

## Méthode de séparation et de purification des fractions de l'hémoglobine par électrophorèse en bloc d'amidon; application au dosage de l'hémoglobine A<sub>2</sub>

PAR

G. VAN ROS

---

*Résumé* — Une technique permettant de séparer rapidement les fractions normales et anormales de l'hémoglobine par électrophorèse en bloc d'amidon (« *starch-block electrophoresis* ») avec système discontinu de tampons est décrite. Elle permet de purifier et de doser les fractions anormales, telle l'hémoglobine S; elle met en évidence les hémoglobines foetale et A<sub>2</sub>; celle-ci peut être ainsi dosée séparément au photomètre.

La précision des dosages ainsi effectués se compare favorablement avec celle d'autres techniques utilisant l'électrophorèse en bloc d'amidon; des essais de reproductibilité des résultats de dosages de l'hémoglobine A<sub>2</sub> ont montré que la différence moyenne entre deux dosages effectués séparément sur le même échantillon représente 2,5 p. cent des grandeurs mesurées.

La moyenne des résultats des dosages de l'hémoglobine A<sub>2</sub> obtenus chez 72 sujets normaux, soit 2,55 p. cent de l'hémoglobine totale ( $\sigma = 0,26$  p. cent) est comparée aux données correspondantes obtenues par d'autres techniques.

Les taux anormaux d'hémoglobine A<sub>2</sub> et d'hémoglobine foetale (cette dernière estimée par alcalidénaturation) trouvés chez des thalassémiques et dans une série d'autres affections hématologiques sont rapportés. Outre la thalassémie mineure, des taux anormalement élevés d'hémoglobine A<sub>2</sub> ont été rencontrés dans des cas d'anémies mégaloblastiques; des taux bas furent par contre obtenus dans des anémies ferriprives. La variété des affections dans lesquelles des élévations modérées du taux d'hémoglobine alcalirésistante ont été constatées est par contre beaucoup plus grande; des conséquences sont tirées de ces constatations quant à la valeur respective des dosages de ces deux hémoglobines dans la détection des porteurs de la tare thalassémique et l'étude de la distribution de cette tare dans les populations humaines.

L'électrophorèse de l'hémoglobine en bloc de grains d'amidon (« *starch-bloc electrophoresis* ») proposée en 1954 par Kunkel et Wallenius permet de séparer les fractions normales ou anormales de l'hémoglobine humaine les unes des autres et, après élution, d'en obtenir des quantités importantes pour analyse ultérieure; de plus ce procédé purifie partiellement les fractions de l'hémoglobine

des autres protéines globulaires auxquelles elles sont mélangées dans les hémolysats; enfin il permet de déterminer de manière précise les proportions relatives des diverses fractions de l'hémoglobine d'un même sujet par dosage photométrique direct sur les éluants.

La précision qu'il est possible d'obtenir par ces dosages fait de l'électrophorèse en bloc d'amidon la méthode de choix de dosage des fractions peu abondantes (Petz et Economidou, 1965), bien que diverses autres méthodes plus simples aient été proposées qui, pour la séparation des fractions, font usage de procédés électrophorétiques ou chromatographiques variés : électrophorèse sur papier-filtre (Ibbotson et Compton, 1961), sur acétate de cellulose (Petrakis *et al.*, 1962), en gel de gélose (Yakulis *et al.*, 1960) ou d'amidon (Goldberg, 1958; Aksoy et Erdem, 1965), chromatographie sur diéthylaminoéthylcellulose (Huisman et Dozy, 1961) ou sur carboxyméthylcellulose (Müller et Pik, 1962); la plupart de ces méthodes font appel soit à la densitométrie directe de phérogrammes, soit au dosage d'un colorant fixé sur les fractions, soit au développement d'une réaction colorée, soit enfin au dosage direct de faibles quantités d'hémoglobine après élution; de ce fait elles sont souvent moins précises.

Parmi les diverses fractions de l'hémoglobine, la fraction  $A_2$  requiert des procédés de dosage particulièrement sensibles, son taux chez les sujets normaux ne dépassant généralement pas 3 p. cent de l'hémoglobine totale. Or ce taux est augmenté chez la majorité des porteurs de la tare  $\beta$ -thalassémique, dans certains cas jusqu'à plus du double de la valeur normale. Bien que cette augmentation ne soit pas absolument spécifique, elle confère pourtant un grand intérêt au dosage de l'Hb  $A_2$  dans les cas suspects. Or les taux les plus élevés trouvés chez les sujets normaux par divers auteurs sont proches des taux les plus faibles trouvés chez certains porteurs de la tare thalassémique avec Hb  $A_2$  augmentée; le dosage de l'hémoglobine  $A_2$  par une méthode précise faisant usage de l'électrophorèse en bloc d'amidon est donc indiqué.

Ces méthodes sont toutefois généralement considérées comme d'exécution difficile : Weatherall (1965) les qualifie de « *rather tedious* » et dans une étude qu'ils leur ont consacré, Petz et Economidou (1965) estiment que la plupart d'entre elles comprennent des manipulations difficiles ou sans nécessité réelle. De plus elles ne séparent en général pas complètement l'hémoglobine s de l'hémoglobine  $A_2$  (Koneman *et al.*, 1963; Weatherall, 1965) et ne permettent donc pas de doser l'Hb  $A_2$  dans des cas où cette donnée serait particulièrement utile (suspicion de microdrépanocytose).

Nous décrivons ici un procédé précis et relativement simple, mis au point avec un appareillage spécialement destiné à cet usage (\*); il donne des séparations complètes des hémoglobines  $A_1$ ,  $S$  et  $A_2$ , les fractions principales se condensant en des zones peu étendues du fait de la discontinuité du système de tampons utilisé (figure 2). Cette discontinuité consiste dans le fait que la concentration du tampon qui durant l'expérience pénètre progressivement dans le bloc d'amidon en provenance des réservoirs de l'appareil est plus forte que celle du tampon, par ailleurs de composition identique, qui sert à la préparation du bloc. Il se produit de ce fait au cours de l'électrophorèse un gradient de concentration décroissante des extrémités vers le centre du bloc, qui favorise la condensation des fractions.

## Technique

### 1° Matériel

Chambre d'électrophorèse en plexiglass (figure 1) comprenant cinq compartiments; un grand compartiment central rectangulaire ( $28 \times 24 \times 10$  cm) dont les parois latérales sont destinées à servir de support à la plaque de verre portant le bloc; deux compartiments ( $4 \times 24 \times 10$  cm) adjacents au précédent, servant de réservoirs de tampon et où plongent en cours d'expérience les ponts de papier-filtre reliant le tampon au bloc; enfin deux compartiments externes ( $3 \times 24 \times 10$  cm) contenant les électrodes; celles-ci consistent en deux fils de platine de 20 cm de long immergés dans le tampon; ces compartiments communiquent avec les précédents par une chicane. Les trois compartiments centraux forment une chambre humide grâce à un couvercle dont la forme en V évite la chute des gouttes d'eau de condensation sur le bloc.

L'appareil peut recevoir deux blocs de  $29 \times 10$  cm, ce qui permet d'effectuer simultanément deux analyses.

La source de courant est un redresseur fournissant un courant continu stabilisé (tension maximum 600 v; ampérage maximum 100 mA).

