



DÉFINITION ET EXPLORATION BIOLOGIQUE DE L'HÉMOLYSE

Dr Nicolas HEBERT

UMR_955 Transfusion et maladies du globule rouge - France PIRENNE
Hôpitaux Universitaires Henri MONDOR



INSTITUT MONDOR
DE RECHERCHE
BIOMÉDICALE



DÉFINITION

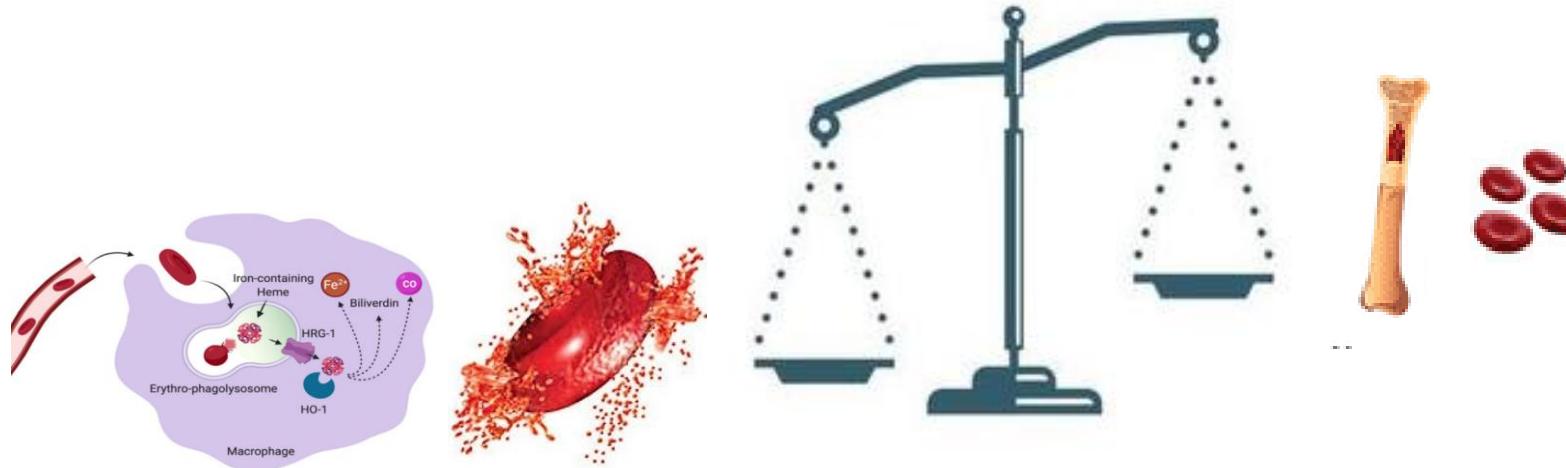
- Hémolyse
 - Destruction des hématies.
 - Le **phénomène physiologique**, assuré par les macrophages de la moelle hématopoïétique, de la rate et du foie, survient à l'issue de 100 à 120 jours.
 - Le **raccourcissement de la durée de vie des hématies** correspond soit à une anomalie constitutionnelle, 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.

