, 1–10
doi:10.1093/nar/gkr1259

Correction of RT-qPCR data for genomic DNA-derived signals with ValidPrime

Henrik Laurell^{1,*}, Jason S. Iacovoni¹, Anne Abot¹, David Svec^{2,3}, Jean-José Maoret^{1,4},
Jean-François Amal^{1,5} and Mikael Kubista^{2,3}

¹Inserm/Université Paul Sabatier UMR1048, Institut des Maladies Métaboliques et Cardiovasculaires (I2MC), BP84225, 31432 Toulouse cedex 4, France, ²Laboratory of Gene Expression, Institute of Biotechnology, Academy of Sciences of the Czech Republic, Prague, ³TATAA Biocenter AB, Göteborg, Sweden, ⁴Plateforme GeT (Génome et Transcriptome) du Génopole Toulouse, Toulouse, France and ⁵Faculté de Médecine, Université de Toulouse III and CHU de Toulouse

Contacts:



GeT-TQ@genotoul.fr



jean-jose.maoret@inserm.fr



frederic.martins@inserm.fr




Pour toutes précisions sur ValidPrim:
Henrik.Laurell@inserm.fr

Logiciels d'analyses à disposition sur le plateau

- **ViiA7 Software v1.2 (Lifetech)** 

- **Fluidigm Real-Time PCR Analysis v3.0** 

- **DataAssist v3.0 (Lifetech)** 

- **GenEx Enterprise v5** 

Logiciels d'analyses à disposition sur le plateau

ViiA7 Software v1.2



- **Avantages :**
 - Suivi simplifié de la discrimination allélique (SNP)**
 - Exportation des données en RDML (MIQE)**
- **Inconvénients :**
 - Logiciel dédié aux runs ViiA7**

Logiciels d'analyses à disposition sur le plateau

Fluidigm Real-Time PCR Analysis v3.0



- **Avantages :**

- **Permet l'analyse de 9216 points QPCR (puce 96*96) sous forme de Heat Map**

- **Facilité de paramétrage et d'utilisation**

- **Exclusion des points à partir des dissociations**

- **Inconvénients :**

- **Donne seulement la pente des courbes standards, pas de calcul de l'efficacité**

- **Normalisation avec un seul gène de référence**

- **Logiciel dédié aux runs BioMark**

Logiciels d'analyses à disposition sur le plateau

DataAssist v3.0



- **Avantages :**

- Analyse de tous les fichiers issus de runs Applied**

- Vérification de la stabilité des gènes**

- Travail sur des groupes biologiques**

- Exportation graphique des données**

- **Inconvénients :**

- Aucun moyen de vérifier l'efficacité**

- Interface peu conviviale**

Logiciels d'analyses à disposition sur le plateau

GenEx Enterprise v5



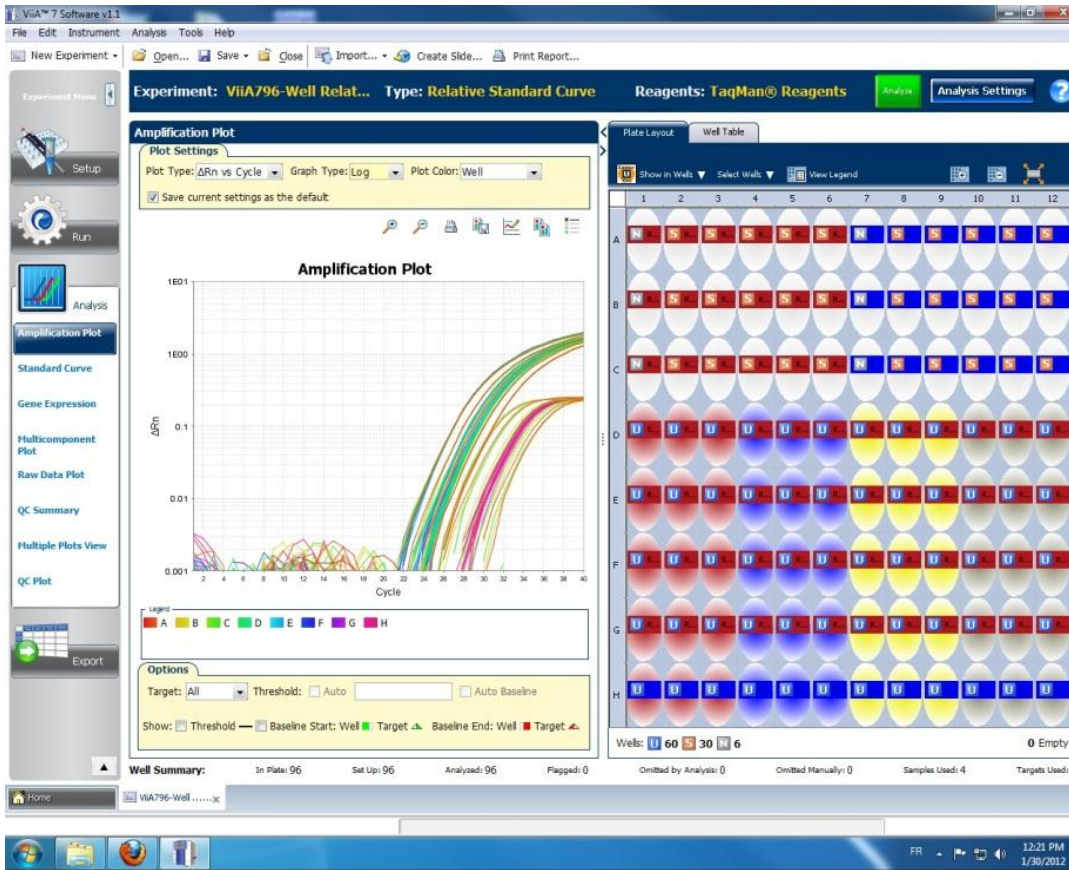
- **Avantages :**

Analyse de fichiers issus des machines Applied, Agilent, Biorad, Corbett, Eppendorf, Fluidigm, Roche, Illumina
De très nombreux outils de pré-traitement des données (correction d'efficacité, moyenne des réplicats, Normalisations gènes et échantillon...)
Applications intégrées : geNorm, NormFinder, etc...

- **Inconvénients :**

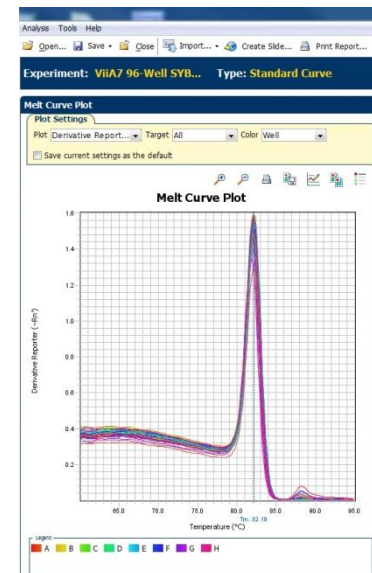
Difficultés de prise en main

ViiA7 software v1.2



Permet l'analyse de 96 ou 384 points PCR
 Visualisation :

- des courbes d'amplifications
- des courbes de dissociations



ViiA7 software v1.2

QC Summary

Analysis Tools Help

Open... Save Close Import... Create Slide... Print Report...

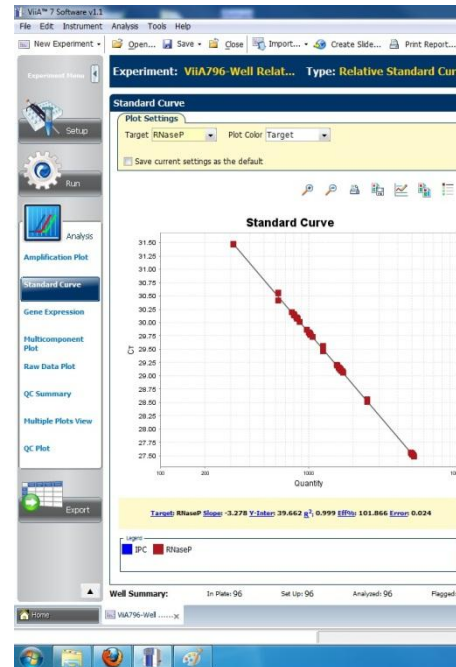
Experiment: **ViiA7 96-Well SYB...** Type: **Standard Curve**

