

Comment valider la méthode de RT-qPCR en détection SybrGreen ? Application à l'analyse de la réponse transcriptomique de *Campylobacter jejuni* soumis à un stress.

Sandrine Rezé¹, Sandrine Guillou¹, Nabila Haddad¹



Sandrine Rezé. Technicienne de Recherche et Formation à Oniris, à Nantes, au sein de l'UMR 1014 Secalim depuis 2011. J'exerce mon activité en microbiologie et biologie moléculaire dans les projets visant à comprendre le comportement des bactéries dans les aliments.



Sandrine Guillou. Ingénieur de Recherche et Directrice adjointe de l'unité Secalim. Scientifique dans le domaine de la sécurité microbiologique des aliments depuis plus de quinze ans, mes activités de recherche portent sur la compréhension et la quantification du comportement bactérien en réponse aux stress liés aux procédés, en utilisant la microbiologie prévisionnelle et l'appréciation des risques microbiologiques.



Nabila Haddad. Maître de Conférence en microbiologie alimentaire et sécurité microbiologique des denrées alimentaires à Oniris (Nantes) au sein de l'unité Secalim. Mes activités de recherche visent à investiguer et comprendre l'effet des stress environnementaux sur le comportement (survie, biofilm et virulence) de pathogènes alimentaires et plus spécifiquement *Campylobacter jejuni*.

Résumé. L'analyse transcriptionnelle via l'utilisation de la technique de RT-qPCR (Reverse Transcription couplée à la PCR quantitative) demeure largement utilisée malgré l'essor grandissant des techniques de séquençage haut débit. La RT-qPCR permet de quantifier le niveau des ARN messagers de gènes cibles reflétant ainsi le niveau d'expression de ces gènes. Elle a de nombreuses applications qui requièrent une forte exigence lors de sa mise au point. Cette technique nécessite la validation, une à une des différentes étapes de la procédure et de nombreux tests sont à effectuer en amont de l'expérimentation ainsi que des points de contrôle au cours de l'expérimentation. L'objectif de ce travail a été de décrire les différents points de contrôle et de détailler des points de vigilance à respecter lors de l'utilisation de la RT-qPCR. Depuis l'extraction des acides nucléiques jusqu'à l'analyse des résultats finaux, la validation des différentes étapes a démontré une méthode robuste et fiable pour la publication des travaux menés sur la réponse transcriptomique chez le pathogène bactérien *Campylobacter jejuni* soumis à un stress thermique.

¹ SECALIM, INRAE, Oniris, 44307 Nantes, France

Correspondance : SECALIM, INRAE, Oniris, UMR1014, Route de Gachet, CS 40706, 44307 Nantes cedex 3, France

Adresse mail : sandrine.reze@oniris-nantes.fr

Mots clés : RT-qPCR, ARN, qualité, validation

Abstract. The transcriptional analysis via the use of the RT-qPCR technique (Reverse Transcription coupled with quantitative PCR) is largely used even though the growing use of high flow sequencing techniques. The RT-qPCR allows to quantify the level of messenger ARN of genes reflecting the level of expression of these genes. It has numerous applications that require a high caution when implementing it. This technique needs the validation of the different steps of the procedure and numerous tests need to be done before the experimentation as well as controls during the experimentation. The objective of this paper is to describe the different control points and to detail vigilance points to be respected during the use of the RT-qPCR. From the extraction of nuclear acids to final results analysis, the validation of the different steps has demonstrated a reliable and robust method for the publication of works about the transcriptomic response of bacterial pathogene *Campylobacter jejuni* submitted to thermal stress.

Keywords : RT-qPCR, ARN, quality, validation

Introduction

L'analyse transcriptionnelle demeure largement utilisée malgré l'essor grandissant des techniques de séquençage haut débit, via l'utilisation de la technique de RT-qPCR (Reverse Transcription couplée à la PCR quantitative). La RT-qPCR permet de quantifier le niveau des ARN messagers de gènes cibles d'un organisme, reflétant ainsi le niveau d'expression de ces gènes. Elle a de nombreuses applications qui requièrent une forte exigence lors de sa mise au point. La technique de RT-qPCR nécessite la validation une à une des différentes étapes de la procédure pour toutes nouvelles conditions d'expérimentations. Cela engendre de nombreux tests et des points de contrôle à effectuer en amont et au cours de l'expérimentation.

Nous avons appliqué cette technique dans le cadre d'un projet de recherche dans le but d'identifier des biomarqueurs moléculaires de la réponse à un stress chez la bactérie *Campylobacter jejuni*. Pour assurer la robustesse de notre protocole, nous avons évalué l'efficacité de chaque étape de la méthode et validé différents contrôles en nous appuyant sur le MIQE (Minimum Information for Publication of Quantitative Real-time PCR experiments : Bustin et al., 2009).

Nous proposons ici de décrire les différents modes opératoires appliqués et les contrôles associés pour chaque étape depuis la lyse des cellules jusqu'à la RT-qPCR. Nous explicitons différents points de validation nécessaires à réaliser à chaque nouvelle condition d'expérimentation pour évaluer l'efficacité de la méthode : l'efficacité de l'extraction des acides nucléiques en passant par une gamme étalon établie à partir d'ADN exprimé en équivalent copie génome, la recherche d'inhibiteur, l'efficacité des couples d'amorces et la détermination des gènes de référence par la méthode geNorm. Quelques recommandations sont également énoncées par des points de vigilance réguliers.

Matériels et méthodes

Schéma global de la RT-qPCR

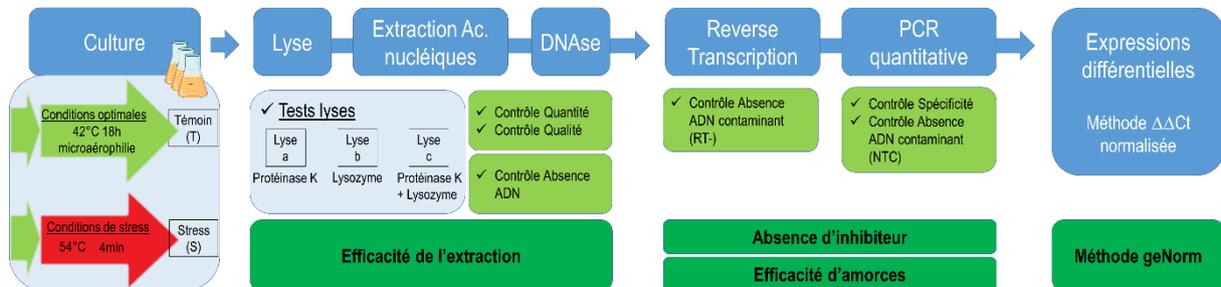


Figure 1 : Stratégie générale de validation des étapes de RT-qPCR. En encadré bleu sont présentées les étapes de RT-qPCR, en encadré bleu clair sont explicitées leurs conditions expérimentales comparées. En encadré vert clair apparaissent les points de contrôles et en encadré vert foncé sont exposés les points de validation.

Cultures bactériennes

Les conditions de culture

L'objectif est de générer les échantillons en adéquation avec le contexte de l'étude, qui permettront de répondre à l'hypothèse émise. Dans notre cas, le but est d'obtenir une culture de *C. jejuni* RM1221 en phase stationnaire de croissance à 10^8 CFU/mL soumise ou non ensuite à un stress. Le stress est décrit comme tout écart par rapport aux conditions optimales susceptible de limiter ou réduire la croissance bactérienne (Storz and Hengge-Aronis, 2000). Dans notre étude, l'application d'un processus physique (thermique) entraîne une situation de lésion sub létale qui endommage mais ne tue pas le micro-organisme (Hurst, 1977).

Dans un premier temps, la concentration de l'inoculum bactérien de départ est standardisée. La souche de *C. jejuni* est ensemencée sur gélose Columbia et mise en conditions optimales de croissance soit à 42 °C en microaérobiose (5% O₂, 10% CO₂, 85% N₂) pendant 48 h. Plusieurs colonies sont repiquées dans un bouillon de Mueller Hinton (MH, ThermoScientific) et mises en culture en conditions optimales de croissance sous agitation pendant 24 h. Une nouvelle culture en milieu MH, ensemencée à 1% à partir de la préculture précédente, est incubée à 42 °C en microaérobiose sous agitation pendant 18 h. La culture est alors diluée au 1/10 dans de l'eau physiologique stérile.

Ensuite, cet inoculum de départ :

- reste soumis aux conditions optimales de croissance et constitue la condition témoin (T).

En condition témoin (optimale de croissance, T), les bactéries ne subissent pas d'étape de stress.

- subit un choc thermique pour générer les échantillons de la condition de stress (S).

En condition de stress (S), les bactéries sont soumises à un choc thermique. Elles sont placées dans un bain marie à 54 °C pendant 4 minutes.

Points de contrôle

Les cultures sont effectuées en triplicats.

Chaque culture bactérienne est dénombrée avant et après application du stress sur une gélose non sélective, permettant également de vérifier la pureté des cultures et de ne pas générer un stress supplémentaire à la bactérie ; ici milieu Columbia 5% sang de mouton (Biomérieux) par ensemencement automatique sur EasySpiral (Interscience).

Toutes les températures et atmosphères d'incubation sont contrôlées.

Points de vigilance

Cette première étape, déterminant les conditions de culture, est primordiale. Les volumes de culture dépendent de la souche, des différentes conditions testées et du nombre d'analyses de RT-qPCR à réaliser ; des pré-tests sont nécessaires.

Lyse bactérienne

Les membranes des bactéries doivent être détruites afin d'en libérer ses constituants et d'extraire ses acides nucléiques, c'est la lyse. Des facteurs, tels que la nature des acides nucléiques à extraire, la constitution de la paroi des bactéries ou encore la composition du milieu de culture orientent quant au choix du mode opératoire adéquat.

Les lyses préconisées par le fournisseur des kits d'extraction présentent des modes opératoires différents. Pour l'extraction d'ADN, les cellules sont cassées chimiquement par une solution de protéinase K (lyse a). Pour l'extraction des ARN, plusieurs lyses chimiques sont envisageables pour des bactéries Gram négatif (*C. jejuni*) à savoir une solution de lysozyme (lyse b) et/ou une solution de lysozyme associée à de la protéinase K (lyse c). Selon le point de validation expérimenté, ces trois lyses ou une seule sont/est appliquée(s).

Les bactéries sont récupérées par centrifugation puis lysées.

- La lyse a : les bactéries en suspension dans un tampon de lyse ATL (Qiagen) associé à 20 µL d'une solution de protéinase K 600 mAU/mL (Qiagen) sont incubées à 56°C pendant une nuit.
- La lyse b : Les bactéries sont incubées à température ambiante pendant 5 min dans 100 µL d'une solution de lysozyme (Tris-HCl 10 mM, EDTA 1 mM, lysozyme 1 mg/mL pH8).
- La lyse c : Les bactéries sont mises en incubation à température ambiante pendant 10 min dans 100 µL d'une solution de lyse (Tris-HCl 30 mM, EDTA 1 mM, lysozyme 15 mg/mL) additionnée de 10 µL de solution protéinase K 600 mAU/mL (Qiagen).

