



<http://portaildoc.univ-lyon1.fr>

Creative commons : Paternité - Pas d'Utilisation Commerciale -
Pas de Modification 2.0 France (CC BY-NC-ND 2.0)



<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/2.0/fr>



UNIVERSITE CLAUDE BERNARD - LYON 1
FACULTE DE PHARMACIE
INSTITUT DES SCIENCES PHARMACEUTIQUES ET BIOLOGIQUES

THESE n° 33

THÈSE

pour le DIPLOME D'ETAT DE DOCTEUR EN PHARMACIE
présentée et soutenue publiquement le 19 avril 2023

par

M. BOISIS Yoan

Né le 29 décembre 1998 à Lyon

TITRE DE LA THESE

La problématique des prélèvements hémolysés dans les laboratoires d'hématologie :
prévalence dans un laboratoire des Hospices Civils de Lyon et recherche d'une alternative à
la mesure de l'héparinémie en hémostase.

JURY

Présidente du jury : Mme VINCIGUERRA Christine, Professeur des Universités-Praticien
Hospitalier,
Directrice de thèse : Mme JOUSSELME Émilie, Praticien Hospitalier, Service d'Hématologie
Biologique
Tutrice pédagogique : Mme VINCIGUERRA Christine, Professeur des Universités-Praticien
hospitalier
Autre membre du jury : Mr NOUGIER Christophe, Praticien Hospitalier, Service
d'Hématologie Biologique

UNIVERSITE CLAUDE BERNARD LYON I

Président de l'Université	Frédéric FLEURY
Président du Conseil Académique et de la Commission Recherche	Hamda BEN HADID
Vice-Président du Conseil d'Administration	Didier REVEL
Vice-Présidente de la Commission Formation	Céline BROCHIER
Vice-Président Relations Hospitalo-Universitaires	Jean François MORNEX
Directeur général des services	Pierre ROLLAND

SECTEUR SANTE

Doyen de l'UFR de Médecine Lyon-Est	Gilles RODE
Doyen de l'UFR de Médecine et de Maïeutique Lyon Sud - Charles Mérieux	Philippe PAPAREL
Doyen de l'Institut des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques (ISPB)	Claude DUSSART
Doyen de l'UFR d'Odontologie	Jean-Christophe MAURIN
Directeur de l'Institut des Sciences & Techniques de Réadaptation (ISTR)	Jacques LUAUTÉ
Présidente du Comité de Coordination des Études Médicales	Carole BURILLON

SECTEUR SCIENCES ET TECHNOLOGIE

Directrice de l'UFR Biosciences	Kathrin GIESELER
Directeur de l'UFR Faculté des Sciences	Bruno ANDRIOLETTI
Directeur de l'UFR Sciences & Techniques des Activités Physiques et Sportives (STAPS)	Guillaume BODET
Directeur de Polytech Lyon	Emmanuel PERRIN
Directeur de l'Institut Universitaire de Technologie Lyon 1 (IUT)	Michel MASSENZIO
Directeur de l'Institut des Science Financière & Assurances (ISFA)	Nicolas LEBOISNE
Directeur de l'Observatoire de Lyon	Bruno GUIDERDONI
Directeur de l'Institut National Supérieur	Pierre CHAREYRON

du Professorat & de l'Éducation (INSPÉ)

Directrice du Département-composante Génie Électrique & des
Procédés (GEP)

Rosaria FERRIGNO

Directrice du Département-composante Informatique

Saida BOUAZAK
BRONDEL

Directeur du Département-composante Mécanique

Marc BUFFAT

UNIVERSITE CLAUDE BERNARD LYON 1
ISPB -Faculté de Pharmacie Lyon

LISTE DES DEPARTEMENTS PEDAGOGIQUES

**DEPARTEMENT PEDAGOGIQUE DE SCIENCES PHYSICO-CHIMIQUES ET PHARMACIE
GALENIQUE**

- **CHIMIE GENERALE, PHYSIQUE ET MINERALE**

Monsieur Raphaël TERREUX (PR)

Madame Julie-Anne CHEMELLE (MCU)

- **CHIMIE ANALYTIQUE**

Madame Anne DENUZIERE (MCU)

Monsieur Lars-Petter JORDHEIM (MCU-HDR)

Madame Christelle MACHON (MCU-PH)

Monsieur Waël ZEINYEH (MCU)

- **PHARMACIE GALENIQUE -COSMETOLOGIE**

Madame Marie-Alexandrine BOLZINGER (PR)

Madame Stéphanie BRIANCON (PR)

Monsieur Fabrice PIROT (PU-PH)

Monsieur Eyad AL MOUAZEN (MCU)

Madame Sandrine BOURGEOIS (MCU)

Madame Danielle CAMPIOL ARRUDA (MCU)

Madame Ghania HAMDY-DEGOBERT (MCU-HDR)

Monsieur Plamen KIRILOV (MCU)

Madame Giovanna LOLLO (MCU)

Madame Jacqueline RESENDE DE AZEVEDO (MCU)

Monsieur Damien SALMON (MCU-PH)

Madame Eloïse THOMAS (MCU)

- **BIOPHYSIQUE**

Monsieur Cyril PAILLER-MATTEI (PR)

Madame Laurence HEINRICH (MCU)

Monsieur David KRYZA (MCU-PH-HDR)

Madame Sophie LANCELOT (MCU-PH)

Madame Elise LEVIGOUREUX (MCU-PH)

Thibault MASSIAS (ATER)°

DEPARTEMENT PEDAGOGIQUE PHARMACEUTIQUE DE SANTE PUBLIQUE

- **DROIT DE LA SANTE**

Madame Valérie SIRANYAN (PR)

Madame Maud CINTRAT (MCU)

- **ECONOMIE DE LA SANTE**

Madame Nora FERDJAOUI MOUMJID (MCU-HDR)

Monsieur Hans-Martin SPÄTH (MCU-HDR)

- **INFORMATION ET DOCUMENTATION**

Monsieur Pascal BADOR (MCU-HDR)

- **INGENIERIE APPLIQUEE A LA SANTE ET DISPOSITIFS MEDICAUX**

Monsieur Xavier ARMOIRY (PU-PH)

Madame Claire GAILLARD (MCU)

- **QUALITOLOGIE – MANAGEMENT DE LA QUALITE**

Madame Alexandra CLAYER-MONTEMBault (MCU)

Monsieur Vincent GROS (MCU-enseignant contractuel temps partiel)

Madame Audrey JANOLY-DUMENIL (MCU-PH)

Madame Pascale PREYNAT (MCU-enseignant contractuel temps partiel)

- **MATHEMATIQUES – STATISTIQUES**

Madame Claire BARDEL-DANJEAN (MCU-PH-HDR)

Madame Marie-Aimée DRONNE (MCU)

Madame Marie-Paule GUSTIN (MCU-HDR)

- **SANTE PUBLIQUE**

Monsieur Claude DUSSART (PU-PH)

Madame Chloë HERLEDAN (AHU)

Maude BEAUDOIN (ATER)

DEPARTEMENT PEDAGOGIQUE SCIENCES DU MEDICAMENT

- **CHIMIE ORGANIQUE**

Monsieur Pascal NEBOIS (PR)
Madame Amanda GARRIDO (MCU)
Madame Christelle MARMINON (MCU)
Madame Sylvie RADIX (MCU-HDR)
Monsieur Luc ROCHEBLAVE (MCU-HDR)

- **CHIMIE THERAPEUTIQUE**

Monsieur Marc LEBORGNE (PR)
Monsieur Thierry LOMBERGET (PR)
Monsieur Laurent ETTOUATI (MCU-HDR)
Monsieur François HALLE (MCU)
Madame Marie-Emmanuelle MILLION (MCU)

- **BOTANIQUE ET PHARMACOGNOSIE**

Madame Marie-Geneviève DIJOUX-FRANCA (PR)
Madame Anne-Emmanuelle HAY DE BETTIGNIES (MCU)
Madame Isabelle KERZAON (MCU)
Monsieur Serge MICHALET (MCU)

- **PHARMACIE CLINIQUE, PHARMACOCINETIQUE ET EVALUATION DU MEDICAMENT**

Madame Christelle CHAUDRAY-MOUCHOUX (PU-PH)
Madame Catherine RIOUFOL (PU-PH)
Madame Magali BOLON-LARGER (MCU-PH)
Monsieur Teddy NOVAIS (MCU-PH)
Madame Florence RANCHON (MCU-PH)
Madame Céline PRUNET-SPANNO (MCU)
Madame Delphine HOEGY (PHU)

DEPARTEMENT PEDAGOGIQUE DE PHARMACOLOGIE, PHYSIOLOGIE ET TOXICOLOGIE

- **TOXICOLOGIE**

Monsieur Jérôme GUITTON (PU-PH)

Madame Léa PAYEN (PU-PH)

Monsieur Bruno FOUILLET (MCU)

- **PHYSIOLOGIE**

Madame Elise BELAIDI (PU)

Madame Kiao Ling LIU (MCU)

Monsieur Ming LO (MCU-HDR)

- **PHARMACOLOGIE**

Monsieur Sylvain GOUTELLE (PU-PH)

Monsieur Michel TOD (PU-PH)

Monsieur Luc ZIMMER (PU-PH)

Monsieur Roger BESANCON (MCU)

Monsieur Laurent BOURGUIGNON (MCU-PH-HDR)

Madame Evelyne CHANUT (MCU)

Monsieur Nicola KUCZEWSKI (MCU)

Madame Dominique MARCEL CHATELAIN (MCU-HDR)

Monsieur David BARTHELEMY(AHU)

- **COMMUNICATION**

Monsieur Ronald GUILLOUX (MCU)

- **ENSEIGNANTS CONTRACTUELS TEMPS PARTIEL**

Madame Pauline LOUBERT (MCU-enseignant contractuel temps partiel)

Monsieur Vincent LESCURE (MCU-enseignant contractuel temps partiel)

Madame Hortense PRELY (MCU-enseignant contractuel temps partiel)

DEPARTEMENT PEDAGOGIQUE DES SCIENCES BIOMEDICALES A

- **IMMUNOLOGIE**

Monsieur Guillaume MONNERET (PU-PH)

Madame Morgane GOSSEZ (MCU-PH)

Monsieur Sébastien VIEL (MCU-PH-HDR)

Monsieur David GONCALVES (AHU)

- **HEMATOLOGIE ET CYTOLOGIE**

Madame Christine VINCIGUERRA (PU-PH)

Madame Sarah HUET (MCU-PH)

Monsieur Yohann JOURDY (MCU-PH)

- **MICROBIOLOGIE ET MYCOLOGIE FONDAMENTALE ET APPLIQUEE AUX BIOTECHNOLOGIES INDUSTRIELLES**

Monsieur Frédéric LAURENT (PU-PH)

Madame Florence MORFIN (PU-PH)

Madame Veronica RODRIGUEZ-NAVA (PR)

Monsieur Didier BLAHA (MCU-HDR)

Madame Ghislaine DESCOURS (MCU-PH)

Monsieur Alexandre GAYMARD (MCU-PH)

Madame Anne DOLEANS JORDHEIM (MCU-PH-HDR)

Madame Emilie FROBERT (MCU-PH)

Monsieur Jérôme JOSSE (MCU)

- **PARASITOLOGIE, MYCOLOGIE MEDICALE**

Monsieur Philippe LAWTON (PR)

Madame Nathalie ALLIOLI (MCU)

Madame Samira AZZOUZ-MAACHE (MCU-HDR)

DEPARTEMENT PEDAGOGIQUE DES SCIENCES BIOMEDICALES B

- **BIOCHIMIE – BIOLOGIE MOLECULAIRE - BIOTECHNOLOGIE**

Madame Pascale COHEN (PR)

Madame Caroline MOYRET-LALLE (PR)

Madame Emilie BLOND (MCU-PH)

Monsieur Karim CHIKH (MCU-PH)

Madame Carole FERRARO-PEYRET (MCU-PH-HDR)

Monsieur Anthony FOURIER (MCU-PH)

Monsieur Boyan GRIGOROV (MCU)

Monsieur Alexandre JANIN (MCU-PH)

Monsieur Hubert LINCET (MCU-HDR)

Monsieur Olivier MEURETTE (MCU-HDR)

Madame Angélique MULARONI (MCU)

Madame Stéphanie SENTIS (MCU)

Monsieur Jordan TEOLI (AHU)

- **BIOLOGIE CELLULAIRE**

Madame Bénédicte COUPAT-GOUTALAND (MCU)

Monsieur Michel PELANDAKIS (MCU-HDR)

INSTITUT DE PHARMACIE INDUSTRIELLE DE LYON

Madame Marie-Alexandrine BOLZINGER (PR)

Monsieur Philippe LAWTON (PR)

Madame Sandrine BOURGEOIS (MCU)

Madame Marie-Emmanuelle MILLION (MCU)

Madame Alexandra MONTEBAULT (MCU)

Madame Angélique MULARONI (MCU)

Madame Marie-Françoise KLUCKER (MCU-enseignant contractuel temps partiel)

Madame Valérie VOIRON (MCU-enseignant contractuel temps partiel)

PR :	Professeur des Universités
PU-PH :	Professeur des Universités-Praticien Hospitalier
PHU :	Praticien hospitalo-universitaire
MCU :	Maître de Conférences des Universités
MCU-PH :	Maître de Conférences des Universités-Praticien Hospitalier
HDR :	Habilitation à Diriger des Recherches
AHU :	Assistant Hospitalier Universitaire
ATER :	Attaché temporaire d'enseignement et de recherche

Remerciements

À Madame le Docteur Émilie Jouselme

Merci d'avoir accepté de m'accompagner et de m'encadrer au cours de mon travail, du temps que vous m'avez accordé aussi bien lors de mon stage, mais aussi pour l'écriture de ma thèse. Merci de votre disponibilité, de vos précieux conseils et explications qui m'ont permis d'améliorer et de finaliser ce travail.

À Monsieur le Docteur Christophe Nougier

Merci de m'avoir proposé un sujet aussi intéressant, de m'avoir permis de réaliser cette étude dans votre service et de m'avoir accompagné tout au long de mon travail.

À Madame le Professeur Christine Vinciguerra

Merci d'avoir accepté avec autant d'enthousiasme d'être ma tutrice, de votre réactivité, et de me faire l'honneur de présider mon jury.

À ma famille

Merci à tous de votre accompagnement et soutien indéfectible.

Table des matières

Remerciements	10
Liste des tableaux	13
Liste des figures	14
Liste des abréviations	16
1. Introduction.....	18
2. L'hémolyse :.....	19
2.1. Définition de l'hémolyse :	19
2.1.1. Hémolyse physiologique	19
2.1.2. Hémolyse pathologique	21
2.1.3. Seuil de détection d'un prélèvement hémolysé	21
2.2. Étiologies d'un prélèvement hémolysé :.....	22
2.2.1. Hémolyse <i>in vivo</i>	22
2.2.2. Hémolyse <i>Ex vivo</i> :	27
2.3. Prévalence des prélèvements hémolysés	31
2.3.1. Importance de la phase pré-analytique.....	31
2.3.2. Prévalence des prélèvements hémolysés.....	31
2.3.3. Prévalence en fonction des services	33
2.3.4. Causes et conséquences de l'hémolyse.....	33
2.4. Détection d'un prélèvement hémolysé.....	35
2.4.1. Détection macroscopique	35
2.4.2. Détection automatisée	37
2.4.3. Détection via des critères d'analyses.....	38
2.5. Impact de l'hémolyse	40
2.5.1. Les différents types d'impacts	40
2.5.2. Impact de l'hémolyse sur les examens d'hématologie cellulaire	41
2.5.3. Impact de l'hémolyse sur les examens d'hémostase.....	49
3. Prévalence et gestion actuelle d'un prélèvement hémolysé au laboratoire d'hématologie du CBPE des HCL.....	59
3.1. Étude rétrospective de prévalence	59
3.1.1. Introduction et objectif.....	59
3.1.2. Matériels et méthodes.....	59
3.1.3. Résultats.....	60
3.1.4. Discussion.....	61

3.2. Modalités de détection et conduite à tenir au laboratoire	64
3.2.1. En hématologie cellulaire.....	64
3.2.2. En hémostase.....	66
4. Cas particulier en hémostase : mesure de l'activité anti-Xa sur prélèvement hémolysé par technique alternative sur le ROTEM®	69
4.1. Introduction.....	69
4.2. Objectif de l'étude.....	72
4.3. Matériels et méthodes	73
4.4. Résultats	77
4.5. Discussion	82
4.6. Conclusion	85
5. Conclusion générale	89
6. Bibliographie	92

Liste des tableaux

Tableau I : Tableau récapitulatif des étiologies *in vivo* d'un prélèvement hémolysé

Tableau II : Tableau récapitulatif des étiologies *ex vivo* d'un prélèvement hémolysé

Tableau III : Analyse bibliographique de l'impact de l'hémolyse sur les résultats de différents paramètres étudiés en hématologie cellulaire.

Tableau IV : Tableau comparatif des seuils d'impacts de l'hémolyse sur les paramètres étudiés en hématologie cellulaire issu des données de la littérature

Tableau V : Analyse bibliographique de l'impact de l'hémolyse sur les résultats de différents paramètres étudiés en hémostase.

Tableau VI : Tableau comparatif des seuils d'impacts de l'hémolyse sur de nombreux paramètres étudiés en hémostase issu des données de la littérature

Tableau VII: Résultat de la Série A : mesure de l'activité anti-Xa et résultats en CT INTEM et HEPTM sur 30 plasmas de patients traités par héparine non fractionnée

Tableau VIII : Résultats de la Série B : mesure de l'activité anti-Xa et résultats en CT INTEM et HEPTM sur du plasma d'un patient sain après ajout d'héparine non fractionnée *in vitro* à différentes concentrations

Tableau IX : Résultats de la Série C : mesure de l'activité anti-Xa et résultats en CT INTEM et HEPTM sur du plasma d'un patient sain après ajout d'héparine non fractionnée *in vitro* à différentes concentrations et ajout d'hémolysats (0 ; 1 ; 3 ; 5 g/L)

Liste des figures

Figure 1 : Schéma de l'hémolyse physiologique (4)

Figure 2 : Manuel de prélèvement du LBMMS favorisant les bonnes pratiques de réalisation d'un prélèvement (13)

Figure 3 : Prévalence et problèmes pré-analytiques selon l'étude de Salvagno, Lippi et al. (17)

Figure 4 : Évaluation visuelle de l'aspect d'un prélèvement hémolysé (30)

Figure 5 : ACL TOP 750® Werfen Instrumentation Laboratory

Figure 6 : Indice d'hémolyse, ictère et lactescence (HIL) obtenu à l'aide d'un ACL TOP 750®

Figure 7 : Interprétation des résultats : les différents niveaux d'impacts en biologie

Figure 8 : Répartition par services des prélèvements hémolysés provenant du GHE et GHC du 1er octobre 2019 au 31 mars 2020

Figure 9 : Prévalence (en %) sur les 3 laboratoires de biologie médicale des HCL (CBN/CBS/CBPE)

Figure 10 : Scattergrammes du canal RET avec une distribution cellulaire normale (à gauche) et anormal (à droite) (54)

Figure 11 : Procédure de prise en charge d'un prélèvement ayant une CCMH supérieur à 365 g/L en hématologie cellulaire au CBPE en 2019

Figure 12 : Conduite à tenir pour la gestion d'un prélèvement hémolysé en hémostase

Figure 13 : TEMogramme représentant les paramètres rendus par l'automate ROTEM®

Figure 14 : Principe de fonctionnement de l'automate ROTEM® (56)

Figure 15 : Gamme d'échantillons avec une concentration croissante en hémolysat

Figure 16 : Schéma récapitulatif des différents tests réalisés dans l'étude

Figure 17 : Série A : Variation du delta (CT INTEM – CT HEPTEM) (en seconde) en fonction de la concentration en héparine non fractionnée (en UI/mL)

Figure 18 : Série B : Variation du delta CT INTEM – CT HEPTEM (en secondes) en fonction de la concentration en héparine non fractionnée (en UI/mL)

Figure 19 : Série C, sous-groupe 1 : Variation du delta CT INTEM – CT HEPTEM (en seconde) sur patient sains avec une héparinémie à 0 UI/mL en fonction du degré d'hémolyse (Hb en g/L)

Figure 20 : Série C, sous-groupe 2 : Variation du delta CT INTEM – CT HEPTEM (en seconde) sur patient sains avec une héparinémie à 0,48 UI/mL en fonction du degré d'hémolyse (Hb en g/L)

Figure 21 : Série C, sous-groupe 3 : Variation du delta CT INTEM – CT HEPTEM (en seconde) sur patient sains avec une héparinémie à 0,84 UI/mL en fonction du degré d'hémolyse (Hb en g/L)

Figure 22 : Automate Hemochron™ Signature Elite® (Werfen, Instrumentation Laboratory)

Figure 23 : Automate HemCheck® (Sweden) : détection de l'hémolyse en sang total en biologie délocalisée

Liste des abréviations

AFFSSAPS : Agence Française de Sécurité Sanitaire des Produits de Santé

AH : Anémie hémolytique

AHAI : Anémie hémolytique auto-immune

AVK : Antagoniste de la vitamine K

CBN : Centre de Biologie Nord

CBPE : Centre de Biologie et Pathologie Est

CBS : Centre de Biologie Sud

CCMH : Concentration corpusculaire moyenne en hémoglobine

CEC : Circulation extra-corporelle

CIVD : Coagulation intravasculaire disséminée

CV : Coefficient de variation

CT : Clotting time

ESAB : European Scientific Advisory Board

G6PD : Glucose 6 Phosphate Déshydrogénase

GHC : Groupement Hospitalier Centre

GHE : Groupement Hospitalier Est

GR : Globule rouge

Hb : Hémoglobine

HCL : Hospices Civils de Lyon

HELLP : Hemolysis Elevated Liver enzymes Low Platelet

HIL : Hémolyse, Ictère et Lactescence

HNF : Héparine non fractionnée

HPN : Hémoglobinurie paroxystique nocturne

Ht : Hématocrite

LBMMS : Laboratoire de Biologie Médicale Multi-Sites

LPM® : Lab Production Manager®

MCF : Maximum Clot Firmness

NADPH : Nicotinamide adénine dinucléotide phosphate

PF4 : Platelet factor 4

SHU : Syndrome hémolytique et urémique

TCA : Temps de céphaline activée

TCMH : Teneur corpusculaire moyenne en hémoglobine

TIH : thrombopénie induite par l'héparine

TP : Taux de prothrombine

VGM : Volume globulaire moyen

1. Introduction

Les laboratoires de biologie médicale doivent faire face au quotidien à de nombreux défis et notamment celui de rendre des résultats exacts pour une juste prise en charge clinique des patients. En ce sens, les laboratoires sont confrontés à des problèmes analytiques mais aussi pré-analytiques. Au sein de cette phase pré-analytique la plus critique, la présence d'hémolyse dans les prélèvements est un des problèmes le plus fréquent. Les difficultés concernant ces prélèvements se retrouvent au niveau de leur détection qui peut être réalisée de différentes manières et être plus ou moins précise, au niveau du choix des seuils de détection et de rejets afin de standardiser les conduites à tenir et enfin, au niveau de la prise en charge de ces prélèvements pour permettre ou non le rendu d'un résultat.

