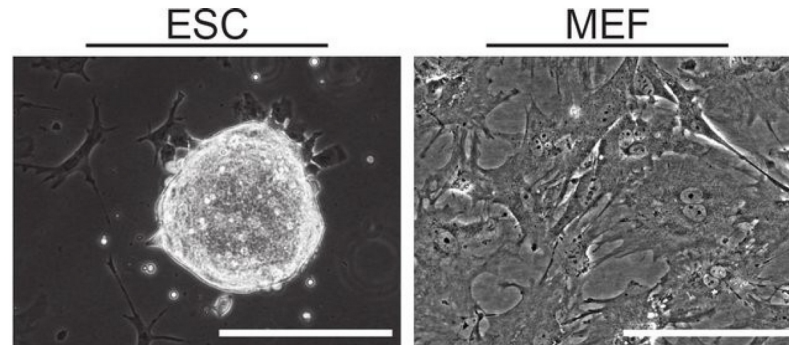
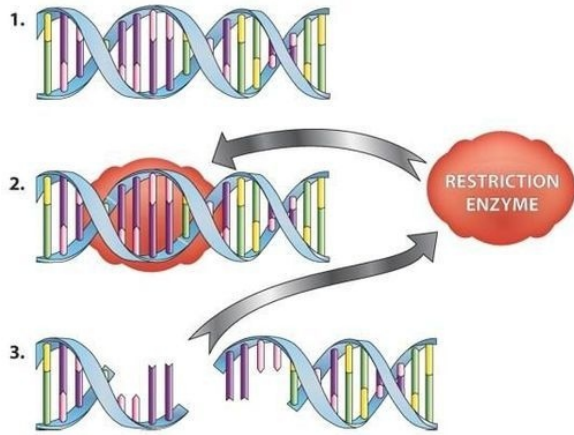


Étude des niveaux de méthylation approche globale LUMA



Boraas et al. 2016. PLoS ONE

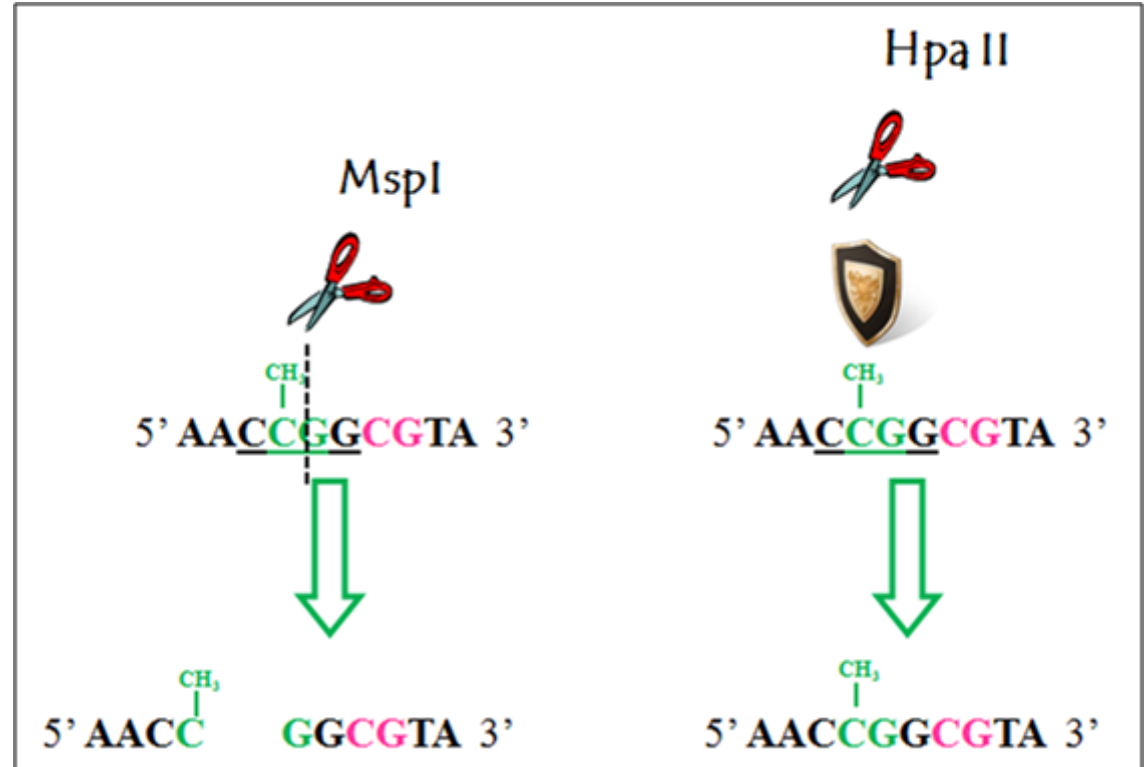
Analyse globale des niveaux de méthylation



