

2. Les méthodes

Parmi les méthodes d'étude de la composition biochimique des cellules nous citons :

2.1. Electrophorèse

Est une technique d'analyse et de séparation basée sur les critères de la charge électrique et la taille des molécules. La migration différentielle de particules chargées électriquement, se fait sous l'influence d'un champ électrique. Seules les particules chargées positivement ou négativement sont attirées par les pôles opposés du champ électrique. Parmi les supports utilisés dans la technique d'électrophorèse, on note le gel de polyacrylamide donnant de bonnes résolutions lors de la séparation. Il existe deux types d'électrophorèse selon le sens de migration : électrophorèse horizontale et verticale

2.2. Les méthodes d'analyse et de dosage biochimiques

Elles sont appliquées soit à des homogénats, soit à des fractions cellulaires à partir desquels on obtiendra des **extraits bruts = constituants biochimiques en solution**.

Elles consistent à rechercher la nature et la concentration des constituants biochimiques : glucides, lipides, protéines et acides nucléiques. Elles sont très nombreuses et concernent les techniques d'extraction, de purification, de caractérisation et de dosage.

✚ Spectrophotométrie

Spectrophotométrie d'absorption moléculaire

Elle s'appuie sur le fait que toute solution colorée traversée par un faisceau de lumière laisse passer une fraction de la lumière incidente ; la quantité de lumière absorbée est proportionnelle à la concentration du composé coloré recherché (loi de Beer-Lambert).

✚ Chromatographie

Pour l'identification et le dosage de matière organique, on a, en général, recours à des techniques chromatographiques.

Chromatographie en phase gazeuse : Est composé de trois parties : un injecteur, une colonne de séparation et un détecteur. Après avoir introduit l'échantillon au moyen d'une micro seringue par l'injecteur, la séparation des molécules s'effectue dans la colonne en fonction d'un gradient de température. A leur sortie de la colonne chromatographique, les composés séparés passent individuellement dans un détecteur dont la fonction est de donner un signal (sous forme de pic) dont l'intensité est proportionnelle à la quantité de composé injecté.

La chromatographie en phase liquide haute pression (HPCL) utilise pour la phase mobile des solvants aqueux ou organiques.

✚ Les méthodes cytochimiques

Ces méthodes permettent de localiser les constituants biochimiques à l'intérieur des cellules.

Ces méthodes s'adressent à des coupes.

➤ **Autoradiographie**

La technique d'autoradiographie a pour objectif de marquer une molécule spécifique avec de la radioactivité. Elle permet de suivre et de localiser des substances au niveau des organites cellulaires. Cette technique repose sur l'utilisation de produits radioactifs.

Exemple : localisation d'acides nucléiques : test de Brachet et réaction de Feulgen

Cette technique est employée pour localiser les acides nucléiques dans la cellule. Elle est toujours réalisée à partir de coupes.

- **Les techniques immunocytologiques** : Se fondent sur l'utilisation d'un anticorps couplé avec un marqueur, visible par l'intermédiaire du microscope optique. Ces méthodes reposent donc sur la propriété de reconnaissance spécifique des anticorps.
- **Techniques de génie génétique (séquençage d'ADN)** : Le séquençage de l'ADN consiste à déterminer l'ordre d'enchaînement des nucléotides pour un fragment d'ADN donné. La méthode se déroule en plusieurs étapes :
- Préparation des acides nucléiques (extraction et purification)
 - Amplification in vitro des acides nucléiques PCR (Polymerase Chain Reaction) et RT-PCR (Reverse Transcription PCR).
 - Séquençage d'ADN.