



البيوكيمياء . قواعد و تطبيقات في البيوتكنولوجيات
BIOCHIMIE. BASES ET APPLICATIONS EN BIOTECHNOLOGIES

تكوين
TAKWEEN

Techniques-Sommaire : <http://www.takween.com/techniques/techniques-biochimie.html>

Electrophorèse : http://www.takween.com/techniques/05_Electrophorese.html

Isoenzymes-mutations : <http://www.takween.com/techniques/isoenzymes-mutations.pdf>

Isozymes. Principe de détection : <http://www.takween.com/techniques/isoenzymes-detection.pdf>

Isozymes : loci, allèles : <http://www.takween.com/techniques/isoenzymes-loci-alleles.pdf>

RAPD : http://www.takween.com/techniques/11_RAPD.pdf

AFLP : http://www.takween.com/techniques/13_AFLP.pdf

SSR (microsatellites) : <http://www.takween.com/techniques/microsatellites-SSR-marqueurs.pdf>

Polymorphisme de longueur des fragments de restriction de l'ADN (RFLP)

La technique RFLP repose sur la digestion d'un DNA cible par une ou plusieurs enzymes de restriction spécifiques des sites de restriction portés par le DNA. Après électrophorèse, les fragments séparés sont hybridés avec un DNA sonde, provenant souvent de banques de DNA génomique ou complémentaire. Cette sonde peut provenir d'une espèce proche de l'espèce à étudier (sonde hétérologue).

Technique RFLP

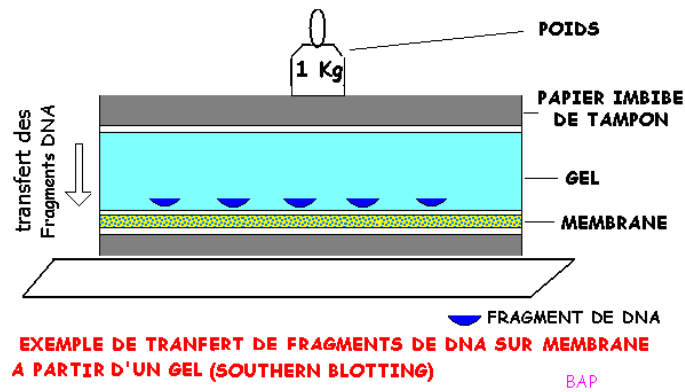
1. Extraction et purification suffisante du DNA
2. Digestion du DNA pure par une enzyme de restriction reconnaissant des séquences de 3-9 nucléotides
—► Fragments de DNA
3. Séparation des fragment de DNA par électrophorèse sur un gel
4. Transfert des fragment de DNA sur une membrane de nylon ou nitrocellulose (Southern blotting)
5. Hybridation des fragments de DNA avec des sondes marquées

Sources du polymorphisme

- Mutations ponctuelles entrainant un gain ou perte de sites de restriction
- Mutations de types Insertion - Déletion

Marqueurs de types RFLP liés au polymorphisme du DNA
(RFLP = Restriction Fragment Length Polymorphism)

Si deux individus diffèrent par un ou plusieurs sites ou, même, par la distance séparant deux sites identiques consécutifs, il se crée une différence dans la longueur des fragments générés par l'enzyme de restriction. Les milliers de fragments obtenus après digestion enzymatique et révélés par le bromure d'éthidium (BET), montrent sous UV un seul voile continu (smear). Une fois transféré sur une membrane de nylon ou de nitrocellulose (Southern, 1975) et hybridé par un DNA sonde, le DNA cible digéré est visualisé par autoradiographie, si la sonde est marquée au P32 (sonde chaude) ou par méthodes biochimiques si la sonde est non radioactive (sonde froide).

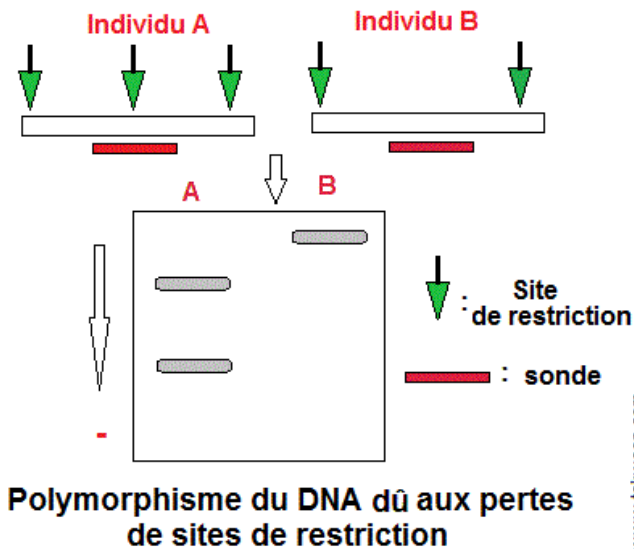


Origines du polymorphisme de restriction (RFLP) :

- Perte ou gain d'un site de restriction
- Mutation de type insertion-déletion

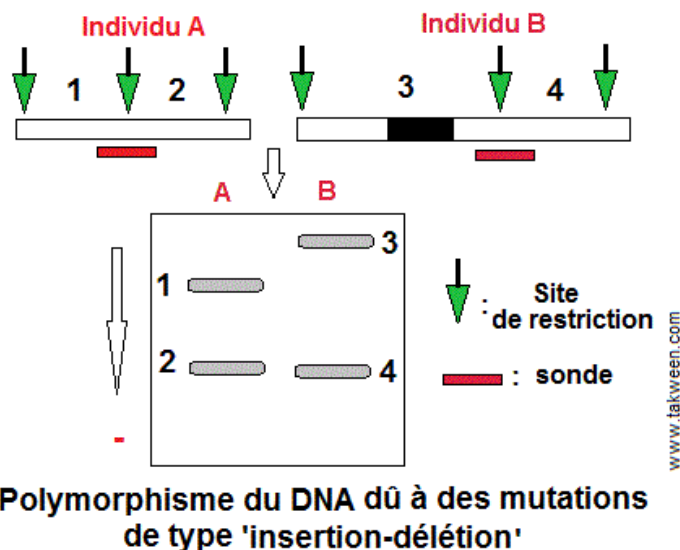
Dans les deux cas les loci sont généralement bialléliques et l'expression des allèles est codominante.