Point de contrôle

La lyse bactérienne ne peut pas être quantifiée directement. Son efficacité est mesurée indirectement à travers l'évaluation de l'efficacité de l'extraction des acides nucléiques (cf. Evaluation de l'efficacité de l'extraction des acides nucléiques).

Points de vigilance

Le choix de la lyse est important, celle-ci doit être optimale. Pour une lyse chimique, la solution de lysozyme doit être préparée extemporanément pour assurer l'activité de l'enzyme.

Le Cahier des Techniques de l'Inra 2021 (104)

Extraction d'acides nucléiques

Extraction d'ADN génomique

L'ADN génomique (ADNg) des bactéries est extrait selon le mode opératoire recommandé pour des bactéries Gram négatif du kit DNeasy Blood and Tissue (Qiagen). Après la lyse bactérienne, l'ADN capté sur colonne subit plusieurs étapes de purifications et de lavages. Il est récupéré par élution qui se fait avec un volume de 50 µL d'eau DEPC (Thermoscientific) passé deux fois sur la colonne.

Extraction des ARN totaux

Avant la lyse cellulaire, les bactéries sont traitées par le RNAprotect (Qiagen). Après 5 min d'incubation à température ambiante, les bactéries sont centrifugées à 5000 g pendant 10 minutes à 4 °C. A l'issue de cette étape, les culots peuvent être lysés directement ou congelés rapidement dans l'azote liquide puis conservés à -80 °C pour une lyse ultérieure.

Après la lyse, les ARN totaux des bactéries sont extraits selon le mode opératoire du kit RNeasy Protect Bacteria (Qiagen). Les ARN sont adsorbés sur la membrane de silice de la colonne, plusieurs étapes de purification et de lavage sont effectuées. Ils sont ensuite récupérés par élution avec un volume de 50 µL d'eau DEPC (Thermofisher) passé deux fois sur la colonne.

L'élimination de l'ADN potentiellement résiduel et contaminant est effectuée à l'aide d'une désoxyribonucléase (DNase du kit TURBO DNA-free, InVitrogen).

Après leurs extractions, les acides nucléiques (ADN et/ou ARN) sont dosés au nanophotomètre N50 (Implen) par lecture de l'absorbance à 260 nm ; cette longueur d'onde correspondant à l'absorption maximale des acides nucléiques purs.

Points de contrôle

Après extraction, la qualité des acides nucléiques (ADN et/ou ARN) est systématiquement estimée en contrôlant les contaminations grâce aux rapports d'absorbance 260/280 et 260/230 (MIQE : Bustin et al 2009). Globalement, chaque rapport compris entre 1,8 et 2 assure une pureté acceptable des extraits d'acides nucléiques.

Lors de l'extraction des ARN, l'efficacité de la DNase est appréciée après une amplification par PCR d'un gène dont les conditions de réaction et les résultats sont bien établis (dans notre cas, un fragment de l'ADNr 16S). L'absence d'amplicon est attendue, il est indispensable de faire des témoins positifs et négatifs.

**Points de
vigilance**

- La méthode d'extraction des acides nucléiques (ADN et/ou ARN) doit être sélectionnée en fonction du germe étudié et de la matrice à partir de laquelle seront extraits les acides nucléiques. Des comparaisons de kit / méthode peuvent être envisagées.
- Pour les ARN, l'utilisation d'un bio-analyseur est recommandée pour déterminer le dosage des acides nucléiques et l'appréciation de la qualité des extraits d'acides nucléiques (MIQE : Bustin et al 2009). Cette technique s'appuie en majorité sur le profil des ARN totaux et notamment des ARN 16S, 23S et 5S pour les bactéries. Cependant, certaines espèces/souches bactériennes présentent un profil d'ARN atypique, ne permettant pas l'application de cette technique d'analyse (c'est le cas de *C. jejuni* dans cette étude (Phongsisay et al., 2007)). Alternativement, l'analyse des profils de migration en gel d'agarose permet d'apprécier la qualité des extraits et d'observer une éventuelle dégradation.

RT-qPCR

Pour pouvoir être analysés en qPCR, les ARN sont d'abord rétro-transcrits en ADN complémentaire (ADNc). La réaction de reverse transcription (RT) ne peut pas être contrôlée directement car l'ADNc ne peut pas être quantifié. Cette réaction peut être perturbée par la présence d'éléments tels que l'ADNg résiduel et/ou des inhibiteurs de l'enzyme.

La présence d'inhibiteurs est contrôlée de pair avec la réaction de qPCR en vérifiant que la réponse obtenue est proportionnelle à la quantité initiale en ARN. Ce même contrôle permet également de déterminer pour quelles quantités d'ARN initial, le signal est linéaire. La quantité d'ARN utilisée pour la RT réalisée ci-dessous découle de ces résultats (cf. Recherche des inhibiteurs des réactions enzymatiques).

La qPCR appliquée se fait en détection non spécifique avec le SybrGreen. En amont des analyses, l'efficacité de chaque couple d'amorces est déterminée. Tous les couples d'amorces d'une même étude comparative doivent avoir une efficacité similaire (cf. Détermination de l'efficacité d'un couple d'amorce).

Mode opératoire

200 ng d'ARN sont transcrits en ADNc par la reverse transcriptase iScript cDNA synthesis (Biorad) dans les conditions décrites par le fournisseur, en utilisant des amorces aléatoires (*random primers*). En parallèle, pour chaque extrait d'ARN, la même réaction est effectuée sans enzyme, c'est la réaction négative (RT-). Celle-ci sera utilisée ultérieurement comme contrôle d'absence d'ADN contaminant (cf. Détermination du niveau de contamination en ADN dans les extraits ARN (RT-)).

Le Cahier des Techniques de l'Inra 2021 (104)

Le signal en qPCR étant plus sensible, les ADNc peuvent être dilués avant leur amplification ; cette étape est d'autant plus utile qu'elle permet un nombre d'analyses plus important.

Les ADNc sont amplifiés avec les enzymes du kit SsoAdvanced Universal SybrGreen supermix (Biorad) par le thermocycleur CFX-Connect (Biorad), en utilisant des amorces spécifiques des gènes cibles. Les conditions des cycles de dénaturation, d'hybridation, de lecture de la fluorescence et de la courbe de fusion sont conformes aux recommandations du fournisseur. Le signal de fluorescence est obtenu et analysé par le logiciel Biorad CFX Manager. Pour chaque amplification, la fluorescence est mesurée en temps réel, à chaque cycle. L'amplification est exponentielle, elle dépend de la quantité d'ADN présente initialement dans la réaction. Le *threshold*, ou ligne de seuil d'analyse de la fluorescence, correspond à un niveau de fluorescence suffisamment bas pour que les courbes d'amplification soient en phase exponentielle mais suffisamment élevé pour être au-dessus du bruit de fond (Fig 2). Le Ct (cycle de seuil) correspond à l'intersection entre la courbe d'amplification et la ligne de seuil (Fig 2). Pour quantifier le niveau d'expression des gènes, les Ct sont relevés pour chaque amplification (Fig 2).

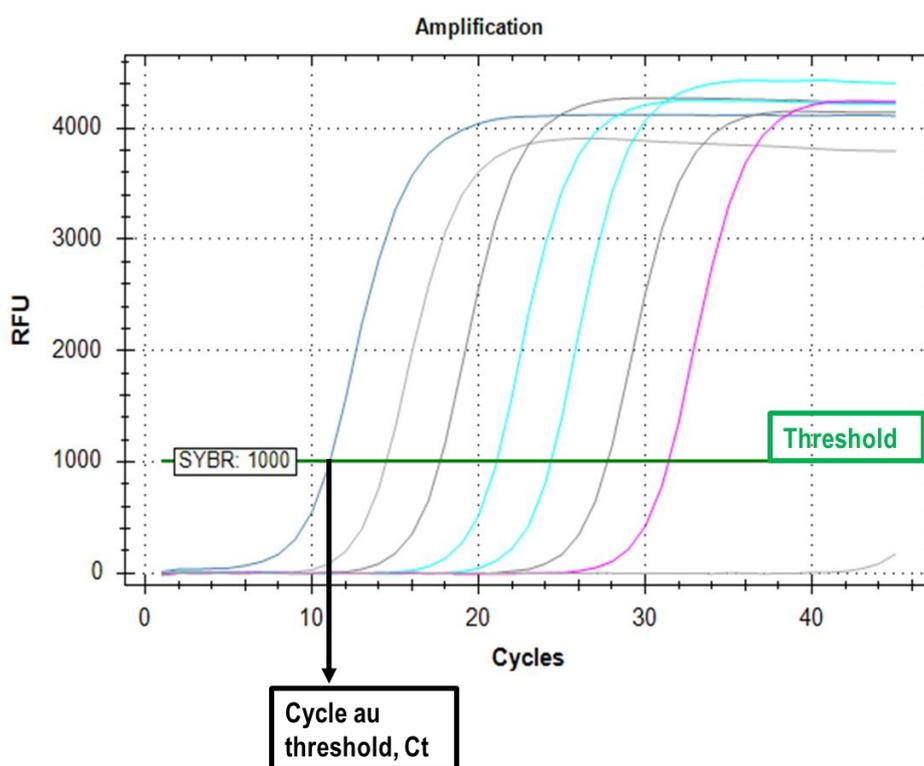


Figure 2 : Courbes d'amplification en qPCR. Le graphique représente la fluorescence mesurée dans chaque échantillon en fonction du nombre de cycle. Chaque courbe de couleur représente l'amplification d'un échantillon. L'intersection de la ligne de seuil (threshold, en vert) avec les courbes d'amplification détermine le Ct. Source : Logiciel CFX-Manager, Biorad.

Points de vigilance

- La détermination du threshold est arbitraire. Sa valeur peut être calculée automatiquement par le logiciel d'exploitation des données pour chaque exécution d'une plaque de qPCR ou définie par l'opérateur responsable des analyses pour l'ensemble des exécutions.

Dans notre cas d'étude, nous présenterons les analyses effectuées sur huit gènes testés : *asD*, *CJE1361*, *cosR*, *dnaK*, *groEL*, *grpE*, *hspR* et *ilvC*. Nous comparerons les expressions différentielles de ces gènes dans nos deux conditions de culture, optimales (T) et de stress (S).

Analyses des résultats / Interprétation

Expression différentielle

Les résultats d'expressions différentielles nécessitent un/des gène(s) de référence. Ces gènes doivent avoir une expression constante quelles que soient les conditions testées. Le(s) gène(s) de référence peut(vent) être désigné(s) au début de l'étude si leur expression est déjà connue pour être constante, ou déterminé(s) au cours de l'étude en se basant sur la méthode geNorm (cf. Normalisation).

En analyse d'expression différentielle, les résultats sont exprimés en $2^{-\Delta\Delta Ct}$ c'est-à-dire l'expression d'un gène par rapport à un autre gène dit de référence et par rapport à une condition témoin (Livak and Schmittgen, 2001). Un exemple de calcul est illustré dans la figure 3. En 1^{er} lieu, pour chaque échantillon, l'amplification d'un gène cible est comparée à celle d'un gène de référence (ΔCt (T), ΔCt (S)). Ensuite les différences d'amplification observées entre échantillons sont comparées entre elles et notamment par rapport à la condition témoin ($\Delta\Delta Ct$). Enfin, cette différence est traduite en expression exponentielle ($2^{-\Delta\Delta Ct}$). Une expression différentielle égale à 1 signifie que les gènes s'expriment en quantité égale dans les deux échantillons comparés.

