



DÉFINITION ET EXPLORATION BIOLOGIQUE DE L'HÉMOLYSE

Dr Nicolas HEBERT

UMR_955 Transfusion et maladies du globule rouge - France PIRENNE

Hôpitaux Universitaires Henri MONDOR



DÉFINITION



- Hémolysé
 - Destruction des hématies.
 - Le **phénomène physiologique**, assuré par les macrophages de la moelle hématopoïétique, de la rate et du foie, survient à l'issue de 100 à 120 jours.
 - Le **raccourcissement de la durée de vie des hématies** correspond soit à une anomalie constitutionnelle, soit à une agression extérieure.
 - Les **anomalies** de la membrane érythrocytaire, de l'hémoglobine ou de l'équipement enzymatique des hématies sont à l'origine des anémies hémolytiques constitutionnelles.
 - Les **formes acquises** répondent à des processus variés : immunologique, toxique, infectieux, parasitaire, mécanique.

DÉFINITION

- Hémolyse
 - **Déséquilibre** entre la production et la destruction des globules rouges

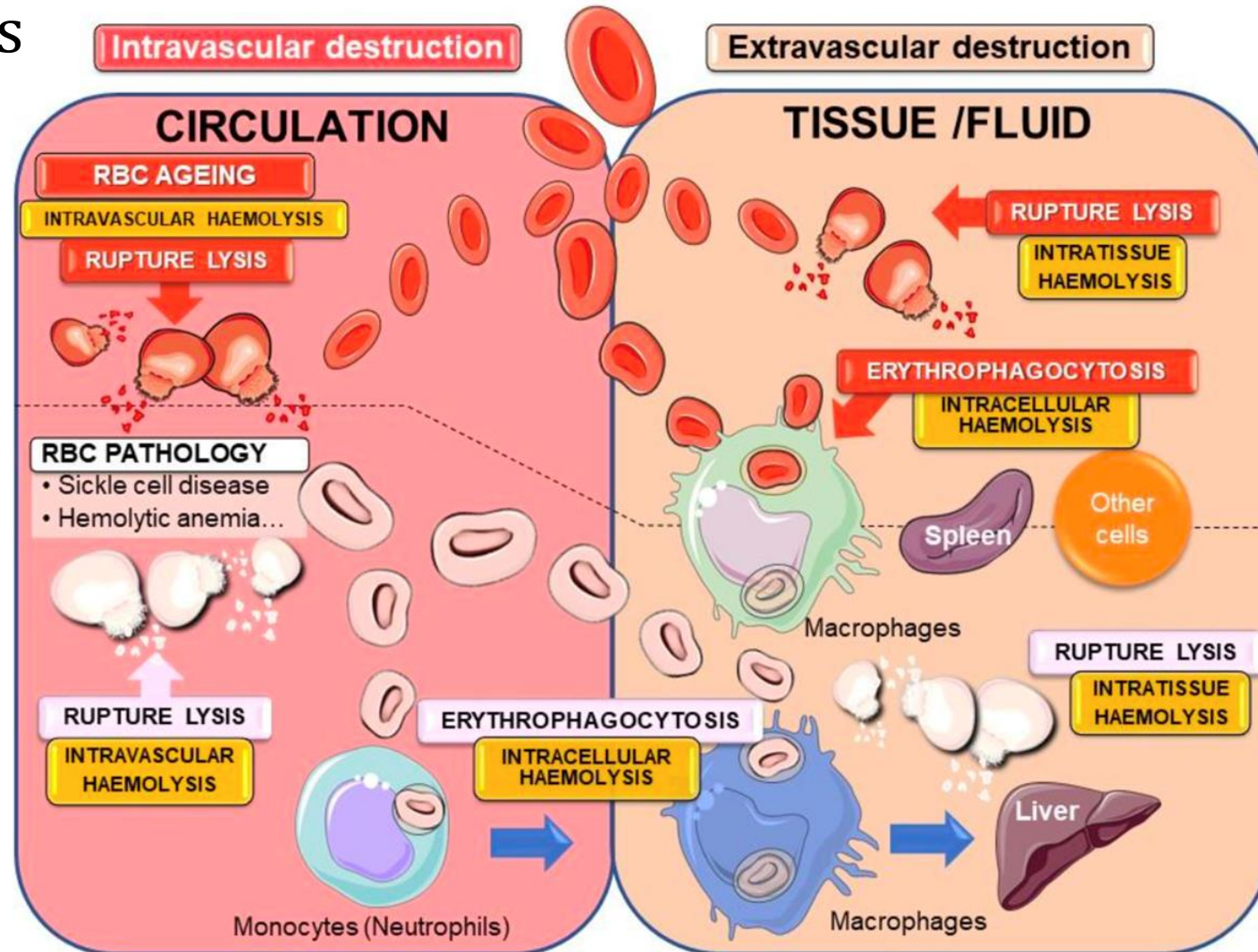


Destruction > production

- Entraîne dans la plupart des cas une réduction globale de la durée de vie des globules rouges, éliminés prématurément de la circulation