### 2° Préparation des hémolysats

Prélever le sang sur anticoagulant; transformer l'hémoglobine en carboxyhémoglobine par barbotage d'oxyde de carbone (cette transformation, bien que souhaitable, peut être omise si l'on ne dispose pas de source de CO). Hémolyser suivant Singer et ses collaborateurs (1951): additionner à 3 volumes du culot de centrifugation de globules rouges frais lavés, 2 volumes d'eau distillée; ajouter 1 volume de toluène; agiter violemment deux minutes; laisser reposer une nuit à 4°C. Centrifuger ensuite à 2.000 tours par minute, pendant quelques minutes et prélever à l'aide d'une pipette Pasteur la solution d'hémoglobine sous-jacente au surnageant, constitué de toluol et de protéines précipitées; la solution obtenue doit être parfaitement claire et dépourvue de débris globulaires, car ceux-ci occasionnent des traînées dans les blocs (recentrifuger éventuellement à grande vitesse, par exemple 20.000 g, dans le froid). Ajuster la concentration de l'hémoglobine aux environs de 10 g p. cent. Avant l'emploi 500 mg de la poudre d'amidon

---

(\*) Réalisé par Pleuger, s. a., Wijnegem, Belgique.

de maïs servant à préparer les blocs sont mis en suspension dans 0,7 ml de cet hémolysat dans un tube à hémolyse. C'est cette suspension qui, après agitation soigneuse, sera coulée dans la fente du bloc; environ 70 mg d'Hb sont ainsi soumis à l'analyse.

### 3° Préparation des blocs d'amidon

On prépare le tampon suivant, préconisé antérieurement par Huehns et Shooter (1965) pour l'électrophorèse en gel d'amidon des hémoglobines :

Tris (hydroxyméthyl)-aminométhane (« Sigma 121 ») : 109 g  
Tétraacétate disodique d'éthylènediamine (EDTA disodique) : 5,84 g  
Acide borique : 30,9 g

pour 1 litre d'eau distillée.  
pH 8,6.

Pour la préparation des blocs, cette solution tampon est diluée à 1/9<sup>e</sup> au moyen d'eau distillée; à 90 ml de la dilution on ajoute progressivement dans un ballon de 500 ml, 100 g de la poudre d'amidon de maïs (British Drug Houses, Poole, Angleterre); on prépare par ailleurs un moule rectangulaire de papier-filtre de 85 mm de hauteur, dont le fond est constitué d'une plaque de verre mince de 290 × 100 mm; le papier utilisé doit posséder de bonnes qualités absorbantes (par exemple papier Whatman n° 3 sous double épaisseur); le moule est maintenu en forme au moyen d'agrafes.

On agite soigneusement le mélange de tampon dilué et de poudre d'amidon et on le verse dans le moule placé sur une surface bien horizontale; la viscosité du liquide augmente progressivement par absorption du tampon dans les parois du moule. Il se forme en une vingtaine de minutes un bloc quasi-solide. Le moule de papier-filtre est enlevé dès que toute trace d'humidité a disparu de la surface du bloc; ce dernier, toujours muni de la plaque de verre qui lui sert de support, est alors prêt à l'usage.

### 4° Méthode

A 9 cm d'une extrémité du bloc, on pratique à égale distance de ses bords une fente bien régulière de 35 mm de long et de 2 mm de large au moyen d'une lame de verre enfoncée perpendiculairement à la surface. Le fond de la fente est débarrassé des grumeaux qui y adhèrent au moyen d'une tige de verre mince. On remplit ensuite celle-ci du mélange hémolysat-poudre d'amidon bien homogénéisé par agitation, à l'aide d'une pipette Pasteur d'assez gros diamètre. Il est aisé d'obtenir ainsi aux deux faces du bloc des zones colorées bien rectangulaires, indices d'un remplissage régulier de la fente; la quasi-totalité du volume du mélange de 0,7 ml d'hémolysat et de 500 mg de poudre d'amidon est ainsi utilisé.

Les quatre chambres latérales de l'appareil d'électrophorèse sont remplies du même tampon que celui utilisé pour la préparation du bloc, mais dilué cette fois au tiers au moyen d'eau distillée et non plus à 1/9<sup>e</sup>.

Les connexions entre le bloc et le tampon sont assurées par des ponts épais de papier-filtre imprégnés du tampon dilué au tiers et reposant à la surface des extrémités du bloc sur une longueur de 35 mm. Il n'est pas nécessaire de recouvrir les blocs pour réduire l'évaporation. L'électrophorèse a lieu au réfrigérateur à 4 °C, sous une tension de départ de 400 volts, fournissant 16 milliampères par bloc. Elle dure environ quatre heures et est interrompue lorsqu'une séparation bien nette des fractions est obtenue: en l'absence d'hémoglobine anormale on se base sur la distance séparant Hb A<sub>1</sub> de Hb A<sub>2</sub>, toujours bien visible; cette distance est d'au moins 12 mm.

Le bloc est ensuite découpé et chaque fraction est éluée sur un filtre en verre fritté (porosité G4: 3 à 15 microns) au moyen d'eau distillée; 15 à 18 ml d'éluant sont utilisés pour les fractions principales (Hb A<sub>1</sub>, s, etc.), 5 à 7 ml pour les frac-

tions mineures. L'éluion est complète dans ces conditions, ainsi que l'ont montré des contrôles effectués sur l'amidon restant sur les filtres. On note soigneusement les volumes des éluants et on dilue ceux-ci de manière à obtenir des densités optiques voisines pour les divers filtrats et quantitativement satisfaisantes du point de vue de la précision photométrique (par exemple pour les sujets normaux dilution à 1/10<sup>e</sup> du filtrat de l'Hb A<sub>1</sub>, pas de dilution pour l'Hb A<sub>2</sub>; chez les sicklémiqes, dilution à 1/7<sup>e</sup> de l'Hb A<sub>1</sub>, à 1/5<sup>e</sup> de l'Hb s, etc.).

Les éluants dilués sont ensuite filtrés sur papier-filtre serré (Whatman n° 42) et les densités optiques sont mesurées au photomètre à 535 millimicrons sous une profondeur de couche de 10 mm, l'eau distillée servant de référence.

Le pourcentage de chaque fraction par rapport au total de l'hémoglobine est calculé en multipliant les densités optiques par les volumes d'éluants et par les dilutions de ceux-ci (Miale, 1962; Aksoy et Erdem, 1965); les résultats obtenus pour les diverses fractions sont additionnés et la valeur de chaque fraction multipliée par 100 est divisée par le total pour obtenir le pourcentage de chacune d'elles.

*Exemple de calcul :*

Hb A<sub>1</sub> : volume : 18,0 ml; dilution 1/10; D.O. : 0,156

Hb A<sub>2</sub> : volume : 6,3 ml; dilution : aucune(1/1); D.O. : 0,135.

$$\text{Hb A}_2 = \frac{6,3 \times 1 \times 0,135}{(18,0 \times 10 \times 0,156) + (6,3 \times 1 \times 0,135)} \times 100 =$$

$$\frac{8,505}{36,585} \times 100 = 2,32 \%$$

## Résultats

### 1° Purification des fractions

Les éluants des hémoglobines A<sub>1</sub>, s et A<sub>2</sub> provenant d'un sujet sicklémiqie et séparées par électrophorèse sur bloc ont été concentrées par dialyse sous pression et leur pureté a été vérifiée par électrophorèse (figure 2). On constate que l'hémoglobine A<sub>1</sub> purifiée ne contient pas d'Hb s, que l'éluat d'Hb s ne contient pas d'hémoglobine A<sub>1</sub> ou A<sub>2</sub> et qu'enfin l'éluant de l'Hb A<sub>2</sub> ne contient pas d'autre hémoglobine; par contre ce dernier contient une des fractions protéiques globulaires dépourvues d'hème (« non-haem protein ») constatée sur tout phérogramme d'hémoglobine. Les fractions conservent leur mobilité électrophorétique initiale, indice d'absence de dénaturation et sont disponibles pour étude ultérieure.

