

LABORATOIRE DE BIOCHIMIE ET LABORATOIRE D'HEMATOLOGIE
TROPICALE DE L'INSTITUT DE MEDECINE TROPICALE
« PRINCE LEOPOLD » A ANVERS
(DIRECTEUR: PROF. P. G. JANSSENS).

Quelques aspects de l'utilité de l'électrophorèse en gel de gélose en hématologie

PAR

M. van SANDE et G. VAN ROS.

Le gel d'amidon hydrolysé est un milieu d'électrophorèse particulièrement bien adapté à la mise en évidence des groupes d'haptoglobine et des variants de la transferrine plasmatique. Nous nous sommes demandé si le polymorphisme moléculaire de ces protéines plasmatiques peut également être mis en évidence par électrophorèse en gel de gélose. Ce milieu possède en effet de nombreux avantages : son pouvoir de résolution, bien que moindre que celui du gel d'amidon, est en effet considérable; de plus ce gel est transparent, ce qui permet une quantification aisée des fractions; certes le gel d'amidon peut lui aussi être rendu transparent, mais le procédé est long et délicat; enfin, l'électrophorèse en gélose permet des mesures très précises de la mobilité relative des fractions, ce qui n'est pas le cas de l'électrophorèse en gel d'amidon.

La méthode d'électrophorèse de Wieme (1959) utilise de manière très heureuse toutes les possibilités offertes par le gel de gélose et c'est la raison pour laquelle nous nous sommes largement inspirés de cette technique dans nos investigations.

Technique.

La séparation électrophorétique a lieu dans une couche de gélose d'un millimètre d'épaisseur préparée en tampon véronal de pH 8,4 et de force ionique 0,05, étalée sur une lame porte-objet ordinaire. Le liquide à analyser est inséré dans

une petite fente pratiquée dans la gélose. Dans le même gel on insère de plus dans une petite fente séparée, faite au même niveau que la fente principale, un mélange standard constitué d'albumine, de transferrine ou sidérophiline pure et de macrodex. Cette dernière substance est du dextran dépolymérisé dépourvu de charge électrique, que l'on retrouve après l'électrophorèse en un point que nous appellerons le point zéro. Le déplacement depuis la fente d'insertion jusqu'à ce point résulte uniquement de l'électro-endosmose. Nous prenons conventionnellement comme unité la distance qui sépare le macrodex de l'albumine. Dans de bonnes conditions techniques la transferrine du mélange artificiel possède une mobilité relative de 0,470 ($\sigma = \pm 0,013$).

La séparation électrophorétique est effectuée sous une tension de 20 volts par centimètre pendant 25 minutes. Après fixation, séchage et coloration, la mobilité relative des fractions est facilement déterminée et leur grandeur est exprimée en fonction de notre unité conventionnelle.

La valeur relative en pourcentage de chaque fraction peut être obtenue par densitométrie directe.

Résultats.

Nous avons investigué avec cette technique la possibilité de séparer l'hémoglobine S de l'hémoglobine A et de déterminer les groupes d'haptoglobine et de transferrine.

A. — En ce qui concerne *les mélanges d'hémoglobines A et S*, on constate que les deux constituants sont nettement séparés après une électrophorèse d'une durée de 20 minutes (figure 1). Il est aisé de déterminer la quantité relative en pourcentage de chaque hémoglobine par densitométrie directe des fractions ainsi séparées ($\lambda = 546 m\mu$), à condition d'effectuer ces déterminations immédiatement après l'électrophorèse. Nous employons pour cela un colorimètre Eppendorf auquel est adapté un dispositif permettant la lecture de $\frac{1}{4}$ mm en $\frac{1}{4}$ mm des phérogrammes disposés sur lames porte-objet. On obtient ainsi des courbes de Gauss (figure 2), qui sont ensuite planimétrées. Un grand avantage pratique de cette méthode de séparation est qu'on peut l'appliquer à une goutte de sang capillaire. Il suffit de mélanger une goutte de sang avec un petit grain de saponine afin de provoquer l'hémolyse des globules rouges. A défaut de saponine le sang peut également être hémolysé au moyen d'eau distillée. Du sang ainsi préparé, un volume de 4 microlitres environ suffit pour l'électrophorèse.