DÉFINITION

- Hémolyses

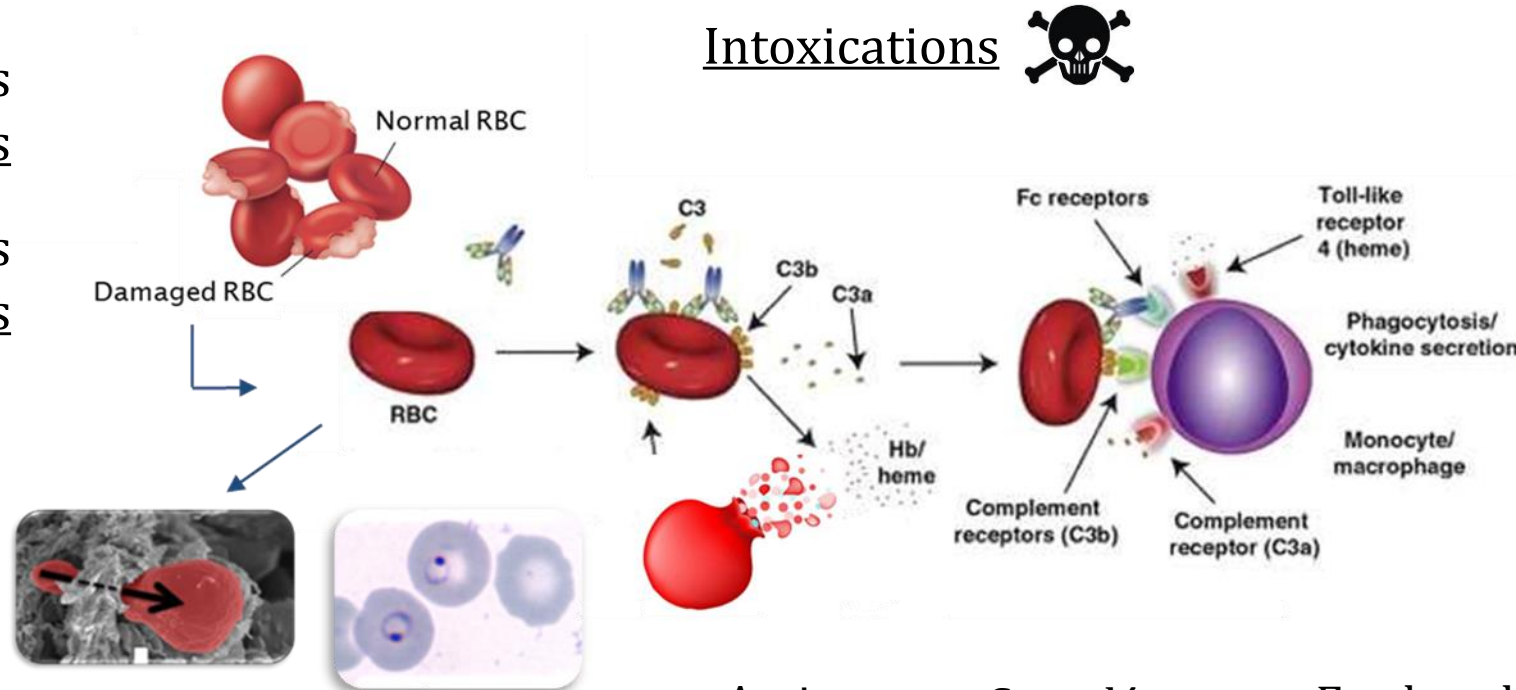


DÉFINITION

- Hémolyses : nombreuses causes et nombreux acteurs

Anomalies
génétiques

Anomalies
induites



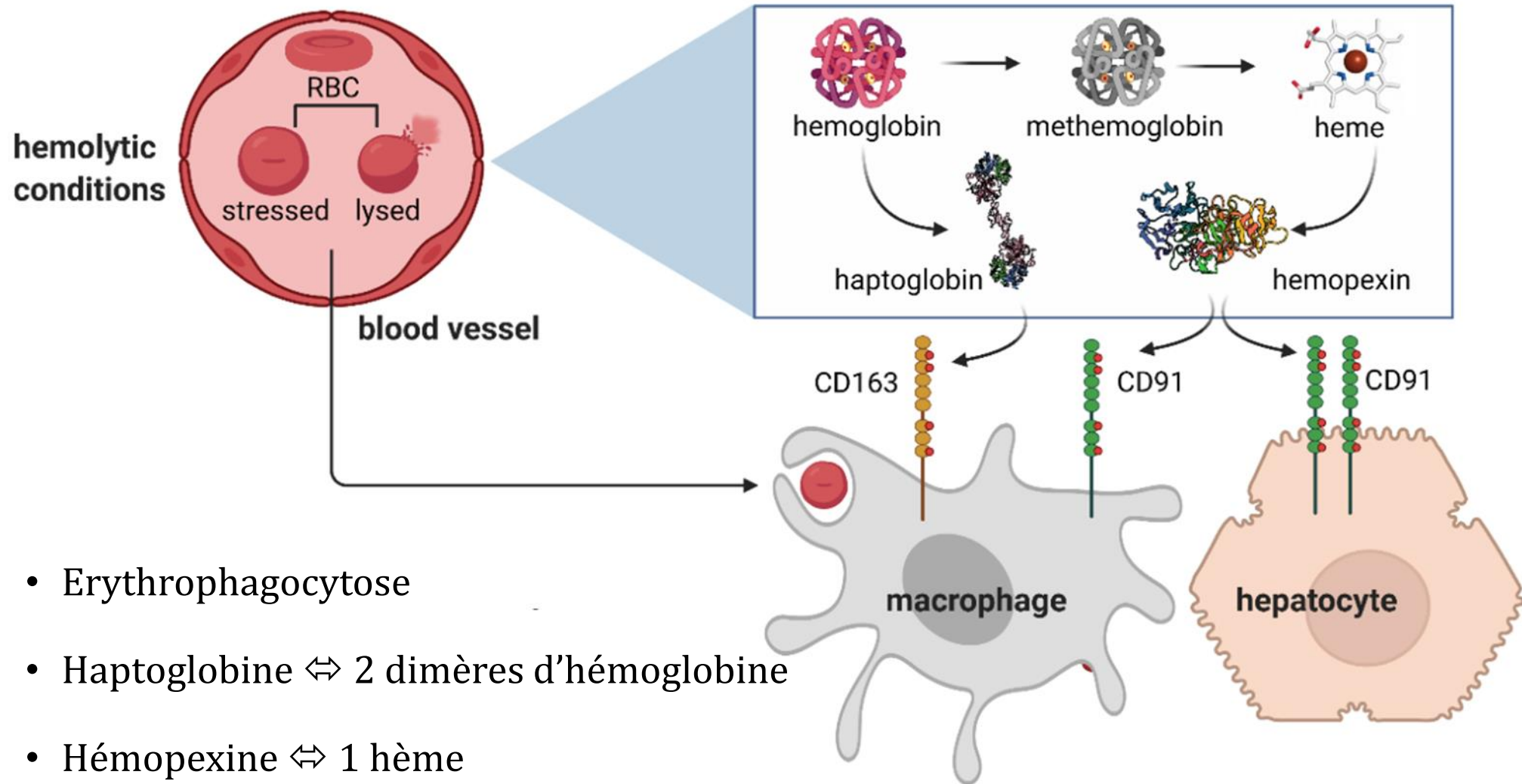
Filtration
splénique

Infections

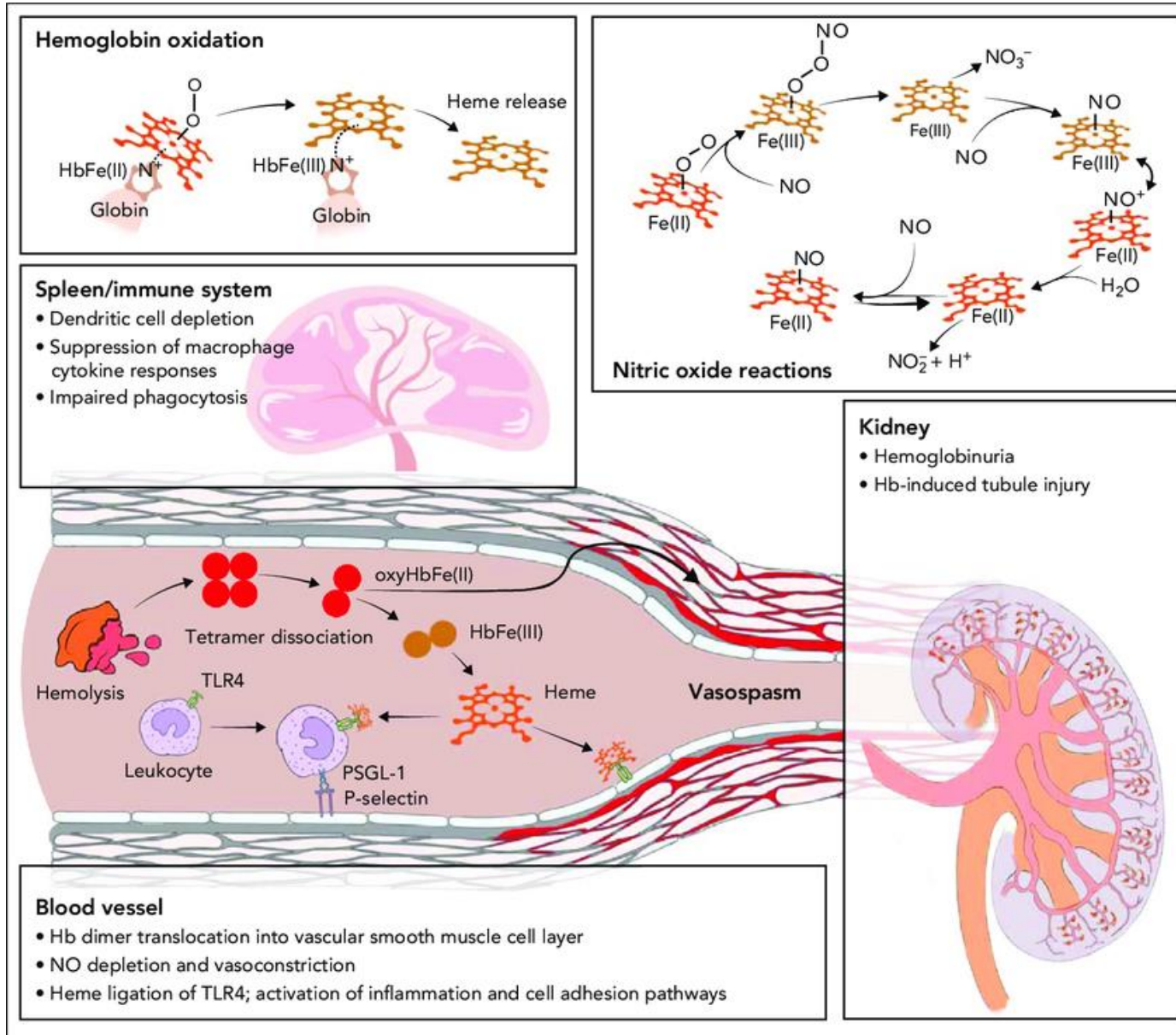
Anticorps Complément Erythrophagocytose

Implication du système immunitaire

HÉMOLYSES : MÉCANISMES PROTECTEURS PHYSIOLOGIQUES



HÉMOLYSES : TOXICITÉ

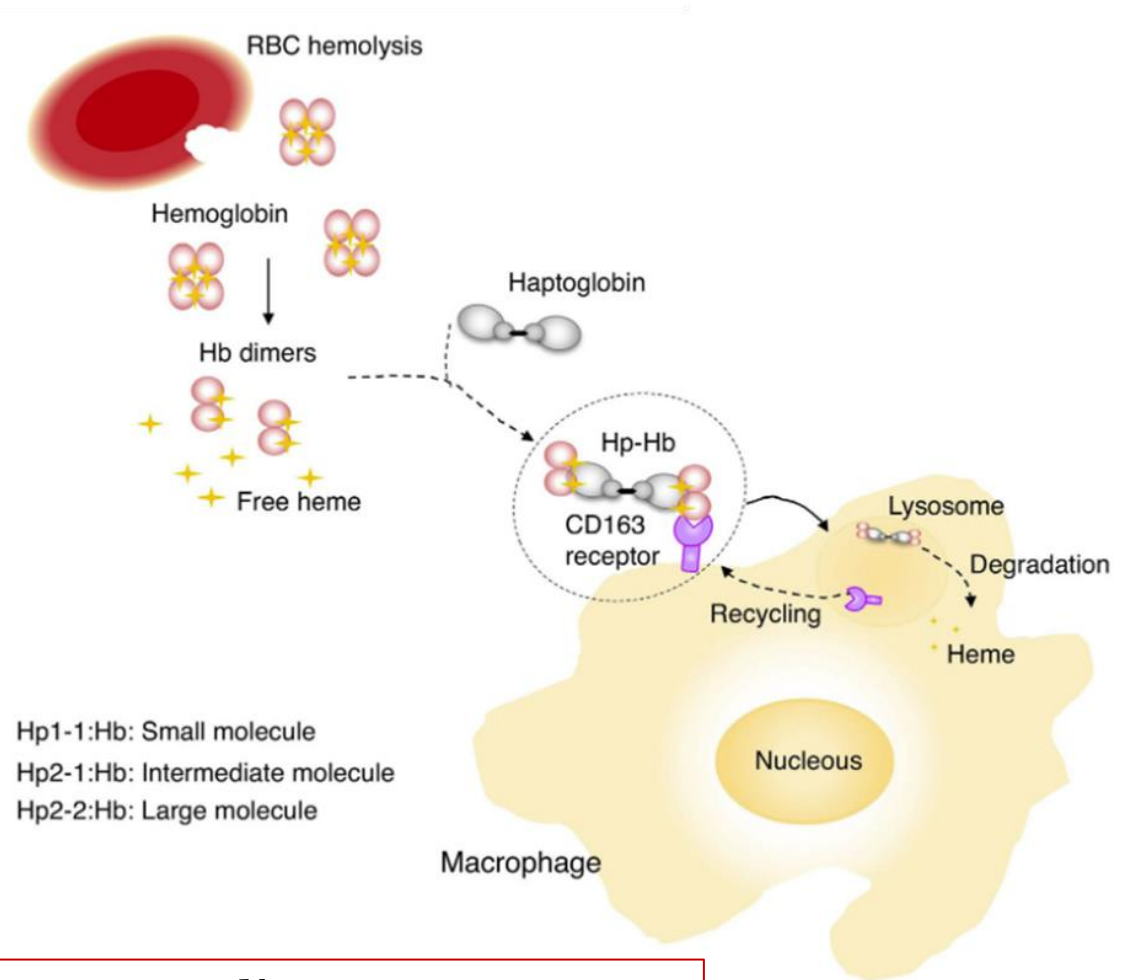


EXPLORATION BIOLOGIQUE DES HÉMOLYSES

- Marqueurs traditionnels de l'hémolyse