Aux laboratoires d'hématologie du Centre de Biologie et Pathologie Est (CBPE) des Hospices Civils de Lyon (HCL), l'hémolyse est un problème quotidien auquel doivent faire face les biologistes. En hémostase, par exemple, l'hémolyse est une problématique pour le suivi des patients traités par héparine non fractionnée (HNF). En effet, le suivi du traitement par la mesure de l'activité anti-Xa ou héparinémie doit être réalisé à heures fixes. Le rejet d'un prélèvement hémolysé impact fortement le suivi des patients. L'objectif de notre travail a été de tester une alternative à la mesure des héparinémies sur des prélèvements hémolysés.

Nous avons dans un premier temps procédé à une revue de la littérature concernant l'hémolyse afin de la définir, de comprendre ses différentes origines, mais aussi d'avoir une vision plus globale de sa prévalence, de sa détection ainsi que de son impact dans les laboratoires d'hématologie. Dans un second temps, nous avons effectué une étude au laboratoire du CBPE afin d'identifier la prévalence des échantillons hémolysés, les services impactés et leur gestion actuelle. Enfin dans un troisième et dernier temps, nous avons réalisé une étude pratique sur un autre analyseur du laboratoire d'hémostase afin de déterminer si l'utilisation du ROTEM® (Werfen) pouvait être une alternative envisageable pour prendre en charge les prélèvements hémolysés dans le cadre du suivi des patients traités par héparine non fractionnée.

2. L'hémolyse :

2.1. Définition de l'hémolyse :

L'hémolyse correspond à la lyse des érythrocytes dans le sang à l'origine de leur éclatement et donc la libération de ses composants dans le sang circulant. L'hémolyse peut avoir différentes étiologies.

2.1.1. Hémolyse physiologique

Dans un premier temps, elle peut être physiologique. En effet, les érythrocytes sont détruits au bout de 120 jours entraînant la libération puis le catabolisme de l'hémoglobine (1).

L'explication de cette destruction repose sur plusieurs mécanismes physiologiques :

- Le premier mécanisme repose sur le fait que les globules rouges (GR) ne possèdent pas d'appareil de synthèse. Les enzymes érythrocytaires présentes ont une activité décroissante au cours du temps et ne sont pas renouvelées. Ce processus entraîne une diminution de la protection de l'hémoglobine qui est plus sensible à l'oxydation. Ce ralentissement métabolique est à l'origine des altérations membranaires ainsi que des oxydations métaboliques créant de l'hémoglobine oxydée (= corps de Heinz) facilitant la phagocytose et donc la destruction des globules rouges (2).
- Un second mécanisme physiologique s'explique par les flux ioniques qui sont modifiés au cours du temps entraînant une augmentation du calcium (Ca^{2+}) avec en parallèle une diminution du potassium (K^+) intracellulaire. Tous deux sont à l'origine d'une diminution de la déformabilité des GR puis de leur destruction (1).
- Le troisième mécanisme physiologique dépend de la partie externe des glycoprotéines membranaires des GR. Elles perdent progressivement de l'acide sialique avec pour conséquence une décroissance de la charge négative de la membrane favorisant la phagocytose par les macrophages.

Finalement, ce processus est irréversible et aboutit à la dégradation du GR, puis la libération et le recyclage de son contenu. Cette hémolyse physiologique est de deux types, majoritairement intratissulaire (85%) et minoritairement intravasculaire (15%)(1).

L'hémolyse intratissulaire qui est majoritaire chez l'homme se fait par captation des globules rouges par les macrophages du foie, de la rate et de la moelle osseuse pour ensuite assurer un enchainement de réaction qui va entrainer la dissociation de l'hémoglobine en deux parties, l'hème et la globine. La globine est ensuite dégradée. Pour ce qui est de l'hème, il donne d'une part du fer qui est soit stocké dans les macrophages soit recyclé dans l'érythropoïèse. D'autre part, le fer est dégradé par l'hème oxydase pour libérer ensuite de la biliverdine puis de la bilirubine. Cette dernière est d'abord appelée bilirubine libre avant d'être libérée par les macrophages pour ensuite se lier à l'albumine qui va la transporter jusqu'aux hépatocytes ou elle devient soluble grâce à une glycuconjugaison. Enfin, la bilirubine est excrétée par la bile dans le duodénum lieu de sa dernière transformation en stercobiline et en urobiline qui est à 15% réabsorbée et à 85% éliminée dans les urines (3).

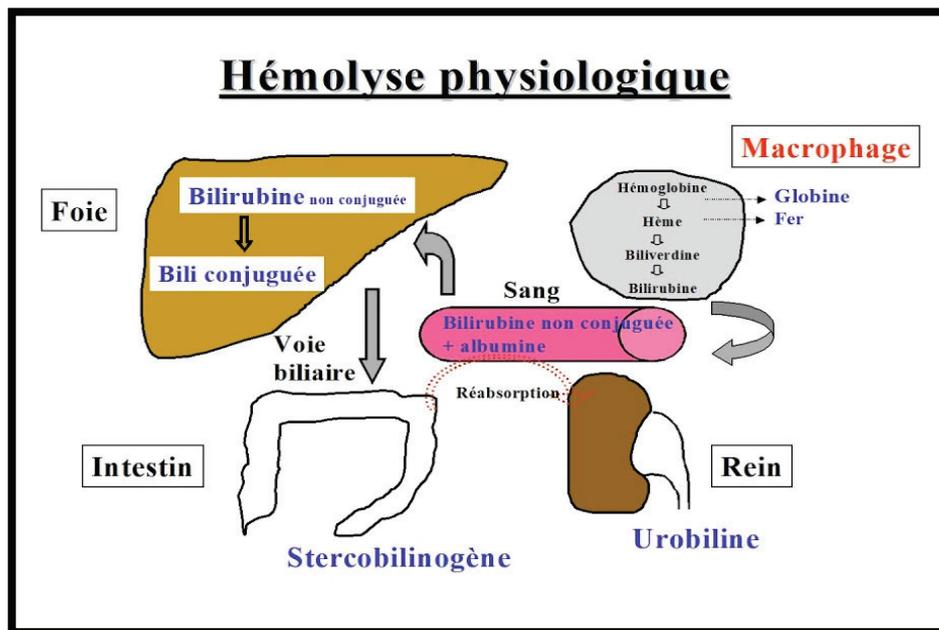


Figure 1 : Schéma de l'hémolyse physiologique (4)

Concernant l'hémolyse intravasculaire, celle-ci se fait par hémolyse spontanée mineure dans les vaisseaux due principalement à une lyse osmotique des globules rouges en fin de vie, mais aussi à une fragmentation des globules rouges vieillissants, et donc moins déformables, dans les capillaires de taille réduite. Elle s'accompagne de la libération d'hémoglobine qui se fixe à l'haptoglobine puis le complexe est éliminé par le foie (5). En parallèle, l'hémoglobine libre va pouvoir suivre deux voies différentes, soit elle est interceptée par les hépatocytes soit elle est séparée en dimères qui passeront le filtre glomérulaire rénale où ils seront en partie

réabsorbés. La réabsorption est un processus limité. Lorsque l'hémoglobine libre est en trop grande quantité, il est observé une hémoglobinurie voire même une tubulopathie (1).

2.1.2. Hémolysse pathologique

En dehors de l'hémolysse physiologique, l'hémolysse peut être pathologique, ce qui correspond à une amplification de l'hémolysse intravasculaire ou intratissulaire. Cette dernière est normalement suivie par une augmentation du nombre de réticulocytes afin de régénérer des globules rouges. L'hémolysse pathologique peut être de type chronique (majoritairement intratissulaire) ou bien de type aigu (majoritairement intravasculaire) et présente un tableau clinique différent. Dans l'hémolysse chronique, il est observé la triade hémolytique qui se traduit par trois symptômes : pâleur, ictère et splénomégalie. Pour ce qui est de la forme aiguë, c'est une urgence vitale qui se caractérisera par des douleurs lombaires, des douleurs abdominales atypiques, un état de choc ainsi qu'une importante hémoglobinurie entraînant une coloration des urines « rouge porto » (3).

Il existe différentes situations cliniques à l'origine d'une hémolysse *in vivo* entraînant une anémie hémolytique détaillées dans les suites. L'hémolysse peut également avoir une origine *ex vivo* lorsqu'elle survient lors du prélèvement ou de son traitement.

2.1.3. Seuil de détection d'un prélèvement hémolysé

L'hémolysse peut entraîner des interférences au niveau des résultats biologiques. Le seuil de détection à partir duquel il peut être considéré une hémolysse dans un prélèvement biologique n'est pas standardisé. La valeur seuil varie en fonction des articles de la littérature : en comparant les études de Lippi *et al.* (6) et de D'angelo *et al.* (7), nous constatons que le seuil à partir duquel un prélèvement est considéré comme hémolysé diffère : à partir d'un taux à 0,3 g/L (7) ou à partir de 0,5-1,0 g/L (8). Cette différence significative peut entraîner une modification de prise en charge d'un échantillon notamment faiblement hémolysé.

2.2.Étiologies d'un prélèvement hémolysé :

Au laboratoire, lorsqu'un prélèvement hémolysé est réceptionné, différentes étiologies classées en deux catégories sont possibles, les hémolyses *in vivo* pathologiques et *ex vivo* au niveau du prélèvement.

2.2.1. Hémolyse *in vivo*

L'hémolyse *in vivo* pathologique a lieu chez le patient. Elle peut avoir une cause de nature corpusculaire par une anomalie intrinsèque aux GR, ou une cause de nature extra corpusculaire lorsque la destruction est dû à un agent extérieur (Tableau I).

Concernant les causes corpusculaires, elles sont liées à un défaut constitutionnel des GR.

- La majorité sont congénitales (8) :
 - Anomalie de la membrane : sphérocytose héréditaire ou maladie de Minkowski-Chauffard. Cette maladie repose sur la mutation d'un gène qui code pour des protéines constituant la membrane du GR. Le GR va prendre une forme sphérique très dense, très compacte : des sphérocytes. Ces sphérocytes sont détectés par les macrophages quand ils passent dans la rate et sont détruits, entraînant une anémie hémolytique (5).
 - Anomalie de l'hémoglobine : hémoglobinopathie comme la drépanocytose, les thalassémies, les hémoglobinoses.
 - Déficits enzymatiques comme le déficit en Glucose 6 Phosphate Déshydrogénase (G6PD), déficit le plus répandu (enzyme portée par le chromosome X) ; déficit en pyruvate kinase ou d'autres déficits comme le déficit de la voie d'Embden-Meyerhof (et métabolisme des nucléotides). Si ces enzymes ne fonctionnent pas bien, les globules rouges sont extrêmement sensibles à l'oxydation (moins de régénération de Nicotinamide adénine dinucléotide phosphate (NADPH) donc moins d'agents réducteurs pour faire face au stress oxydatif) et peuvent être très facilement détruits par induction de crises hémolytiques.

- Plus rarement, l'anomalie corpusculaire est acquise : Hémoglobinurie paroxystique nocturne (HPN) ou maladie de Marchiafava-Micheli. Cette maladie entraîne la production d'hématies (en proportions plus ou moins importantes) anormalement sensibles à l'action lytique du complément (2).

Concernant les causes extra corpusculaires dues à un agent extérieur, il faut en distinguer deux types :

- Les causes immunologiques (9) :
 - Allo-immunisation : maladie hémolytique périnatale, transfusions incompatibles...
 - Auto-immunisation : anémie hémolytique auto-immune (AHA) transitoires au cours des épisodes infectieux ou anémie hémolytique auto-immune sur pathologie chronique sous-jacente (lymphomes, cancers, troubles dysimmunitaires...). Dans ce cas, les patients synthétisent des anticorps contre leur propre GR.

Ces AHA peuvent être de deux types :

- ✓ Soit une AHA à auto-anticorps chaud, anticorps exerçant leur activité hémolytique à environ 37°C (cas le plus fréquent). Leur présence peut être due à des hémopathies ou à des tumeurs solides, des maladies auto-immunes ou inflammatoires (lupus systémique, syndrome des anti-phospholipides), des maladies infectieuses (VIH, VHC, VHB), des médicaments ou encore à des déficits immunitaires primitifs.
- ✓ Soit des AHA à auto-anticorps froid aussi appelé à « agglutinine froide », anticorps avec une activité hémolytique à une température inférieure 37°C. Ces anticorps sont le plus souvent retrouvés chez l'enfant ou le jeune adulte en post-infectieux et est transitoire dans ce cas. Au contraire, chez l'adulte de plus de 50 ans, cette maladie évolue en général sur un mode chronique : la maladie chronique à agglutinine froide.
- Médicaments : production d'anticorps dirigés contre les médicaments pouvant atteindre les globules rouges si le médicament est fortement

lié aux globules rouges. C'est le cas par exemple de l'Oxaliplatine libérant du Platine qui se lie irréversiblement aux globules rouges.

Une autre possibilité plus rarement observée est la production d'auto-anticorps anti-globules rouges induite par le médicament. Dans ce cas, les anticorps vont cibler directement des protéines de la membrane des globules. Ce mécanisme sera retrouvé avec certains médicaments comme la Fludarabine, les interférons alpha, l'alphaméthylidopa...

- Les causes non immunologiques (10) :

▪ Toxiques :

- ✓ Dû à des agents oxydants (les sulfones, la phénacétine, le cisplatine...) qui auront soit une action directe en oxydant la membrane de l'hémoglobine, soit une action indirecte : réaction avec l'oxygène de l'hémoglobine entraînant une production excessive de peroxyde qui ne pourra plus être détoxifié par le glutathion,
- ✓ Dû à des agents méthémoglobinisants (nitrate, chlorate, naphthaline, aniline),
- ✓ Dû à l'inhalation d'hydrogène arsénié, de plomb (entraînant un saturnisme),
- ✓ Dû à des venins (morsure de serpent ou d'araignée),
- ✓ Dû à des champignons : Amanite rougissante (*Amanita rubescens*), Amanite fauve (*Amanita fulva*), Helvelle crépue (*Helvella crispa*) et autres helvelles,
- ✓ Dû à une action lipolytique (benzène, saponine, toluène...),
- ✓ Dû aux sels de cuivre (maladie de Wilson)

- Médicamenteuses : dû à un effet oxydatif de la substance mère, ou un effet oxydatif d'un métabolite, ou encore à la production de radicaux libres durant le métabolisme. De nombreux médicaments sont en causes, en particulier lors de déficit en G6PD (médicaments contre indiqués : Bleu de Méthylène, Dapsone, Nitrofurantoïne, Rasburicase, Sulfadiazine...)

- Infectieuses :

- ✓ Paludisme : selon les espèces, on observe des hémolyses aiguës, chroniques ou récurrentes
 - ✓ Babésiose : maladie parasitaire transmise par des piqûres de tiques provoquant une maladie aiguë fébrile qui s'accompagne d'anémie hémolytique
 - ✓ Bartonella : piqûre par des phlébotomes qui transmettent des bactéries adhérentes aux GR entraînant une anémie hémolytique (AH) aiguë intravasculaire
 - ✓ Leishmaniose viscérale : cette maladie se caractérise par une atteinte du foie et de la rate entraînant une hépatosplénomégalie et une destruction non spécifique des globules rouges par les macrophages (en tant que réponse non spécifique au parasite)
 - ✓ Septicémie à *Clostridium perfringens* libérant une toxine qui est une phospholipase entraînant la formation de lysolécithine qui est une enzyme ayant un fort pouvoir hémolytique.
 - ✓ De nombreuses autres infections peuvent entraîner des hémolyses soit par action directe en libérant des composés hémolytiques (*C. perfringens*, streptococcus) ou de manière indirecte en entraînant une Coagulation intravasculaire disséminée (CIVD) ou par fragmentation de type syndrome hémolytique et urémique (SHU).
- Mécaniques entraînant une fragmentation des hématies : valves cardiaques, valvoplastie, circulation extra corporelle, micro-angiopathies thrombotiques (atteintes endothéliales avec activations anormales des plaquettes formant des thrombus, hémolyse formant des schizocytes). Dans ces cas, la présence « d'obstacle » dans la circulation fait que les GR sont projetés sur l'obstacle. Ils sont alors brisés, responsables de la présence de schizocytes.
 - Métaboliques : pathologie hépatiques (cirrhose), hématologiques...
 - Causes physiques : brûlures étendues (exposition supérieure à 47°C) ou gelures majeures.

- HELLP syndrome (= Hemolysis Elevated Liver enzymes Low Platelet) qui est une variante de pré éclampsie se traduisant par la libération de substance activant les plaquettes et entraînant une hémolyse. Une anémie hémolytique.

Tableau I : Tableau récapitulatif des étiologies *in vivo* d'un prélèvement hémolysé

Hémolyses d'origines corpusculaires	Congénitale	<ul style="list-style-type: none"> • Anomalie de la membrane : maladie de Minkowski-Chauffard = sphérocytose héréditaire. • Anomalie de l'hémoglobine : hémoglobinopathie (drépanocytose, hémoglobinose, thalassémie). • Déficits enzymatiques : déficit en glucose-6-phosphate déshydrogénase, déficit en pyruvate kinase, déficit de la voie d'Embden-Meyerhof).
	Acquise	<ul style="list-style-type: none"> • Hémoglobinurie paroxystique nocturne = maladie de Marchiafava-Micheli
Hémolyses d'origines extra corpusculaires	Immunologique	<ul style="list-style-type: none"> • Allo-immunisation : maladie hémolytique périnatale, transfusion incompatible. • Auto-immunisation : AHAI à anticorps chaud ou anticorps froid. • Médicamenteuse : Oxaliplatine, Fludarabine, Interferons alpha...
	Non immunologique	<ul style="list-style-type: none"> • Toxique ayant pour origine : des agents oxydants (sulfones, phénacétine, cisplatine...), des agents méthémoglobinisants (nitrate, chlorate, naphthaline...), des inhalations d'hydrogène arsénié, des inhalations de

		<p>plomb, des venins, des champignons, une action lipolytique, aux sels de cuivre.</p> <ul style="list-style-type: none"> • Médicamenteuse : Bleu de méthylène, Dapsone, Nitrofurantoïne, Rasburicase... • Infectieux : paludisme, babésiose, bartonella, leishmaniose viscérale, septicémie à <i>C. perfringens</i>... • Mécanique : valve cardiaque, valvoplastie, circulation extracorporelle, micro-angiopathie thrombotique... • Métabolique : pathologies hépatiques, hématologiques... • Physique : brûlure, gelure... • HELLP syndrome
--	--	--

2.2.2. Hémolysse *Ex vivo* :

L'hémolysse *ex vivo* (11) (12) a lieu au décours ou après le prélèvement. Il existe différentes causes (Tableau II) :

- Lors de la phlébotomie, il existe de nombreuses sources d'hémolysse : modalités de prélèvements (sur cathéter intraveineux ou en capillaire), prélèvements traumatiques (aspiration trop rapide), difficultés dans certains services (urgence, pédiatrie...), lieu de prélèvement, positionnement du bras ou si le patient serre le bras, durée de pose du garrot, gauge d'aiguille (aiguille trop fine), transfert depuis une seringue...
- Transport de l'échantillon : l'utilisation ou non de tubes pneumatiques et leurs vitesses, température et durée de transport.
- Traitement de l'échantillon : durée entre le prélèvement et l'analyse, type et paramétrage de la centrifugeuse (température, vitesse, temps, frein), mauvaise intégrité de la barrière de séparation, nouvelle centrifugation de l'échantillon.
- Analyse : durée d'attente entre la centrifugation et l'analyse.

- Stockage de l'échantillon : température et durée.

Tableau II : Tableau récapitulatif des étiologies *ex vivo* d'un prélèvement hémolysé

Phlébotomie	<ul style="list-style-type: none"> • Type de cathéter (intraveineux ou capillaire) • Lieu de prélèvement (antébrachial ou autre) et positionnement du bras • Patient contracte ou non le bras ou la main • Durée de pose du garrot • Gauge de l'aiguille (plus ou moins fine) • Tube utilisé • Prélèvement traumatique (rapidité du prélèvement, débit du patient, transfert de seringue...) • Service d'origine (Urgence, pédiatrie, centre de prélèvement...)
Transport de l'échantillon	<ul style="list-style-type: none"> • Utilisation ou non de tube pneumatique • Vitesse des tubes pneumatique • Température et durée du transport
Traitement de l'échantillon	<ul style="list-style-type: none"> • Durée entre le prélèvement et l'analyse • Type et paramétrage de la centrifugeuse (centrifugation : température, vitesse de centrifugation, durée, frein) • Mauvaise intégrité de la barrière de séparation • Possible nouvelle centrifugation
Analyse de l'échantillon	<ul style="list-style-type: none"> • Durée d'attente entre la centrifugation et l'analyse
Stockage de l'échantillon	<ul style="list-style-type: none"> • Température • Durée

Concernant ces causes non pathologiques liées aux prélèvements, il existe des guides pour les préleveurs. Par exemple aux Hospices Civils de Lyon (HCL), les règles de bonnes pratiques de prélèvements sont diffusées par le système documentaire interne du laboratoire dans le Manuel de Prélèvement du Laboratoire de Biologie Médicale Multi-Sites (LBMMS) (13).

Ce manuel reprend dans un premier temps toutes les informations nécessaires à la réalisation d'un prélèvement de qualité. Il comporte tout d'abord des informations sur les logiciels utilisés pour le traitement des échantillons, puis détail le matériel de prélèvement :

- La structure d'approvisionnement
- Les différents types de tubes qu'il faut selon ce qui est prélevé (sang, urine, autres) et selon l'examen à réaliser (hémocultures, seringues gaz du sang, cantines, pots, poudriers)
- Les différentes unités de prélèvement

Il décrit ensuite les étapes à suivre avant la réalisation du prélèvement comme les règles de remplissage des fiches de demande, le personnel autorisé, la bonne préparation du matériel, ou encore la vérification de l'identité du patient.

Le manuel présente ensuite une explication détaillée de la réalisation du prélèvement dans un premier temps veineux :

- Choix de l'antiseptique en fonction des analyses ou du contexte
- Pose du garrot : objectif, position, durée
- Prélèvement : ordre des tubes, position du bras et du tube, remplissage du tube, homogénéisation et identification du tube

Dans un deuxième temps, le manuel précise comment réaliser des prélèvements particuliers comme les prélèvements capillaires détaillés en dix étapes précises.

Enfin, le manuel prodigue des informations quant à l'emballage et l'acheminement des prélèvements en détaillant les conditions de transport comme par exemple des indications sur l'utilisation des pneumatiques, de la température...

