

[**Considerations for normalisation of RT-qPCR in
oncology**]

Alexandre Ho-Pun-Cheung, Dominic Cellier, Evelyne Lopez-Crapez

► **To cite this version:**

Alexandre Ho-Pun-Cheung, Dominic Cellier, Evelyne Lopez-Crapez. [Considerations for normalisation of RT-qPCR in oncology]. *Annales de Biologie Clinique*, John Libbey Eurotext, 2009, 66 (2), pp.121-9. <10.1684/abc.2008.0204>. <inserm-00396192>

HAL Id: inserm-00396192

<http://www.hal.inserm.fr/inserm-00396192>

Submitted on 19 Jun 2009

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

Figure 1. Principe de la quantification par RT-qPCR. La figure représente les cinétiques d'amplification obtenues pour l'ARN ribosomique 18S. Cinq dilutions sériées au 1/10 d'un ADNc obtenu à partir de cellules épithéliales humaines ont été amplifiées dans une même expérience. A chaque cycle d'amplification de PCR, la quantité d'amplicons est mesurée grâce à un marqueur fluorescent. Le suivi de la fluorescence émise au cours du temps permet d'obtenir une cinétique d'amplification. Un seuil situé dans la phase exponentielle d'amplification est fixé, et le nombre de cycles requis pour atteindre ce seuil, le C_T (de l'anglais *cycle threshold* pour "cycle du seuil"), est défini. Ce C_T est inversement proportionnel à la quantité de cible initialement présente dans l'échantillon.

Tableau 1. Gènes de référence candidats étudiés en cancérologie.

Abréviation	Nom du gène	N° Genbank
18S	18S ribosomal RNA	X03205
28S	28S ribosomal RNA	M11167
ABL1	V-abl Abelson murine leukaemia viral oncogene homologue 1	NM_007313
ACTB	Beta-actin	NM_001101
ADA	Adenosine deaminase	NM_000022
AGPAT1	Lysophosphatidic acid acyltransferase	NM_006411
ALAS1	Aminolevulinate delta-synthase 1	NM_000688
ALB	Albumin	NM_000477
ATP6	ATP synthase 6	NC_001807
ATUB	Alpha tubulin	NM_006082
B2M	Beta-2-microglobulin	NM_004048
BGUS	Beta-glucuronidase	NM_000181
BTF3	Basic transcription factor 3	NM_001037637
BTUB	Beta-Tubulin	AF141349
CAPN2	Ca-activated neutral protease large subunit (calpain 2)	NM_001748
CETN2	Caltractin, centrin	NM_004344
CYCC	Cyclophilin C, (peptidylprolyl-isomerase C)	NM_000943
EEF1A1	Eukaryotic elongation factor 1 α 1	NM_001402
EEF1G	Eukaryotic translation elongation factor 1 γ	NM_001404
ESD	Esterase D/formylglutathione hydrolase	NM_001984
G6PDH	Glucose-6-phosphate dehydrogenase	NM_000402
GAPDH	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	NM_002046
HDAC10	Histone deacetylase	NM_032019
HIST1H2BC	Histone 1 H2bc	NM_003526
HPRT	Hypoxanthine phosphoribosyl transferase 1	NM_000194
HuTfR	Transferrin receptor	M11507
LMNB1	Lamin B1	NM_005573
MAN1B1	Mannosidase, alpha, class 1B	NM_016219
MBNL2	Muscleblind-like 2	NM_144778
MTR	5-methyltetrahydrofolate-homocystine methyltransferase	NM_000254
PBGD	Porphobilinogen deaminase	NM_000190
PGK1	Phosphoglycerate kinase 1	NM_000291
PMM1	Phosphomannomutase I	NM_002676
POLR2A	Polymerase RNA II polypeptide A	NM_000937
POLR2L	Polymerase RNA II polypeptide L	NM_021128
PPIA	Peptidylprolyl isomerase A (cyclophilin A)	NM_021130
PRKG1	Protein kinase, cGMP-dependent, type I	NM_006258
PSMB6	Proteasome subunit Y	NM_002798
QRRS	Glutamyl-tRNA synthetase	NM_005051
RPL13	Ribosomal protein L13	NM_000977
RPL13A	Ribosomal protein L13a	NM_012423
RPL30	Ribosomal protein L30	BC019014
RPL4	Ribosomal protein L4	NM_000968
RPLP0	Ribosomal protein, large, P0	NM_001002
RPS14	Ribosomal protein S14	NM_005617
S9	S9 ribosomal	NM_001013
SDHA	Succinate dehydrogenase complex, subunit A	NM_004168
SI	Sucrase-isomaltase (alpha-glucosidase)	NM_001041
TAF2	TAF2 RNA polymerase II, TATA box binding protein (TBP)-associated factor	NM_003184
TBP	TATA box binding protein	NM_003194
TfR	Transferrin receptor	NM_003234
TXNRD1	Thioredoxin reductase 1	NM_003330
UBC	Ubiquitin C	NM_021009
UBE2D2	Ubiquitin-conjugating enzyme E2D 2	NM_003339
YAP1	Yes-associated protein 1	NM_006106
YWHAZ	Tyrosine 3 /tryptophan 5-monooxygenase activation protein	NM_003406

