TP n°1 : Etude de la perméabilité membranaire des globules rouges «Teste d'hémolyse »

La membrane cellulaire constitue la surface d'échange entre le liquide intracellulaire et le liquide interstitiel. Ce qui permet d'assurer un équilibre permanents des échanges de substances entre les cellules et leurs environnements. Ces échanges vont dépendre de la perméabilité membranaire qui peut différer selon les substances et de forces physiques qui conditionnent les mouvements des substances (**gradient de concentration, gradient électrique du au potentiel de membrane).** Les globules rouges constituent un bon modèle pour étudier les mouvements de l'eau et la résistance membranaires. En effet, si on soumet des hématies à une solution de solutés non diffusibles de faible pression osmotique, ces dernières vont gonfler jusqu'à rupture de la membrane plasmatique et libération de l'hémoglobine dans la solution **hypotonique.** Ce qui va nous permettre de déterminer **l'osmolarité** intracellulaire (Les globules rouges se comportent donc comme des osmomètres).Cette **hémolyse** et également observée avec des substances diffusibles (et ce même lorsqu'elles sont **hypertoniques**).

1. Bute & Principe de la manipulation

Au cours de ce TP, nous étudierons d'une part le devenir des globules rouges qui seront placés dans des solutions à différentes concentrations de solutés non diffusibles afin d'estimer qu'elle est l'osmolarité intracellulaires. D'autres parts, nous étudierons l'effet de la taille des solutés hydrophiles sur la perméabilité membranaire sur la vitesse d'hémolyse des globules rouges.

1.1. Détermination de l'osmolarité intracellulaires par la recherche de solutions isotoniques de solutés non diffusible

Comparaison des effets de substances électrolytiques (NaCl) ou non-électrolytes (Saccharose).

1.1.1. Préparation des deux séries de dilution

A partir des solutions mères de NaCl à 0,15 mM, et de saccharose à 0,32mM. Préparer une série de 5 tubes pour le NaCl et une série de 5 tubes pour le saccharose selon le tableau suivant :

	NaCl (mM)					**Saccharose (mM)**				
	H_2O	0,03	0,06	0,09	0,15	0,04	0,08	0,16	0,24	0,32
NaCl/Saccharose(ml)										
H_2O (ml)										
Volume finale(ml)	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4
Incubation des hématies avec les solutions non diffusables										
Sang (µl)	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
Boucher avec de paraffine et homogénéiser										
Incuber /Centrifugation	10 minutes /5 minutes à 4000 tours/mn									

1- A quelle concentration de NaCl et de saccharose se produit l'hémolyse ? Expliquer ces résultats.
2- A quelle concentrations les cellules sont isotonique (ne subissent pas de changement de volume) ?
3- Est-ce que les observations au microscope des hématies complète-t-elles les réponses des 2 questions précédentes ? Pourquoi ?
4- Tracer un tableau récapitulatif avec des calcule des osmolarité des solutions, en se basant sur **les principes d'observation de l'hémolyse** et **les principes osmotiques.**

1.1.2. Principes d'observation de l'hémolyse

a) Aspect macroscopique 1:

Est basé sur la différence d'aspect avec le tube témoin. Si la suspension dans le tube à hémolyse est de couleur rouge translucide on dit que le sang est laqué et qu'il y a eu hémolyse. Si la suspension dans le tube à hémolyse est trouble il n'y a pas eu d'hémolyse.

b) Aspect macroscopique 2 :

Est basé sur le taux d'hémolyse, c'est à dire si le phénomène d'hémolyse est :

-Totale : la suspension dans le tube à hémolyse est de couleur rouge due à la présence des molécules d'hémoglobines libérées par les hématies qui ont été détruite avec un culot blanc (correspond aux membranes des hématies).

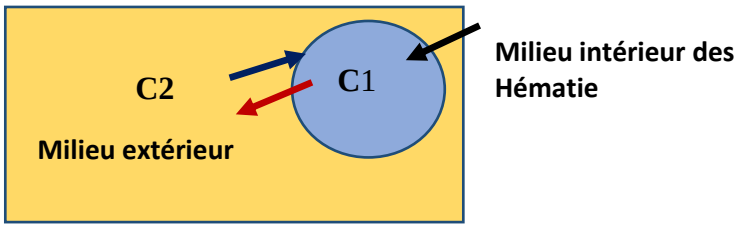
-Partielle : le surnageant présent dans le tube à hémolyse est de couleur orangé. Avec un culot rouge (hématies non détruites).

