

# **TP de Physiologie Animale :Hémolyse**

Université Montpellier II

Année 2002

Nom du professeur :

## Introduction

Les cellules des êtres vivants sont le siège d'échange incessant d'eau ou de substances dissoutes, ces échanges se font grâce à la perméabilité membranaire.

Ces échanges se font du milieu le moins concentré vers le plus concentré grâce à une force de traction appelée osmose ou pression osmotique.

Le but du TP d'hémolyse est d'étudier le comportement d'hématie de rat en présence de solution d'osmolarité différentes ou des solutions de même osmolarité mais de composants chimiques différents.

L'intérêt de ce TP est de comprendre les différents phénomènes observés lors des expériences et préciser certaines notions telles que l'isoosmolarité, isotonicité d'une solution et de résistance globulaire.

## Matériels et méthodes.

On veut étudier le comportement des hématies de rat en présence de solution d'osmolarité différentes ou des solutions de même osmolarité mais de composants chimiques différents, les solutés utilisés sont initialement présent dans le sang. En influençant les facteurs (solutés concentration et composition chimiques) nous avons étudié les phénomènes osmotiques qu'ils peuvent engendrer.

Préparation des solutions

Solutions utilisés proviennent du stock (NaCl à 12 ‰, Glucose à 5.5%, Urée, Glycérol et Sérum Physiologique).

On prépare alors des solutions de NaCl à différentes concentrations avec une solution mère de 12‰.

Solution de NaCl à 9 ‰ = 6 ml de solution à 12 ‰ + 2 ml d'eau distillée

Solution de NaCl à 6 ‰ = 4 ml de solution à 12 ‰ + 4 ml d'eau distillée

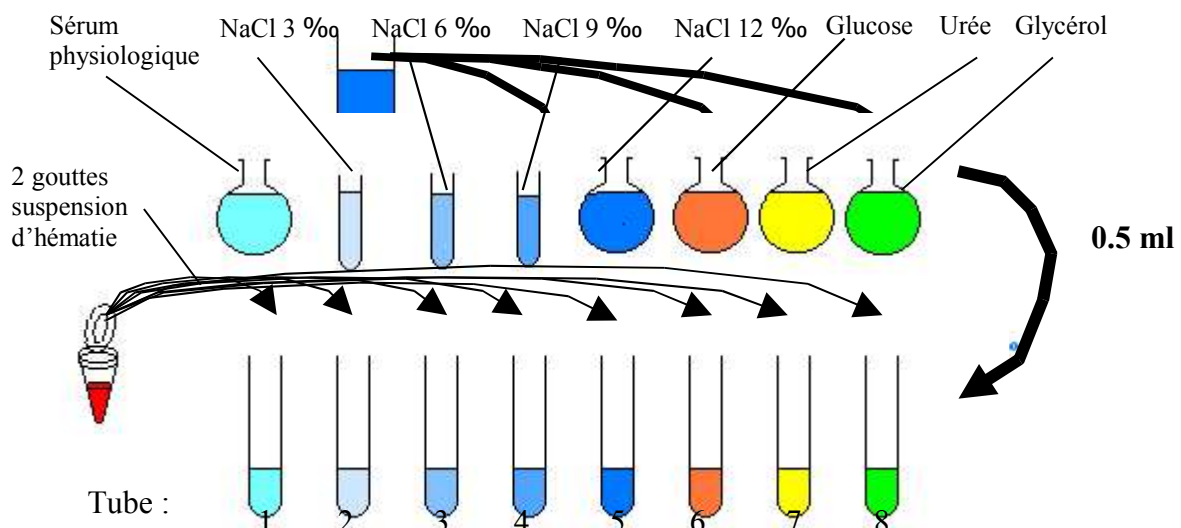
Solution de NaCl à 3 ‰ = 2 ml de solution à 12 ‰ + 6 ml d'eau distillée

Nous allons étudier les phénomènes osmotiques liés à ces solutions. Ces manipulations vont permettre d'étudier les phénomènes qui touchent les hématies.

Nous obtenons 11 tubes à hémolyse correspondant à chaque solution que nous voulons étudier

Schémas de préparation de la manipulation :

Dilution des solutions NaCl :



## Principe des observations

### Aspect macroscopique 1 :

Est basé sur la différence d'aspect avec le tube 1 correspondant au 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.

### 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.

### 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).

Ces différentes observations macroscopiques et microscopiques permettent d'affiner les résultats obtenus par le calcul et d'expliquer les phénomènes qui ont touché les hématies.

## **RESULTATS.**

Les résultats des observations macro et microscopiques se trouve dans le tableau récapitulatif.

Calculs des concentrations osmolaires ou osmolarités des solutions du tube 2,3,4,5,6.