Site de reconnaissance

5'...C C G G...3'

3'...G G C C...5'



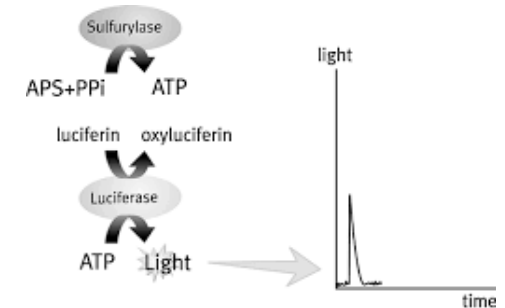
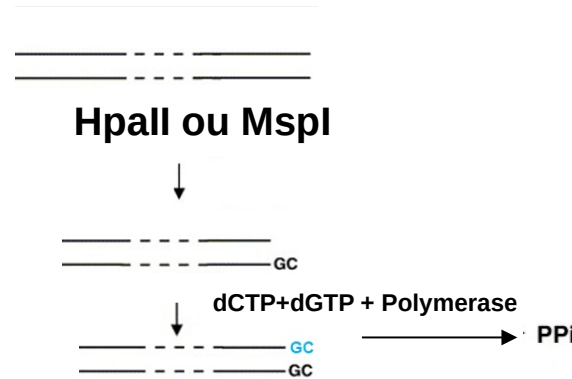
MspI: Insensible à la méthylation
HpaII: Sensible à la méthylation

LUMA

(LUMINOMETRIC METHYLATION ASSAY)

- Méthode pour l'**analyse globale** de la méthylation
- Détermination du niveau de méthylation : **rapide** (6h) & **quantitative**
- Aucune information concernant la localisation ou la répartition de la méthylation de l'ADN

Quantification du nombre de coupures par des enzymes de restriction sensibles ou non à la méthylation