### 2° Reproductibilité des résultats quantitatifs

Une série de dosages d'hémoglobine A<sub>2</sub> ont été répétés sur les mêmes hémolysats; les résultats de ces analyses en double sont rapportés dans le tableau 1.

TABLEAU 1

Reproductibilité des résultats  
 Doubles dosages d'Hb A<sub>2</sub> effectués séparément sur les mêmes échantillons

	Résultat; Pourcentage	Différences Pourcentage
1	1,83-1,86	0,03
2	2,00-2,12	0,12
3	2,57-2,70	0,13
4	2,59-2,59	0
5	3,26-3,40	0,14
6	3,74-3,84	0,10
7	3,88-3,93	0,05
8	4,43-4,53	0,10
9	4,53-4,58	0,05
10	5,06-5,20	0,14
Moyennes	<b>3,39-3,47</b>	<b>0,08</b>

La moyenne des différences observées, soit 0,08 p. cent, représente 2,5 p. cent environ des grandeurs mesurées.

3° Taux d'hémoglobine A<sub>2</sub> obtenus chez les sujets normaux

Soixante-douze sujets ne présentant aucune anomalie aux examens hématologiques et chimiques de routine ont été étudiés afin d'établir une valeur normale moyenne et des limites de normalité pour l'Hb A<sub>2</sub> par la méthode ici décrite; la distribution de toutes les valeurs correspond à une courbe de Gauss.

Les résultats suivants ont été obtenus :

Taux moyen d'Hb A<sub>2</sub> : 2,55 p. cent.

$$\text{Ecart-type : } \sigma = \sqrt{\frac{\Sigma(x - \bar{x})^2}{N - 1}} = 0,26 \text{ p. cent.}$$

Limites de la normalité ( $M \pm 2 \sigma$ ) : 2,03 et 3,07 p. cent.

Taux extrêmes trouvés : 1,92 et 3,11 p. cent.

#### 4° Résultats dans des cas pathologiques

L'hémoglobine  $A_2$  a été dosée dans une série de cas pathologiques; simultanément nous avons déterminé le taux d'hémoglobine foetale sur les hémolysats de ces mêmes sujets par la méthode de Betke et collaborateurs (1959); cette méthode est basée sur les propriétés de résistance de l'hémoglobine F à la dénaturation par les alcalis; chez 21 adultes normaux elle nous a donné un taux moyen de 0,56 p. cent d'Hb F; les taux extrêmes trouvés furent respectivement de 0,40 et 0,78 p. cent.

Les résultats sont mentionnés dans le tableau 2.

### Discussion

#### 1° Particularités de la méthode proposée

Les méthodes de dosage de l'Hb  $A_2$  par « *starch-block electrophoresis* » ont la réputation d'être de réalisation assez longue et difficile; celle que nous proposons est au contraire rapide, relativement simple et adaptable en routine hématologique. Sa précision atteint pourtant au moins celle des techniques antérieures : l'écart-type des résultats obtenus chez 72 sujets normaux est de 0,26 p. cent, alors qu'il est respectivement de 0,29, 0,35 et 0,40 p. cent pour des séries étudiées avec d'autres techniques (voir tableau 3). De plus les essais de reproductibilité ont montré une variabilité de 0,08 p. cent en moyenne, donc de l'ordre de 2,5 p. cent par rapport aux grandeurs mesurées (tableau 1).

La technique donne de bonnes séparations de l'hémoglobine s vis-à-vis de l'hémoglobine normale  $A_1$  (figure 2), ce qui permet de doser l'Hb s de manière précise; de tels dosages permettent notamment l'étude du mécanisme déterminant héréditairement le taux de l'Hb s dans des familles où celle-ci est transmise ou bien encore celle de l'influence des anémies ferriprives sur le taux de l'hémoglobine s chez les sicklémiqes (Levere *et al.*, 1964).

L'hémoglobine  $A_2$  est par ailleurs bien séparée de l'hémoglobine s (figures 2 et 3), ce qui permet une détermination précise de l'Hb  $A_2$  chez les patients suspects de thalassodrépanocytose. Les vérifications ont d'ailleurs montré que les éluants des fractions  $A_1$ , s et  $A_2$  sont effectivement purs des fractions hémoglobiniqes voisines (figure 4).

Enfin, cette technique met en évidence l'hémoglobine foetale, toujours présente, au moins à l'état de trace dans les hémolysats, mais qui reste ordinairement mélangée à l'hémoglobine  $A_1$ . Elle est visible par transparence sur tous les phérogrammes en bloc d'amidon

TABLEAU 2

Taux d'Hb  $A_2$  et d'Hb  $F$  observés dans diverses affections hématologiques

		Taux d'Hb $A_2$ Pourcentage	Taux d'Hb $F$ (*) Pourcentage	Remarques
<i>Thalassémie mineure</i>	1	3,40	1,3	Congolais
	2	3,59	1,5	Congolais
	3	4,25	2,5	Grec
	4	4,80	1,1	Turc
	5	5,10	1,2	Congolaise
	6	5,68	2,9	Grecque
	7	6,12	2,2	Grec
	8	7,04	0,9	Turc
	Moyenne	4,99		
<i>Thalassémie majeure</i>	1	2,52	21,8	Enfant grec, âgé de 7 mois, 26 jours après transfusion
	2	2,65	44,4	Italien 18 ans, 8 jours après transfusion
<i>Thalassodrépanocytose</i>	1	3,05	17,9	Congolais, âgé de 1 an
	2	3,51	2,0	Murundi, 12 ans
	3	4,40	5,9	Congolais, 17 ans
	4	4,67	0,7	Congolais adulte
<i>Sphérocytose héréditaire</i>		3,10	1,7	
<i>Anémie hypochrome ferri- prive</i>		1,23	0,6	
		1,71	0,5	
<i>Anémie aplastique</i>		2,19	4,7	
<i>Anémies mégaloblastiques</i>	1a	3,93	2,4	Avant traitement
	b	3,30	1,9	29 <sup>e</sup> jour de traitement
	c	2,73	1,6	41 <sup>e</sup> jour de traitement
	2	4,53	1,6	
	3	5,06	1,2	
<i>Saturnisme chronique</i>	1	1,98	0,7	
	2	2,28	2,9	
	3	2,36	0,5	
	4	2,45	0,9	
	5	2,62	0,6	
<i>Leucoses</i>				
	Aiguë	2,55	2,1	
	Lymphoïde chronique	1	2,12	1,2
		2	2,46	1,3

(\*) Méthode de Betke *et al.* (1959). Valeurs normales chez l'adulte, inférieures à 0,8 p. cent.

de l'hémoglobine des adultes normaux sous forme d'une zone rectangulaire située en arrière de la fraction  $A_1$ ; chez les sujets dont le taux d'alcalirésistance est augmenté elle apparaît nettement comme une fraction séparée (figures 1 et 5); l'importance quantitative de cette fraction est proportionnelle au taux d'alcalirésistance.

### 2° Taux normaux d'hémoglobine $A_2$

Les résultats obtenus par divers auteurs chez des sujets normaux par électrophorèse en bloc d'amidon sont comparés dans la table 3 à ceux obtenus par la présente méthode; la valeur moyenne pour l'Hb  $A_2$  donnée par cette dernière est analogue à celles mentionnées dans d'autres travaux; la dispersion des résultats est toutefois plus faible.

