



(22) Date de dépôt/Filing Date: 2005/11/17  
(41) Mise à la disp. pub./Open to Public Insp.: 2006/05/18  
(30) Priorité/Priority: 2004/11/18 (FR0412263)

(51) Cl.Int./Int.Cl. *G01N 27/447* (2006.01)

(71) Demandeur/Applicant:  
SEBIA, FR

(72) Inventeurs/Inventors:  
ROBERT, FREDERIC, FR;  
SIMONIN, DENIS, FR;  
CLEMENT, JEAN-BAPTISTE, FR

(74) Agent: SMART & BIGGAR

(54) Titre : PROCEDE D'ANALYSE DE L'HEMOGLOBINE PAR ELECTROPHORESE CAPILLAIRE, TROUSSE POUR ELECTROPHORESE CAPILLAIRE ET UTILISATION DE RALENTISSEUR DE FLUX DANS UN TEL PROCEDE  
(54) Title: PROCESS FOR ANALYZING HEMOGLOBIN BY CAPILLARY ELECTROPHORESIS, CAPILLARY ELECTROPHORESIS KIT AND USE OF FLOW RATE REDUCER IN SUCH A PROCESS

(57) **Abrégé/Abstract:**

L'invention concerne un procédé d'électrophorèse capillaire en solution libre à pH alcalin pour l'analyse d'échantillons comportant de l'hémoglobine dans lequel on fait passer l'échantillon dans un capillaire contenant un tampon d'analyse, comportant au moins une étape où l'on introduit l'échantillon dans un tube capillaire contenant une solution de tampon d'analyse, caractérisé en ce que le tampon est du type zwitterionique et en ce qu'il est associé à au moins un ralentisseur de flux. Elle concerne également l'utilisation de ralentisseurs de flux en EC, associé(s) à au moins un tampon zwitterionique, ainsi qu'une trousse d'analyse de l'hémoglobine par électrophorèse capillaire.



PROCÉDÉ D'ANALYSE DE L'HEMOGLOBINE PAR ÉLECTROPHORÈSE CAPILLAIRE,  
TROUSSE POUR ÉLECTROPHORÈSE CAPILLAIRE ET UTILISATION DE  
RALENTISSEUR DE FLUX DANS UN TEL PROCÉDÉ

5

ABREGÉ

10

L'invention concerne un procédé d'électrophorèse capillaire en solution libre à pH alcalin pour l'analyse d'échantillons comportant de l'hémoglobine dans lequel on fait passer l'échantillon dans un capillaire contenant un tampon d'analyse, comportant au moins une étape où l'on introduit l'échantillon dans un tube capillaire contenant une solution de tampon d'analyse, caractérisé en ce que le tampon est du type zwitterionique et en ce qu'il est associé à au moins un ralentisseur de flux.

15

Elle concerne également l'utilisation de ralentisseurs de flux en EC, associé(s) à au moins un tampon zwitterionique, ainsi qu'une trousse d'analyse de l'hémoglobine par électrophorèse capillaire .

20

La présente invention concerne un procédé de séparation de l'hémoglobine par électrophorèse capillaire ainsi que des compositions de tampon utiles pour cette séparation, et des trousse d'analyse de l'hémoglobine par électrophorèse capillaire.

Pour analyser l'hémoglobine A<sub>2</sub> et les variants de l'hémoglobine, notamment, dans des liquides biologiques, comme du sang, en ayant des visées analytiques et notamment diagnostiques, et pour donc séparer des hémoglobines par électrophorèse, il est connu d'utiliser des techniques d'électrophorèse capillaire (EC). Par hémoglobines, on entend ici toute hémoglobine normale ou pas, et les variants de ces hémoglobines. L'un des intérêts de l'électrophorèse capillaire réside dans le fait que seules de très petites quantités des liquides biologiques à analyser sont nécessaires. De plus, la séparation par cette technique peut être très rapide, dans la mesure où de forts voltages peuvent être utilisés sans que l'échantillon ne s'échauffe trop lors de la séparation.

Ainsi, la technique de choix est l'analyse par isoélectrofocalisation capillaire (cIEF). Cette méthode permet d'obtenir une résolution élevée entre les différentes formes d'hémoglobine (Hempe) (7). Toutefois son automatisation est difficile et, la nécessité d'utiliser des capillaires revêtus, encore appelés capillaires « coatés » afin de supprimer le flux électro-osmotique, la rend difficilement compatible avec des analyses effectuées en série.

Une autre technique dite technique de « double coating dynamique » peut être mise en œuvre notamment avec les trousse commercialisées sous le nom de « Analis HbA<sub>2</sub>-CE kit » ou « CEofix HbA<sub>2</sub>-CE kit » d'Analis. Cette technique implique un premier lavage du capillaire par une solution contenant un polycation à un pH de 4,7, suivi d'un second lavage avec un tampon d'analyse contenant un polyanion, à un pH de 8,7. Dans cette méthode de « double-coating » ou double revêtement, la quantité de charges négatives présentes sur la paroi interne du capillaire

est encore plus élevée que sur un capillaire nu, si bien que le flux électro-osmotique est encore plus important. Cette méthode de double-coating dynamique ne permet toutefois pas la séparation suffisante entre les fractions HbA<sub>2</sub>, HbC et HbE. Ceci rend l'analyse quantitative de la fraction HbA<sub>2</sub> impossible en présence de variants HbC ou HbE. De plus, comme les fractions HbS et HbD ont la même position électrophorétique, une analyse complémentaire en milieu acide est nécessaire afin de déterminer le type de variant présent dans l'échantillon. Enfin, le revêtement double doit être refait entre chaque analyse d'échantillon, ce qui rend cette méthode lourde et difficile à employer pour des essais en grande série.

Par ailleurs, des séparations des hémoglobines en solution libre ont été décrites, mais elles ne répondent pas aux critères de précision, de résolution ou de rapidité attendus pour rationaliser les analyses des hémoglobines en EC. Ainsi, Ishoka (1)(1992) décrit la séparation d'hémoglobines en utilisant un tampon borate (100mM), à un pH de 9,98 dans des temps de migration de l'ordre de 50 minutes, c'est-à-dire incompatibles avec la durée des analyses des hémoglobines comme elles sont menées à l'heure actuelle. Le même type de tampon, à des conditions similaires de concentration et de pH (Jenkins)(3), (4) et (5) ne permet que des résolutions insuffisantes entre les fractions HbA, HbF et HbS. Sahin (2) décrit des conditions de pH plus acide, mais des résultats très insuffisants pour la résolution entre les fractions HbA, HbF, HbS et HbA<sub>2</sub> avec des concentrations (20mM), moindres en borate, ou avec du barbital (50mM), à un pH de 8,5, et également très insuffisants pour la résolution entre les fractions HbA, HbS et HbA<sub>2</sub> pour le tampon Tris (1M) à un pH de 8,0. De plus, des associations Tris/Arginine (Shihabi) (6), ont été utilisées et même si elles permettent la séparation HbA/HbS, les fractions HbC/HbE et HbA<sub>2</sub> ne sont pas résolues. Enfin, les brevets US 5 202 006 et US 5 439 825 qui décrivent l'utilisation du barbital ou de l'éthylbarbital ne permettent d'obtenir que de faibles résolutions entre les principales Hbs que sont les HbA, HbF, HbS et HbC.

Il subsiste donc un besoin pour une méthode d'analyse de l'hémoglobine et notamment de l'hémoglobine A<sub>2</sub> qui permette l'analyse en une unique étape, et sans double revêtement, qui puisse être mise en œuvre automatiquement et en séries, et qui garantisse une résolution satisfaisante entre les formes HbA<sub>2</sub>, HbC, HbD, HbE, HbS, HbF et HbA, notamment.

La demanderesse a maintenant mis en évidence qu'en utilisant un tampon d'analyse zwitterionique associé à un ralentisseur de flux, notamment en EC en solution libre, il est possible d'obtenir une séparation largement améliorée des fractions évoquées ci-dessus, en une étape unique, évitant ainsi les séparations complémentaires, et sans double revêtement, ce qui simplifie la mise en œuvre. De préférence, c'est un procédé d'électrophorèse capillaire en solution libre qui est mis en œuvre (FSCE pour « Free Solution Capillary Electrophoresis »).

Ainsi, la présente invention concerne la séparation par électrophorèse capillaire des hémoglobines dans des échantillons biologiques, procédé dans lequel on fait passer l'échantillon biologique comportant lesdites hémoglobines dans un capillaire contenant un tampon d'analyse, comportant au moins une étape où l'on introduit l'échantillon dans un tube capillaire contenant une solution de tampon d'analyse, et dans lequel le tampon est du type zwitterionique et est associé à au moins un ralentisseur de flux. Cette étape est en général suivie de la séparation des hémoglobines, par migration et détection des différents variants.

En tant que tampon zwitterionique, on utilise selon l'invention un tampon zwitterionique tamponnant entre les valeurs de pH 8 et 10, et comprenant au moins une fonction amine, et au moins une fonction acide, et au moins une fonction hydroxyle en position opposée à la fonction acide. Par fonction acide, on entend ici la fonction acide carboxylique ou la fonction acide sulfonique, notamment. Ce tampon zwitterionique peut être formé d'une ou de deux molécules : pour le cas où la fonction amine est portée par une première molécule sans fonction acide, cette première

molécule est associée à une seconde molécule portant une fonction acide, notamment une fonction acide carboxylique ou sulfonique ou telle qu'un acide aminé. On peut citer, à titre d'exemple, la glycine comme acide aminé.

5                   Selon l'invention, les ralentisseurs de flux sont du type diamine ou polyamine aliphatique ou cyclique. Ils sont choisis parmi les diamines ou polyamines aliphatiques et/ou les diamines ou polyamines cycliques, par exemple. On préfère les diamines ou polyamines aliphatiques. A titre de diamine aliphatique, on peut citer à titre d'exemple le 1,3-diaminopropane, 10 le 1,4-diaminobutane, le 1,5-diaminopentane, le 1,6-diaminohexane, la N,N'-diméthyl-1,6-hexanediamine, la N,N,N',N'-tétraméthyl-1,4-butanediamine et leurs dérivés et sels acceptables. A titre de polyamines aliphatiques, on peut citer à titre d'exemple la diéthylènetriamine, la spermine, la tétraéthylènepentamine, et leurs dérivés et sels acceptables. 15 Les ralentisseurs de flux peuvent être utilisés en mélange.

                  Comme sel acceptable, on peut citer les sels de chlorhydrate ou similaires. Comme dérivés, on peut citer par exemple, les dérivés des composés ci-dessus dont un ou des atomes de carbone de la chaîne aliphatique est ou sont substitué(s) par un ou des groupements alkyles 20 et/ou un ou des hydrogène(s) des amines libres est ou sont substitué(s) par un ou des groupements alkyles.