ACADEMIE
NATIONALE
DE MEDECINE



DÉFINITION

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

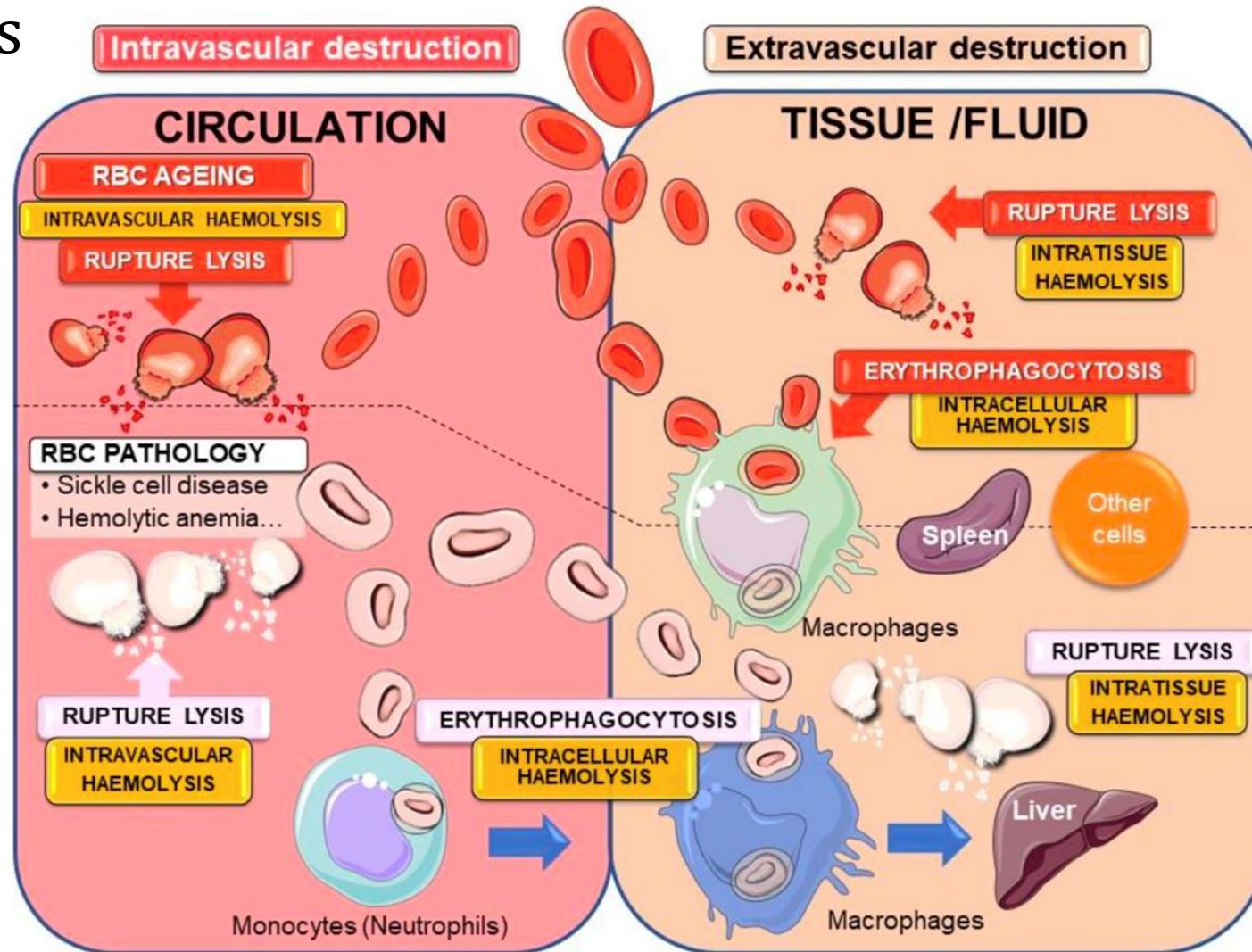


Destruction > production

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

DÉFINITION

- Hémolyses

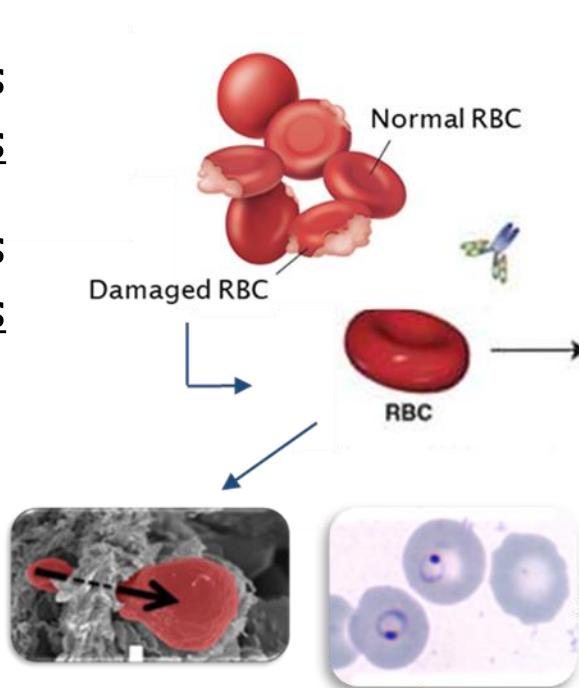


DÉFINITION

- Hémolyses : nombreuses causes et nombreux acteurs

Anomalies génétiques

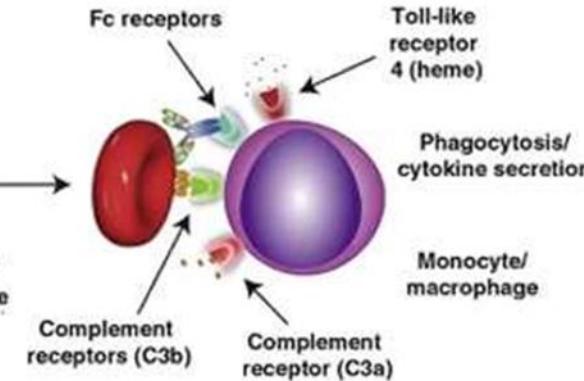
Anomalies induites



Filtration splénique

Infections

Intoxications



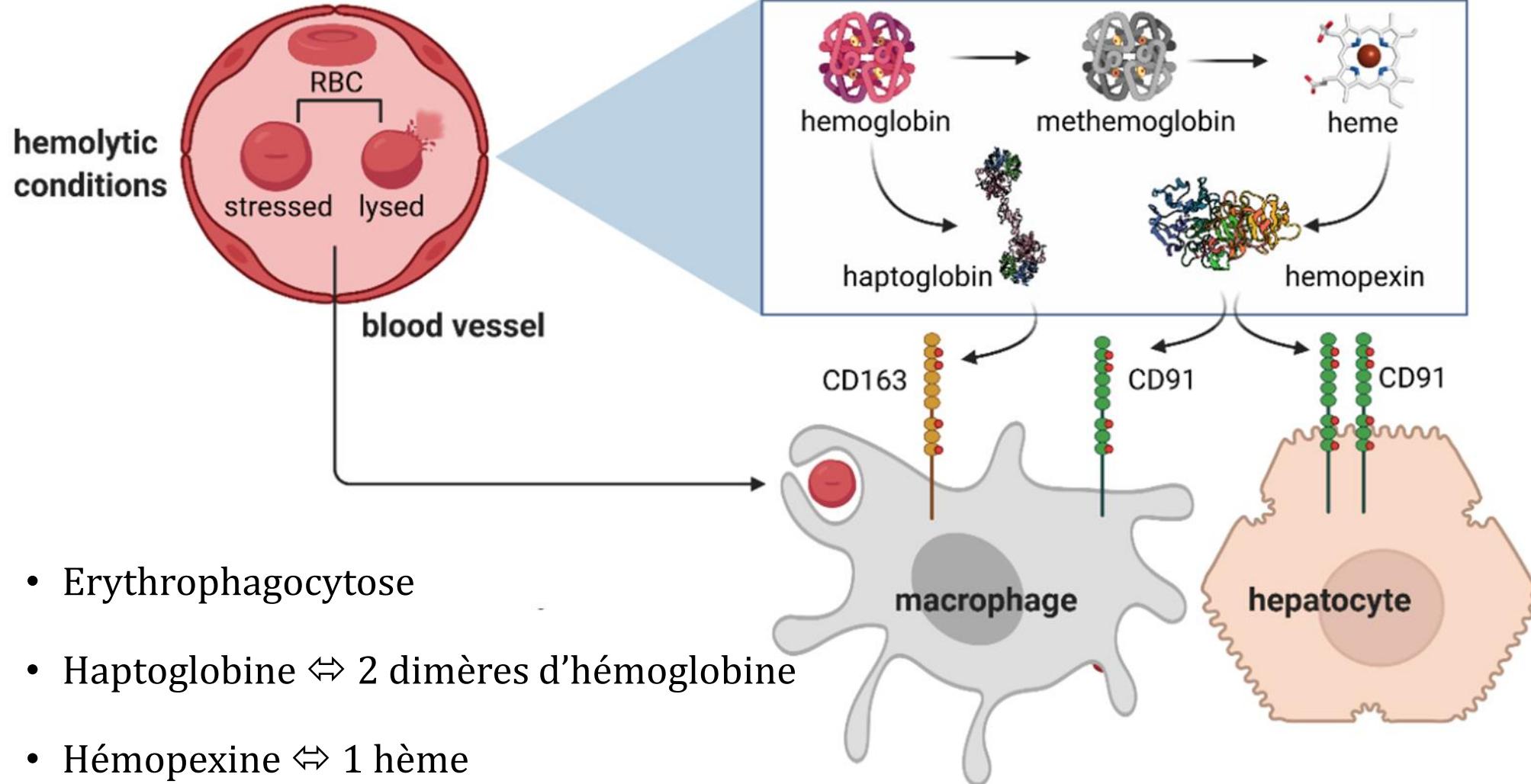
Anticorps

Complément

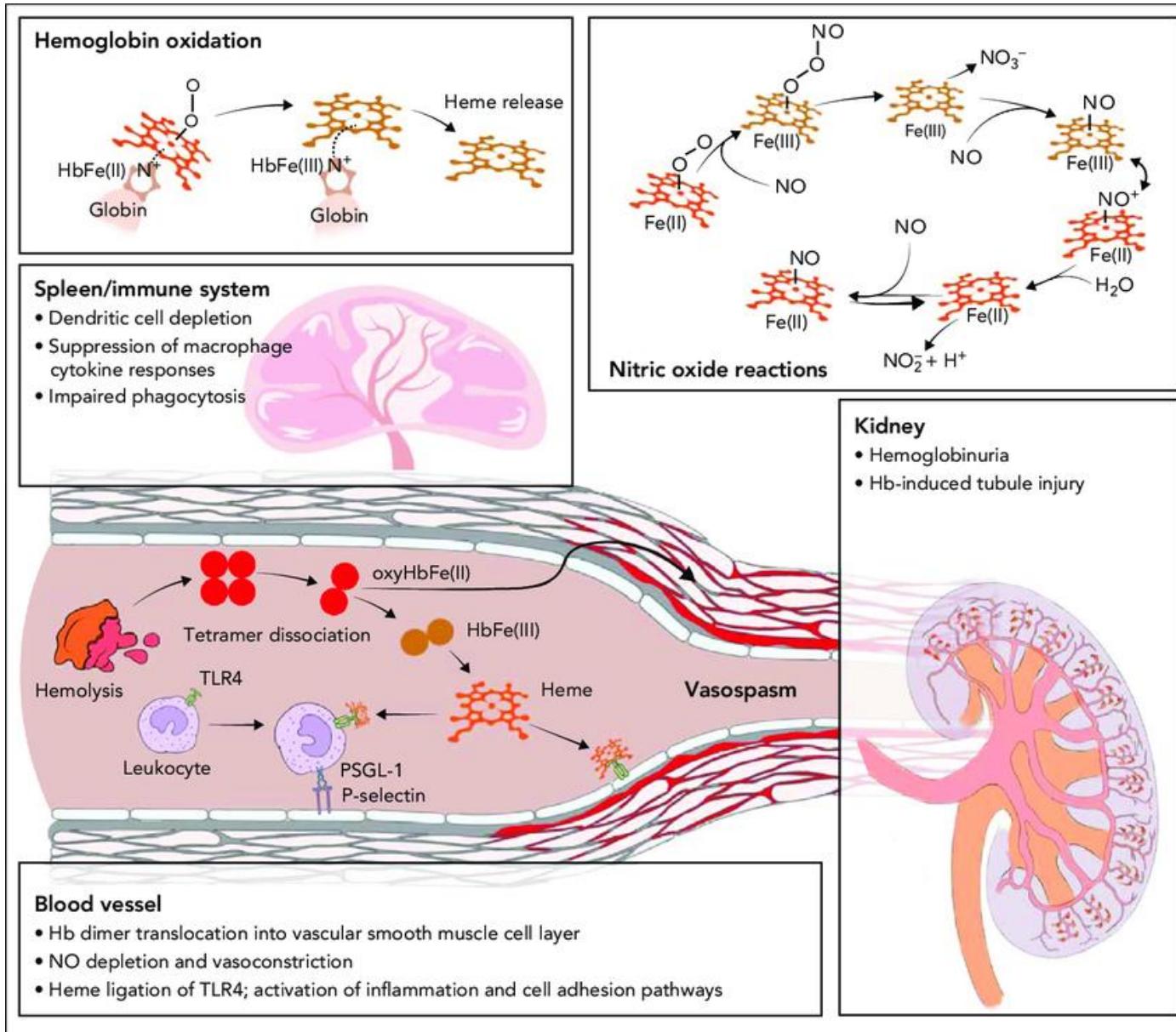
Erythrophagocytose

Implication du système immunitaire

HÉMOLYSES : MÉCANISMES PROTECTEURS PHYSIOLOGIQUES