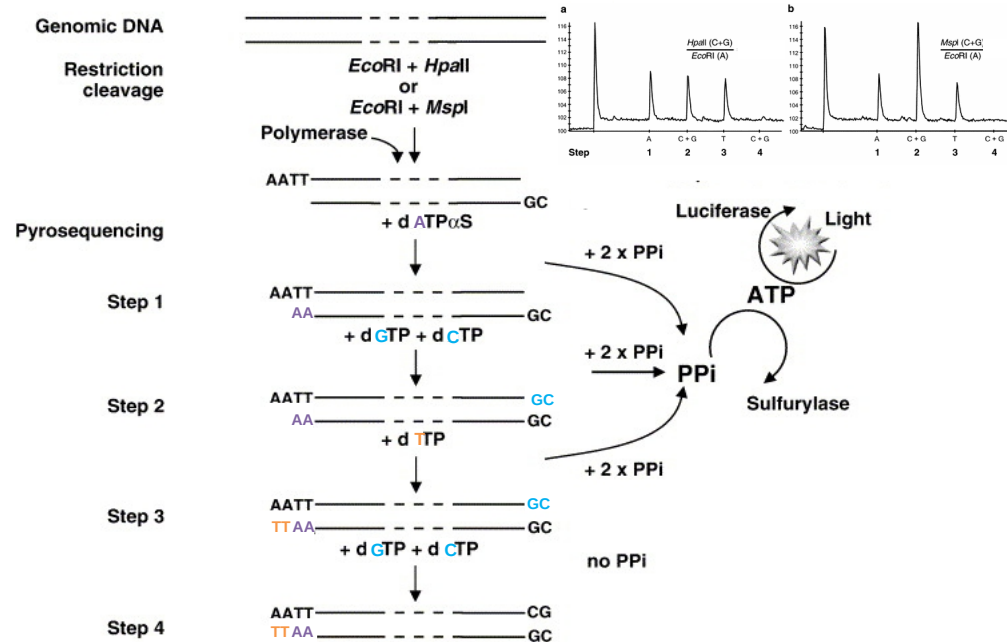


nucleotide incorporation generates light
seen as a peak in Pyrogram

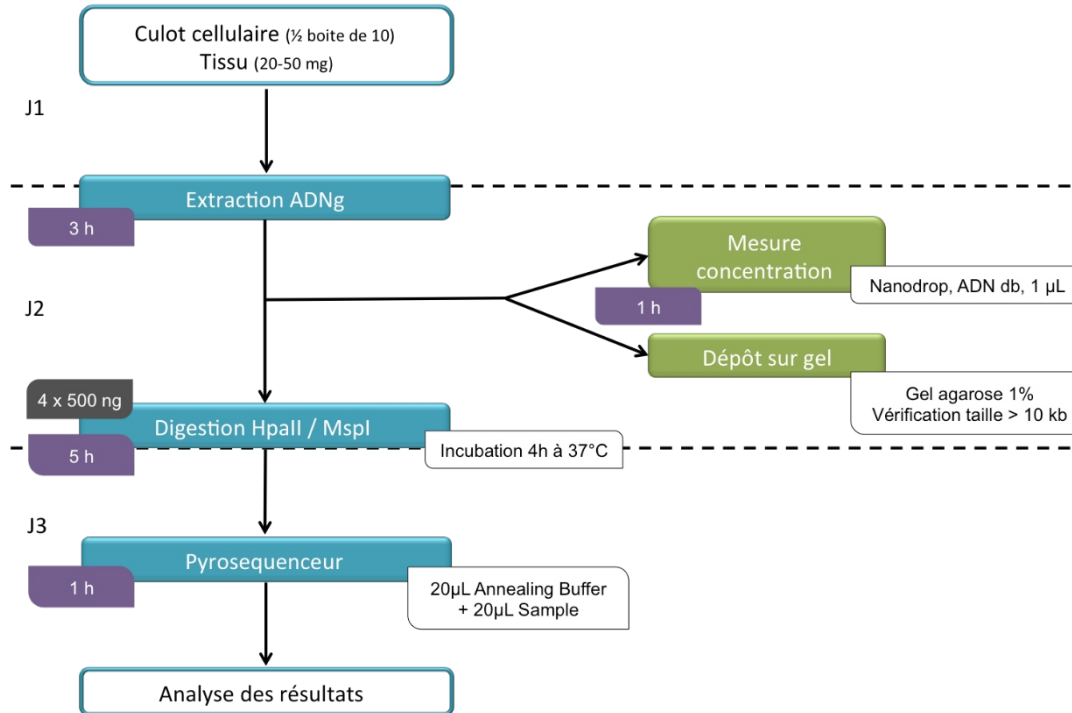
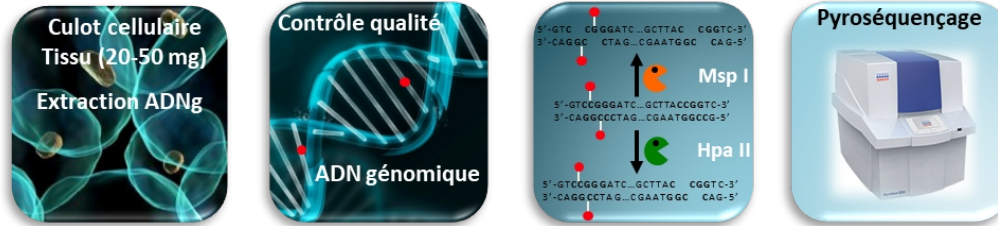
But: comparer les niveaux de méthylations globaux entre différents échantillons

LUMA (LUMINOMETRIC METHYLATION ASSAY)

Quantification du nombre de coupures par des enzymes de restriction (MspI & HpaII) sensibles ou non à la méthylation, par rapport à un étalon interne (EcoRI)

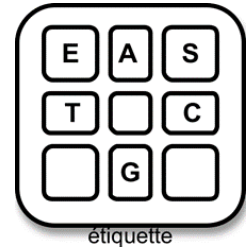
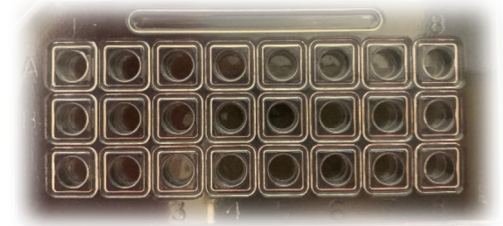