Nous avons recherché le degré de précision de ces déterminations quantitatives en soumettant à l'électrophorèse des quantités progressivement croissantes de dilutions variées d'un même échantillon de sang d'un sujet sickléémique. Les résultats sont représentés dans les figures 3 et 4.

De plus nous avons également ajouté à une quantité bien déterminée d'un mélange d'hémoglobine A et S des quantités progressi-

vement croissantes d'hémoglobine A (figure 5); nous avons ainsi constaté que les quantités ajoutées sont déterminées avec une grande précision. De ces constatations on peut tirer la conclusion que la méthode proposée donne des résultats exacts. Une telle exactitude est indispensable pour certaines recherches. Il a en effet été démontré que les proportions relatives des hémoglobines chez les sicklémiqes sont déterminées génétiquement par une série d'allèles (Wells et Itano, 1951; Itano, 1953, 1959). Les différences individuelles dans les proportions d'hémoglobine S déterminées par des allèles différents peuvent être relativement faibles et nécessitent donc une précision suffisante des mesures.

Bref, la méthode proposée possède les avantages suivants : c'est une microméthode; elle est très rapide; elle donne des résultats quantitatifs précis. De plus elle convient particulièrement bien au travail en série : sur une lame porte-objet il est aisé de procéder à trois déterminations simultanées. On peut même, toutes les autres conditions restant inchangées, effectuer douze analyses simultanées dans des gels coulés sur plaques de verre mince de huit centimètres et demi sur dix.

B. — Que peut-on d'autre part attendre de cette technique pour la détermination des *groupes d'haptoglobine* ?

La totalité de l'haptoglobine plasmatique est préalablement liée à l'hémoglobine par mélange d'une quantité suffisante d'hémoglobine au plasma. Deux à trois microlitres de ce mélange sont ensuite soumis à l'électrophorèse pendant 25 minutes. Les complexes hémoglobine-haptoglobine sont révélés au moyen d'un réactif à la benzidine (une solution de 200 mg de benzidine dans une solution aqueuse de CH_3COOH à 5 p. cent; ajouter après 0,2 ml H_2O_2 30 p. cent). Deux fractions apparaissent sur le phérogramme : les complexes hémoglobine-haptoglobine qui ici restent réunis en une seule fraction et l'hémoglobine libre. Le grand avantage du gel de gélose pour ce genre de détermination consiste précisément dans cette séparation très marquée des complexes et de l'hémoglobine libre, qui résulte du fait que l'hémoglobine libre migre à partir du lieu d'insertion vers la cathode, alors que les complexes hémoglobine-haptoglobine migrent vers l'anode (van Sande, Van Ros et Druet, 1963). La figure 6 représente les résultats d'une électrophorèse simultanée en un même gel de quatre sérums appartenant aux groupes d'haptoglobine 1-1, 2-1, 2-2 et 0-0. Les complexes hémoglobine-haptoglobine sont situés à gauche dans la figure, l'hémoglobine libre à droite. On constate que les complexes hémoglobine-haptoglobine des différents groupes présentent dans ce type de gel une légère différence de mobilité. On reconnaît facilement le

groupe 1-1; pour les groupes 2-1 et 2-2 la différence est moins nette. Comme il ne s'agit que d'une différence de mobilité et non d'une différence dans l'aspect des complexes, comme c'est le cas en gel d'amidon, les déterminations des groupes ne sont guère possibles qu'en soumettant à l'électrophorèse dans le même gel un sérum de groupe haptoglobine connu en même temps que les sérums à déterminer. Il ne nous semble de toute manière pas recommandable d'utiliser seule cette technique en lieu et place de l'électrophorèse en gel d'amidon pour la détermination des groupes : outre que les différences de mobilité sont faibles, le gel de gélose ne permet pas de reconnaître d'autres phénotypes, tels que le type 2-1 modifié.