QC Summary

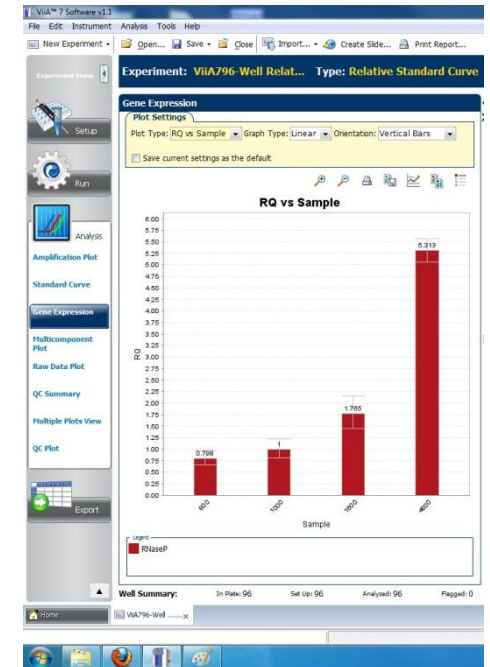
Flag Details

Flag:	Description	Frequency	Wells
AMPNC	Amplification in negative control	0	
BADROX	Bad passive reference signal	0	
OFFSCALE	Fluorescence is offscale	0	
HIGHSD	High standard deviation in replicate group	0	
NOAMP	No amplification	0	
NOISE	Noise higher than others in plate	0	
SPIKE	Noise spikes	0	
NOSIGNAL	No signal in well	0	
OUTLIERRG	Outlier in replicate group	0	
EXPFAIL	Exponential algorithm failed	0	
BLFAIL	Baseline algorithm failed	0	
THOLDFAIL	Thresholding algorithm failed	0	
CTFAIL	Cr algorithm failed	0	
MTP	Multiple Tm peaks	0	

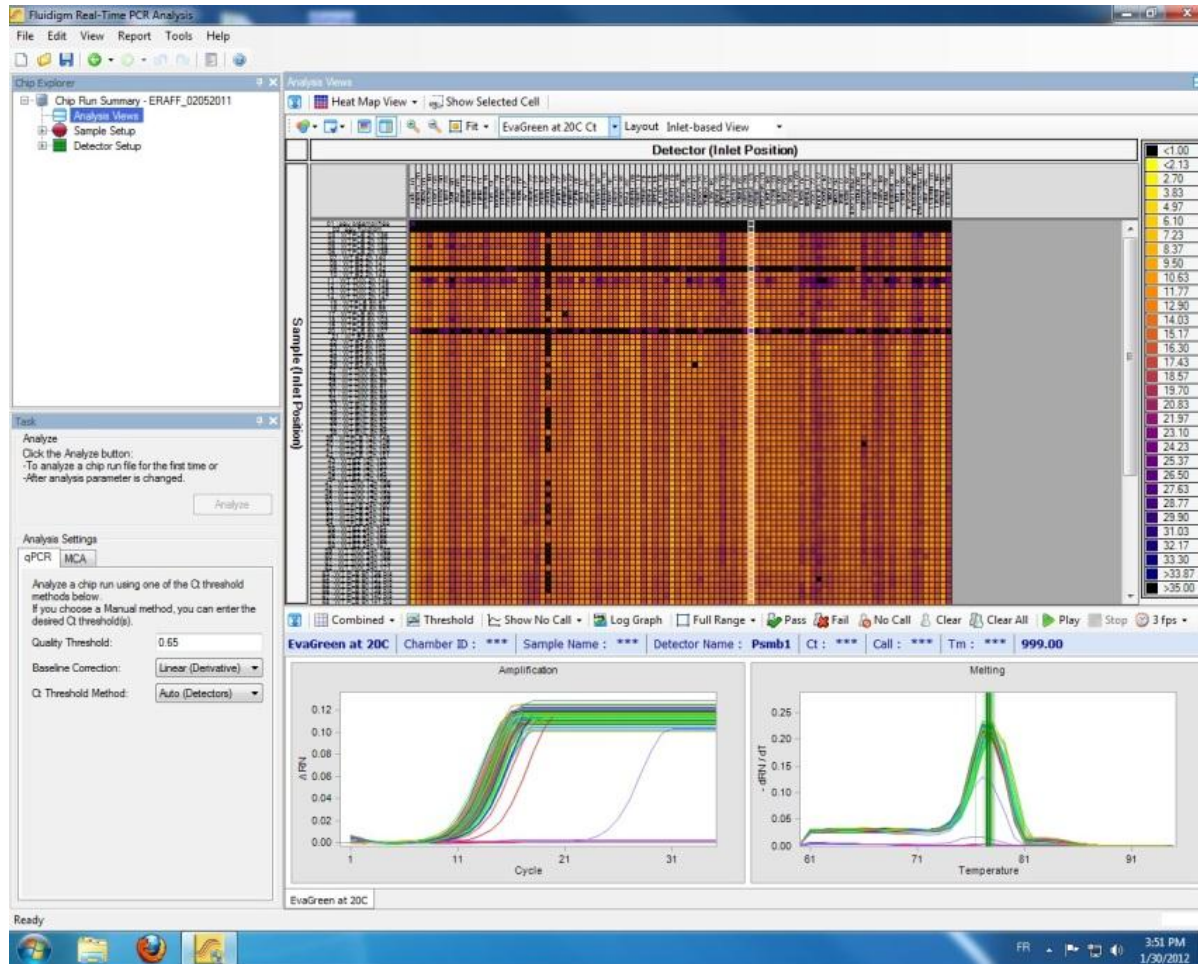
Calcul de l'efficacité de la PCR



Calcul des Fold Change ou RQ



Fluidigm Real-Time PCR Analysis v3.0

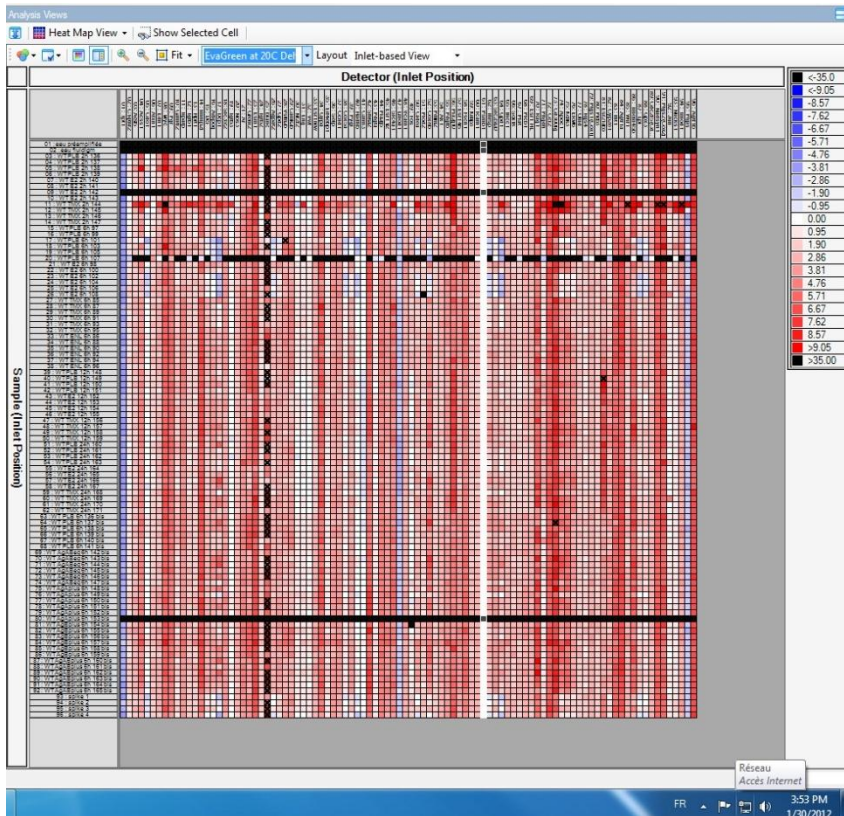


Visualisation :

