

Sélection d'un gène de référence en RT-qPCR

Utilisation de l'outil NormFinder

Marjorie DUFRESNE et Jade BERTRAN

Réunion technique – 16.03.2026

Pourquoi utiliser un gène de ménage ?

Corriger :

- Variabilité quantité d'ARN
- Qualité de rétrotranscription
- Variabilité pipetage

Hypothèse :

Expression stable dans toutes les conditions

Problème : un gène de ménage n'est pas universellement stable

Critères d'un bon gène de référence

- Expression stable entre groupes expérimentaux
- Expression similaire au gène d'intérêt (Ct proches)
- Non régulé par la condition / le traitement étudié
- Efficacité PCR proche de 100 % (primers testés)

Exemples de gènes candidats

GAPDH

GUSB

HPRT1

RPLP0

ACTB

18S rRNA

HPRT1

Toujours tester plusieurs candidats (≥ 3 recommandés)

Méthodes de validation des gènes de référence

- Δ Ct method
- geNorm
- BestKeeper
- **NormFinder**

NormFinder = méthode basée sur un modèle statistique robuste
Prend en compte variation intra- et inter-groupe

Principe de NormFinder

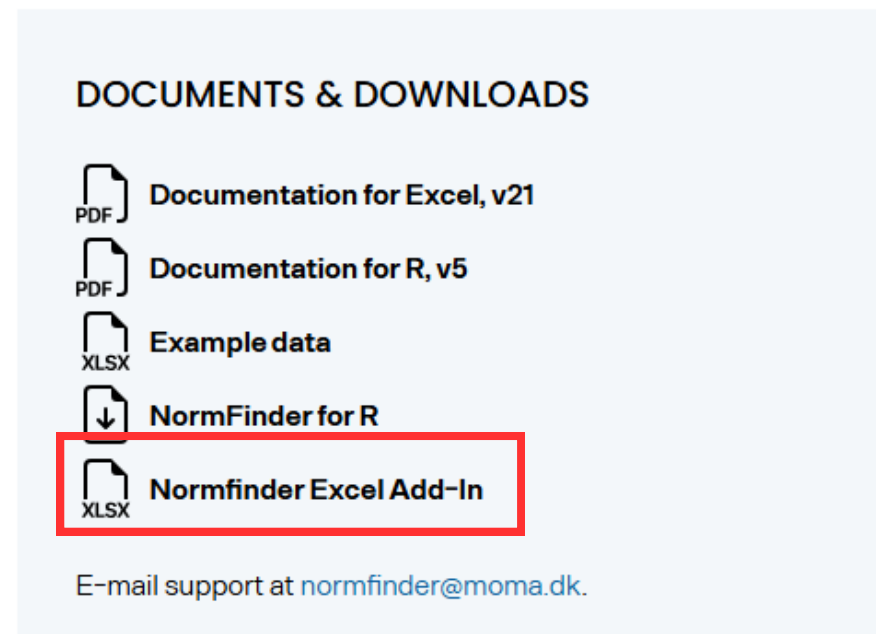
- Modèle à effets mixtes
- Calcule un score de stabilité
- Plus le score est bas → plus le gène est stable
- Peut proposer la meilleure combinaison de deux gènes

Installation de NormFinder

1

moma.dk/software/normfinder

2



3

- Ouvrir excel
 - Fichier
 - Options
- Compléments
 - Atteindre
 - Parcourir
- Téléchargements
 - Norminder

