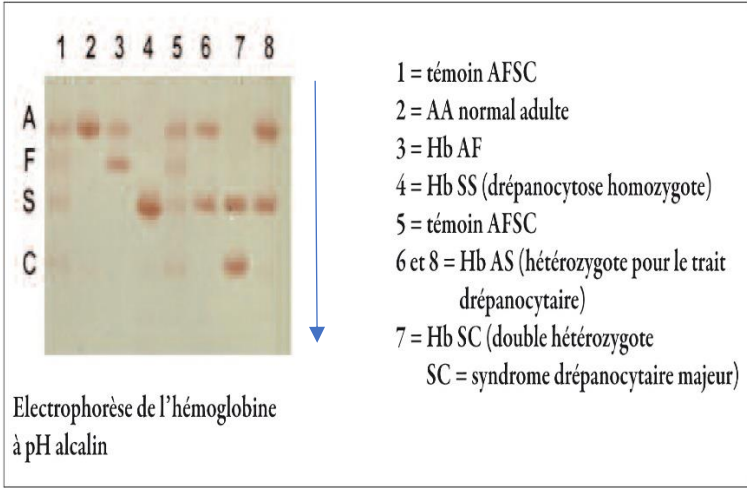


La drépanocytose : une maladie d'origine génétique





**TP 3 Identification de l'hémoglobine A et de l'hémoglobine S**

Rappel du contexte de votre recherche : Vous travaillez au sein d'une équipe médicale dans un grand hôpital de la région bordelaise. Deux très jeunes patients, jumeaux, sont arrivés le matin dans votre service. Ils présentent des troubles tels que très grande fatigue, fièvre, essoufflement, douleur articulaire. **Vous savez que ces patients présentent des hématies falciformes (TP Frottis sanguin). Vous savez qu'il existe un allèle muté responsable de la synthèse d'une globine  $\beta$  modifiée à l'origine d'une hémoglobine HbS (TP Relation phénotype moléculaire et génotype). Cette hémoglobine S correspond au phénotype moléculaire de la drépanocytose.**

- On cherche donc à vérifier que le type d'hémoglobine que possèdent les jeunes patients ainsi que leurs parents.

Documents ressources	
<p>Après extraction et purification de molécules d'hémoglobine contenue dans les hématies, on peut déterminer le type d'hémoglobine par la technique de l'électrophorèse qui permet de séparer des protéines.</p> <p><b>Principe de l'électrophorèse :</b> En milieu basique, les protéines sont chargées négativement. Lorsqu'un mélange de protéines est soumis à un champ électrique, les protéines migrent à une distance caractéristique par rapport à la ligne de dépôt, en fonction de leur taille et de leur charge.</p> <p>Le rouge Ponceau est un colorant spécifique des protéines, ayant une grande affinité pour elles.</p>	<p>Exemple de résultats d'électrophorèse de différentes hémoglobines :</p> <div style="text-align: center;">  </div> <p>Electrophorèse de l'hémoglobine à pH alcalin</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>1 = témoin AFSC</li> <li>2 = AA normal adulte</li> <li>3 = Hb AF</li> <li>4 = Hb SS (drépanocytose homozygote)</li> <li>5 = témoin AFSC</li> <li>6 et 8 = Hb AS (hétérozygote pour le trait drépanocytaire)</li> <li>7 = Hb SC (double hétérozygote SC = syndrome drépanocytaire majeur)</li> </ul>

Etape A Proposer une stratégie de résolution et mettre en œuvre un protocole
<p><b>Proposer une stratégie permettant de connaître le phénotype moléculaire des jeunes patients et de leurs parents</b></p> <p>« Ce que je vais faire, je sais que, et pourquoi », « Comment je fais », « Ce que j'attends »</p>