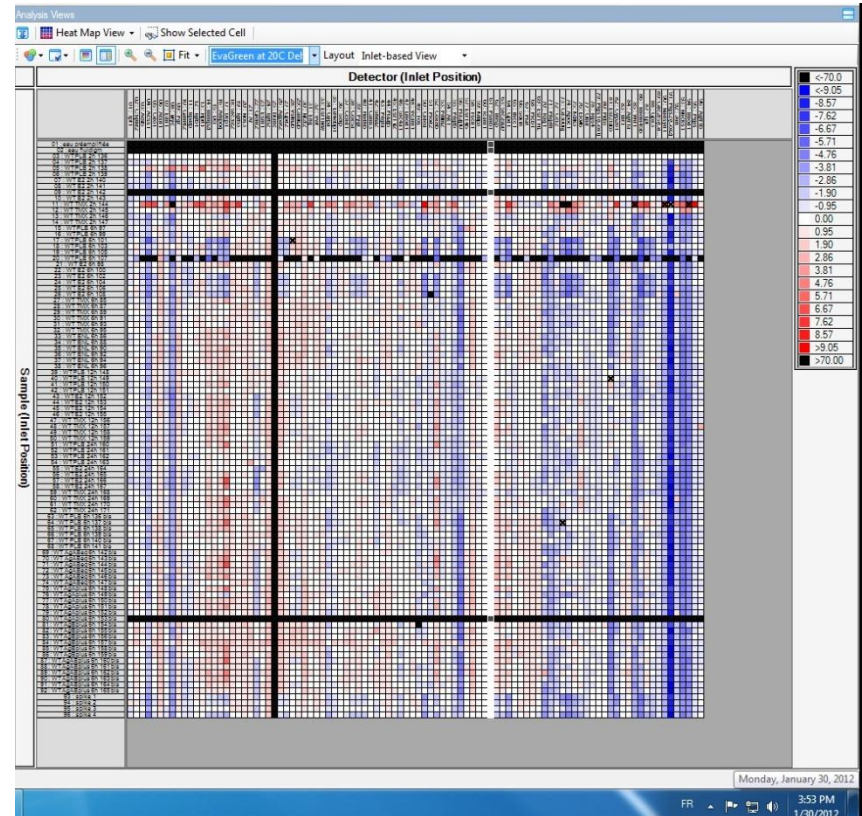
- Ct sous forme de Heat Map
- courbes d'amplifications
- courbes de dissociations

Fluidigm Real-Time PCR Analysis v3.0

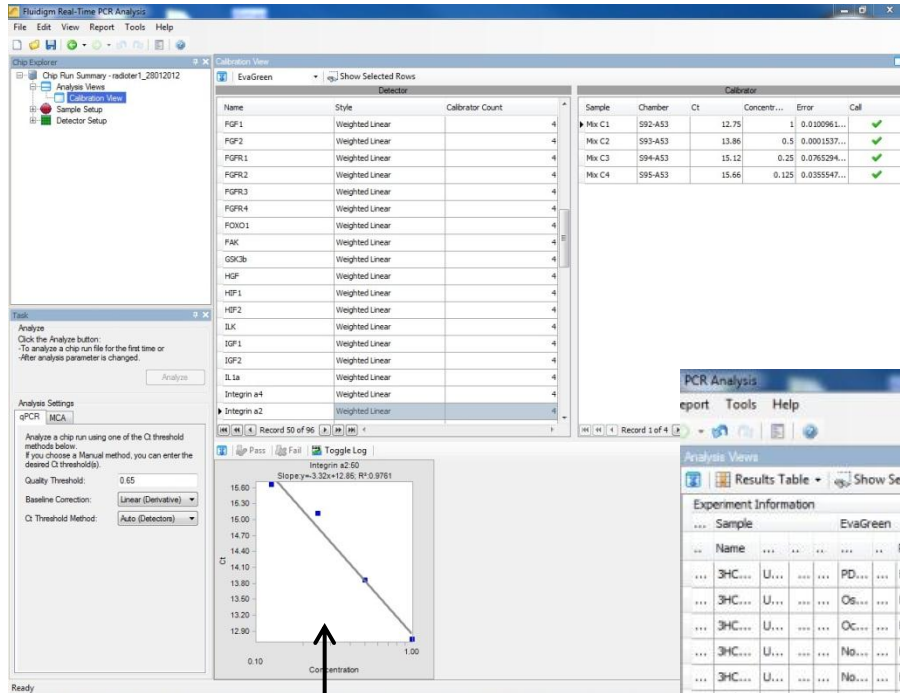
Delta Ct



Delta Delta Ct



Fluidigm Real-Time PCR Analysis v3.0



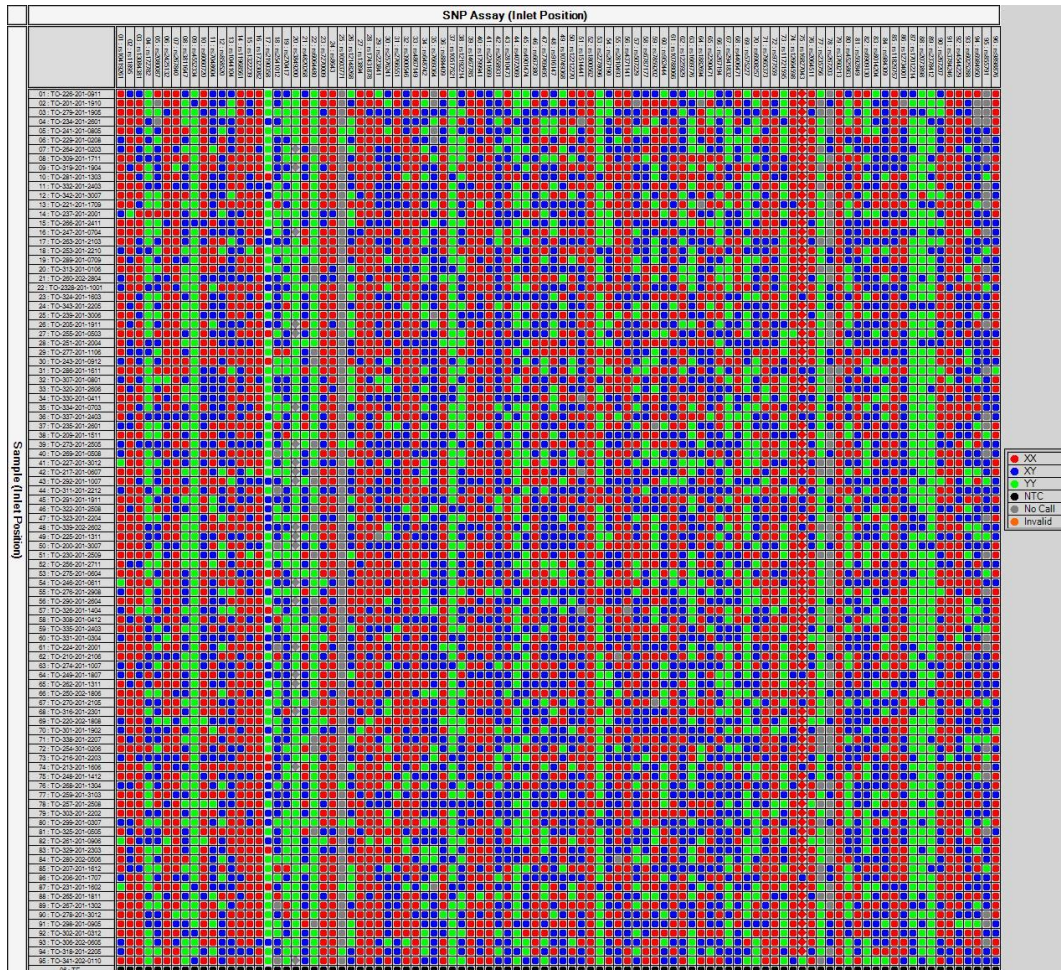
Courbes standards

Résultats sous forme de tableau exportable
 Ct, Delta Ct Sample, Delta Ct Reagent,
 Delta Delta Ct, Fold Change, Tm...

The screenshot shows the 'PCR Analysis Results Table' window. It displays a detailed table of results. The table has several columns grouped under 'Experiment Information', 'EvaGreen', 'Delta Ct Sample', 'Delta Ct Reagent', 'Delta Delta Ct', and 'Tm'. A black arrow points to the 'Delta Delta Ct' column. The table contains multiple rows of data, with some rows highlighted in blue. The bottom of the window shows 'Record 4443 of 9216'.