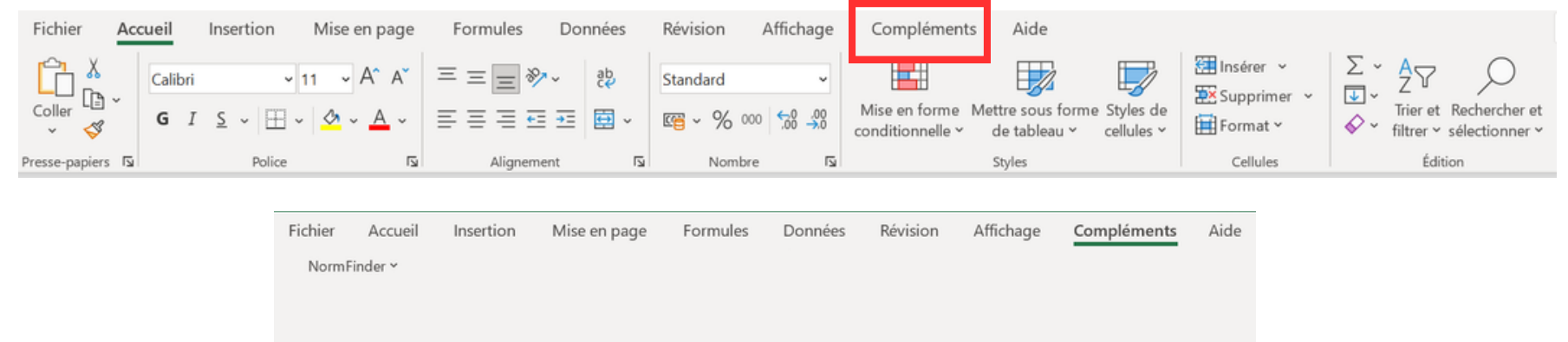
→ OK

4

Redémarrer l'ordinateur

5

Ouvrir excel



Nb:

- Si ne fonctionne pas : Autoriser les macros manuellement
 - Excel → Fichier
 - Options
 - Centre de gestion de la confidentialité
 - Paramètres du centre
 - Paramètres des macros
 - Sélectionner :
 - Activer toutes les macros (temporairement)

Préparation des données dans Excel

Format recommandé :

Colonnes = échantillons

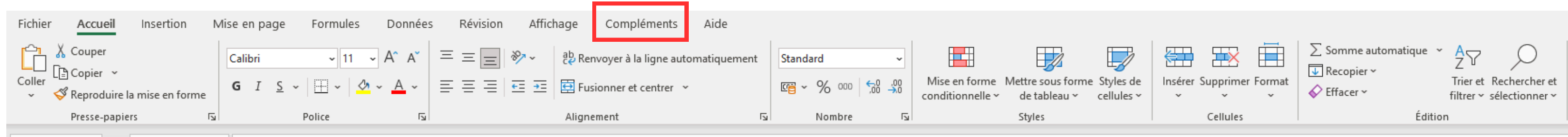
Lignes
= gènes candidats (≥ 3 gènes)

	Sample 1	Sample 2	Sample 3	Sample 4	Sample 5	Sample 6	Sample 7	Sample 8	Sample 9	Sample 10	Sample 11	Sample 12
RPLPO	19,4131649	19,5039119	19,642361	19,679283	19,806783	19,5264715	19,5607329	19,3201601	19,2840478	19,545061	19,6188551	19,7984613
PPIA	19,367492	19,4008422	19,3482715	19,3441092	19,4494244	19,4848036	19,439798	19,3160366	19,2252551	19,3893036	19,3099748	19,3609068
HPRT1	26,2985243	26,3652896	26,0207434	26,0345742	26,2062104	26,4150248	26,2762426	26,3939878	26,4807669	26,527997	26,2715922	26,3166965
GUSB	25,2064628	25,367066	25,2668964	25,3169557	25,3912057	25,460674	25,3019273	25,4337638	25,620094	25,6892572	25,5354208	25,6069911
Groupes de traitement / Temps d'arrêt	1	1	1	1	2	2	2	2	3	3	3	3