Tableau 2. Stabilité de gènes de référence candidats dans diverses localisations cancéreuses.

Auteurs	Objet de l'étude	Matériel biologique	Quantification de l'ARN	Qualification de l'ARN	Contrôle d'inhibition	Gènes analysés	Gènes montrant le moins de variabilité
Gerard <i>et al.</i> 2000 [38]	Tumeurs solides : endomètre, vessie, utérus, rein, colon, foie, estomac, poumon, sein, pancréas, prostate, testicule	Nombre variable en fonction des tissus et des gènes analysés	A_{260}	?	—	ATP6, GAPDH, BGUS, 18S, PPIA	ATP6
Goidin <i>et al.</i> 2001 [28]	Mélanomes	2 sous-populations de cellules sélectionnées à partir d'une même tumeur	?	?	—	GAPDH, ACTB, 18S	18S
Lupberger <i>et al.</i> 2002 [40]	Leucocytes	Lignée leucémique (n=1), leucocytes du sang périphérique de différents tumeurs (n=10), préparation de leucocytes normaux (n=1)	?	(normalisation avec le nombre de cellules)	—	ACTB, B2M, PBGD	B2M
Blanquie <i>et al.</i> 2002 [27]	Carcinomes colorectaux et métastases hépatiques	10 patients : tumeurs primaires, métastases, et tissus sains appariés	A_{260}	Electrophorèse sur gel d'agarose	—	GAPDH, ACTB, S9, UBC, PPIA, BTUB, 18S, HPRT, B2M, TBP, RPLP0, HUITR, BGUS	Foie : 18S, GUS Colon : 18S, ACTB
Tricario <i>et al.</i> 2002 [10]	Cancers du sein	23 patients : tissus sains et tumoraux appariés	A_{260}	?	+	ACTB, PPIA, PGK, TBP, BGUS, GAPDH, TFR, RPLP0, B2M, 18S	Aucun
Lossos <i>et al.</i> 2003 [30]	Lymphomes et leucémies lymphocytaires	12 lignées cellulaires, 80 lymphomes, 2 amygdales normales	A_{260}	Bioanalyzer 2100	—	GAPDH, ACTB, 18S, B2M, PRKG1, HPRT, TBP, RPLP0, TFR, BGUS, PPIA (sur la plupart des patients, seuls PRKG1, TBP et GAPDH ont été analysés)	PRKG1, TBP
Aerts <i>et al.</i> 2004 [29]	Lignées cellulaires	Lignées leucémiques (n=2), de cancer du sein (n=2), de mélanomes (n=2), et embryonnaire (n=1)	?	?	+	18S, ACTB, PPIA, RPLP0, B2M, BGUS, HPRT, GAPDH, TFR, TBP, PGK1	18S, BGUS, ACTB
Fischer <i>et al.</i> 2005 [42]	Neuroblastomes	26 stades 1-3, 19 stades 4S, et 19 stades 4	A_{260}	Electrophorèse sur gel d'agarose	—	LMNB1, PBGD, PPIA, PGK1, SDHA, HPRT	SDHA + HPRT1 (moyenne géométrique)
Liu <i>et al.</i> 2005 [19]	Cancers du poumon	18 tumeurs primaires, 10 tissus sains, et 6 lignées cellulaires	A_{260}	?	—	ABL1, B2M, HPRT, GAPDH, PRKG1, PPIA, RPLP0	GAPDH