                  La solution de tampon d'analyse peut en outre comporter d'autres additifs, notamment d'autres additifs visant à améliorer la séparation des différentes hémoglobines.

25                   De plus, l'invention concerne l'utilisation de composés connus pour leur activité de ralentisseur de flux électrophorétique, en EC en solution libre en association avec au moins un tampon zwitterionique.

                  Comme cela apparaît dans les exemples qui suivent, l'utilisation des associations selon l'invention permet une résolution très améliorée de 30 l'hémoglobine et des variants de l'hémoglobine. Elle permet de ce fait d'améliorer la justesse et la précision de l'analyse qualitative et quantitative

des variants, par rapport aux analyses réalisées avec les procédés connus. Elle permet également de quantifier HbA<sub>2</sub>, même en présence de HbC ou HbE.

5 Les associations tampon zwitterionique-ralentisseur de flux de l'invention sont particulièrement utiles pour l'analyse d'échantillons où les hémoglobines normales ou variants du type HbA<sub>2</sub>, HbC, HbD, HbE, HbS, HbF et/ou HbA sont présents, pour les déceler et/ou les quantifier.

10 Enfin, l'invention a pour objet des trousse(s) (ou kits) d'analyse par EC de l'hémoglobine A<sub>2</sub> et des variants de l'hémoglobine dans un échantillon biologique, comprenant au moins une solution de tampon d'analyse contenant au moins un tampon d'analyse du type zwitterionique ou un tampon zwitterionique et au moins un ralentisseur de flux, et éventuellement un modificateur de pH. Ainsi, les trousse(s) peuvent comprendre au moins un tampon d'analyse et un ralentisseur de flux selon 15 l'invention, et une ou des solution(s) de lavage des capillaires et/ou des barrettes de dilution et/ou un (ou des) diluant(s) de l'échantillon à analyser. Elles peuvent comporter en outre au moins une solution hémolysante. Dans ce kit, le tampon et le ou les ralentisseurs(s) et diluant(s) ou autres additifs peuvent être stocké(s) séparément pour être mélangés 20 extemporanément, ou stockés en mélange. Ce kit comprend éventuellement, en outre, des indications d'utilisation pour réaliser l'analyse et/ou un support de logiciel d'identification.

25 D'autres caractéristiques et avantages de l'invention apparaîtront à la lecture de la description détaillée qui va suivre, des exemples et figures annexées.

La figure 1 représente un électrophorégramme d'un sang humain normal (HbA, HbA<sub>2</sub>) analysé par électrophorèse capillaire en utilisant une solution de tampon selon l'invention.

30 Les figures 2 à 5 représentent chacune un électrophorégramme d'un sang analysé par électrophorèse capillaire en utilisant la même

solution de tampon. Le sang comporte respectivement les variants suivants : fig. 2 : HbF et HbS ; fig. 3 : HbC ; fig. 4 : HbE ; fig. 5 : HbS et HbD-Los Angeles.

5 Les figures 6a, b, c, d représentent chacune un électrophorégramme d'un sang  $\beta$ -thalassémique, analysé par électrophorèse capillaire en utilisant quatre solutions de tampon différentes basées sur quatre ralentisseurs de flux différents.

10 Les figures 7a, b, c, d représentent chacune un électrophorégramme d'un sang comportant HbF et HbS, analysé par électrophorèse capillaire en utilisant quatre solutions de tampon différentes basées sur quatre ralentisseurs de flux différents.

15 Les conditions de réalisation d'une électrophorèse capillaire EC sont connues de l'homme de l'art. Elles peuvent comporter usuellement un lavage des capillaires par une solution de lavage, un lavage avec la solution de tampon d'analyse, une ou des dilution(s) éventuelle(s) de l'échantillon, l'injection de l'échantillon, la migration et la détection. Ces étapes peuvent être réalisées par des automates.

20 Des conditions de réalisation d'une électrophorèse capillaire sont par exemple les conditions appropriées pour utiliser l'automate Capillarys (SEBIA).

A titre de tampon zwitterionique utile selon l'invention, on peut citer les tampons de type « Tris » pourvus de plusieurs groupements hydroxyle et notamment à titre d'exemples, les tampons Tris (2-amino-2-[hydroxyméthyl]-1,3-propanediol), Tricine (N-tris[hydroxyméthyl]méthylglycine), TAPS (acide N-tris[hydroxyméthyl]méthyl-3-aminopropanesulfonique), TABS (acide N-tris[hydroxyméthyl]méthyl-4-aminobutanesulfonique), ou encore AMPD (2-amino-2-méthyl-1,3-propanediol) ou Bis Tris Propane (1,3-bis[tris(Hydroxyméthyl)méthylamino]propane), ces deux derniers et le Tris devant être associés à un acide aminé.

30

D'autres molécules comptant un nombre de groupements hydroxyle moindre conviennent également, telles que l'AMPSO (acide 3-[(1,1-diméthyl-2-hydroxyméthyl)amino]-2-hydroxy-propanesulfonique), la Bicine (N,N-bis[2-hydroxyéthyl]glycine), l'HEPBS (acide N-[2-hydroxyéthyl]pipérazine-N'-[4-butanesulfonique]), notamment.

Parmi les tampons zwitterioniques cités ci-dessus, on préfère la tricine.

Ces tampons sont connus et disponibles dans le commerce. Ils peuvent en outre être utilisés en mélange.

Comme ralentisseur de flux, parmi ceux déjà évoqués, on préfère le 1,4-diaminobutane (DAB), le 1,5-diaminopentane, le 1,6-diaminohexane, la diéthylènetriamine (DETA) et la N,N,N',N'-tétraméthyl-1,4-butanediamine. Les ralentisseurs peuvent également être utilisés en mélange.

En association avec la tricine, on préfère le chlorhydrate de 1,4-diaminobutane.

Par échantillon selon l'invention, on entend l'échantillon biologique à analyser c'est-à-dire tout liquide biologique comportant des globules rouges provenant de patients sains ou malades. Ainsi, les liquides biologiques humains peuvent être du sang, normal ou non, lavé, décanté, centrifugé ou total. De plus, le sang peut être hémolysé.

Outre les échantillons biologiques humains, on peut analyser des échantillons d'origine animale. Les échantillons peuvent aussi être d'origine synthétique, et le procédé de l'invention peut alors avoir des visées de contrôle de production par exemple.

L'échantillon peut être préalablement dilué avec une solution de dilution appropriée, une solution hémolysante ou une solution de tampon d'analyse, par exemple.

Les procédés EC mettant en œuvre les associations tampon zwitterionique/ralentisseur de flux selon l'invention sont particulièrement

utiles pour les analyses de sang et la séparation de l'hémoglobine et de ses variants dans des échantillons humains.

Selon l'invention, le pH de la solution de tampon d'analyse est compris entre 8 et 11, de préférence entre 8 et 10.

5 Les solutions de tampons d'analyse selon l'invention peuvent en outre comporter au moins un composé modifiant le pH. A titre de modificateur de pH, on peut utiliser un composé choisi parmi l'hydroxyde de lithium, l'hydroxyde de sodium, l'hydroxyde de potassium, l'hydroxyde de rubidium, l'hydroxyde de césium, l'hydroxyde de francium, un hydroxyde de  
10 mono-, di-, tri- ou tétra-alkyl ammonium ayant de 1 à 8 atomes de carbone dans la partie alkyle.

Selon l'invention, les tampons sont utilisés dans les solutions de tampon d'analyse dans les conditions et concentrations usuelles, à savoir de l'ordre de 20 à 500 mM, de préférence 100 à 250 mM.

15 Les ralentisseurs de flux sont utilisés dans les solutions de tampon, à ces concentrations comprises entre environ 0,01 et 50 mM, de préférence environ 0,10 et 20 mM.

De plus, la solution de tampon peut comporter un ou des additifs propre(s) à modifier la force ionique.

20 A titre de tels composés, on peut citer des sels tels que des sulfates, des chlorures, par exemple, et leurs mélanges.

La solution hémolysante permet de réaliser l'hémolyse des globules rouges contenant l'hémoglobine A<sub>2</sub> et les variants de l'hémoglobine. Elle est également utile à la dilution de l'échantillon avant  
25 analyse en EC. Elle peut permettre, selon sa composition, une lyse totale des globules rouges en usant d'un faible mouvement mécanique additionnel (vortex, agitation, ...).

La solution hémolysante comprend un tampon d'analyse tels que ceux déjà évoqués (tampons zwitterioniques), des additifs usuels de lyse  
30 cellulaire, comme par exemple le Triton X100 et/ou la saponine et éventuellement d'autres additifs visant à amener un effet positif sur la

résolution entre certaines hémoglobines proches. A titre d'exemple, on peut citer la solution hémolysante « Hydragel hémoglobine » de Sebia.

Le pH de la solution hémolysante est compris entre 8 et 11, de préférence entre 8 et 10.

5 Les solutions de tampon de l'invention sont préparées de façon usuelle pour des compositions de tampon d'analyse, à savoir par adjonction des constituants sous forme liquide, ou solide à diluer, à un support acceptable. De façon usuelle, le support est de l'eau, distillée ou déminéralisée.

10 Du point de vue des matériaux utilisés pour les capillaires, ceux-ci sont usuels en électrophorèse capillaire. Ainsi, on peut utiliser des capillaires de silice fondue. Leur diamètre interne peut aller de 5 à 2 000  $\mu\text{m}$ . De façon préférée, on utilise selon l'invention des capillaires de diamètre interne inférieur à 200  $\mu\text{m}$ , de préférence inférieur à 100  $\mu\text{m}$ . On  
15 utilise de préférence des capillaires à surface intérieure non traitée. Le spécialiste saura adapter la nature du capillaire et sa taille aux besoins de l'analyse.

L'utilisation de tels capillaires nus constitue un des avantages de l'invention.

20 Les hémoglobines peuvent être analysées à une longueur d'onde d'environ 200 nm, sur du sang hémolysé obtenu à partir de sang lavé, décanté ou centrifugé. Néanmoins, pour éviter des interférences avec les protéines plasmatiques, elles sont de préférence analysées à une  
25 longueur d'onde d'environ 415 nm, sur sang hémolysé obtenu à partir de sang lavé, décanté, centrifugé ou total.

## Exemples

### MATERIEL ET METHODES

#### A) Electrophorèse capillaire

5 L'électrophorèse capillaire d'échantillons cliniques est réalisée sur un appareil d'EC équipé d'un capillaire en silice fondue de diamètre interne 25 microns.

La détection est réalisée dans des conditions optimales autour de 415 nm.

10 Les échantillons sont placés dans l'appareil Capillarys (SEBIA) et automatiquement injectés par injection hydrodynamique. La séparation des échantillons est réalisée en moins de 8 minutes en appliquant un champ électrique d'environ 550 V/cm. Le capillaire est lavé avant chaque analyse par la soude 0,25 M, puis par la solution de tampon d'analyse.