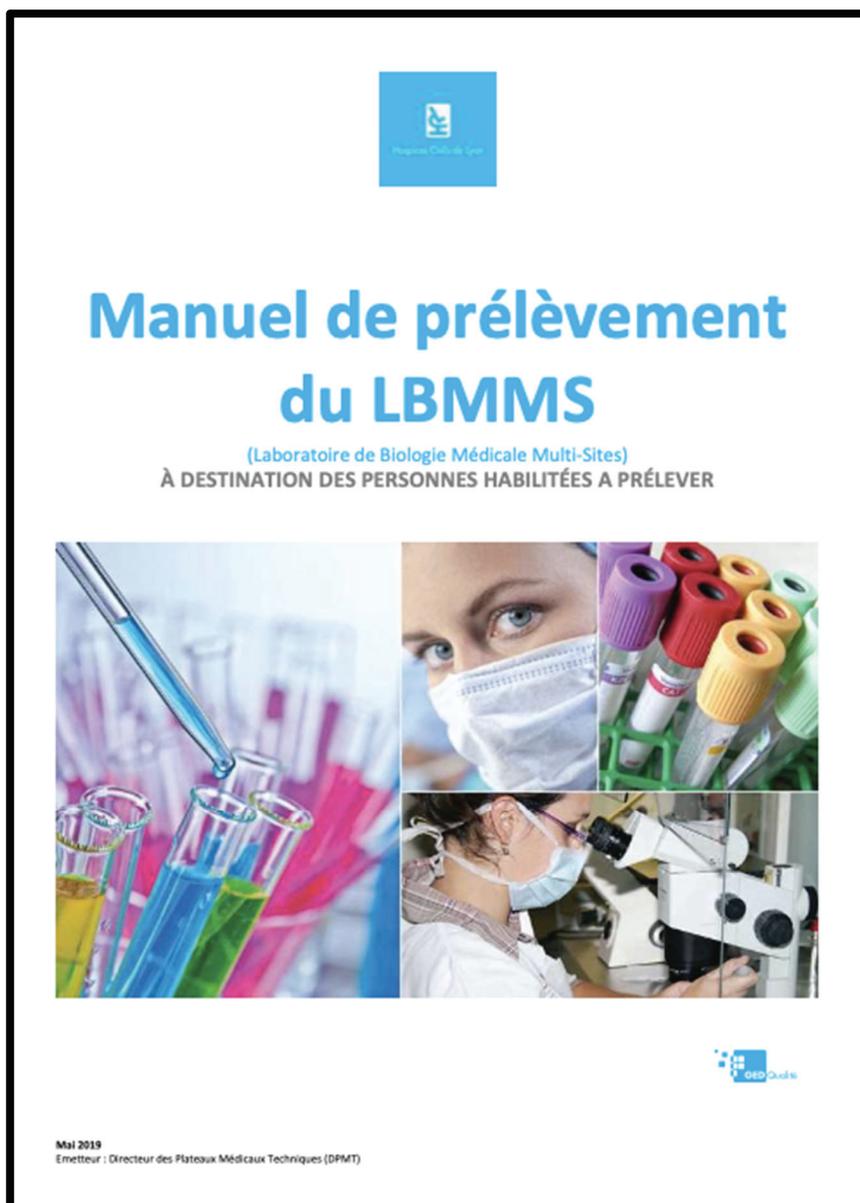


Figure 2 : Manuel de prélèvement du LBMMS favorisant les bonnes pratiques de réalisation d'un prélèvement (13)

De manière générale, cette documentation permet de limiter la fréquence des hémolyses *ex-vivo* afin d'améliorer la prise en charge des prélèvements et donc des patients. Bien que le nombre d'échantillons hémolysés puisse être réduit grâce à ces documents, il existe toujours des prélèvements hémolysés qu'il faut impérativement détecter.

2.3. Prévalence des prélèvements hémolysés

2.3.1. Importance de la phase pré-analytique

Dans les laboratoires, la phase pré-analytique est une partie essentielle du processus d'analyse, au même titre que les phases analytiques. En effet, des preuves solides ont montré que la grande majorité des erreurs de diagnostic proviennent des nombreuses activités, encore largement manuelles, liées au prélèvement, à la manipulation et au transport des échantillons biologiques ainsi qu'aux étapes de traitement pré-analytique de l'échantillon (14). La phase pré-analytique est d'une telle importance pour garantir la qualité du prélèvement que Dikmen et al. (15) soutiennent dans leur article l'idée de Plebani et al. (16) que la phase pré-analytique doit être subdivisée en une phase pré-pré-analytique et en une phase pré-analytique. La phase pré-pré-analytique comprenant la demande de test, l'identification du patient ou de l'échantillon, le prélèvement, la manipulation et le transport de l'échantillon, et la phase pré-analytique comprenant les étapes de préparation de l'échantillon pour l'analyse, telles que la centrifugation, l'aliquotage et le tri.

2.3.2. Prévalence des prélèvements hémolysés

La phase pré-analytique est donc d'une grande importance pour les analyses, mais de nombreuses erreurs sont rencontrées au cours de cette dernière, et différents articles de la littérature ont essayé de trouver laquelle est la plus fréquente.

En étudiant la littérature, nous avons trouvé trois études qui traitent des erreurs lors de la phase pré-analytique. Une première étude de Salvagno, Lippi et *al.* (17) concernant une étude de janvier 2005 à décembre 2006 sur 65 283 prélèvements de routine, démontre que mis à part la non-réception de l'échantillon, l'hémolyse a une prévalence de plus de 38%. La fréquence des prélèvements hémolysés par rapport aux autres non-conformités des prélèvements est donc largement supérieure. Nous pouvons observer cela sur le graphique ci-dessous (figure 3), construit à partir des résultats de l'article Salvagno, Lippi et al. (17) confirmant la prépondérance de l'hémolyse parmi les erreurs pré-analytique.

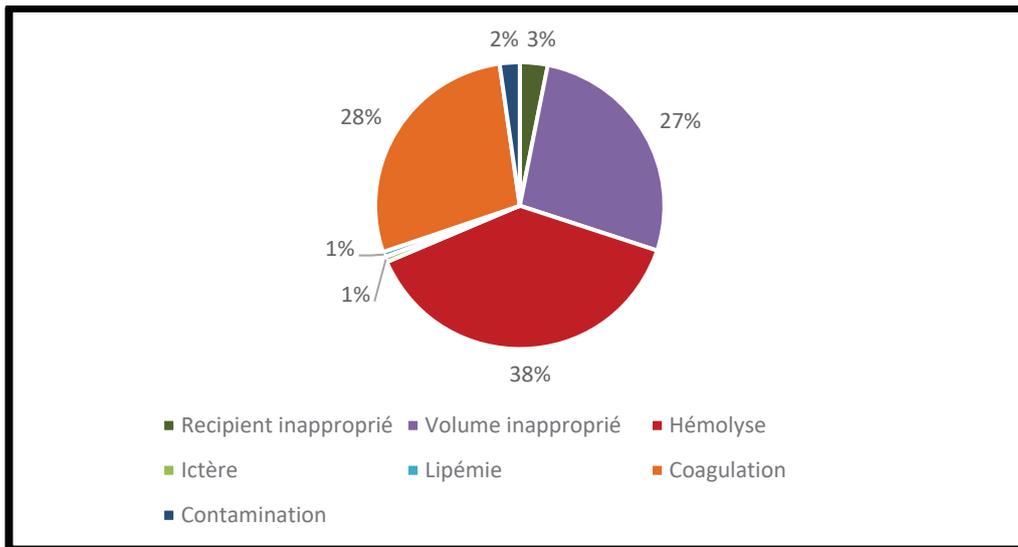


Figure 3 : Prévalence et problèmes pré-analytiques selon l'étude de Salvagno, Lippi et al. (17)

Dans une seconde étude de prévalence des échantillons hémolysés sur les prélèvements en laboratoire menée par Carraro P et al.(18), il est observé des résultats similaires concernant le taux de prélèvement hémolysés. En effet, ce dernier précise que les échantillons hémolysés sont la raison la plus courante de rejet des prélèvements, et représentent 60% des échantillons rejetés (soit cinq fois plus que la deuxième cause la plus courante) (19). Cette étude est réalisée pendant une période de 30 jours, durant cette période, 15 323 échantillons de sang ont été analysés. Parmi ces prélèvements, 505 spécimens hémolysés ont été recensés, soit environ 3,3 % des échantillons.

Enfin, une troisième étude de Lippi et al. (20), qui est réalisée sur une période d'un an et sur un total de 150 516 tubes pour des tests de routine, nous pouvons distinguer : 16 960 provenant des urgences, 2 652 de l'unité d'hémodialyse, 10 116 de l'unité de soins intensifs, 62 068 des services de médecine interne, 38 084 des services de chirurgie, 11 756 des services pédiatriques et 880 du centre de phlébotomie ambulatoire. Sur la totalité de ces prélèvements, il en ressort que le nombre de spécimens hémolysés enregistré était de 8 440 ce qui représente environ 5,6 % des prélèvements.

Finalement, il en ressort dans toutes les études que l'hémolyse est l'erreur pré-analytique la plus fréquente avec une prévalence qui oscille entre 3 et 6%.

2.3.3. Prévalence en fonction des services

Après avoir observé l'importante fréquence de l'hémolyse, d'autres études se sont intéressées à la prévalence de cette dernière en fonction des différents services. En effet, l'hémolyse pathologique, bien qu'impactant pour les rendus de résultat est bien minoritaire par rapport à l'origine ex vivo de l'hémolyse qui survient à partir du prélèvement. Par exemple, dans l'article de Burns R, Yoshikawa N. et *al.* (21), étude réalisée sur 4 021 patients, il a été examiné les taux d'hémolyse sur deux échantillons différents, un provenant du service médical hospitalier et un provenant du service d'urgence. L'hémolyse est retrouvée beaucoup plus fréquemment dans les échantillons des urgences : sur les 2 992 prélèvements de sang provenant des urgences, 372 étaient hémolysés, soit 12,4%, sur les 1 029 échantillons provenant du service médical, 16 étaient hémolysés, soit 1,6%.

De même, dans l'étude de Lippi G., Salvagno GL. et *al.* (20), le même constat est réalisé. A la fin de cette étude sur 150 516 échantillons, il est conclu que la prévalence de l'hémolyse est distribuée de façon disparate en fonction du site de collecte avec un taux plus élevé pour les échantillons provenant des services d'urgences et un taux plus faible pour les échantillons collectés dans le centre de prélèvement des patients externes.

À travers ces études tirées de la littérature, nous constatons bien que l'hémolyse est la cause majeure des interférences pré-analytique et qu'elle est distribuée de manière hétérogène en fonction des services cliniques préleveurs (entre 8 et 9% en service d'urgence) (22). Ces études abordent aussi le sujet des potentielles causes de ces hémolyses selon les services et nous montrent que ces hémolyses ont une explication.

2.3.4. Causes et conséquences de l'hémolyse

Pour déterminer les causes et les conséquences de l'hémolyse, nous nous sommes intéressés à plusieurs études de la littérature. Dans l'étude de Burns R., Yoshikawa N. et *al.* (21) il est comparé les techniques de prélèvement afin de déterminer quels facteurs jouent un véritable rôle dans les hémolyses en service d'urgence. Le premier facteur évoqué est un problème de formation du personnel. En comparant les deux groupes, il est retrouvé que les personnes du service médical avaient toutes suivi une formation officielle et obtenu un certificat sur les techniques de prélèvement sanguin. En revanche, les préleveurs des urgences ont été formés très rapidement sans certification. L'autre cause mise en avant est le site de ponction. Dans le

groupe du service médical, le site était principalement dans la fosse antécubitale (site optimal de prélèvement), contrairement au groupe du service d'urgence qui était plus distal et donc moins adaptés expliquant la difficulté des prélèvements en service d'urgence. Cette même cause est reprise dans l'article de Pretlow L., Gandy T. et *al.* (23).

La conséquence de l'hémolyse est qu'elle est la principale cause de rejet des résultats dans les laboratoires du monde entier, avec une fréquence 5 à 10 fois supérieure aux autres anomalies pré-analytiques (24). Cela est principalement dû au fait que la dégradation des globules rouges et la libération d'hémoglobine et d'autres composants intracellulaires qui en découle dans le sérum ou le plasma provoquent un grand nombre d'interférences biologiques, chimiques et spectrophotométriques, rendant ainsi les résultats des tests souvent ininterprétables et/ou obligeant les biologistes à ne pas rendre les résultats dans la plupart des cas. Néanmoins, nous observons une hétérogénéité concernant la prise en charge de ces prélèvements hémolysés : selon une enquête de l'ESAB (European Scientific Advisory Board), en Europe, 37% des laboratoires les rejettent, mais cela est variable d'un pays à l'autre. Aux USA, ce sont 88% des prélèvements hémolysés qui sont rejetés (25).

Il est évident que la pratique de la suppression des résultats des tests sur des échantillons hémolysés est associée à de nombreuses conséquences : au niveau clinique, cela entraîne un retard de rendu des résultats, du diagnostic et donc de prise en charge du patient ; au niveau économique, un non rendu des résultats entraîne des coûts supplémentaires nécessaires pour prélever à nouveau des échantillons de sang mais aussi pour faire une nouvelle série d'analyse, et au niveau organisationnelle cela ajoute de l'activité qui aurait pu être évitée.

Une autre étape primordiale au laboratoire consiste en la détection d'une hémolyse sur un prélèvement et est réalisée de différentes manières.

2.4. Détection d'un prélèvement hémolysé

L'évaluation de la qualité de l'échantillon avant le test est un pilier du diagnostic au laboratoire. Cette évaluation, dont l'objectif est l'identification des prélèvements avec des anomalies pré-analytiques, dont l'hémolyse, a également été recommandé et approuvé par des organisations internationales telles que l'Organisation internationale de normalisation (ISO) 15189 (26).

Au cours des années précédentes, plusieurs propositions sur la manière de gérer les échantillons hémolysés ont été publiées (27) (28). Néanmoins, il n'existe toujours pas de stratégie harmonisée pour la gestion des échantillons hémolysés dans les différents laboratoires du monde que ce soit pour leur détection, les seuils de rendu des résultats ou bien pour leur prise en charge.

Effectivement, les techniques de détection sont très variables d'un pays à un autre, et même d'un laboratoire à un autre. En effet, dans la littérature, deux techniques de détection sont utilisées, selon l'enquête de l'ESAB seulement 42% des laboratoires en Europe utilisent une technique automatisée de détection des prélèvements hémolysés, c'est-à-dire microscopique (contre seulement 11% aux États-Unis) alors que 56% choisissent de réaliser cette détection de manière visuelle (25), en technique macroscopique. Nous allons donc étudier plus précisément ces deux techniques de détection.

2.4.1. Détection macroscopique

Bien que l'importance de l'évaluation de la qualité de l'échantillon avant les analyses fasse l'objet d'un consensus, la qualité des échantillons a longtemps été évaluée par inspection visuelle du sérum ou du plasma, autrement appelé détection macroscopique.

La détection macroscopique d'un plasma consiste à observer visuellement son aspect. En effet lors d'une hémolyse, le plasma aura une couleur différente de la normale : il va devenir rouge orangé. En général, ce changement de coloration est observable dès lors que le taux d'hémoglobine est supérieur à 0,3 g/L (29). Ce changement de couleur donne une indication avant tout qualitative bien qu'en fonction de l'intensité de la coloration, on pourra avoir un ordre d'idée de l'intensité du phénomène d'hémolyse (figure 4).

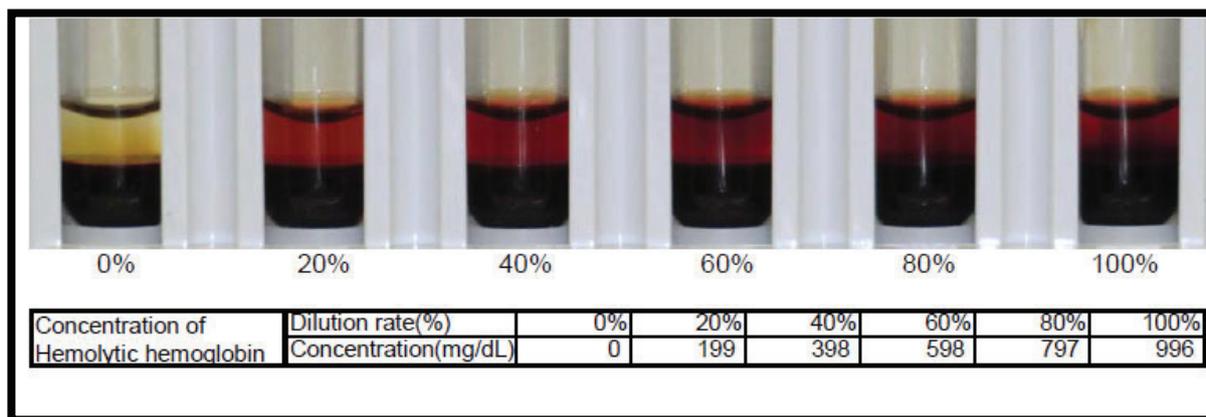


Figure 4: Évaluation visuelle de l'aspect d'un prélèvement hémolysé (30)

Cette technique macroscopique présente cependant de nombreux inconvénients. Plusieurs sources de données attestent aujourd'hui que l'inspection visuelle des échantillons n'est pas réellement fiable. En effet, il existe tout d'abord une grande variabilité interindividuelle. Cette détection est très subjective, non standardisée et non reproductible. De plus, elle est beaucoup plus chronophage qu'avec un automate (31), et peut également impacter le résultat rendu.

Il a également été démontré que non seulement la détection visuelle, mais aussi la décision de communiquer ou non les résultats des tests effectués sur des échantillons hémolysés, peuvent varier considérablement d'une personne à l'autre lorsqu'elle est basée sur le jugement individuel (32).

Pour minimiser les erreurs associées à une telle pratique, l'évaluation visuelle du niveau d'hémolyse et la gestion des échantillons hémolysés basées sur une opinion subjective individuelle et non standardisée ne devraient plus être effectuées et doivent être remplacées par des systèmes de détection et de gestion automatisés. Pour cela, il est utilisé dans certains laboratoires l'indice sérique HIL (Hémolyse, Ictère et Lactescence) afin de détecter les potentielles interférences causées par ces derniers. Dans les établissements où l'indice H n'est pas disponible, l'évaluation visuelle de l'hémolyse en comparant la teinte de l'échantillon avec un nuancier afin de maintenir une certaine forme de standardisation est préconisée. Cependant, le passage à l'utilisation d'automate pour la détection d'hémolyse semble inévitable actuellement.

2.4.2. Détection automatisée

L'évaluation automatique des indices HIL dans les plateformes analysants de nombreux échantillons comme celle du Centre de Biologie et Pathologie Est (CBPE) des Hospices Civils de Lyon (HCL), permet non seulement une estimation beaucoup plus précise, exacte et reproductible des interférences potentielles, mais elle est également facile et plus rapide. Par ailleurs, les systèmes automatisés n'affectent pas la cadence d'exécution des analyseurs et constituent le seul moyen fiable d'identifier les échantillons hémolysés. Par conséquent, la mesure automatisée systématique de l'indice H dans tous les échantillons de sérum et de plasma et la mise en œuvre de règles décisionnelles automatisées basées sur des algorithmes devraient être fortement recommandées pour la gestion des échantillons hémolysés.

Un exemple de solution en hémostase est l'utilisation d'automate comme l'analyseur ACL TOP 750®, Werfen, Instrumentation Laboratory (figure 5) pour détecter le phénomène d'hémolyse.



Figure 5 : ACL TOP 750® Werfen Instrumentation Laboratory (33)

Cet automate est équipé d'un système pré-analytique permettant de donner un indice sur les valeurs d'hémoglobine, d'ictère et de lactescence : l'indice HIL (représenté par des histogrammes, figure 6).

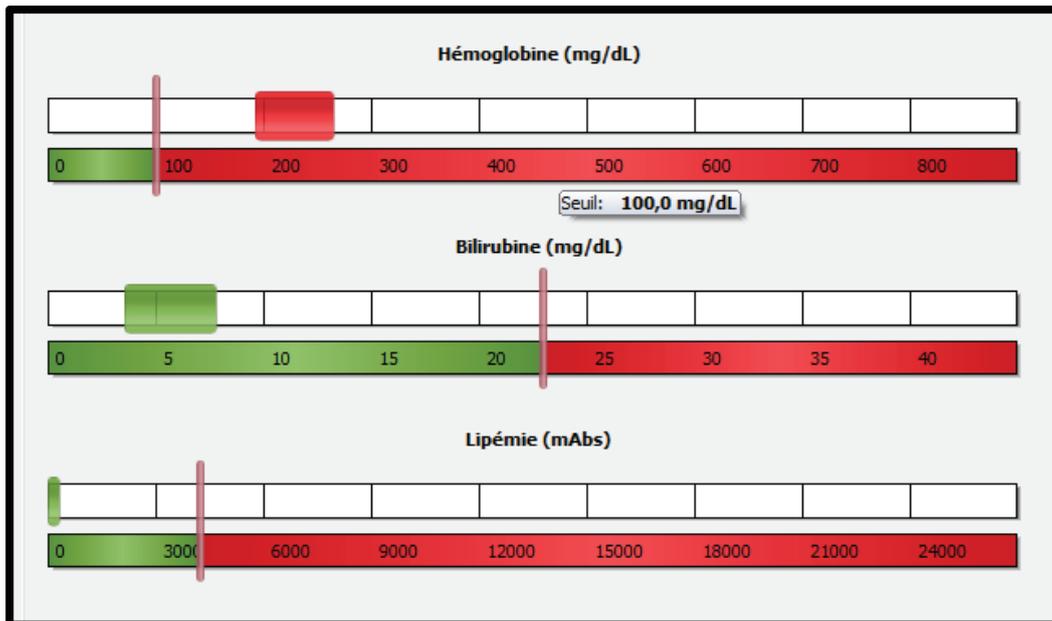


Figure 6 : Indice d'hémolyse, ictère et lactescence (HIL) obtenu à l'aide d'un ACL TOP 750®

La mesure de l'indice H repose sur la mesure de l'intensité de la coloration rouge (ou diffraction optique) provoquée par une éventuelle hémolyse. Cette mesure est ensuite traduite en indice d'hémolyse, suivant une gamme de calibration. Le degré d'importance de l'interférence de l'hémolyse sur le dosage est déterminé au préalable par le fabricant du réactif utilisé, il fixe le seuil de rejet. Ce seuil est déterminé de manière à ce que la variation des paramètres due à l'hémolyse soit supérieure ou inférieure à 10%. Le seuil est pour ce modèle d'analyseur paramétrable par les utilisateurs s'ils le souhaitent.

Cette technique de détection automatique présente de nombreux avantages et permet de ne pas rejeter toutes les analyses demandées en cas d'hémolyse, mais de rejeter seulement de manière spécifique une analyse impactée par l'hémolyse. Enfin, cela permet aussi de pouvoir prendre en charge un échantillon hémolysé afin de pouvoir rendre une partie des résultats qui seraient fiables malgré l'hémolyse.

2.4.3. Détection via des critères d'analyses

En hématologie cellulaire, Il est observé dans l'article de De Jong G, Dos Santos L, et al. (34) que lorsqu'une lecture optique est utilisée, il peut être détecté lors d'une hémolyse, une augmentation du VGM (volume globulaire moyen), de la CCMH (concentration corpusculaire

moyenne en hémoglobine), des plaquettes ainsi qu'une diminution du nombre de globules rouges et de l'hématocrite (34).