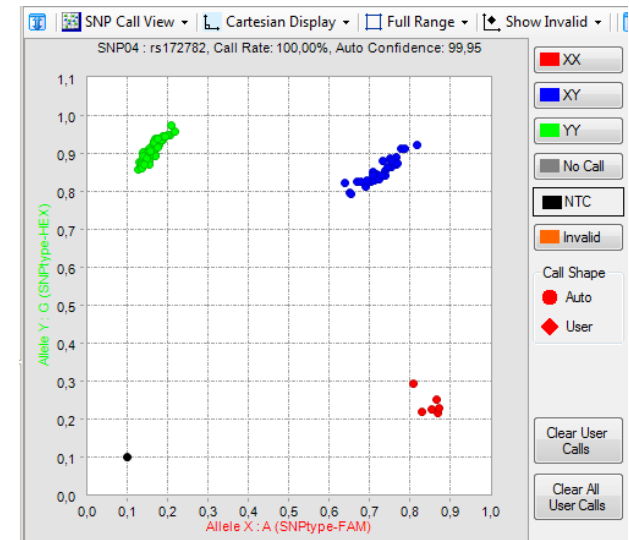
Experiment Information				EvaGreen			Delta Ct Sample			Delta Ct Reagent			Delta Delta Ct			Tm							
Sample	EvaGreen	EvaGreen	Ct	Value	Ca...	Q...	Call	Thre...	Value	Qu...	Call	Value	Qu...	Call	Fold Change	Quality	Call	In Range	Out Ra...	Peak ...			
...	3HC...	U...	...	PD...	HPRT	13.86	0.16	0.97	✓	0.008	-0.15	0.95	✓	-0.54	0.97	✓	-0.13	1.09307052	0.95	✓	79.74	999.00	1.00
...	3HC...	U...	...	Os...	HPRT	17.70	5.58	0.99	✓	0.008	1.27	0.95	✓	3.30	0.99	✓	1.29	0.41010737	0.95	✓	78.99	999.00	1.00
...	3HC...	U...	...	Oc...	HPRT	18.86	0.28	0.97	✓	0.010	1.00	0.97	✓	4.46	0.97	✓	1.02	0.49160950	0.97	✓	83.26	999.00	1.00
...	3HC...	U...	...	No...	HPRT	14.21	3.31	0.97	✓	0.011	0.32	0.97	✓	-0.19	0.97	✓	0.34	0.79185353	0.97	✓	87.27	999.00	1.00
...	3HC...	U...	...	No...	HPRT	13.35	1.07	0.98	✓	0.013	0.10	0.97	✓	-1.05	0.98	✓	0.12	0.92079051	0.97	✓	79.66	999.00	1.00
...	3HC...	U...	...	No...	HPRT	14.81	0.55	0.99	✓	0.010	0.68	0.98	✓	0.41	0.99	✓	0.70	0.61621386	0.97	✓	84.33	999.00	1.00
...	3HC...	U...	...	MU...	HPRT	13.99	2.50	0.80	✓	0.003	0.63	0.80	✓	-0.41	0.80	✓	0.65	0.63947005	0.80	✓	86.14	999.00	1.00
...	3HC...	U...	...	M...	HPRT	22.12	0.30	0.95	✓	0.009	-0.26	0.90	✓	7.71	0.95	✓	-0.24	1.18160285	0.90	✓	81.62	999.00	1.00
...	3HC...	U...	...	M...	HPRT	23.67	0.49	0.90	✓	0.008	3.31	0.90	✓	9.26	0.90	✓	3.33	0.09923911	0.90	✓	81.98	999.00	1.00
...	3HC...	U...	...	M...	HPRT	16.21	0.30	0.97	✓	0.010	0.83	0.96	✓	1.81	0.97	✓	0.85	0.55617958	0.96	✓	81.02	999.00	1.00
...	3HC...	U...	...	M...	HPRT	26.64	0.00	0.68	✗	0.009	3.69	0.68	✗	12.24	0.68	✗	3.71	0.07624365	0.68	✗	81.06	999.00	1.00
...	3HC...	U...	...	M...	HPRT	21.48	0.04	0.97	✓	0.009	-0.70	0.95	✓	7.07	0.97	✓	-0.68	1.59727685	0.95	✓	76.79	999.00	1.00
...	3HC...	U...	...	M...	HPRT	23.32	0.52	0.00	✗	0.010	1.91	0.00	✗	8.92	0.00	✗	1.93	0.26240984	0.00	✗	999.00	999.00	0.00
...	3HC...	U...	...	M...	HPRT	22.45	0.00	0.92	✓	0.010	2.02	0.92	✓	8.05	0.92	✓	2.04	0.24309499	0.92	✓	80.27	999.00	1.00
...	3HC...	U...	...	M...	HPRT	20.39	0.33	0.95	✓	0.007	-1.84	0.88	✓	5.98	0.95	✓	-1.82	3.52409354	0.88	✓	77.08	999.00	1.00
...	3HC...	U...	...	MET	HPRT	10.61	3.66	0.86	✓	0.011	0.37	0.86	✓	-3.79	0.86	✓	0.39	0.76548306	0.86	✓	81.10	999.00	1.00
...	3HC...	U...	...	PYK2	HPRT	15.32	1.19	0.97	✓	0.011	0.97	0.97	✓	0.92	0.97	✓	0.98	0.50524008	0.97	✓	84.66	999.00	1.00

Fluidigm Real-Time PCR Analysis v3.0



Génotypage SNP avec sondes :

- Kaspar
- Fluidigm
- Taqman
- etc...

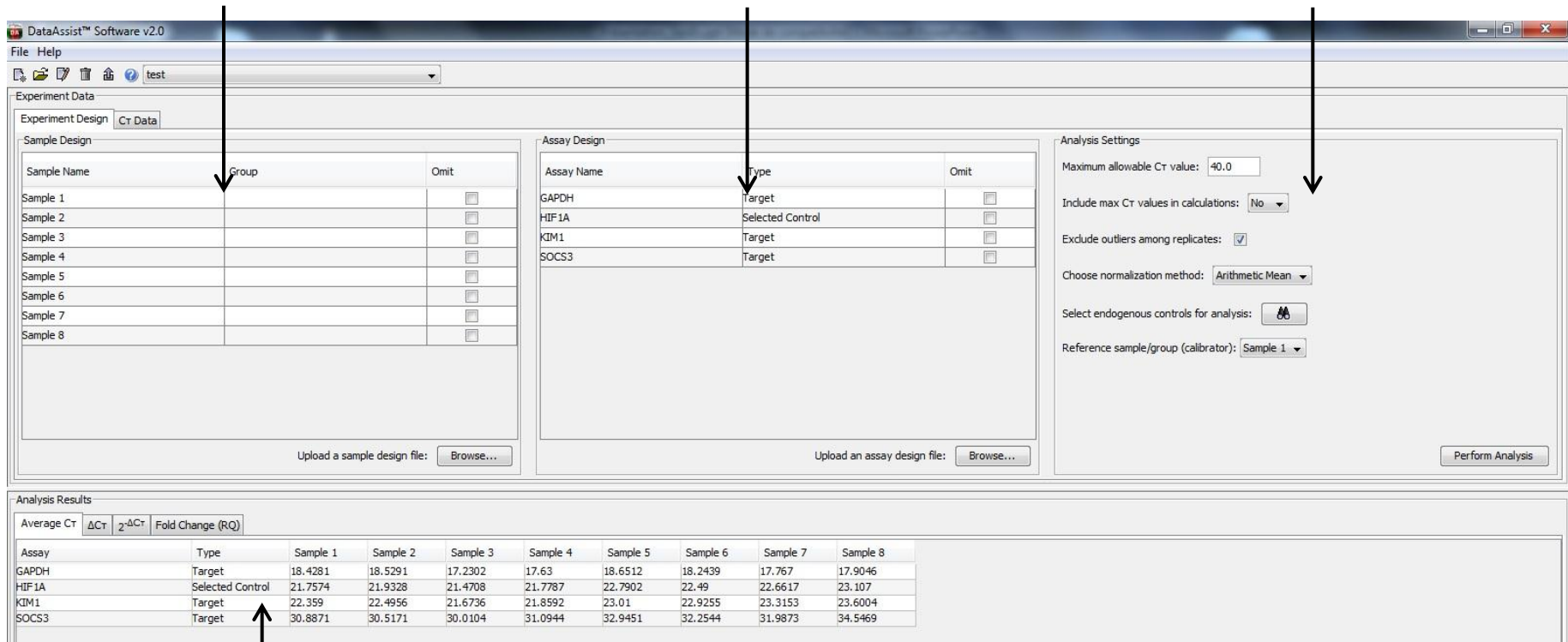


DataAssist v3.0

Echantillons

Gènes

Paramètres d'Analyses



The screenshot displays the DataAssist v3.0 software interface. It is divided into several sections:

- Experiment Data:** Contains 'Sample Design' and 'Assay Design' tables.
- Analysis Settings:** A panel on the right with various configuration options.
- Analysis Results:** A table at the bottom showing the results of the analysis.

Arrows from the labels above point to specific elements in the interface:

- 'Echantillons' points to the 'Sample Design' table.
- 'Gènes' points to the 'Assay Design' table.
- 'Paramètres d'Analyses' points to the 'Analysis Settings' panel.
- 'Résultats' points to the 'Analysis Results' table.

