

COURS 5 ; Cartographie du génome humain

1. L'hybridation de cellules somatiques homme-rongeur

Cette technique a été utilisée pour la cartographie du génome humain, mais en théorie, elle pourrait s'appliquer à de nombreux autres systèmes animaux. La procédure utilise des cellules qui poussent en culture.

- Si l'on mélange des suspensions de cellules humaines (fibroblastes) et murines (souris) en présence du virus Sendai. Les cellules vont fusionner ainsi que leurs noyaux pour former une lignée cellulaire mononucléaire, composée d'un jeu de chromosomes d'hommes et de souris. Les chromosomes humains et murins étant reconnaissables en raison de leur différence de taille et de nombre, on peut facilement distinguer les deux jeux dans les cellules hybrides
- Toutefois, au cours des divisions cellulaires ultérieures, les chromosomes humains sont éliminés au hasard de l'hybride.
- On peut stopper la perte des chromosomes humains par la formation d'hybride partiel stable comme suit : la lignée cellulaire murine utilisée est mutante pour une fonction biochimique spécifique, ainsi si les cellules sont mises à pousser, la fonction absente devra être assurée par le génome humain.
- Cette technique permet de maintenir les cellules hybrides qui contiennent un jeu complet de chromosomes murins et un petit nombre de chromosomes humains, dont le nombre et type varient d'un hybride à l'autre, mais qui contient toujours le chromosome humain portant l'allèle de type sauvage déficient dans le génome de la souris.
- L'ADN peut être fabriqué de novo ou par voie de récupération, les deux enzymes responsables de la biosynthèse par voie de récupération (voie de novo inhibée par aminoptérine) sont la thymidine kinase (thymine → acide thymidilique) et l'hypoxanthine-guanine phosphoribosyl transférase (HGPRT) hypoxanthine → acide inosinique...AMP et GMP.
- Chaque lignée étant déficiente pour une enzyme, ni les cellules murines ni les cellules humaines ne sont capables de fabriquer seules l'ADN contrairement aux cellules hybrides qui pourront fabriquer les deux enzymes

- Hybride : tk+/tk-

Hgp⁺rt+/hgp⁻rt-

- Pour continuer à pousser sur un milieu contenant de l'hypoxanthine, de l'aminoptérine et de la thymidine, un hybride doit conserver au moins l'un des chromosomes humains portant l'allèle tk⁺
- Heureusement l'élimination progressive des chromosomes humains à partir des lignées cellulaires fusionnées peut être suivie sous microscope, car les chromosomes murins se distinguent des chromosomes humains
- On met à pousser séparément les cellules hybrides différentes pour qu'elles forment des lignées hybrides et on obtient finalement une banque de lignées qui contiennent au total tous les chromosomes humains
- A l'aide d'une banque complète de lignées cellulaires spécifiques d'un chromosome, on peut attribuer des gènes ou des marqueurs humains de chromosomes.
- Si le jeu de chromosomes humains est homozygote pour un marqueur moléculaire humain (allèle contrôlant un antigène de surface, un besoin nutritionnel, une protéine spécifique...) alors la présence ou l'absence de ce marqueur dans chaque lignée de cellules hybrides va être corrélée à la présence ou l'absence de certains chromosomes humains dans chaque lignée

2. Carte chromosomique à haute résolution

- Des mesures ont montré que les intervalles chromosomiques entre les gènes devraient correspondre à des quantités importantes d'ADN.
- Il fallait donc de nombreux marqueurs génétiques supplémentaires pour combler les espaces vides et produire une carte à plus haute résolution.
- La solution fut apportée par la découverte de différentes régions d'ADN pouvant être utilisée comme marqueurs moléculaires.
- Un marqueur moléculaire est un site présentant une hétérozygotie pour un type d'une variation quelconque d'ADN non codant, de la même manière que des allèles hétérozygotes.

- C'est un point de référence utile pour retrouver son chemin dans le génome :
- Les marqueurs microsatellite c'est-à-dire l'ADN dinucléotidique répété (CA/TG)
- Les marqueurs minisatellites
- Les polymorphismes de longueur des fragments de restriction (les RFLP)
- Ces marqueurs constituent des bornes. C'est un point de référence utile pour retrouver son chemin dans le génome