

## Partie I : Etude des propriétés membranaires des hématies

**I-A.** Vous disposez de sang de rat fraîchement prélevé. Le sang est un tissu constitué de différents éléments figurés circulants, en suspension dans le plasma.

**I-A.1** Réalisez un frottis sanguin en suivant le protocole de l'Annexe A, dessinez et identifiez les différents éléments sanguins observables. Vous montrerez à un examinateur votre meilleur champ en lui présentant en parallèle votre dessin d'observation

*Réponse à la question I-A.1*

Notation qualité du montage et dessin

Différents éléments sanguins :

Hématies

Leucocytes : -polynucléaires :- neutrophiles

- éosinophiles

-basophiles

- mononucléaires : - monocytes

- lymphocytes

Plaquette ou thrombocytes

Nous allons maintenant nous intéresser plus précisément à l'un de ces éléments figurés, l'hématie.

Dans l'expérience suivante, nous allons étudier le comportement des hématies de rat en présence de solutions d'osmolarité différentes ou de solutions de même osmolarité mais de compositions chimiques différentes.

**I-A.2. Préparez les 8 solutions de travail en vous référant à l'annexe B afin de connaître la composition des différents tubes.**

La solution physiologique et les solutions de glucose, d'urée et de glycérol sont fournies sous une forme directement utilisable. Par contre, vous devez préparer une gamme de concentration de solution de NaCl à partir d'une solution mère à 12 ‰.

**I-A.2.a. Décrivez brièvement le protocole de préparation de vos dilutions de NaCl à partir de la solution mère fournie.**

Réponse à la question I-A.2. a

Ex pour 2 mL

$$c_1v_1=c_2v_2 \quad (0,012v_1=0,009 \times 2)$$

Solution de NaCl à 9 ‰ = 1,5 ml de solution à 12 ‰ + 0,5 ml d'eau distillée (dilution au 1/4)

Solution de NaCl à 6 ‰ = 1 ml de solution à 12 ‰ + 1 ml d'eau distillée (ou dilution de moitié)

Solution de NaCl à 3 ‰ = 0,5 ml de solution à 12 ‰ + 1,5 ml d'eau distillée (dilution au 3/4)

**I-A.2. b Déterminez les concentrations molaires et l'osmolarité des solutions des différents tubes. Détaillez votre raisonnement pour les calculs de concentrations des solutions de NaCl à 3 ‰, glucose, glycérol et urée. Rappel: dans l'expérience, la concentration osmolaire est la même pour la solution de Glycérol, d'Urée et de NaCl à 9‰.**

Réponse à la question I-A.2.b

**C=concentration molaire, Cm=concentration massique**

**C=n/V or n=m/M (m=masse et M= masse molaire) donc C=m/MV; concentration massique Cm=m/V d'où Cm= C x M**

**Solution de NaCl à 3‰** correspond à 3 g pour 1000 mL d'eau d'où CNaCl = 3 g/L

Concentration massique en NaCl: CNaCl = 3 g/L

La concentration molaire [NaCl]= CNaCl / MMolaireNaCl = 3/58.5 = 0.051 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‰. L'osmolarité de cette solution est donc **102 mOsm/L**.

**Glucose à 5.5% correspond à 55g/L**

Concentration massique du glucose à 5.5 % : CGlucose= 55g/L

La concentration molaire [Glucose]= CGlucose/ MGlucose = 55/180 = 0.305mol/L

Le Glucose ne se dissocie pas dans l'eau, l'osmolarité de la solution de glucose à 5.5% est donc 0.305osmol/L ou 305 mosmol/L.

Les concentrations osmolaires sont les mêmes pour les solutions de Glycérol, d'Urée et de NaCl à 9‰.