Alors que lorsque l'on utilise d'autres techniques comme l'impédance et la fluorimétrie, seules les variables dépendantes de l'hémoglobine seront influencées, c'est-à-dire les constantes érythrocytaires : CCMH calculée à partir des valeurs d'hémoglobine (Hb) et de l'hématocrite (Ht) (Hb/Ht) et TCMH (teneur corpusculaire moyenne en hémoglobine) calculée à partir des valeurs de la CCMH et des globules rouges ($CCMH \times GR$). Ainsi, lorsqu'un échantillon est suspecté d'être hémolysé du fait d'une CCMH élevée (supérieure à 365 g/L), l'utilisation d'automates avec d'autres techniques de mesure comme le font par exemple les XN-10[®] (Sysmex) utilisant l'impédance et la fluorimétrie, permettent de re-calculer certains paramètres pour en permettre le rendu.

2.5. Impact de l'hémolyse

2.5.1. Les différents types d'impacts

Dans les laboratoires de biologie médicale, l'ictère, la lipémie, mais avant tout l'hémolyse possiblement présentent dans les échantillons à tester représentent de loin l'un des principaux défis analytiques.

Concernant l'hémolyse, les causes de l'interférence sur les tests peuvent être d'ordre analytique par la forte absorbance de l'hémoglobine plasmatique aux longueurs d'ondes utilisées par les systèmes de détection optiques (29) ou biologique par la libération de molécules cytoplasmiques et plasmatiques comme par exemple : les facteurs tissulaires, les protéases, les phospholipides de l'ADP, qui peuvent activer de façon anormale la coagulation sanguine et les plaquettes.

En pratique, l'hémolyse reflète un processus plus généralisé d'endommagement des cellules endothéliales et sanguines, de sorte que les résultats des tests effectués sur des échantillons hémolysés doivent être la plupart du temps non rendus, prélevé à nouveau et refait. Cette problématique d'impact sur les paramètres biologiques est d'autant plus difficile à gérer pour les hémolyses pathologiques pour lesquelles un nouveau prélèvement n'aura probablement pas de plus-value, l'hémolyse ayant lieu chez le patient.

Afin de décider ou non de l'impact de l'hémolyse sur des résultats biologiques, différents critères peuvent être choisis pour statuer d'une différence entre un résultat rendu sur un prélèvement hémolysé d'un résultat rendu sur le même prélèvement non hémolysé. Trois critères d'interprétation peuvent être utilisés pour définir la présence d'un impact :

- Le premier degré d'impact est statistique, il est déterminé par des tests comme le test de Student, le test de Shapiro-Wilk ou le test d'ANCOVA et répond à la question, le résultat hémolysé est-il statistiquement différent d'un prélèvement non hémolysé ?
- Le second degré d'impact est analytique et est basé sur le coefficient de variation (CV) de la technique analytique employée. Le résultat rendu avec hémolyse dépasse-t-il la variabilité de la méthode employée ?

- Enfin, le troisième degré est clinique et est basé des critères d'interprétation des résultats pouvant modifier la prise en charge du patient. Le résultat avec hémolyse induirait-il une prise en charge clinique du patient différente ?

L'existence de ces 3 critères d'interprétation des résultats explique le manque de consensus entre les différents auteurs quant au choix d'un seuil d'impact des résultats.

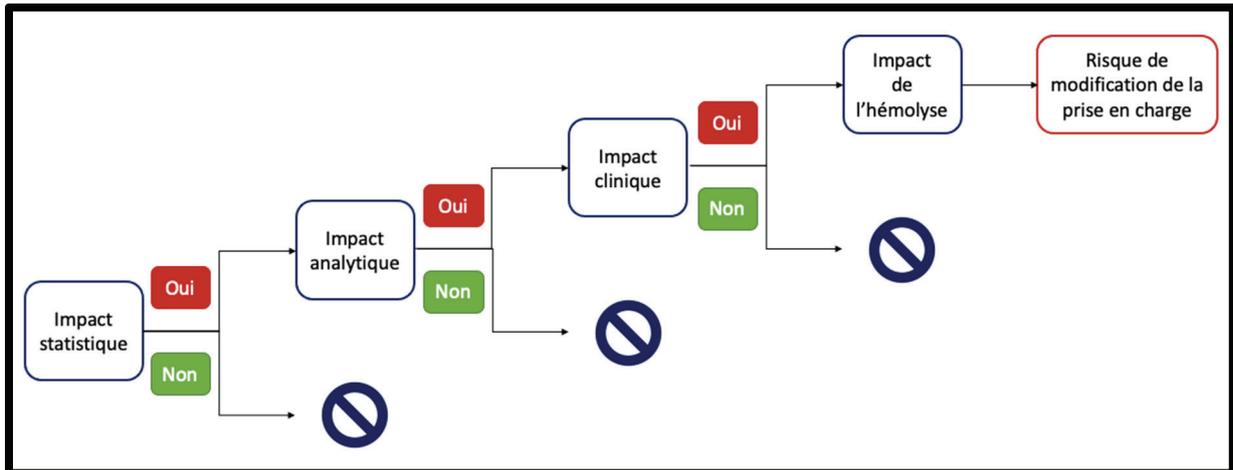


Figure 7 : Interprétation des résultats : les différents niveaux d'impacts en biologie

2.5.2. Impact de l'hémolyse sur les examens d'hématologie cellulaire

Dans la littérature, nous avons regardé l'impact de l'hémolyse dans les laboratoires d'hématologie sur les paramètres d'hémostase et d'hématologie cellulaire. Nous avons retrouvé entre 2006 et 2020 sur PubMed 19 études pertinentes, 7 en hématologie cellulaire et 12 en hémostase. Ces études ont montré d'importantes différences sur les potentiels impacts de l'hémolyse sur différents paramètres. Nous avons fait une synthèse sur des critères tangibles : le nombre d'échantillons, le type d'hémolyse et les critères d'interprétations utilisés (tableaux 3 et 5) menant à des seuils d'acceptabilité d'hémolyse différents (tableaux 4 et 6).

En hématologie cellulaire, la présence d'hémolyse peut influencer la numération de la formule sanguine et fausser les résultats ce qui peut entraîner un impact clinique.

Plusieurs paramètres sont analysés et impactés par l'hémolyse comme : la numération des globules rouges, le taux d'hémoglobine, le pourcentage d'hématocrite, le VGM (volume globulaire moyen), la TCMH, la CCMH, le nombre de leucocytes, le nombre de polynucléaires

neutrophiles, le nombre de plaquettes. L'influence de l'hémolyse sera plus ou moins importante en fonction de la technique utilisée au laboratoire.

Afin d'étudier au mieux l'impact de l'hémolyse sur les paramètres étudiés en hématologie cellulaire, nous avons fait la revue de la littérature (Tableaux 3 et 4) afin d'observer la disparité constatée actuellement dans ce domaine.

En prenant par exemple le paramètre de la concentration corpusculaire moyenne en hémoglobine (CCMH), l'impact de l'hémolyse sur ce dernier varie d'un article à l'autre : selon l'article de De Jong et al. (34) ce paramètre est stable jusqu'à un niveau d'hémolyse atteignant 22,38 g/L alors que selon l'étude de Peng Z et al. (35), ce même paramètre augmente dès 6,6 g/L.

Articles	Nombre d'échantillons	Types d'hémolyses	Critères d'interprétations
<p>Article 1: Interference of <i>in vitro</i> hemolysis complete blood count Gabriela de Jonge, Talita L. dos Santos et al. (34)</p>	<p>Les participants à l'étude sont des volontaires provenant de LUAC : Université Laboratory of Clinical Analyzes à Ponta Grossa au Brésil. Un total de 10 personnes participent à l'étude, soit 10 échantillons divisés en 30 aliquots réparti dans trois groupes.</p>	<p>Chaque échantillon est divisé en trois aliquots de 1 mL subissant chacun un traitement différent : le premier est laissé intact, le deuxième subit 5 passages à travers une aiguille très fine (gauge faible : 24G) permettant d'obtenir une faible hémolyse mécanique, le troisième aliquot subit le même processus 10 fois afin d'obtenir une forte hémolyse mécanique (méthode de Dimeski) puis une centrifugation à 1200g pendant 10 minutes pour ensuite mesurer l'hémolyse par la technique Harboe.</p>	<p>Tous les aliquots sont analysés sur le même automate : Hematocounter 60 – RT 7600 selon le principe d'impédance. Les résultats sont traités selon un test de Shapiro-Wilk pour confirmer la normalité, puis la réalisation d'un Student t test afin d'effectuer la comparaison des moyennes. Le seuil de différence significative est établi à $p < 0,05$. Ensuite pour évaluer le degré de corrélation entre les différents groupes, un test de Bland-Altman est utilisé. Les limites cliniquement acceptables ont été définies selon les spécifications de qualité analytique de la littérature en fonction du biais souhaitable.</p>
<p>Article 2: Influence of <i>in vitro</i> hemolysis on nucleated red blood cells and reticulocyte counts</p>	<p>Les participants sont des patients sélectionnés au hasard. Un total de 10 personnes participent à l'étude, soit 10 échantillons divisés en 30 aliquots réparti dans trois groupes.</p>	<p>Chaque échantillon est divisé en trois aliquots de 1 mL subissant chacun un traitement différent : le premier est directement testé, le deuxième subit 5 passages à travers une aiguille très fine (gauge faible 30 G) permettant d'obtenir une faible hémolyse mécanique, le troisième</p>	<p>Sur chaque aliquot est effectué un comptage des érythroblastes, des réticulocytes ainsi que des érythrocytes sur un automate : Sysmex XE-2100 par cytométrie de flux. Afin de vérifier l'appareillage des</p>

<p>G. LIPPI, F. PAVESI et <i>al.</i> (36)</p>		<p>aliquot subit le même processus 10 fois afin d'obtenir une forte hémolyse mécanique (méthode de Dimeski). Enfin, après l'analyse, est réalisé une centrifugation à 1300g pendant 10 minutes pour ensuite mesurer l'hémolyse par spectrophotométrie sur un automate nommé Beckman Coulter.</p>	<p>échantillons, il est réalisé un test de Wilcoxon.</p>
<p>Article 3: Studies on <i>in vitro</i> hemolysis and utility of corrective formulas for reporting results on hemolyzed specimens G Lippi, P. Avanzini et <i>al.</i> (37)</p>	<p>Les participants sont des volontaires sains du laboratoire. Le prélèvement est réalisé par un seul et unique préleveur. 5 personnes sont incluses et sont prélevées de 6 mL, à l'aide d'une aiguille de 20G, dans un tube contenant de l'héparine. Chaque tube est divisé en 6 aliquots, soit un total de 25 échantillons à analyser.</p>	<p>Chaque échantillon est divisé en six aliquots de 1 mL subissant chacun un traitement différent : le premier est directement testé, le deuxième subit un passage à travers une aiguille très fine (gauge faible 30 G), le troisième aliquot subit le même processus 2 fois, le quatrième subit le même processus 3 fois, le cinquième subit le même processus 4 fois et le sixième subit le même processus 5 fois et cela afin d'obtenir une hémolyse mécanique de plus en plus importante (méthode de Dimeski). Enfin, après l'analyse, est réalisé une centrifugation à 2000g pendant 15 minutes à température ambiante pour ensuite mesurer l'hémolyse par spectrophotométrie sur un automate nommé Beckman Coulter.</p>	<p>Tous les aliquots sont analysés sur le même automate : Advia 2120i (Siemens Healthcare Diagnostics, Tarrytown NY, USA), mesure photométrique. Les résultats de chaque patient sont soumis à une analyse de régression selon un test d'ANCOVA. Le seuil de différence significative est établi à $p < 0,01$.</p>
<p>Article 4: Influence of <i>in</i></p>	<p>Les participants sont des volontaires sains du laboratoire. Le prélèvement</p>	<p>Chaque échantillon est divisé en trois aliquots de 1 mL subissant chacun un</p>	<p>Tous les aliquots sont analysés sur le même automate : Advia 2120i</p>

<p><i>vitro</i> hemolysis on hematological testing on Advia 2120. G. Lippi, R. Musa et <i>al.</i> (38)</p>	<p>est réalisé par un seul et unique phlébotomiste. 13 volontaires sains provenant du laboratoire sont inclus dans l'étude et seront prélevés de 4 mL dans un tube contenant de l'EDTA. Chaque tube est divisé en 3 aliquots de 1 mL, soit un total de 39 échantillons à analyser.</p>	<p>traitement différent : le premier est directement analysé (Aliquot A), le deuxième subit 5 passages à travers une aiguille très fine (gauge faible 30 G) permettant d'obtenir une faible hémolyse mécanique (Aliquot B), le troisième aliquot subit le même processus 10 fois afin d'obtenir une forte hémolyse mécanique (Aliquot C) (méthode de Dimeski). Enfin, après l'analyse, est réalisé une centrifugation à 2000g pendant 15 minutes pour ensuite mesurer l'hémolyse par spectrophotométrie sur un automate nommé Beckman Coulter.</p>	<p>(Siemens Healthcare Diagnostics, Tarrytown NY, USA), mesure photométrique. Les résultats de chaque groupe sont analysés selon un t test appareillé de Student. Le seuil de différence significative est établi à $p < 0,05$. Ensuite et afin d'analyser l'accord entre les résultats des groupes Aliquot B, Aliquot C et le groupe Aliquot A, un tracé de Bland-Altman est réalisé.</p>
<p>Article 5: Influence of hemolysis on routine clinical chemistry testing. G. Lippi, G. L. Salvagno et <i>al.</i> (39)</p>	<p>Cette étude inclus au total 12 participants sains chez lesquels il sera prélevé 3,5 mL de sang. Ils sont sélectionnés selon leur taux de leucocyte, de plaquette, et d'hémoglobine. Ces 12 volontaires sont prélevés à deux reprises, à 1 jour d'intervalle.</p>	<p>Les différents prélèvements sont répartis dans plusieurs échantillons de cette manière : l'échantillon 1 est immédiatement conservé à -70°C, en parallèle, l'échantillon 2 est centrifugé à 1500g pendant 10 minutes à température ambiante, le sérum est séparé et conservé à -70°C. Le jour suivant, le sang de chacun des 12 mêmes volontaires est prélevé dans quatre autres tubes de 6,0 ml dans les mêmes conditions puis sont poolés avant d'être divisés en aliquotes de 2 ml. Les échantillons 1 et 2 sont ensuite décongelés pour réaliser 9 dilutions d'hémoglobine</p>	<p>L'hémolyse est évaluée grâce à la méthode de la cyanméthémoglobine en mesurant la concentration d'hémoglobine sur le spectrophotomètre UV-1700 (Shimadzu Italia S.l.r., Milano, Italie). Les tests hématologie de routine sont effectués sur l'automate ADVIA 120 (Bayer Diagnostics, Newbury, Berkshire, UK) ainsi que sur l'automate modulaire P de Roche/Hitachi (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Allemagne).</p>

		<p>sérique libre en mélangeant des aliquotes des échantillons 1 et 2. Puis 200 mL de chacune de ces dilutions sont ajoutés à des aliquotes de 2 mL de sang de l'échantillon 3 afin d'obtenir des concentrations d'hémoglobine sérique libre dans les échantillons allant de 0 à 20,6 g/L, de manière à reproduire une hémolyse. Le sang est ensuite centrifugé à 1500g pendant 10 minutes à température ambiante et le sérum est séparé et analysé immédiatement.</p>	<p>Les résultats de chaque groupe sont analysés selon un t test apparié de Student. Le seuil de différence significative est établi à $p < 0,05$. Afin d'analyser l'accord entre les résultats des mesures indépendantes, un tracé de Bland-Altman est réalisé.</p>
<p>Article 6: Influence of mechanical trauma of blood and hemolysis on PFA-100 testing. G. Lippi, R. Fontana, et al. (40)</p>	<p>Les participants sont des volontaires sains du laboratoire. Le prélèvement est réalisé par un seul et unique phlébotomiste. 9 volontaires sains provenant du laboratoire sont inclus dans l'étude et sont prélevés de 3,5 mL dans un tube citraté. Les tubes sont ensuite poolés puis séparés en 3 aliquots de 3,0 mL.</p>	<p>Le premier aliquot A, est directement analysé sans autre manipulation, tandis que le deuxième B, et le troisième C, sont soumis à un traumatisme mécanique par deux (pour l'aliquot B) ou quatre passages (pour l'aliquot C) à travers une aiguille très fine (30 G) pour produire une hémolyse mécanique croissante (méthode de Dimeski). Enfin, après l'analyse, est réalisé une centrifugation à 2000g pendant 15 minutes à température ambiante pour ensuite mesurer l'hémolyse par spectrophotométrie sur un automate nommé Beckman Coulter.</p>	<p>Tous les aliquots sont analysés sur les mêmes automates : sur le Advia 2120 (Siemens Healthcare Diagnostics). Les résultats de chaque groupe sont analysés selon un t test apparié de Student, puis avec un test de Khi-2. Le seuil de différence significative est établi à $p < 0,05$.</p>

<p>Article 7: Hemolytic specimens in complete blood cell count: Red cell parameters could be revised by plasma free hemoglobin. Z. Peng, W. Xiang et <i>al.</i> (35)</p>	<p>Les échantillons sont des prélèvements directement récupérés dans le laboratoire. Plusieurs groupes sont observables dans cette étude : des patients avec une hémolyse <i>in vivo</i> récupérer sur la chaîne du laboratoire, un second avec des hémolyses <i>in vitro</i> et enfin un groupe de 5 patients suivit par analyse sur plusieurs jours avec au moins une fois un prélèvement hémolysé. Au total, 84 échantillons sont analysés.</p>	<p>Dans cette étude, on retrouve d'une part les hémolyses naturelles, et d'autre part des hémolyses <i>in vitro</i> qui sont réalisées de manière physique : hémolyse mécanique grâce à une technique d'aspiration refoulement rapide à travers une aiguille.</p>	<p>Tous les échantillons sont analysés sur les mêmes automates : le XN-330 ainsi que le XN-A1 (Sysmex). Les résultats de chaque groupe sont analysés selon un t test appareillé de Student. Le seuil de différence significative est établi à $p < 0,05$.</p>
--	--	---	---

Tableau III : Analyse bibliographique de l'impact de l'hémolyse sur les résultats de différents paramètres étudiés en hématologie cellulaire.

	Niveau d'hémolyse (en g/L)	Erythrocyte	Reticulocyte	Hte	VGM	CCMH	TCMH	Plaquette	Lymphocyte
Article 1 (34)	5,98 à 22,38	↓	N.E.	↓	→	→	→	↑	↑
Article 2 (36)	6,7 à 14,1	↓	↑	↓	N.E.	N.E.	N.E.	N.E.	N.E.
Article 3 (37)	7 à 37	↓	N.E.	↓	↓	N.E.	↑	↑	N.E.
Article 4 (38)	4 à 9,5	↓	N.E.	↓	↓	↑	↑	↑	↓
Article 5 (39)	0,3 à 20,6	↓	N.E.	↓	N.E.	N.E.	N.E.	N.E.	N.E.
Article 6 (40)	0,2 à 12	↓	N.E.	N.E.	N.E.	N.E.	N.E.	↓	N.E.
Article 7 (35)	0,3 à 6,6		N.E.	N.E.	N.E.	↑	N.E.	N.E.	N.E.

Tableau IV : Tableau comparatif des seuils d'impacts de l'hémolyse sur les paramètres étudiés en hématologie cellulaire issu des données de la littérature

Légendes :			
↓	Diminution	↑	Augmentation
→	Stable	NE	Non Évalué

2.5.3. Impact de l'hémolyse sur les examens d'hémostase

Afin d'étudier au mieux l'impact de l'hémolyse sur les paramètres d'hémostase, nous avons fait la revue de la littérature (Tableaux 5 et 6) afin d'observer la disparité constatée actuellement dans ce domaine.

L'impact est différent en fonction du paramètre mesuré, mais aussi en fonction des traitements du patient. En effet, en cas d'hémolyse sur un prélèvement d'un patient sous héparine, les impacts analytiques sont différents de celles d'un patient sous AVK (Antagoniste de la vitamine K) ou sans traitement. L'hémolyse peut alors être considérée comme un biais lors de l'analyse. De plus, cet effet est plus ou moins important en fonction du degré d'hémolyse.

D'après l'article de Nougier C., Jusselme E. et al (41), différents impacts analytiques de l'hémolyse sont constatés :

- Concernant l'INR, il est peu sensible à l'hémolyse autant au niveau analytique qu'au niveau clinique. Il y a néanmoins une influence clinique lorsque le taux d'hémoglobine plasmatique est supérieur à 5 g/L.
- Concernant le Temps de céphaline activée (TCA), l'impact est traitement dépendant. Effectivement, l'hémolyse n'a pas d'influence sur le TCA de patients sans traitement par héparine ou traités par AVK. Au contraire, lorsque le patient est sous HNF, l'analyse est impactée par l'hémolyse : les résultats montrent un biais systématique de +30,6% avec l'instrument optique et de +27,3% avec l'instrument mécanique lorsque le taux d'hémoglobine plasmatique est supérieur à 1,5 g/L entraînant un raccourcissement significatif du TCA démontrant un impact analytique et biologique non acceptable.

Ces résultats sont concordants avec l'étude de Kostousov V., Nguyen K., et al (32), où l'hémolyse entraîne une perte de précision de l'ordre de 10% sur la mesure du TCA dès lors que le taux d'hémoglobine dépasse les 1,5 g/L et d'autre part une modification de l'activité anti-Xa qui est sous-estimé (diminution de l'ordre de 0,035 UI/mL) dès lors que le taux d'hémoglobine est supérieur à 5,0 g/L. Ces impacts analytiques avec un impact clinique empêchent un rendu exact du résultat qui ne peut être rendu au clinicien.

Mais même si les résultats de l'étude de Nougier C., Jusselme E. et al. (41) ainsi que ceux de l'étude de Kostousov V., Nguyen K., et al. (42) se recourent, le tableau 5 montre que les seuils d'impacts varient énormément d'une étude à l'autre. Par exemple, concernant l'analyse du

fibrinogène, ce test est sensible à l'hémolyse avec une variabilité des seuils d'impacts à un taux d'hémoglobine à 0,5 g/L (7), à 1,8 g/L (41) et jusqu'à 3,6 g/L (43). Malgré cette variabilité analytique, cela a seulement très peu d'effet d'un point de vue clinique et n'a donc pas d'impact clinique.

À travers l'étude bibliographique, non exhaustive, sur les seuils d'impact de l'hémolyse sur les différents paramètres d'hématologie étudiés, il en ressort qu'aucun consensus n'a été trouvé et que les seuils varient énormément d'une étude à l'autre.

Ces importants écarts peuvent être expliqués par le manque de standardisation des expériences. En effet, dans les tableaux récapitulatifs des différents articles étudiés (Tableaux 4 et 6), il en résulte de nombreuses variations dans le nombre d'échantillons, dans la technique de création des hémolysats, dans les automates employés ou encore dans les tests statistiques utilisés pour définir s'il existe un impact de l'hémolyse. Toutes ces variations sont à l'origine de résultats différents et donc d'un manque de standardisation. Ces études permettent tout de même de conclure que l'hémolyse, même faible (dès 0,5 g/L), impact fortement les résultats des différents paramètres étudiés, et nécessite donc de mettre au point des prises en charge adaptées de ces échantillons.

