

TP 4 Evaluation de l'activité anti-hémolytique

Objectifs

Evaluer l'activité anti-hémolytique en utilisant les globules rouges comme modèle

Activité anti-hémolytique induite *in vitro* par l'hypotonie

➤ Principe

L'exposition des globules rouges à un milieu hypotonique provoque l'entrée massive du solvant dans son milieu intrinsèque entraînant un gonflement puis un éclatement. La lyse de la membrane cytoplasmique aboutit à la libération de l'hémoglobine dans le milieu extra cellulaire facilement observable macroscopiquement grâce à la coloration rougeâtre permettant aussi son dosage par spectrophotométrie d'absorbance visible à 540 nm.

➤ Préparation de la solution érythrocytaire

Le culot du sang récupéré dans des tubes héparinés a été utilisé pour préparer les suspensions érythrocytaires. Le sang est centrifugé à une vitesse de 3000 rpm durant 10 min. Le plasma séparé des érythrocytes est éliminé (le surnageant). Ces érythrocytes sont ensuite lavés trois fois par une solution de tampon phosphate iso-saline « PBS » (10 mM, 154 mM NaCl, pH= 7,4). Ensuite les globules rouges ont été reconstitués sous forme de suspension à 5% ((500µl + 9500 µl PBS iso-salin).

A. Mode opératoire

Le Protocole suivi pour effectuer le test anti-hémolytique les étapes sont celles indiquées ci-dessous :

- ✓ La mise dans des tubes à hémolyse un volume de 0,500 ml de la solution hypotonique, 0,125 ml de la substance à tester et 0,125 ml de la suspension érythrocytaire à 5 %. La mixture est homogénéisée délicatement suivie d'une incubation à température ambiante pendant 30 min.
- ✓ La solution subit une centrifugation pendant 10 min à une vitesse de 3000 rpm.
- ✓ La lecture de l'absorbance de chaque tube à 540 nm.

Expression des résultats

L'expérience a été réalisée en triple et les résultats sont la moyenne des différentes mesures. Le pourcentage d'inhibition de la dénaturation de la protéine a été calculé comme suit :

$$\text{Pourcentage d'inhibition} = ((\text{Abs C} - \text{Abs T}) / \text{Abs C}) \times 100$$

Abs C : Absorbance du témoin négatif.

Abs T : Absorbance du test.