HÉMOLYSES : TOXICITÉ

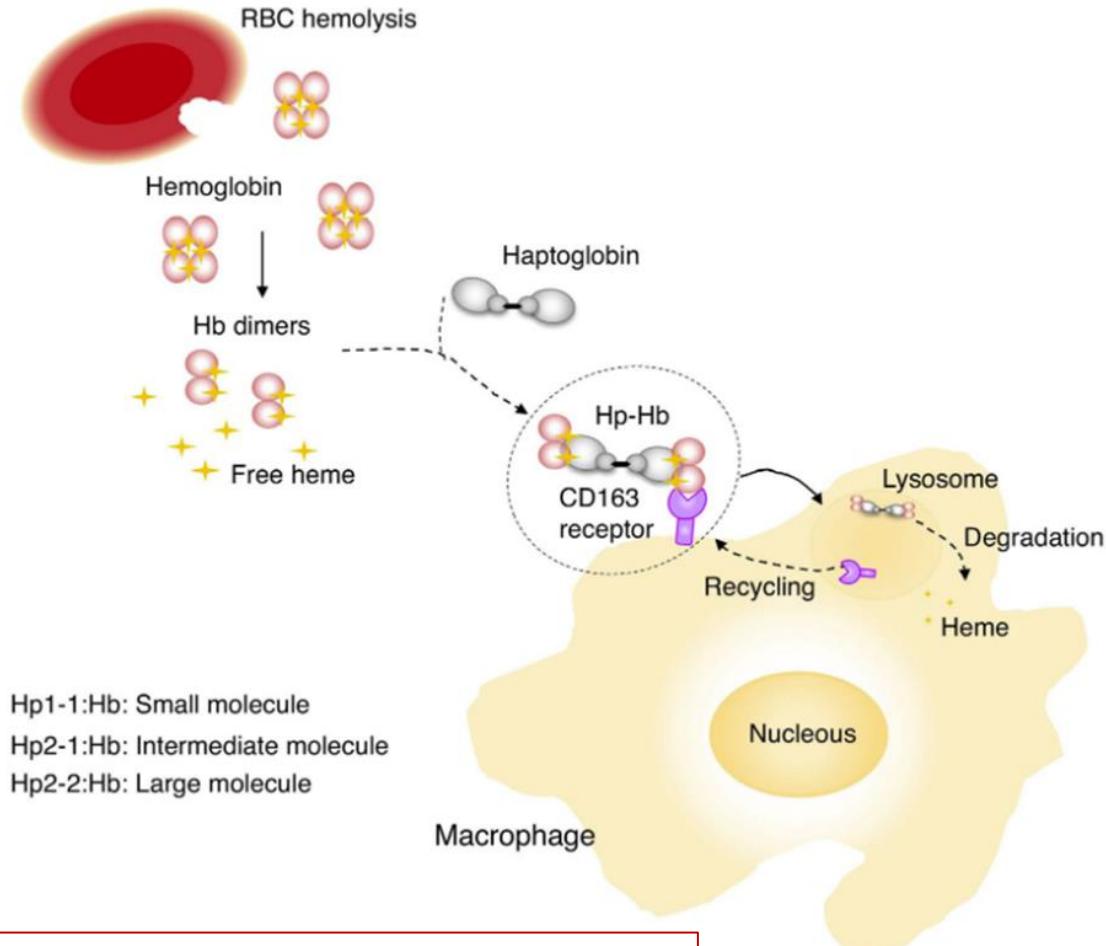


EXPLORATION BIOLOGIQUE DES HÉMOLYSES

- 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

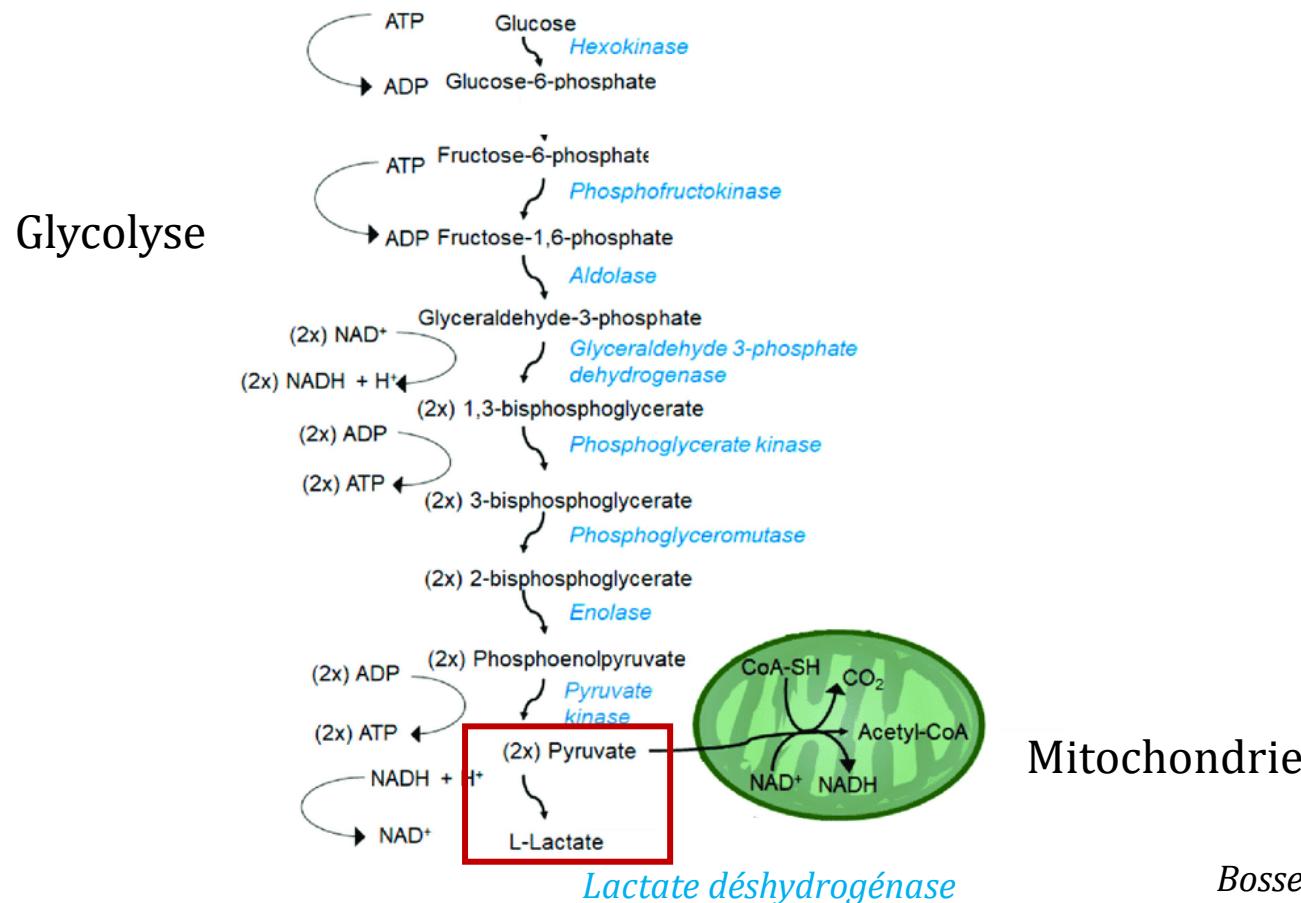
- Protéine plasmatique se liant à l'hémoglobine libre
 - Prévenir le stress oxydatif
 - Production stimulée par cytokines inflammatoires comme Il-1, Il-6 et TNF
 - Valeurs faibles associées à :
 - Anémie hémolytique
 - Maladie du foie / des reins
 - Déficit



→ Nombreuses causes d'augmentation

LACTATE DÉSHYDROGÉNASE (LDH)

- Enzyme de la respiration anaérobie



LACTATE DÉSHYDROGÉNASE (LDH)

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