15 Tampons d'analyse :

Les produits chimiques utilisés sont de grade analytique.

20 . Le tampon Tricine 200 mM –1,4-diaminobutane 15 mM (A) est préparé en dissolvant 35,84 g de Tricine dans environ 900 ml d'eau déminéralisée, puis en ajoutant 2,32 g de chlorhydrate de 1,4-diaminobutane (DAB). Le pH est ajusté à 9,37 à 22°C par environ 38,3 ml de NaOH 5M et le volume de la solution de tampon ajusté à 1 l par de l'eau déminéralisée.

25 . Le tampon Tricine 200 mM –1,5-diaminopentane 15 mM (B) est préparé en dissolvant 35,84 g de Tricine dans environ 900 ml d'eau déminéralisée, puis en ajoutant 2,62 g de chlorhydrate de 1,5-diaminopentane. Le pH est ajusté à 9,40 à 22°C par environ 38,4 ml de NaOH 5M et le volume de la solution de tampon ajusté à 1 l par de l'eau déminéralisée.

30 . Le tampon Tricine 200 mM –diéthylènetriamine 20 mM (C) est préparé en dissolvant 35,84 g de Tricine dans environ 900 ml d'eau déminéralisée, puis en ajoutant 2,06 g de diéthylènetriamine (DETA). Le pH

est ajusté à 9,40 à 22°C par environ 32,4 ml de NaOH 5M et le volume de la solution de tampon ajusté à 1 l par de l'eau déminéralisée.

. Le tampon Tricine 200 mM – N,N,N',N'-Tétraméthyl-1,4-butanediamine 8 mM (D) est préparé en dissolvant 35,84 g de Tricine dans environ 900 ml d'eau déminéralisée, puis en ajoutant 1,15 g de N,N,N',N'-Tétraméthyl-1,4-butanediamine. Le pH est ajusté à 9,19 à 22°C par environ 34,7 ml de NaOH 5M et le volume de la solution de tampon ajusté à 1 l par de l'eau déminéralisée.

#### B) Echantillons cliniques :

Pour l'EC, le sang humain, décanté ou centrifugé, est dilué au 1/6<sup>ème</sup> dans la solution hémolysante. Celle-ci est préparée en dissolvant 1,00 g de Triton X100, 2,50 g de saponine, 3,63 g de Tris dans environ 900 ml d'eau déminéralisée. Le pH est ajusté à 8,70 à 22, 0°C et le volume de la solution ajusté à 1 l par de l'eau déminéralisée. Les produits chimiques utilisés sont de grade analytique.

#### Exemples 1 à 5

Une solution de tampon d'analyse Tricine/DAB.2HCl est préparé comme ci-dessus.

L'électrophorèse a été réalisée selon la méthode ci-dessus sur un sang humain.

Exemple 1 : analyse d'un sang humain normal avec HbA en pic principal et HbA<sub>2</sub>, fraction plus petite. (Figure 1)

Exemple 2 : analyse d'un sang humain malade qui montre une fraction HbA plus faible, une fraction HbF augmentée, une fraction HbS forte et une fraction HbA<sub>2</sub> normale. Il s'agit d'une HbS hétérozygote à l'origine de la maladie de drépanocytose. (Figure 2)

Exemple 3 : analyse d'un sang humain de malade présentant une hétérozygotie A/C. La fraction HbC sort juste avant la fraction HbA<sub>2</sub> dont elle est bien résolue. Cette bonne résolution autorise la quantification

de A<sub>2</sub> ce qui permet d'orienter le diagnostic en cas de β-thalassémie, c'est-à-dire de fraction HbA<sub>2</sub> augmentée. (Figure 3)

5 Exemple 4 : analyse d'un sang humain présentant une hétérozygotie A/E. La fraction HbE sort juste après la fraction HbA<sub>2</sub> dont elle est totalement résolue. Il n'y a donc aucun problème pour quantifier HbA<sub>2</sub> en présence d'HbE. (Figure 4)

10 Exemple 5 : analyse d'un mélange d'un sang présentant une hétérozygotie A/S et d'un sang présentant une hétérozygotie A/D Los Angeles. Les fractions HbS et HbD sont partiellement résolues ce qui permet de les distinguer l'une de l'autre sans nécessité d'une analyse complémentaire. (Figure 5)

Exemple 6 : analyse d'un sang humain β-thalassémique, c'est-à-dire présentant un pourcentage de la fraction HbA<sub>2</sub> augmenté et présentant une petite fraction HbF.

15 Quatre solutions de tampons d'analyse A, B, C et D sont préparées comme ci-dessus.

L'électrophorèse a été réalisée selon la méthode décrite ci-dessus.

20 La figure 6a) montre le résultat avec le tampon A (Tricine/DAB.2HCl). La figure 6b) montre le résultat avec le tampon B (Tricine/1,5-diaminopentane.2HCl). La figure 6c) montre le résultat avec le tampon C (Tricine/DETA). La figure 6d) montre le résultat avec le tampon D (Tricine/N,N,N',N'-Tétraméthyl-1,4-butanediamine).

25 La comparaison de ces quatre figures permet d'observer, dans tous les cas, une bonne séparation de chacune des fractions ainsi qu'une bonne focalisation des petites fractions HbF et HbA<sub>2</sub>.

Exemple 7 : analyse d'un sang humain présentant une hétérozygotie drépanocytaire (HbS/HbA).

30 Quatre solutions de tampons d'analyse (A : Tricine/DAB.2HCl ; B : Tricine/1,5-diaminopentane.2HCl ; C : Tricine/DETA ; D :

Tricine/N,N,N',N'-Tétraméthyl-1,4-butanediamine) sont préparées comme ci-dessus.

L'électrophorèse a été réalisée selon la méthode décrite ci-dessus. (Figure 7)

5 L'ordre des figures correspond aux tampons déjà évoqués. Là encore, on peut observer des profils comparables quel que soit le tampon utilisé.

Références

1. Noriaki Ishioka et al., Biomedical Chromatography, vol. 6, 224-226 (1992).
- 5 2. Ahmet Sahin et al., Journal of Chromatography A, 709 (1995) 121-125.
3. Margaret A. Jenkins, Michael D. Guerin, Journal of Chromatography B, 682 (1996) 23-34.
4. Margaret A. Jenkins, Jean Hendy, Ian L. Smith, J. CAP. ELEC. 004 :  
10 3 (1997) 137-143.
5. Margaret A. Jenkins, Sujiva Ratnaike, Clinica Chimica Acta 289 (1999) 121-132.
6. Zak K. Shihabi et al., Electrophoresis, 21 (2000), 749-752.
7. James M. Hempe, Randall D. Craver, Electrophoresis, 21 (2000)  
15 743-748.

## REVENDICATIONS

1. Procédé de séparation par électrophorèse capillaire des hémoglobines dans des échantillons biologiques, dans lequel on fait passer l'échantillon comportant lesdites hémoglobines dans un capillaire contenant un tampon d'analyse, comportant au moins une étape où on introduit l'échantillon dans un tube capillaire contenant une solution d'au moins un tampon d'analyse.

caractérisé en ce que le tampon est du type zwitterionique et est associé à au moins un ralentisseur de flux.

2. Procédé selon la revendication 1, caractérisé en ce qu'il comporte en outre la séparation des hémoglobines par migration et la détection de ces hémoglobines.

3. Procédé selon la revendication 1 ou 2, caractérisé en ce que l'échantillon est un échantillon de sang, normal ou non, lavé, décanté, centrifugé ou total.

4. Procédé selon l'une des revendications 1 à 3, caractérisé en ce que l'échantillon est un échantillon de sang hémolysé.

5. Procédé selon l'une des revendications 1 à 4, caractérisé en ce que les hémoglobines sont l'hémoglobine A<sub>2</sub> et les hémoglobines C, D, E, S, F et/ou A.

6. Procédé selon l'une des revendications 1 à 5, caractérisé en ce que le tampon zwitterionique est formé d'une ou deux molécules, et comporte au moins une fonction amine, au moins une fonction acide et au moins une fonction hydroxyle en position opposée à la fonction acide.

7. Procédé selon l'une des revendications 1 à 6, caractérisé en ce que le tampon est choisi parmi Tricine, TAPS, TABS, AMPSO, Bicine ou HEPBS, ou l'association de Tris, AMPD ou Bis Tris Propane avec un acide aminé.

8. Procédé selon l'une des revendications 1 à 7, caractérisé en ce que le tampon est la Tricine.

9. Procédé selon l'une des revendications 1 à 8, caractérisé en ce que le ralentisseur de flux est du type diamine ou polyamine aliphatique ou cyclique.

5 10. Procédé selon l'une des revendications 1 à 9, caractérisé en ce que ledit ralentisseur de flux est choisi parmi les diamines aliphatiques, les polyamines aliphatiques, et leurs dérivés et sels acceptables, et leurs mélanges.

10 11. Procédé selon l'une des revendications 1 à 10, caractérisé en ce que ledit ralentisseur de flux est choisi parmi le 1,3-diaminopropane, le 1,4-diaminobutane, le 1,5-diaminopentane, le 1,6-diaminohexane, la diéthylènetriamine, la spermine, la N,N'-diméthyl-1,6-hexanediamine, la tétraéthylènepentamine, la N,N,N',N'-tétraméthyl-1,4-butanediamine et leurs dérivés ou sels acceptables, et leurs mélanges.

15 12. Procédé selon l'une des revendications 1 à 11, caractérisé en ce que ledit ralentisseur de flux est choisi parmi le 1,4-diaminobutane, le 1,5-diaminopentane, le 1,6-diaminohexane, la diéthylènetriamine, la N,N,N',N'-tétraméthyl-1,4-butanediamine et leurs dérivés ou sels acceptables, et leurs mélanges.

20 13. Procédé selon l'une des revendications 1 à 12, caractérisé en ce que le ralentisseur de flux est le 1,4-diaminobutane.

14. Procédé selon l'une des revendications 1 à 13, caractérisé en ce que le ralentisseur de flux est le 1,4-diaminobutane sous forme chlorhydrate.

25 15. Procédé selon l'une des revendications 1 à 14, caractérisé en ce que la concentration en tampon dans la solution de tampon est comprise entre 20 mM et 500 mM.

16. Procédé selon l'une des revendications 1 à 15, caractérisé en ce que la concentration en tampon dans la solution de tampon est comprise entre 100 mM et 250 mM.

17. Procédé selon l'une des revendications 1 à 16, caractérisé en ce que la concentration en ralentisseur de flux dans la solution de tampon est comprise entre 0,01 et 50 mM.

18. Procédé selon l'une des revendications 1 à 17, caractérisé en ce que la concentration en ralentisseur de flux dans la solution de tampon est comprise entre 0,10 mM et 20 mM.