En fait le grand avantage de la méthode est qu'elle permet de distinguer avec une absolue certitude les sujets anhapto-globulinémiques des sujets du groupe 1-1. Ceci est très important, car les techniques courantes d'électrophorèse en amidon ne donnent souvent pas de certitude à ce sujet, particulièrement quand l'électrophorèse est faite en tampon borate de Smithies (1955). Même en tampon discontinu de Poulik (1957), lorsque l'hémoglobine libre est quelque peu abondante, la séparation entre elle et le complexe unique hémoglobine-haptoglobine peut manquer.

De plus le risque existe parfois de prendre en gel d'amidon un sérum 2-2 à faible teneur en haptoglobine pour un sérum 1-1, l'hémoglobine libre y étant prise pour un complexe hémoglobine-haptoglobine et les fractions du groupe 2-2 paraissant manquer. De tels sérums montrent toujours en gélose un complexe hémoglobine-haptoglobine net à la suite de la concentration de tous les polymères du groupe 2-2 en une seule fraction.

Dans tous ces cas la précision des méthodes en amidon peut certes être augmentée, soit comme l'a proposé Laurell (1959), en travaillant en tampon phosphate à pH 7,4, soit en utilisant la technique des gels d'amidon verticaux proposée par Smithies (1959). Notre méthode est toutefois bien plus simple et plus sûre. Elle évite également l'inconvénient principal de la technique de Laurell qui est la friabilité des gels.

C. — En ce qui concerne *les variants de transferrines*, nous avons pu appliquer notre technique aux phénotypes CC, CD₁ et D₁D₁. Deux microlitres du sérum à examiner sont soumis à l'électrophorèse durant 25 minutes. Les gels sont ensuite fixés, séchés et colorés au noir amide. Une quantité suffisante de sérum peut être obtenue à partir de sang capillaire prélevé par piqûre et aspiré dans la partie effilée d'une pipette Pasteur. Après coagulation et centrifugation, une quantité de sérum, suffisante pour l'examen, est

obtenue. Les transferrines C et D₁ sont très bien séparées par cette technique. Dans la figure 7 sont représentés les phénotypes CC, CD₁ et D₁D₁. Les différences de mobilité sont évidentes. Chaque fraction protéique peut de plus être caractérisée par deux grandeurs numériques : sa quantité relative et sa mobilité relative. La mobilité relative de la transferrine C est 0,470 (moyenne de 84 déterminations). Celle de la transferrine D₁ 0,439 (moyenne de 10 déterminations).

Sur plaques de verre mince plus grandes, mesurant 10 centimètres sur 8,5, douze échantillons différents peuvent être étudiés simultanément. La méthode pourrait donc être fort utile comme *screening-test* dans l'étude des populations noires, qui présentent souvent un pourcentage appréciable d'hétérozygotes CD₁.

En résumé, l'électrophorèse en gel de gélose, effectuée suivant les modalités que nous venons de décrire, est un très utile procédé complémentaire d'étude des types d'hémoglobine, d'haptoglobine et de transferrine. Combiné à l'électrophorèse en gel d'amidon, elle augmente la précision et la rapidité des déterminations.

Résumé. — *Les auteurs exposent les avantages du gel de gélose en ce qui concerne la séparation des hémoglobines A et S et la mise en évidence du polymorphisme des haptoglobines et transferrines sériques.*

Avec la microméthode utilisée, on peut séparer l'hémoglobine A et l'hémoglobine S en vingt minutes et effectuer une quantitation précise des deux constituants.