Anémies hémolytiques

- hémoglobinopathies



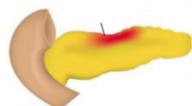
Infections

- septicémie, mononucléose



Maladies pulmonaires

- infections, emphysème



Pancréatite

- infections, emphysème



Maladies rénales

- Insuffisance, néphropathie



Maladies hépatiques

- hépatite, cirrhose



Maladies musculaires

- myopathie, rhabdomyolyse



Maladies cardiaques

- infarctus du myocarde

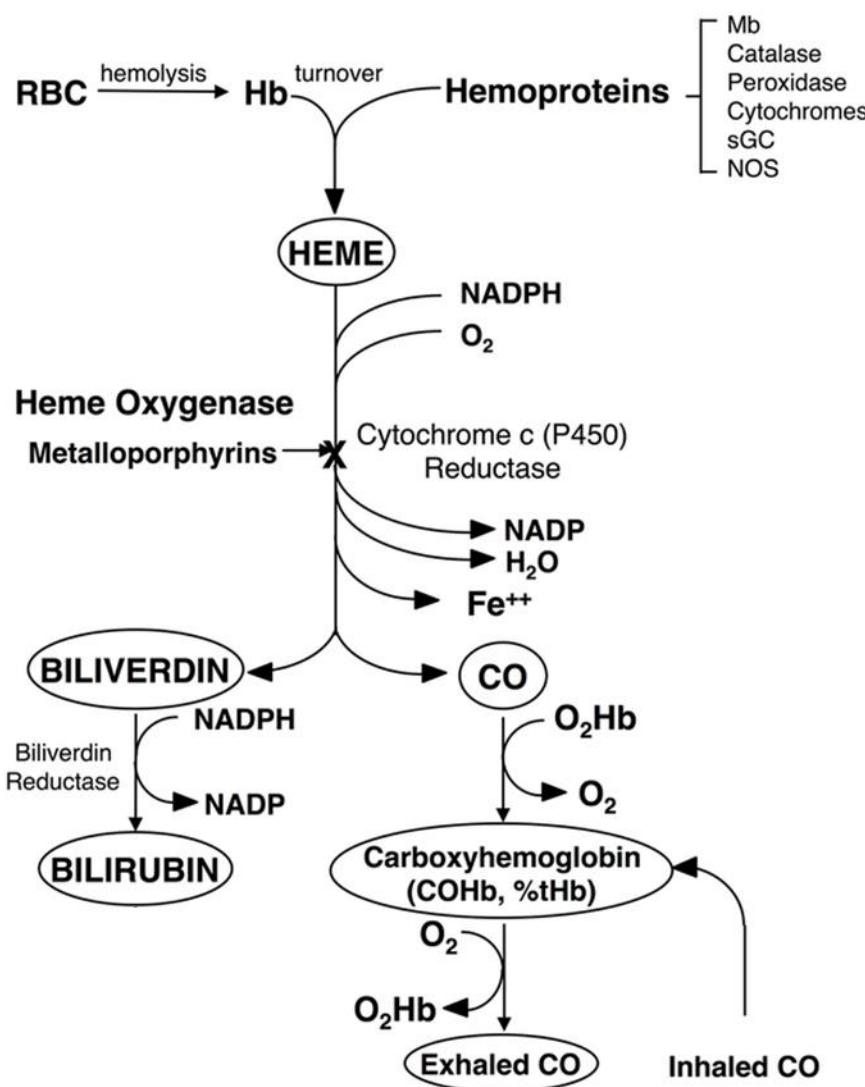


Cancers

- lymphomes, leucémie, foie, poumon, pancréas

➔ Indicateur de lyse cellulaire

BILIRUBINE



- Sous-produit de dégradation de l'hème

- Hème oxygénase (HO-1):
 - Hème + NADPH + O₂ → Biliverdine + Fe²⁺ + CO + NADP⁺ + H₂O