 - Analyses plasmatiques / sériques de « routine »
 - **Baisse** concentration en haptoglobine
 - **Augmentation** activité de la Lactate Déshydrogénase (LDH)
 - **Augmentation** concentration en bilirubine
 - **Augmentation** taux des réticulocytes

HAPTOGLOBINE

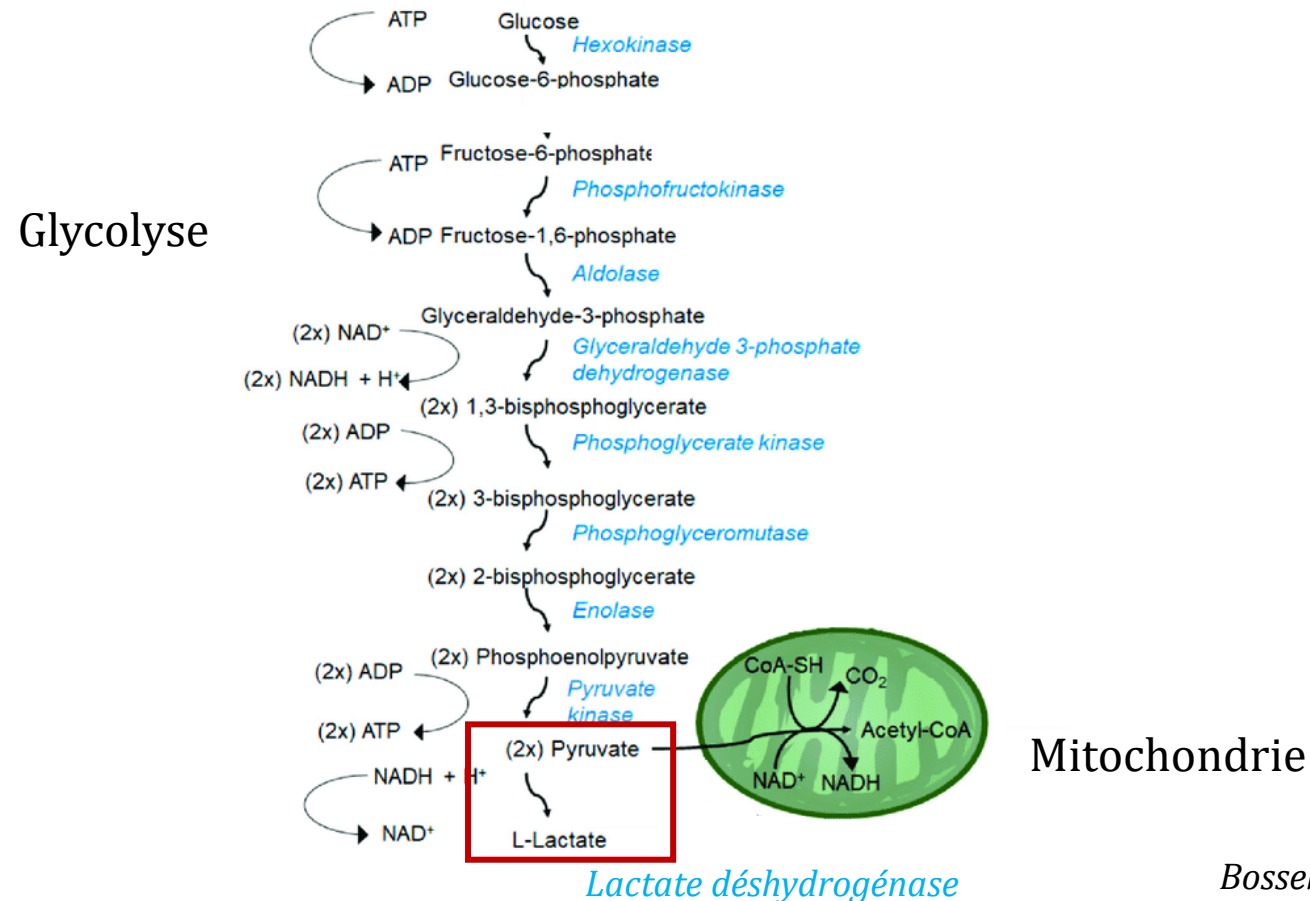
- Protéine plasmatique se liant à l'hémoglobine libre
 - Prévenir le stress oxydatif
- Production stimulée par cytokines inflammatoires comme Il-1, Il-6 et TNF
- Valeurs faibles associées à :
 - Anémie hémolytique
 - Maladie du foie / des reins
 - Déficit