Article	Nombre d'échantillons	Types d'hémolyse	Critères d'interprétations
(29) : Lippi G, Plebani M, Favalaro E. Interference in coagulation testing: focus on spurious hemolysis, icterus, and lipemia. Semin Thromb Hemost. 2012;39(03):258-266.	Méta-analyse d'étude de : Roß and Paar, Laga et al, Tantanate et al, Bauer et al...	Méta-analyse d'étude de Roß and Paar, Laga et al, Tantanate et al, Bauer et al...	Métan-analyse d'étude de : Roß and Paar, Laga et al, Tantanate et al, Bauer et al...
(43): Lippi G, Ippolito L, Favalaro EJ. Technical evaluation of the novel preanalytical module on instrumentation laboratory ACL TOP: advancing automation in hemostasis testing. J Lab Autom. 2013;18(5):382-390.	8 pools de 10 échantillons. 4 prélèvements de chaque pool sont analysés.	4 prélèvements de chaque pool sont réalisés, dont 1 laissé tel quel puis les 3 autres subissent des hémolyses mécaniques (centrifugation et aspiration relâchement par de fines seringues) de plus en plus importantes.	ACL TOP 700 utilisant la technique HIL avec une détection photo-optique à 3 longueurs d'onde différentes : 405, 535, 671 nm. Les résultats sont évalués grâce à un test de Student.
(44) : Nagant C, Rozen L, Demulder A. HIL interferences on three hemostasis analyzers and contribution of a preanalytical module for routine coagulation assays. Clini Lab. 2016;62(10):1979-1987.	10 plasmas en pools de 10mL.	4 prélèvements de chaque pool sont réalisés dont 1 laissé tel quel puis les 3 autres subissent des hémolyses en ajoutant des concentrations croissantes de globules rouges libres.	Observation grâce à l'utilisation de détecteurs optiques : ACL TOP 550 et CS-5100 et un analyseur mécanique STA-R. Critère de biais suit les recommandations de Ricos. Les résultats sont évalués grâce à un test de Khi-2.
(45) : Woolley A, Golmard J-L, Kitchen S. Effects of haemolysis,	Séparation des échantillons en pools.	2 Types d'hémolyses sont étudiés : l'hémolyse	Observation réalisée à l'aide d'un analyseur STA-Compact-Max.

<p>icterus and lipaemia on coagulation tests as performed on Stago STA- Compact-Max analyser. Int J Lab Hematol. 2016;38(4):375-388.</p>	<p>40 paires d'échantillons ont été étudiées (comparaison des échantillons hémolysés et non hémolysés).</p>	<p>spontanée et les fausses hémolyses. 4 prélèvements de chaque pool sont réalisés dont 1 laissé tel quel puis les 3 autres subissent des hémolyses par aspirations.</p>	<p>Critère de biais utilisé suit la guideline CLSI C56-A. Les résultats sont évalués grâce à un test d'équivalence ainsi qu'un test d'ANOVA.</p>
<p>(46) : Hernaningsih Y, Akualing JS. The effects of hemolysis on plasma pro- thrombin time and activated partial thromboplastin time tests using photo-optical method. Medicine (Baltimore). 2017;96(38):e7976.</p>	<p>30 échantillons qui subissent 2 hémolyses successives soit un total de 90 échantillons analysés.</p>	<p>Les 30 échantillons vont dans un premier temps être analysés tel quel, puis ils subissent une première lyse mécanique, sont analysés et enfin une deuxième lyse mécanique pour être à nouveau analysés.</p>	<p>Observation réalisée à l'aide d'un analyseur Sysmex-2000i (détection photo-optique). Les résultats sont évalués grâce à un test d'ANOVA puis une courbe ROC est réalisée afin de déterminer les Cut-off de l'étude.</p>
<p>(42) : Kostousov V, Nguyen K, Hundalani SG, Teruya J. The influence of free hemoglobin and bilirubin on heparin monitoring by activated partial thromboplastin time and anti-Xa assay. Arch Pathol Lab Med. 2014;138(11):1503-1506.</p>	<p>6 échantillons normaux sont étudiés. 2 échantillons restent intacts, 2 échantillons subissent des hémolyses mécaniques et 2 échantillons sont soumis à une hyperbilirubinémie. Il y a ensuite ajout d'HNF.</p>	<p>Dans cette étude, les échantillons sont soit laisser intact (sans hémolyse) ou bien ils subissent une hémolyse mécanique par congélation (-80°) et centrifugation (12000g) pendant 30 minutes ; au final, il y aura soit une hémolyse à 1,00 g/L soit une hémolyse à 2,00 g/L.</p>	<p>Observation réalisée à l'aide d'un analyseur STA-R. Les résultats sont analysés grâce à un test de Mann-Whitney et un test de corrélation de Pearson et sont comparés grâce à la p-value.</p>

<p>(41) : Nougier C, Jouselme E, Sobas F, Pousseur V, Négrier C. Effects of hemolysis, bilirubin, and lipemia interference on coagulation tests detected by two analytical systems. <i>Int J Lab Hematol.</i> 2019;00:1–7.</p>	<p>90 échantillons : 30 de patients sains, 30 de patients traités par AVK et 30 de patients traités par HNF.</p>	<p>Chaque échantillon est divisé en 2 aliquotes : le premier qui sert de référence reste intact ; et le second qui est l'échantillon hémolysé. L'hémolyse est produite en utilisant un tissu homogénéisateur pendant 20 secondes puis subit une double centrifugation (la valeur de l'hémolyse est mesurée grâce à l'indice HIL sur l'ACL TOP 750® qui fonctionne en mesurant à 3 longueurs d'onde distinctes).</p>	<p>Observation est réalisé grâce à 2 analyseurs différents : le premier qui est un analyseur optique : ACL TOP 750®, et le second est un analyseur électromécanique : STAR. Les interférences sont calculées selon un pourcentage de biais et ces valeurs sont comparées à des valeurs de références tirées du GFHT (Groupe Français d'étude sur l'Hémostase et la Thrombose).</p>
<p>(47) : Laga AC, Cheves TA, Sweeney JD. The effect of specimen hemolysis on coagulation test results. <i>Am J Clin Pathol</i> 2006;126:748–55.</p>	<p>100 échantillons provenant de 50 patients sur lesquels 2 échantillons sont prélevés. Un intervalle maximum de 180 minutes entre le prélèvement de chaque échantillon doit être respecté.</p>	<p>Chaque patient est prélevé à deux reprises et est son propre témoin. Un échantillon hémolysé (définis comme : toute coloration rose ou rouge du plasma après centrifugation à 2 500 g pendant 15 minutes détectée à l'œil nu), et un échantillon non-hémolysé. L'hémolysat est</p>	<p>Les dosages sont réalisés par différentes techniques selon les tests comme par exemple à l'aide de tests chronométriques sur le MDA-II, à l'aide de test ELISA (Versamax ELISA), ou encore le Dynex MRX. Les résultats sont analysés l'aide de tests t appariés bilatéraux, du test U de Mann-Whitney, de l'analyse de variance à mesures répétées (ANOVA) et des coefficients de corrélation de Pearson (r), selon le cas. Une différence significative a</p>

		<p>créé grâce à l'utilisation d'un homogénéisateur de tissus (Fisher, Tissuemiser, Pittsburgh, PA), c'est une hémolyse mécanique. La valeur de l'hémolyse est mesurée par colorimétrie en utilisant la méthode des 3 longueurs d'onde avec absorption à 562, 578 et 598 nm dans un spectrophotomètre (modèle 390, Sequoia-Turner, Mountain View, CA).</p>	<p>été définie comme une valeur P inférieure à 0,05.</p>
<p>(7) : D'Angelo et al 2015- International Journal of Laboratory Hematology (1) (1)</p>	<p>40 échantillons provenant de différents donneurs : 20 patients sains et 20 patients sous AVK.</p>	<p>Chaque lot de 20 échantillons subira le même protocole : il est divisé en 3 aliquotes : le premier qui sert de contrôle, le second subit une hémolyse mécanique (30 secondes de centrifugation) et le dernier est soumis à une hémolyse par choc thermique (congélation à - 80°C).</p>	<p>Observation est réalisé grâce à 2 analyseurs différents : le premier qui est un analyseur optique : BCSxp, et le second est un analyseur manuel électromécanique qui est utilisé seulement pour le TP et le TCA : le KC4 Amelung.</p> <p>Les mesures sont réalisées à 2 longueurs d'onde différentes : 405 et 570 nm.</p> <p>Les résultats sont évalués grâce à un test d'ANOVA. Le seuil d'acceptabilité de différence entre les échantillons hémolysés</p>

			ou non a été choisi arbitrairement et fixés à 3%.
(48) : Arora, S et al. "Hemolyzed Samples Should be Processed for Coagulation Studies: The Study of Hemolysis Effects on Coagulation Parameters." Annals of medical and health sciences research vol. 4,2 (2014): 233-7.	45 échantillons provenant de différents donneurs : 28 volontaires sains et 17 patients sous héparine.	Dans un premier temps, pour chacun des groupes, il est réalisé une mesure du TP et du TCA sur les échantillons tel quel, c'est-à-dire non hémolysé. Ensuite dans un deuxième temps, les échantillons subissent une hémolyse mécanique par 5 aspirations successives dans une aiguille de 23 G. Après avoir été hémolysé, une mesure du TP et du TCA est réalisée selon les mêmes modalités que la mesure précédente.	Observation réalisée grâce à un analyseur automatique : ACL Elite pro. Les résultats sont évalués grâce à un test statistique de comparaison puis il est calculé la p-value afin de décider si la différence est significative ou non.
(49) : Ning Tang, Xi Jin, Ziyong Sun & Cui Jian (2017) Effects of hemolysis and lipemia interference on kaolin-activated thromboelastography, and comparison with conventional coagulation tests, Scandinavian	24 échantillons de patients sains : 12 utilisés pour étudier l'hémolyse et 12 pour la lipémie.	Chacun des 12 échantillons est divisé en 4 aliquotes : 1 non traité, puis les 3 autres subissent une hémolyse mécanique par des aspirations successives dans une aiguille de 20 G (respectivement 2, 6, 12	Observation est réalisé grâce à 2 analyseurs différents : le premier qui est un analyseur automatique : TGF 5000, et le second est un analyseur fonctionnant par cytométrie de flux et est utilisé seulement pour les plaquettes : XE 2100. Les résultats sont évalués grâce à un test non paramétrique de Wilcoxon.

<p>Journal of Clinical and Laboratory Investigation, 77:2, 98-103</p>		<p>aspirations) afin d'obtenir différents niveaux d'hémolyses).</p>	<p>Les interférences sont calculées selon un pourcentage de biais et ces valeurs sont comparées à des valeurs de références tirées des recommandations du CLIA (Clinical Laboratory Improvement and Amendment) qui suit le modèle de performance analytique défini par l'EFLM (European Federation of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine).</p>
<p>(50) : Hedeland Y, Gustafsson CM, Touza Z, Ridefelt P. Hemolysis interference in 10 coagulation assays on an instrument with viscosity-based, chromogenic, and turbidimetric clot detection. Int J Lab Hematol. juin 2020;42(3):341-9.</p>	<p>53 plasmas regroupés pour former 10 échantillons à analyser avec des taux d'hémolyses différents.</p>	<p>Chacun des 10 échantillons subit une fausse hémolyse qui est de plus en plus importante en passant d'un échantillon à un autre (jusqu'à 15g/L).</p>	<p>Observation réalisée grâce à un analyseur automatique : STA R Max 2 utilisant 3 techniques : vicoélastimétrie (TCA, TP, fibrinogène), photométrie chromogénique à 405nm (AT, HBPM, PC, FVIII) et la turbidimétrie immunologique (DDi, VWF, et PS).</p> <p>Les résultats sont évalués grâce à un test statistique de Student puis une droite de régression.</p> <p>Les interférences sont calculées selon un pourcentage de biais et ces valeurs sont comparées à des valeurs de références afin de fixer des critères d'acceptabilités. Le premier critère est celui fixé par le fabricant (+/- 10%) et le second critère est tiré de European Federation of Clinical Chemistry</p>

			<p>and Laboratory Medicine Working Group for Preanalytical Phase qui permet de le calculer selon la formule de Fraser) prenant en compte l'imprécision de la méthode analytique et la variation interindividuelle. Pour chacun des cas, le seuil le plus faible sera utilisé.</p>
--	--	--	---

Tableau V : Analyse bibliographique de l'impact de l'hémolyse sur les résultats de différents paramètres étudiés en hémostase.

Hb plasmatique	TP	TCA	Fibrinogène	D Dimère	Anti-thrombine	Activité anti-Xa	INR	Protéine C	Protéine S
0,50 g/L	N.E.	N.E.	DS (7)	DS (7)	N.E.	DS (50) (HBPM)	DS (7) HS	N.E.	N.E.
0,90 g/L	DS (29)	N.E.	N.E.	N.E.	N.E.	N.E.	N.E.	N.E.	N.E.
0,95 g/L	N.E.	DS (46)	N.E.	N.E.	N.E.	N.E.	N.E.	N.E.	N.E.
1,00 g/L	DS (42), (7) (405nm) et (48)	DS (42), (7) (405nm) et (48)	N.E.	N.E.	DS (7)	DS (42) (HNF)	DS (7) 405 nm	N.E.	N.E.
1,50 g/L	N.E.	DS (41)	N.E.	N.E.	N.E.	N.E.	N.E.	N.E.	N.E.
1,55 g/L	DS (46)	N.E.	N.E.	N.E.	N.E.	N.E.	N.E.	N.E.	N.E.
1,70 g/L	N.E.	DS (29)	DS (29)	N.E.	N.E.	N.E.	N.E.	N.E.	N.E.
1,80 g/L	N.E.	N.E.	DS (41)	N.E.	N.E.	N.E.	N.E.	N.E.	N.E.
2,00 g/L	N.E.	N.E.	N.E.	N.E.	N.E.	N.E.	N.E.	N.E.	N.E.
2,10 g/L	N.E.	DS (45)	N.E.	N.E.	N.E.	N.E.	N.E.	N.E.	N.E.
3,00 g/L	DS (44)	N.E.	N.E.	N.E.	N.E.	N.E.	N.E.	DS (50)	N.E.
3,60 g/L	DS (43)	DS (43)	DS (43)	N.E.	N.E.	N.E.	N.E.	N.E.	N.E.
4,00 g/L	DS (7) (570nm)	DS (7) (570nm)	DS (7)	N.E.	N.E.	N.E.	N.E.	N.E.	N.E.
4,80 g/L	N.E.	N.E.	N.E.	N.E.	N.E.	N.E.	N.E.	N.E.	N.E.
5,00 g/L	DS (41)	DS (44)	N.E.	DS (29) et (44)	N.E.	N.E.	N.E.	N.E.	N.E.
6,00 g/L	DS (50) (si INR>2)	N.E.	N.E.	DS (50)	N.E.	N.E.	N.E.	N.E.	DS (50)
6,44 g/L (+/- 3,32)	N.E.	DS (47)	N.E.	N.E.	N.E.	N.E.	N.E.	N.E.	N.E.

Tableau VI : Tableau comparatif des seuils d'impacts de l'hémolyse sur de nombreux paramètres étudiés en hémostase issu des données de la

Légendes : DS : Différence significative N.E. : Non Évalué

littérature
58

3. Prévalence et gestion actuelle d'un prélèvement hémolysé au laboratoire d'hématologie du CBPE des HCL

3.1. Étude rétrospective de prévalence

3.1.1. Introduction et objectif

Les résultats des tests de laboratoire ne sont utiles que si un haut degré de qualité est assuré tout au long du processus, c'est-à-dire de la phase pré-analytique (comprenant le prélèvement, l'acheminement, la conservation...) jusqu'à la phase post-analytique en passant par l'analyse elle-même. Bien que des erreurs puissent se produire à chaque étape, les multiples étapes pré-analytiques sont reconnues comme la source prédominante d'erreurs (47,51). Parmi les différents problèmes qui surviennent au cours de la phase pré-analytique, l'hémolyse présente dans le prélèvement est souvent considérée comme la principale source d'erreur car de nombreux résultats de tests (par exemple : Taux de prothrombine (TP), TCA, fibrinogène, D Dimère, activité anti-Xa, numération de la formule sanguine...) ne sont pas fiables si des échantillons hémolysés sont utilisés (52).

L'approche qui paraît à ce jour la meilleure solution pour faire face à l'hémolyse dans les échantillons est basée sur la surveillance du processus, mais aussi la mise en place de moyen de détection de l'hémolyse et d'une conduite à tenir en fonction du seuil (51,52).

À l'aide des études de la littérature, il ressort que la prévalence de l'hémolyse varie entre 3 et 6 % d'un centre à l'autre. Ainsi, un premier objectif de notre étude a été de réaliser une analyse rétrospective aux HCL, au laboratoire d'hématologie du CBPE, de la prévalence des tubes hémolysés en hémostase et en hématologie cellulaire et de la répartition en fonction des services cliniques.

3.1.2. Matériels et méthodes

Sur le versant hémostase, la prévalence des échantillons détectés comme hémolysés par l'automate (ACL TOP 750®) dans notre centre a été calculée sur une période de 6 mois : du 1^{er} octobre 2019 au 31 mars 2020. Elle prend en compte tous les prélèvements

provenant du GHE (Groupement Hospitalier Est) et du GHC (Groupement Hospitalier Centre). Afin de calculer cette prévalence, nous avons extrait, à l'aide du logiciel LPM® (Lab Production Manager) (Data Innovations), tous les prélèvements hémolysés sur cette période. Ensuite, sur le logiciel GLIMS® (Clinisys MIPS), nous avons recherché le nombre total d'analyses demandées par chaque service sur cette période.

Pour le versant d'hématologie cellulaire, les échantillons hémolysés sont détectés lorsque la valeur de la CCMH est anormalement élevée (supérieur à 370 g/L). Afin de calculer cette prévalence, nous avons extrait, à l'aide du logiciel LPM®, tous les prélèvements hémolysés sur une période d'un an : du 1^{er} janvier 2019 au 31 décembre 2019.

3.1.3. Résultats

Pour la première requête concernant le versant hémostase, nous observons que sur un total de 57 691 échantillons analysés, 3 105 sont hémolysés, ce qui représente 5,4 % des prélèvements.

Pour la seconde requête concernant le versant hématologie cellulaire, il en ressort que seulement 44 échantillons sont détectés comme potentiellement hémolysés, c'est-à-dire, avec une CCMH supérieure à 370 g/L, sur un total de 3 477 échantillons analysés ce qui représente environ 1,3%.

Concernant la catégorisation par services en hémostase, nous avons étudié les 57 691 échantillons afin de pouvoir les répertorier par service d'origine. Nous observons que la répartition des prélèvements hémolysés par services est très disparate. Effectivement, nous observons sur la figure 8 que plus de 67% des échantillons hémolysés proviennent de seulement deux catégories de services, à savoir les urgences et la pédiatrie. Par ailleurs, nous pouvons aussi constater que plus de la moitié des prélèvements hémolysés proviennent des services d'urgences.

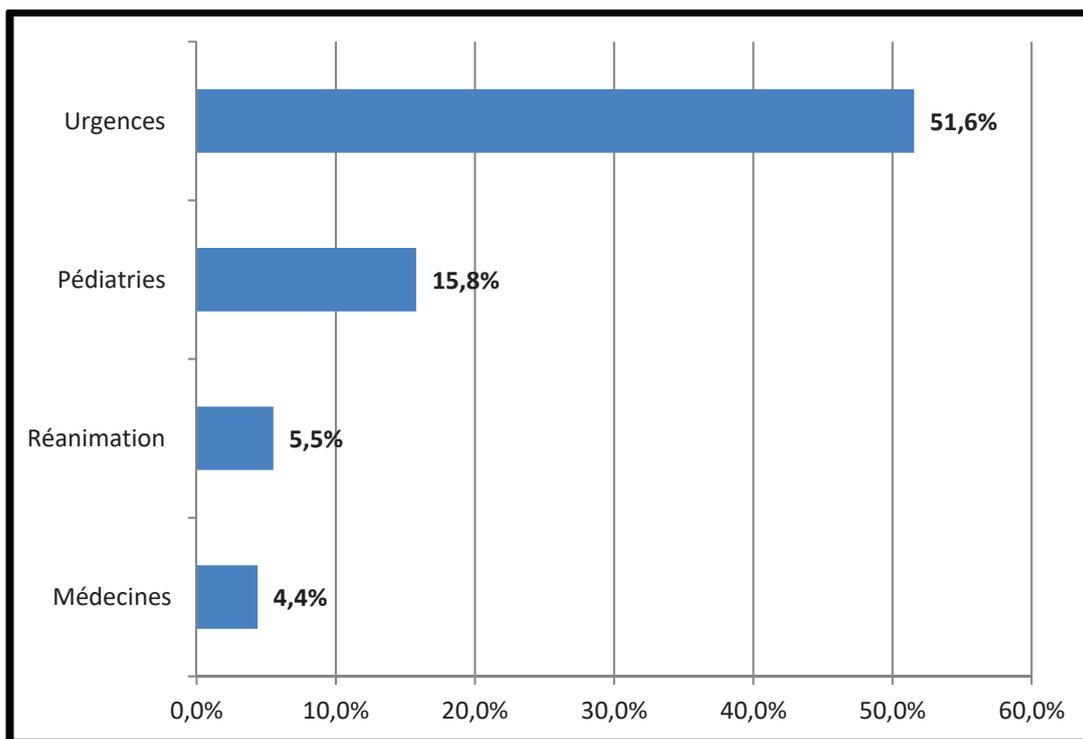


Figure 8 : Répartition par services des prélèvements hémolysés provenant du GHE et GHC du 1er octobre 2019 au 31 mars 2020.

3.1.4. Discussion

En ce qui concerne le secteur de l'hémostase, la prévalence retrouvée (5,4 %) est en accord avec ce qui est retrouvé dans la littérature (17–23) et confirme bien le fait que l'hémolyse est très présente dans le laboratoire du CBPE et qu'elle est l'une des principales anomalies retrouvées au laboratoire. Cette prévalence est également en accord avec celle retrouvée dans le suivi mensuel des biologistes des 3 sites réalisant des tests d'hémostase aux HCL (Centre de Biologie Nord, Centre de Biologie Sud, et Centre de Biologie Est) (figure 9). Ce suivi mensuel du nombre de tubes hémolysés est un indicateur pour la discipline prouvant que le laboratoire ne dégrade pas ses performances au cours du temps. Ainsi, dès lors que la prévalence de prélèvements hémolysés dépasse 6%, seuil maximum fixé par la discipline, une analyse plus poussée est mise en place afin d'en déterminer la cause (problème de prélèvement, de pneumatique...) et permet d'avoir un meilleur contrôle de la phase pré-analytique.