Macrophages, hépatocytes, cellules endothéliales, neurones, cellules rénales

- Biliverdine réductase
 - Biliverdine + NADPH + H⁺ → Bilirubine + NADP⁺

Macrophages, hépatocytes

→ Marqueur secondaire

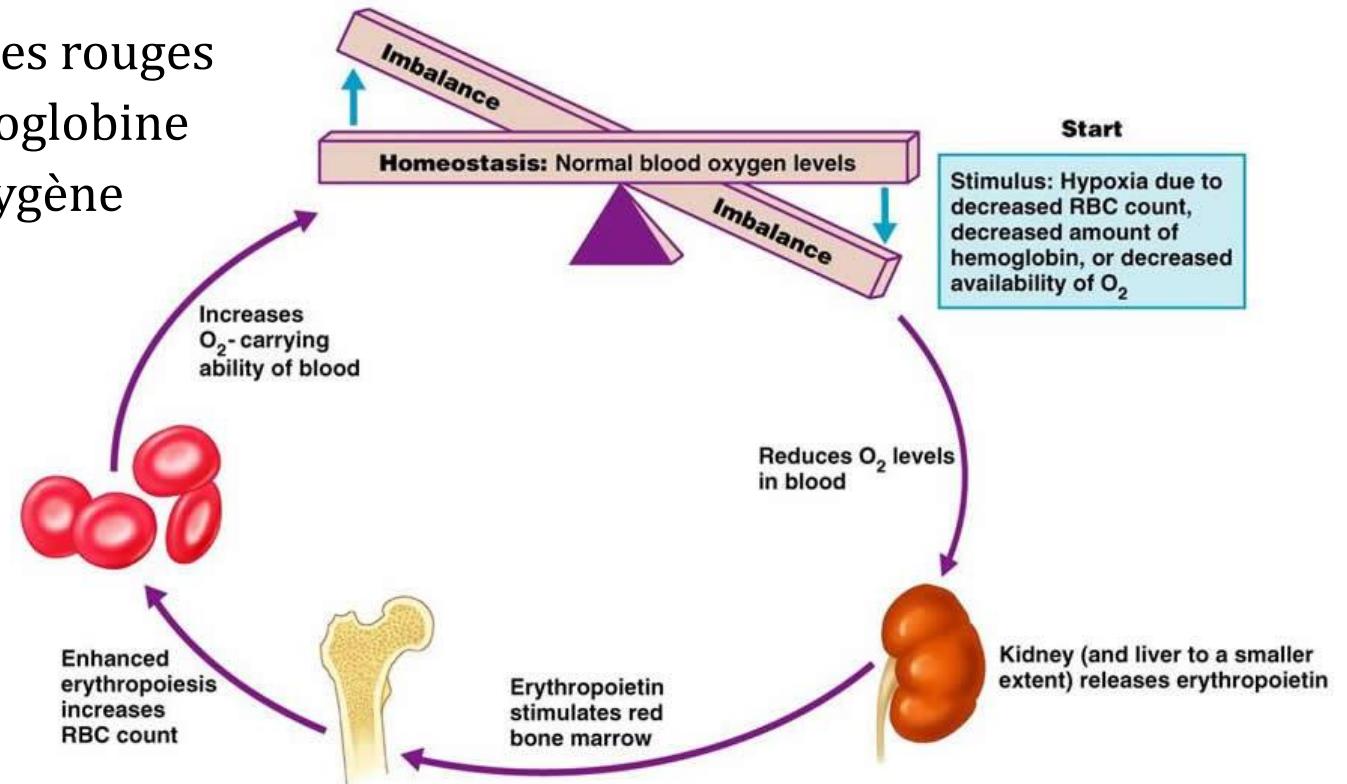
RÉTICULOCYTES

- 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 dysérythropoïèse ?)



➔ Indicateur de l'hypoxie / anémie

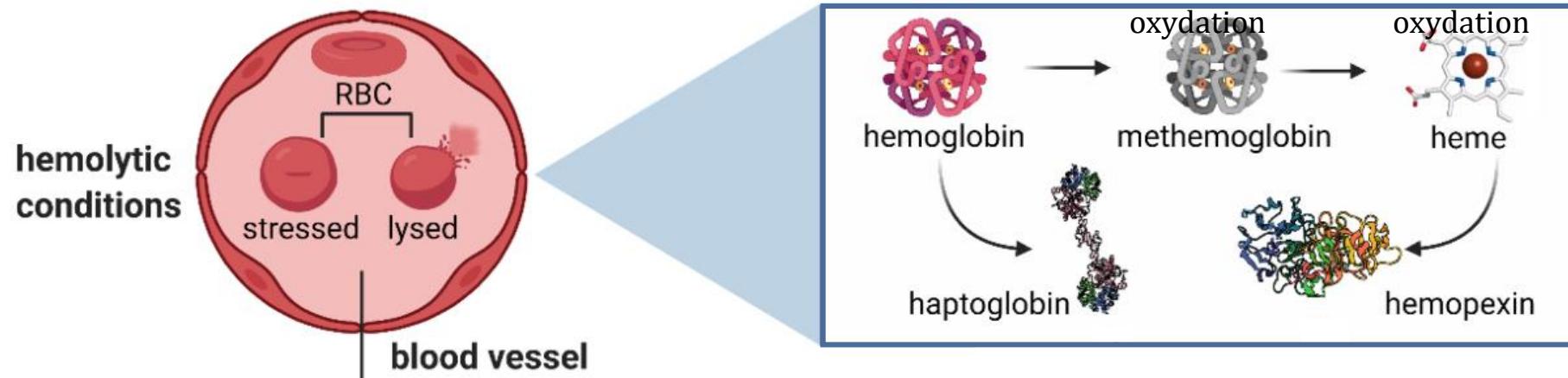
EXPLORATION BIOLOGIQUE DES HÉMOLYSES

- 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

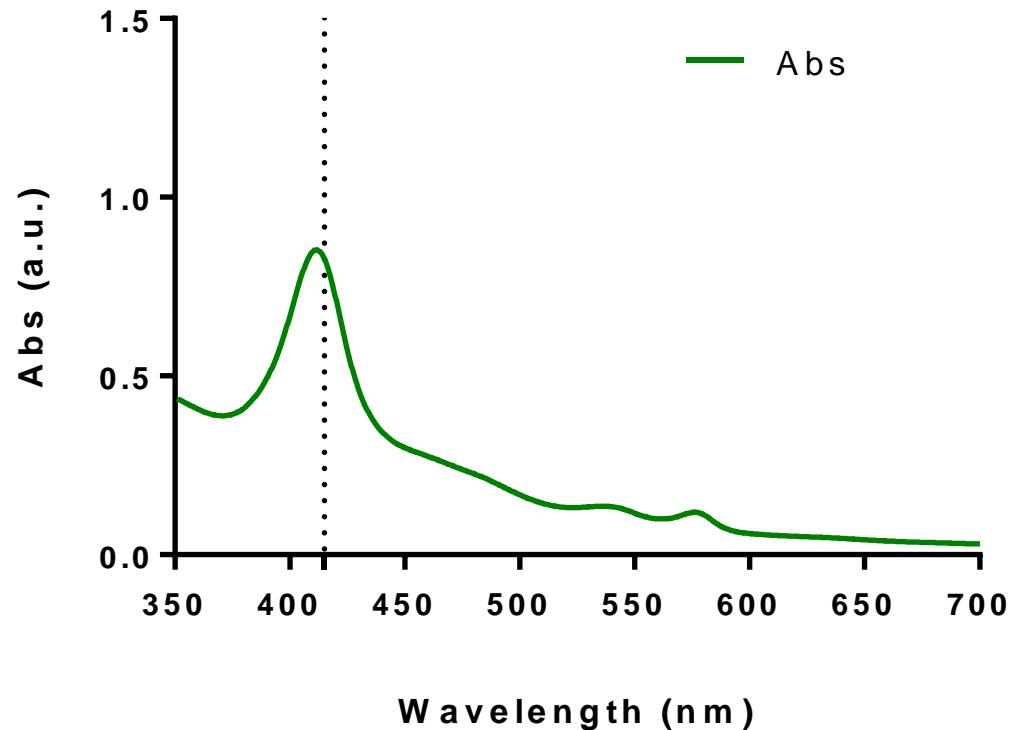
- Marqueurs **directs**
 - Analyses plasmatiques / sériques :