➔ Nombreuses causes d'augmentation

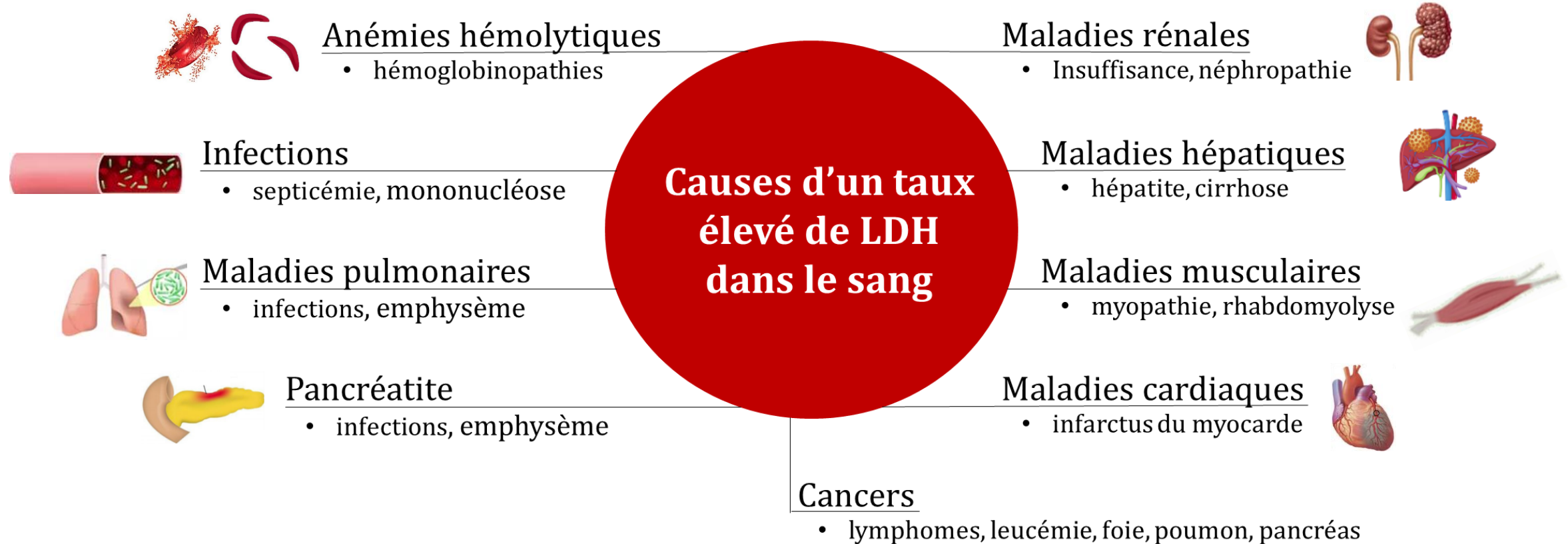
LACTATE DÉSHYDROGÉNASE (LDH)

- Enzyme de la respiration anaérobie



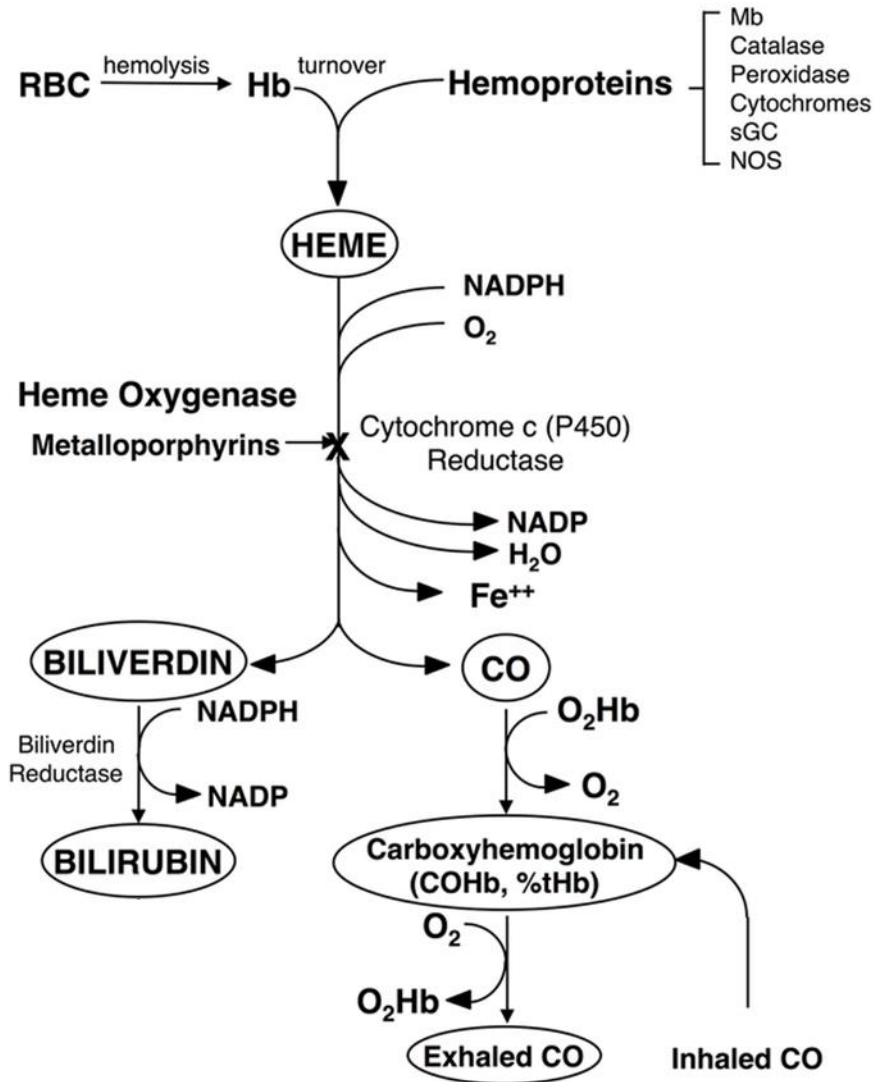
LACTATE DÉSHYDROGÉNASE (LDH)