Concentration osmolaire de la solution de NaCl à 9‰ =CnaCl à 9‰/MNaCl\*2=9\*2/58.5=0.308osmol/L

**Solution d'Urée et de Glycérol.**

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

[Urée]=Curée/Murée alors Curée=[Urée]\*Murée=0.308\*62.02=18.5 g/L

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

**I-A.2.c Reportez vos résultats dans le tableau récapitulatif ci-dessous:**

<i>Tubes</i>	<i>n°2</i> <i>NaCl</i> <i>3 ‰</i>	<i>n°3</i> <i>NaCl</i> <i>6 ‰</i>	<i>n°4</i> <i>NaCl</i> <i>9 ‰</i>	<i>n°5</i> <i>NaCl</i> <i>12 ‰</i>	<i>n°6</i> <i>Glucose</i> <i>5.5 ‰</i>	<i>n°7</i> <i>Urée</i>	<i>n°8</i> <i>Glycérol</i>
Concentration massique des solutés en g/L	<b>3</b>	<b>6</b>	<b>9</b>	<b>12</b>	<b>55</b>	<b>18.5</b>	<b>28,4</b>
Masse molaire des solutés en g/mol	58.5	58.5	58.5	58.5	180	60.06	92.06
Concentration molaire en mmol/L	<b>51</b>	<b>102,5</b>	<b>154</b>	<b>205</b>	<b>305</b>	<b>308</b>	<b>308</b>
Osmolarité des solutés en mosm/L	<b>102</b>	<b>205</b>	<b>308</b>	<b>410</b>	<b>305</b>	<b>308</b>	<b>308</b>

**I.A.3 Plongez les hématies dans les 8 solutions de travail préparées ci-dessus en suivant les consignes données dans l'annexe B.**

**I-A.3. a Décrivez l'aspect général du contenu des tubes (aspect macroscopique)**

*Réponse à la question I-A.3.a*

Tube 1: Trouble ou 2 phases (surnageant clair avec culot rouge)

Tube 2: Sang laqué ou 1 seule phase

Tube 3: Trouble

Tube 4: Trouble

Tube 5 : Trouble

Tube 6: Trouble

Tube 7 (Urée): Sang laqué

Tube 8 (Glycérol): Sang laqué

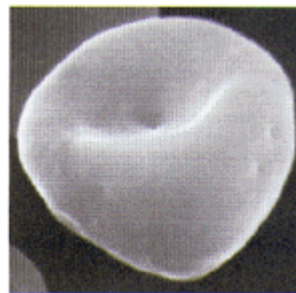
**I-A.3.b Dessinez l'aspect (taille, forme) des hématies observées au microscope (aspect microscopique). Vous montrerez à un examinateur votre meilleur champ en lui présentant en parallèle un dessin d'observation.**

Réponse à la question I-A.3.b

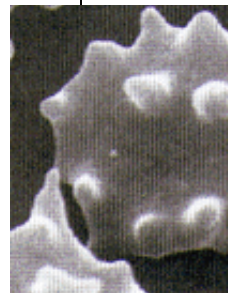
Globule rouge normal



Turgescence



Plasmolyse



Tube 1, 4,6: hématies de taille normale (légèrement crénelées parfois)

Tube 2, 7, 8 : Fantômes d'hématie

Tube3: Hématies gonflées

Tube 5: hématies fortement crénelées (forme d'étoile)

I-A.3.c Interprétez vos résultats. En vous aidant de la figure 1, précisez notamment la nature des molécules impliquées dans les phénomènes observés ainsi que les mécanismes mis en jeu dans ces phénomènes.

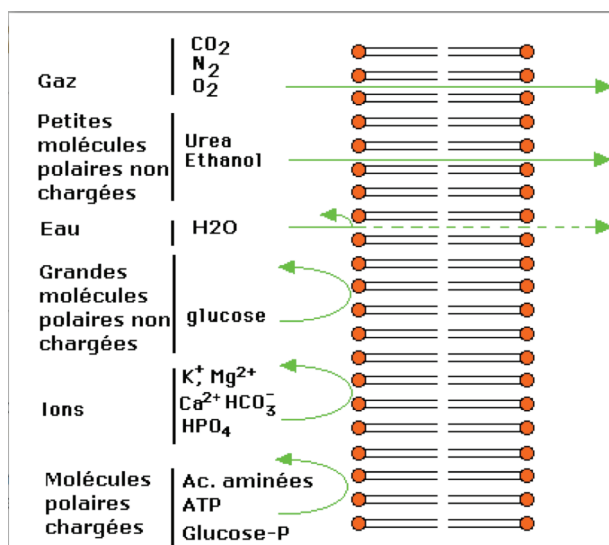


Figure 1: Perméabilité d'une bicouche lipidique vis-à-vis de différentes substances.