Sample Design Table:

Sample Name	Group	Omit
Sample 1		<input type="checkbox"/>
Sample 2		<input type="checkbox"/>
Sample 3		<input type="checkbox"/>
Sample 4		<input type="checkbox"/>
Sample 5		<input type="checkbox"/>
Sample 6		<input type="checkbox"/>
Sample 7		<input type="checkbox"/>
Sample 8		<input type="checkbox"/>

Assay Design Table:

Assay Name	Type	Omit
GAPDH	Target	<input type="checkbox"/>
HIF1A	Selected Control	<input type="checkbox"/>
KIM1	Target	<input type="checkbox"/>
SOCS3	Target	<input type="checkbox"/>

Analysis Settings:

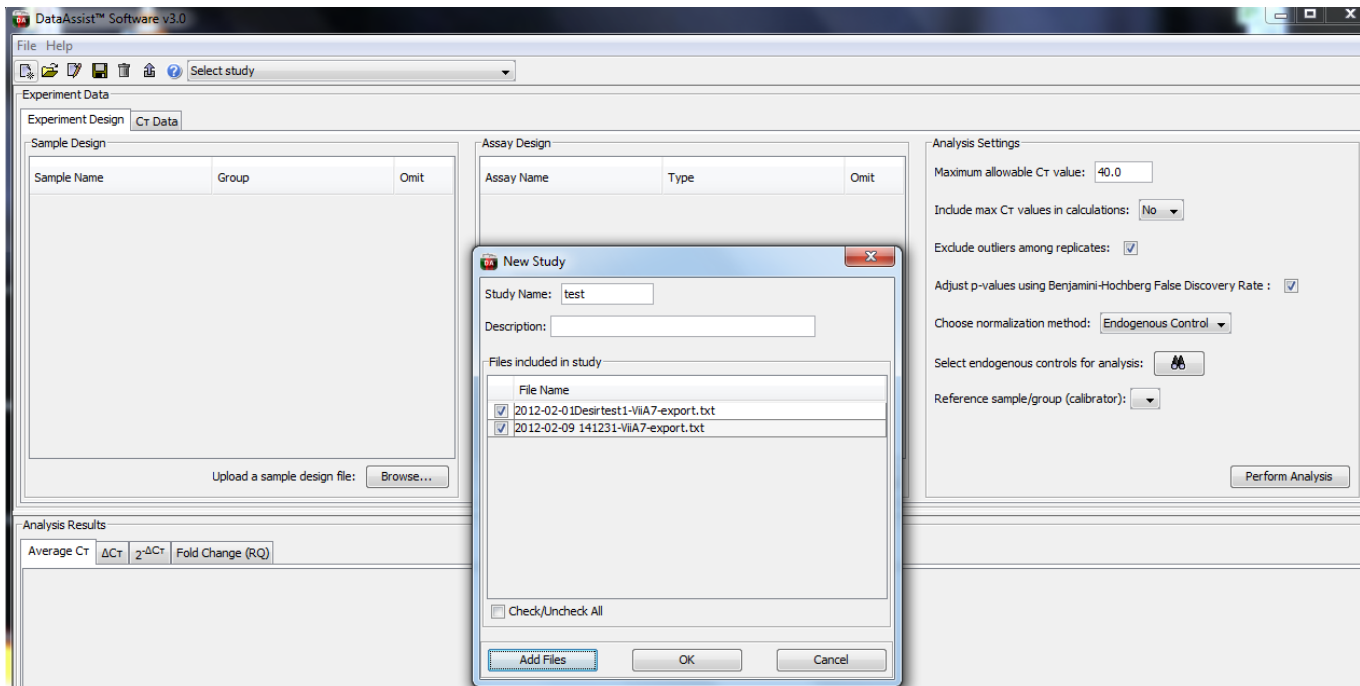
- Maximum allowable Ct value: 40.0
- Include max Ct values in calculations: No
- Exclude outliers among replicates:
- Choose normalization method: Arithmetic Mean
- Select endogenous controls for analysis:
- Reference sample/group (calibrator): Sample 1

Analysis Results Table:

Assay	Type	Sample 1	Sample 2	Sample 3	Sample 4	Sample 5	Sample 6	Sample 7	Sample 8
GAPDH	Target	18.4281	18.5291	17.2302	17.63	18.6512	18.2439	17.767	17.9046
HIF1A	Selected Control	21.7574	21.9328	21.4708	21.7787	22.7902	22.49	22.6617	23.107
KIM1	Target	22.359	22.4956	21.6736	21.8592	23.01	22.9255	23.3153	23.6004
SOCS3	Target	30.8871	30.5171	30.0104	31.0944	32.9451	32.2544	31.9873	34.5469

Résultats

Analyses de données issus de plusieurs runs (plaques)



DataAssist v3.0

DataAssist™ Software v2.0

File Help

Experiment Data

Experiment Design Cr Data

File Name	Well	Assay	Type	Sample	Group	Cr	Adjusted Cr	Omit
C:\Users\FRED\Desktop\Analyse_DataAssist\20110930 hk2 hypoxie hif ter_data.txt	A1	GAPDH	Target	Sample 1		18.0313	18.0313	
C:\Users\FRED\Desktop\Analyse_DataAssist\20110930 hk2 hypoxie hif ter_data.txt	A2	GAPDH	Target	Sample 1		17.9575	17.9575	
C:\Users\FRED\Desktop\Analyse_DataAssist\20110930 hk2 hypoxie hif ter_data.txt	A3	GAPDH	Target	Sample 1		19.2954	19.2954	
C:\Users\FRED\Desktop\Analyse_DataAssist\20110930 hk2 hypoxie hif ter_data.txt	C1	HIF1A	Selecte...	Sample 1		21.9082	21.9082	
C:\Users\FRED\Desktop\Analyse_DataAssist\20110930 hk2 hypoxie hif ter_data.txt	C2	HIF1A	Selecte...	Sample 1		21.6755	21.6755	
C:\Users\FRED\Desktop\Analyse_DataAssist\20110930 hk2 hypoxie hif ter_data.txt	C3	HIF1A	Selecte...	Sample 1		21.6884	21.6884	
C:\Users\FRED\Desktop\Analyse_DataAssist\20110930 hk2 hypoxie hif ter_data.txt	E1	KIM1	Target	Sample 1		22.2286	22.2286	
C:\Users\FRED\Desktop\Analyse_DataAssist\20110930 hk2 hypoxie hif ter_data.txt	E2	KIM1	Target	Sample 1		22.23	22.23	
C:\Users\FRED\Desktop\Analyse_DataAssist\20110930 hk2 hypoxie hif ter_data.txt	E3	KIM1	Target	Sample 1		22.6184	22.6184	x (outlier replicate)
C:\Users\FRED\Desktop\Analyse_DataAssist\20110930 hk2 hypoxie hif ter_data.txt	G1	SOC33	Target	Sample 1		31.1685	31.1685	
C:\Users\FRED\Desktop\Analyse_DataAssist\20110930 hk2 hypoxie hif ter_data.txt	G2	SOC33	Target	Sample 1		30.5512	30.5512	
C:\Users\FRED\Desktop\Analyse_DataAssist\20110930 hk2 hypoxie hif ter_data.txt	G3	SOC33	Target	Sample 1		30.9417	30.9417	
C:\Users\FRED\Desktop\Analyse_DataAssist\20110930 hk2 hypoxie hif ter_data.txt	A4	GAPDH	Target	Sample 2		18.4849	18.4849	
C:\Users\FRED\Desktop\Analyse_DataAssist\20110930 hk2 hypoxie hif ter_data.txt	A5	GAPDH	Target	Sample 2		18.7216	18.7216	
C:\Users\FRED\Desktop\Analyse_DataAssist\20110930 hk2 hypoxie hif ter_data.txt	A6	GAPDH	Target	Sample 2		18.3809	18.3809	
C:\Users\FRED\Desktop\Analyse_DataAssist\20110930 hk2 hypoxie hif ter_data.txt	C4	HIF1A	Selecte...	Sample 2		21.9567	21.9567	
C:\Users\FRED\Desktop\Analyse_DataAssist\20110930 hk2 hypoxie hif ter_data.txt	C5	HIF1A	Selecte...	Sample 2		21.9039	21.9039	
C:\Users\FRED\Desktop\Analyse_DataAssist\20110930 hk2 hypoxie hif ter_data.txt	C6	HIF1A	Selecte...	Sample 2		21.9378	21.9378	
C:\Users\FRED\Desktop\Analyse_DataAssist\20110930 hk2 hypoxie hif ter_data.txt	E4	KIM1	Target	Sample 2		22.354	22.354	
C:\Users\FRED\Desktop\Analyse_DataAssist\20110930 hk2 hypoxie hif ter_data.txt	E5	KIM1	Target	Sample 2		22.5121	22.5121	
C:\Users\FRED\Desktop\Analyse_DataAssist\20110930 hk2 hypoxie hif ter_data.txt	E6	KIM1	Target	Sample 2		22.6206	22.6206	
C:\Users\FRED\Desktop\Analyse_DataAssist\20110930 hk2 hypoxie hif ter_data.txt	G4	SOC33	Target	Sample 2		30.8779	30.8779	
C:\Users\FRED\Desktop\Analyse_DataAssist\20110930 hk2 hypoxie hif ter_data.txt	G5	SOC33	Target	Sample 2		30.806	30.806	
C:\Users\FRED\Desktop\Analyse_DataAssist\20110930 hk2 hypoxie hif ter_data.txt	G6	SOC33	Target	Sample 2		29.8675	29.8675	
C:\Users\FRED\Desktop\Analyse_DataAssist\20110930 hk2 hypoxie hif ter_data.txt	A7	GAPDH	Target	Sample 3		16.7267	16.7267	
C:\Users\FRED\Desktop\Analyse_DataAssist\20110930 hk2 hypoxie hif ter_data.txt	A8	GAPDH	Target	Sample 3		17.1676	17.1676	