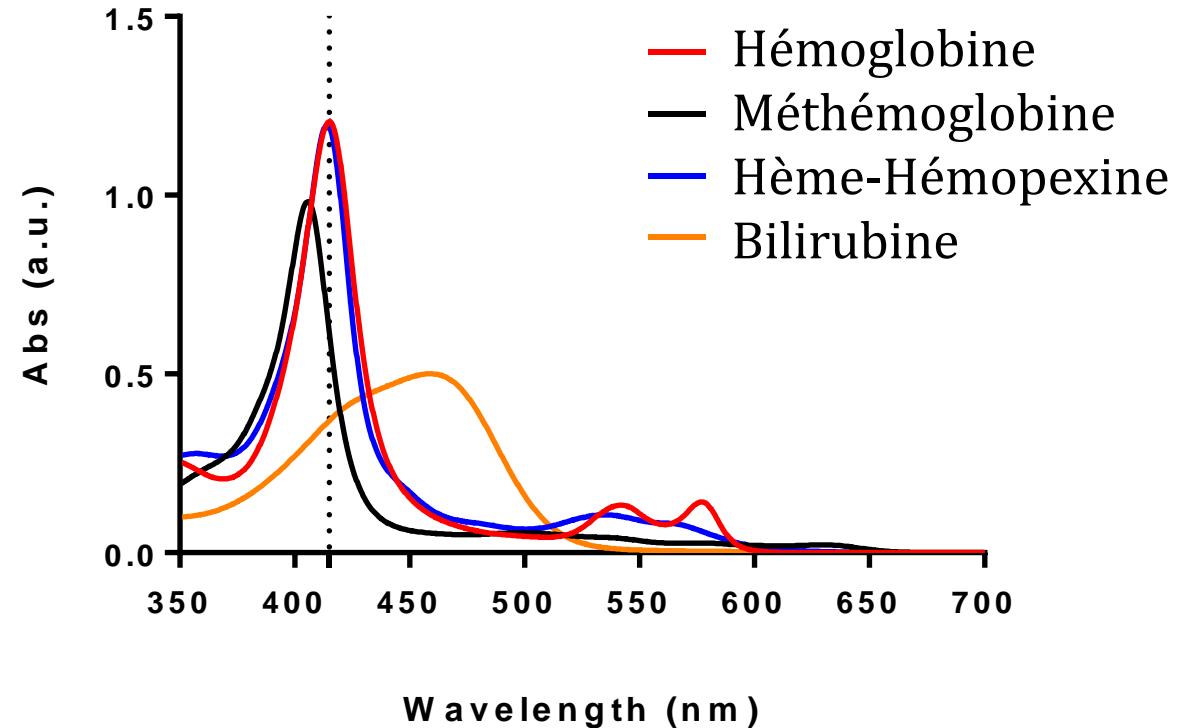
- **Hémoglobine / méthémoglobine**
- **Hème**

EXPLORATION BIOLOGIQUE DES HÉMOLYSES

- Méthodes spectrophotométriques



Spectre d'absorbance d'un plasma

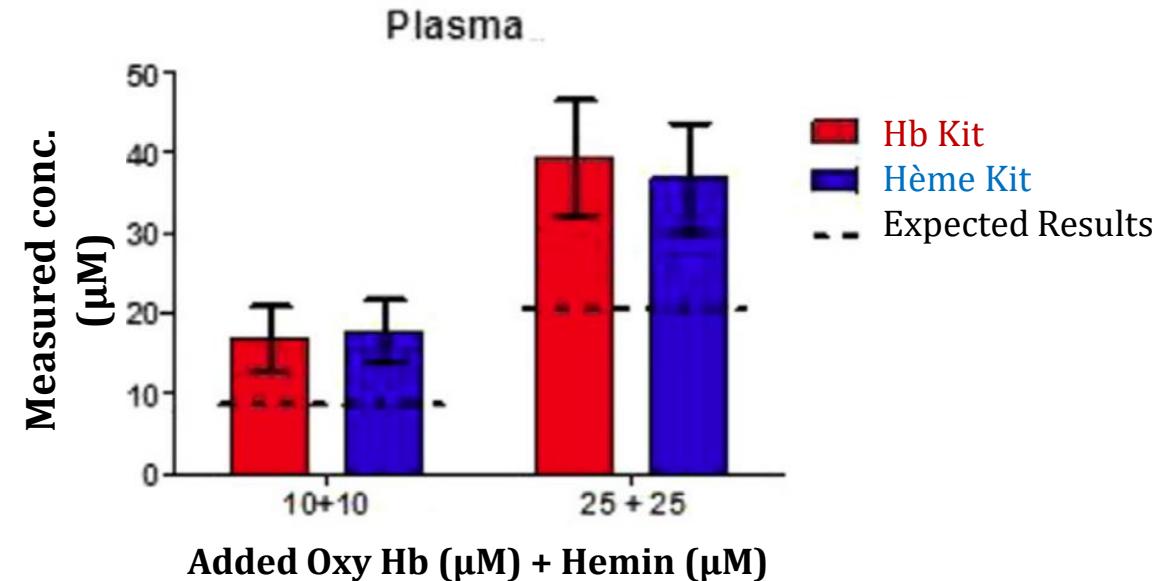
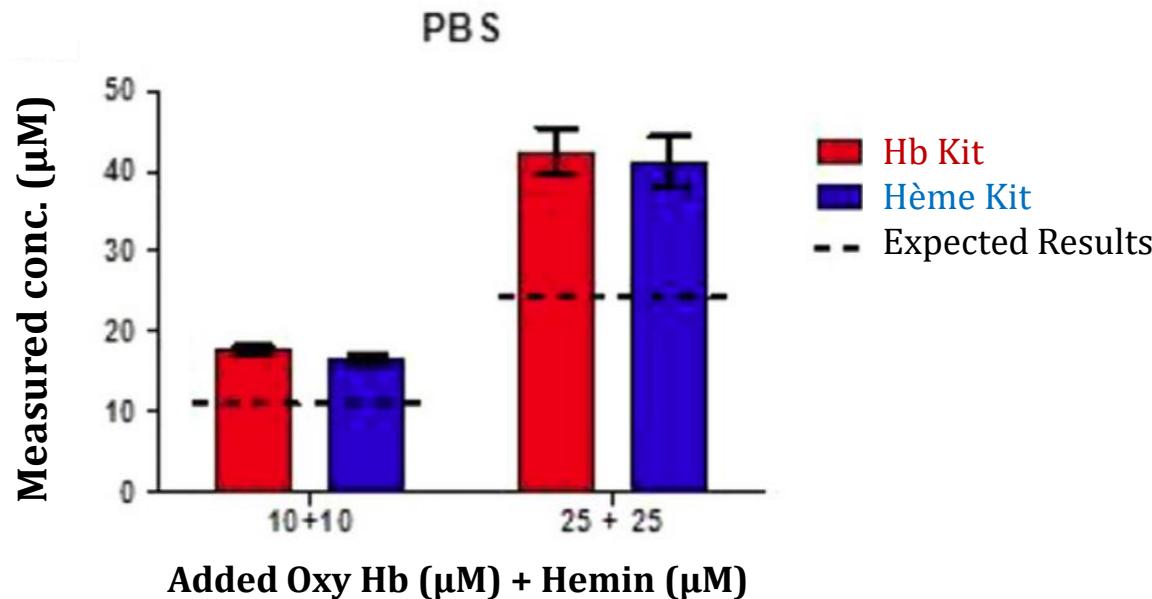