19. Procédé selon l'une des revendication 1 à 18, caractérisé en ce que la solution de tampon comporte en outre un modificateur de pH.

20. Procédé selon la revendication 19, caractérisé en ce que le modificateur de pH est choisi parmi l'hydroxyde de lithium, l'hydroxyde de sodium, l'hydroxyde de potassium, l'hydroxyde de rubidium, l'hydroxyde de césium, l'hydroxyde de francium, un hydroxyde de mono-, di-, tri- ou tétra-alkyl ammonium ayant de 1 à 8 atomes de carbone dans la partie alkyle.

21. Procédé selon l'une des revendications 1 à 20, caractérisé en ce que le capillaire est nu.

22. Procédé selon l'une des revendications 1 à 21, caractérisé en ce que le capillaire est en silice fondue.

23. Procédé selon l'une des revendications 1 à 22, caractérisé en ce que le pH de la solution de tampon d'analyse est compris entre 8 et 10.

24. Procédé selon l'une des revendications 1 à 23, caractérisé en ce que l'électrophorèse est du type électrophorèse capillaire en solution libre.

25. Utilisation d'un ralentisseur de flux choisi parmi les diamines et polyamines aliphatiques et cycliques, dans un procédé d'électrophorèse capillaire des hémoglobines, en association avec au moins un tampon zwitterionique dans une solution de tampon.

26. Utilisation selon la revendication 25, dans laquelle le ralentisseur de flux est choisi parmi les diamines aliphatiques, les polyamines aliphatiques, leurs dérivés et sels acceptables, et leurs mélanges.

27. Utilisation selon la revendication 25 ou 26, dans laquelle le tampon zwitterionique est présent à une concentration d'environ 20 à 500 mM, et le ralentisseur est présent à une concentration d'environ 0,01 à 50 mM.

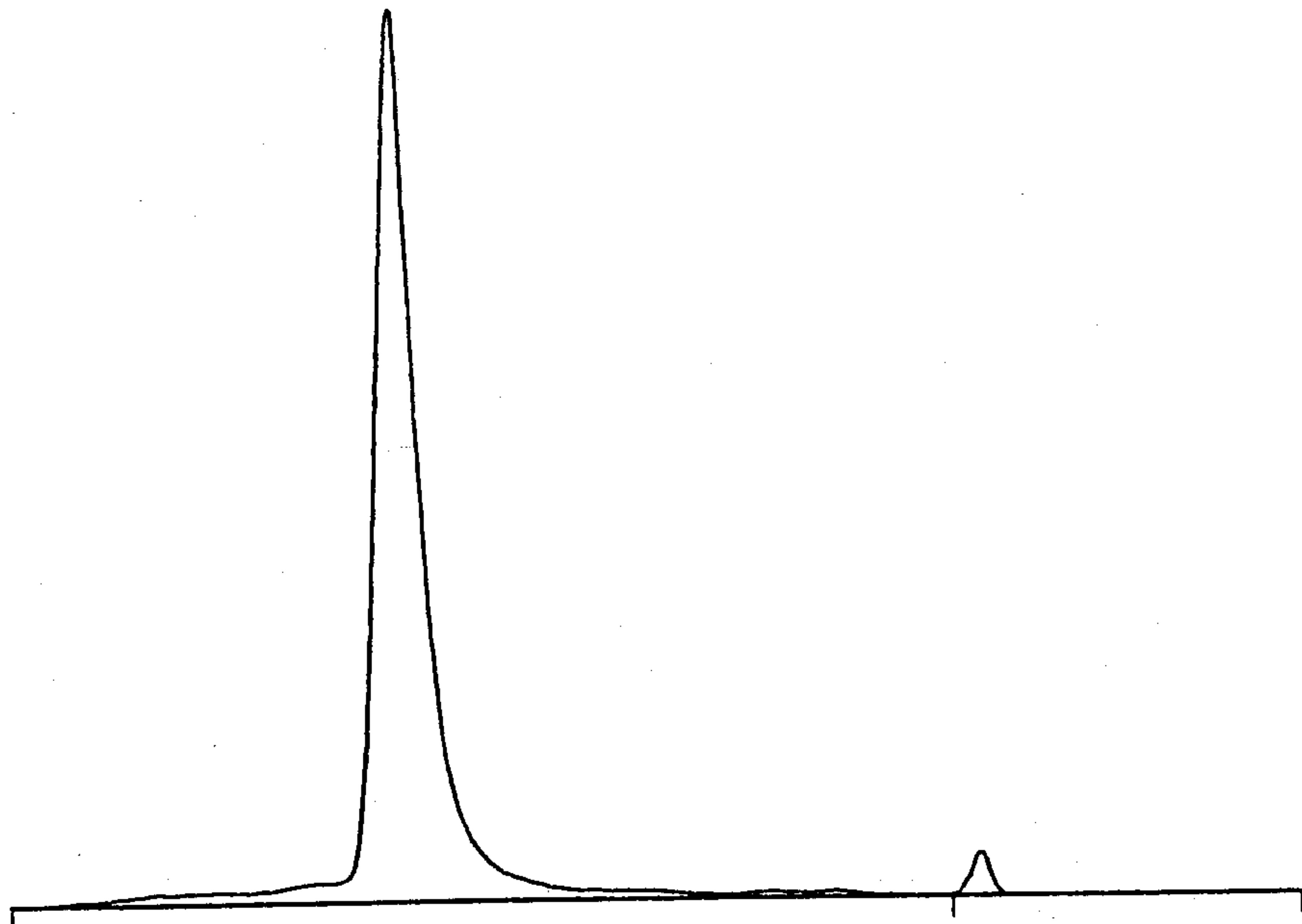
5 28. Utilisation selon l'une des revendications 25 à 27, dans un procédé d'électrophorèse capillaire en solution libre.

29. Trousse d'analyse de l'hémoglobine par électrophorèse capillaire, comprenant au moins une solution de tampon d'analyse contenant au moins un tampon d'analyse du type zwitterionique ou un  
10 tampon zwitterionique et au moins un ralentisseur de flux, et éventuellement un modificateur de pH.