TABLEAU 3  
Taux de l'hémoglobine  $A_2$  chez les sujets normaux,  
déterminés après isolement sur bloc d'amidon et élution

Auteurs	Nombre de sujets	Moyennes (% Hb $A_2$ )	Ecart-type ( $\sigma$ )	Moyennes $\pm 2\sigma$
Kunkel <i>et al.</i> , 1957	12	2,40	—	—
Betke <i>et al.</i> , 1959	40	2,52	—	—
Hilgartner <i>et al.</i> , 1961	22	2,60	0,40	1,80-3,40
McCoo et Leikin, 1961	20	2,49	0,29	1,91-3,07
Marti, 1963	757	2,20	0,35	1,50-2,90
Données personnelles	72	2,55	0,26	2,03-3,07

### 3° Taux pathologiques d'hémoglobine $A_2$

A —  $\beta$ -thalassémie et autres affections hématologiques avec hémoglobine  $A_2$  élevée :

En 1955, Kunkel et Wallenius établirent par « *starch-block electrophoresis* » que la présence d'une tare thalassémique à l'état hétérozygote s'accompagne généralement d'un taux relatif d'hémoglobine  $A_2$  anormalement élevé. Kunkel et ses collaborateurs rapportèrent en 1957 que le taux d'Hb  $A_2$  de 32 des 34 patients atteints de thalassémie mineure étudiés dépassait 3,5 p. cent de l'hémoglobine totale; ces constatations ont été suivies de nombreuses autres analogues; le tableau 4 compare les taux moyens et extrêmes obtenus dans la thalassémie mineure par divers auteurs utilisant des méthodes d'électrophorèse en bloc d'amidon :

TABLEAU 4

Taux de l'hémoglobine  $A_2$  dans la thalassémie mineure, déterminés après isolement sur bloc d'amidon et élution

Auteurs	Nombre de sujets	Hémoglobine $A_2$ (%)	
		Moyennes	Extrêmes
Kunkel <i>et al.</i> , 1957	34	5,1	2,4 9,5
Silvestroni <i>et al.</i> , 1957	182	4,2	2,0 5,8
Marti, 1963	200	5,0	3,2 7,9
Weatherall, 1964	54	5,1	4,4 6,9
Données personnelles	8	5,0	3,4 7,0

Cette comparaison montre que les huit cas auxquels la présente méthode a été appliquée (mentionnés dans le tableau 2) ont fourni des valeurs moyennes et extrêmes analogues à celles obtenues par d'autres auteurs.

Toutefois, comme le montre également le tableau 2, des taux pathologiques ont également été trouvés par nous dans 3 *anémies mégalo-blastiques* (respectivement 3,93, 4,53 et 5,06 p. cent d'Hb  $A_2$ ; la découverte d'un taux élevé d'hémoglobine  $A_2$  n'est donc pas à elle seule la preuve formelle de la présence d'un trait thalassémique chez le porteur.

L'examen de la littérature indique pourtant que les élévations non thalassémiques du taux d'Hb  $A_2$  ne sont pas fréquentes; elles ont été rapportées dans des cas d'anémies mégalo-blastiques (Josephson *et al.*, 1958), d'intoxication saturnine (Albahary *et al.*, 1965) et dans l'hémoglobinosé Zürich (Hitzig *et al.*, 1960).

Dans les anémies mégalo-blastiques les élévations de l'Hb  $A_2$  sont inconstantes; le taux baisse avec le traitement (Josephson *et al.*, 1958), ainsi que nous avons également pu le constater (tableau 2).

Dans l'*intoxication saturnine chronique*, la possibilité d'une élévation acquise du taux d'Hb  $A_2$  demande confirmation; elle doit en tout cas être peu fréquente : Albahary *et al.* (1965) rapportent l'avoir constatée chez 5 des 36 patients étudiés (taux dépassant 4 p. cent) et cette modification n'est pas mentionnée par d'autres auteurs; les 5 cas étudiés par nous (tableau 2) ont fourni des taux normaux ou bas.

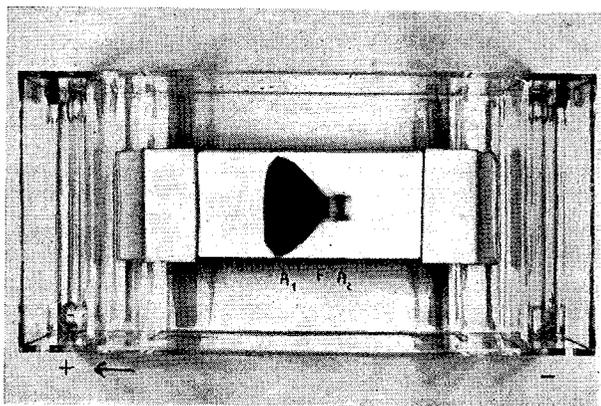


Figure 1

Electrophorèse en bloc d'amidon des hémoglobines d'un adulte atteint d'anémie mégalo-blastique.  
 Les fractions sont photographiées sans coloration.  
 L'hémoglobine  $\Lambda_2$  est augmentée : 4,53 p. cent de l'hémoglobine totale.  
 L'hémoglobine F est visible (1,6 p. cent, mesurée par alcalidénaturation suivant Betke *et al.*, 1959).

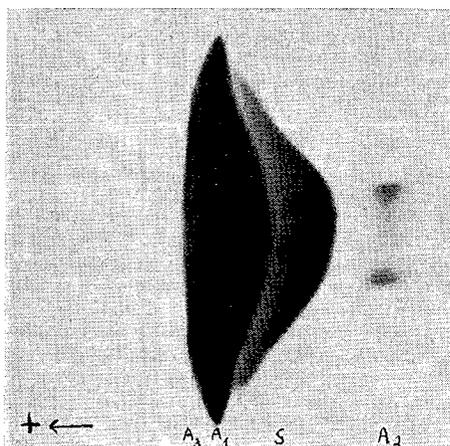


Figure 2

Electrophorèse en bloc d'amidon des hémoglobines d'un sujet porteur du « sickle-cell trait » : séparation des hémoglobines  $\Lambda_1$ , S et  $\Lambda_2$ .  
 Fractions photographiées sans coloration.  
 Le dosage photométrique sur les éluats a donné les résultats suivants :  $\Lambda_1$  : 68,6 p. cent; S : 28,6 p. cent;  $\Lambda_2$  : 2,8 p. cent.

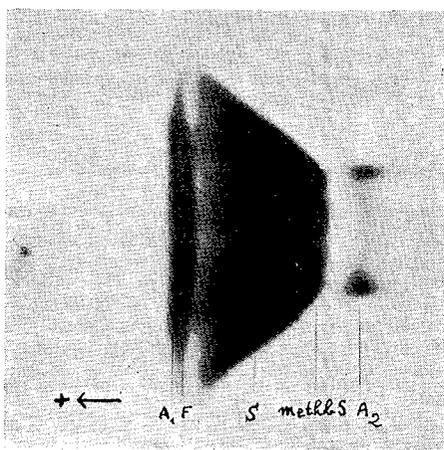


Figure 3

Electrophorèse en bloc d'amidon des hémoglobines d'un enfant sicklanémique transfusé.  
 Fractions photographiées sans coloration.

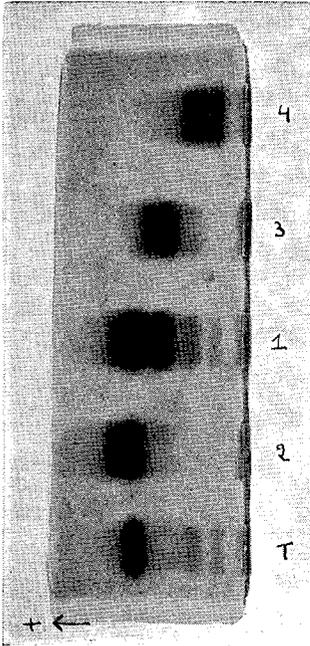


Figure 4

Phérogrammes en gel d'amidon des éluants des fractions d'hémoglobine d'un sujet porteur du « *sickle-cell trait* », isolées et partiellement purifiées par électrophorèse en bloc d'amidon, puis concentrées par dialyse sous pression contre une solution saline.