LUMA : STRATÉGIE



Protocole de pyroséquençage

- Chaque personne a un échantillon digéré avec 1) MspI ou 2) HpaII à déposer dans les puits de la plaque 24 puits
- Remplir la cassette selon les quantités indiquée par le programme :
 - puits E = mixE – 119µl
 - puits S = mixS – 119µl
 - puits A = nucléotide A – 57µl
 - puits T = nucléotide T – 57µl
 - puits C = nucléotide C et G – 57µl de C, 57µl de G
 - puits G = 100µl H₂O



étiquette

- Ouvrir délicatement le capot du pyroséquenceur et mettre la cassette.
- Dans chaque puits de la plaque de pyro, déposer 20µl d'annealing buffer et 20 µl de produit de digestion.
- Lancer le programme à partir de la clé usb.
- Récupération des résultats et analyses

Protocole d'analyse

Dans le logiciel du pyroséquenceur, regarder les profils :

Pics A, C et T doivent être < pic S

Pic G = 0

Pics A et T finaux pas trop grand.

Pic C MspI doit être plus grand que pic C HpaII du même échantillon.

Tools – Export Peak Heights – All wells, row en format .csv

Ouvrir Excel, ouvrir le fichier .csv, convertir les (;), remplacer les (.) par des (,).

Ajouter des noms aux colonnes : A - C - T - C' - H₂O - A' - T'

Faire les calculs :

- A/T et $(A+A')/(T+T')$ reflètent la digestion **EcoRI** et doivent être proches de 1 (≥ 1 car A est légèrement auto luminescent)
- Calculer la **moyenne AT** : $\text{moyenne}((A+A'):(T+T'))$
- $(C+C')/(\text{moyenne AT})$ reflète **Msp/Eco** ou **Hpa/Eco**.
- Le ratio Msp/Eco doit être constant entre échantillons. Msp/Eco doit être \geq Hpa/Eco.

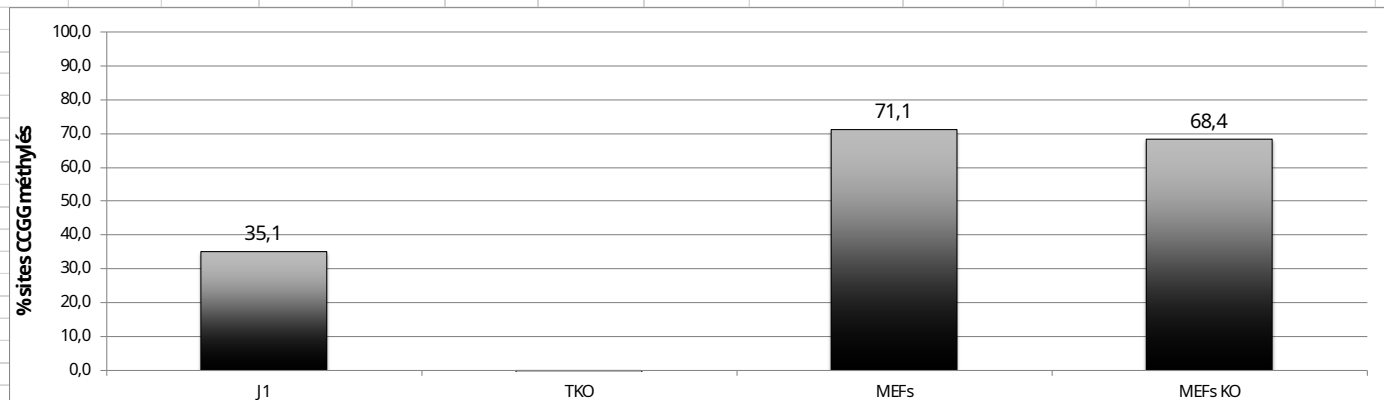
Faire le calcul $(\text{Hpa/Eco})/(\text{Msp/Eco}) = \text{rapport Hpa/Msp}$ représentant le nombre de sites non méthylé sur le nombre de site total. Une méthylation de 100% donne un rapport de 0 et une absence de méthylation un rapport de 1.