- Ubiquitaire : cœur, muscles, foie, reins, poumons, érythrocytes



➔ Indicateur de lyse cellulaire

BILIRUBINE



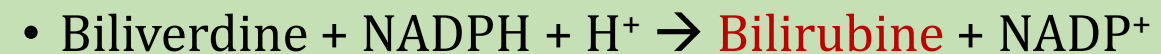
• Sous-produit de dégradation de l'hème

• Hème oxygénase (HO-1):



Macrophages, hépatocytes, cellules endothéliales,
neurones, cellules rénales

• Biliverdine réductase



Macrophages, hépatocytes

➔ Marqueur secondaire

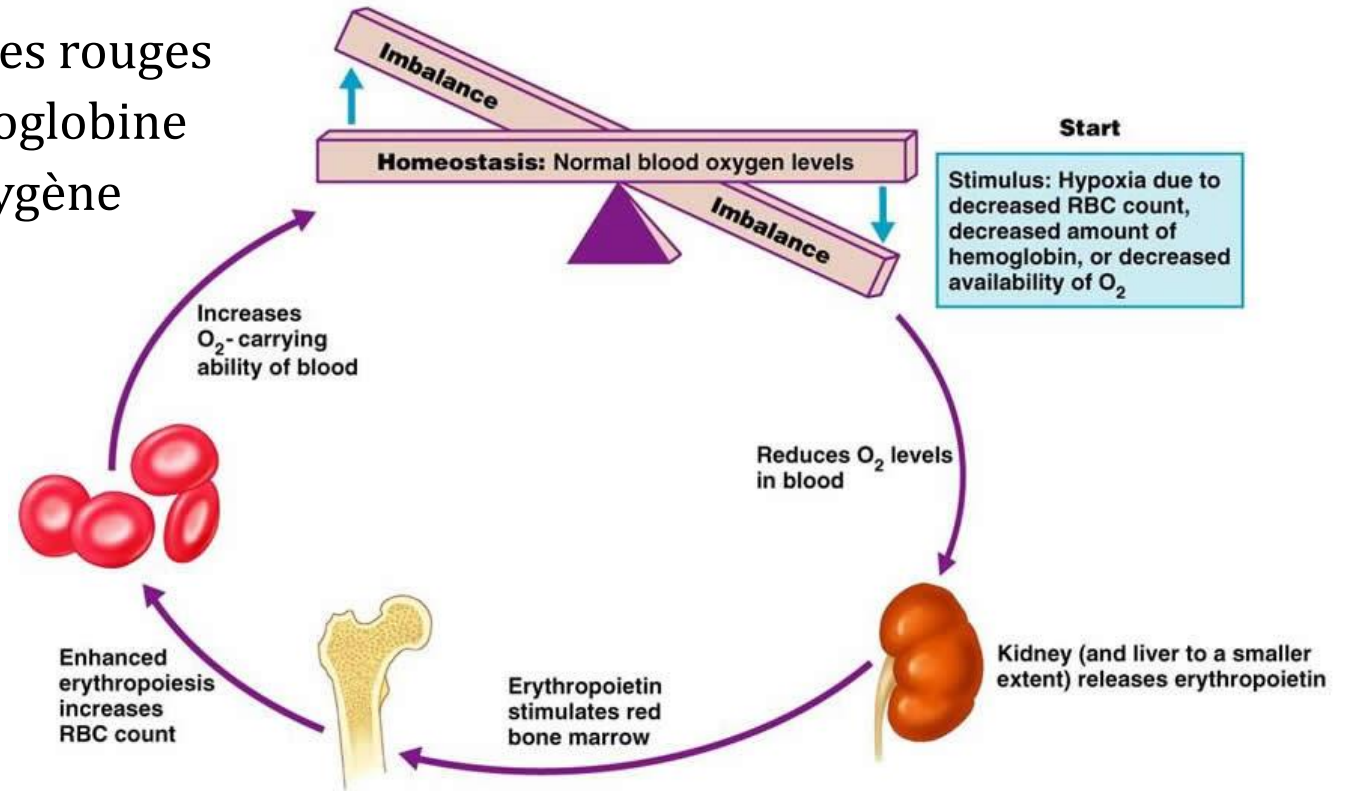
RÉTICULOCYTES

- Augmentation du taux de réticulocytes :

- Stimulus : hypoxie
 - Réduction du nombre de globules rouges
 - Réduction de la quantité d'hémoglobine
 - Réduction de disponibilité d'oxygène

- Réponse : production d'érythropoïétine (EPO)

- Augmentation de l'érythropoïèse (quid dyséthropoïèse ?)



➔ Indicateur de l'hypoxie / anémie

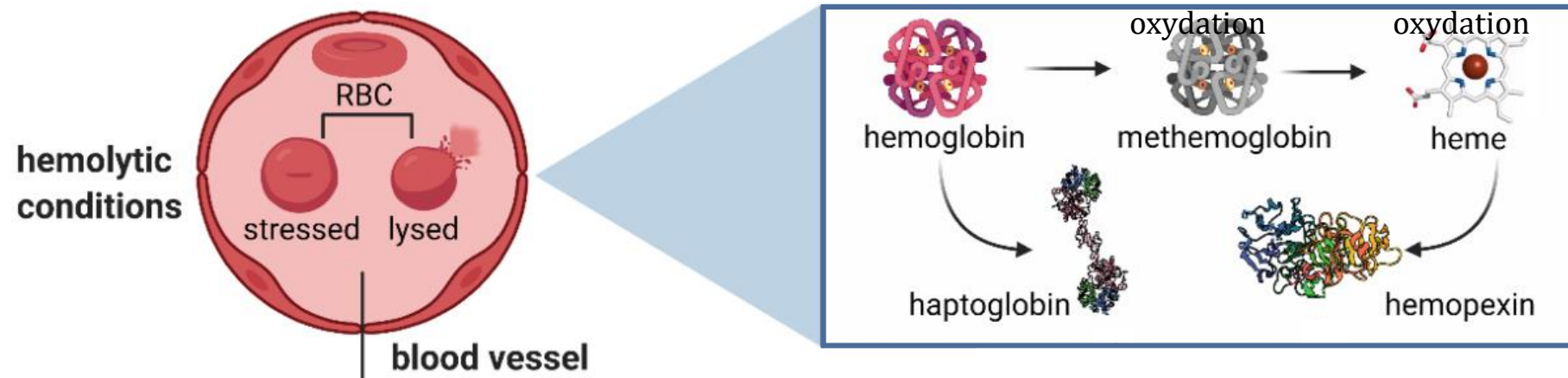
EXPLORATION BIOLOGIQUE DES HÉMOLYSES

- Marqueurs traditionnels
 - Inconvénients :
 - **Haptoglobine** → pas uniquement spécifique de l'hémolyse, stimulée par inflammation
 - **Lactate Déshydrogénase (LDH)** → lyse cellulaire globale
 - **Bilirubine** → sous produit de dégradation
 - **Réticulocytes** → indicateur d'hypoxie / anémie