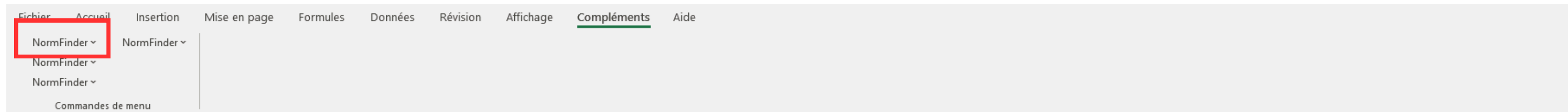
Données = Ct

Utilisation de l'add-in NormFinder

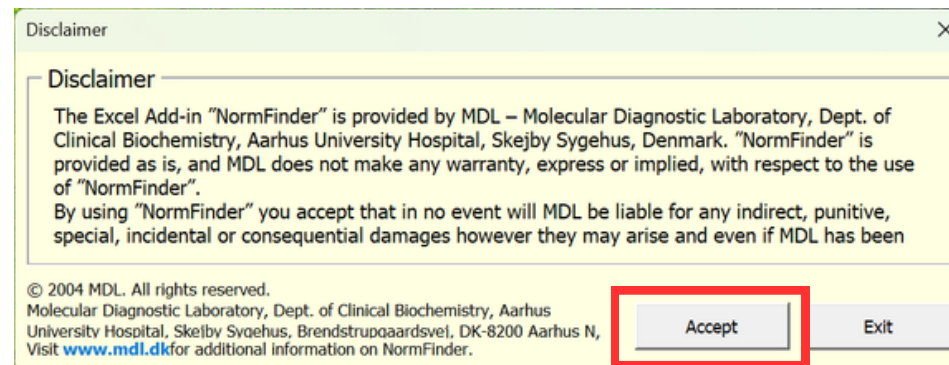
1



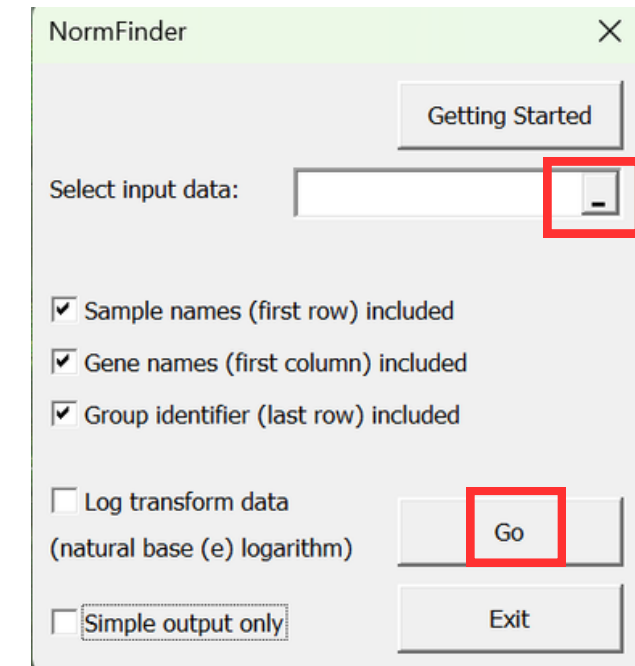
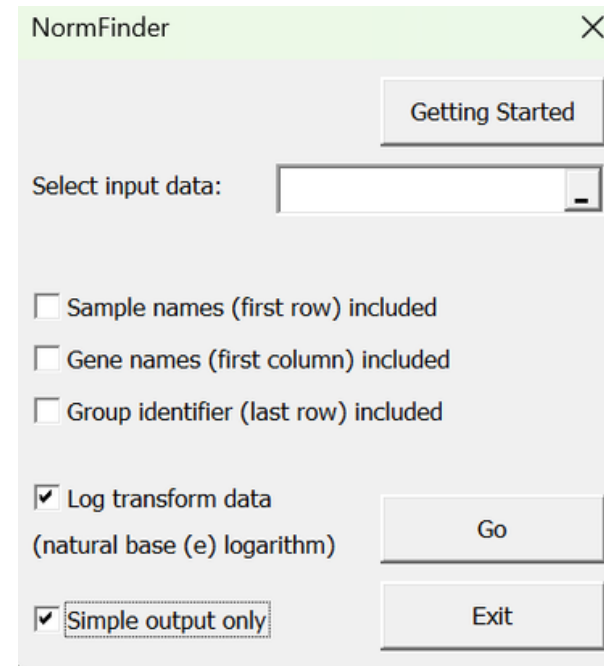
2



3



4



5

	Sample 1	Sample 2	Sample 3	Sample 4	Sample 5	Sample 6	Sample 7	Sample 8	Sample 9	Sample 10	Sample 11	Sample 12
RPLPO	19,4131649	19,5039119	19,642361	19,679283	19,806783	19,5264715	19,5607329	19,3201601	19,2840478	19,545061	19,6188551	19,7984613
PPIA (2)	19,367492	19,4008422	19,3482715	19,3441092	19,4494244	19,4848036	19,439798	19,3160366	19,2252551	19,3893036	19,3099748	19,3609068
HPRT1	26,2985243	26,3652896	26,0207434	26,0345742	26,2062104	26,4150248	26,2762426	26,3939878	26,4807669	26,527997	26,2715922	26,3166965
GUSB	25,2064628	25,367066	25,2668964	25,3169557	25,3912057	25,460674	25,3019273	25,4337638	25,620094	25,6892572	25,5354208	25,6069911
	1	1	1	1	2	2	2	2	3	3	3	3