Ct Data Table

Paramètres d'Analyses

Analysis Settings

Maximum allowable Ct value:

Include max Ct values in calculations:

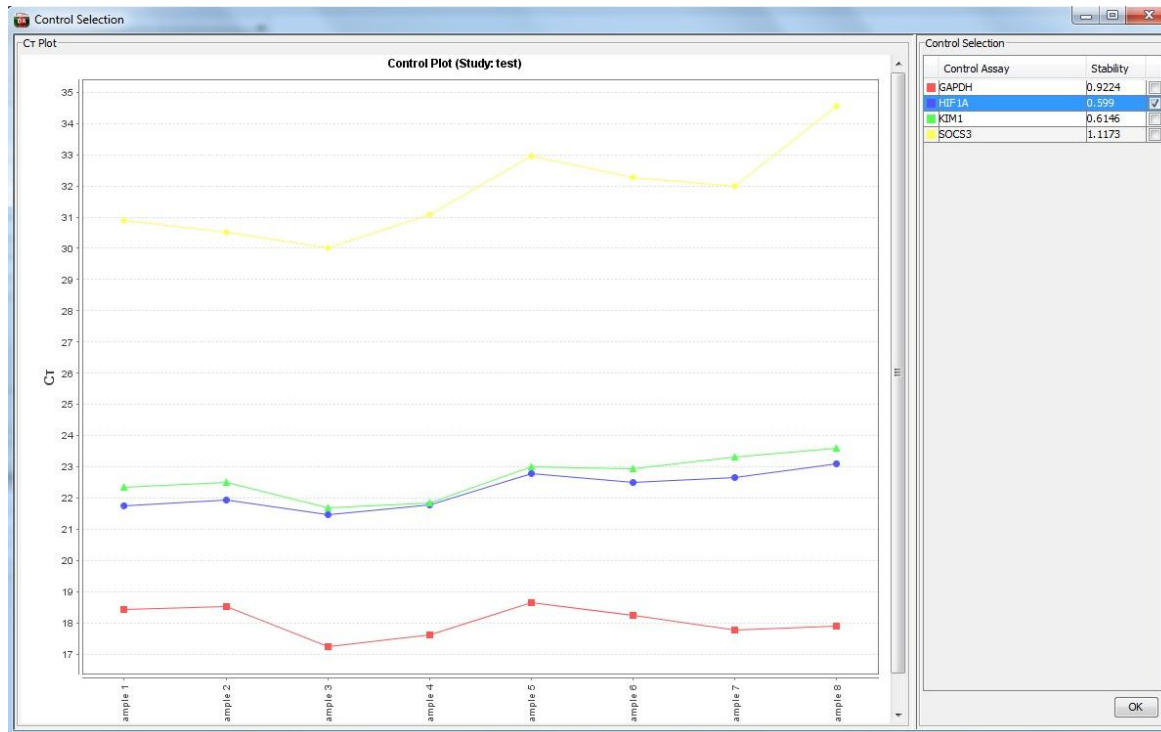
Exclude outliers among replicates:

Choose normalization method:

Select endogenous controls for analysis:

Reference sample/group (calibrator):

DataAssist v3.0



Vérification de la stabilité des gènes de références en terme de Ct

Calcul de la moyenne des Ct

Analysis Results									
Average Ct	ΔCt	$2^{-\Delta Ct}$	Fold Change (RQ)						
Assay	Type	Sample 1	Sample 2	Sample 3	Sample 4	Sample 5	Sample 6	Sample 7	Sample 8
GAPDH	Target	18.4281	18.5291	17.2302	17.63	18.6512	18.2439	17.767	17.9046
HIF1A	Selected Control	21.7574	21.9328	21.4708	21.7787	22.7902	22.49	22.6617	23.107
KIM1	Target	22.359	22.4956	21.6736	21.8592	23.01	22.9255	23.3153	23.6004
SOCS3	Target	30.8871	30.5171	30.0104	31.0944	32.9451	32.2544	31.9873	34.5469

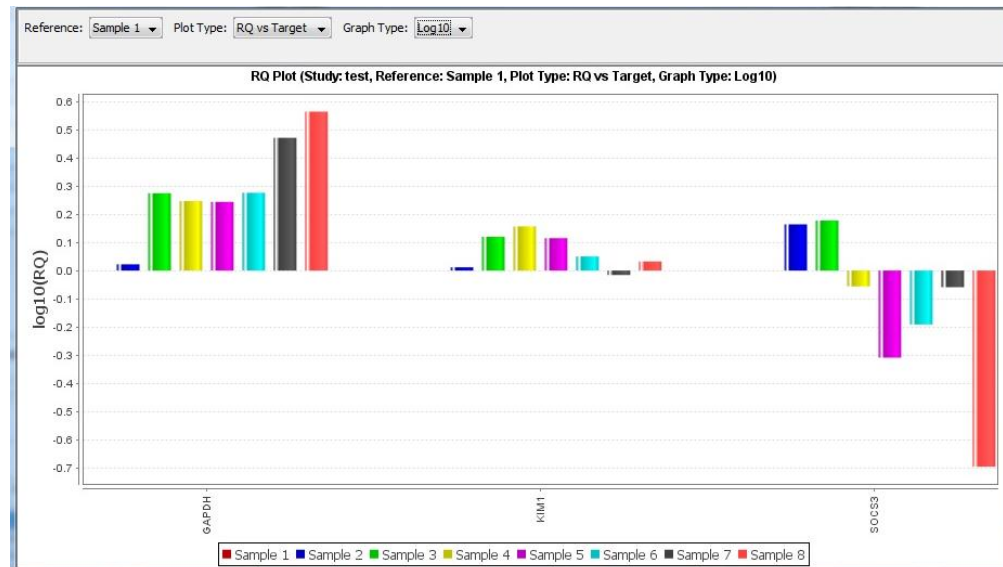
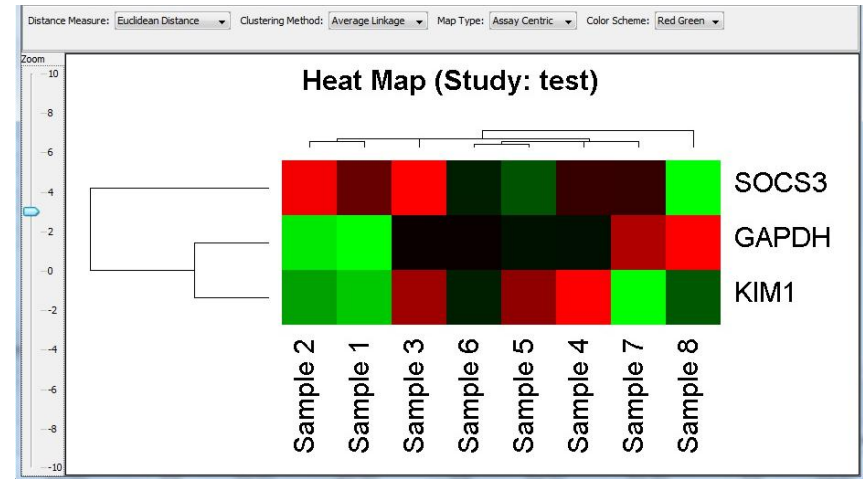
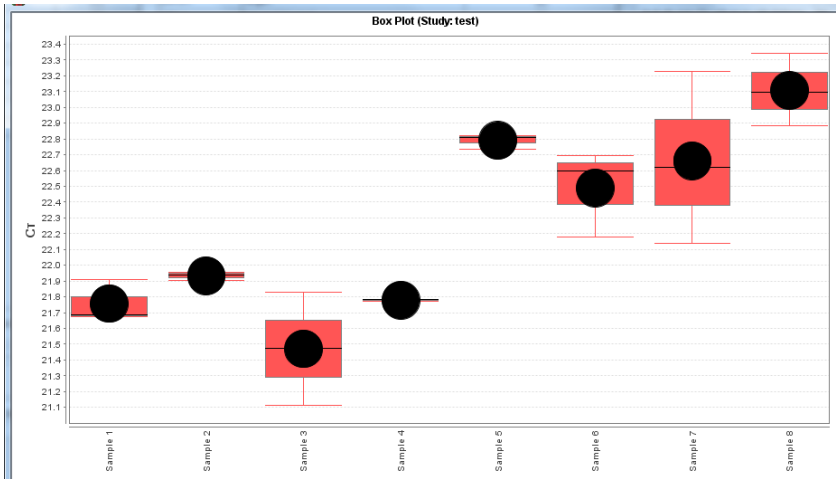
Calcul des Delta Ct