Protocole	
<p>Matériel :</p> <p>Pipette, propipette, capillaire pour les dépôts....(voir au tableau), pincettes</p> <p>Tube A contenant Hémoglobine du père</p> <p>Tube B contenant Hémoglobine de la mère</p> <p>Tube C contenant Hémoglobine du jumeau 1</p> <p>Tube D contenant Hémoglobine du jumeau 2</p> <p>Cuve à électrophorèse, solution tampon, bandes d'acétate, applicateur</p> <p>Colorant (rouge Ponceau), bain d'acide acétique, solution de transpa-risation, plaques de verre</p>	<p>Afin de vérifier le type de d'hémoglobine des parents et des enfants, réaliser les dépôts nécessaires en suivant le protocole indiqué. (voir fiche protocole)</p>
<p>Sécurité</p> <div style="display: flex; justify-content: space-around;">    </div>	<p>Rouge Ponceau :</p>  <p>Noel</p>

Etape B Communiquer et exploiter les résultats
<p>Sous la forme de votre choix, présenter vos résultats et exploiter les résultats (« je vois que », « je sais que », je conclus »)</p>

## Fiche Protocole

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

1. **Remplir** la cuve à électrophorèse au 2/3 avec la solution tampon, de chaque côté, en évitant tout débordement.  
**Ne jamais toucher les bandes d'acétate avec les doigts, sinon des traces apparaîtront à la coloration.**
2. **Sortir** les bandes des bacs à l'aide d'une pince, les placer entre 2 feuilles de papier filtre et les sécher à l'aide d'un mouvement rapide.
3. **Fixer** les bandes d'acétate de cellulose sur le portoir de la cuve, tendues autant que possible (sans les déchirer bien entendu), de façon à ce que la face mate qui est absorbante soit sur le dessus (encoche de la bande tenue dans la longueur en bas à droite). Les bandes doivent être parallèles entre elles et perpendiculaires à l'axe du portoir pour permettre une migration des protéines dans l'axe du portoir. (voir fig.1 et 2)
4. **Poser** le portoir dans la cuve et **vérifier** que les extrémités de chaque bande trempent dans le tampon de la cuve.

### Dépôt du mélange

1. **Tremper** l'applicateur dans le mélange, **déposer** rapidement l'applicateur près du bord, du côté de l'encoche et perpendiculaire au grand axe de la bande d'acétate (faire une application bien nette). (voir fig.1)

### Mise en route de l'électrophorèse

1. **Fermer** la cuve avec le couvercle, côté de la cathode (pôle négatif, borne noire) près du bord avec encoche.
2. **Relier** la cuve au générateur à l'aide du cordon. **Respecter** la correspondance des couleurs entre cordons et douilles.
3. **Régler** la tension de l'alimentation sur 160V.
4. **Raccorder** l'appareil au secteur. **Mettre** sous tension. La migration démarre et durera une heure.

### Coloration au rouge Ponceau des protéines, décoloration des bandes et transparisation

1. **Verser** le colorant dans un bain.
2. **Immerger** les bandes 10 min face à traiter vers le liquide.
3. **Décolorer** les bandes en les plongeant successivement dans deux bains d'acide acétique 5 %. Seules les traces laissées par les protéines apparaîtront.
4. **Immerger** enfin les bandes dans un 4<sup>ème</sup> bain avec la solution de transparisation. **Retirer** les dès qu'elles deviennent translucides.
5. **Poser** les bandes sur des plaques en verre et **laisser sécher** à l'air libre.

Fig.1 Bande d'acétates de cellulose

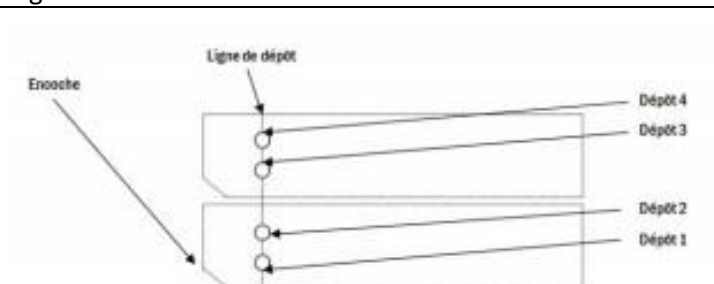


Fig.2 Positionnement des bandes dans la cuve