En ce qui concerne les différents groupes d'haptoglobine, le grand avantage de la méthode réside dans le fait que l'hémoglobine libre est très nettement séparée des complexes hémoglobine-haptoglobine. Ainsi on obtient une très grande certitude dans la détection des groupes Hp 0-0 et des groupes chez des sujets 2-2 ayant un taux faible d'haptoglobine.

Pour les variants de la transferrine, a été étudiée jusqu'à présent par cette méthode la détermination des phénotypes CC, CD₁ et D₁D₁. Le variant D₁ se sépare nettement de la transferrine C.

Chaque fraction séparée peut être caractérisée par deux données numériques : sa concentration relative et sa mobilité relative, ce qui fait que la méthode décrite est un très utile procédé complémentaire de l'électrophorèse en gel d'amidon.

Summary. — *The authors explain the advantages of agar gel with regard to the separation of A and S hemoglobins and the detection of the haptoglobins types and serum transferrins.*

With the micromethod used, it is possible to separate the A hemoglobin and the S hemoglobin in 20 minutes and to effect a precise quantitative analysis of the two constituents.

As regards the various haptoglobin groups, the great advantage of the method lies in the fact that the free hemoglobin is very clearly separated from the complexes of hemoglobin-haptoglobin. In this manner one obtains a very safe certainty in the detection of the groups Hp 0-0 and the groups in subjects 2-2 who have a low rate of haptoglobin.

For the variants of the transferrin, the determinations of the phenotypes CC, CD₁ and D₁D₂ have been studied so far. The variant D₁ is clearly separated from the transferrine C.

Each separated fraction may be characterized by two numerical data: its relative concentration and its relative mobility, which means that the described method is a very useful complementary procedure of the electrophoresis in starch gel.

Zusammenfassung. — Die Verfasser betonen die Vorteile des Agar-Agar-Gels bei der Trennung der Hämoglobine A und S und das Hervortreten des Polymorphismus der serischen Haptoglobine und Transferrine.

Mit dem angewendeten Mikroverfahren kann man in 20 Minuten das Hämoglobin A vom Hämoglobin S absondern und eine genaue quantitative Einteilung der beiden Bestandteile durchführen.

Was die verschiedenen Haptoglobingruppen betrifft, so liegt der grosse Vorteil der Methode in der Tatsache dass das freie Hämoglobin sehr deutlich von den Hämoglobin-Haptoglobin-Komplexen abgesondert wird. In dieser Weise bekommt man eine sehr grosse Sicherheit in der Aufdeckung der Gruppen Hp 0-0 und der Gruppen bei 2-2 Subjekten die einen niedrigen Haptoglobinsatz aufweisen.

Für die Varianten des Transferrins wurde bisher durch diese Methode die Bestimmung der Phenotypen CC, CD₁ und D₁D₂ studiert. Die Variante D₁ sondert sich sehr deutlich vom Transferrin C ab.

Jede abgesonderte Fraktion kann durch zwei numerische Angaben gekennzeichnet werden: seine relative Konzentration und seine relative Mobilität, wodurch die beschriebene Methode ein sehr nützliches Ergänzungsverfahren der Elektrophorese im Stärkegel darstellt.

BIBLIOGRAPHIE.