30. Trousse d'analyse selon la revendication 29, caractérisée en ce qu'elle comporte en outre une solution hémolysante.

**Smart & Biggar  
Ottawa, Canada  
Patent Agents**

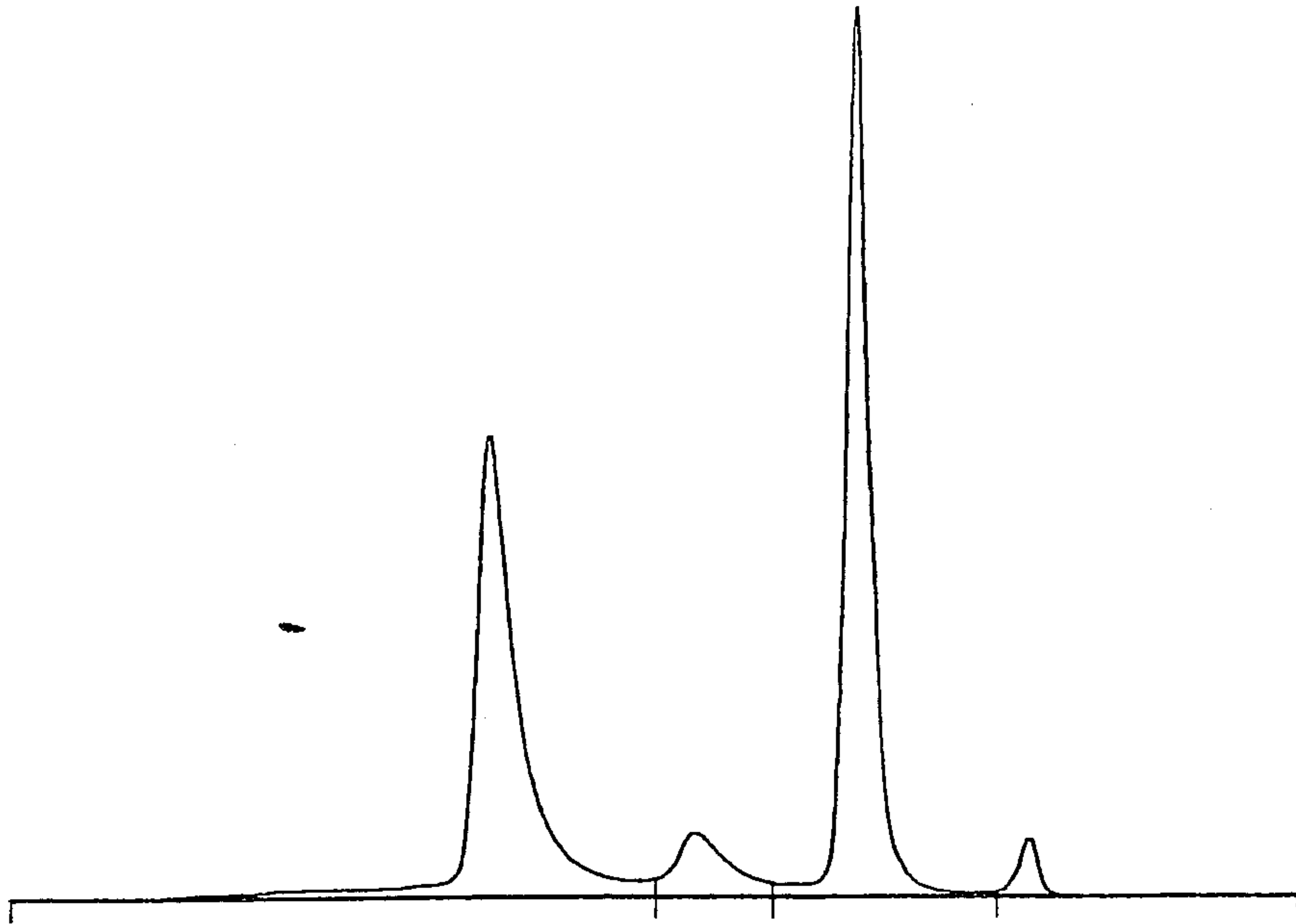
1/13



	%
HbA	98,2
HbA2	1,8

FIG 1

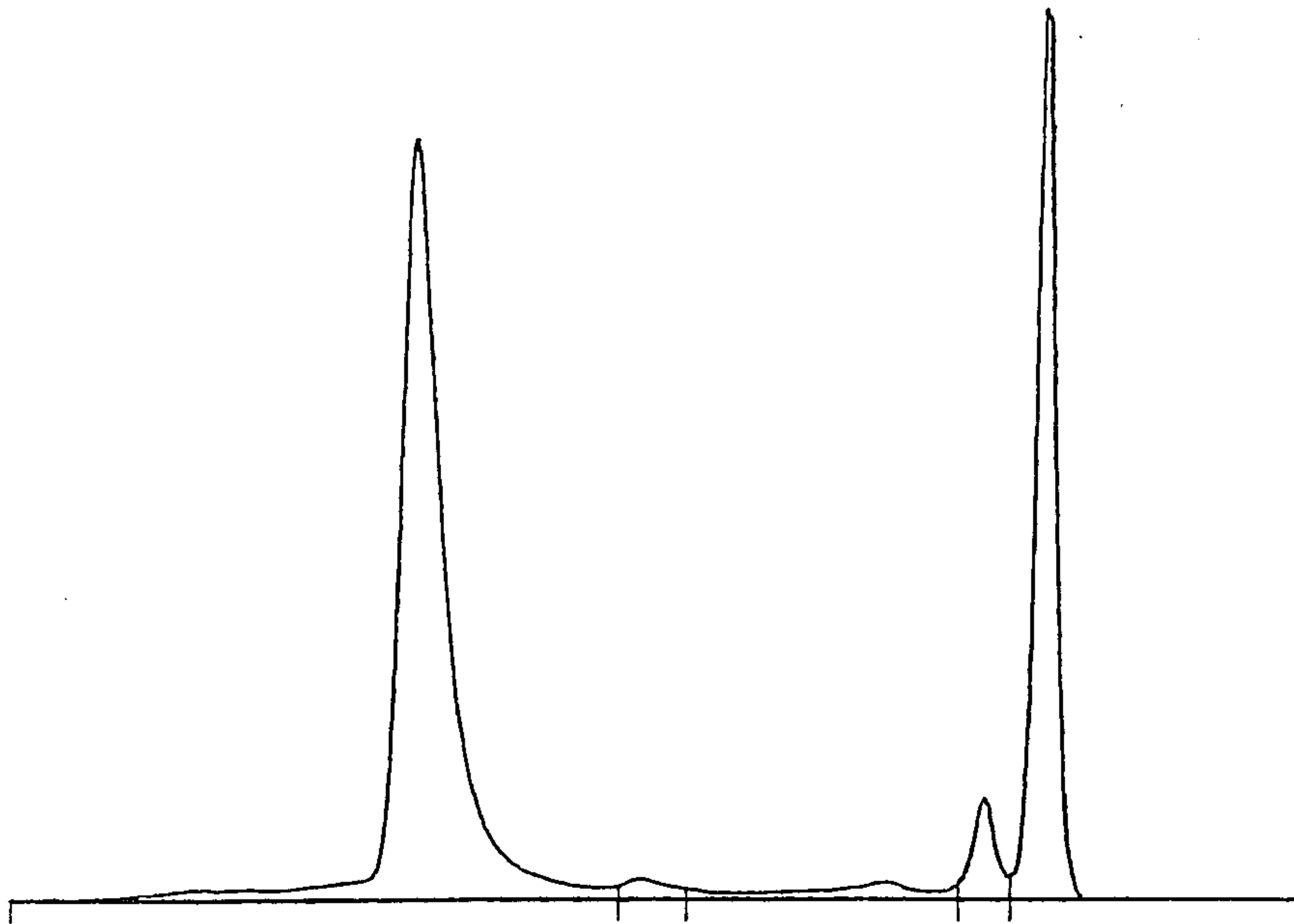
2/13



	%
HbA	44,0
HbF	7,1
HbS	46,5
HbA2	2,4

FIG 2