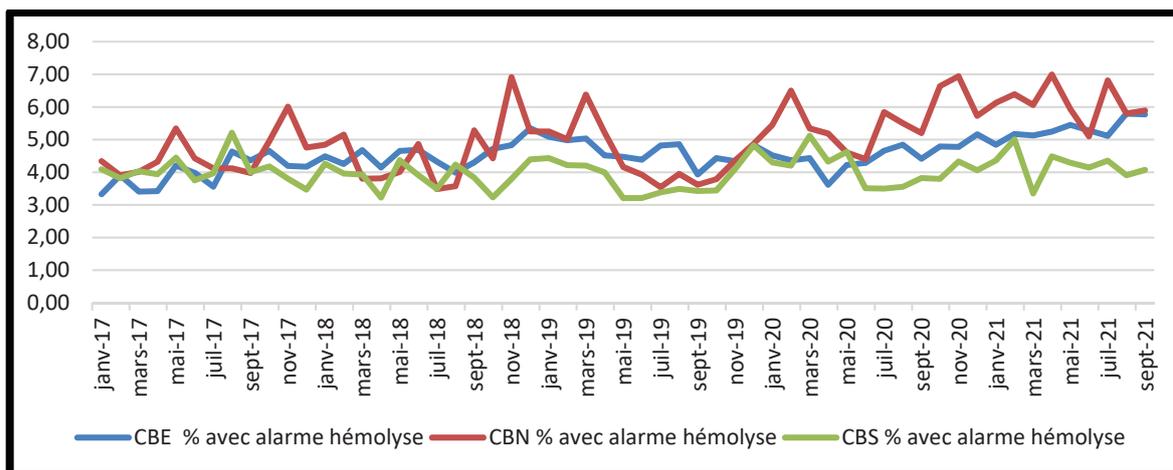


Figure 9 : Prévalence (en %) des tubes hémolisés sur les 3 laboratoires de biologie médicale des HCL (CBN/CBS/CBPE)

L'analyse de prévalence dans le secteur de l'hématologie cellulaire nous montre que l'hémolyse est aussi un problème rencontré pour cette discipline. Cependant, cette discipline semble être moins impactée : prévalence moindre de 1,3% contre 5,4% en hémostase. Nous pouvons supposer que ce nombre est sous-évalué étant donné que le seuil de détection basé sur la CCMH utilisé en 2019 était supérieur aux recommandations : 370 g/L contre 365 g/L. Le seuil de 365 g/L a d'ailleurs été changé et est utilisé désormais aux HCL depuis 2020.

Enfin, cette étude de prévalence nous permet de constater une importante différence des prévalences d'un service à l'autre aux HCL. Cette variation est en accord avec ce qui est retrouvé dans la littérature (21,23) avec toujours une prévalence largement supérieure pour les services d'urgences. Dans ces services, le prélèvement est souvent beaucoup plus complexe et cela se caractérise par sa rapidité d'exécution, la présence de patients moins collaboratifs ainsi qu'une pression supplémentaire pour les professionnels. Il existe par ailleurs un important turn-over des infirmières, des internes et des externes qui sont de garde qu'occasionnellement, entraînant un possible manque de standardisation du processus de prélèvement, ainsi qu'un manque d'expérience. Concernant l'importance de la prévalence des prélèvements hémolisés dans les services de pédiatrie (plus de 15%), ceci peut s'expliquer par le fait que les prélèvements sur les enfants et les nourrissons sont assez complexes. En effet, ces derniers sont en général moins conciliants (nécessiter d'une autre personne pour immobiliser l'enfant), ont un

réseau veineux beaucoup plus fragile ce qui complexifie le prélèvement, et par conséquent augmente le risque d'hémolyse. Par ailleurs, il faut utiliser du matériel pédiatrique comme un micro-perfuseur (papillon à 23G) qui augmente drastiquement le risque d'hémolyse (53).

Devant la prévalence élevée observée des échantillons hémolysés, des recommandations quant à la prise en charge de ces prélèvements sont nécessaires et notamment au centre de biologie Est.

3.2.Modalités de détection et conduite à tenir au laboratoire

3.2.1. En hématologie cellulaire

Comme nous l'avons vu précédemment, un prélèvement est considéré comme potentiellement hémolysé en hématologie cellulaire lorsque la CCMH est supérieure à 370 g/L (en 2019). Dès lors, toute une procédure est prévue afin de vérifier si cette augmentation est pathologique (présence d'agglutinine froide ou d'anticorps chaud) ou artéfactuelle (hémolyse, lactescence ou ictère) afin de rendre un résultat dont la fiabilité est prouvée.

Au CBPE, en cas de CCMH supérieur à 370 g/L (en 2019), le technicien analyse une seconde fois l'échantillon de sang total à l'aide du canal RET, canal chauffant la cuve réactionnelle à 41°C, afin d'éliminer l'étiologie d'une agglutinine froide. Après ce passage, il compare la valeur des GR-I (mesurée par impédance sur le premier passage) à celle des GR-O (mesurée par optique sur le canal RET). En fonction de la différence entre ces deux valeurs, il pourra s'orienter vers différentes étiologies. En cas où GR-O inférieur à GR-I de plus de 5%, il pourra conclure à la possible présence d'auto-anticorps chaud ; en cas de GR-O supérieur à GR-I de plus de 5% : à la possible présence d'agglutinines froides ; enfin, en cas de GR-O égal à GR-I à plus ou moins 5%, le technicien fait sédimenter le sang total puis observe le surnagent pour déceler la présence ou non d'interférence analytique (lactescence, ictère, hémolyse).

Dans ce dernier cas, soit le plasma est limpide, ce qui est le signe d'interférences sur la CCMH orientant vers une cause pathologique (déshydratation intracellulaire, plasma hypotonique (hyponatrémie), des interférences médicamenteuses ou une pathologie des globules rouges comme une sphérocytose, une hémoglobinosé C ou une drépanocytose) : la CCMH est non rendue dans ces contextes ; Soit il y a bien la présence de lactescence, d'ictère ou d'hémolyse dans le surnagent, et le technicien vérifie la conformité du graphique RET. Dans le cas où il est normal (figure 10), certaines valeurs sont ajustées en prenant les valeurs de l'équivalent de la TCMH sur ce canal le RBC-He pour re calculer manuellement l'hémoglobine puis la CCMH. Un commentaire est laissé

sur le rendu des résultats « CCMHH » en précisant « CCMH recalculées car plasma hémolysé » dans le cas de l'hémolyse.

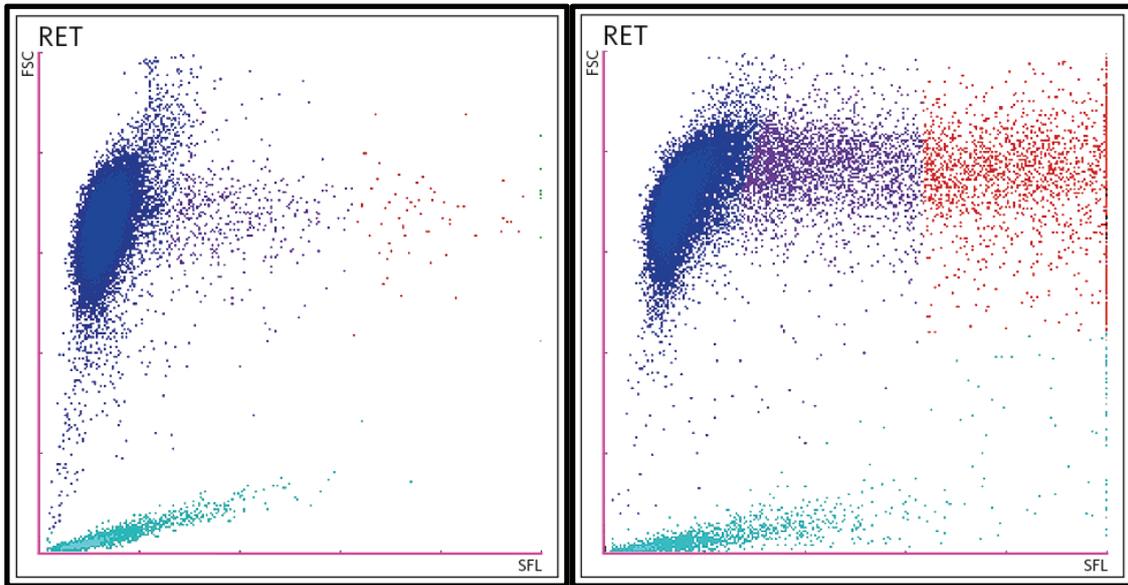


Figure 10 : Scattergrammes du canal RET avec une distribution cellulaire normale (à gauche) et anormal (à droite) (54).

À l'inverse, lorsque le graphique RET est anormal (figure 10), les valeurs de TCMH obtenues sur ce canal (RBC-He) ne sont pas fiables non plus. Le plasma est remplacé volume à volume par un réactif appelé du Cellpack diluent pour ensuite refaire une numération en sang total afin de rendre seulement la valeur de l'hémoglobine. Les valeurs du taux de globules rouges, de l'hématocrite, du VGM, de la TCMH, de la CCMH sont non rendues et un commentaire est laissé en précisant : « Présence d'interférences, certains paramètres érythrocytaires ne sont pas rendus ».

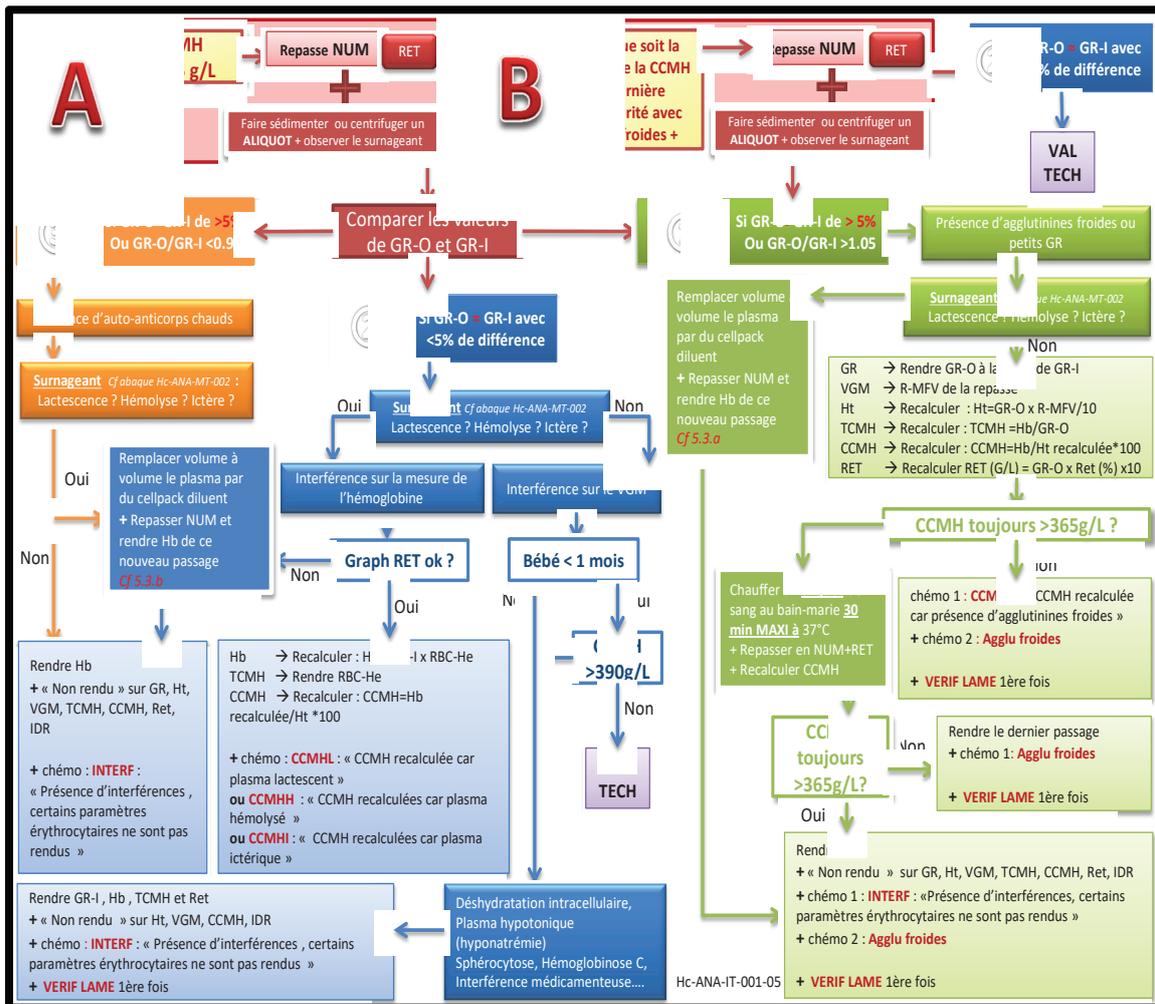


Figure 11 : Procédure de prise en charge d'un prélèvement ayant une CCMH supérieur à 365 g/L en hématologie cellulaire au CBPE en 2019

3.2.2. En hémostase

En hémostase, lorsqu'un prélèvement est détecté comme hémolysé, le technicien a différentes attitudes en fonction du taux d'hémoglobine interférant et du paramètre.

Avant de définir une conduite à tenir, il a fallu interpréter l'indice H rendu par l'ACLTOP 750® du laboratoire de manière identique entre techniciens puisque l'automate ne donne pas une valeur, mais une plage de valeur où se situe le plasma du patient sur une gamme croissante d'hémolyse. Il a été convenu de prendre comme seuil d'interprétation, la valeur inférieure donnée par l'analyseur (Figure 6).

Ensuite, dans l'action à réaliser, lorsque le taux d'hémoglobine est entre 1 et 2 g/L, l'échantillon n'est pas rejeté et les résultats sont rendus avec le commentaire « prélèvement hémolysé ». Lorsque le taux d'hémoglobine est supérieur à 2 g/L, le technicien décante dans un premier temps le prélèvement afin de vérifier l'absence de coagulum, puis précise lors du rendu du résultat « tube décanté ». Dans un second temps, selon le paramètre et le taux, il peut ou non rendre certains paramètres. Les seuils à partir duquel les résultats ne peuvent plus être rendus sont donnés par le fournisseur. Il est de 5 g/L pour le TP, TCA, D-Dimères, Antithrombine et les facteurs de coagulation et parfois plus faible comme pour le fibrinogène (3,75 g/L) ou les héparines (HBPM et HNF) (3 g/L).

Dans les cas où le taux d'hémoglobine empêche le rendu des résultats, il n'existe pour le moment aucune procédure alternative au CBPE afin de pallier cette interférence, en conséquence aucun résultat ne sera rendu pour le paramètre concerné. Il faudra donc prévenir le clinicien afin de réaliser un nouveau prélèvement. Nous avons résumé toute cette procédure via un schéma reprenant concrètement l'ensemble des démarches à suivre pour la gestion d'un prélèvement hémolysé en hémostase (figure 12).

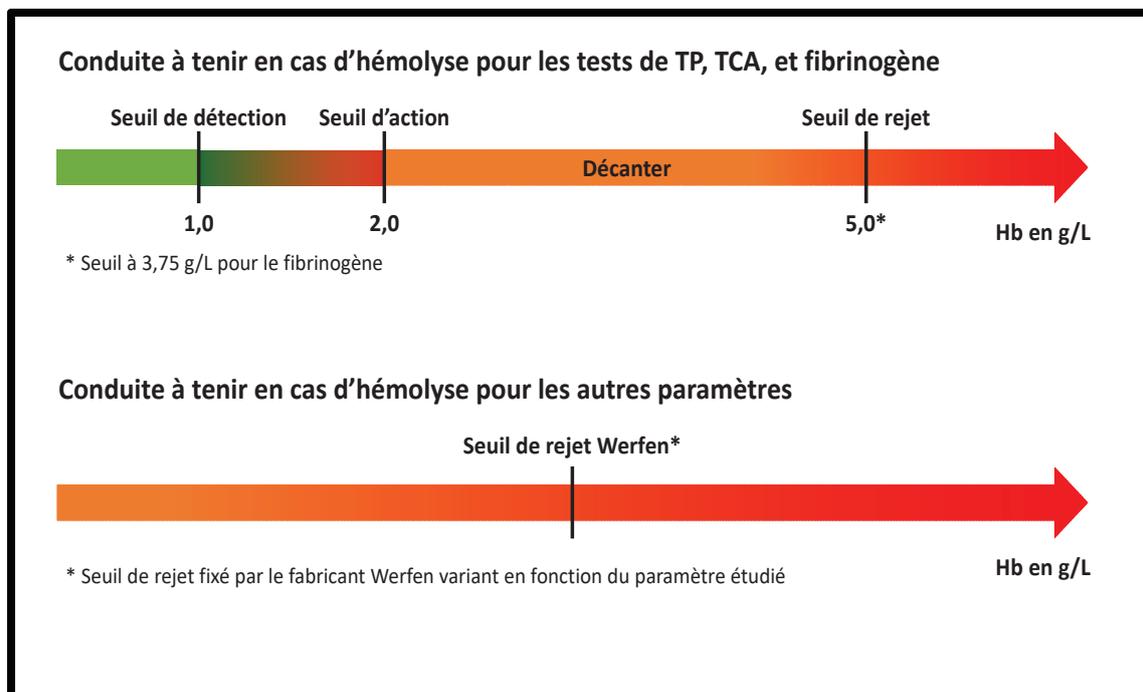


Figure 12 : Conduite à tenir pour la gestion d'un prélèvement hémolysé en hémostase.

De manière générale, dans les laboratoires de biologie médicale, actuellement, nous faisons face à de nombreuses difficultés face à un prélèvement hémolysé. D'une part un manque important de standardisation dans la mise en place de seuils de rendu des résultats et d'autre part un besoin de procédure alternative pour la prise en charge des prélèvements hémolysés obligeant les biologistes à refuser le rendu des résultats et donc à retarder la prise en charge des patients. La mise en place de procédure alternative permettrait un gain de temps dans la prise en charge des patients et donc de pouvoir prendre une décision thérapeutique plus rapidement.

C'est dans cette optique que nous avons réalisé une étude portant sur la gestion d'un prélèvement hémolysé dans le cadre du suivi, par dosage de l'activité anti-Xa, d'un patient traité par HNF.

4. Cas particulier en hémostase : mesure de l'activité anti-Xa sur prélèvement hémolysé par technique alternative sur le ROTEM®

4.1.Introduction

L'hémolyse est un réel problème rencontré au laboratoire et peut fortement impacter la phase analytique sur différents types d'analyses, comme par exemple l'activité anti-Xa en hémostase, menant à une impasse dans la bonne prise en charge du patient.

Les héparines non fractionnées sont utilisées dans plusieurs types d'indications que l'on peut scinder en deux catégories : les traitements curatifs et les traitements préventifs. Lorsque les HNF sont utilisées à visée curative (thrombose veineuse profonde, embolie pulmonaire, infarctus du myocarde, angor instable), et étant donné la grande variabilité de réponse individuelle aux HNF, leur dosage doit être surveillé quotidiennement. Cette surveillance est réalisée par le TCA, qui doit atteindre une valeur cible selon les recommandations des laboratoires du fait de l'influence du réactif utilisé, la valeur doit être comprise entre environ 1,5 et 3 fois le TCA témoin en général (valeur différente dans notre centre d'étude : entre 1,9 et 4 fois le TCA témoin). Cette surveillance est également réalisée par la mesure de l'activité anti-Xa (héparinémie), dont la valeur cible est de 0,3 à 0,7 UI/mL selon AFFSSAPS (Agence Française de Sécurité Sanitaire des Produits de Santé) (55). Cette mesure doit être effectuée à la moitié du temps qui sépare deux injections, soit entre 4 et 6 heures après l'instauration du traitement ou le changement de dose. En parallèle, une numération plaquettaire doit être réalisée afin de prévenir le risque de thrombopénie induite par l'héparine (TIH).

En temps normal, ce suivi est réalisé sur plasma citraté déplaquetté. Or sur certains prélèvements, l'automate d'hémostase détecte, grâce à son module de mesure de l'indice HIL, une hémolyse sur l'échantillon ce qui empêche de rendre des résultats. Au CBPE, sur ACL TOP 750®, au-delà de 3 g/L d'hémoglobine, l'héparinémie est impactée par l'hémolyse, il n'est alors plus possible de rendre un résultat.

Le ROTEM®, utilisant une technique de thromboélastométrie rotative, permet de réaliser un test global de la coagulation sur sang total à 37°C avec un volume de 300 µl. Le principe est le suivant : une goupille en rotation selon un axe de +/- 4,75° est plongée dans une cuvette immobile remplie de l'échantillon de sang à analyser et conservée à 37°. Au fur et à mesure de la formation du caillot dans la cuvette, le mouvement de la goupille est entravé par le caillot. Un rayon lumineux reflété par un miroir situé sur l'axe de rotation est renvoyé vers un capteur (basé sur un système de détection optique) qui analyse et transforme les données pour générer une courbe : le TEMogramme (figure 13). Le TEMogramme donne des informations sur le temps de coagulation, la stabilisation et la fermeté du caillot, ainsi que sur la lyse de ce dernier.

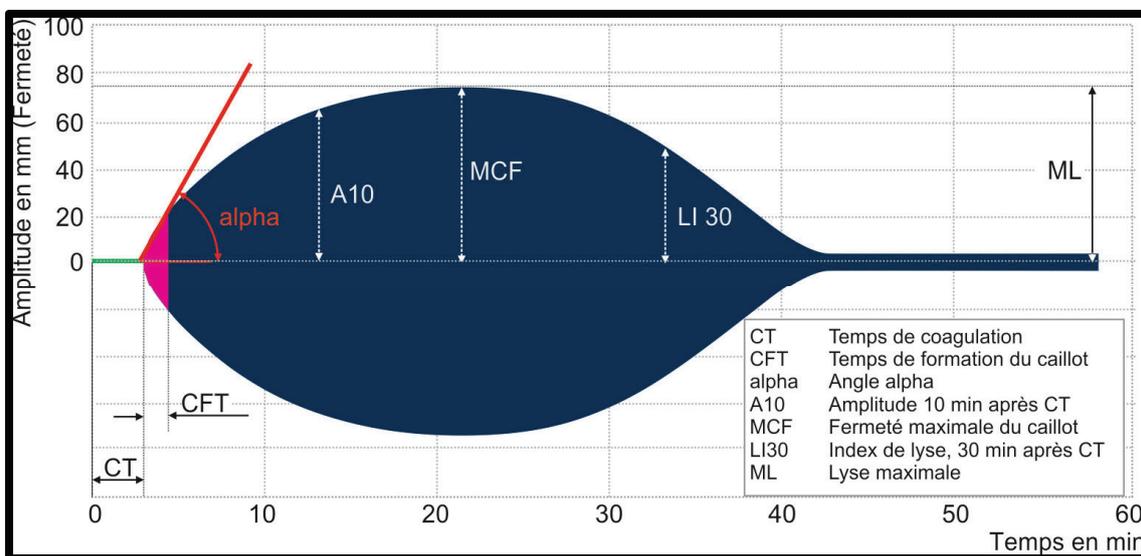


Figure 13 : TEMogramme représentant les paramètres rendus par l'automate ROTEM®

Les résultats sont interprétés graphiquement et grâce à des valeurs numériques. Un des paramètres est le CT ou Clotting Time (temps de coagulation) qui permet d'étudier le temps depuis le départ de la mesure jusqu'au début de la coagulation (correspondant à l'initiation de la coagulation, à la génération de thrombine et au début de la polymérisation). Le Clotting Time permet d'évaluer un déficit en facteurs de coagulation ou la présence d'héparine dans l'échantillon. D'autres paramètres, souvent utilisés pour l'interprétation des résultats, sont les indices d'amplitudes, A5, A10, A15, A20, respectivement des mesures de fermeté du caillot à 5, 10, 15, 20 minutes et le MCF (Maximum Clot Firmness) correspondant à l'amplitude maximal. Selon les réactifs

utilisés, ces paramètres d'amplitudes renseignent sur la part du fibrinogène et/ou des plaquettes dans la composition du caillot.