- Itano, H. A., 1953, Qualitative and quantitative control of adult hemoglobin synthesis. A multiple allele-hypothesis. *Am. J. Human Genet.*, **5**, 34.
- , 1957, Genetic and physical factors in the heterogeneity of haemoglobins. Abnormal Haemoglobins, 1-17, J. H. P. Jonxis and J. F. Delafresnaye. Ed. Oxford.
- Laurell, C. B., 1959, Determination of human haptoglobin group. *Scand. J. of Clin. Lab. Invest.*, **11**, 18.
- Poulik, M. D., 1957, Starch-gel electrophoresis in a discontinuous system of buffers. *Nature*, **185**, 1477.
- Smithies, O., 1955, Zone-electrophoresis in starch-gel: group variations in the serum proteins of normal human adults. *Biochem. J.*, **61**, 629.
- , 1959, An improved procedure for starch-gel electrophoresis: further variations in the serum proteins of normal individuals. *Biochem. J.*, **71**, 587.
- van Sande, M., Van Ros, G. et Druet, R., 1963, Determination of haptoglobin groups frequencies by starch-gel and agar-gel electrophoresis. Application to the Belgian and Barundi populations. *Nature*, **197**, 603-604.
- Wells, I. C. et Itano, H. A., 1951, Ratio of sickle-cell anemia hemoglobin to normal hemoglobin in sicklemics. *J. Biol.*, **188**, 65.
- Wieme, R. J., 1959, Studies on agar-gel electrophoresis. *Arschia Uitgaven*, Brussels.

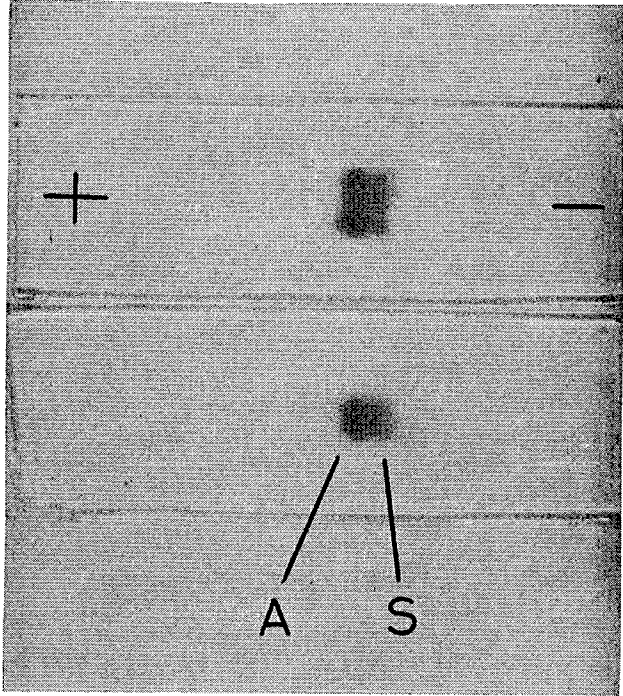


Figure 1.

Phérogramme en gel de gélose d'hémolysats de globules rouges de deux sujets sicklémiqes.

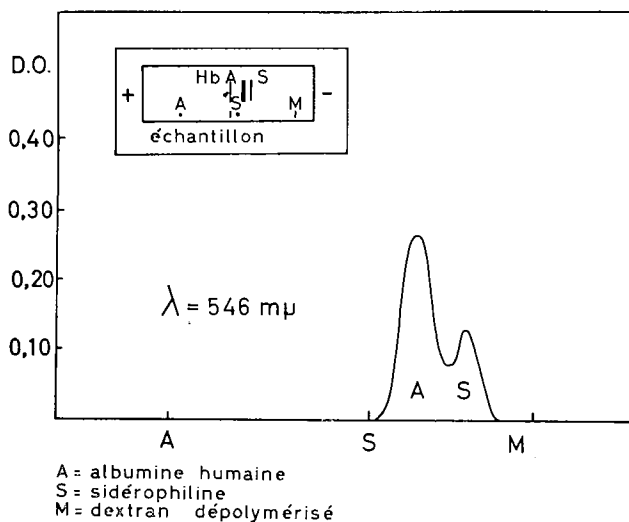


Figure 2.

Présentation schématique d'un phérogramme d'hémoglobine AS et de la courbe d'extinctions.

SOLUTION D'HEMOGLOBINE AS (11,12 g%)

Volumes soumis à l'électrophorèse	Pourcentages trouvés	
	A	S
1 μ l	65,1	34,9
2	67,5	32,5
3	63,7	36,3
4	62,2	37,8
5	63,4	36,6
6	68,1	31,9
7	69,5	30,5
8	68,5	31,5
9	63,5	36,5
Moyenne	65,9	34,1

Figure 3.