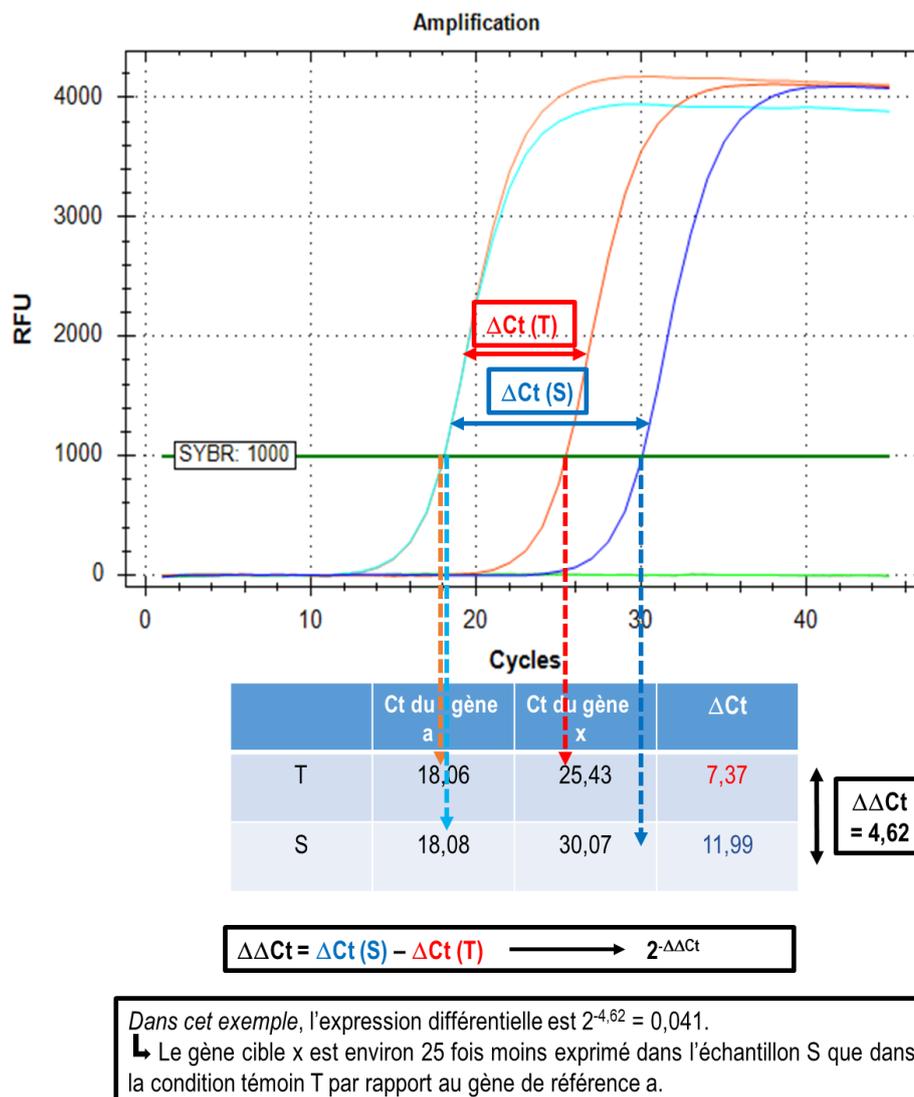


Figure 3 : Démarche du calcul d'une expression différentielle d'un gène cible (x) par rapport à un gène de référence (a) dans un échantillon obtenu en condition de stress (S) (en bleu) contre une condition témoin (T) (en rouge). Le graphique représente les courbes d'amplification en qPCR désignant la fluorescence mesurée en fonction du nombre de cycle. Le ΔCt est calculé à partir des Ct relevés sur les courbes d'amplification des gènes x et a (respectivement rouge et orange pour T, bleu foncé et bleu clair pour S). La comparaison des échantillons S et T, au travers de la différence des ΔCt ($\Delta\Delta Ct$), permet de formuler l'expression différentielle ($2^{-\Delta\Delta Ct}$). Source : logiciel CFX-Manager, Biorad.

Pour une lecture plus lisible, les résultats d'expression, notamment présentés sous forme d'histogramme, peuvent être exprimés en \log_{10} ou en \log_2 .

Normalisation des résultats de RT-qPCR

Lorsque le contexte de l'étude le permet, il est recommandé d'utiliser plusieurs gènes de référence afin de normaliser les résultats grâce à l'application d'un facteur de normalisation calculé pour chaque échantillon (MIQE : Bustin et al, 2009). Ce facteur de normalisation correspond à la moyenne géométrique des expressions des gènes de référence. La méthode geNorm permet de déterminer les gènes de référence optimaux et leur nombre en fonction des conditions testées. Cette méthode est facilement applicable via le logiciel d'analyses qbase+ (Biogazelle) (Vandesompele et al ; Hellemans et al.).

Deux paramètres sont ainsi évalués :

- le geNorm M classe les gènes selon la stabilité de leur expression

L'analyse de la valeur geNorm M de chaque gène, moyenne géométrique de la réponse de tous les échantillons, permet de déterminer au vu de l'ensemble des résultats les gènes dont l'expression est la plus stable. Les gènes dont la valeur M est inférieure à 0,5 sont considérés comme les plus stables ; plus la valeur de M est petite, plus le gène est stable.

- le geNorm V pour le nombre optimal de gènes de référence à utiliser

La valeur geNorm V correspond à la variation d'expression par paire de gènes classés séquentiellement. Le facteur de normalisation calculé à partir de n gènes les plus stables (valeurs de M minimales) est comparé à celui obtenu à partir de n+1 gènes les plus stables, donc consécutivement en utilisant d'abord deux et trois gènes, puis 3 et 4 gènes, jusqu'à tous les utiliser. Selon les auteurs du geNorm, une variation V inférieure à 0,15 signifie que l'ajout d'un gène de référence dans le calcul du facteur de normalisation a un impact non significatif sur son résultat, il n'est alors pas nécessaire.

L'association de ces deux paramètres permet de déterminer les meilleurs gènes de référence à utiliser.

Une fois les gènes de référence déterminés, un facteur de normalisation est calculé pour chaque échantillon. Il correspond à la moyenne géométrique des expressions des gènes de référence. Les expressions différentielles sont calculées par rapport à la condition témoin s'il y en a une et/ou par rapport à l'ensemble des échantillons. L'expression différentielle normalisée est l'expression différentielle divisée par le facteur de normalisation.

Points de contrôles

Au cours de cette étape de RT-qPCR, plusieurs contrôles sont réalisés.

Témoins négatifs

Pour chaque réaction de reverse transcription et de qPCR, des témoins négatifs sont effectués. Ce sont des réactions pour lesquelles l'échantillon est remplacé par de l'eau et dans lesquelles aucune réaction n'est censée s'opérer. Ces témoins sont communément nommés NTC (No Template Control). Il s'agit de vérifier la non amplification de ces témoins négatifs et valider l'absence de contaminants extérieurs.

Spécificité des couples d'amorces

La température de fusion (T_m , *melting temperature*), température à laquelle la moitié de l'ADN double brin est dénaturé, dépend pour un fragment d'ADN donné, de sa taille et de sa composition. Chaque couple d'amorces permet d'amplifier un amplicon ayant une T_m spécifique. Une courbe de fusion, étape réalisée à la fin des cycles d'amplification et consistant à lire la fluorescence en continu lors d'une augmentation progressive de la température, permet de déterminer la T_m et de vérifier la spécificité de l'amplification (Fig 4).

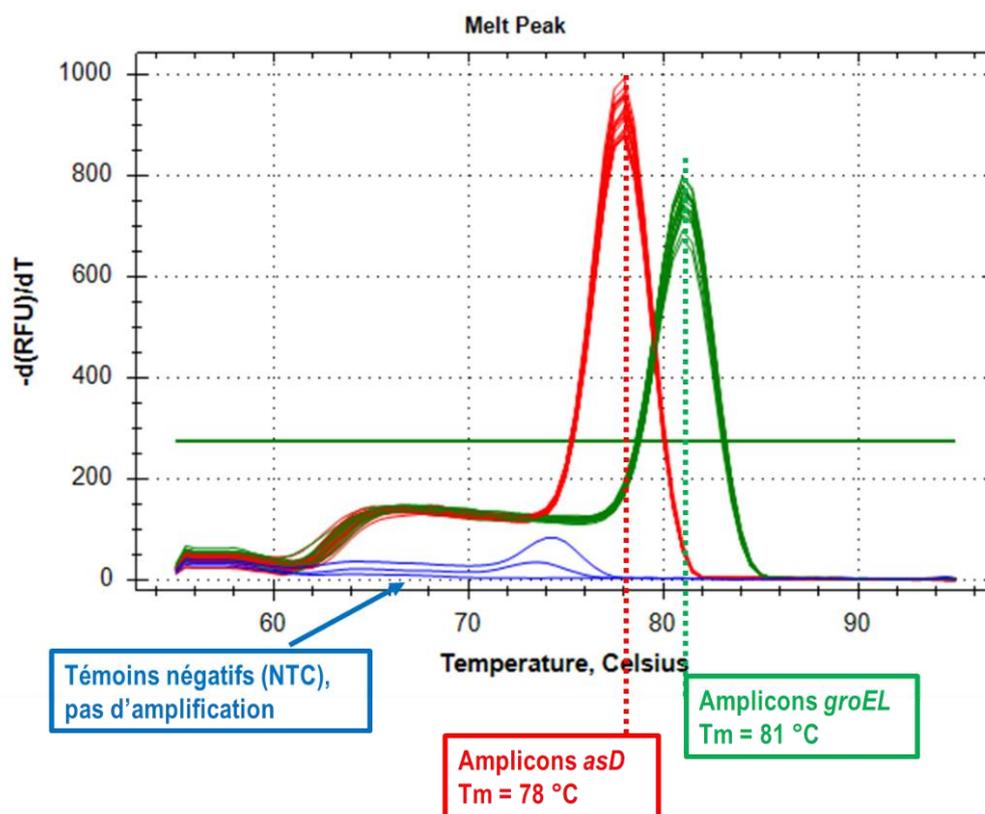


Figure 4 : Courbes de fusion en qPCR et leurs pics de fusion correspondants, représentés par la dérivée première négative de la fluorescence enregistrée en fonction de la température. Aucune amplification n'est détectée dans les témoins négatifs (bleu). L'amplification du gène *asD* est caractérisée par des amplicons ayant un T_m à 78 °C (rouge) et à 81 °C pour le gène *groEL* (vert). Source : logiciel CFX-Manager, Biorad.

Points de vigilance

Ce contrôle est d'autant plus important que le signal de détection est non spécifique (comme ici le SybrGreen).