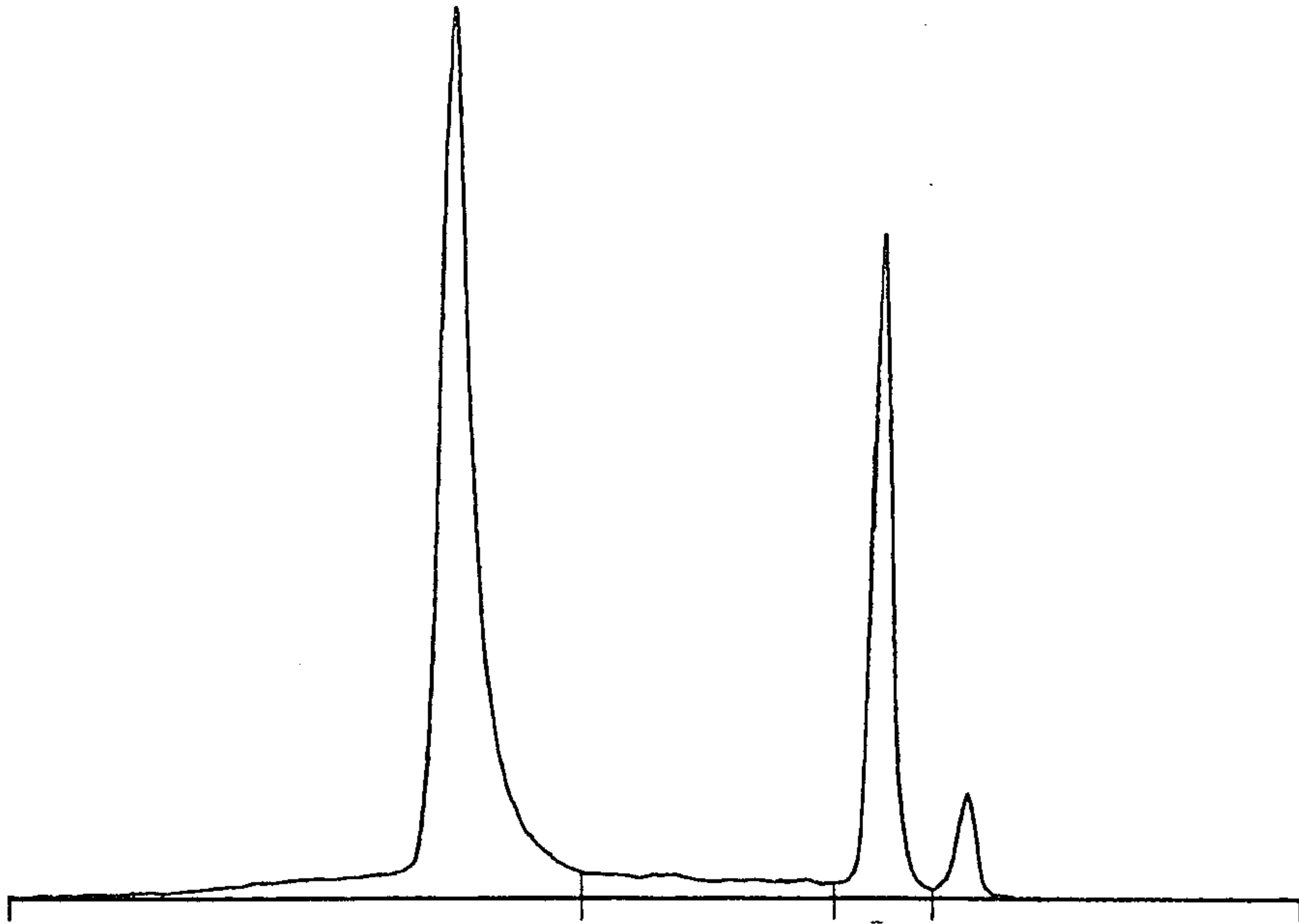
3/13



	%
HbA	60,9
HbF	1,6
MetHb	3,9
HbA2	4,0
HbC	29,6

FIG 3

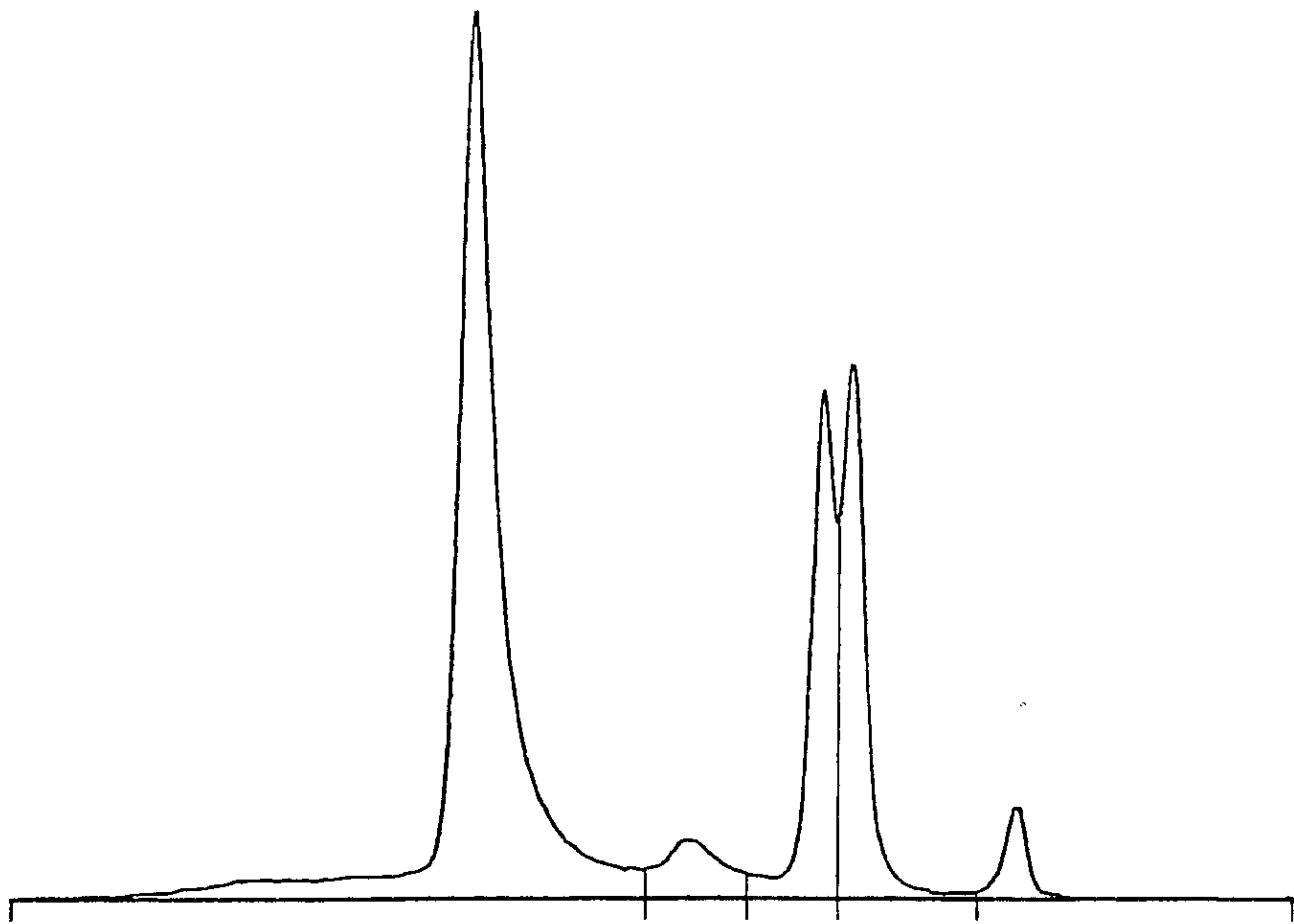
4/13



	%
HbA	65,2
MetHb	7,4
HbE	23,5
HbA2	3,9

FIG 4

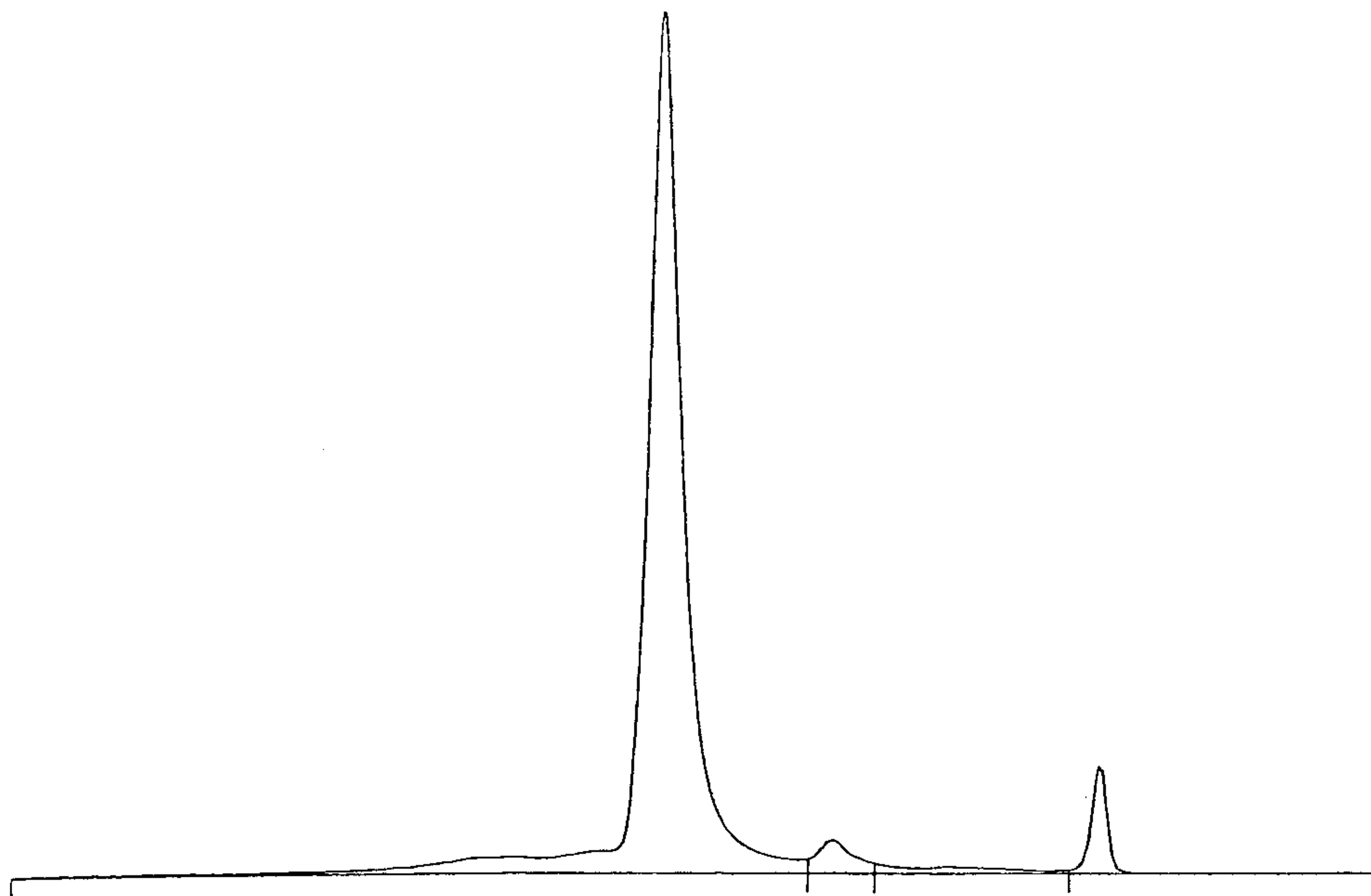
5/13



	%
HbA	55,6
HbF	4,8
HbD	18,4
HbS	18,2
HbA2	3,0

FIG 5

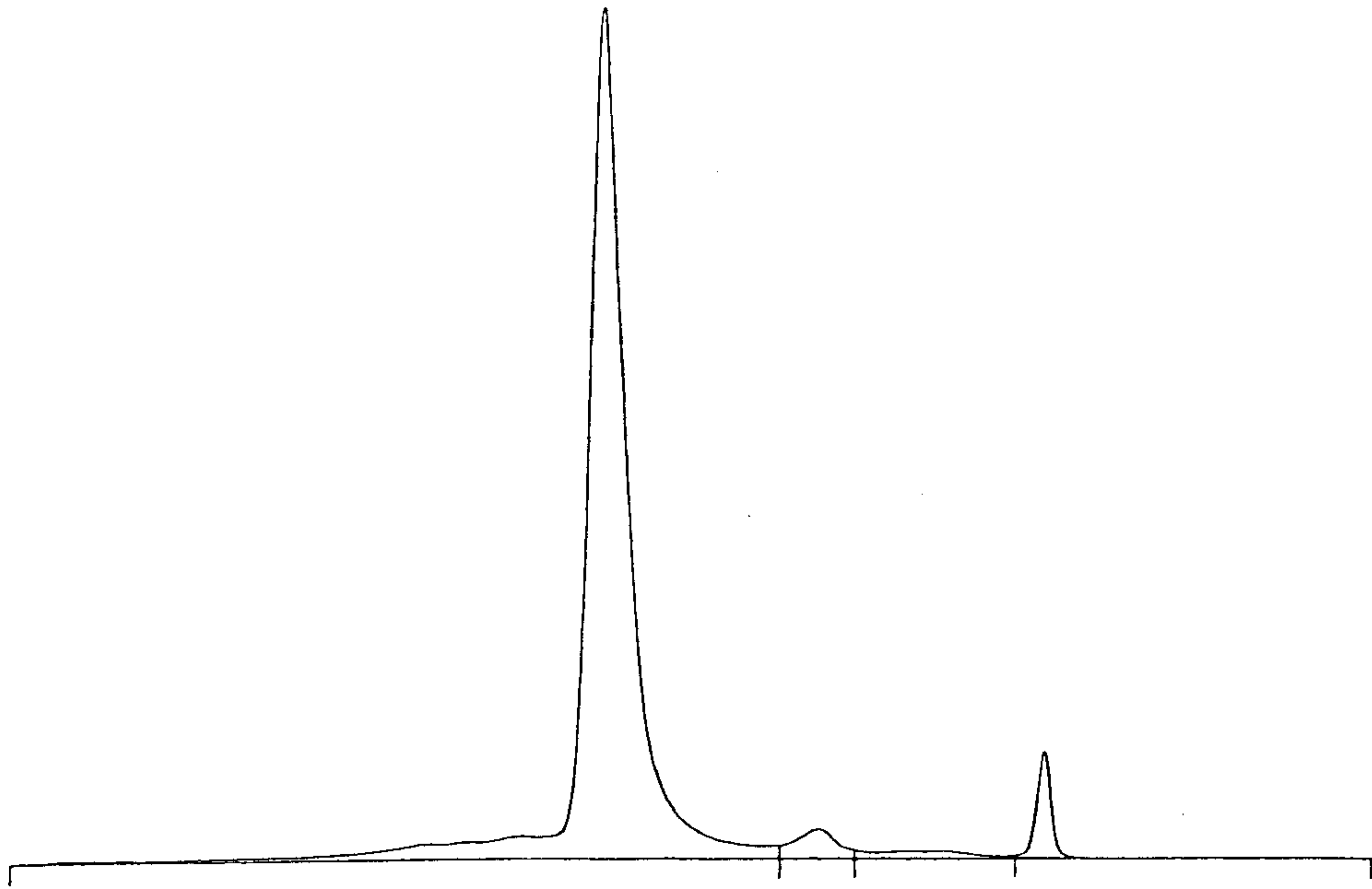