Polymorphisme dû à la disparition d'un site de restriction (mutations ponctuelles).



Polymorphisme du DNA dû aux pertes de sites de restriction

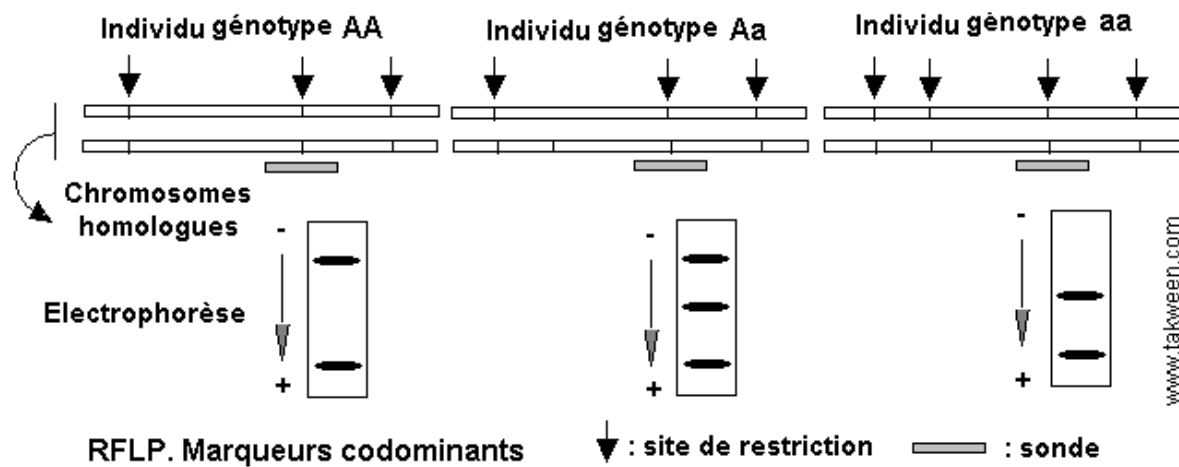
Polymorphisme dû aux mutations de type 'insertion - délétion'.



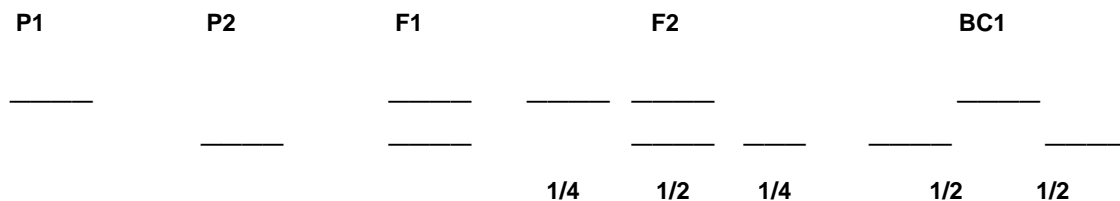
Polymorphisme du DNA dû à des mutations de type 'insertion-délétion'

Caractéristiques principales des marqueurs RFLP.

- ✓ Marqueurs reflétant un polymorphisme de longueur de fragment
- ✓ Marqueurs codominants



Ségrégation des marqueurs moléculaires de type 'RFLP'.



Valeurs comparatives des marqueurs biochimiques et moléculaires.

Types de marqueurs	Nombre	Déterminisme	Effet de l'environnement	Faisabilité	Coûts
Morphologie	rares	Dominants	Oui	++++	Culture de plantes
Isoenzymes	50	Codominants	Non/Oui	+++	+
RFLP	Illimités	Codominants	Non	+	+++
Specific PCR,					
CAPS	Illimités	Codominants	Non	++	++++
RAPD	Illimités	Dominants	Non	+++	++++

Liens utiles :

- Techniques-Sommaire : <http://www.takween.com/techniques/techniques-biochimie.html>
 Electrophorèse : http://www.takween.com/techniques/05_Electrophorese.html
 Travaux dirigés (TD) : http://www.takween.com/techniques/15_TD.pdf
 Travaux dirigés (TP) : http://www.takween.com/techniques/14_TP.pdf
 Isoenzymes-mutations : <http://www.takween.com/techniques/isoenzymes-mutations.pdf>
 Isozymes. Principe de détection : <http://www.takween.com/techniques/isoenzymes-detection.pdf>
 Isozymes : loci, allèles : <http://www.takween.com/techniques/isoenzymes-loci-alleles.pdf>
 Isozymes hétéromériques : <http://www.takween.com/techniques/isoenzymes-heteromeriques.pdf>
 RAPD : http://www.takween.com/techniques/11_RAPD.pdf
 AFLP : http://www.takween.com/techniques/13_AFLP.pdf
 SSR (microsatellites) : <http://www.takween.com/techniques/microsatellites-SSR-marqueurs.pdf>