

BIOLOGIE CELLULAIRE

Laboratoire - Perméabilité cellulaire et osmolarité sanguine




Objectifs : Les objectifs de cette expérience sont 1) que l'étudiant se familiarise avec l'utilisation d'un microscope et 2) que l'étudiant comprenne l'importance de l'environnement pour maintenir l'intégrité des érythrocytes dans le plasma sanguin,

Modèle d'étude :

Les cellules eucaryotes présentent des formes et des tailles différentes, elles partagent néanmoins un certain nombre de caractères dont la présence d'une membrane plasmique contenant un cytoplasme. Dépendant du type cellulaire observé, il est possible d'observer différents organites au microscope photonique.

Les érythrocytes sont des cellules sanguines dont la fonction principale est de transporter l'oxygène vers les tissus. Cette fonction est assurée par l'hémoglobine, une protéine qui contient des groupes hèmes, responsables de la couleur rouge des érythrocytes. Au cours du processus de maturation de ces cellules, l'hémoglobine produite se dissout dans le cytoplasme et atteint des concentrations très élevées (environ 34 % du poids de l'érythrocytes); les organites intracellulaires tels que le noyau, le réticulum endoplasmique et les mitochondries sont perdus. Les érythrocytes sont alors destinés à survivre, dans le cas des bovins, pendant environ 120 jours. Les caractéristiques décrites ci-dessus font des érythrocytes un modèle pour étudier la perméabilité membranaire, puisque leurs altérations conduisant à la lyse cellulaire se traduisent par la libération d'hémoglobine dans le milieu extracellulaire (hémolyse).

Les érythrocytes ont une certaine tolérance à l'hypotonie et l'hypertonie de leur environnement. Cependant, des changements brusques dans l'osmolarité sanguine peuvent avoir un impact sur l'intégrité des globules rouges, les rendant plus susceptibles à l'hémolyse. La solubilisation des lipides des membranes cellulaires, ou la diminution de la tension à surface de la cellule, peut aussi provoquer une hémolyse.

<p>MATÉRIEL</p> <ul style="list-style-type: none"> • Support à microtubes • 3 microtubes • 3 x pipette de 7 mL • Mini-centrifugeuse • Micropipette P200 + embouts pour P200 • Microscope optique • Kit à microscopie : <ul style="list-style-type: none"> • Papier à lentille (Kimwipes) • Éthanol 95% • Huile à immersion • Boîte de lames + boîte de lamelles • Bleu d'éthylène • Lugol • Boîte de cure-dents • Lame et lamelles • Bécher « Waste » • Chronomètre 	<p>RÉACTIFS</p> <ul style="list-style-type: none"> • Eau distillée (dH₂O) • Solution isotonique (NaCl 0,9 %) • Solution hypertonique (NaCl 10 %) • Solution d'érythrocytes (de mouton) lavés, en bouteille compte-goutte
<p><u>Précautions santé et sécurité</u></p> <div style="display: flex; align-items: center;">  <p>Certains matériaux sont dangereux et présentent un danger biologique. Ces organismes/toxines peuvent causer des maladies chez l'humain ou l'animal. Porter gants, sarrau, lunettes de sécurité et manipuler avec beaucoup de précautions. Jeter les produits à l'endroit désigné.</p> </div>	
<div style="display: flex; align-items: center;">  <p>Certains produits peuvent entraîner des effets plus ou moins sévères sur la santé ou couche d'ozone. Manipuler avec précaution.</p> </div>	<div style="display: flex; align-items: center;">  <p>Certains produits sont inflammables. Tenir à l'écart de la chaleur, du feu et des étincelles.</p> </div>

PARTIE A. Préparation de spécimen de cellules buccales et observation au microscope optique (30 min.)

1. Avec un cure-dent, frotter l'intérieur de votre joue pour en prélever une mince couche de tissu.
2. Bien étaler le frottis sur la lame.
 - Préalablement nettoyer la lame avec une goutte d'alcool et un papier Kimwipe
 - Préalablement identifier la lame avec un crayon mine, du côté givré de la lame
3. Déposer une petite goutte de bleu de méthylène sur le frottis.
 - La goutte doit être très petite, sans quoi le volume sera trop grand pour l'observation au microscope
4. Déposer une lamelle sur l'échantillon.
5. Faire l'observation de la lame au microscope.

