

République Algérienne Démocratique et Populaire
Ministère de l'Enseignement Supérieur
et de la Recherche Scientifique
Université Frères Mentouri- Constantine 1

Faculté des sciences de la nature et de la vie

Licence III Toxicologie

Travaux Pratiques de physiologie des grandes fonctions

Réalisé par : DR IHOUEL S

Année universitaire 2020-2021

TP01:Groupe sanguin

Découvert en 1900 par LANDSTEINER, le système ABO permet de classer les différents groupes sanguin selon:

- * La présence ou non d'antigène (Ag) A ou B à la surface des globules rouge.
- * La présence ou non d'anticorps (Ac) anti-A ou anti-B dans le serum.

Le système Rhesus permet de classer les groupes sanguins selon la présence ou non d'antigène D à la surface des globules rouges. L'épreuve globulaire ou réaction de BETH VINCENT correspond à la mise en évidence des Ag globulaire par agglutination des hématies porteuses d'un Ag provoquée par l'Ac (serum test) correspondant.

Materiels:

- Lames, baguettes en bois.
- Aiguilles stériles, coton, antiseptique.
- Réactifs: serum test anti-A, anti-B, anti-AB et anti-D.

Technique:

- Déposer sur une lame, toujours dans le même ordre, les gouttes de serum test anti-A, anti-B, anti-AB et anti-D.
- Avec une aiguille stérile, on pique l'extrémité d'un doigt préalablement nettoyé avec un antiseptique et on dépose sur chaque goutte de serum test une goutte de sang.
- Avec une baguette en bois, on mélange les deux gouttes dans un seul sens.
- Laisser la réaction agir pendant 10 min environ.

Travail à faire:

- Interpréter les resultas obtenus.
- Calculer le taux de chaque groupe sanguin.
- Donner les lois de transfusion sanguine.

TP n°=2 la perméabilité cellulaire
Physiologie cellulaire (3^{ème} année : SNV, BPA ; LMD physiotoxicologie, BMC) IHOUAL.S

La membrane plasmique des cellules est le siège d'échanges cellulaires. Ces échanges s'effectuent grâce à la perméabilité membranaire ; d'où l'importance d'étudier le comportement des érythrocytes de rat en présence des solutions d'osmolarité différentes ou des solutions de même osmolarité mais de composants chimiques différents. Ainsi de comprendre le phénomène de résistance globulaire.

Matériels & méthodes

Matériels

- 13 Tubes à essai
- portoir
- 2 bichers
- 4 pipettes de 5 ml
- 2 pipettes de 1 ml
- pipette pasteur
- centrifugeuse
- spectrophotomètre UV-VISIBLE

Mode opératoire

N°= Tube	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
Osmolarité (mosmol/L.)	0	102	136								307	307	307
Concentration (%)	0	3	4								9	/	/
Eau distillée (ml)	8	6	5.4	4.7	4.4	4	3.7	3.4	3	2.7	2	/	/
NaCl (ml)	0	2	2.6	3.3	3.6	4	4.3	4.6	5	5.3	6	/	/
Glucose (ml)	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	8	/
Urée (ml)	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	8
<p>Ajouter une goutte de sang pour chaque tube</p> <p>Laisser agir pendant 5 min, agiter doucement puis centrifuger à 2000 rpm pendant 5 min</p> <p>Récupérer 3 ml de surnageant et lire l'absorbance à 540 nm.</p>													
DO à 540 nm													
% d'hémolyse													

Travail à faire

- Calculer la concentration pondérale (g/l) en NaCl pour chaque tube, sachant que la solution mère de NaCl est de 12 %.
- Calculer l'osmolarité pour chaque tube.
- Calculer le pourcentage d'hémolyse.
- Tracer la sigmoïde d'hémolyse ; pourcentage d'hémolyse en fonction de la concentration massique.
- Déterminer graphiquement la concentration de NaCl capable d'hémolyser 50% des hématies.

Responsable de TP M^{elle} IHOUAL SAFIA

TP 03 : observation de la membrane cytoplasmique

La membrane plasmique, aussi appelée membrane cellulaire, désigne la fine couche protectrice enveloppant chaque cellule de l'organisme. La membrane plasmique est constituée de deux couches de lipides, des graisses associées à différentes protéines exerçant des rôles de réceptions d'informations ou de transport de molécule.