### **Exemple de calcul :**

#### Solution de NaCl

##### **Tube n°2 :**

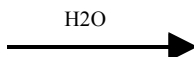
Solution de NaCl à 3‰ correspond à 3 g pour 1000 ml d'eau d'ou  $C_{NaCl} = 3 \text{ g/l}$

Concentration massique en NaCl  $C_{NaCl} = 3 \text{ g/l}$

Dou la concentration molaire  $[NaCl] = C_{NaCl} / M_{NaCl} = 3/58.5 = 0.051 \text{ mol/l}$  ou 51 mmol/l

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‰.

La concentration osmolaire = nombre de particules dissociées \* la concentration molaire initiale ,pour le NaCl nombre de particule dissocié est 2



Solution de glucose à 5.5 %.

**Tube n°6 :**

Glucose à 5.5% correspond à 55g/l

Concentration massique du glucose à 5.5 % :  $C_{\text{Glucose}} = 55\text{g/l}$

D' ou la concentration molaire  $[\text{Glucose}] = C_{\text{Glucose}} / M_{\text{Glucose}} = 55/180 = 0.305\text{mol/l}$

le Glucose ne se dissocie pas dans l'eau alors la concentration du glucose est égale à l'osmolarité de la solution de glucose à 5.5% c'est à dire 0.305osmol/l ou 305 mosmol/l.

**Tube n° 7 et 8 :**

Solution d'Urée et de Glycérol.

Concentration osmolaire est la même pour la solution de Glycérol , d'Urée et de NaCl à 9‰.

Concentration osmolaire de la solution de NaCl à 9‰ =  $C_{\text{NaCl}} \text{ à } 9\text{‰} / M_{\text{NaCl}} * 2 = 9 * 2 / 58.5 = 0.308$  osmol/L

Concentration osmolaire de NaCl à 9‰ = Concentration osmolaire de l'urée

L'Urée ne se dissocie pas dans l'eau donc la concentration osmolaire = la concentration molaire de l'urée

$[\text{Urée}] = C_{\text{urée}} / M_{\text{urée}}$  alors  $C_{\text{urée}} = [\text{Urée}] * M_{\text{urée}} = 0.308 * 62.02 = 18.5 \text{ g/l}$

Même méthode pour le calcul de la concentration massique du glycérol .

Tableau récapitulatif des calculs :

Tubes	Proportion du soluté dans la solution	Concentration massique des solutions en g/l	Masse molaire des solutés en g/mol	Concentration molaire des solutions en mmol/l	Osmolarité des solutions en mosmol/l
2 Solution de NaCl à 3‰	3 ‰	3	58.5	51	102
3 Solution de NaCl à 6‰	6 ‰	6	58.5	102.5	205
4 Solution de NaCl à 9‰	9 ‰	9	58.5	154	308
5 Solution de NaCl à 12‰	12 ‰	12	58.5	205	410
6 Solution de Glucose à 5.5%	5.5 %	55	180	305	305
7 Solution d'Urée	—	18.5	60.06	308	308
8 Solution de Glycérol	—	28.4	92.09	308	308

**Connaissant la loi de Van't Hoff :  $\Pi = RTC$**

$\Pi$  = pression osmotique

R = constante des gaz parfaits

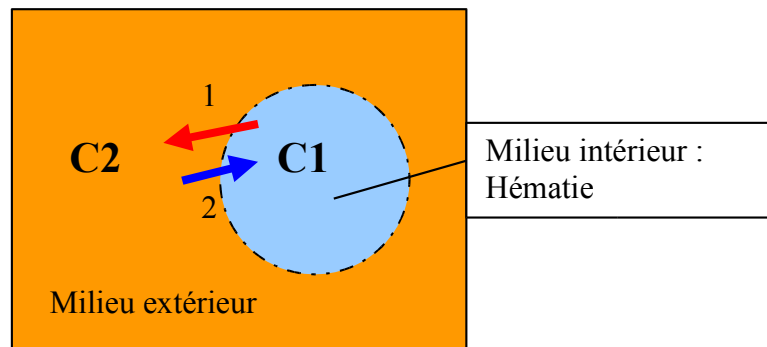
T = température absolue en Kelvin

C = concentration osmolaire de la solution en Osmol/l

Nous calculons la pression osmotique du plasma à 37°C la concentration osmolaire du plasma est la même que la concentration osmolaire de la solution de NaCl à 9‰.

$$\Pi = R * T * C = 0.082 * 310 * 0.308 = 7.8 \text{ atm}$$

## Principes osmotiques :



### Osmocité :

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 isotonique pour les hématies