Exemple de résultats

Gene name	Stability value			Best gene	PPIA
RPLPO	0,096			Stability value	0,049
PPIA	0,049				
HPRT1	0,084			Best combination of two genes	PPIA and GUSB
GUSB	0,100			Stability value for best combination of two genes	0,043
Intragroup variation					
Group identifier	1	2	3		
RPLPO	0,040	0,038	0,027		
PPIA	0,005	0,007	0,002		
HPRT1	0,021	0,043	0,028		
GUSB	0,024	0,033	0,036		
Intergroup variation					
Group identifier	1	2	3		
RPLPO	-0,022	0,085	-0,063		
PPIA	0,027	0,016	-0,042		
HPRT1	0,053	-0,062	0,009		
GUSB	-0,057	-0,039	0,096		

Normalisation finale

	Sample 1	Sample 2	Sample 3	Sample 4	Sample 5	Sample 6	Sample 7	Sample 8	Sample 9	Sample 10	Sample 11	Sample 12
RPLPO	19,4131649	19,5039119	19,642361	19,679283	19,806783	19,5264715	19,5607329	19,3201601	19,2840478	19,545061	19,6188551	19,7984613
PPIA (2)	19,367492	19,4008422	19,3482715	19,3441092	19,4494244	19,4848036	19,439798	19,3160366	19,2252551	19,3893036	19,3099748	19,3609068
HPRT1	26,2985243	26,3652896	26,0207434	26,0345742	26,2062104	26,4150248	26,2762426	26,3939878	26,4807669	26,527997	26,2715922	26,3166965
GUSB	25,2064628	25,367066	25,2668964	25,3169557	25,3912057	25,460674	25,3019273	25,4337638	25,620094	25,6892572	25,5354208	25,6069911
	1	1	1	1	2	2	2	2	3	3	3	3
moy geom PPIA et GUSB	22,0949308	22,1842837	22,1104223	22,1299335	22,2226086	22,2732178	22,1780152	22,164826	22,1935315	22,3180825	22,2055924	22,2659958

Calcul ΔCt :

$Ct(\text{gène cible}) - Ct(\text{moy geom gène référence})$

Puis :

$\Delta\Delta Ct$

$2^{-\Delta\Delta Ct}$ (expression relative)

Points critiques / Limites

- Un gène stable dans un tissu \neq stable ailleurs
- Impact des conditions pathologiques
- Toujours valider pour chaque nouveau modèle

Conclusion

Guideline > Clin Chem. 2009 Apr;55(4):611-22. doi: 10.1373/clinchem.2008.112797. 

Epub 2009 Feb 26.

The MIQE guidelines: minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments

Stephen A Bustin ¹, Vladimir Benes, Jeremy A Garson, Jan Hellemans, Jim Huggett, Mikael Kubista, Reinhold Mueller, Tania Nolan, Michael W Pfaffl, Gregory L Shipley, Jo Vandesompele, Carl T Wittwer

Affiliations + expand

PMID: 19246619 DOI: 10.1373/clinchem.2008.112797 

CELL AND TUMOR BIOLOGY | AUGUST 02 2004

Normalization of Real-Time Quantitative Reverse Transcription-PCR Data: A Model-Based Variance Estimation Approach to Identify Genes Suited for Normalization, Applied to Bladder and Colon Cancer Data Sets

Claus Lindbjerg Andersen; Jens Ledet Jensen; Torben Falck Ørntoft

Tester \geq 3 gènes

Utiliser NormFinder pour validation statistique

Idéalement utiliser 2 gènes de référence

Documenter la validation (MIQE guidelines)

La sélection d'un gène de ménage :

Est une étape critique

Doit être expérimentalement validée

Influence directement la fiabilité des résultats RT-qPCR