Matériels :

- 8 Tubes à essais - des solutions NaCl 0.9 % 0.2 %
- Sang d'un rat -compte-goutte -pipette (5 ml)
- Centrifugeuse - microscope - outils de dissection

Technique :

- Prélever un échantillon du sang d'un rat qu'on va mettre dans 8 tubes différents ou il y a du 0.9 % du NaCl
- Mélanger doucement en remuant les tubes
- Centrifuger les tubes à 4000 tours/mn pendant 20 minutes
- Après la centrifugation, Débarrasser le surnageant et ajouter aux tubes 0.2 % du NaCl
- Laisser agir 10 min
- Centrifuger à 4000 tours/mn pendant 15 min
- Répéter la centrifugation jusqu'à l'obtention du culot rose

Travail à faire :

- Interpréter les résultats obtenus
- Observer les résultats au microscopique et dessiner un schéma qui montre l'observation microscopique

3 Année LMD physio toxicologie

Charger de TP : M^{me} Ihoual s

TP N° 4 : Observation microscopique d'hépatocytes.

Pour l'étude de l'homéostat glucidique, il peut être intéressant dans cette séance d'observer les hépatocytes. En effet, ces cellules constituent la principale cible des systèmes de régulation impliqués dans le contrôle de la glycémie et il est également possible d'y mettre en évidence la présence de glycogène. Enfin, le glycogène peut également être extrait du même foie pour être caractérisé chimiquement. Un matériel pratique pour l'observation microscopique des cellules est constitué par le foie frais. On trouve chez les bouchers du foie de mouton, veau, poulet ou lapin et le foie de toutes ces espèces peut être utilisé indifféremment. La seule contrainte dont il faut tenir compte est que le foie ne doit pas avoir été congelé.

Protocole opératoire :

- Couper un petit morceau de foie et gratter avec une spatule la surface de la section de façon à déposer sur une lame de microscope un échantillon de la taille d'une lentille au maximum.
- Dissocier au mieux les cellules avec la spatule puis recouvrir d'une goutte de bleu de méthylène, Laisser agir environ une minute.
- Déposer une goutte de glycérol et bien mélanger avec la spatule. *(Le glycérol rend possible l'observation de la préparation pendant une longue durée sans risquer l'évaporation du milieu de montage).*
- Poser une lamelle sur l'échantillon et placer l'ensemble sur une feuille de papier essuie-tout.
- Utiliser une autre feuille pour presser fermement sur la lamelle de façon à dissocier les cellules en prenant garde de ne pas casser la lamelle. *(Le papier sert à essorer le trop plein de liquide qui s'échappe lors du pressage).*
- Essuyer soigneusement la surface de la lamelle et observer au microscope, et Rechercher les régions de la préparation où les cellules sont dissociées et suffisamment colorées pour faciliter leur observation.

Le même protocole pour colorer la préparation avec du lugol (eau iodée) qui colore le glycogène en brun acajou. Noter que, selon l'origine du foie, la quantité de glycogène présent dans les hépatocytes est extrêmement variable.

Travail à faire :

Observer les préparations sous microscope avec des divers agrandissements, puis les dessiner

TP : Frottis sanguin :

On dispose du matériel suivant:

- un flacon de sang d'un animal
- un agitateur
- un flacon de colorant GIEMSA ou de bleu de méthylène
- une pissette d'eau distillée
- une boîte de Pétri avec un support pour lame
- un flacon d'alcool absolu
- lamelles et lames
- un microscope et une lampe
- une paire de gants de latex

PROTOCOLE DE REALISATION D'UN FROTTIS SANGUIN

REALISATION DU FROTTIS :

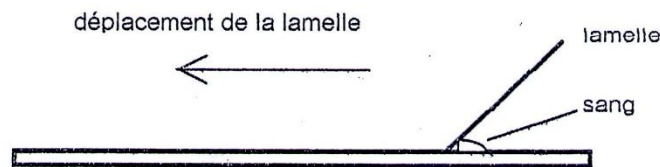
Enfiler les gants de protection

Déposer une goutte de sang à l'extrémité d'une lame à l'aide d'un agitateur.

Incliner une lamelle à 45° sur la goutte de sang de façon à ce qu'elle s'étale le long de la lamelle par capillarité.

La faire alors glisser vivement et sans à coup le long de la lame pour étaler le sang.

Sécher la lame en l'agitant puis la placer dans la boîte de Pétri sur le support de lame.



FIXATION DU FROTTIS :

Recouvrir toute la surface de la lame d'une pellicule d'alcool absolu.

Laisser l'alcool agir pendant 10 mn (rajouter de l'alcool si nécessaire de façon à ce que la lame reste humide).