### Tableau récapitulatif des résultats :

Tubes	Solutions	Observations			Osmolarité des solutions en mosmol/l	Osmoticité	Tonicité
		Macro 1	Microscopique	Macro 2			
1	Sérum physiologique	Trouble	Hématies de tailles normales et légèrement crénelées	Absence d'Hémolyse	—	Isoosmotique	Isotonique
2	NaCl à 3‰	Sang laqué	Fantomes d'hématies	Hémolyse totale	102	Hypoosmotique	Hypotonique
3	NaCl à 6‰	Trouble	Hématies de grandes tailles	Hémolyse partielle	205	Hypoosmotique	Hypotonique
4	NaCl à 9‰	Trouble	Hématies de tailles normales et légèrement crénelées	Absence d'Hémolyse	308	Isoosmotique	Isotonique
5	NaCl à 12‰	Trouble	Hématie fortement crénelé	Absence d'hémolyse	410	Hyperosmotique	Hypertonique

6	Glucose 5.5%	à Trouble	Hématies normales	Absence d'hémolyse	305	Isoosmotique	Isotonique
7	Urée	Sang laqué	Fantomes d'hématies	Hémolyse totale	308	Isoosmotique	Hypotonique
8	Glycérol	Sang laqué	Fantomes d'hématies	Hémolyse totale	308	Isoosmotique	Hypotonique

### **Analyses et Interprétations des résultats**

Nous savons que l'osmolarité du plasma est équivalent à celui du milieu intérieur des hématies est à celui d'une solution de NaCl à 9 ‰ .

Concentration osmolaire de la solution de NaCl de 9‰ est de 308 mosmol/l.

Donc l'osmolarité de l'hématie du rat est de 308 mosmol/l.

#### **Tube n°1 :**

La solution dans le tube correspond au milieu extérieur reconstitué artificiellement des hématies du rat, les aspects macroscopiques (1 suspension trouble et 2 surnageant claire avec culot rouge) et microscopiques ( hématies normales) permettent de dire qu'il n'y a pas eu d'hémolyse.

La tonicité du sérum physiologique est isotonique c'est à dire l'échange d'eau est la même entre la solution (milieu extérieur) et les hématies (milieu intérieur).

*Conclusion* :ni Hémolyse , ni Plasmolyse

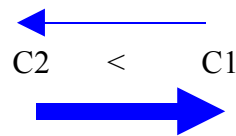
#### **Tube n°2 :** C1>C2

La solution présente dans le tube 2 est une solution de NaCl à 3‰ , les observations et la comparaison avec le tube témoin, montrent que les hématies ont été hémolysées, aspect macroscopique1 le sang est laqué, les cellules sont éclatées.

Il y a donc eu un échange d'eau de part et d'autres de la membrane des hématies.

L'osmolarité de la solution de NaCl à 3 ‰ (C2) < l'osmolarité présente dans la cellule (C1), alors la concentration en sel du milieu extérieur est hypoosmotique par rapport à concentration de sel présent dans les hématies.

Schéma des mouvements d'eau : Solution NaCl à 3 ‰ Hématie



*Les flèches représentent les mouvements d'eau proportionnellement à leurs tailles.*

L'entrée massive d'eau dans le soluté dans le soluté entraîne le phénomène d'hémolyse et l'éclatement de la cellule entraîne la libération des molécules d'hémoglobine dans le milieu extérieur expliquant ainsi l'aspect macroscopique 1 (sang laqué), la présence de cellules éclatées pour l'observation au microscope et l'hémolyse totale pour l'aspect macroscopique 2.

**Conclusion :** Hémolyse totale

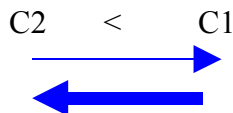
**Tube n° 3 :**  $C1 > C2$

L'osmolarité de la solution est égale à l'osmolarité dans la cellule, le milieu extérieur est hypoosmotique par rapport au milieu intérieur de l'hématie.

Il devrait y avoir le phénomène d'hémolyse, or ce n'est pas le cas, les aspects macroscopiques et microscopique montre le contraire, mais la forme des cellules et la comparaison avec le tube n°1 montre qu'il y a eu hémolyse mais que celle-ci est partielle. La membrane de cellule est capable de résister à cette pression osmotique exercée par la solution de NaCl à 6 ‰.

Le milieu extérieur est donc hypotonique entraînant une légère entrée d'eau l'aspect rond des hématies.

Schéma des mouvements d'eau : Solution de NaCl à 6 ‰ Hématie



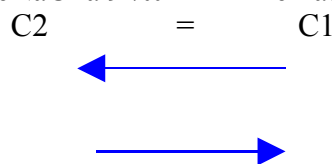
**Conclusion :** Absence d'Hémolyse

**Tube n°4 :**  $C1 = C2$

L'osmolarité de la solution est égale à l'osmolarité dans les hématies, le milieu est isoosmotique par rapport au milieu intérieur des hématies. Le milieu extérieur est donc isotonique, les échanges d'eau sont le même de part et d'autre de la membrane donc le phénomène d'hémolyse est absente, ces résultats sont confirmés par les observations microscopiques et macroscopiques, les hématies sont normales, le sang est laqué et le taux d'hémolyse est absent.