Réponse à la question I-A.3.c

Les cellules sont enveloppées par une membrane plasmique très perméable à l'eau mais imperméable à un grand nombre de substances. Une différence de concentration en solutés non diffusibles de part et d'autre de la membrane sera compensée par des mouvements d'eau au travers de la membrane, l'eau traversant librement la membrane plasmique. Des mouvements

d'eau passifs vont donc avoir lieu **par osmose d'un milieu hypotonique vers un milieu hypertonique**.

Ici, Urée et glycérol peuvent pénétrer les membranes contrairement à NaCl et glucose

Tube 1, 4: La solution dans les tubes correspond au milieu extérieur. Milieu isotonique et isoosmotique: pas de flux net d'eau ni hémolyse, ni plasmolyse

Tube 2: solution dans le tube est hypoosmotique et hypotonique par rapport à la concentration intracellulaire des hématies. Les hématies sont hémolysées car l'eau est rentrée (flux net entrant, turgescence) dans les hématies jusqu'à provoquer l'éclatement de la cellule =hémolyse totale (notion de **résistance membranaire**)

Tube 3: Milieu hypoosmotique là encore, mais hémolyse partielle. Cellule gonfle, car entrée d'eau, mais la membrane de la cellule est capable de résister à la pression osmotique exercée par la solution de NaCl

Tube 5: Milieu hyperosmotique par rapport au milieu intérieur des hématies, l'eau sort des hématies. = plasmolyse

Tube 6: solution de glucose isoosmotique et isotonique, hématies normales ni hémolyse ni plasmolyse

Tube 7 : solution d'urée est isoosmotique mais hypotonique par rapport au milieu intérieur des cellules. L'urée peut traverser les membranes, la concentration en urée va donc s'équilibrer entre les 2 compartiments. Ceci va entraîner une concentration plus forte à l'intérieur des hématies et donc une entrée d'eau.

Tube 8: même interprétation que pour l'Urée

Bonus : calcul pression osmotique

**I-B.** La membrane des hématies est depuis de nombreuses années un modèle de choix dans l'étude des membranes plasmiques.

#### **I-B.1 Quels sont les avantages des hématies pour l'étude des membranes?**

*Réponse à la question I-B.1*

Ces cellules sont très faciles à obtenir de façon relativement pure, et elles n'ont qu'une seule membrane, la membrane plasmique.

L'étude de ces membranes a permis de fournir de nombreuses informations sur la physiologie et l'architecture des membranes en général.

En 1988, une équipe de chercheurs travaillant sur l'identification des déterminants moléculaires du groupe Rhésus identifièrent, de manière fortuite, dans la membrane des hématies, une petite protéine jusque là inconnue. En effet, ces chercheurs faisaient produire à des lapins des anticorps en réponse à un polypeptide Rhésus partiellement purifié et dénaturé. Ils constatèrent que leurs préparations étaient systématiquement contaminées par une protéine dont la masse moléculaire était de 28 kDa. Des études complémentaires ont montré que cette protéine ne correspondait pas un produit de dégradation de la protéine rhésus, comme supposé initialement, mais était bien une nouvelle protéine encore inconnue. L'abondance de cette protéine permit de la purifier et de la séquencer partiellement. L'ADN complémentaire (ADNc) codant pour cette protéine fut cloné à partir d'une banque d'érythroïdes de foie fœtal humain.

**I-B.2. a** Décrivez sous la forme d'un schéma une stratégie possible permettant d'obtenir cet ADNc. Sur ce schéma devront notamment apparaître les différentes étapes de la construction de la banque et de son criblage.

Réponse à la question I-B.2.a

Sont résumés dans ce cadre les principales étapes de la procédure

**Construction d'une banque :**

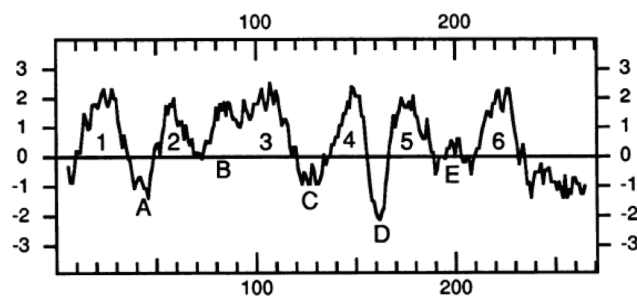
- Extraction des ARN totaux puis sélection des ARN polyA
- Synthèse des ADNc par transcription inverse de ces ARN
- Insertion des ADNc dans un vecteur de clonage : phage ou plasmide