**** Se référer aux consignes relatives à l'utilisation du microscope en annexe ****

- a. Déposer la lame avec l'échantillon sur la platine du microscope.
- b. Faire d'abord les mises au point avec l'objectif 4X (grossissement de 40X).
- c. Observer l'échantillon au microscope à grossissement 40X afin de repérer les endroits les plus favorables à l'observation.
- d. Passer au grossissement 100X, en veillant à choisir un champ visuel intéressant.
- e. Passer au grossissement 400X, en veillant à choisir un champ visuel intéressant.
- f. Déposer une goutte d'huile à immersion sur l'échantillon.
- g. Passer au grossissement 1000X, en veillant à choisir un champ visuel intéressant.
- h. Observer la préparation au microscope (400X ou 1000X en immersion).
- i. Remettre l'objectif à 4X, abaisser la platine et retirer la lame.

6. Dessiner (sur papier) vos observations pour une cellule individuelle et identifier les structures cellulaires suivantes :

- Membrane plasmique
- Noyau
- Cytoplasme
- Autres organites visibles ?
- Autres organismes (ex. bactéries) visibles ?

7. Déposer toutes les lames utilisées dans le bac jaune prévu à cet effet.

PARTIE B. Observation d'érythrocytes en réaction à l'exposition à trois (3) milieux de différentes concentrations en NaCl (60 min.)

1. Identifier le capuchon et le côté (partie rugueuse) de chaque microtube avec le numéro d'équipe et une des trois solutions : NaCl 0,9 %, NaCl 10 % et dH₂O.
2. Déposer :
 - 1 mL de solution NaCl 0,9 % dans le microtube 1
 - 1 mL de solution NaCl 10 % dans le microtube 2
 - 1 mL de dH₂O dans le microtube 3
3. Ajouter 1 goutte de la solution d'érythrocytes dans chaque tube.
4. Fermer les microtubes et mélanger par inversion jusqu'à l'obtention d'un mélange homogène (tapoter les tubes au besoin).
5. Laisser reposer les microtubes 1 minute.
6. Centrifuger 1 minute à 5000 RPM.

7. Retirer les microtubes, **noter la différence entre chaque tube (couleur du surnageant/culot)**.

- Placer les tubes contre une surface blanche pour faciliter l'observation

8. Placer un Kimwipe sur la surface de travail et y déposer 3 lames.

9. Identifier les 3 lames avec un marqueur de type « Sharpie » :

- 1- NaCl 0,9 %
- 2- NaCl 10 %
- 3- dH₂O

10. Avec la micropipette, placer au centre de la lame 22 µl du culot de la solution correspondante.

11. Placer une lamelle sur la goutte, en évitant les bulles d'air (**fig. 1**)

- Au besoin, enlever avec un Kimwipe l'excédent de solution débordant de la lamelle

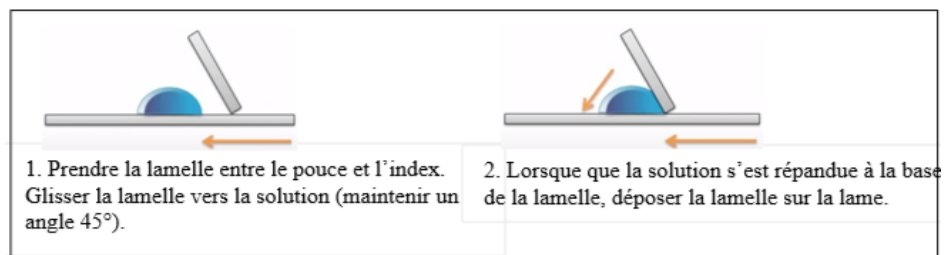


Figure1. Préparation d'une lame de microscope

12. **Faire l'observation des lames au microscope** en commençant par la **lame NaCl 0,9 %** et **notez vos observations** (présence/absence de cellules ou de débris, forme de cellules).