→ Marqueurs **indirects**

EXPLORATION BIOLOGIQUE DES HÉMOLYSES

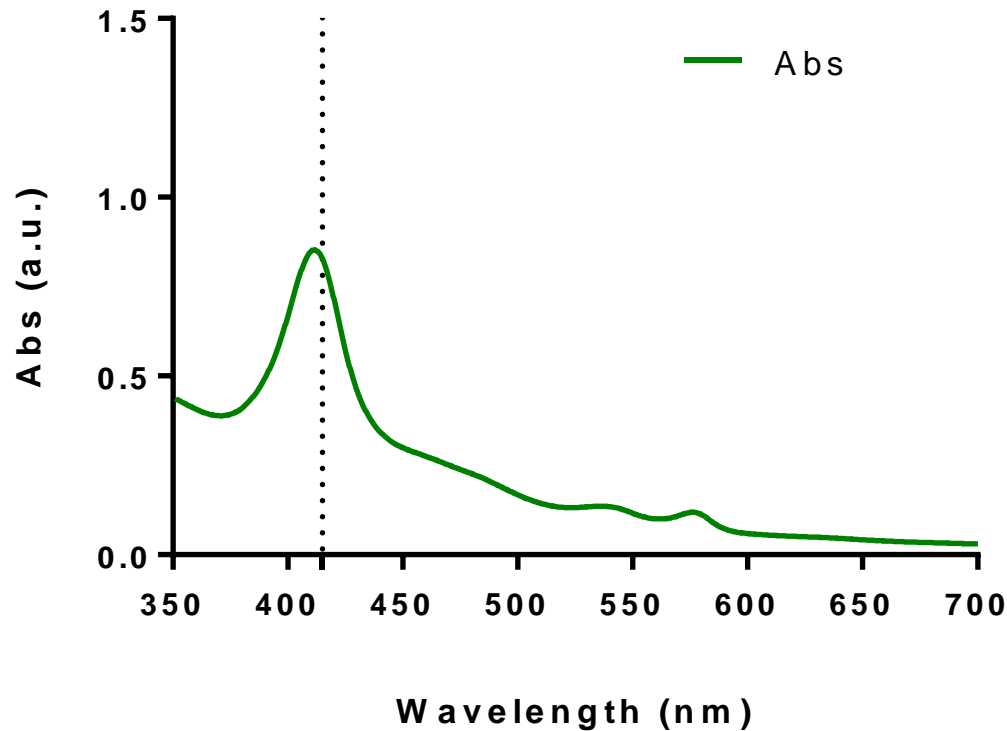
- Marqueurs **directs**
 - Analyses plasmatiques / sériques :



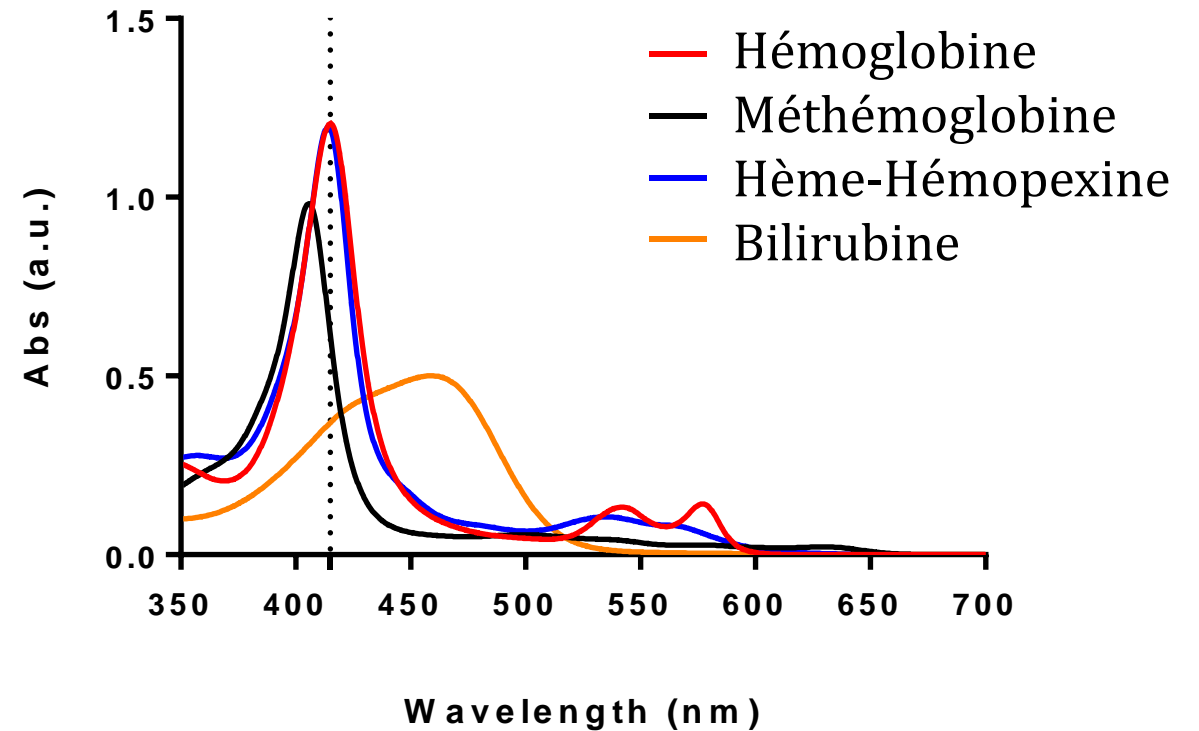
- **Hémoglobine / méthémoglobine**
- **Hème**

EXPLORATION BIOLOGIQUE DES HÉMOLYSES

- Méthodes spectrophotométriques



Spectre d'absorbance d'un plasma

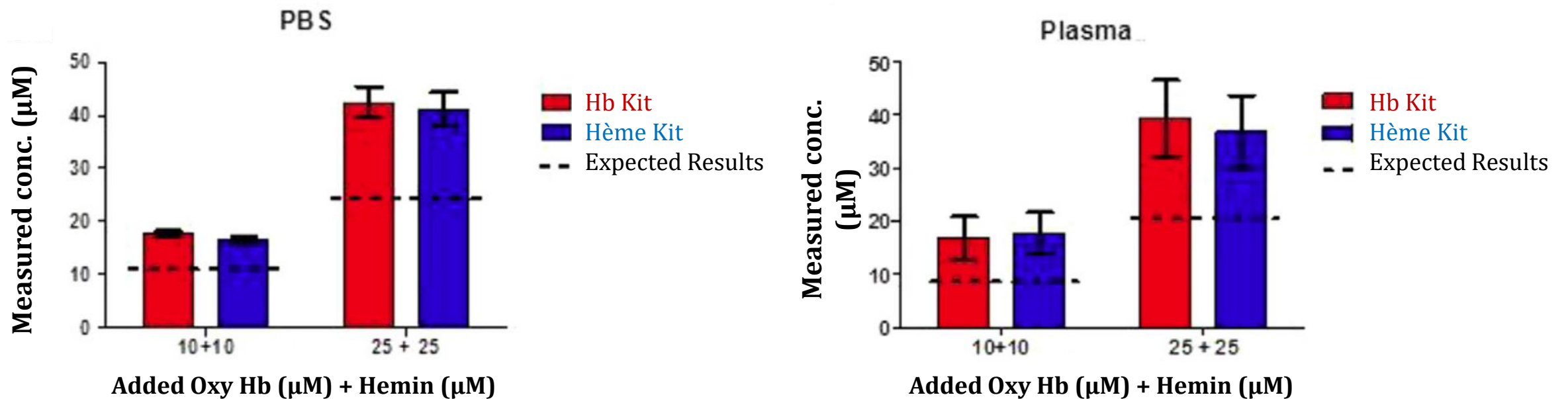


Spectres d'absorbance des différentes espèces liées à l'hème et de la bilirubine

➔ Interférences possibles de différentes espèces plasmatiques

EXPLORATION BIOLOGIQUE DES HÉMOLYSES

- Méthodes spectrophotométriques





Interférence hémoglobine \Leftrightarrow hème observée par kits de dosage commerciaux