Différents réactifs existent pour activer la coagulation par différentes voies, voie extrinsèque (EXTEM) et voie intrinsèque (INTEM), évaluer le taux de fibrinogène (FIBTEM) ou la présence d'héparine dans un prélèvement (HEPTEM).

Nous détaillons ici plus spécifiquement les réactifs INTEM et HEPTEM, réactifs utilisés dans notre étude. Le réactif INTEM permet de réaliser un test global explorant la voie intrinsèque, comme le ferait le TCA et en utilisant comme activateur l'acide ellagique. Ce test est sensible au déficit en facteurs de la voie intrinsèque, mais aussi à la présence d'héparine et à un déficit en fibrinogène et/ou en plaquettes. En parallèle, l'HEPTEM permet de réaliser un test discriminatoire comparé à l'INTEM. En effet, dans ce test, l'activation de la coagulation est similaire à l'INTEM mais avec l'ajout d'héparinase permettant de dégrader l'héparine et de révéler ou non sa présence par comparaison avec le TEMogramme de l'INTEM. Nous avons également besoin du réactif STARTEM qui est le réactif de la recalcification.

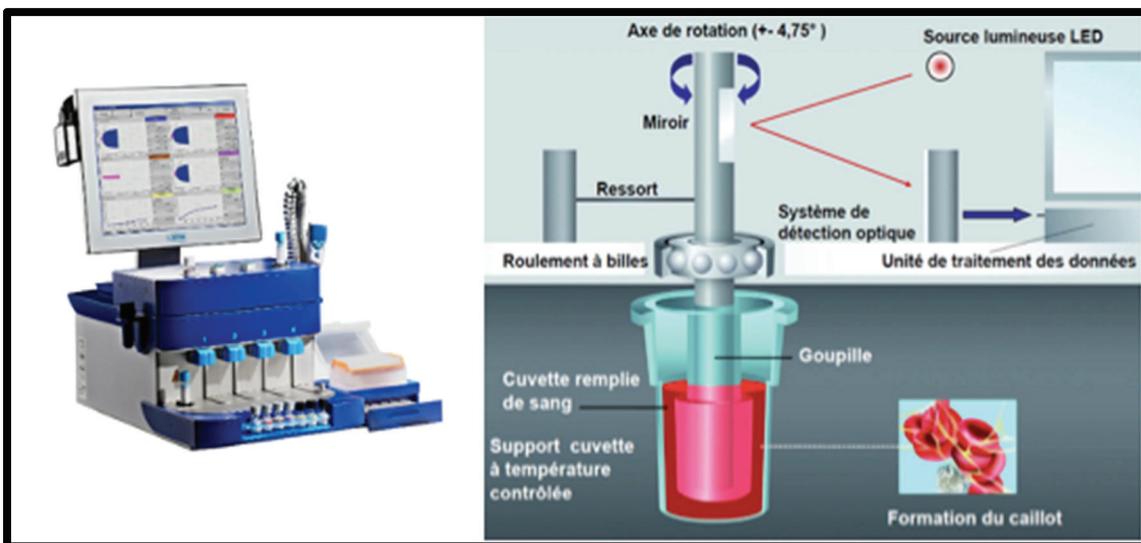


Figure 14 : Principe de fonctionnement de l'automate ROTEM® (56)

4.2.Objectif de l'étude

L'objectif principal de notre étude est de trouver si une alternative est possible en cas de demande de mesure de l'activité anti-Xa sur un prélèvement hémolysé dans le cadre du suivi du traitement par HNF. En effet, le suivi du traitement étant nécessaire à heures fixes, le rejet d'un prélèvement hémolysé impacte fortement le suivi des patients. Un autre exemple est celui des patients sous circulation extra-corporelle (CEC). Il est primordial de monitorer la décoagulation du patient dans le but d'éviter une thrombose lors de la CEC mais aussi d'éviter que le patient saigne en post-CEC. La mesure de l'activité anti-Xa est donc le paramètre à surveiller. Néanmoins, il est fréquent que les patients sous CEC aient une hémolyse mécanique impactant les analyses biologiques.

Pour pallier ce problème, un axe d'étude est l'utilisation du ROTEM® pour ce suivi. Dans cette étude, nous cherchons à évaluer quel impact a l'hémolyse sur les paramètres d'hémostase et notamment l'héparinémie à travers les tests INTEM et HEPTM sur le ROTEM®.

Une différence à l'utilisation classiques du ROTEM® est cependant l'utilisation non pas du sang total mais du plasma étant donné que cette technique serait utilisée après que l'échantillon ait été centrifugé, révélant la présence d'hémolyse.

Pour mener à bien l'objectif de l'étude, nous avons :

- Évalué la corrélation entre la différence (CT INTEM – CT HEPTM) et l'héparinémie sur des échantillons sains (non hémolysé) chez des patients traités par HNF.
- Évalué la corrélation entre la différence (CT INTEM – CT HEPTM) et l'héparinémie sur des échantillons sains (non hémolysé) contenant de l'HNF ajouté *in vitro*.
- Évalué la corrélation entre la différence (CT INTEM – CT HEPTM) et l'héparinémie sur des échantillons hémolysés *in vitro* contenant de l'HNF ajouté *in vitro*.

4.3. Matériels et méthodes

Après prélèvements, chaque tube citraté a le même parcours : il est d'abord centrifugé (10 minutes, à 20°C, à 2 300g, frein moyen) afin d'obtenir du plasma. Le plasma est analysé sur ACL TOP 750® afin d'obtenir la valeur exacte de l'héparinémie (mesure de l'activité anti-Xa en UI/mL), puis analysé sur ROTEM® en utilisant les test INTEM et HEPTM pour obtenir les CT (en secondes).

Nous réalisons 3 séries de tests avec différents échantillons ayant des concentrations en héparine croissante.

- **Série A** : série réalisée sur un total de 30 échantillons provenant de patients traités par HNF : plasmas frais (inférieur à 4 heures) et sains (non hémolysé) avec des concentrations croissantes en HNF (présence d'HNF *in vivo*).
- **Série B** : série réalisée sur 6 échantillons provenant d'un donneur sain et analysé en duplicate : plasmas frais (inférieur 4 heures) sains (non hémolysé) dans lesquels nous ajouterons des concentrations croissante d'HNF (en spiking) : surcharge d'HNF *in vitro*.
- **Série C** : série réalisée sur 12 échantillons provenant d'un donneur sain : plasmas frais (inférieur 4 heures) avec surcharge en hémolysât *in vitro* dans lesquels nous ajouterons des concentrations croissante d'HNF (en spiking) : surcharge d'HNF *in vitro*.

Afin de créer une surcharge en HNF, nous utilisons de l'héparine sodique concentré a 5000 UI/mL que nous diluons pour obtenir la concentration cible. Nous avons choisi pour chaque série de test de se placer entre 2 et 6 concentrations cibles différentes en héparines (en UI/mL) : 0 ; 0,2 ; 0,3 ; 0,5 ; 0,7 ; 1,0. La concentration à 0 UI/mL a été choisie afin d'avoir un contrôle, celles à 0,3 UI/mL et 0,7 UI/mL car ce sont les concentrations cible lors des traitements par HNF, celles à 0,2 UI/mL et 0,5 UI/mL afin d'avoir des intermédiaires pour notre corrélation et enfin celle à 1,0 UI/mL pour avoir des résultats en cas de surdosage en HNF.

En ce qui concerne la première série de test (Série A), nous avons sélectionné 30 prélèvements. Les critères d'inclusion de ces prélèvements sont simples, ils doivent

provenir de patients traités par héparine non fractionnée avec des concentrations variant entre 0 UI/mL et 1,00 UI/mL et prélevés il y a moins de 4 heures. Une fois les analyses demandées par le service réalisées, nous récupérons l'échantillon pour ensuite prélever le plasma. Une fois le plasma récupéré, nous passons cet échantillon sur l'analyseur ACL TOP 750® pour réaliser le test « HNF anti-Xa » afin de connaître l'héparinémie exacte pour ensuite passer ce même échantillon sur le ROTEM® pour réaliser un INTEM et un HEPTM. Cette série de test est réalisée sur plusieurs semaines en veillant toujours à respecter un délai maximum de 4 heures entre le prélèvements et l'analyse sur le ROTEM®. Cette série de test a pour but de réaliser une gamme d'étalonnage pour la différence (CT INTEM - CT HEPTM) avec des concentrations variables d'HNF injectées chez le patient donc d'origine *in vivo*.

Pour la deuxième série de test (Série B), nous souhaitons réaliser à nouveau une gamme d'étalonnage pour la différence (CT INTEM - CT HEPTM) avec des concentrations variables d'héparine non fractionnée mais cette fois injectées *in vitro*. Pour réaliser cette série de test, le groupe de patient doit donc être sain et si possible, conserver le même témoin afin d'avoir moins de variabilité. Tous les tests sont donc réalisés sur le même patient à quelques jours d'intervalles avec différents prélèvements. Le prélèvement de sang doit être laissé au repos pendant quelques minutes, une fois ce délai respecté, il est centrifugé pendant 10 minutes à 2 300g (soit 3 800 rotations par minute). Dans le plasma obtenu, nous ajoutons par spiking une solution diluée d'héparine non fractionnée à des concentrations croissantes (objectifs de concentrations à : 0 UI/mL, 0,3 UI/mL, 0,7 UI/mL, 0,9 UI/mL et 1,2 UI/mL), de manière à créer une surcharge en héparine *in vitro*. Ensuite, de la même manière que dans la Série A, le plasma avec la surcharge est analysé sur l'analyseur ACL TOP 750® pour réaliser le test « HNF anti-Xa » en duplicate afin de connaître l'héparinémie exacte et ensuite analysé sur ROTEM® pour réaliser en duplicate un INTEM et un HEPTM. Tout comme lors de la Série A, nous veillons toujours à respecter un délai maximum de 4 heures entre le prélèvement et l'analyse sur le ROTEM®.

Enfin, pour la troisième et dernière série de test Série C, nous souhaitons réaliser des mesures sur des plasmas avec une surcharge en hémolysat ainsi que des concentrations

croissantes en HNF. Pour cela, nous avons dans un premier temps préparé une gamme d'échantillon avec des concentrations en hémolysat croissantes (figure 15).

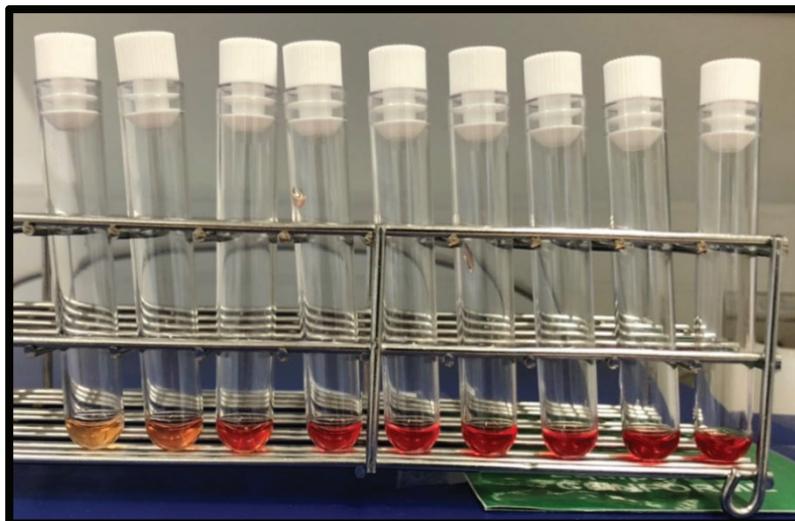


Figure 15 : Gamme d'échantillons avec une concentration croissante en hémolysat

Pour réaliser la Série C, le groupe de patient doit donc être sain et si possible, conserver le même témoin afin d'avoir le moins de variabilité possible. Tous les tests sont donc réalisés sur le même patient, le même jour, avec différents prélèvements. Le prélèvement de sang doit être laissé au repos pendant quelques minutes. Ensuite, une partie des échantillons est utilisée afin de créer une hémolyse artificielle par congélation à -80°C pendant 8 minutes puis décongélation dans le bain-marie à 37°C pendant 5 minutes. Ces échantillons sont ensuite centrifugés pendant 10 minutes à 2 300g (soit 3 800 rotations par minute) pour récupérer le plasma hémolysé qui est utilisée pour créer une surcharge en hémolysât en quantité croissante dans les plasmas sains. Le but est d'obtenir quatre degrés d'hémolyse pour nos analyses : un groupe sain sans hémolyse, un second avec un taux hémoglobine à 1 g/L, un troisième à 3 g/L, et un dernier à 5 g/L. Cette série de test est subdivisée en trois sous-groupes avec des concentrations croissantes en HNF : un groupe témoin sans héparine (sous-groupe 1), un groupe avec une concentration en héparine de 0,48 UI/mL (sous-groupe 2), et un groupe avec une concentration de 0,84 UI/mL (sous-groupe 3). Pour cela, nous ajoutons par spiking une solution diluée d'héparine non fractionnée à des concentrations croissantes, de manière à créer une surcharge en héparine *in vitro*. Une fois avoir ajouté l'HNF et l'hémolysât artificielle dans nos plasmas, les plasmas

finaux sont analysés sur l'automate ACL TOP 750® pour réaliser le test « HNF anti-Xa » afin de connaître l'héparinémie exacte, mais aussi pour vérifier la surcharge en hémolysât. Enfin, ces échantillons sont analysés sur le ROTEM pour réaliser un INTEM et un HEPTEM. Comme lors des séries A et B, nous veillons toujours à respecter un délai maximum de 4 heures entre le prélèvement et l'analyse sur le ROTEM.

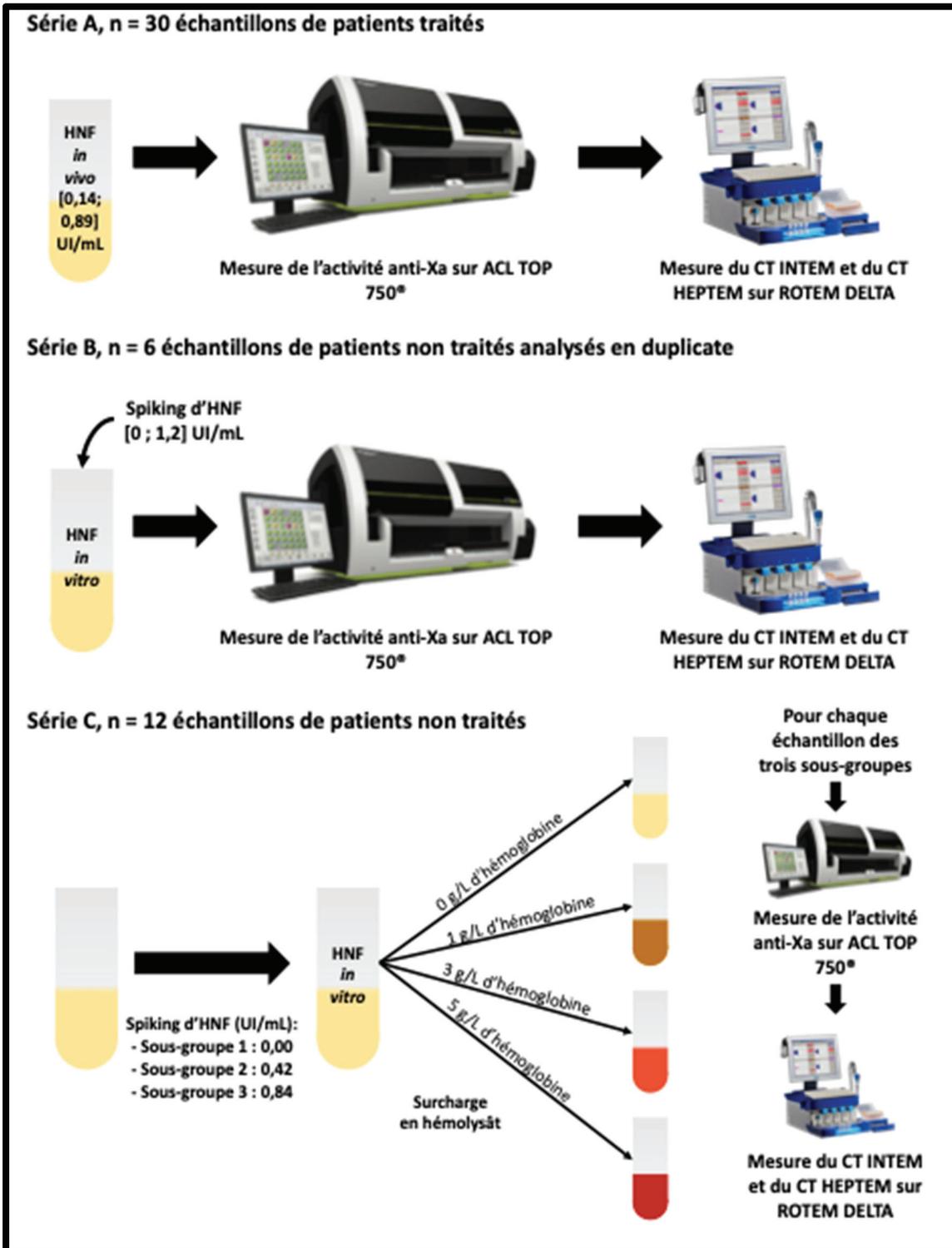


Figure 16 : Schéma récapitulatif des différents tests réalisés dans l'étude

4.4.Résultats

Les résultats de la Série A de test sur les 30 prélèvements sélectionnés sont présentés dans le tableau VII ainsi que la figure 17 ci-dessous.

Test Numéro	Concentration en HNF (en UI/mL)	Δ (CT _{Intem} – CT _{Heptem}) (s)	CT Intem (s)	CT Heptem (s)
5	0,14	12	212	200
3	0,19	22	242	220
10	0,2	24	222	198
28	0,21	17	256	239
4	0,23	41	226	185
11	0,25	15	276	261
15	0,27	8	219	211
13	0,28	35	218	183
16	0,28	36	258	222
14	0,29	103	391	288
6	0,3	78	292	214
22	0,31	38	240	202
12	0,35	117	394	277
1	0,37	112	408	296
24	0,37	25	246	221
20	0,38	31	271	240
23	0,41	130	390	260
17	0,43	45	256	211
18	0,45	79	304	225
2	0,47	131	450	319
25	0,48	159	392	233
21	0,49	113	363	250
8	0,5	161	421	260
9	0,52	174	500	326
29	0,56	202	428	226
26	0,62	230	446	216
30	0,69	371	609	238
19	0,75	479	727	248
7	0,82	470	859	389
27	0,89	797	1089	292

Tableau VII : Résultat de la Série A : mesure de l'activité anti-Xa et résultats en CT INTEM et HEPTTEM sur 30 plasmas de patients traités par héparine non fractionnée

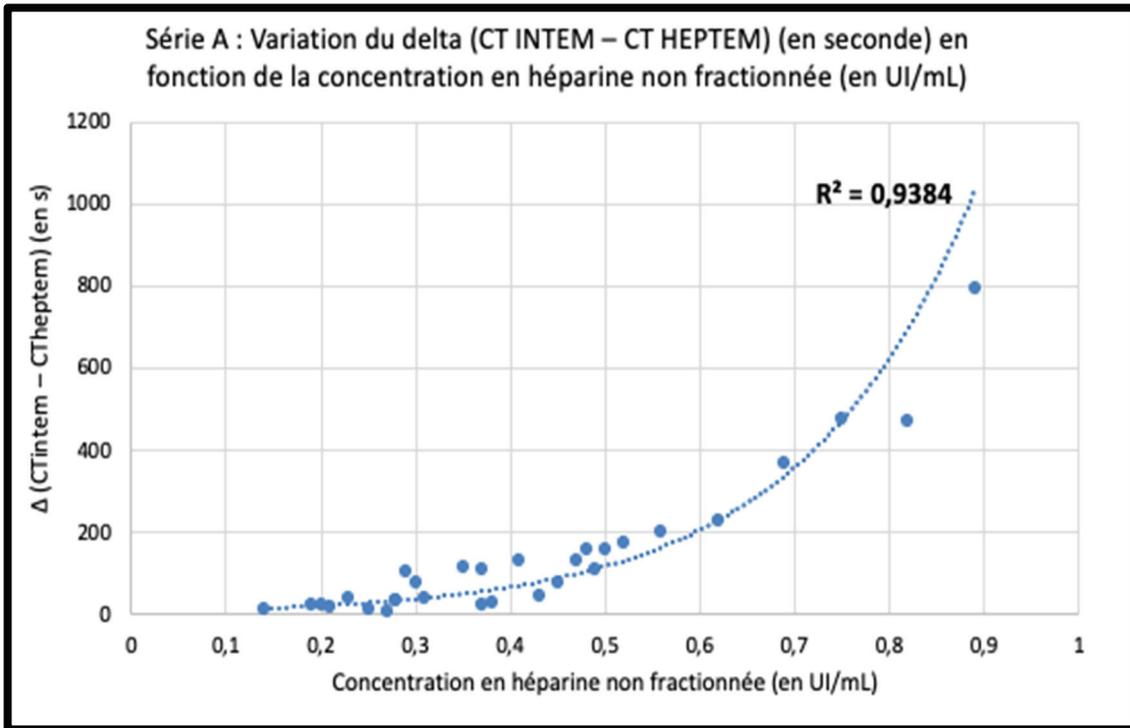


Figure 17 : Série A : Variation du delta (CT INTEM – CT HEPTEM) (en seconde) en fonction de la concentration en héparine non fractionnée (en UI/mL)

A la suite de Série A, nous obtenons une courbe de tendance exponentielle et un coefficient de détermination R^2 d'environ 0,94. Sur les 30 prélèvements sélectionnés aucune hémolyse n'a été détecté, et chaque prélèvement a une héparinémie comprise entre 0,1 et 0,9 UI/mL.

Les résultats de la Série B sont présentés dans le tableau VIII ainsi que la figure 18.