Les fractions sont colorées au noir amide.

1. Hémolysat non purifié : de gauche à droite : hémoglobines  $A_2$ ,  $A_1$ , S, F,  $A_2$  et « *non-haem protein* ».
2. Eluant concentré des hémoglobines  $A_2$  et  $A_1$  du même sujet; pas d'hémoglobines S et  $A_2$ .
3. Eluant concentré des hémoglobines F et S; pas d'hémoglobines  $A_1$  et  $A_2$ .
4. Eluant concentré de l'hémoglobine  $A_2$ , contenant également la « *non-haem protein* »; pas d'autres hémoglobines.
- T. Hémolysat témoin d'un sujet normal.

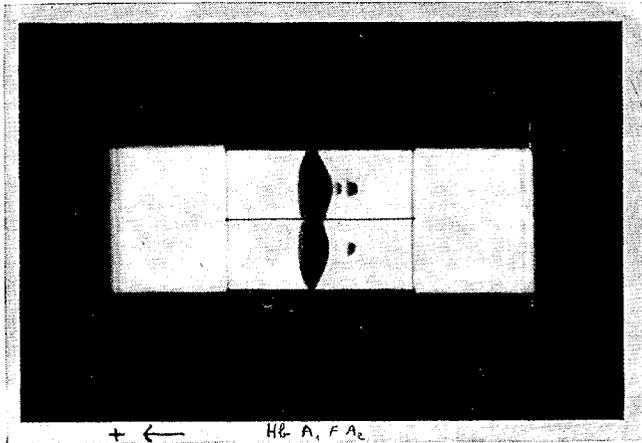


Figure 5

Electrophorèses en bloc d'amidon des hémoglobines de deux sujets effectuées simultanément.

En bas : sujet normal : les hémoglobines  $A_1$  et  $A_2$  sont visibles; l'hémoglobine foetale (0,6 p. cent quand mesurée par alcalidénaturation) ne se voit que sur le bloc examiné par transparence.

En haut :  $\beta$ -thalassémie hétérozygote; sujet de nationalité grecque.

L'hémoglobine  $A_2$  est augmentée (6,12 p. cent);

L'hémoglobine foetale est visible (2,2 p. cent par alcalidénaturation).

L'hémoglobinosse *Zürich* enfin est une affection rare se caractérisant par des crises hémolytiques lors de l'ingestion de certains médicaments (sulfamidés); l'augmentation relative de l'hémoglobine  $A_2$  pourrait y résulter de la précipitation intraglobulaire de l'hémoglobine anormale instable qui constitue environ 25 p. cent de l'hémoglobine totale.

L'élévation de l'hémoglobine  $A_2$  caractéristique de la  $\beta$ -thalassémie hétérozygote se retrouve également dans les combinaisons de cette dernière avec les hémoglobinoses hétérozygotes et par conséquent dans la *thalassodrépanocytose* (microdérépanocytose); le tableau 2 reproduit les résultats obtenus par nous dans quatre cas, dont un a été décrit antérieurement en détail (Van Ros *et al.*, 1965). Les taux d'Hb  $A_2$  vont de 3,05 avec hémoglobine F abondante (17,9 p. cent) chez un enfant congolais âgé de un an à 4,67 p. cent avec taux d'Hb F normal chez un adulte. Ces résultats cadrent avec l'hypothèse avancée par Huisman (1963) d'une relation inverse assez étroite entre les taux des hémoglobines  $A_2$  et F dans la thalassodrépanocytose.

Le tableau 2 mentionne également les taux d'Hb  $A_2$  trouvés dans deux cas de *thalassémie majeure*; il s'agissait d'un enfant grec âgé de sept mois étudié 26 jours après transfusion et d'un enfant italien de huit ans étudié 8 jours après transfusion; tous deux résidaient en Belgique. Dans les deux cas des taux normaux ont été trouvés, ce qui correspond aux données de la littérature : dans une revue de 96 cas (Weatherall, 1965) les valeurs mentionnées s'échelonnent de 0,5 à 13,0 p. cent, avec les moyennes suivantes obtenues dans six séries différentes de cas : 1,5, 2,2, 2,3, 2,5, 3,1 et 4,2 p. cent; les taux sont donc normaux ou bas dans la plupart des cas; toutefois les auteurs s'accordent pour reconnaître que la nécessité de fréquentes transfusions chez les enfants atteints d'anémie de Cooley rend souvent difficile l'interprétation des données obtenues. Les parents de ces enfants thalassémiques à taux bas ou normal présentent fréquemment une Hb  $A_2$  élevée; ce fut le cas chez l'enfant grec mentionné plus haut : il présentait 26 jours après la dernière transfusion un taux de 2,52 p. cent d'Hb  $A_2$ , alors que chez les parents des taux s'élevant respectivement à 4,25 et 5,68 p. cent furent trouvés. Dans l'anémie de Cooley le taux d'Hb  $A_2$  semble sans rapport avec la sévérité de l'anémie et d'après Fessas (1959) il n'y aurait dans cette affection pas de relation étroite entre les pourcentages des hémoglobines  $A_2$  et F.

#### B — Confrontation des taux d'hémoglobine $A_2$ et d'hémoglobine F :

Sept des huit cas de thalassémie mineure mentionnés dans le tableau 2 présentaient outre un taux anormal d'Hb  $A_2$  une augmen-

tation modérée de l'hémoglobine F mesurée par alcalidénaturation (1,1 à 2,9 p. cent d'Hb F, méthode de Betke, Marti et Schlicht, 1959, particulièrement adaptée à la mesure exacte des augmentations légères d'Hb F; taux pathologique : plus de 0,8 p. cent d'Hb F).

Le même tableau 2 montre toutefois que nous avons constaté des augmentations modérées du même ordre dans des affections hémato-logiques acquises et dans des affections congénitales en dehors des hémoglobinoses.

L'augmentation modérée de l'hémoglobine F fréquemment constatée dans la forme  $\beta$  hétérozygote de la thalassémie n'a donc pas la même valeur pathognomonique que le taux élevé d'Hb A<sub>2</sub>.

Ceci est confirmé par la littérature qui rapporte des augmentations modérées de l'Hb F dans certains cas des états ou affections suivants, en dehors des hémoglobinoses et de la thalassémie :

- des anémies mégalo-blastiques (Beaven *et al.*, 1960);
- des anémies aplastiques (anémies aplastiques à sidéroblastes, Jones, 1961; syndrome de Fanconi, Sheperd *et al.*, 1962);
- des anémies ferriprives, notamment par ankylostomose (Flatz *et al.*, 1965);
- de nombreux cas d'intoxication saturnine chronique (Dulong et Rosnay, 1957);
- la sphérocytose héréditaire (White et Beaven, 1959);
- l'hémoglobinurie nocturne paroxystique (syndrome de Marchiafava-Micheli, Weatherall, 1965);
- des myéloscléroses (Beaven *et al.*, 1960);
- des leucoses aiguës et des érythroleucoses (Beaven *et al.*, 1960).

Mentionnons également la grossesse (Rucknagel et Neel, 1961) et les élévations familiales légères et asymptomatiques de l'hémoglobine foetale décrites par Kleihauer et Betke (1961) et par Marti (1961) dans la race blanche et par Horton et ses collaborateurs (1965) chez des Noirs. Peut-être n'y a-t-il pas lieu d'inclure dans cette liste la « persistance héréditaire de l'hémoglobine foetale » (« *high F gene* »), car les taux d'hémoglobine F y sont plus élevés : 15 à 35 p. cent dans la forme africaine de cet état asymptomatique (Conley *et al.*, 1963), 18 à 29 p. cent dans la variété décrite en Grèce (Fessas et Stommatoyannopoulos, 1964).