**Criblage de la banque :**

- Etalement de la banque d'ADNc sur Petri après infection ou transformation de bactéries. Chaque plaque de lyse ou colonie représente un clone qui a amplifié un ADNc particulier.
- Hybridation des clones avec une sonde marquée dont la séquence a été déduite d'une partie de celle de la protéine d'intérêt (cette sonde est obligatoirement dégénérée, du fait de la redondance du code génétique)
- Isolement des clones positifs
- Purification du vecteur de ces clones
- Isolement et séquençage de l'insert d'ADNc

NB. Il est possible de simplifier la procédure grâce à la PCR qui peut être réalisée directement sur les ADNc sans clonage préalable. Le criblage des ADNc se fait par les amorces, qui seront nécessairement dégénérées.

L'ADNc identifié est constitué de 807 paires de bases. Il code pour une protéine de 269 acides aminés dont la séquence peut être déduite grâce au code génétique. L'analyse du profil d'hydrophobicité est présentée en figure 2.

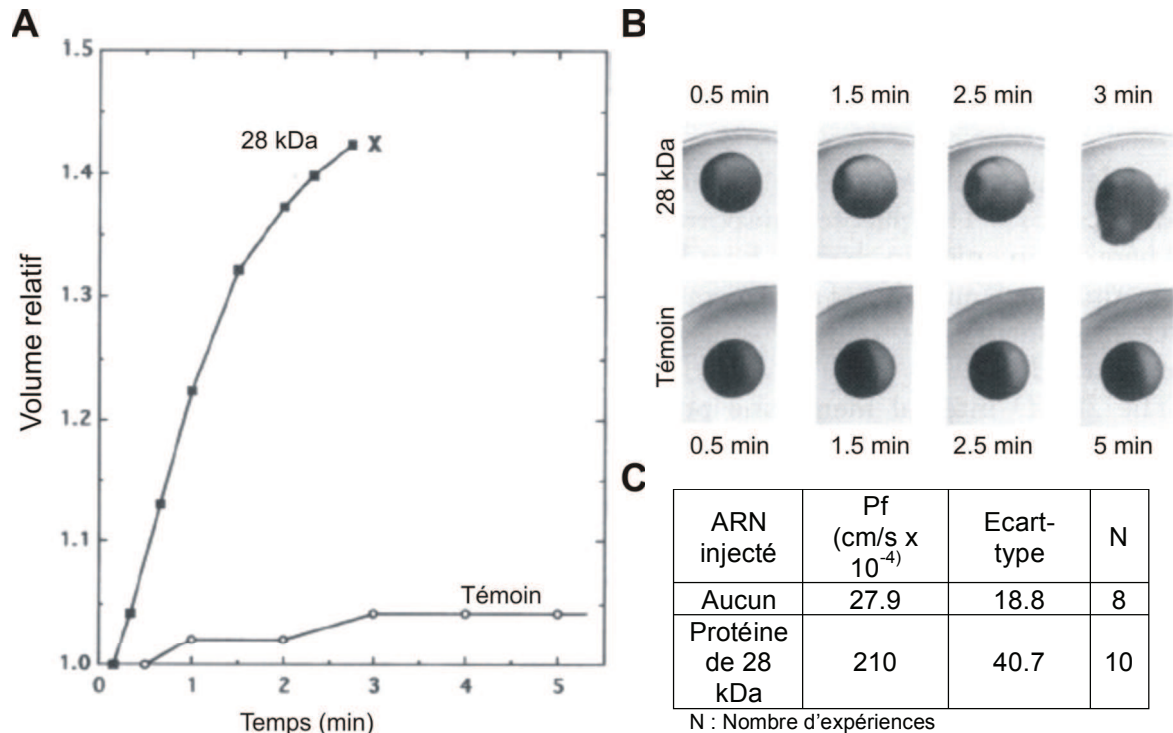


**Figure 2 : Profil d'hydrophobicité de la séquence de la protéine de 28 kDa.** L'indice porté sur l'axe des ordonnées est d'autant plus élevé que l'acide aminé est hydrophobe. L'extrémité N-terminale de la protéine est située à gauche et l'extrémité C-terminale à droite. Les chiffres sur l'axe des abscisses indiquent la position des acides aminés dans la protéine

