

[**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**

**<https://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 $\alpha$ 1                                | NM_001402    |
| EEF1G       | Eukaryotic translation elongation factor 1 $\gamma$                      | 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 différentes tumeurs (n=10), préparation de leucocytes normaux (n=1) | ?  | (normalisation avec le nombre de cellules)                                       | —                     | ACTB, B2M, PBGD   | B2M  |
| Blanquicett <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<br>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<br>Colon: PMM1, ACTB, PSMB6<br>Pancréas: 18S, QRRS0<br>Estomac: CAPN2, AGPAT1<br>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.