Comme l'indique le tableau 2, nous avons trouvé également des élévations modérées de l'hémoglobine foetale dans certaines des affections citées ci-dessus à partir de la littérature; il s'agit de cas d'anémies mégalo-blastiques, d'anémie aplastique, de saturnisme chronique, de sphérocytose héréditaire et de leucose aiguë. Nous pouvons y ajouter des affections dont nous n'avons pas trouvé men-

tion ailleurs : une agranulocytose (1,09 p. cent d'Hb F), une érythrémie (1,05 p. cent), deux anémies hémolytiques congénitales non sphérocytaires du type I de Selwyn et Dacie (1,73 p. cent chez un enfant de six ans, 1,05 p. cent chez un adulte), deux leucoses lymphoïdes chroniques (1,2 et 1,3 p. cent d'Hb F chez deux femmes adultes) et un cas de maladie de Hodgkin (1,09 p. cent).

Bref l'augmentation généralement modérée de l'hémoglobine foetale souvent constatée dans la thalassémie mineure ne présente de loin pas la même spécificité que celle que nous avons reconnue au taux élevé d'Hb A<sub>2</sub> qu'on y trouve fréquemment.

Par ailleurs, on constate dans de nombreux cas d'anémie hypochrome ferriprive une baisse du taux relatif de l'Hb A<sub>2</sub> au-dessous de la limite inférieure de la normalité. Cette constatation fut faite dès 1958 par Josephson et ses collaborateurs; nous l'avons faite également dans deux cas, cités dans le tableau 2 (respectivement 1,23 et 1,71 p. cent d'Hb A<sub>2</sub>). D'après Shepherd et ses collaborateurs (1962) il en serait de même dans certaines anémies aplastiques.

Chez les thalassémiques ce facteur peut jouer pour ramener à la normale un taux d'hémoglobine A<sub>2</sub> élevé; c'est ce qui a été constaté récemment (Flatz *et al.*, 1965) chez des thalassémiques atteints d'ankylostomose avec déplétion des réserves de fer, dont le taux d'Hb A<sub>2</sub>, situé temporairement dans la zone normale, est redevenu élevé après un traitement efficace.

Ce phénomène contribue dans une certaine mesure à limiter la valeur diagnostique du dosage de l'hémoglobine A<sub>2</sub> dans la thalassémie : les insuffisances en fer sont en effet fréquentes dans les régions où prévaut cette dernière; de plus les anémies microcytaires hypochromes ferriprives présentent de nombreuses analogies hémato-logiques avec la thalassémie mineure, y compris une augmentation éventuelle modérée de l'hémoglobine foetale.

Bref si les cas d'augmentation de l'Hb A<sub>2</sub> sont rares en dehors de la  $\beta$ -thalassémie hétérozygote (il s'agit surtout d'anémies mégalo-blastiques), la thalassémie hétérozygote avec hémoglobine A<sub>2</sub> normale ou basse est rencontrée fréquemment : il s'agit alors soit de  $\beta$ -thalassémie avec Hb A<sub>2</sub> « normalisée » sous l'influence d'une déplétion des réserves de fer, soit de  $\beta$ -thalassémie avec Hb A<sub>2</sub> habituellement normale (dans ces cas le taux d'hémoglobine F peut être élevé : « high F- $\beta$ -thalassaemia »), soit enfin d' $\alpha$ -thalassémie hétérozygote. Dans ce dernier cas toutefois on peut éventuellement constater la présence d'hémoglobines supplémentaires caractéristiques, les hémoglobines Bart's ou H, qui sont également mises en évidence par la technique d'électrophorèse en bloc d'amidon que nous proposons ici; de plus on y constate également un taux normal d'hémoglobine F.

De l'ensemble des constatations précédentes on peut conclure que le dosage précis de l'hémoglobine  $A_2$  utilisé comme *screening test* à l'aide d'une méthode relativement facile comme celle que nous avons décrite permettra de détecter efficacement les cas de  $\beta$ -thalassémie et d'établir avec suffisamment de précision la distribution de cette tare dans les populations humaines; ceci correspondrait au souhait formulé par Chernoff (1959) dans une revue de la question de la distribution des gènes thalassémiques. Ce procédé serait bien plus spécifique que la recherche des porteurs d'un taux anormal d'hémoglobine foetale par une technique d'alcalidénaturation.

L'efficacité de cette recherche systématique ne serait pourtant pas absolue, du fait de l'existence de cas de thalassémie mineure sans élévation de l'hémoglobine  $A_2$ , ainsi que du fait des modifications du taux de cette hémoglobine constatées dans quelques autres affections congénitales ou acquises. Certaines d'entre elles, telles les anémies *ferriprives*, sont en effet très répandues et susceptibles d'interférer avec le taux de synthèse de l'hémoglobine  $A_2$  chez les thalassémiques.

*Ce travail a été réalisé avec la collaboration technique dévouée de M<sup>mes</sup> J. Mèlis et M. Donckerwolcke à qui nous exprimons nos remerciements.*

*Samenvatting* — Een techniek wordt beschreven die er in bestaat normale en abnormale fracties van haemoglobine door « starch-block electrophoresis » met behulp van een discontinu buffersysteem snel van elkaar te scheiden. Zij laat reiniging en herkenning toe van abnormale fracties zoals Hb s en demonstreert foetale Hb en Hb  $A_2$ ; dit laatste kan dan met de fotometer afzonderlijk worden gedoseerd.

De precisie van de op deze wijze uitgevoerde metingen, in vergelijking met deze verkregen door andere technieken die gebruik maken van de « starch-block electrophoresis », blijkt gunstig: proeven tot het herhalen der doseringsresultaten voor Hb  $A_2$  toonden aan dat het gemiddeld verschil tussen twee afzonderlijk uitgevoerde doseringen van hetzelfde staal 2,5 ten honderd bedraagt der totale metingen.

Het gemiddelde der doseringsresultaten voor Hb  $A_2$ , verkregen bij 72 normale personen, tzt. 2,55 ten honderd van het totale Hb ( $\sigma = 0,26$  ten honderd) wordt vergeleken met de overeenkomstige gegevens verkregen bij middel van andere technieken.

De abnormale waarden Hb  $A_2$  en Hb F (deze laatste verkregen door alkalidenaturatie), aangetoond bij thalassaemia en een aantal andere haematologische aandoeningen, worden ontleed. Behalve bij thalassaemia minor, werden abnormaal hoge Hb  $A_2$ -waarden aangetroffen in gevallen van megaloblastische anaemieën, geringe waarden anderzijds zijn anaemia oligosideraemica. De verscheidenheid, evenwel, der aandoeningen bij dewelke matige verhogingen van alkaliresistente haemoglobine waarde werden vastgesteld, is veel groter; hieruit worden de nodige gevolgtrekkingen gemaakt in verband met het belang der doseringen van deze twee haemoglobinen, respectievelijk voor het opsporen van dragers van thalassaemische genen en voor de studie van hun verspreiding in de menselijke bevolkingsgroepen.

*Summary* — A technique which enables normal and abnormal fractions of haemoglobin (Hb) to be separated rapidly by starch block electrophoresis with a discontinuous buffer system is described. It enables abnormal fractions such as Hb s to be purified and estimated and can demonstrate Hb F and Hb A<sub>2</sub>; the latter can be assayed separately by photometry.

The accuracy of the estimations so performed compares favourably with that of other techniques using starch block electrophoresis. Trials of the reproducibility of the results of assay of Hb A<sub>2</sub> have demonstrated that the average difference between two estimations made separately on the same sample represents 2.5 p. cent of the amounts measured.