Laisser sécher

COLORATION DU FROTTIS :

Recouvrir entièrement la lame d'une pellicule de colorant (bleu de méthylène ou Giemsa)

Laisser agir 5 mn.

Rincer à l'eau distillée, égoutter et laisser sécher.

Une fois sèche la lame est observée sans lamelle.

Mettre les gants dans le récipient réservé à cet usage.

Placer la lamelle utilisée pour le frottis et l'agitateur utilisé lors du prélèvement dans l'eau de javel.

Chargé de TP : M^{ème} IHOUAL .S

TP n°06: Extraction et mise en évidence de la quantité de glycogène présent dans le foie

BUT :

On se propose de déterminer par la méthode colorimétrique de Beer-Lambert, la quantité de glycogène préalablement extraite d'un échantillon de foie le plus frais possible, plus l'abattage de l'animal sera récent, plus le résultat de la manipulation sera probant .

MATÉRIEL NÉCESSAIRE :

Matière première	Appareillage	Verrerie	Reactifs
Foie frais	Balance ,Broyeur électrique	Buchner + filtres ,Bêcher ,Éprouvette,Pipette	Eau iodée ,Alcool à 95,HCl concentrée, Glycogène

MANIPULATION :

La manipulation se déroule en deux temps, il faut en premier lieu extraire le glycogène du foie puis dans un deuxième temps réaliser le dosage de l'échantillon obtenu par rapport à une gamme étalon en utilisant la méthode de Beer-Lambert .

Extraction du glycogène :

- Peser et couper en petits morceaux 10 g de foie frais
- Faire bouillir le foie dans 100 ml d'eau distillée pendant 2 minutes
- Égoutter à l'aide d'une passoire puis le broyer avec un mixeur
- Ajouter 50 ml d'eau distillée et faire bouillir 5 minutes
- Filtrer sous vide sur Buchner
- Précipiter le filtrat récupéré avec 5 gouttes d'HCl concentré, (si un précipité important se forme, filtrer à nouveau afin d'éliminer l'excès protéique).
- Traiter le filtrat récupéré par 4 fois son volume d'alcool à 95 puis filtrer sous vide
- Récupérer le filtrat, le laisser égoutter puis reprendre celui-ci avec 5 ml d'eau distillée
- Tester la présence de glycogène en prenant 3 gouttes du liquide obtenu et rajouter une goutte d'eau iodée*, (on doit obtenir une couleur brun-acajou).

***Eau iodée : dissoudre 1 g d'iode dans 2 g d'iodure de potassium puis compléter à 100 ml avec de l'eau distillée**

Dosage de l'échantillon suivant la méthode de Beer-Lambert :

- La loi de Beer-Lambert obéit à la relation suivante $DO = E . l . C$

DO ou densité optique correspond à une absorbance

E (Epsilon) correspond au coefficient d'extinction molaire, (il est constant pour un produit donné)

l est l'épaisseur du milieu traversé, (ici, il s'agit d'une cuve carré de 1 cm de coté)

C correspond à la concentration du produit à étudier

E et l sont tout les deux constants, on peut donc dire que l'absorbance sera proportionnelle à la concentration

- *Préparation de la gamme étalon*

On prépare 100 ml d'une solution mère de glycogène à 10 g/L à partir de glycogène du commerce, pureté 85%

Il faut tenir compte de la pureté du produit pour réaliser les solutions.

On réalise les dilutions suivantes :

Dilutions	1/2	1/4	1/8	1/32
Concentration de glycogène en mg/ml	4.250	2.125	1.063	0.266

Les cuves se préparent de la manière suivante :

1 ml de solution de glycogène + 3 ml d'eau distillée + 1 goutte d'eau iodée

Le blanc permettant de régler le 100% de transmission se fait avec la solution diluée au 1/32

Les mesures se font avec une longueur d'onde de 470 nm (filtre bleu)

Avant de réaliser le dosage, vérifier que la coloration de l'échantillon de foie se situe bien dans la gamme

RÉSULTATS :

Concentration de glycogène en mg/ml	4.250	2.125	1.063	0.266
Absorbances	0.45	0.20	0.10	0.05

La courbe peut être réalisée sur du papier millimétré ou avec le logiciel Excel à partir des mesures expérimentales.

On place ensuite l'échantillon de foie dans le colorimètre, on mesure l'absorbance, on la reporte sur la courbe étalon et on déduit ainsi la concentration en glycogène de nos 10 g de foie du départ.