EXPLORATION BIOLOGIQUE DES HÉMOLYSES

- Hémoglobine et hème plasmatiques
 - Méthodes spectrophotométriques

Absorbance and redox based approaches for measuring free heme and free hemoglobin in biological matrices

Joo-Yeun Oh ^{a 1}, Jennifer Hamm ^{b 1}, Xin Xu ^{c f}, Kristopher Genschmer ^{c f}, Ming Zhong ^{c i}, Jeffrey Lebensburger ^b, Marisa B. Marques ^a, Jeffrey D. Kerby ^{d h}, Jean-Francois Pittet ^e, Amit Gaggar ^{c f h}, Rakesh P. Patel ^{a g}  


Redox Biology

Volume 9, October 2016, Pages 167-177



FULL ARTICLE |  Open Access |  

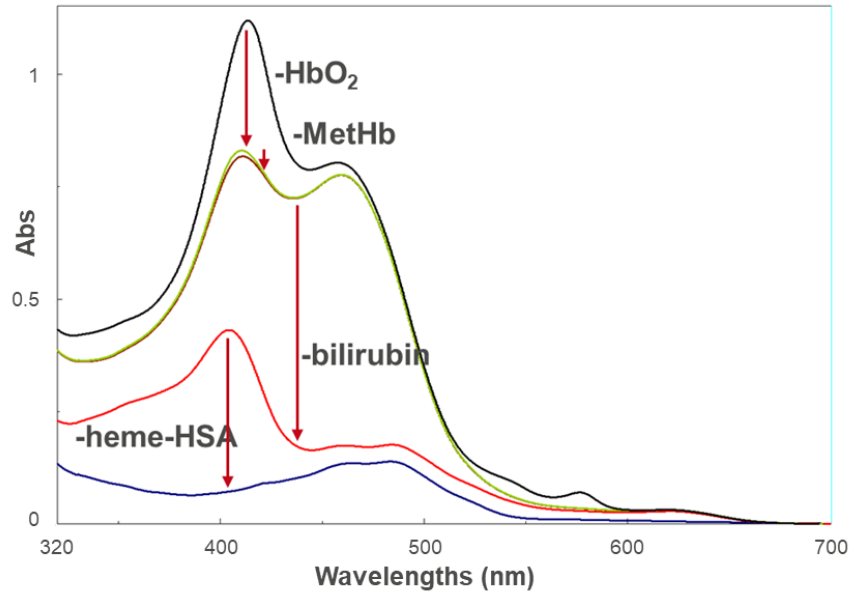
Spectrophotometric evaluation of hemolysis in plasma by quantification of free oxyhemoglobin, methemoglobin, and methemalbumin in presence of bilirubin

Christian Heckl , Alexander Lang, Adrian Rühm, Ronald Sroka, Thomas Duffield, Michael Vogeser, Michael Paal

First published: 01 February 2021 | <https://doi.org/10.1002/jbio.202000461> | Citations: 6

EXPLORATION BIOLOGIQUE DES HÉMOLYSES

- Invention d'une méthode de dosage spectrophotométrique



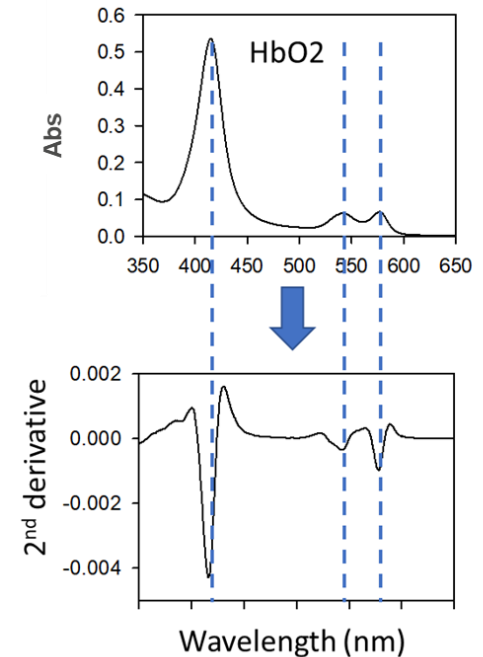
Chaque espèce est déterminée séquentiellement et sa contribution spectrale est soustraite de la mesure précédente

methemoglobin (metHb)
 $\text{Hb}-(\text{Fe}^{3+})$

+ potassium
cyanide
(KCN)



cyanmethemoglobin



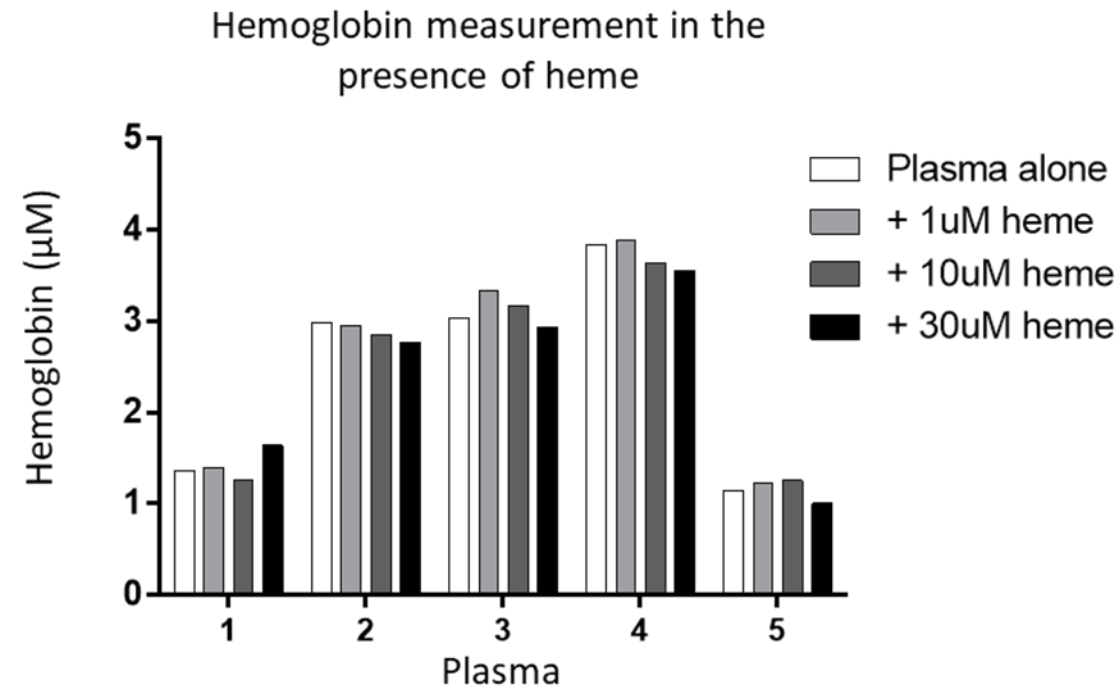
Pour séparer les formes ambiguës des produits chimiques sont ajoutés

Précision par le calcul de la dérivée seconde, permet d'obtenir une plus grande amplitude du signal

Mesure directe dans le plasma de : Oxy-Hb ; CO-Hb ; metHb (somme = Hb plasmatique totale) ; hème ; hxp et bilirubine