Détermination du niveau de contamination en ADN dans les extraits ARN (RT-)

La réaction négative (RT-) initiée en reverse transcription permet de détecter plus précisément l'ADN résiduel des extraits d'ARN. En effet, sans reverse transcriptase, seul l'ADN résiduel est amplifié pendant la réaction de qPCR. Le niveau de contamination par de l'ADN est évalué en analysant la différence d'amplification entre la réaction de RT négative (sans enzyme, $Ct(x, RT-)$) et la RT positive sur un même échantillon (avec enzyme, $Ct(x)$). Soit pour un échantillon x , $\Delta CT(x) = Ct(x, RT-) - Ct(x)$ (Fig 5). Les données de la littérature s'accordent pour appliquer le seuil significatif à $\Delta Ct > 5$, estimant qu'à partir de cette valeur, moins de 3% de la réponse transcriptomique est imputée à de l'ADNg résiduel, et exprimant ainsi une présence d'ADNg non significative (Laurell, 2012).

La figure 5 illustre différents cas de résultat et d'interprétation. Dans la majorité des cas, par l'action efficace de la DNase, la réaction négative de l'échantillon n'engendre aucun signal de détection démontrant l'absence d'ADN contaminant (Fig 5 échantillon A). Lorsqu'un signal est détecté dans le témoin RT- indiquant la présence d'ADN contaminant dans l'extrait d'ARN, une différence entre ce signal et celui de la réaction positive (ΔCt) supérieure à

7 indique que l'ADN résiduel représente moins de 1% de l'ADN (Laurell, 2012). Le signal est donc considéré comme non significatif et l'échantillon d'ARN est validé (Fig 5 échantillon B). En revanche, lorsqu'un échantillon présente un pourcentage non négligeable d'ADN contaminant avec un $\Delta Ct < 5$ (Laurell, 2012), le signal détecté (en réaction positive) est par conséquent faussé car plus de 3% de la réponse peut être due à de l'ADN contaminant. Dans ce cas, le résultat ne peut pas être interprété. Pour ré-intégrer cet échantillon d'ARN dans les analyses de RT-qPCR, il devra subir un nouveau traitement par une DNase dont il faudra également vérifier l'efficacité (Fig 5 échantillon C).

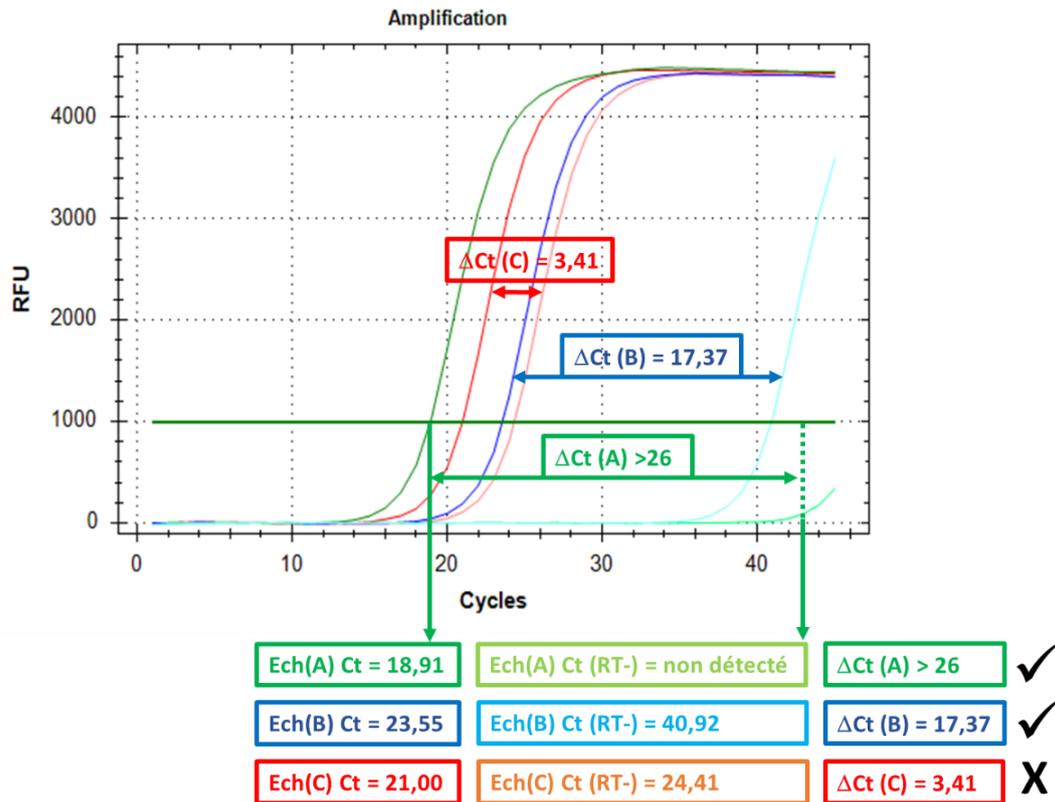


Figure 5 : Détermination du niveau de contamination en ADN dans les extraits d'ARN. Analyse des courbes d'amplification en RT-qPCR des réactions positives et négatives de RT. Le graphique représente la fluorescence en fonction du nombre de cycle de trois échantillons (A en vert, B en bleu, C en rouge). Pour chacun, la différence $\Delta Ct (x) = Ct (x, RT-) - Ct (x)$ permet de valider (✓) ou non (X) l'extrait d'ARN au regard de la littérature (Laurell et al., 2012). L'échantillon A (vert) ne contient pas d'ADN résiduel détectable, et l'échantillon B (bleu) en contient une quantité négligeable ($\Delta Ct (B) > 7$). Dans l'échantillon C (rouge) l'ADN contaminant représente presque 12% de la réponse transcriptomique ($\Delta Ct (C) = 3,41$) selon Laurell, 2012.

Source : logiciel CFX-Manager, Biorad.

Points de vigilance

- Les volumes réactionnels de la RT sont à adapter en fonction du nombre de réactions qPCR à effectuer (nombre de gènes * répétitions techniques).
- Le plan de dépôt des échantillons dans la plaque de la RT-qPCR a son importance au vu de l'analyse des résultats ultérieurs. Il est recommandé, dans la mesure du possible, de déposer tous les échantillons et tous les gènes cibles sur la même plaque. Si cela n'est pas possible, selon le nombre d'échantillons, selon le nombre de gènes cibles, le plan de plaque devra être adapté en tenant compte de la question scientifique initiale à savoir quelle(s) expression(s) différentielle(s) veut-on analyser. Il sera alors peut-être nécessaire d'utiliser un calibrateur inter-run afin de normaliser le signal des plaques entre elles (MIQE : Bustin et al, 2009).

Détermination de l'efficacité d'un couple d'amorces en qPCR

L'objectif est de s'assurer de l'efficacité des amorces à dupliquer les séquences d'ADN présentes dans l'échantillon à analyser. Cette étape est à faire en amont de toute analyse d'expression différentielle. Les séquences des gènes cibles identifiées dans le génome de la souche de *C. jejuni* RM1221 (NC_003912) permettent de dessiner des amorces par l'utilisation du logiciel Primer3Plus. La spécificité de chacune des amorces est analysée par BLAST-NCBI.

L'efficacité des couples d'amorces est déterminée à partir d'ADNg extrait (lyse a) d'une culture obtenue en conditions optimales de croissance de la bactérie. L'ADNg est dilué en série au dixième puis amplifié en qPCR, en ciblant les amorces spécifiques.

L'objectif est de déterminer la courbe d'étalonnage (ou courbe standard) en exprimant le Ct en fonction du log de la quantité initiale d'ADN pour pouvoir calculer E, l'efficacité, à partir de la pente (p) de la droite selon la formule :

$$E = -1 + 10^{\left(\frac{1}{p}\right)} \text{ (Bustin et al., 2009).}$$

Un exemple de courbe étalon est présenté dans la figure 6. Un couple d'amorces a une amplification efficace pour une valeur de E comprise entre 0,9 et 1,10 (Fig 6).

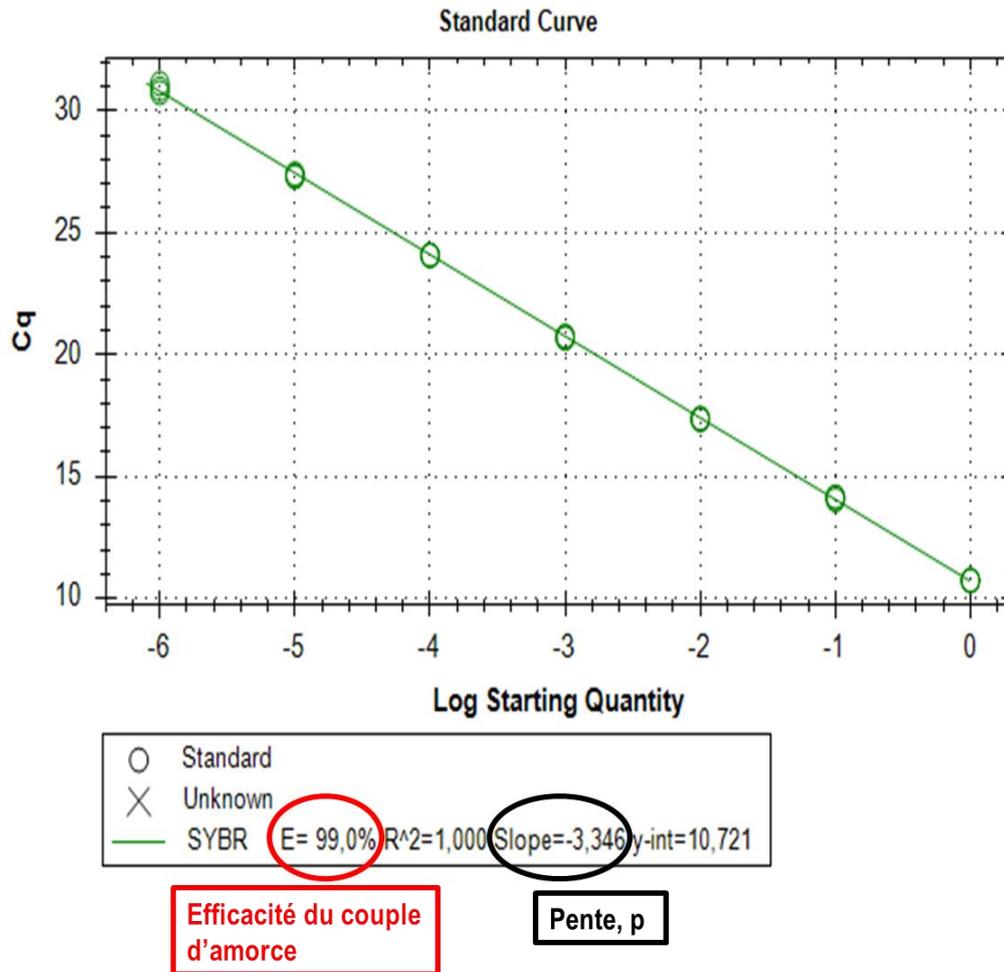


Figure 6 : Détermination de l'efficacité d'un couple d'amorce en qPCR. La courbe d'étalonnage représente le Ct en fonction du log de la quantité d'ADN initiale. La pente de la droite (entourée en noir) permet de calculer l'efficacité E (entourée en rouge). Source : Logiciel CFX-Manager, Biorad.