6/13



	%
HbA	90,3
HbF	3,2
MetHb	2,2
HbA2	4,3

FIG 6A

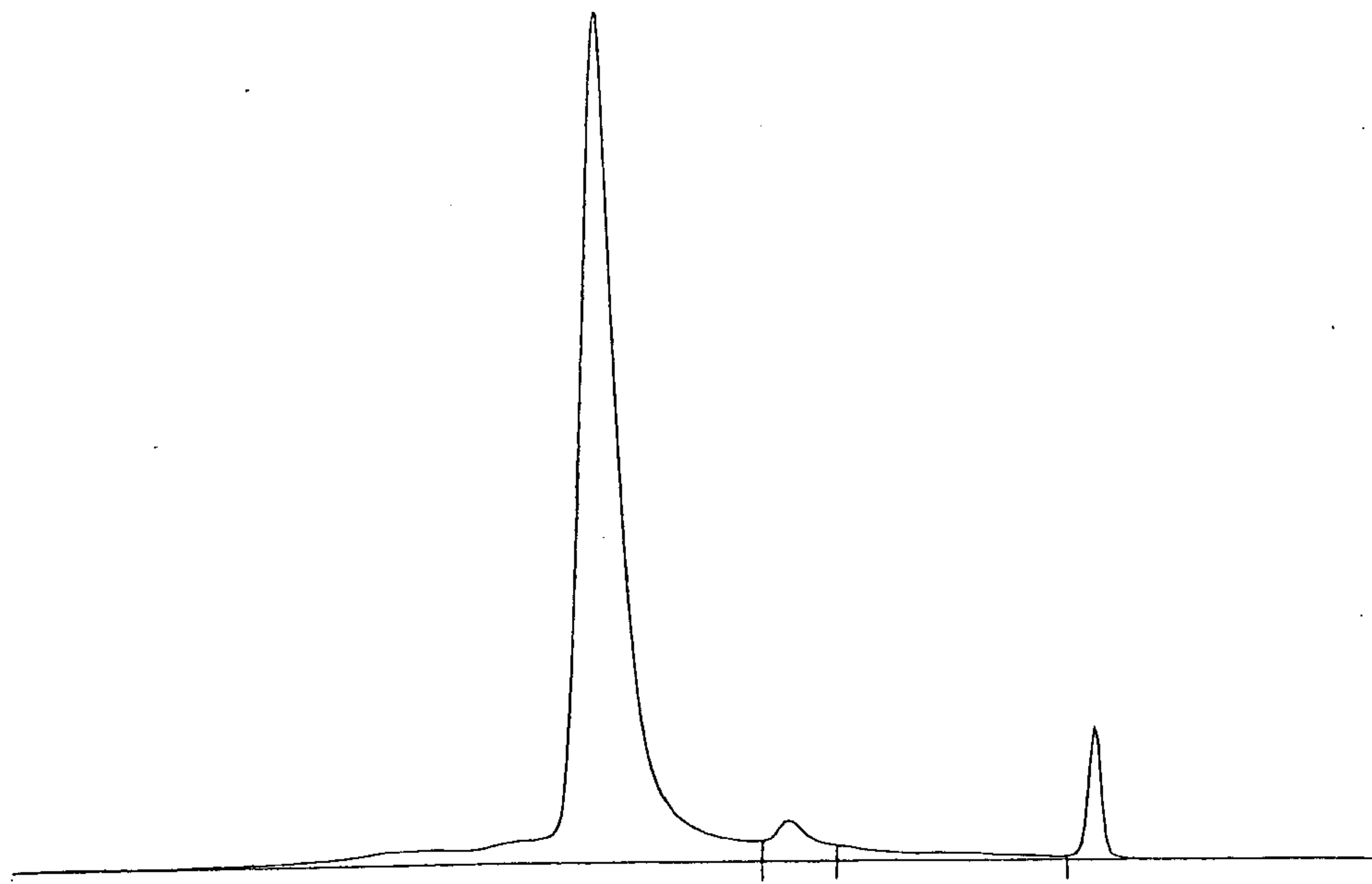
7/13



	%
HbA	90,4
HbF	3,3
MetHb	2,0
HbA2	4,3

FIG 6B

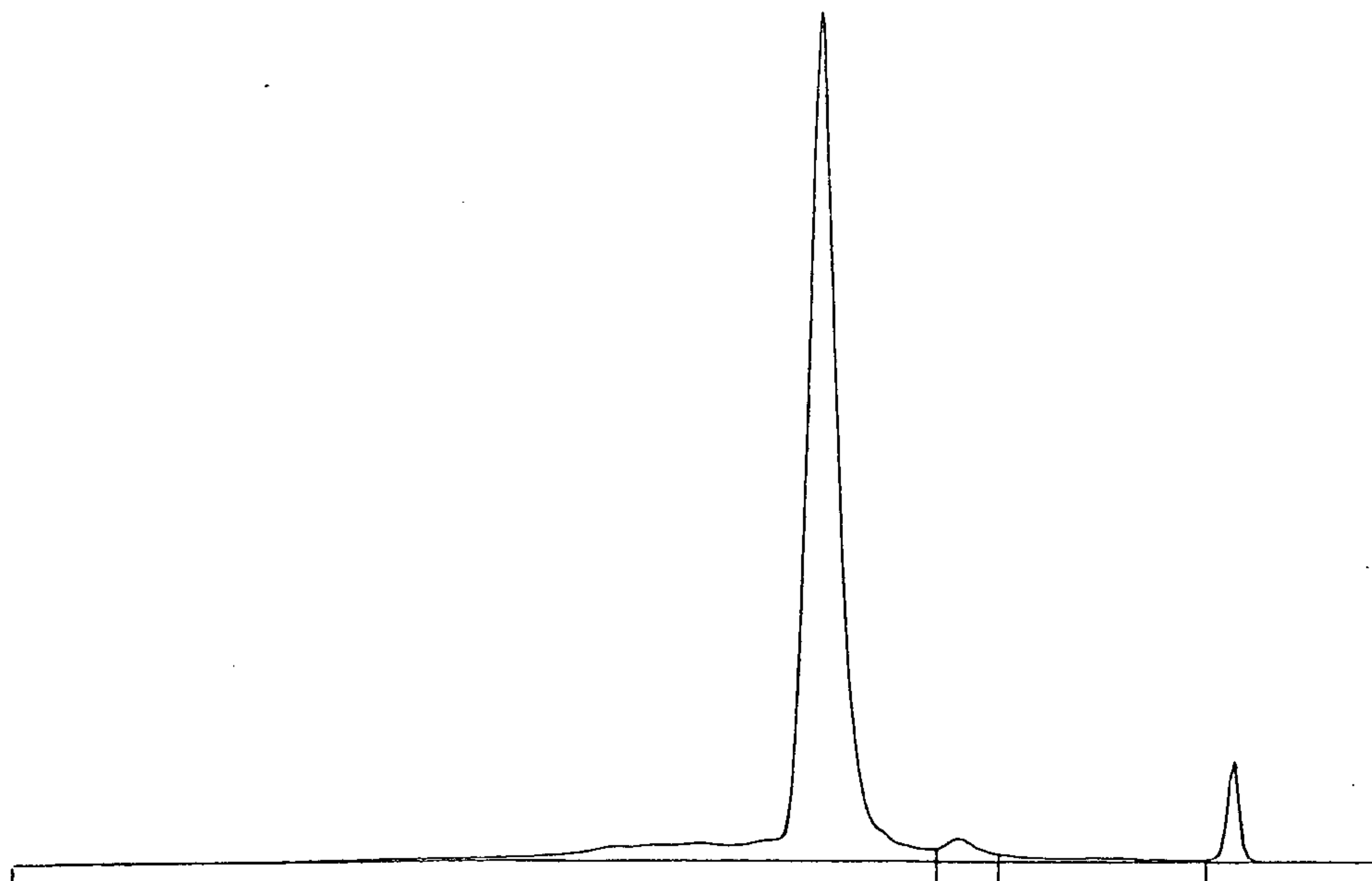
8/13



	%
HbA	88,2
HbF	3,9
MetHb	3,4
HbA2	4,5

FIG 6C

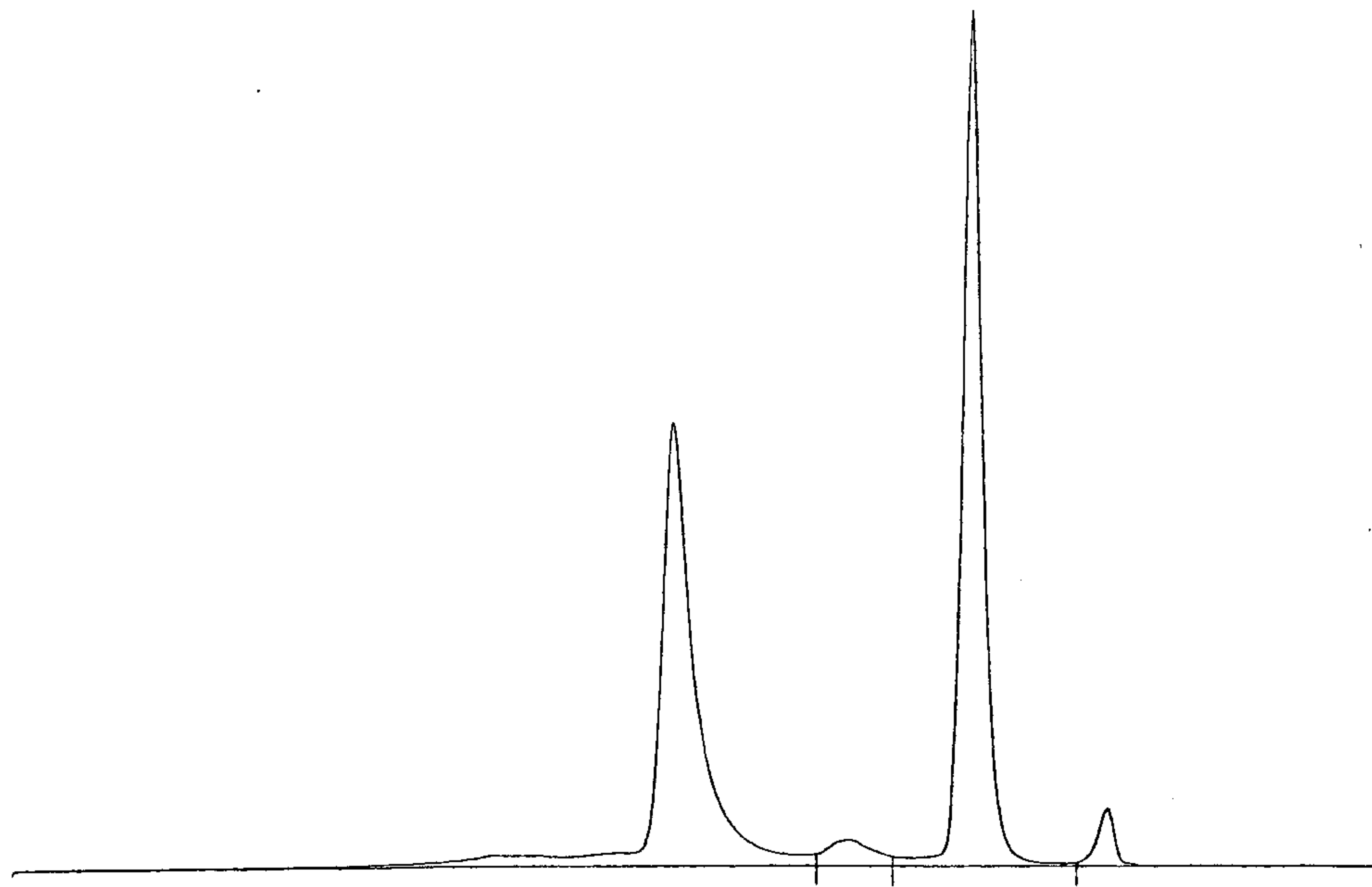
9/13



	%
HbA	91,6
HbF	2,6
MetHb	1,9
HbA2	3,9

FIG 6D