-**Absent** : surnageant est incolore avec la présence d'un culot rouge (correspond aux hématies non détruites).

c) Aspect microscopique :

Est basé sur l'observation cellulaire (taille, forme et proportion)
Cellule gonflée ou éclatée : hémolyse
Cellule crénelée ou flétrie : plasmolyse
Cellule ronde biconcave : hématie normale

-Les principes osmotiques



-Osmosité :
Si C1 > C2 : le milieu extérieur (C2) est hypoosmotique par rapport au milieu intérieur (C1)
Si C1 < C2 : le milieu extérieur est hyperosmotique par rapport au milieu intérieur
Si C1 = C2 : le milieu extérieur est isoosmotique par rapport au milieu intérieur

Tonicité :
S'il y a entrée d'eau (2) dans l'hématie (C1) la solution est dite hypotonique pour les hématies
S'il y a sortie d'eau (1) dans l'hématie la solution est dite hypertonique pour les hématies
S'il y a équilibre (entres les échanges d'eau) la solution est dite

2-Effet de la taille des solutés hydrophiles sur la perméabilité membranaire

De façon générale, le poids moléculaire d'une substance donne une idée approximative du diamètre de la molécule (plus la molécule est grosse plus son poids moléculaire est élevée), les configurations stérique et la présence ou non de symétrie influencent aussi le diamètre. Des molécules très larges comme les protéines ont beaucoup de mal à entrer dans les cellules alors que de petites molécules comme les acides aminés rentrent dans la cellule plus facilement.

Protocol :

Ajouter 100 µL de sang aux 3 tubes suivants qui contiennent respectivement 2 mL des solutions à 0,3 M des composés suivant.

Solutés (0,3 M)	**Urée**	**glycérol**	**Glucose**
Masse molaires (g/mol)	60	92	180
Boucher, mélanger par inversion			
Déterminer le temps nécessaire (en seconde) pour avoir l'hémolyse dans chaque tube			

Question :

1- Déterminez quelle solution produit l'hémolyse en tenant vos tubes devant une feuille imprimée bien tracé des lignes. Si l'hémolyse se produit, on doit voir clairement ce qui est imprimé au travers du tube.
2- Tracer le graphe du temps (en secondes) qu'il faut pour avoir hémolyse en fonction du poids moléculaire du soluté qui cause l'hémolyse.
3- Est-ce qu'il existe une corrélation entre le temps nécessaire pour avoir l'hémolyse et le poids moléculaire ?
4- Etant donné que toutes les solutions utilisées dans cette partie sont légèrement hyper-osmotiques par rapport au liquide intracellulaire, pourquoi y a –t'il hémolyse ?
5- Qu'elle est la différence entre isotonique et iso-osmotique ? Est-ce qu'il est possible qu'une solution soit iso-osmotique mais pas isotonique ? Si oui, précisez comment est pourquoi.

- Méthode de calcul d'osmolarité :

EX : Solution de NaCl à 3‰ correspond à 3 g pour 1000 ml d'eau d'ou la concentration massique en NaCl = 3 g/l

Et la concentration molaire[NaCl]= C NaCl / PM NaCl = 3/58.5 = 0.051 mol/l

Le NaCl se dissocie en 2 il suffit donc de multiplier la concentration molaire par 2 pour obtenir l'osmolarité de la solution de NaCl à 3‰.

Tableau récapitulatif

Tubes		Observation		Osmolaritédes solutions enosmol/l	Osmoticité	Tonicité
		Macro 1	Macro 2			
	Sérum physio					
2	**Nacl 3‰**					
3	**NaCl 6‰**					
4	**NaCl 9‰**					
5	**NaCl 15‰**					
	Saccharose mM					
6	**0,04**					
7	**0,08**					
8	**0.16**					
9	**0,24**					
10	**0.32**					