**I-B.2.b** Quelle disposition la protéine peut-elle avoir dans la membrane? Proposer un modèle topologique.



La perméabilité osmotique à l'eau (Pf) des membranes est calculée et correspond au volume d'eau traversant la membrane par unité de surface et par unité de temps sous l'effet d'un gradient osmotique. Le volume (V) est mesuré au cours du temps et le rapport V/Vo est appelé volume relatif (ie le volume mesuré à un instant donné / volume initial mesuré à l'instant du transfert).



**Figure 3 : Perméabilité à l'eau des 2 lots d'ovocytes (Témoin et ovocytes ayant été injectés avec les ARN messenger de la protéine de 28 kDa).** A : Courbes montrant l'évolution du volume relatif après le transfert des ovocytes dans le milieu hypotonique. B : Observation en microscopie. C : Tableau donnant les coefficients de perméabilité (Pf) osmotique à l'eau.

### I-B.3.b Analysez et interprétez les résultats obtenus

Réponse à la question I-B.3.b

Les 2 lots d'ovocytes sont transférés dans un milieu hypotonique, ce qui va engendrer une entrée d'eau dans les ovocytes. Cette entrée d'eau est bien plus importante dans les ovocytes où des ARNm de la protéine de 28kDa ont été injectés comme l'atteste l'augmentation bien plus importante du volume relatif et de la perméabilité osmotique pour ce lot.

### I-B.3.c Quelle hypothèse peut-on faire quant à la fonction de cette protéine?

Réponse à la question I-B.3.c

Il semble donc que la protéine de 28kDa favorise l'entrée d'eau dans les ovocytes, elle s'apparente à un transporteur d'eau.



#### I-B.4

Par la suite, une autre équipe de recherche a étudié la fonction de ces protéines de 28kDa en utilisant cette fois-ci des membranes artificielles.

L'expérience a consisté à produire des protéoliposomes-protéine 28kDa qui sont de petites vésicules constituées d'une bicouche lipidique dans laquelle ont été insérées les protéines de 28 kDa purifiées.

Les protéoliposomes-protéine 28kDa sont rapidement transférés à un instant donné dans un milieu dont l'osmolalité est supérieure de 20% à celle du milieu d'origine. Comme précédemment décrit, le volume relatif des protéoliposomes est mesuré au cours du temps afin de déterminer le coefficient de perméabilité membranaire (Pf) à l'eau. Ces résultats sont présentés dans le tableau 1 ci-dessous. La même expérience est réalisée avec des liposomes témoin ne contenant pas la protéine de 28 kDa.

	Pf (cm/s)	Ecart-type
Liposome témoin	0.0097	0.004
Protéoliposome-protéine 28kDa	0.054	0.008

**Tableau 1 : Coefficients de perméabilité osmotique à l'eau**

##### I-B.4.a Quel est l'intérêt d'avoir effectué cette expérience ?

Réponse à la question I-B.4.a

C'est pour s'assurer que c'est la protéine de 28kD elle-même qui est l'unité fonctionnelle du canal hydrique et non une autre protéine présente dans les ovocytes ou dans leur membrane.

##### I-B.4.b Que peut-on en conclure ?

Réponse à la question I-B.4.b

Le coefficient de perméabilité membranaire (Pf) à l'eau des protéoliposomes est bien supérieur à celui des liposomes témoin, la protéine de 28kD favorise donc le transport d'eau par diffusion facilitée.

##### I-B.4.c Quel nom donne-t-on à la famille dont fait partie la protéine de 28 kDa?

Réponse à la question I-B.4.c

Aquaporine

I.C. En guise de conclusion de cette 1<sup>ère</sup> partie, représentez de façon schématique la structure de la membrane plasmique d'une hématie en indiquant les différents types d'échanges dont elle est le siège dans les expériences que vous avez réalisées en I.A. Vous n'oubliez pas de préciser le nom donné à ces types d'échanges, ainsi que les mécanismes qui en sont à l'origine.

Réponse à la question I-C

Plusieurs schémas étaient possibles et acceptables. Les notions de diffusion et transport facilité devaient y figurer.