Analysis Results									
Average Ct	ΔCt	$2^{-\Delta Ct}$	Fold Change (RQ)						
Assay	Type	Sample 1	Sample 2	Sample 3	Sample 4	Sample 5	Sample 6	Sample 7	Sample 8
GAPDH	Target	-3.3293 ± 0.752	-3.4037 ± 0.1746	-4.2406 ± 0.5375	-4.1487 ± 0.3051	-4.1391 ± 0.561	-4.2461 ± 0.1085	-4.8947 ± 0.2522	-5.2024 ± 0.1928
HIF1A	Selected Control	0.0 ± 0.1308	0.0 ± 0.0268	0.0 ± 0.3577	0.0 ± 0.0065	0.0 ± 0.0461	0.0 ± 0.275	0.0 ± 0.5473	0.0 ± 0.2307
KIM1	Target	0.6016 ± 0.2246	0.5628 ± 0.1341	0.2028 ± 0.2559	0.0805 ± 0.1153	0.2198 ± 0.0429	0.4355 ± 0.0974	0.6536 ± 0.0367	0.4934 ± 0.0354
SOCS3	Target	9.1298 ± 0.3122	8.5843 ± 0.5637	8.5396 ± 0.6869	9.3157 ± 1.3424	10.1548 ± 0.6059	9.7644 ± 1.6693	9.3256 ± 0.65	11.44 ± 2.0096

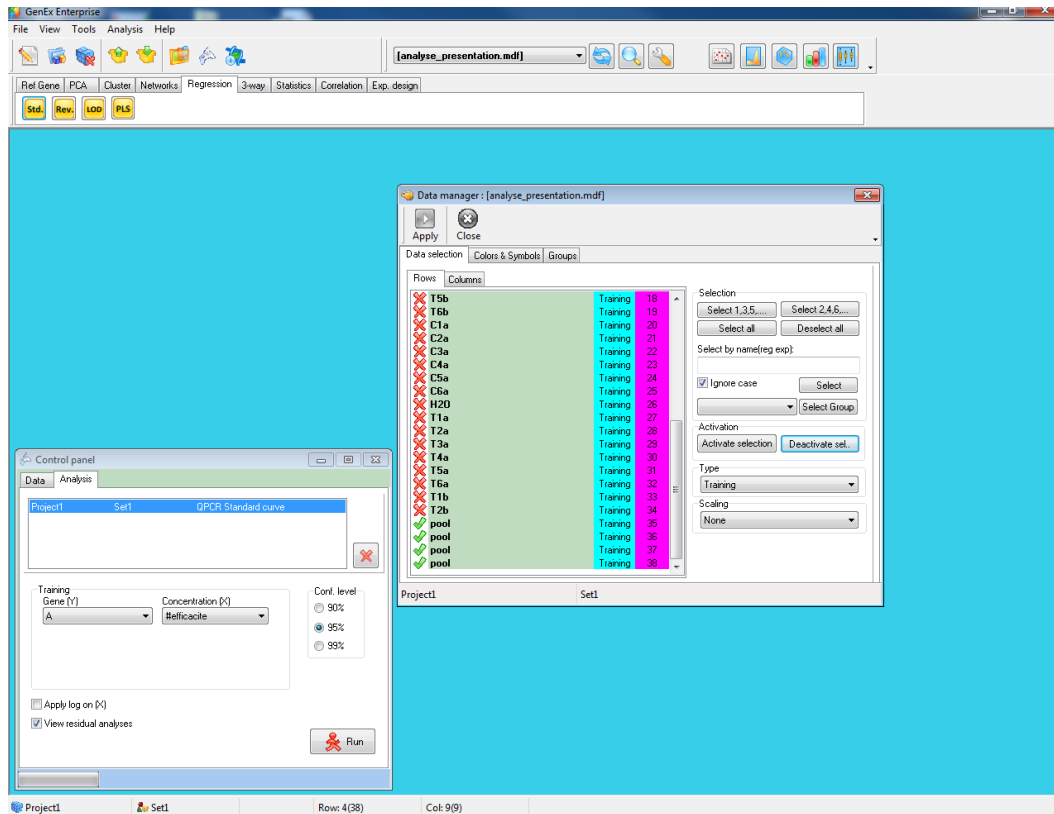
Calcul des Fold Change (RQ)

Analysis Results													
Average Ct	ΔCt	$2^{-\Delta Ct}$	Fold Change (RQ)										
Assay	Type	Sample 1 (RQ)	Sample 1 (RQ Min)	Sample 1 (RQ Max)	Sample 2 (RQ)	Sample 2 (RQ Min)	Sample 2 (RQ Max)	Sample 3 (RQ)	Sample 3 (RQ Min)	Sample 3 (RQ Max)	Sample 4 (RQ)	Sample 4 (RQ Min)	Sample 4 (RQ Max)
HIF1A	Selected Control	1.0	0.9133	1.0949	1.0	0.9816	1.0187	1.0	0.7804	1.2813	1.0	0.9955	1.0045
GAPDH	Target	1.0	0.5938	1.6842	1.0529	0.9329	1.1884	1.8808	1.2958	2.7298	1.7646	1.4282	2.1802
KIM1	Target	1.0	0.8558	1.1685	1.0273	0.9361	1.1273	1.3184	1.1041	1.5743	1.435	1.3248	1.5545
SOCS3	Target	1.0	0.8054	1.2416	1.4595	0.9874	2.1572	1.5054	0.9351	2.4235	0.8791	0.3467	2.229