SOLUTION D'HEMOGLOBINE AS (5,56 g %)

Volumes soumis à l'électrophorèse	Pourcentages trouvés	
	A	S
1 μ l	—	—
2	—	—
3	68,5	31,5
4	63,4	36,6
5	68,7	31,3
6	67,2	32,8
7	66,0	34,0
8	69,4	30,6
Moyenne	67,2	32,8

Figure 4.

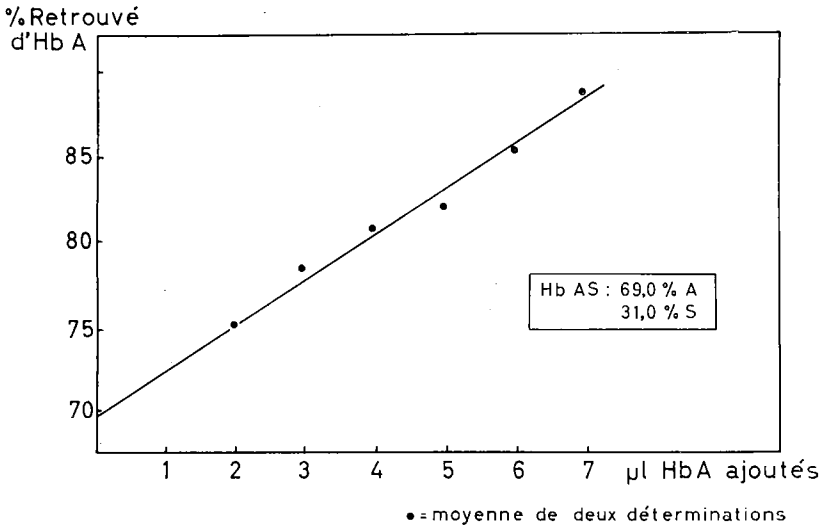


Figure 5.

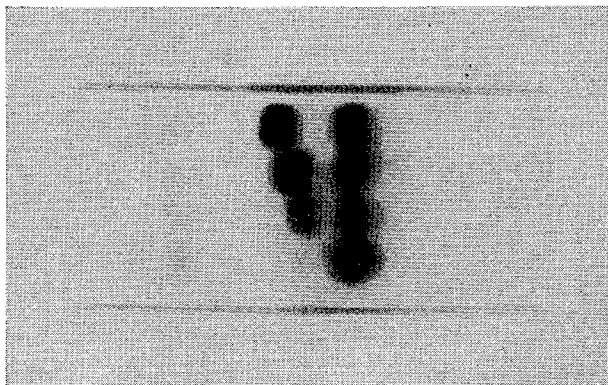


Figure 6.

Electrophorèse simultanée en gel de gélose de 4 sérums, appartenant aux groupes d'haptoglobine 1-1, 2-1, 2-2 et 0-0.

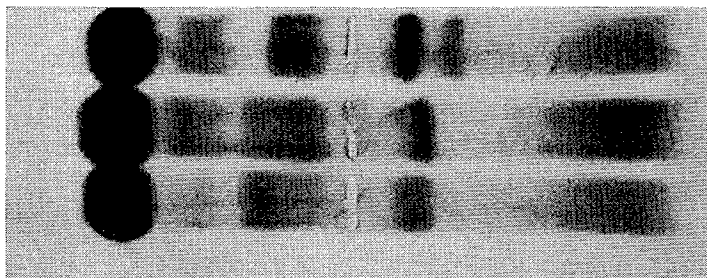


Figure 7.

Electrophorèse simultanée en gel de gélose de 3 sérums. En haut : groupe Tf CC, au milieu : groupe Tf D₁D₁, en bas : Tf CD₁.