**** Se référer aux consignes relatives à l'utilisation du microscope en annexe ****

- Déposer la lame avec l'échantillon sur la platine du microscope.
- Faire d'abord les mises au point avec l'objectif 4X (grossissement de 40X).
- Observer l'échantillon au microscope à grossissement 40X afin de repérer les endroits les plus favorables à l'observation.
- Passer au grossissement 100X, en veillant à choisir un champ visuel intéressant.
- Passer au grossissement 400X, en veillant à choisir un champ visuel intéressant.
- Déposer une goutte d'huile à immersion sur l'échantillon.
- Passer au grossissement 1000X, en veillant à choisir un champ visuel intéressant.
- Observer la préparation au microscope (400X ou 1000X en immersion).
- Remettre l'objectif à 4X, abaisser la platine et retirer la lame.

13. Refaire l'étape 10 (sous-étapes a. à i.) pour faire l'observation de la **lame NaCl 10 %**

14. Refaire l'étape 10 (sous-étapes a. à i.) pour faire l'observation de la **lame dH₂O**

ANNEXE

Consignes relatives à l'utilisation du microscope

Le microscope est un instrument complexe et fragile. Il importe d'en prendre grand soin. Vous êtes responsable du bon état du microscope. Les règles suivantes doivent être respectées par tous les utilisateurs.

Ne pas déplacer le microscope.

Si vous avez à le faire, portez toujours le microscope à deux mains, l'une sous la base, l'autre tenant la potence qui supporte le tube optique.

Utiliser uniquement du papier à lentilles (Kimwipes) pour nettoyer les objectifs et les oculaires.

Les objectifs, à eux seuls, coûtent aussi cher que l'ensemble des autres parties du microscope.

Vérifier soigneusement le bon état du microscope

Nettoyer les oculaires et les objectifs **avant** et **après chaque séance** de microscopie.

Veiller au rangement final.

- Toujours abaisser la platine au maximum.
- L'objectif 4X doit être placé dans l'axe optique.
- La lumière est fermée.
- Aucune lame ne reste sur la platine.
- L'oculaires, les objectifs et la platine sont nettoyés et exempts d'huile ou de taches.
- Le fil est bien rangé autour de la base.

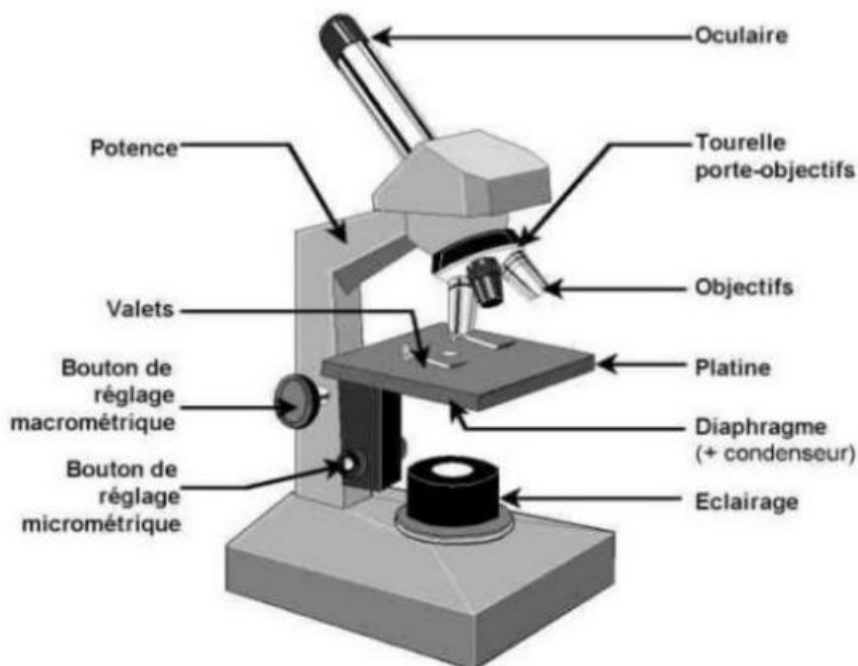


Figure 1. Identification des composantes retrouvées au sein d'un microscope photonique. Les objectifs et l'oculaire contiennent les lentilles en charge de grossir l'image de l'objet observé. L'oculaire induit un grossissement de 10X. La tourelle porte-objectifs permet à l'utilisateur de choisir quel objectif utiliser parmi le 4X, 10X, 40X et 100X, pour obtenir un grossissement final de 40X, 100X, 400X et 1000X, respectivement.