EXPLORATION BIOLOGIQUE DES HÉMOLYSES

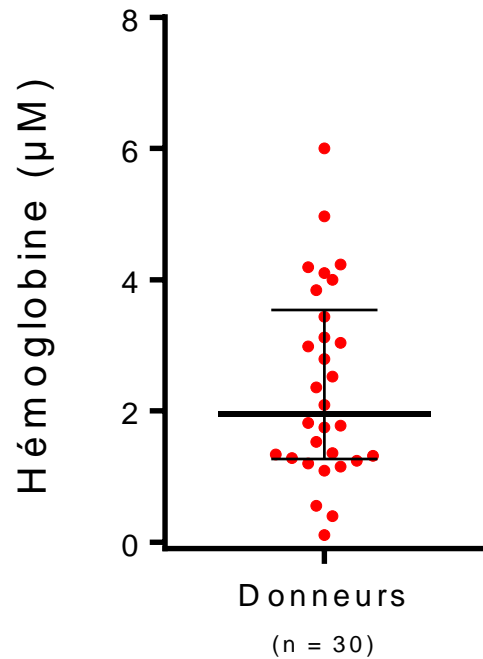
- Invention d'une méthode de dosage spectrophotométrique



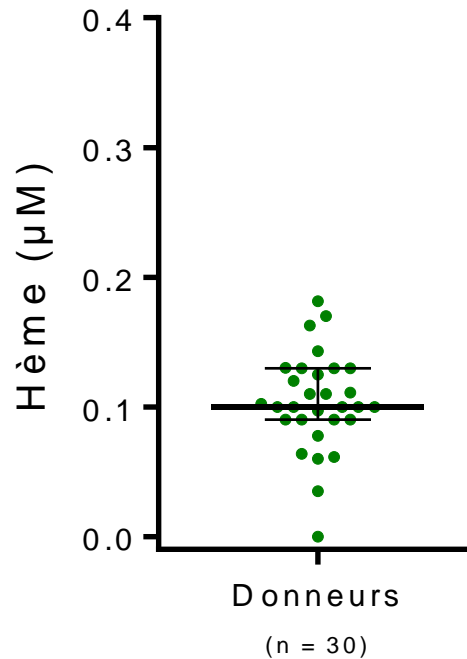
Pas de différence significative dans les valeurs mesurées
Pas d'interférence entre les espèces

EXPLORATION BIOLOGIQUE DES HÉMOLYSES

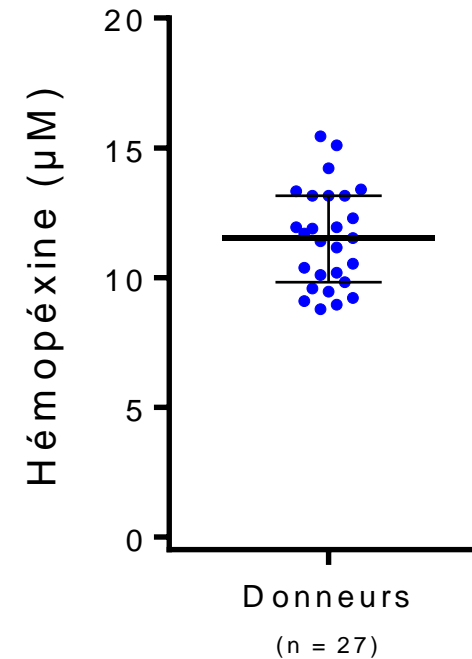
- Concentrations plasmatiques chez des donneurs sains (EFS)



Hémoglobine
Médiane : 1,95 µM
[1,27 – 3,54]



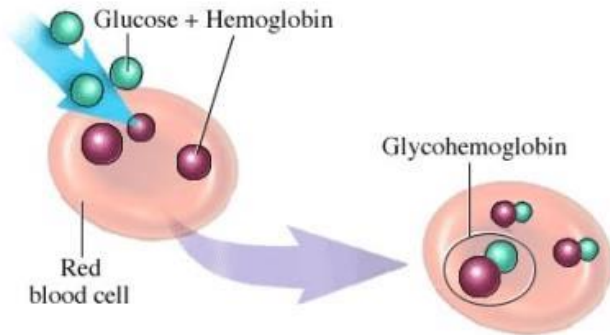
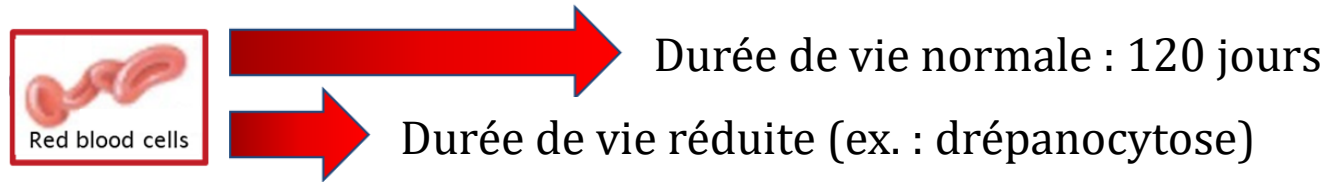
Hème
Médiane : 0,10 µM
[0,09 – 0,13]



Hémopexine
Médiane : 11,51 µM
[9,82 – 13,16]

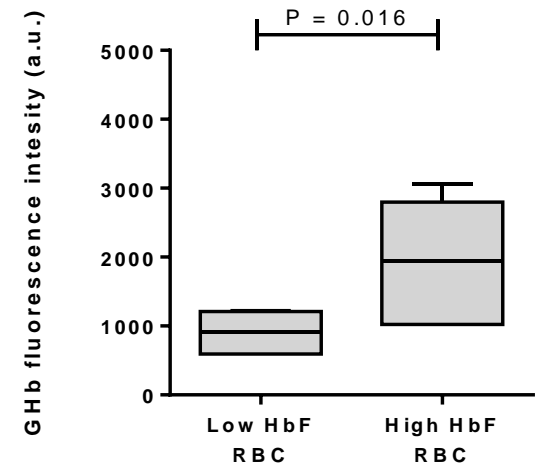
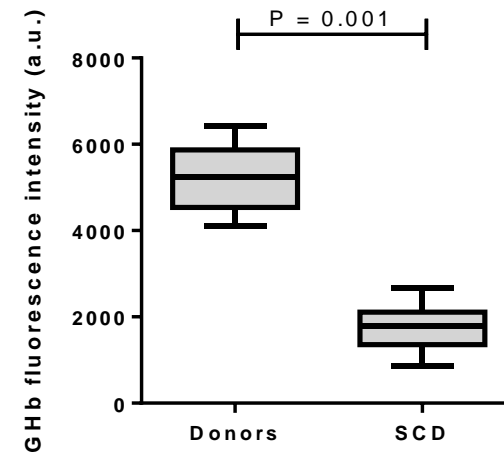
EXPLORATION BIOLOGIQUE DES HÉMOLYSES

- Mesure de la durée de vie des globules rouges



- Glycation de l'hémoglobine processus non enzymatique dépend :
 - De la glycémie
 - Du temps
- Marquage intracellulaire fluorescent de l'hémoglobine glyquée
 - Intensité de fluorescence \leftrightarrow durée de vie

Mesures par cytométrie en flux



CONCLUSIONS

- Les hémolyses sont très variées et complexes à évaluer
- Intérêt de doser des marqueurs directs utilisés en conjonction avec les marqueurs traditionnels
- Complexité de différencier les contributions hémolyse intravasculaire / hémolyse intratissulaire
- Bilan du fer



REMERCIEMENTS

- Dr Laurent KIGER
- Pr Pablo BARTOLUCCI
- Dr Stéphane MOUTEREAU
- Pr Frédéric GALACTÉROS
- Dr Véronique BAUDIN-CREUZA