Point de contrôle

Comme décrit plus haut, contrôler la spécificité de chaque couple d'amorces est primordial et le Tm de chaque amplicon aide à cette vérification. Pour aller plus loin, les amplicons de chaque couple d'amorces sont séquencés.

Points de vigilance

- Dans le cadre d'une analyse différentielle d'expression de gènes, les couples d'amorces dessinés doivent avoir une efficacité équivalente pour pouvoir être comparés les uns aux autres. Pour une analyse plus pointue, les valeurs d'efficacité peuvent être intégrées au calcul de normalisation des expressions différentielles.
- La qualité du design des amorces facilite d'autant plus leur validation en qPCR.

Evaluation de l'efficacité de l'extraction des acides nucléiques

L'objectif est ici de mettre en relation le nombre de bactéries et le nombre de copie d'un gène donné analysé en qPCR. On peut supposer que, dans une culture bactérienne et pour un gène monocopie, le rapport entre le nombre de bactéries et le nombre de copie du gène sera de 1 si l'extraction des acides nucléiques a été efficace.

Le nombre de copie d'un gène (exprimé en ECG, Equivalent Copie Génome) ne trouve pas de correspondance avec une quantité d'ARN mais peut être calculé à partir d'une quantité d'ADN génomique. C'est donc à partir d'extraits d'ADNg de bactéries que la méthode suivante est appliquée. La qPCR permet de déterminer la relation entre les Ct et la quantité d'ADNg (étape A). Cette quantité d'ADNg peut être convertie en ECG par la formule de Whelan (étape B). On peut donc établir une courbe standard des Ct en fonction du log (ECG/mL) à partir de la courbe standard d'efficacité d'un couple d'amorces codant pour un gène monocopie. Cette courbe standard, par l'analyse du signal qPCR d'une culture bactérienne diluée en série et dénombrée, permet d'établir la corrélation entre le nombre d'individus et la quantité en ECG du gène analysé (étape C) (Fig 7).

Les différentes étapes sont décrites ci-dessous.

Etape A : La 1^{ère} étape est de déterminer l'efficacité d'un couple d'amorces codant pour un gène de ménage monocopie en qPCR (cf. ci-dessus). Le gène monocopie de cette étude est *ilvC*.

Etape B : à partir de la courbe standard obtenue, la courbe représentant $Ct = f(\log(\text{ECG}/\text{mL}))$ est établie en convertissant la quantité d'ADN en Equivalent Copie Génome selon la formule de Whelan et al, 2003 :

$$\text{nombre de copies (ECG)} = \frac{\text{quantité ADN (ng)} * 6,022 * 10^{23} (\text{mol}^{-1})}{\text{longueur du génome (base)} * 1 * 10^9 (\text{ng.g}^{-1}) * 660 (\text{g.mol}^{-1}.\text{base}^{-1})}$$

La formule de calcul comprend la quantité d'ADN, le nombre d'Avogadro ($6,022 * 10^{23}$), la longueur totale du génome de *C. jejuni* (1,77783 Mb), la masse molaire moyenne d'un nucléotide (660 g / mol de base) et une conversion en ng pour les unités (*en italique*).

Etape C : Une culture de *C. jejuni* obtenue en conditions optimales de croissance est diluée en série de 10 et chaque dilution est dénombrée en CFU/mL. Les ADNg de chaque dilution sont extraits selon les modes opératoires de lyse (a, b et c) et d'extraction par le kit DNeasy (Qiagen) puis l'amplification du gène *ilvC* est analysée en qPCR.

Pour interpréter les résultats, une fois les Ct de chaque extrait d'ADN déterminés, ils sont reportés sur la courbe des $Ct = f(\log(\text{ECG}/\text{mL}))$ de l'étape B afin de déterminer le log (ECG/mL) correspondant. Enfin pour chaque dilution de culture, le log (ECG/mL) et le log (CFU/mL) sont exprimés l'un par rapport à l'autre et la courbe établie renseigne de la corrélation obtenue.

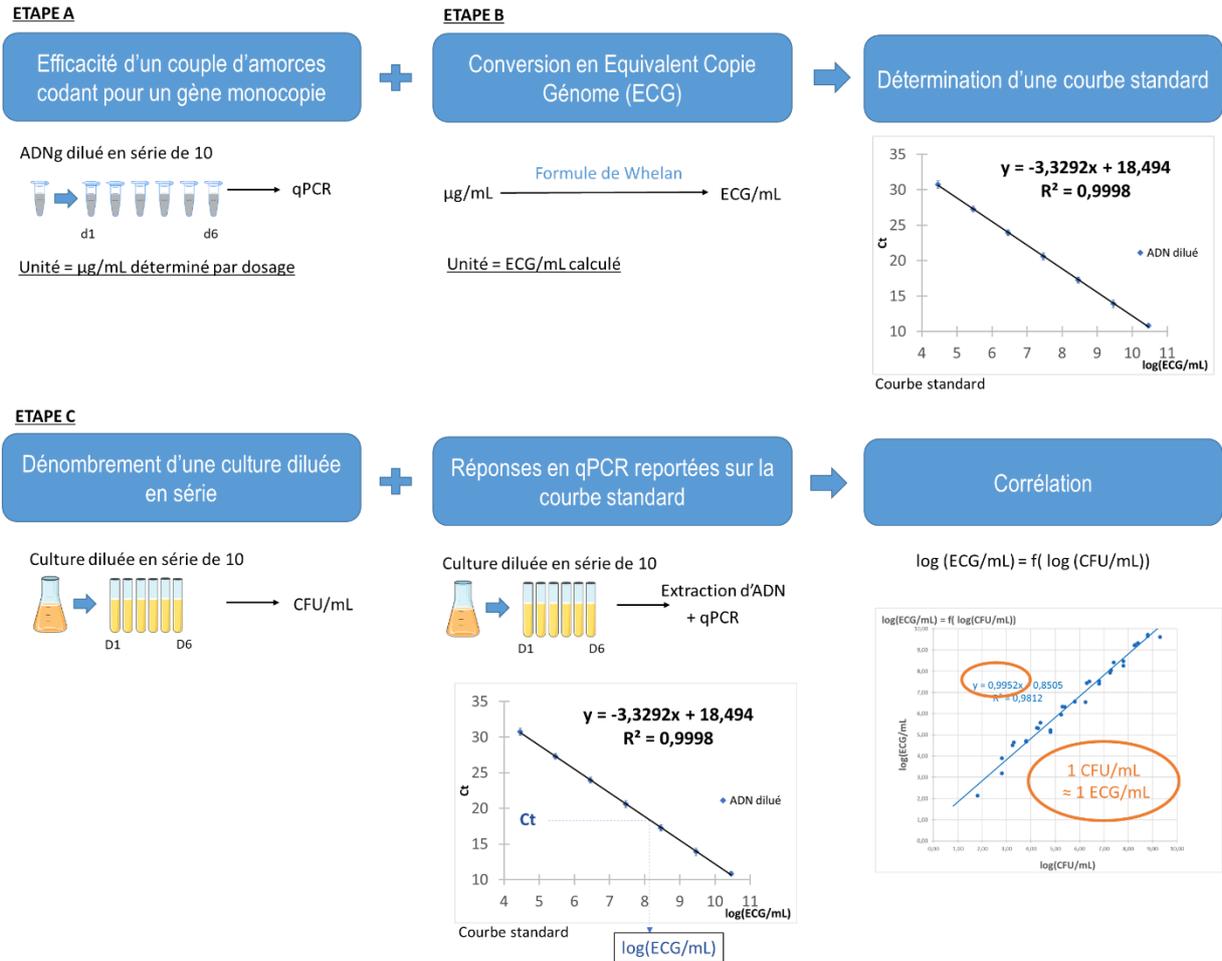


Figure 7 : Principe de l'évaluation de l'efficacité de l'extraction des acides nucléiques. Schéma décrivant les étapes successives de détermination de l'efficacité d'amplification des amorces codant pour un gène monocopie (A), la conversion en Equivalent Copie Génome (ECG) (B), puis la corrélation entre le résultat du dénombrement et de l'ECG (C).

Recherche des inhibiteurs des réactions enzymatiques

L'objectif de ce contrôle est de vérifier que le signal obtenu en qPCR est proportionnel à la quantité initiale d'ARN indiquant une réaction efficace et de déterminer les quantités initiales d'ARN utilisables pour la réaction de RT. Ce test doit se faire pour toutes les conditions de l'étude.

Pour ce test, des ARN de *C. jejuni* obtenus à partir de cultures réalisées en conditions optimales et en conditions de stress sont extraits selon le mode opératoire d'extraction cité ci-dessus (kit RNeasy, Qiagen) puis sont dilués en série avant d'être soumis à la RT-qPCR. La recherche d'inhibiteurs a été effectuée sur des acides nucléiques extraits à la suite des deux lyses (b et c). La courbe établie des Ct en fonction du log de la quantité d'ARN initiale, dans sa zone linéaire, détermine pour quelles quantités d'ARN initiales les réactions de RT et de PCR en temps réel sont exemptes d'inhibiteurs.

Points de vigilance

- Le choix de la quantité initiale d'ARN à utiliser pour la RT est un compromis entre les trois paramètres suivants :
 - ~ Respecter les conditions de réactions en absence d'inhibiteur.
 - ~ Permettre une dilution de l'ADNc pour avoir un volume d'échantillon adéquat aux nombres d'analyses de qPCR à effectuer.
 - ~ Respecter la zone d'efficacité des amorces et de détection de l'appareil.
- En présence d'inhibiteurs, il peut être nécessaire de diminuer la quantité d'ARN initiale avant la reverse transcription.

Evaluation globale de la RT-qPCR

Les tests d'efficacité ayant jusqu'ici été réalisés à partir de l'ADN, il convient également d'évaluer la technique, de l'extraction des ARN totaux jusqu'à la qPCR.

Des réponses transcriptomiques de l'amplification d'*ilvC* d'une culture diluée en série de 10 sont analysées, en appliquant le même mode opératoire que l'étape C de la méthode d'évaluation de l'efficacité de l'extraction d'acides nucléiques mais en extrayant les ARN totaux. Seuls les ARN extraits de la première dilution de culture sont dosés. (Au regard des résultats présentés plus loin, la lyse c se révélant être la plus efficace, elle est la seule testée ici). Les Ct obtenus sont reportés sur la courbe standard du gène *ilvC* (Fig 8) pour obtenir une équivalence en log de la quantité d'ADNc présent dans le puits réactionnel. La corrélation entre ce log de la quantité d'ADNc présent et la dilution expérimentée, si elle est linéaire, permet d'apprécier l'efficacité de l'extraction des ARN ; en supposant que la quantité d'ARNm présente dans la culture bactérienne initiale n'évolue pas (rapidité de l'exécution des dilutions et fixation par le RNAprotect puis l'azote liquide) et est donc proportionnelle aux dilutions.