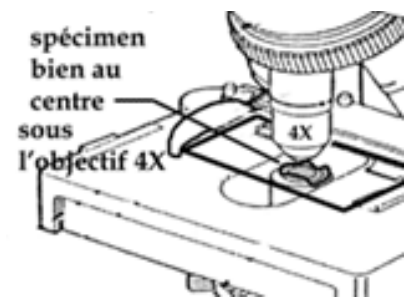
INSTRUCTIONS : OBSERVATION AU MICROSCOPE

1. Préparation initiale

- Bien nettoyer l'oculaire et les objectifs avec un peu de nettoyant à lentilles.
 - Déposer quelques gouttes de nettoyant à lentilles sur un papier à lentilles (Kimwipes) et essuyer doucement les lentilles.
 - **Ne JAMAIS déposer de nettoyeur à lentilles directement sur l'oculaire et les objectifs.**
- Assurez-vous que l'objectif 4X est en place.
(La mise au point initiale se fait TOUJOURS avec l'objectif 4X pour TOUTE observation)
- Assurez-vous que la platine est au plus bas niveau possible.

2. Centrer le spécimen à observer

- Placer la lame sur la platine.
- Ouvrir le bras du valet et placer la lame au fond, contre le corps du valet.
- Examiner la lame.
- À l'aide des vis de déplacement du chariot, centrer l'échantillon à observer vis-à-vis du point lumineux au centre de la platine (où la lumière du trajet lumineux va passer).



3. Première mise au point à 40x (objectif 4X + oculaire 10X)

- Sans mettre l'œil à l'oculaire, monter la platine au maximum vers l'objectif.
 - Faire la mise au point avec la vis MACRO
 - La vis MACRO est utilisée **uniquement** pour la première mise au point à 40X
 - Faire la mise au point avec la vis MICRO
 - Toutes les mises au point subséquentes (100X, 400X et 1000X) sont faites avec la vis MICRO
 - Si ce grossissement est approprié à l'échantillon, procéder à l'observation.
 - Sauf exception, ce grossissement n'est généralement pas suffisant pour l'observation (ou)
- Si un grossissement plus grand est requis, passer à l'étape suivante.

4. Passer à 100X et faire la mise au point (objectif 10X + oculaire 10X)

- Faire tourner le revolver dans le sens horaire pour passer à 100X.
 - Faire la mise au point avec la vis MICRO.
 - Si ce grossissement est approprié à l'échantillon, procéder à l'observation (ou)
- Si un grossissement plus grand est requis, passer à l'étape suivante.

5. PASSER À 400X et faire la mise au point (objectif 40X et oculaire 10X)

- Faire tourner le revolver dans le sens horaire pour passer à 100X.
- Faire la mise au point avec la vis MICRO.
- Si ce grossissement est approprié à l'échantillon, procéder à l'observation (ou)
Si un grossissement plus grand est requis, passer à l'étape suivante.

6. PASSER À 1000X, avec immersion, et faire la mise au point (objectif 100X et oculaire 10X)

- Faire pivoter le revolver de façon à être à mi-chemin entre les objectifs 40X et 100X.
- Place la bouteille d'huile au-dessus de la lame et déposer UNE goutte d'huile sur l'échantillon
 - Prenez le temps de bien vous positionner : il est difficile de placer la bouteille entre les objectifs
 - Éviter d'huiler la platine ou toute autre partie de la lame.
- Faire basculer doucement l'objectif 100X sur la goutte d'huile : l'objectif va glisser sur la lame.
 - La goutte devrait faire « le pont » entre la lame et l'objectif.
- Faire la mise au point uniquement avec la vis MICRO.
- Procéder à l'observation.

6. Remettre le microscope en position initiale

N.B. Faire ces étapes même si vous avez d'autres échantillons à observer, car vous devrez revenir à 4X

- Remettre l'objectif à 4X, abaisser la platine et retirer la lame.
- À l'aide de la solution à lentilles et d'un Kimwipe, essuyer toute trace d'huile sur le microscope, en particulier sur l'objectif 100X
 - **Ne JAMAIS revenir vers les objectifs 40X, 10X et 4X lorsqu'il y a de l'huile sur la lame**

Qu'importe l'étape, si rien ne fonctionne : recommencer à partir de l'étape 1 (Préparation initiale).

Si de l'huile a été utilisée (1000X) et que rien ne fonctionne : il faudra laver la lame et refaire toute la démarche de préparation de spécimen.