Spectres d'absorbance des différentes espèces liées à l'hème et de la bilirubine

➔ 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 ^{g,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}  



FULL ARTICLE |  Open Access |  

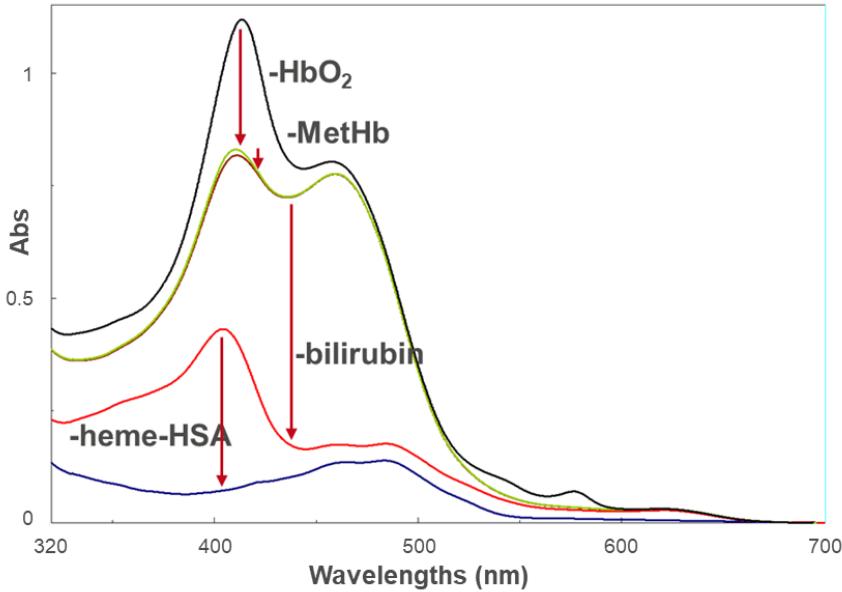
Spectrophotometric evaluation of hemolysis in plasma by quantification of free oxyhemoglobin, methemoglobin, and methemalbumin in presence of bilirubin

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

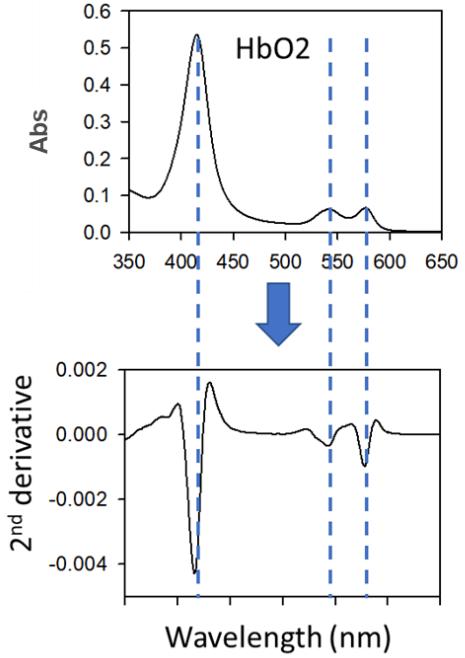


methemoglobin (metHb)
 $\text{Hb-(Fe}^{3+}\text{)}$

+ potassium
cyanide
(KCN)



cyanmethemoglobin



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

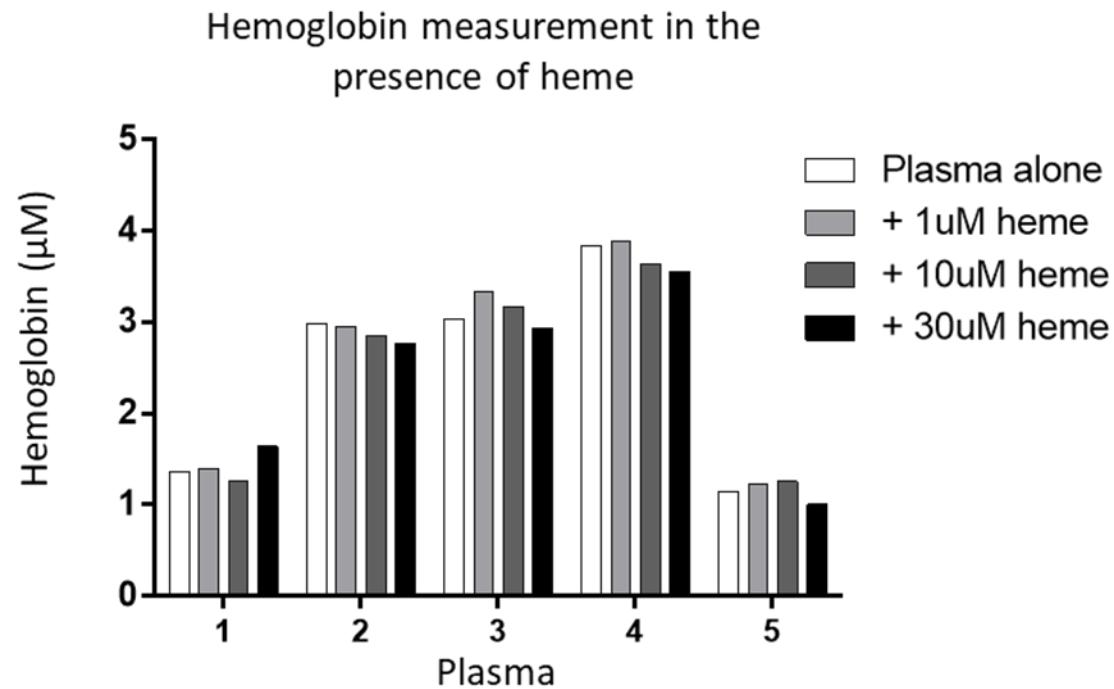
Pour séparer les formes
ambigües des produits
chimiques sont ajoutés