DataAssist v3.0

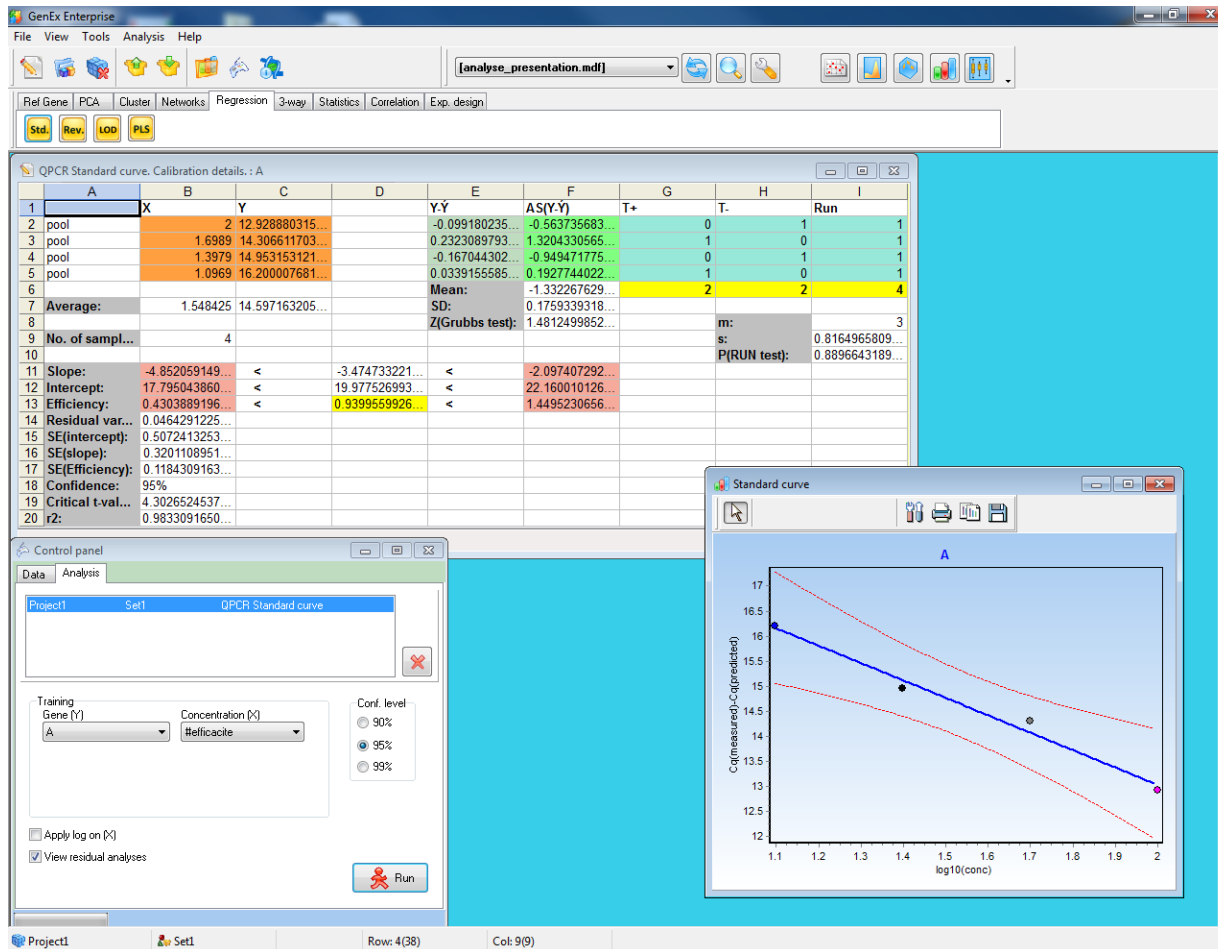


GenEx Enterprise v5.0



DataManager :
 Création de groupes
 Activer/inactiver échantillons ou
 gènes

GenEx Enterprise v5.0



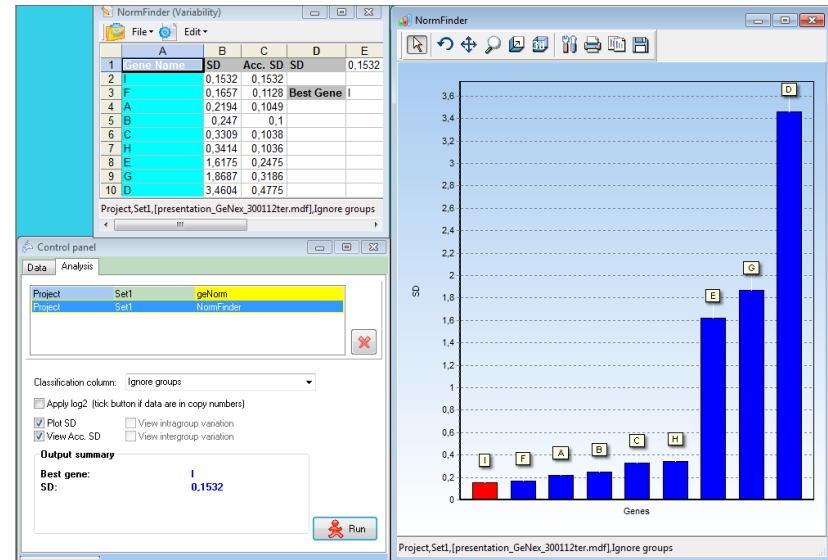
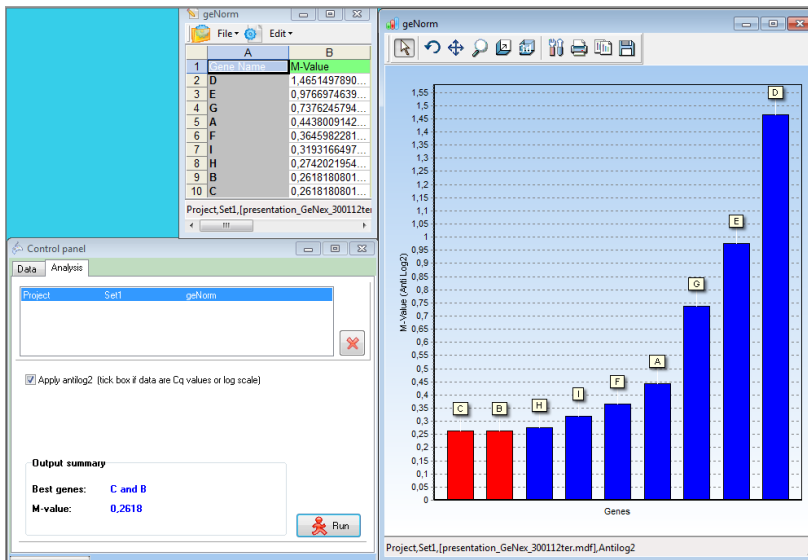
Détermination de l'efficacité de chaque couple d'amorces

GenEx Enterprise v5.0

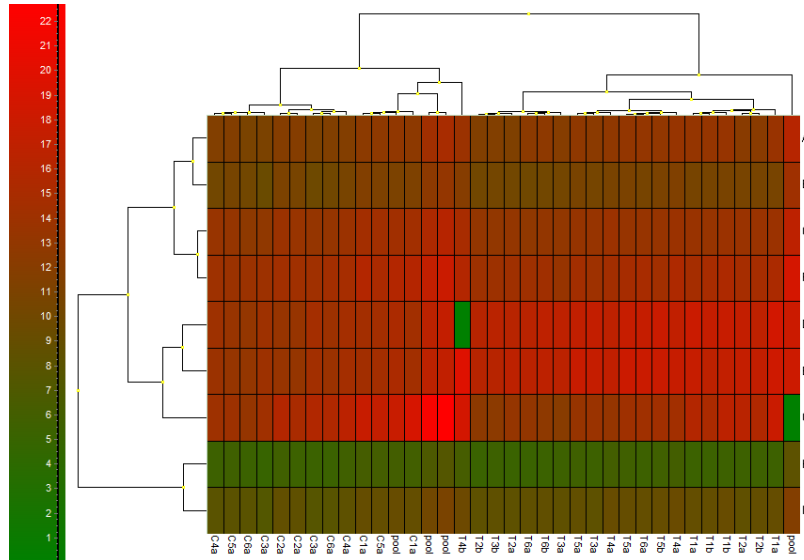
Détermination du/des gène(s) de référence(s) grâce à 2 logiciels

GeNorm

NormFinder

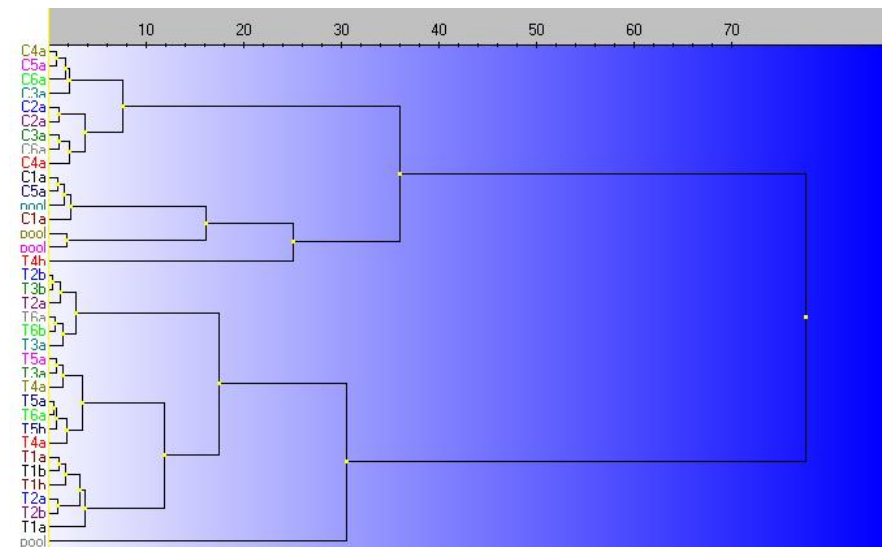


GenEx Enterprise v5.0

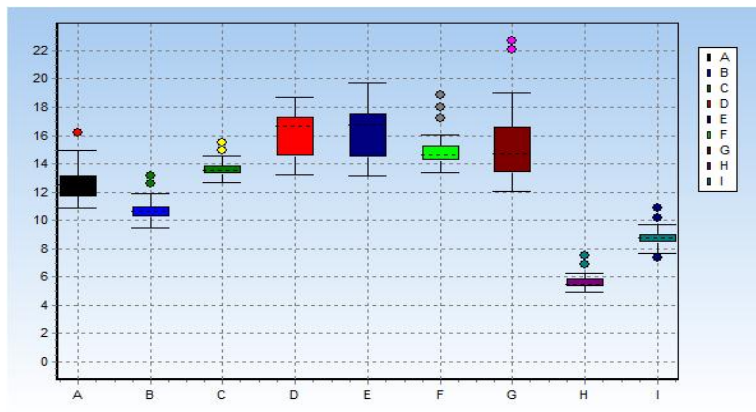


HeatMap

Dendrogramme



Plot



Pipeline en projet

Développement d'un script dans R

...
Statistiques
...

Choix
nombre
échantillons
par groupe,
nombre de
gènes à
tester...

Reverse
Transcription

Choix
des
amorces
et du kit
de QPCR

Test
efficacité
spécificité

Choix des
gènes de
références

Choix de la
technologie
appropriée

QPCR

Analyse
des
résultats et
validation