En complément, les résultats peuvent être mis en parallèle avec les analyses en RT-qPCR d'ARN de quantités connues dilués en série de 10. En effet, lors de la recherche d'inhibiteur, des extraits d'ARN sont dilués en série de 10 et analysés en RT-qPCR ; seule la première dilution peut être dosée, les dilutions suivantes ont des quantités d'ARN estimées. A partir de ces données sont calculés les log de quantité d'ADNc présent dans les puits réactionnels. La comparaison des deux courbes du log de la quantité d'ADNc calculé en fonction des dilutions donne une idée de la répétabilité de l'extraction et permet de mettre en évidence d'éventuelles imprécisions.

Résultats

Validation des points de contrôle

Tous les résultats des points de contrôle de cette expérimentation sont indiqués dans le tableau 1. Il est indispensable que tous ces contrôles soient validés. Dans notre expérimentation, le profil ARN de la souche *C. jejuni* RM1221 n'étant pas compatible avec l'utilisation d'un bio-analyseur, a minima la migration en gel d'agarose des extraits d'ARN a été réalisée.

Tableau 1 : Résultats des points de contrôles obtenus dans cette étude. (A) Contrôles en lien avec les conditions de cultures de *Campylobacter jejuni*. (B) Contrôles en lien avec l'extraction des acides nucléiques et la RT-qPCR.

A

Contrôles propres à l'expérimentation	Résultats obtenus	Validation
Echantillonnage / Cultures		
- Pureté des cultures	Cultures de <i>C. jejuni</i> RM1221	✓
- Répétitions biologiques	Cultures de <i>C. jejuni</i> indépendantes	✓
- Standardisation de la suspension mère, dénombrement	Suspensions mère dénombrées à 10 ⁸ CFU/mL	✓
- Paramètres physiques (température, atmosphère)	Relevés par des sondes adaptées	✓
- Conditions expérimentales	Obtention de cultures témoins et de cultures stressées	✓

B

Contrôles	Résultats obtenus	Validation
Quantification des acides nucléiques	Dosage au nanospectrophotomètre -> limite de fiabilité pour des extraits issus de culture bactérienne de concentration ≤ 10 ⁷ CFU/mL	✓
Qualité des acides nucléiques		
- Rapport d'absorbance A260/A280 et A230/A260	Compris entre 1,8 et 2	✓
- Bio-analyseur	Profil ARN de la souche incompatible	X
-> Migration en gel d'agarose	Absence de smear (= pas de dégradation)	✓
Contamination en ADNg des extraits ARN		
- PCR d'un gène connu	Absence d'amplicon	✓
- RT-qPCR : détection des RT-	Non détectés et/ou Ct ≥ 40 (négligeable)	✓
RT-qPCR		
- NTC	Non détectés et/ou Ct ≥ 40 (négligeable)	✓
- Spécificité	Courbe de fusion : Tm spécifique	✓
- Couples d'amorces	0,91 < Efficacité < 1,09	✓
	Spécificité vérifiée par le séquençage des amplicons	✓
- Plan d'expérimentation	Pas besoin de calibrateur inter-run	✓
- geNorm	Choix de gènes de référence	✓

Efficacité des couples d'amorces en qPCR

Les courbes d'étalonnage ont permis de déterminer les efficacités de chacun des huit couples d'amorces. Dans l'exemple ci-dessous, la courbe standard du couple d'amorce codant pour le gène *ilvC*, montre une efficacité de 0,99 (Fig 8).

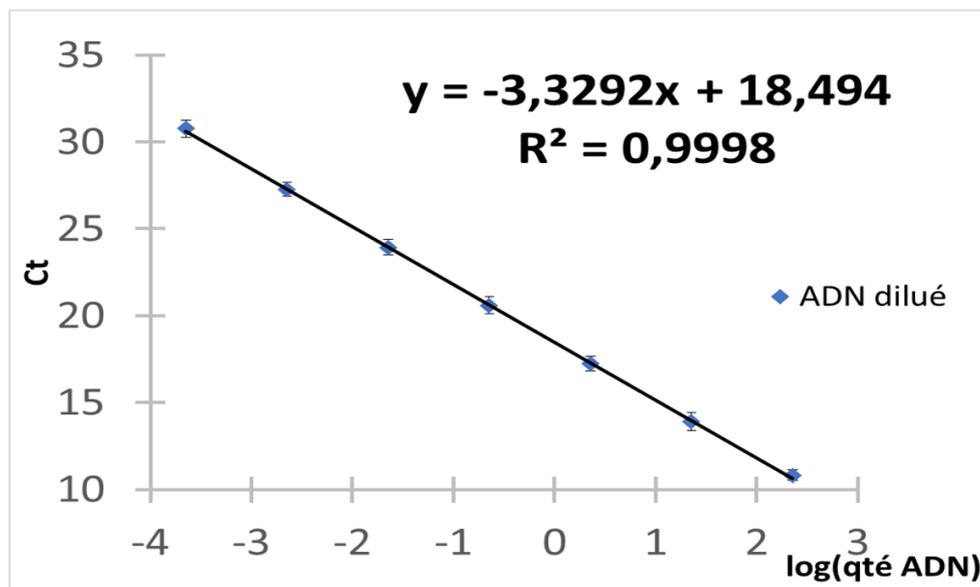


Figure 8 : Courbe d'étalonnage du gène *ilvC*. Le graphique représente le Ct en fonction du log de la quantité d'ADN pour une série de dilutions d'extraits d'ADN. La pente de la courbe de tendance (en noir) permet de calculer l'efficacité. $E (ilvC) = -1+10^{(1/3,3292)} = 0,997$.

Tous les couples d'amorces testés dans cette étude ont une efficacité comprise entre 0,91 et 1,09. La spécificité de chacun est validée et vérifiée par séquençage.

Evaluation de l'efficacité de l'extraction des acides nucléiques

Etape A : vu précédemment, le couple d'amorces codant pour le gène *ilvC* est validé avec une efficacité de 0,99 (Fig 8).

Etape B : pour le gène *ilvC*, en convertissant la quantité d'ADN en Equivalent Copie Génome, la courbe présentée en figure 9 est obtenue.

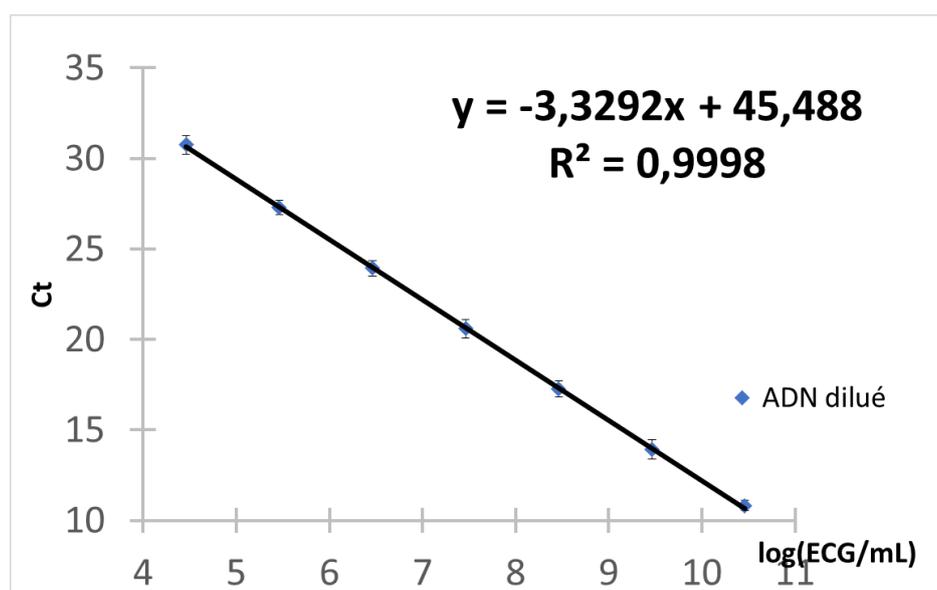


Figure 9 : Conversion de la quantité d'ADN en ECG. Le graphique représente le Ct en fonction du log (ECG/mL) pour une série de dilution d'extraits d'ADN.

Etape C : Les ADNg extraits à partir d'une culture de *C. jejuni* diluée en série de 10, sont analysés en qPCR par l'amplification du gène *ilvC*. Les Ct de chaque extrait sont reportés sur le graphique obtenu à l'étape B (Fig 9) afin de déterminer le log (ECG/mL) correspondant. Cette valeur est alors corrélée aux résultats de dénombrement bactérien de chaque dilution, effectué avant l'extraction des acides nucléiques (Fig 10).

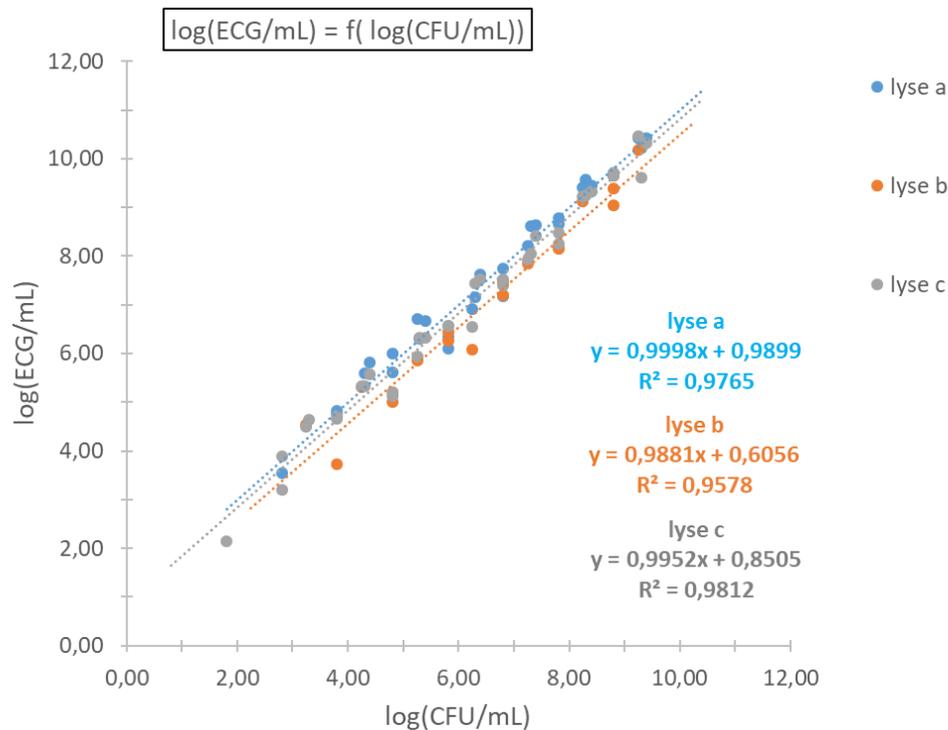


Figure 10 : Corrélation de la réponse transcriptomique du gène monocopie *ilvC* convertie en ECG/mL d'une culture bactérienne diluée de 10^8 à 10^2 CFU/mL avec son dénombrement. Le graphique représente le log (ECG/mL) en fonction du log (CFU/mL) obtenu en testant 3 lyses différentes. La lyse a (bleu) est la méthode référence du fournisseur sur ADNg. Les lyses b (orange) et c (gris), deux méthodes possibles pour l'extraction des ARN, sont testées sur ADNg.

