

Pour compléter notre étude de la drépanocytose, nous allons étudier sa transmission au sein d'une famille.

**But du TP :** Identification des phénotypes moléculaires et des génotypes par électrophorèse de l'hémoglobine.

### **Rappel de l'activité précédente et complément.**

Plusieurs maladies héréditaires qualifiées d'hémoglobinopathies affectent l'un des deux gènes codant les chaînes de l'hémoglobine humaine adulte, hémoprotéine tétramérique constituée de deux chaînes alpha et de deux chaînes bêta. La drépanocytose est une affection génétique due à une mutation ponctuelle dans le gène codant la chaîne bêta. Elle est caractérisée par la substitution de l'acide glutamique en position 6 de la structure primaire par une valine. Il en résulte une hémoglobine anormale (HbS) qui a tendance à polymériser lorsque la pression partielle en dioxygène diminue, en particulier dans le sang périphérique, contrairement à l'hémoglobine normale (HbA) qui ne présente pas cette propriété. La présence de cette hémoglobine anormale dans les globules rouges aboutit à une pathologie qui peut être plus ou moins grave en fonction de divers autres facteurs génétiques et environnementaux, principalement chez les homozygotes, et elle peut être détectée par l'observation microscopique du sang qui contient des hématies déformées, qualifiées de falciformes (en forme de faucille).

La simple substitution de la valine en position 6 dans la structure primaire de la chaîne bêta confère à l'hémoglobine S une charge électrique globale inférieure à celle de l'hémoglobine A. Il en résulte que lorsque les deux hémoglobines sont placées sur un gel d'électrophorèse, elles ne migrent pas de la même façon ce qui permet de les identifier dans un simple hémolysat de globules rouges. On peut aisément en déduire le phénotype moléculaire du porteur et en déduire son génotype.

Dans l'enseignement de la biologie, le cas de la drépanocytose est particulier. En effet, il constitue un exemple des relations complexes entre génotype et phénotype qui interviennent dans l'évolution parce que l'allèle muté, bien que morbide, s'est maintenu à un taux élevé dans le pool génique de certaines populations en raison de l'avantage sélectif qu'il confère dans les zones d'endémie du paludisme. En effet, le parasite responsable de cette maladie, le *Plasmodium*, se révèle moins pathogène chez les porteurs de l'allèle muté.

Pour toutes ces raisons, il est intéressant d'utiliser l'électrophorèse pour identifier les deux hémoglobines, par exemple dans une simulation de situation réelle.

### **Activité pratique :**

La durée de migration de l'hémoglobine étant d'environ une heure, vous commencerez par lancer une électrophorèse selon le protocole qui suit. Pendant le temps de la migration, vous utiliserez les résultats de l'électrophorèse suivante pour dresser l'arbre généalogique d'une famille dont un des fils est atteint.

Les sept membres dont l'hémoglobine a été analysée sont les deux parents (pistes 1 et 2), leurs quatre enfants (pistes 3 à 6) et un petit enfant (piste 7). En outre, deux références sont constituées par un échantillon d'hémoglobine S (piste 8) et un échantillon d'hémoglobine A (piste 9).

Vous construirez le tableau de croisement des parents de l'individu 7 et vous calculerez la probabilité pour cet individu d'avoir un frère ou une sœur :

-sain

-porteur sain

-atteint

Le gel ci-contre montre les résultats obtenus.



## **Protocole de l'électrophorèse**

### **1 Préparation des bandes d'acétate de cellulose**

Attention : Le méthanol est une substance très toxique, le manipuler avec précaution. Les bandes de celluloses sont conservées dans le méthanol à remplacer par du tampon afin que la migration des protéines soit possible dans un champ électrique. Vous trouverez les bandes immergées depuis 10 à 15 minutes dans le tampon (pour les imprégner et éliminer le méthanol) sur votre paillasse.

### **2 Dépôt des Hémoglobines :**

Sortir les bandes des bacs transparents contenant la solution tampon à l'aide d'une pince. Les placer entre deux feuilles de papier filtre et les sécher à l'aide d'un mouvement rapide de la main.