The average of the results of estimation of Hb A<sub>2</sub> obtained in 72 normal subjects (2.5 p. cent of the total Hb,  $\sigma = 0.26$  p. cent) is compared with the corresponding figures obtained with other techniques.

The abnormal levels of Hb A<sub>2</sub> and Hb F (the latter estimated by alkali denaturation) found in thalassaemia minor and in a series of other haematological affections are reported. Other than thalassaemia minor, abnormally high titres of Hb A<sub>2</sub> were also found in megaloblastic anaemias, while low titres were found in iron-deficiency anaemias. The variety of affections in which moderate rises in alkali resistant Hb were found is very much greater. Conclusions are drawn from the observations as regards the respective value of the estimation of these two Hbs in the detection of carriers of the thalassaemic trait and in the study of this trait in human populations.

*Zusammenfassung* — Es wird eine Technik beschrieben, die es erlaubt, normale und anormale Fraktionen des Hämoglobins durch « Stärke-Block-Elektrophorese » (« starch-block-electrophoresis ») mit Hilfe eines unterbrochenen Puffersystems schnell zu trennen. Dieses Verfahren gestattet es, die anormalen Fraktionen wie das Hämoglobin s zu reinigen und zu bestimmen. Es lässt sich foetales Hämoglobin und Hämoglobin A<sub>2</sub> nachweisen, das im Photometer getrennt bestimmt werden kann.

Die Genauigkeit der auf diese Weise ausgeführten Bestimmungen ist im Vergleich mit anderen Techniken bei der Verwendung der Elektrophorese im Stärke-Block von Vorteil. Versuche, die Resultate der Bestimmung des Hämoglobins A<sub>2</sub> zu reproduzieren, haben gezeigt, dass die Differenz zwischen den beiden an den gleichen Proben ausgeführten Bestimmungen im Mittel bei 2,5 Prozent der gemessenen Grössenordnung lag.

Die mittleren Werte der Resultate bei Bestimmung von Hämoglobin A<sub>2</sub> bei 72 normalen Personen, d.h. 2,55 Prozent des Gesamthämoglobins ( $\sigma = 0,26$  Prozent), werden mit den entsprechenden, vermittels anderer Technik gewonnenen Werten verglichen.

Die Werte für das anormale Hämoglobin A<sub>2</sub> und das foetale Hämoglobin (letzteres durch Alkalidenaturierung bestimmt) werden bei Thalassämie und bei einer Serie von anderen hämatologischen Affektionen mitgeteilt. Ausser bei Thalassaemia minor werden anomal hohe Werte von Hämoglobin A<sub>2</sub> in Fällen von megaloblastischer Anämie gefunden; niedrige Werte werden dagegen bei Eisenmangelanämie festgestellt. Die Vielfalt verschiedener Affektionen, bei denen eine Mässige Erhöhung der Werte für alkaliresistentes Hämoglobin konstatiert wurde, ist dagegen sehr viel höher. Aus diesen Feststellungen wurden bezüglich des Wertes der Bestimmung dieser beiden Hämoglobine für die Entdeckung von Trägern einer thalassämischen Anlage und ihrer mengenmässigen Verteilung in der Bevölkerung Schlussfolgerungen gezogen.

*Resumen* — Se describe una técnica que permite separar rápidamente las fracciones normales y anormales de la hemoglobina por electroforesis

en bloque de almidón (« starch-block electroforesis ») con sistema discontinuo de tampones. Permite purificar y dosificar las fracciones anormales, tal como la hemoglobina S; pone, asimismo, en evidencia las hemoglobinas fetal y A<sub>2</sub>; esta última puede de esta forma ser dosificada separadamente por el fotómetro.

La precisión de las dosificaciones así efectuadas se compara con la de otras técnicas que utilizan la electroforesis en bloque de almidón; los ensayos de reproductibilidad de los resultados de dosificación de la hemoglobina A<sub>2</sub> han mostrado que, la diferencia media entre dos determinaciones efectuadas separadamente sobre la misma muestra, representa un 2,5 % de los tamaños medidos.

La media de los resultados de las dosificaciones de la hemoglobina A<sub>2</sub> obtenidos en 72 sujetos normales, o sea 2,55 % de la hemoglobina total ( $\sigma = 0,26$  %) es comparada con los datos correspondientes obtenidos por otras técnicas.

Las tasas normales de hemoglobinas A<sub>2</sub> y fetal (esta última estimada por alcalidesnaturalización) encontradas en los talasémicos y en una serie de otras afecciones hematológicas, son relacionadas. En la talasemia menor tasas anormalmente elevadas de hemoglobina A<sub>2</sub> fueron encontradas en casos de anemias megaloblásticas; tasas bajas se hallaron, por el contrario, en las anemias ferriprivas. La variedad de las afecciones en las cuales elevaciones moderadas de la tasa de hemoglobina alcaliresistente fueron comprobadas, es por el contrario, mucho más grande; consecuencias se deducen de tales comprobaciones en cuanto al valor respectivo de las dosificaciones de estas dos hemoglobinas en la detección de los portadores de la tara talasémica y el estudio de la distribución de esta tara en las poblaciones humanas.

Travail effectué au Laboratoire d'Hématologie  
Tropicale de l'Institut de Médecine Tropicale d'An-  
vers (Directeur: Prof. P. G. Janssens) et reçu pour  
publication le 16 avril 1966.

## BIBLIOGRAPHIE

- Aksoy, M. et Erdem, S., A simple method for the quantitation of haemoglobin A<sub>2</sub> by starch-gel electrophoresis. *Clin. Chim. Acta*, 1965, **12**, 696.
- Albahary, C., Guillaume, P. et Martin, S., La nocivité hématologique du plomb. Bilan de 40 malades hospitalisés pour saturnisme professionnel. *Nouv. Rev. franç. Hémat.*, 1965, **5**, 689.
- Allen, D. W., Schroeder, W. A. et Balog, J., Observations on the chromatographic heterogeneity of normal adult and fetal human hemoglobins. A study of the effects of crystallization and chromatography on the heterogeneity of isoleucine content. *J. amer. Chem. Soc.*, 1958, **80**, 1628.
- Beaven, G. H., Ellis, M. J. et White, J. C., Studies on human foetal haemoglobins III The hereditary haemoglobinopathies and thalassaemia. *Brit. J. Hemat.*, 1961, **7**, 169.
- Betke, K., Marti, H. R. et Schlicht, I., Estimation of small percentages of fetal haemoglobins. *Nature*, 1959, **184**, 1877.
- Betke, K., Schlaich, P. et Hindobro-Tech, G., Blutfarbstoffuntersuchung mit der Stärkblockelektrophorese. *Klin. Wochschr.*, 1959, **37**, 794.
- Chernoff, A. I., The distribution of the thalassaemia gene; a historical review. *Blood*, 1959, **14**, 899.
- Chernoff, A. I. et Pettit, N. M., Some notes on the starchgel electrophoresis of hemoglobins. *J. Lab. clin. Med.*, 1963, **63**, 290.