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

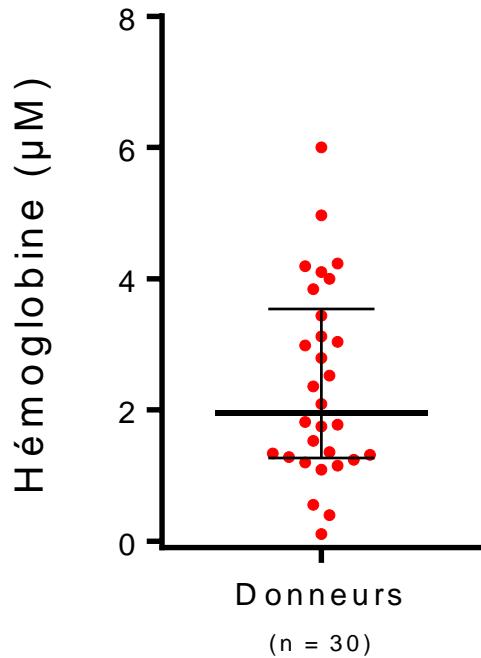
- Invention d'une méthode de dosage spectrophotométrique



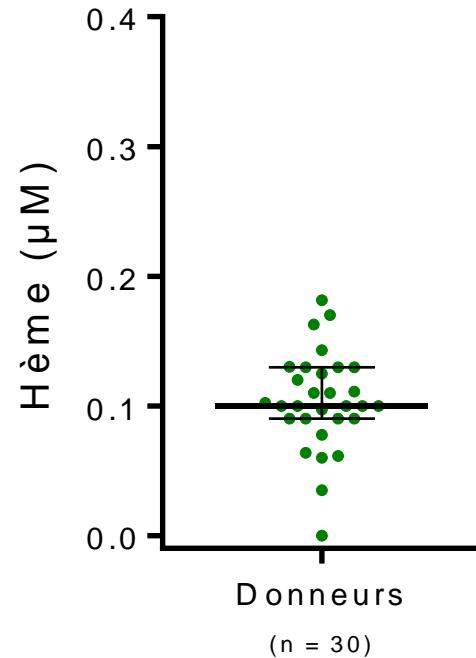
Pas de différence significative dans les valeurs mesurées
Pas d'interférence entre les espèces

EXPLORATION BIOLOGIQUE DES HÉMOLYSES

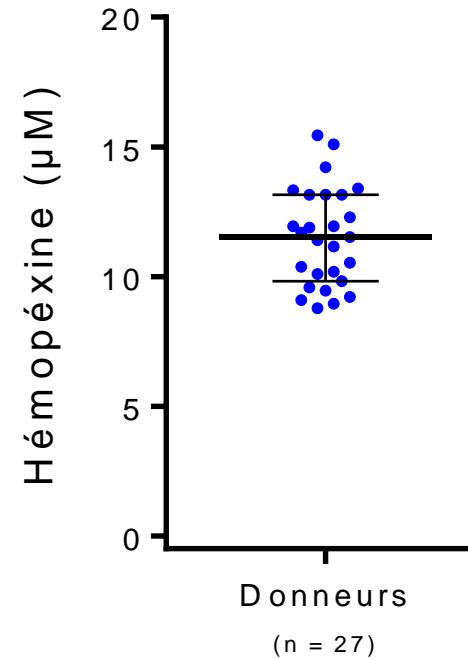
- Concentrations plasmatiques chez des donneurs sains (EFS)



Hémoglobin
Médiane : 1,95 μM
[1,27 - 3,54]



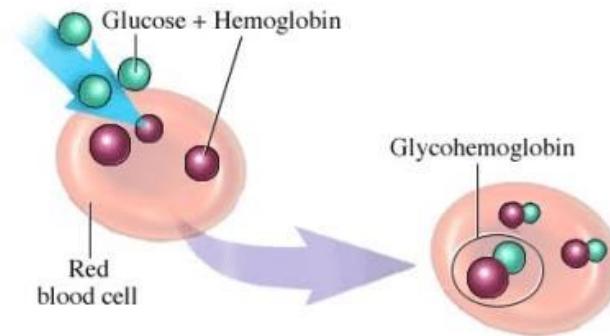
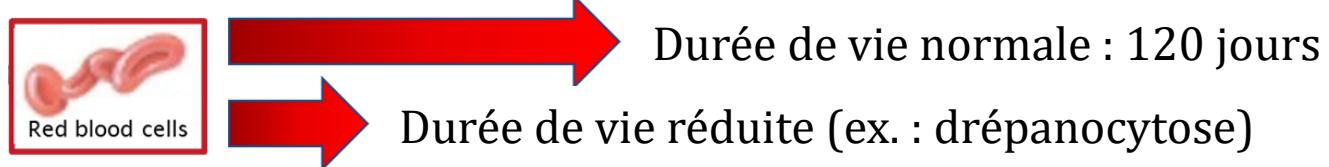
Hème
Médiane : 0,10 μM
[0,09 - 0,13]



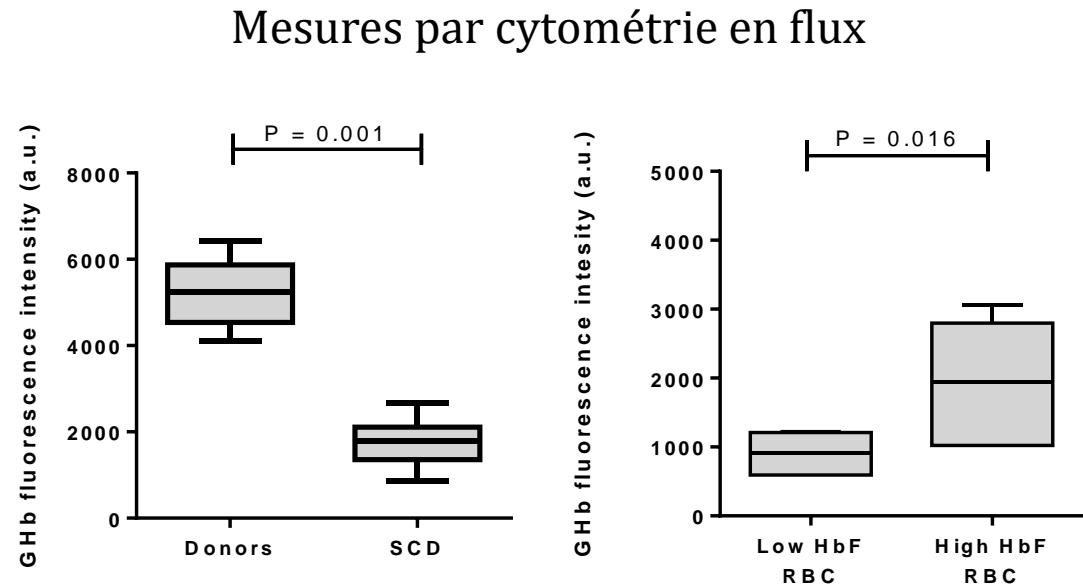
Hémopéxine
Médiane : 11,51 μM
[9,82 - 13,16]

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



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