Globalement, pour les trois lyses, la pente des droites obtenues, proche de la valeur 1, signifie qu'un CFU exprime un ECG (Fig 10). Ce qui est attendu pour l'expression d'un gène de ménage monocopie. Les trois lyses sont donc efficaces dans ce protocole d'extraction. En ce qui concerne notre questionnement, la lyse c est la plus fiable (meilleur R^2). Elle apparaît également plus sensible (le signal est détecté pour des extraits d'ADN issus de culture de l'ordre de 10^2 CFU/mL) (Fig 10). Ainsi la lyse c est retenue pour le reste de l'étude.

Recherche des inhibiteurs des réactions enzymatiques

La recherche d'inhibiteur a été effectuée sur des acides nucléiques extraits à partir des deux lyses (b et c) mais la lyse c étant celle retenue, seuls les résultats découlant de cette lyse c sont présentés. Pour toutes les conditions de l'étude (cellules témoins et stressées), l'amplification du gène *ilvC* est analysée en RT-qPCR sur des dilutions en série de chaque ARN extraits (Fig 11).

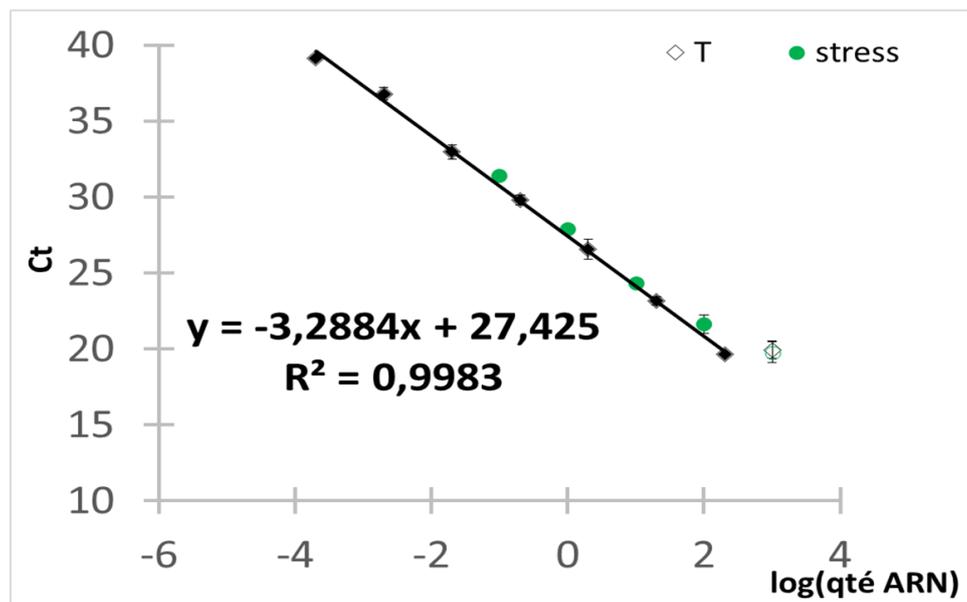


Figure 11 : Recherche des inhibiteurs de réactions enzymatiques. Le graphique représente le Ct en fonction du log de la quantité initiale d'ARN pour une série de dilution d'extraits d'ARN. Les ARN extraits à partir de cellules témoins (en noir) suivent sensiblement la même droite que les ARN extraits à partir des cellules stressées (en vert).

La courbe établie des Ct en fonction du log de la quantité d'ARN initiale est linéaire pour des quantités de 200 ng à 2 pg d'ARN initial dans toutes les conditions. Dans cet intervalle, l'absence d'inhibiteur de RT-qPCR est avérée et les résultats fiables (Fig 11). Pour la suite de l'étude, la quantité d'ARN transcrit est de 200 ng.

Evaluation globale de la RT-qPCR

Les résultats de RT-qPCR d'ARN extraits à partir d'une culture bactérienne diluée sont représentés dans la figure 12. Le log de quantité d'ADNc est obtenu à partir des Ct relevés et de la formule d'efficacité du gène amplifié *ilvC*. En comparaison, le même calcul est effectué sur les résultats de RT-qPCR des ARN dilués en recherche d'inhibiteurs.

Pour tous les premiers échantillons (d1) de chaque série de dilutions, seules solutions dosées, le signal en RT-qPCR est sensiblement le même, dénotant d'une bonne répétabilité des extractions et une bonne fiabilité du dosage.

La linéarité observée entre le log de la quantité et les dilutions à partir des ARN extraits puis dilués en série de 10 doit normalement suivre une courbe logarithmique (Fig 12 courbe orange). En considérant les autres dilutions, dont la quantité en ARN ne peut pas être directement dosées, la linéarité de la réponse transcriptomique des ARN extraits à partir d'une culture bactérienne diluée (Fig 12 courbe noire) proche de celle des ARN dilués (Fig 12 courbe orange) dénote également d'une bonne répétabilité de la méthode de l'extraction jusqu'au signal en RT-qPCR. Cependant, un biais des résultats est observé lors de l'extraction d'ARN issus de culture bactérienne de concentration inférieure à 10^7 CFU/mL.

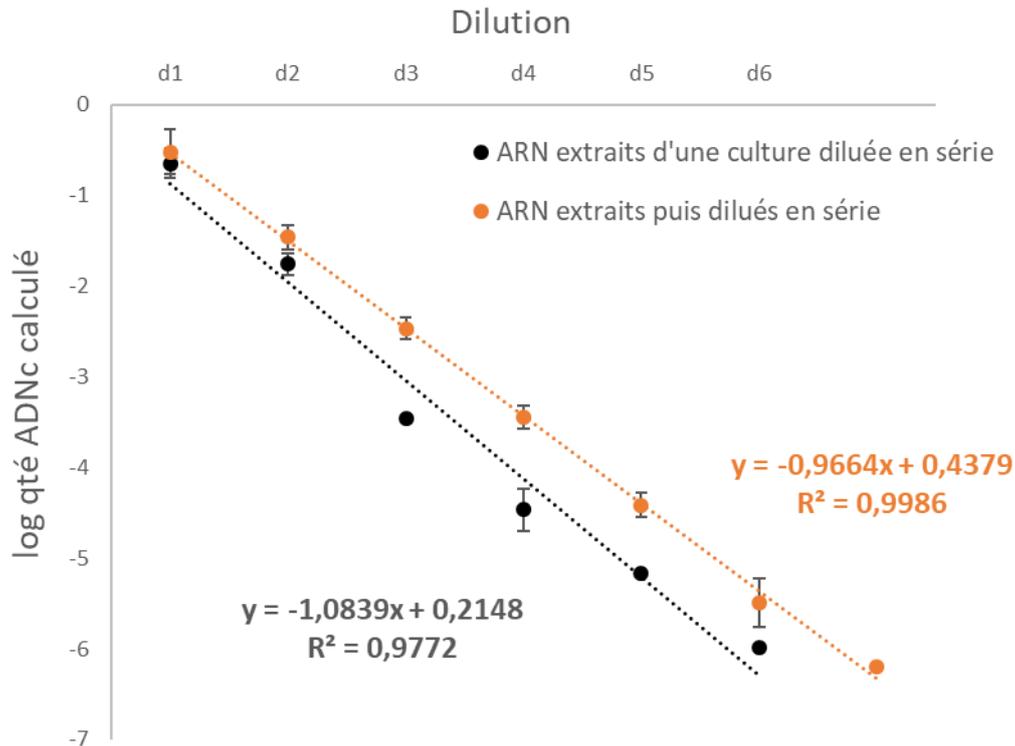


Figure 12 : Evaluation de la répétabilité de l'extraction d'ARN. Le graphique représente le log de la quantité d'ADNc calculé à partir du signal en qPCR, présent initialement dans le puits réactionnel selon diverses séries de dilutions au dixième (d1 à d6) : les dilutions en série d'ARN dosés (orange) et les ARN extraits à partir d'une culture bactérienne diluée de 10^8 à 10^3 CFU/mL (noir).

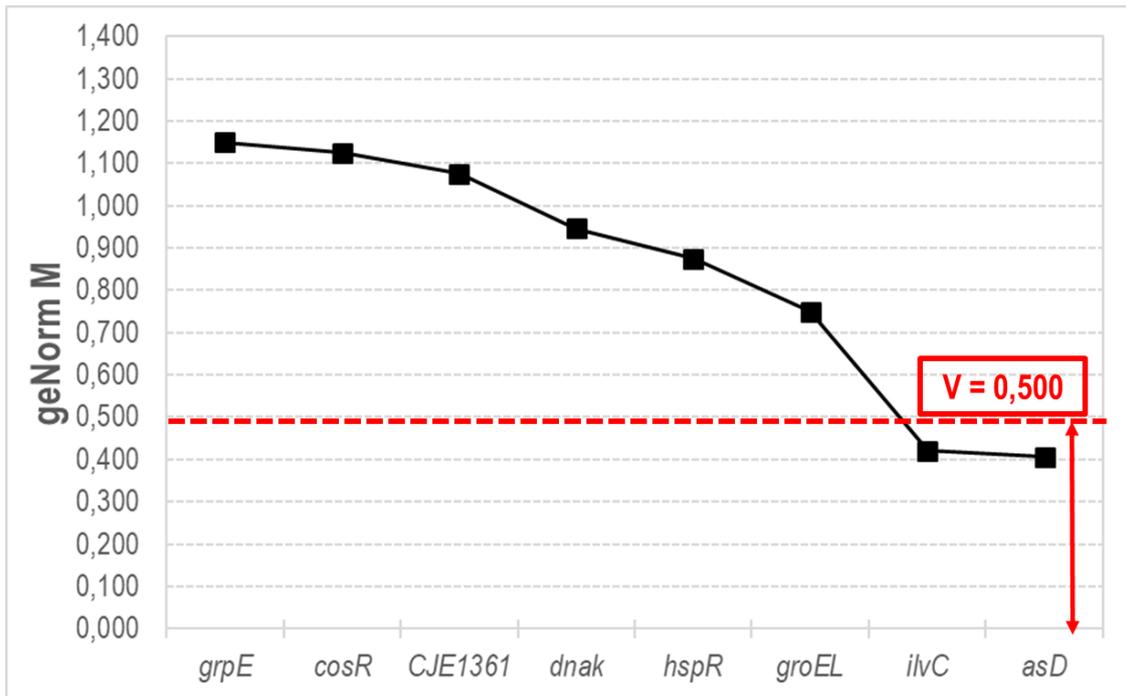
Détermination des gènes de référence interne

Comme décrit dans les Matériels et Méthodes, les gènes de référence sont déterminés par la méthode geNorm à partir des critères de stabilité M et de variabilité des facteurs de normalisation selon le nombre de gènes utilisés, V (Fig 13).

Pour notre cas d'étude, les deux gènes *asD* et *ilvC*, avec une valeur de M inférieure à 0,5, sont identifiés comme les meilleurs gènes de référence potentiels (Fig 13A). Le geNorm V pour V2/3 est inférieur à 0,15 signifiant que deux gènes de référence suffisent pour le calcul du facteur de normalisation (Fig 13B). L'association de ces deux résultats détermine que les meilleurs gènes de référence à utiliser sont ici les gènes *asD* et *ilvC*.