- Conley, C. L., Weatherall, D. J., Richardson, S. N., Shepherd, M. R. et Charache, C., Hereditary persistence of fetal hemoglobin: a study of 79 affected persons in 15 Negro families in Baltimore. *Blood*, 1963, **21**, 261.
- Dulong de Rosnay, C., Labadie, P. et Debot, P., Recherches sur l'hémoglobine alcalino-résistante. Sa présence au cours de l'intoxication saturnine. *Arch. Mal. prof.*, 1957, **18**, 474.
- Fessas, P., Thalassaemia and alterations in the haemoglobin pattern. *Abnormal Haemoglobins, A Symposium*, Jonxis, J. H. P. et Delafresnaye, S. F., Oxford, éd. Blackwell Scientific Publications, 1959, 134.
- Fessas, P. et Stommatoyannopoulos, G., Hereditary persistence of foetal haemoglobin in Greece. A study and comparison. *Blood*, 1964, **24**, 223.
- Flatz, G., Pik, C. et Springam, S., Haemoglobinopathies in Thailand; II Incidence and distribution of elevations of haemoglobin A<sub>2</sub> and haemoglobin F; a survey of 2,790 people. *Brit. J. Haemat.*, 1965, **11**, 227.
- Goldberg, C. A. J., A new method for starch-gel electrophoresis of human haemoglobins with special reference to the determination of hemoglobin A<sub>2</sub>. *Clin. Chem.*, 1958, **4**, 484.
- Hilgartner, M. W., Erlandson, M. E., Walden, B. S. et Smith, C. H., A comparison of the paper and starch-block electrophoretic methods for determination of A<sub>2</sub> hemoglobin. *Am. J. clin. Path.*, 1961, **35**, 26.
- Hitzig, W. H., Frick, P. G., Betke, K. et Huisman, T. H. J., Hämoglobin Zürich: eine neue Hämoglobinanomalie mit Sulfonamidinduzierter Innenkörper anämie. *Helv. Pediatr. Acta*, 1960, **15**, 494.
- Horton, B. F., Hahn, D. A. et Huisman, T. A. J., Slight increase of fetal hemoglobin in apparently healthy Negroes. *Acta haemat.*, 1965, **33**, 312.
- Huehns, E. R. et Shooter, E. M., Human haemoglobins. *J. med. Genet.*, 1965, **2**, 48.
- Huisman, T. H. J., Normal and abnormal human hemoglobins, *Advances in Clinical Chemistry*, H. Sobotka et C. P. Stewart, New York, éd., Academic Press, 1963, **6**, 300.
- Huisman, T. H. J. et Dozy, A. M., Quantitative determination of the minor hemoglobin component Hb A<sub>2</sub> by DEAE cellulose chromatography. *Anal Biochem.*, 1961, **2**, 400.
- Ibbotson, R. N. et Compton, B. A., Quantitative determination of haemoglobin A<sub>2</sub> using paper electrophoresis. *J. clin. Path.*, 1961, **14**, 164.
- Jones, J. H., Foetal haemoglobin in Fanconi type anaemia. *Nature*, 1961, **192**, 983.
- Josephson, A. M., Masri, M. S., Singer, L., Dworkin, D. et Singer, K., Starch-block electrophoretic studies of human haemoglobin solutions; II Results in cord blood, thalassaemia and other hematologic disorders: comparison with Tiselius electrophoresis. *Blood*, 1958, **13**, 543.
- Kleihauer, E. et Betke, K., Die Verteilung von Hämoglobin-F auf die Zellpopulation bei verschiedenen Zuständen einer Vermehrung von Hämoglobin F. *Haemoglobin Colloquium*, Wien, Lehmann, H. et Betke, K., Stuttgart, éd., Georg Thieme, 1961, 98.
- Koneman, E. W., Miale, J. B. et Masri, A., Current biochemical and genetic concepts in the diagnosis of sickle cell-thalassaemia. *Am. J. clin. Path.*, 1963, **40**, 1.
- Kunkel, H. G. et Wallenius, G., New hemoglobin in normal adult blood. Science, the minor basic hemoglobin component in the blood of normal individuals and patients with thalassaemia. *J. clin. Invest.*, 1957, **36**, 1615.
- Kunkel, H. G. et Wallenius, G., *Methods of Biochemical Analyses*. Interscience, New-York, 1954, **1**, 141.
- Kunkel, H. G. et Wallenius, G., New hemoglobin in normal adult blood. *Science*, 1955, **122**, 288.

- Levere, R. D., Lichtman, H. C. et Levine, J., Effect of iron-deficiency anaemia on the metabolism of the heterogenic haemoglobins in sickle-cell trait. *Nature*, 1964, **202**, 499.
- Marti, H. R., Die Vermehrung des alkaliresistenten Hämoglobins bei hämatologisch gesunden Erwachsenen. *Haemoglobin Colloquium*, Wien, Lehmann, H. et Betke, K., Stuttgart, éd. Georg Thieme, 1961, 98.
- Marti, H. R., Le diagnostic de la thalassémie. *Ann. Soc. belge Méd. trop.*, 1963, **43**, 603.
- McCoo, J. W. Jr et Leikin, S. L., A rapid modified starch electrophoretic method. *Am. J. clin. Pathol.*, 1961, **35**, 349.
- Miale, J. B., *Laboratory Medicine; Hematology*, 2<sup>e</sup> éd. C. V. Mosby, St-Louis, 1962, 851.
- Müller, C. J. et Pik, C., A simple and rapid method for the quantitative determination of hemoglobin A<sub>2</sub>. *Clin. chim. Acta*, 1962, **7**, 92.
- Petrakis, N. L., Doberty, M. A., Grunbaum, B. W. et Atchley, W. A., Cellulose acetate membranes for the electrophoretic demonstration of hemoglobin A<sub>2</sub>. *Acta haemat.*, 1962, **27**, 96.
- Petz, L. D. et Economidou, J., The technique of starch-block electrophoresis. *Clin. Chim. Acta.*, 1965, **11**, 469.
- Poulik, M. D., Starch-gel electrophoresis in a discontinuous system of buffers. *Nature*, 1957, **180**, 1477.
- Rucknagel, D. L. et Neel, J. V., *Medical Genetics*, Steinberg, A., New York, éd., Grune et Stratton, 1961, **1**, 158.
- Shepherd, M. K., Weatherall, D. J. et Conley, C. L., Semi-quantitative estimation of distribution of fetal hemoglobin in red cell populations. *Bull. Johns Hopkins Hosp.*, 1962, **110**, 293.
- Silvestroni, I., Bianco, I., Muzzolini, M., Modiano, G. et Vallisneri, E., Dell'emoglobina di malati di anemia microcitica costituzionale e di morbo di Cooley. *Progr. med.*, 1957, **13**, 706.
- Singer, K., Chernoff, A. I. et Singer, L., Studies on abnormal hemoglobins I Their demonstration in sickle cell anemia and other hematologic disorders by means of alkali denaturation. *Blood*, 1951, **6**, 413.
- Van Ros, G., Janssens, P. G. et De Muynck, A., Sicklanémie ou interaction sicklémique-thalassémique? Les moyens actuels de diagnostic et leur application à un cas de beta-thalassodrépanocytose. *Ann. Soc. belge Méd. trop.*, 1965, **45**, 211.
- Weatherall, D. J., Biochemical phenotypes of thalassemia in the American Negro population. *Problems in Cooley's anemia*. *Ann. N.-Y. Acad. Sci.*, 1964, **119**, 450.
- Weatherall, D. J., *The thalassaemia syndromes*, Oxford, Blackwell Scientific Publications, 1965, p. 11, 59, 139, 203, 212.
- White, J. C. et Beaven, G. H., Foetal haemoglobin. *Brit. med. Bull.*, 1959, **15**, 33.
- Yakulis, V. J., Heller, P., Josephson, A. M. et Singer, L., Rapid demonstration of hemoglobin A<sub>2</sub> by means of agar-gel electrophoresis. *Amer. J. clin. Pathol.*, 1960, **34**, 28.
- Zuelzer, W. W., Robinson, A. R. et Booker, C. R., Reciprocal relationship of hemoglobin A<sub>2</sub> and F in beta-chain thalassaemia, a key to the genetic control of hemoglobin F. *Blood*, 1961, **17**, 393.
-