Ohl <i>et al.</i> 2005 [25]	Cancers de la prostate	17 carcinomes + tissus sains appariés	A_{260} (NanoDrop®)	Ratio A_{260}/A_{280} + mesure du RIN avec le Bioanalyzer 2100	—	ACTB, ALAS1, ALB, POLR2A, B2M, G6PDH, GAPDH, PBGD, HPRT, ATUB, PPIA, RPL13A, SDHA, TBP, UBC, YWHAZ	HPRT + ALAS1 + ATUB (combinés)
Rubie <i>et al.</i> 2005 [33]	Cancers colorectaux primaires et métastases hépatiques, cancers pancréatiques, gastriques, et de l'œsophage	10 patients pour chaque localisation : tissus sains et tumoraux appariés	A_{260}	Ratios A_{260}/A_{280} et A_{260}/A_{330} + électrophorèse sur gel d'agarose	—	GAPDH, ACTB, TXNRD1, PGK1, AGPAT1, PMM1, HPRT, CAPN2, POLR2L, TAF2, SDHA, HDAC10, PSMB6, CETN2, B2M, UBE2D2, QRRS, BGUS, CYCC, ADA, 18S	Foie: BGUS, PMM1, PSMB6, 18S Colon: PMM1, ACTB, PSMB6 Pancréas: 18S, QRRS0 Estomac: CAPN2, AGPAT1 Oesophage: GAPDH, CETN2, UBE2D2, POLR2L, PGK1, 18S
Neuvians <i>et al.</i> 2005 [43]	Séminomes	22 séminomes et 9 tissus testiculaires normaux	A_{260}	Ratio A_{260}/A_{280} et ratio 28S/18S avec le Bioanalyzer 2100	—	UBC, GAPDH, PBGD, ACTB, 18S	Aucun
de Kok <i>et al.</i> 2005 [34]	Cancers de la prostate, du colon, de la vessie, de la peau, et du sein	16 échantillons par organe : tissus sains et différents stades pathologiques	A_{260}	?	+	RPLP0, ACTB, PPIA, GAPDH, PGK1, B2M, BGUS, HPRT, TBP, TFR, PBGD, ATP6, 18S	HPRT (reflète l'expression moyenne de tous les autres, ATP6 et 18S ayant été exclus)
Dydensborg <i>et al.</i> 2006 [39]	Cancers du colon	7 patients : adénocarcinomes + marges des résections correspondantes	RiboGreen®	Electrophorèse sur gel d'agarose	—	B2M, POLR2A, ACTB, HPRT, RPLP0, RPS14, MAN1B1, MTR, GAPDH, SI	B2M
Silvia <i>et al.</i> 2006 [24]	Cancers du poumon non à petites cellules	18 patients : tissus sains et tumoraux appariés	Bioanalyzer 2100	?	—	ACTB, GAPDH, PGK1, PPIA, POLR2A, RPLP0, ESD, BTF3, HIST1H2BC, RPL30, YAP1, 18S	18S, POLR2A, ESD, YAP1
Steinau <i>et al.</i> 2006 [11]	Cancers de l'utérus	30 échantillons représentant le spectre des néoplasmes utérins pré-invasifs	Densitométrie des ARNr sur gel d'agarose	Spectrophotométrie + électrophorèse sur gel d'agarose	+	PGK1, RPL4, RPLP0, ACTB, EEF1A1, EEF1G, GAPDH, TBP, B2M, SDHA, MBNL2, 28S, 18S	ACTB

Sauf précision, la mesure de l'absorbance à 260nm (A_{260}) a été réalisée avec un spectrophotomètre conventionnel.