Pour chaque échantillon de chaque condition, la moyenne géométrique de l'expression du gène *asD* et celle du gène *ilvC* est calculée, c'est le facteur de normalisation. Il est ensuite appliqué à l'expression de l'ensemble des gènes cibles.

A



B

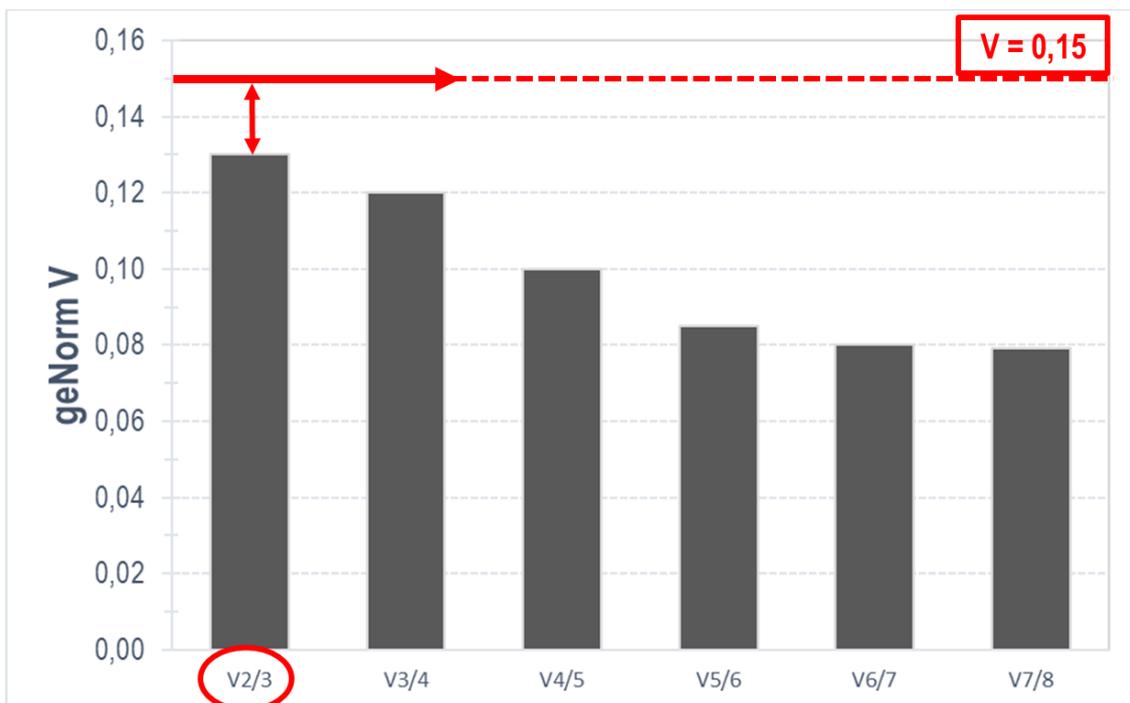


Figure 13 : Détermination des gènes de référence par la méthode geNorm. (A) Détermination des gènes les plus stables. Le graphique représente les valeurs de geNorm M pour chaque gène. Les gènes apparaissent classés de gauche à droite comme ayant l'expression la moins stable vers la plus stable. Les meilleurs candidats ont une valeur inférieure à 0,5. (B) Détermination du nombre optimal de gènes de référence. Le graphique représente les valeurs de geNorm V pour chaque comparaison des valeurs des facteurs de normalisation obtenues en utilisant n et n+1 gènes ($V_n/n+1$) à partir des gènes les plus stables obtenus en (A). Une valeur inférieure à 0,15 signifie qu'il n'y a pas d'intérêt à ajouter un gène de référence. D'après le logiciel qbase+, Biogazelle.

Analyse des résultats : exemple d'expressions différentielles normalisées

Les expressions différentielles sont calculées par rapport à la condition témoin dont l'expression est ramenée à 1. L'expression des gènes peut être interprétée de trois manières différentes : une surexpression, une sous-expression ou un niveau d'expression similaire, toujours sous-entendu : par rapport à la condition témoin et par rapport aux gènes de référence. Les expressions relatives sont exprimées en $2^{-\Delta\Delta Ct}$ représentées par des histogrammes, ici en \log_2 (Fig 14).

La figure 14 montre des exemples de résultats. Les résultats statistiques sont obtenus par une Anova réalisée sur l'ensemble des résultats. L'expression des gènes *dnaK* et *grpE* est surexprimée significativement chez les bactéries stressées par rapport aux bactéries témoin (Fig 14, en vert). Les gènes *cosR* et *CJE1361* sont environ 15 fois moins exprimés en conditions de stress (Fig 14, en rouge-orange). Les gènes *groEL* et *hspR* sont exprimés de la même manière dans les deux conditions (Fig 14, en bleu).

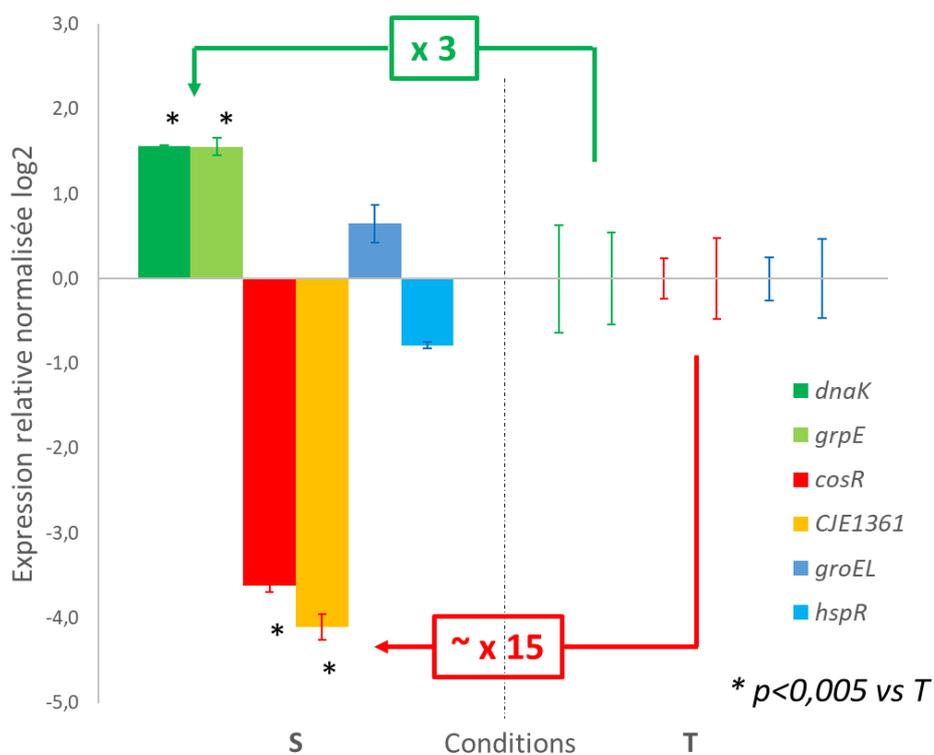


Figure 14 : Expression relative normalisée de différents gènes d'une condition de stress (S) contre une condition non stressante (T). Les expressions des gènes cibles *dnaK* et *grpE* (vert), le gène *cosR* (rouge) et le gène *CJE1361* (orange) et les gènes *groEL* et *hspR* (bleu) sont représentées par rapport aux gènes de référence. En encadré apparaissent les rapports moyens à la condition témoin des sur-expressions (en vert) et des sous-expressions (en rouge). La différence significative ($p < 0,005$) de l'expression d'un gène par rapport au témoin est indiquée par une étoile (*).

Points de vigilance

- L'interprétation des résultats d'expressions différentielles doit s'appuyer sur une analyse statistique robuste. Le choix du/des test(s) statistique(s) à appliquer devra *a minima* tenir compte de la nature et du nombre des échantillons, s'ils sont appariés ou non, des répétitions biologiques, des facteurs considérés et des réponses étudiées, etc.
- Au-delà des analyses statistiques, l'interprétation biologique des résultats est importante. Une expression différentielle d'un facteur inférieur ou égal à deux entre deux gènes n'a pas forcément de sens biologiquement parlant.

Conclusion

Cet article décrit les différents tests de mises au point et les points de contrôle des différentes étapes de notre méthode d'analyse de RT-qPCR appliquée à l'étude de la réponse transcriptomique chez *Campylobacter jejuni* soumis à un stress. Nous avons également mis en avant des points de vigilance auxquels être attentifs dans le cadre d'une analyse d'expression différentielle par RT-qPCR en détection SybrGreen puisque de nombreux facteurs sont finalement dépendants de l'étude menée, de la nature des échantillons et des conditions d'expérimentations. Pour notre équipe, nous avons attesté que notre méthode était fiable et robuste permettant la publication des résultats.

Cet article est publié sous la licence Creative Commons (CC BY-SA).



<https://creativecommons.org/licenses/by-sa/4.0/>

Pour la citation et la reproduction de cet article, mentionner obligatoirement le titre de l'article, le nom de tous les auteurs, la mention de sa publication dans la revue « Le Cahier des Techniques de l'Inra », la date de sa publication et son URL).

Bibliographie

Bustin SA, Benes V, Garson JA, et al. The MIQE guidelines: minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments. *Clin Chem*. 2009 Apr;55(4):611–622. doi:10.1373/clinchem.2008.112797.

Hellemans et al. qBase relative quantification framework and software for management and automated analysis of real-time quantitative PCR data. *Genome Biol*. 2007;8(2):R19.

Hurst, A. (1977). "Bacterial injury: a review." *Canada Journal of Microbiology* 23: 935-944.

Laurell H, Kubista M, Iacovoni JS. Methods for determining the expression level of a gene of interest including correction of RT-qPCR data for genomic DNA-derived signals. Brevet numéro PCT/EP2012/061289 [en ligne]. 20 December 2012. Disponible sur : <https://patentimages.storage.googleapis.com/e1/ed/47/89b4ea5c4b5dc8/WO2012171997A1.pdf>

Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods*. 2001 Dec;25(4):402–408. doi:10.1006/meth.2001.1262.

Phongsisay V, Perera VN, Fry BN. Evaluation of eight RNA isolation methods for transcriptional analysis in *Campylobacter jejuni*. *J Microbiol Methods*. 2007 Feb;68(2):427–429. doi:10.1016/j.mimet.2006.09.002.

Storz, G. and R. Hengge-Aronis (2000). Preface. *Bacterial stress responses*. G. Storz and G. S. a. R. Hengge-Aronis. Washington, DC, ASM Press,. xii–xiv

Vandesompele J, De Preter K, Pattyn F, et al. Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. *Genome Biol.* 2002 Jun 18;3(7):RESEARCH0034. doi:10.1186/gb-2002-3-7-research0034.

Whelan et al. A method for the absolute quantification of cDNA using real-time PCR. *J Immunol Methods.* 2003 Jul;278(1-2):261-9. Doi:10.1016/s0022-1759(03)00223-0.