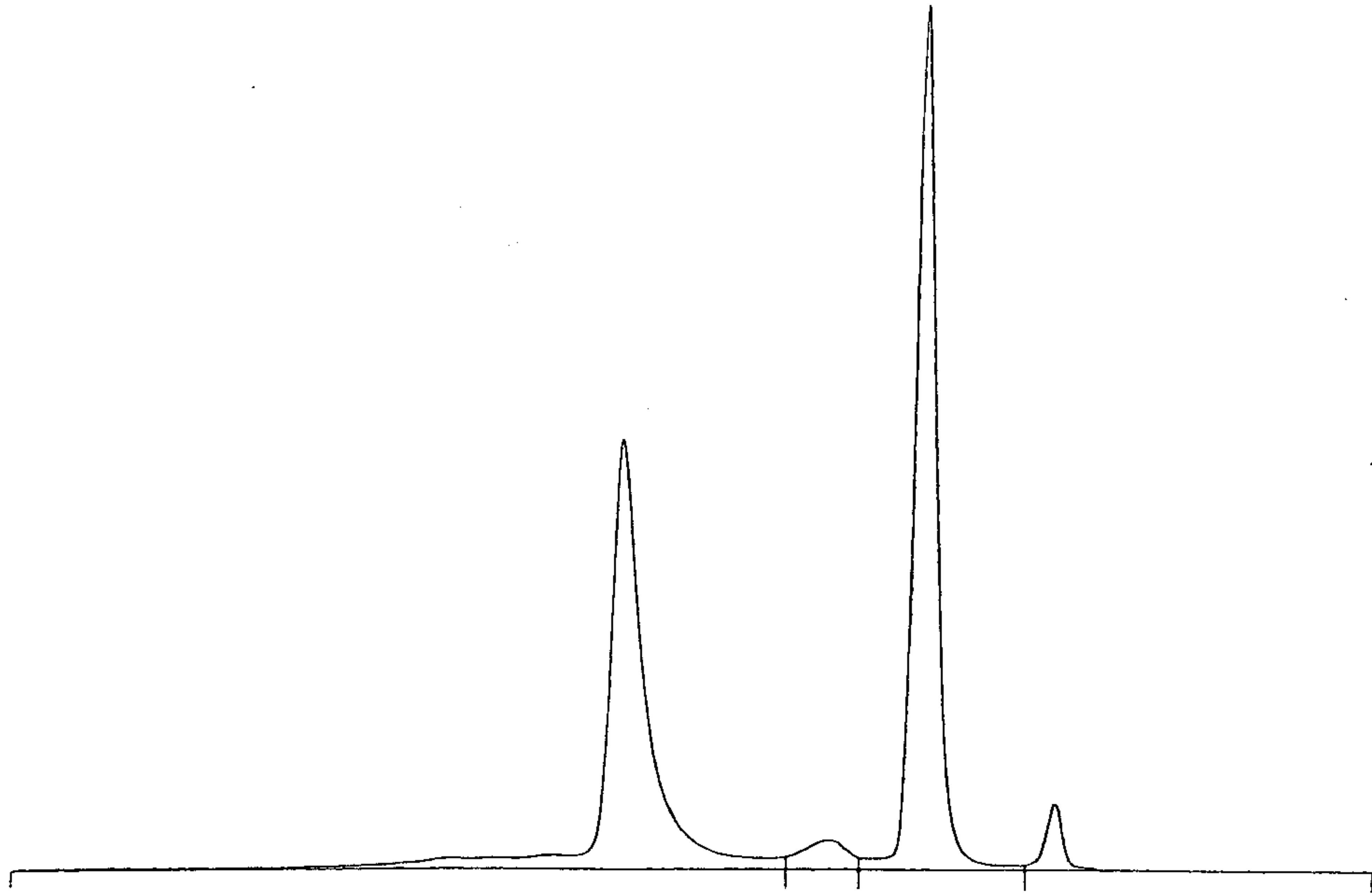
10/13



	%
HbA	46,2
HbF	3,3
HbS	47,7
HbA2	2,8

FIG 7A

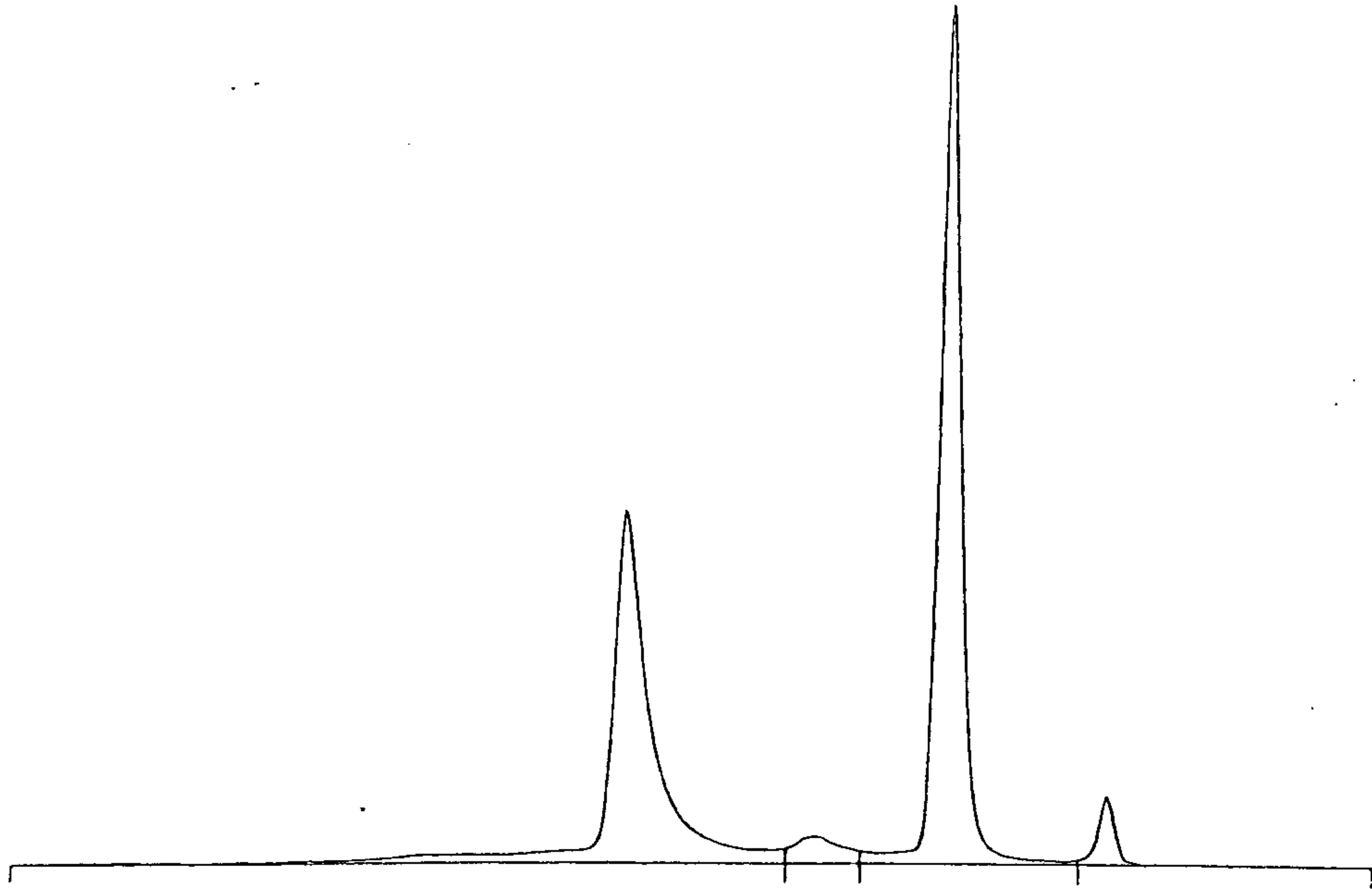
11/13



	%
HbA	46,4
HbF	3,5
HbS	47,1
HbA2	3,0

FIG 7B

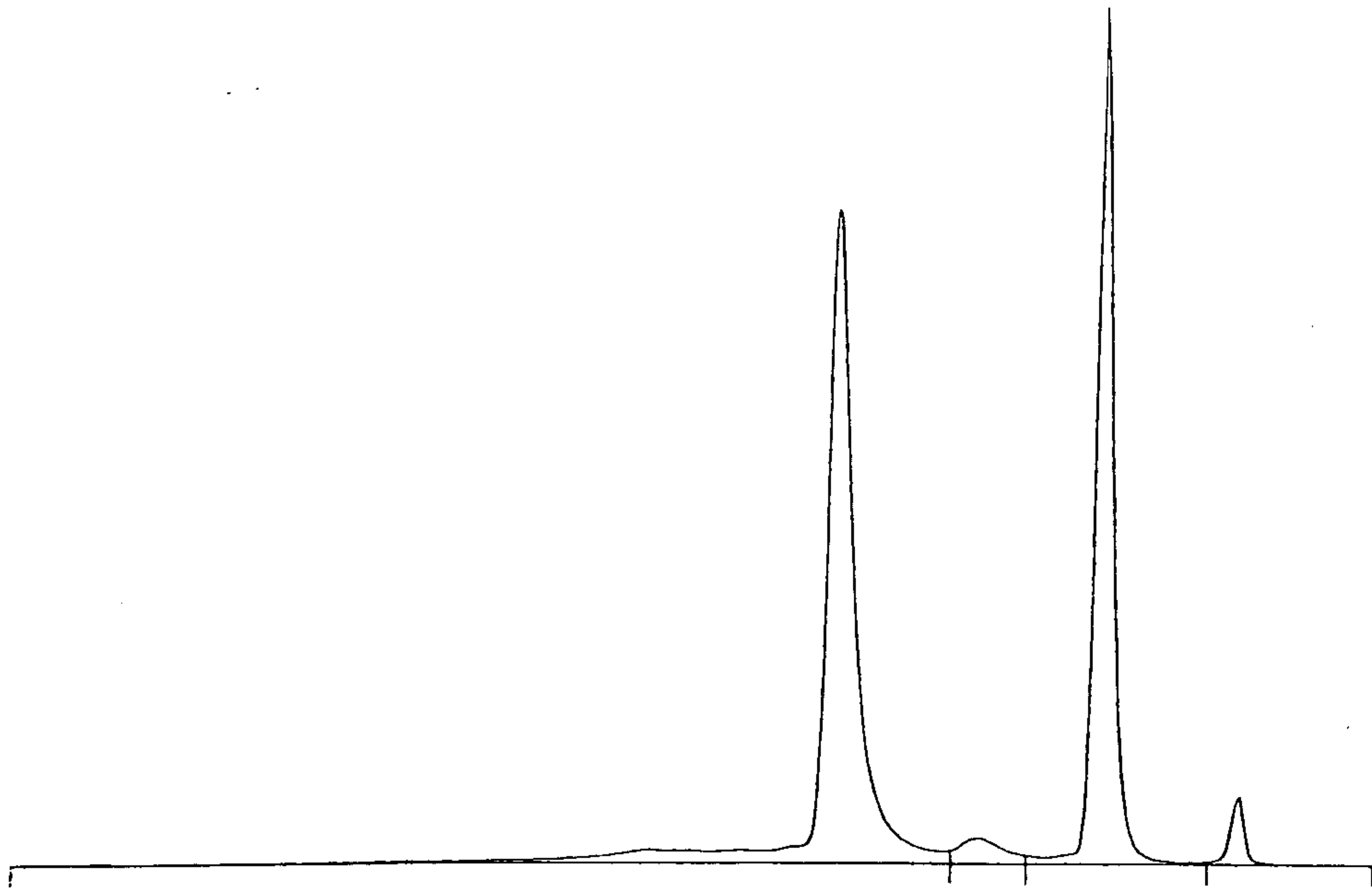
12/13



	%
HbA	42,1
HbF	3,7
HbS	51,3
HbA2	2,9

FIG 7C

13/13



	%
HbA	55,5
HbF	3,1
HbS	38,8
HbA2	2,6

FIG 7D