Le tube n°4 peut correspondre au tube 1 c'est à dire au milieu habituel de l'hématie.

Schéma des mouvements d'eau : Solution de NaCl à 9 ‰ Hématie



*Conclusion:* Ni hémolyse , ni Plasmolyse

**Tube n°5 :**  $C_2 > C_1$

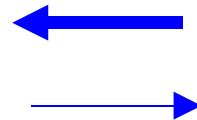
L'osmolarité de la solution est supérieure à l'osmolarité dans les hématies, le milieu extérieur est donc hyperosmotique par rapport au milieu intérieur des hématies. Le milieu extérieur est donc hypertonique entraînant la sortie de l'eau des hématies et donc le phénomène de plasmolyse.

Le résultat est confirmé par l'observation microscopique, les cellules sont flétries cellules à bords crénelés, cela montre que les cellules ont perdu de l'eau.

Les observations macroscopiques confirment qu'il n'y a pas eu d'hémolyse, la suspension est trouble pour l'aspect macroscopique 1 et l'aspect macroscopique 2 surnageant clair et culot rouge prouve qu'il y a absence d'hémolyse. Cette concentration en NaCl 12‰ entraîne une plasmolyse, la membrane des hématies sont alors capables de résister à la pression osmotique exercée par la solution de NaCl à 12‰.

Schéma des mouvements d'eau : Solution de NaCl à 12‰      Hématie

$C_2 > C_1$



*Conclusion :* Plasmolyse

**Tube n°6 :**  $C_1 = C_2$

L'osmolarité de solution de glucose est la même que celle des cellules. Donc la solution de glucose est isoosmotique par rapport au milieu intérieur des hématies. Et donc que la solution de glucose à 5.5% est isotonique, alors l'échange d'eau est le même de part et d'autre de la membrane. La solution de glucose n'entraîne donc aucun phénomène ni d'hémolyse ni de plasmolyse cette absence de phénomène est confirmée par les aspects macroscopiques( sang trouble et présence d'un surnageant clair et d'un culot rouge après centrifugation ) et microscopique les hématies sont normales.

*Conclusion :* Ni Hémolyse , Ni Plasmolyse

**Tube n°7 :**

L'Osmolarité de la solution d'urée est identique au milieu intérieur de la cellule, et le milieu est isoosmotique par rapport au milieu intérieur des cellules. La solution devrait être isotonique or ce n'est pas le cas d'après les observations macroscopiques (sang laqué, et la suspension après centrifugation est de couleur rouge avec un culot blanc) et microscopiques ( cellules éclatées) prouvent qu'il y a eu hémolyse. L'urée traversant la membrane elle n'influe donc pas sur la pression osmotique extérieure.

La concentration en Urée va alors s'équilibrer entre les 2 compartiments (Equivalence entre milieu intérieur et extérieur ).

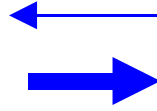
En conséquence le milieu intérieur de l'hématie est plus concentré que le milieu extérieur (car la solution d'urée pénètre dans l'hématie) est donc provoqué une hémolise.

Schéma des mouvements d'eau :

Solution d'urée      Hématies

$C_1 > C_2$





*Conclusion:*

**Tube n°8 :**

Solution de glycérol même interprétation que pour l'Urée.

L'osmolarité du plasma correspond à l'osmolarité d'une solution de NaCl à 9 ‰ (0.308mosmol/l). La pression osmotique exercée par le plasma à 37 °C est nettement supérieure à la pression atmosphérique, les hématies du rat sont alors capables de résister à une pression 8 fois supérieures à celle de l'atmosphère terrestre.

### *Conclusion*

Ces résultats expérimentaux nous ont permis de déterminer l'osmolarité des hématies de rat, en effet des taux de glucose et de NaCl respectivement de 5.5 ‰ et 9 ‰ sont tout à fait correcte pour une présence d'hématies de formes normale et opérationnelles. On remarque que l'urée et le glycérol ont provoquer une hémolyse, du au fait que ces substances peuvent traverser la membrane contrairement au NaCl et au glucose. Mais on peut penser que dans certains taux d'urée et de glycérole les hématies ne seront pas hémolysées si il y a une présence correcte de NaCl ou de glucose dans le substrat permettant de maintenir l'équilibre osmotique.

Nous pouvons aussi remarquer que les hématies de rat sont capables de résister à une forte pression osmotique (8 fois supérieures à celle de l'atmosphère terrestre).