*Le **pourcentage de méthylation** quant à lui se calcule selon la formule : $\%meDNA = 100 * (1 - (\text{Hpa/Msp}))$, ce qui donne une représentation graphique plus logique.*

Résultats

Run1																
Digestion	Echantillon	A	C	T	C'	H2O	A'	T'	EcoRI (A+A')/(T+T')	(A+A')	(T+T')	moyenne AT	Msp/Eco (C+C')/moyAT	Hpa/Eco (C+C')/moyAT	Hpa/Msp (Hpa/Eco)/(Msp/Eco)	% méthylation
MspI	J1	3,58	14,54	3,19	0,89	0,06	1,91	1,39	1,20	5,49	4,58	5,04	3,06		0,65	34,5
	TKO	5,66	20,73	5,26	0,79	0,06	2,57	2,09	1,12	8,23	7,35	7,79	2,76		1,04	-3,7
	MEFs	9,61	34,05	8,62	0,77	0,03	3,39	3,3	1,09	13	11,92	12,46	2,79		0,28	71,7
	MEFs KO	5,52	28,88	5,19	0,8	0,12	1,72	1,53	1,08	7,24	6,72	6,98	4,25		0,32	68,3
	J1	3,85	15,9	3,64	0,93	0,14	2,19	1,58	1,16	6,04	5,22	5,63	2,99		0,64	35,6
	TKO	5,96	22,36	5,66	0,98	0,01	2,78	2,3	1,10	8,74	7,96	8,35	2,80		1,01	-1,3
	MEFs	9,29	31,51	7,87	0,71	0,04	3,45	3,29	1,14	12,74	11,16	11,95	2,70		0,29	70,5
	MEFs KO	5,23	27,81	4,82	0,8	0,12	1,57	1,37	1,10	6,8	6,19	6,50	4,40		0,32	68,4
Hpa II	J1	3,37	9,4	3,41	0,6	0	1,82	1,37	1,09	5,19	4,78	4,99		2,01		
	TKO	6,02	21,25	5,22	0,57	0	2,15	1,85	1,16	8,17	7,07	7,62		2,86		
	MEFs	9,61	9,52	8,64	0,25	-0,04	3,35	3,07	1,11	12,96	11,71	12,34		0,79		
	MEFs KO	4,82	7,56	4,51	0,33	0,15	1,16	1,21	1,05	5,98	5,72	5,85		1,35		
	J1	3,79	10,12	3,86	0,93	0,05	2,13	1,7	1,06	5,92	5,56	5,74		1,93		
	TKO	6,21	22,1	5,47	0,73	0,03	2,43	2,02	1,15	8,64	7,49	8,07		2,83		
	MEFs	9,41	9,51	8,66	0,29	0,05	3,43	3,18	1,08	12,84	11,84	12,34		0,79		
	MEFs KO	4,28	6,66	3,98	0,37	0,11	0,93	0,92	1,06	5,21	4,9	5,06		1,39		

% sites CCGG méthylés			
	Run 1	Run 2	Moyenne
J1	34,5	35,6	35,1
TKO	-3,7	-1,3	-2,5
MEFs	71,7	70,5	71,1
MEFs KO	68,3	68,4	68,4

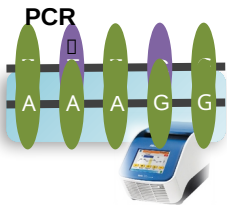
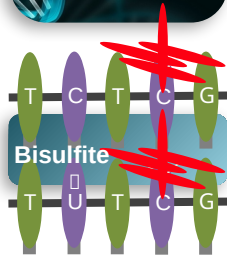


BISULFITE PYROSÉQUENÇAGE

Méthode d'analyse de la méthylation à un locus précis



Analyse et quantification du niveau de méthylation d'un ou plusieurs CpG consécutifs



5'-GAGTCGC.....CG.....^mCG.....GCTTTTA-3'
3'-CTCAGCG.....GC.....G^mC.....CGAAAAT-5'

Denaturation
Bisulfite Treatment

5'-GAGTUGU.....UG.....^mCG.....GUTTTTA-3'

3'-UTUAGUG.....GU.....G^mC.....UGAAAAT-5'

PCR amplification (strand specific)

5'-GAGTTGT.....TG.....CG.....GTTTTTA-3'
3'-CTCAACA.....AC.....GC.....CAAAAAT-5'

Méthode basée sur la conversion bisulfite qui ne permet pas de différencier 5-mC et 5-hydroxy-mC