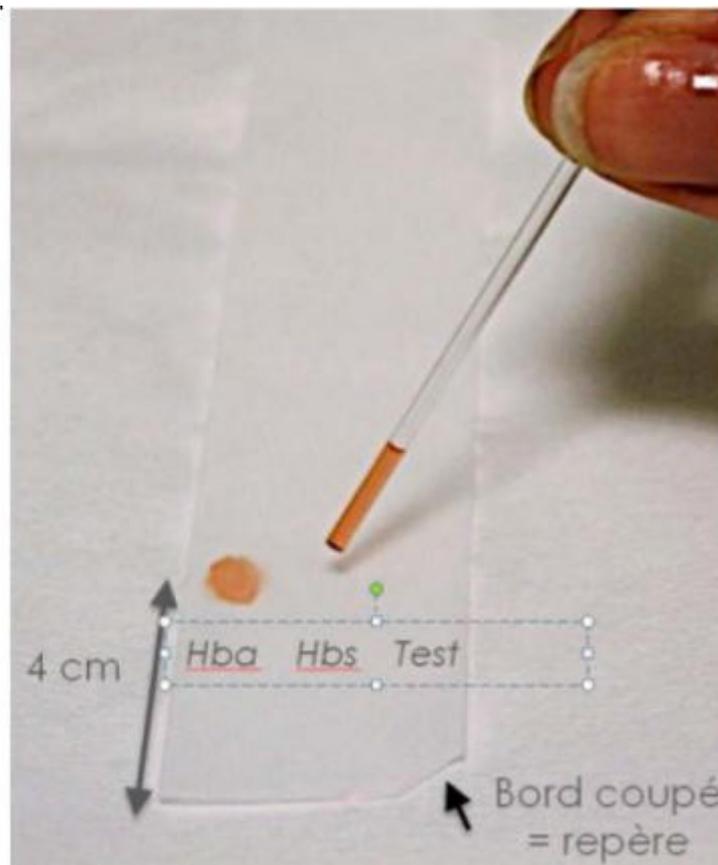
À l'aide d'une micropipette de 20 µl, prélever une goutte d'individu sain ou malade (suivant les tables) et la déposer rapidement à 4 centimètres de l'extrémité de la bande du côté de la cathode (borne noire/biseau en bas à droite) et perpendiculairement à l'axe de la bande. Vous pouvez déposer sur la même bande une deuxième goutte d'hémoglobine d'individu (HbA/HbS) à l'aide de la micropipette et d'un embout propre.

### **3 Mise en place des bandes d'acétate de cellulose dans la cuve:**

Remplir chaque compartiment de la cuve de tampon (200ml) en évitant tout débordement. Prendre le portoir de la cuve à électrophorèse et dégager les baguettes de plastique de leur logement. Poser les bandes sur le portoir le coin coupé de la bande en bas à droite (ainsi la bande est sur la face mate qui est absorbante). Fixer les bandes d'un côté à l'aide d'une des deux baguettes.

Tendre les bandes en tirant sur l'extrémité libre à l'aide de la pince plate, et poser la deuxième baguette. Les bandes doivent être parallèles entre elles et perpendiculaires à l'axe du portoir pour permettre une migration des protéines dans l'axe de la bande. Poser le portoir dans la cuve et vérifier que les extrémités de chaque bande trempent

dans le tampon de chacun des deux compartiments.



#### **4 Mise en route de l'électrophorèse :**

Fermer la cuve à l'aide du couvercle.

Relier la cuve au générateur à l'aide des cordons.

Mettre sous tension le générateur avec le bouton marche - arrêt. Régler la minuterie sur continu. Appuyer sur le bouton réarmement, et régler la tension sur 200 volts grâce au potentiomètre. Appuyer sur le bouton démarrer. Les voyants de la cuve et du générateur doivent être allumés.

#### **5 Arrêt de l'électrophorèse (au bout d'1 heure) et coloration des bandes (si le temps) :**

Pendant le temps de migration, remplir le premier bac à coloration de rouge Ponceau. Remplir l'autre bac à coloration d'acide éthanoïque à 5% (5 mL d'acide éthanoïque glacial dans 100 mL d'eau distillée).

Arrêter l'électrophorèse.

Débrancher les cordons reliés à la cuve et retirer le couvercle en le faisant coulisser.

Sortir le portoir de la cuve et dégager les baguettes de fixation de leur logement.

Vous pouvez réaliser une observation directe de la migration pour comparer les distances parcourues.

La coloration des bandes reste facultative, mais si vous différez l'observation, les tâches d'hémoglobines s'atténuent rapidement au cours du temps.

Prendre chaque bande à l'aide d'une pince plate pour la coloration.

Immerger la bande dans le compartiment contenant le rouge Ponceau.

Laisser la bande se colorer pendant environ 1 minute.

Puis tremper la bande dans des bains successifs d'acide éthanoïque à 5 %. La bande est changée de compartiment lorsque la solution d'acide éthanoïque est saturée en rouge Ponceau. Dans le dernier bain, la bande doit être redevenue blanche, seules les protéines doivent être colorées et apparaître sous forme de tâches rouges.