Test Numéro	Concentration en HNF (en UI/mL)	Δ (CTintem – CTheptem) (s)	CT Intem (s)	CT Heptem (s)
1	0	-4	212	216
2	0	-16	209	225
3	0,27	75	310	235
4	0,27	33	270	237
5	0,68	352	539	187
6	0,68	296	488	192
7	0,85	484	700	216
8	0,85	524	743	219
9	0,93	749	1012	263
10	0,93	695	952	257
11	1,22	2702	3000	298
12	1,22	2717	3000	283

Tableau VIII : Résultats de la Série B : mesure de l'activité anti-Xa et résultats en CT INTEM et HEPTEM sur du plasma d'un patient sain après ajout d'héparine non fractionnée *in vitro* à différentes concentrations

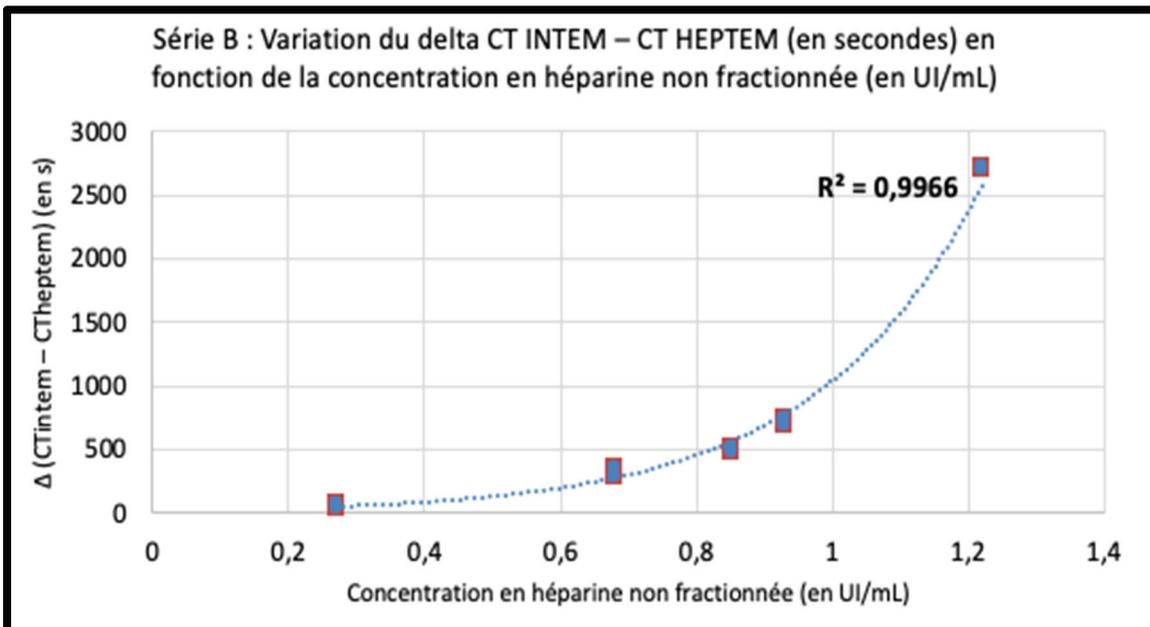


Figure 18 : Série B : Variation du delta CT INTEM – CT HEPTM (en secondes) en fonction de la concentration en héparine non fractionnée (en UI/mL)

La Série B nous permet d’obtenir une courbe de tendance exponentielle et un coefficient de détermination R^2 d’environ 1,00. Chacun des 12 prélèvements a été analysés dans un premier temps sur l’analyseur ACL TOP 750® nous permettant de connaître avec précision l’héparinémie (Tableau VIII). Aucune hémolyse n’a été détecté avant le passage du prélèvement sur le ROTEM®.

Les résultats de la dernière série de test (Série C), sont présentés dans le tableau IX et dans les figures 19, 20 et 21. Cette série de test se décompose en trois sous-groupe (1, 2, et 3) en fonction des concentrations en héparine non fractionnée, le premier à 0,00 UI/mL, le second à 0,48 UI/mL et le troisième à 0,84 UI/mL.

Le sous-groupe 1, à 0 UI/mL d’héparine non fractionnée montre aucune variation dans la différence entre le CT INTEM et le CT HEPTM quelques soit le degré d’hémolyse. Le sous-groupe 2, à 0,48 UI/mL d’héparine non fractionnée montre une légère décroissance dans la différence entre le CT INTEM et le CT HEPTM lorsque le degré en hémolyse augmente de 0 g/L à 1 g/L puis à 3 g/L et se stabilise lors de l’augmentation du degré d’hémolyse à 5 g/L. Enfin, le troisième et dernier sous-groupe à 0,84 UI/mL d’héparine non fractionnée montre une décroissance plus marquée dans la différence entre le CT INTEM et le CT HEPTM lorsque le degré d’hémolyse augmente de 0 g/L à 1 g/L puis à 3 g/L et réaugmente légèrement lors de l’augmentation du degré d’hémolyse

à 5 g/L. L'interférence de la surcharge en hémoglobine raccourcit le CT INTEM et de manière moindre raccourcit également le CT HEPTM.

Sous-groupe 1 : HNF 0 UI/mL			
Degré d'hémolyse (Hb en g/L)	$\Delta(\text{CTintem} - \text{CTheptem})$ (s)	CT Intem	CT Heptem
0	13	236	223
1	10	201	191
3	9	216	207
5	3	204	201
Sous-groupe 2 : HNF 0,48 UI/mL			
Degré d'hémolyse (Hb en g/L)	$\Delta(\text{CTintem} - \text{CTheptem})$ (s)	CT Intem	CT Heptem
0	248	460	212
1	202	389	187
3	151	319	168
5	156	315	159
Sous-groupe 3 : HNF 0,84 UI/mL			
Degré d'hémolyse (Hb en g/L)	$\Delta(\text{CTintem} - \text{CTheptem})$ (s)	CT Intem	CT Heptem
0	660	902	242
1	637	867	230
3	474	673	199
5	503	649	146

Tableau IX : Résultats de la Série C : mesure de l'activité anti-Xa et résultats en CT INTEM et HEPTM sur du plasma d'un patient sain après ajout d'héparine non fractionnée *in vitro* à différentes concentrations et ajout d'hémolysats (0 ; 1 ; 3 ; 5 g/L)

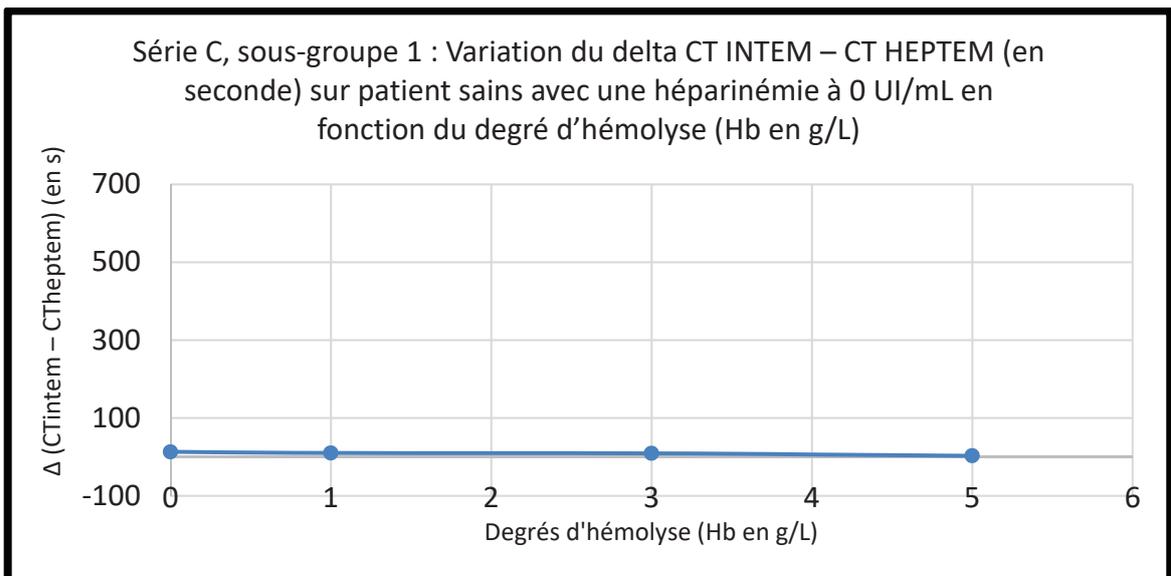


Figure 19 : Série C, sous-groupe 1 : Variation du delta CT INTEM – CT HEPTM (en seconde) sur patient sains avec une héparinémie à 0 UI/mL en fonction du degré d'hémolyse (Hb en g/L)

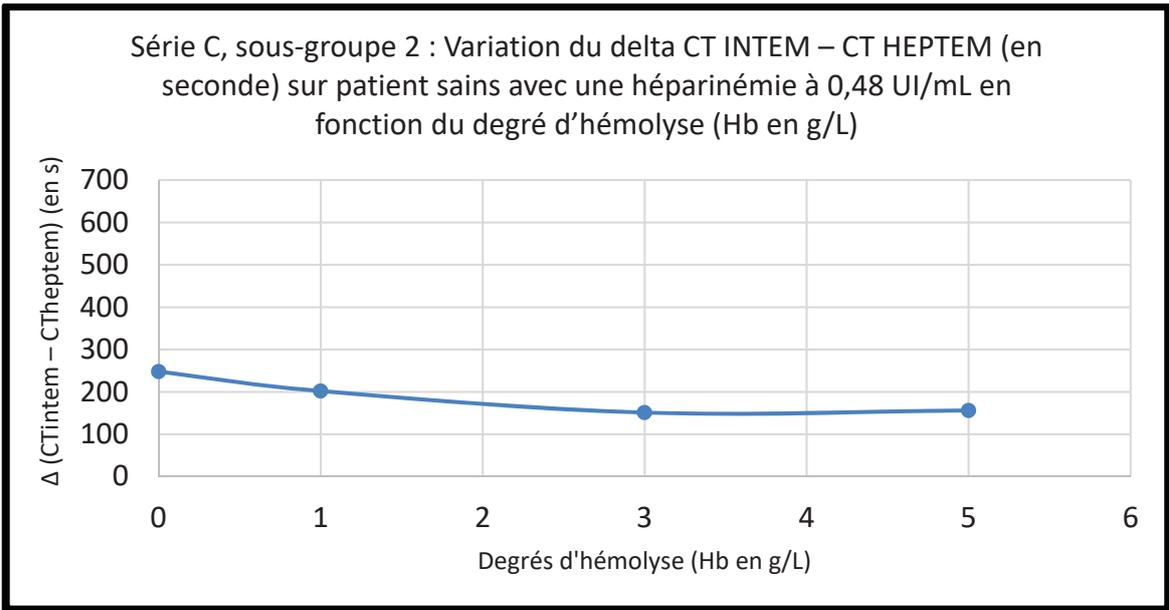


Figure 20 : Série C, sous-groupe 2 : Variation du delta CT INTEM – CT HEPTEM (en seconde) sur patient sains avec une héparinémie à 0,48 UI/mL en fonction du degré d'hémolyse (Hb en g/L)

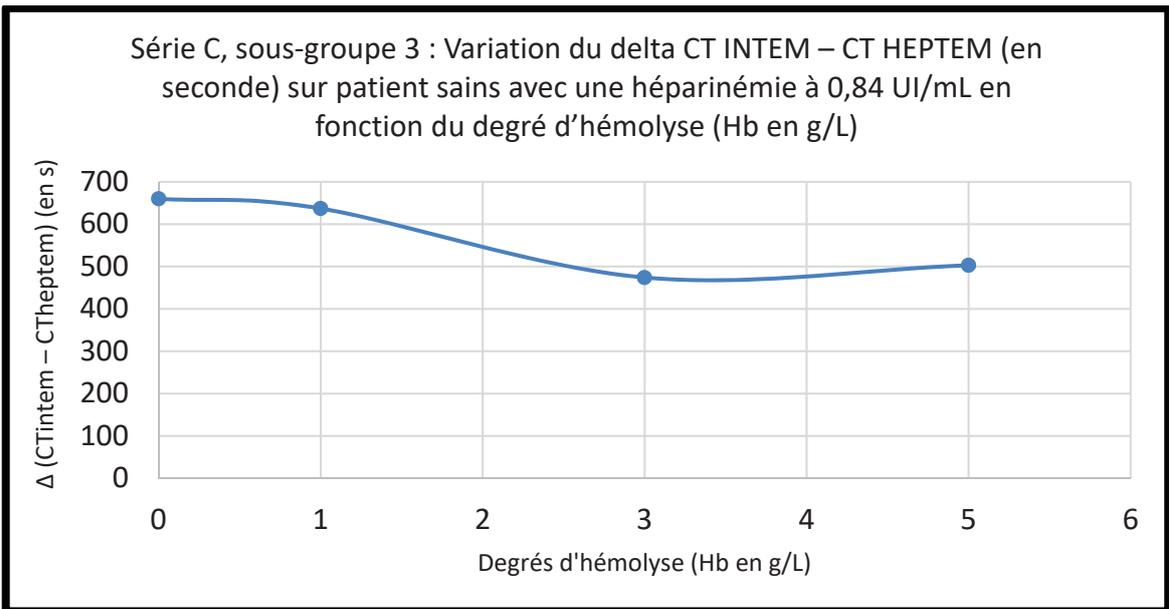


Figure 21 : Série C, sous-groupe 3 : Variation du delta CT INTEM – CT HEPTEM (en seconde) sur patient sains avec une héparinémie à 0,84 UI/mL en fonction du degré d'hémolyse (Hb en g/L)

4.5. Discussion

Les résultats de la série A montrent qu'il y a une augmentation de la différence entre le CT INTEM et le CT HEPTM qui semble proportionnelle à l'augmentation de la concentration en héparine non fractionnée dans le plasma du patient. Comme nous l'observons sur la figure 17, la répartition des données montre que l'augmentation de la différence entre le CT INTEM et le CT HEPTM semble suivre un modèle exponentiel. Cette augmentation de la différence entre le CT INTEM et le CT HEPTM s'explique par le fait que d'une part le CT INTEM est sensible à l'héparine qui est présente en quantité croissante de nos échantillons d'où l'allongement du temps de coagulation, et d'autre part car le réactif de l'HEPTM contient de l'héparinase qui va supprimer l'effet de l'héparine non fractionnée entraînant une faible variation du CT HEPTM malgré des concentrations croissantes d'HNF.

Par ailleurs, à partir des 30 prélèvements étudiés, nous obtenons une courbe avec un coefficient de détermination r^2 d'environ 0,94 ce qui montre la précision de ce modèle. La différence entre le CT INTEM et le CT HEPTM peut donc être corrélée à la concentration en HNF dans le plasma des patients ce qui nous laisse penser que le ROTEM® pourrait être une alternative à l'ACL TOP 750® pour le dosage de l'héparinémie.

Concernant les résultats de la série B réalisée sur le même principe que la première mais cette fois ci avec ajout d'héparine non fractionnée *in vitro*, nous trouvons des résultats similaires à la Série A. En effet, nous observons également une augmentation de la différence entre le CT INTEM et le CT HEPTM qui semble proportionnelle à l'augmentation de la concentration en HNF dans le plasma du patient sain et ce pour les mêmes raisons que celles évoquées ci-dessus. Les analyses étant réalisées en duplicate, nous obtenons une bonne précision de notre modèle qui suit également une tendance exponentielle (figure 18) et donne une courbe avec un coefficient de détermination r^2 d'autant plus précis avec une valeur d'environ 1,00. Cette série de test nous permet de confirmer qu'il y a une corrélation entre la différence du CT INTEM et le CT HEPTM et la concentration en héparine non fractionnée en l'absence d'hémolyse dans nos échantillons. L'origine de l'héparine, issue de plasmas de patients traités ou de spiking (série A et série B), n'influe pas les résultats donc nous

pouvons utiliser la surcharge en héparine pour modéliser l'impact de l'hémolyse (série C).

Concernant les résultats de la série C, nous observons dans le sous-groupe 1, que l'hémolyse, peu importe son degré, n'a aucun impact sur l'INTEM et l'HEPTEM en l'absence d'HNF (figure 19). En effet, du fait de la détection mécanique de la formation du caillot par le ROTEM[®], l'hémolyse n'influe pas les résultats rendus en absence d'HNF. D'un point de vue biologique, l'effet de l'hémolyse n'est probablement pas détecté par ce test global. Notre test, réalisé sur un prélèvement sans HNF, peut être assimilé à un contrôle négatif et nous permet de démontrer que l'hémolyse n'a pas d'impact sur les résultats du ROTEM[®] lorsque l'analyse est effectuée sur un plasma sans substance exogène.

Dans le sous-groupe 2, lorsque l'héparinémie est de 0,48 UI/mL, soit une valeur dans l'intervalle cible d'un patient traité par HNF, la différence entre le CT INTEM et le CT HEPTEM est impactée par le degré d'hémolyse (figure 20). Dans le sous-groupe 3, lorsque l'héparinémie est de 0,84 UI/mL, soit une valeur légèrement supérieure à l'intervalle cible d'un patient traité, nous observons que la différence entre le CT INTEM et le CT HEPTEM est également impactée par le degré d'hémolyse (figure 21). D'une part, cet impact est moins important avec l'héparinémie du sous-groupe 2 qui est plus faible que celle du groupe 3, l'impact de l'hémolyse en présence d'héparine semble donc proportionnel à la concentration et d'HNF et d'hémoglobine dans l'échantillon. D'autre part, pour la concentration à 5g/L d'hémoglobine, il semble y avoir une saturation de l'effet, plus visible à 0,84 UI/mL.

Ces séries de tests nous permettent ainsi de répondre à l'objectif de l'étude. Nous pouvons dire qu'il existe une corrélation entre la différence CT INTEM – CT HEPTEM et l'héparinémie sur des échantillons sains (absence d'hémolyse) contenant de l'héparine non fractionnée chez des patients traités (série A) mais aussi ajoutée in vitro (série B). Le modèle n'est pour autant pas linéaire mais exponentiel, ce qui, même si l'hémolyse n'avait pas d'impact, serait problématique pour faire une corrélation directe entre la différence CT INTEM – CT HEPTEM et l'héparinémie. La série C montre grâce au sous-groupe 1, que la détection mécanique de la coagulation sur ROTEM permet de

s'affranchir de l'interférence optique de l'hémolyse. Néanmoins, en présence d'HNF (sous-groupes 2 et 3), des interactions ont lieu du fait de l'hémolyse, empêchant d'établir la même corrélation entre la différence CT INTEM – CT HEPTEM et l'héparinémie. En effet, lors de l'hémolyse, se produit la libération de substances telles que des facteurs tissulaires ou encore des PF4 (Platelet factor 4) qui active la coagulation et interfère de manière biologique sur les tests. Le PF4 libéré peut neutraliser l'héparine présente dans l'échantillon et donc diminuer le CT INTEM comme observé dans nos sous-groupes 2 et 3 de la série C. Ce même mécanisme est également décrit dans l'article de Nougier et al (41). Nous pouvons affirmer que ces substances interagissent préférentiellement avec l'héparine du prélèvement puisque le CT INTEM est plus impacté que le CT HEPTEM où l'héparinase permet de s'affranchir de l'héparine du prélèvement. Nous pouvons donc conclure que les tests réalisés sur l'automate ROTEM® sont, eux aussi, impactés par l'hémolyse en présence d'HNF.

Il ressort tout de même une limite de cette étude qui réside dans le fait que nous avons, pour notre série C, eu recours à l'utilisation d'hémolysât artificiel créé par une manipulation de congélation / décongélation. L'origine de l'hémolyse présente dans les échantillons de la série C n'est donc pas physiologique. Il serait intéressant de réaliser une nouvelle série sur le même principe que notre série C mais avec des patients réellement traités, et sur lesquels nous aurions un échantillon hémolysé et un second prélevé au même moment, non hémolysé. Cette série nous permettrait de valider le modèle sur des données physiologiques. Néanmoins, l'obtention de ces deux prélèvements serait très difficile en pratique.

4.6. Conclusion

Pour conclure, nous avons constaté que bien que présentant une corrélation exponentielle entre la différence du CT INTEM et le CT HEPTEM et la concentration en HNF en l'absence d'hémolyse, le ROTEM® ne nous permet pas de rendre une héparinémie en présence d'hémolyse. Ce dernier n'est donc pas une alternative à l'ACL TOP 750® pour le dosage de l'héparinémie. Il est donc nécessaire de réfléchir à une autre alternative.

Actuellement, dans certains services de soin, dans le contexte d'urgence pour la prise en charge des patients, un automate est utilisé en biologie délocalisée afin d'assurer le suivi des patients sous HNF, il s'agit de l'Hemochron™ Signature Elite® (Werfen, Instrumentation Laboratory) (figure 22).



Figure 22 : Automate Hemochron™ Signature Elite (Werfen, Instrumentation Laboratory)

Cet automate permet de réaliser des tests rapides d'hémostase sur sang total frais non anticoagulé ou citraté comme le temps de coagulation activé (ACT+ et ACT-LR), le temps de céphaline activée (TCA ou APTT et APTT Citrate), ainsi que le temps de prothrombine (PT et PT Citrate). Le test qui nous intéresse pour le suivi de l'HNF est le test ACT+ utilisé

lors d'interventions de chirurgie cardiaque et d'angioplastie coronaire (57). En effet, pour ajuster en temps réel la quantité d'HNF à administrer chez les patients au décours de la chirurgie ou d'une CEC ou pour vérifier l'efficacité de l'antidote, la protamine, en fin de chirurgie, le médecin a besoin de connaître immédiatement le degré d'anticoagulation du patient. Le laboratoire ne peut pas répondre dans des délais aussi courts pour le rendu du TCA classique ou pour la mesure de l'héparinémie qui serait, par ailleurs, en dehors des limites de linéarité (supérieure à 2,5 UI/mL) des analyseurs de laboratoire dédiés à des suivis classiques pour identifier des surdosages. L'Hemochron™ Signature Elite®, du fait de sa simplicité d'utilisation par des personnels formés à son utilisation dans les blocs permet de réaliser ce suivi « au lit du patient ». L'installation de tels automates, la formation du personnel, le suivi des performances analytiques et des pannes est toutefois du ressort du laboratoire qui accrédite cet analyseur selon la norme de la biologie délocalisée NF EN ISO 22870 (2017) aujourd'hui intégrée à la norme NF EN ISO 15189 version 2022. Comme tout analyseur, les biologistes doivent s'assurer de la fiabilité des résultats rendus et actuellement, il n'existe aucune étude sur la fiabilité des rendus des ACT+ en présence d'hémolyse. Par ailleurs, le prélèvement étant du sang total et non du plasma pour gagner le temps de la centrifugation dans le rendu des résultats patients, l'hémolyse ne peut être quantifiée à l'œil nu avant mesure.

Pour évaluer l'impact potentiel de l'hémolyse sur les résultats en ACT+ et déterminer si l'Hemochron pourrait être une alternative à la mesure des héparinémies sur plasmas hémolysés, il convient donc de réaliser une étude similaire à celle que nous venons de réaliser avec cet analyseur. La contrainte néanmoins est qu'il n'est pas possible pour un service de soin de centrifuger une seringue non anti-coagulée en sang total pour estimer le degré d'hémolyse et que le test ne peut être réalisé que sur du sang total frais non anti-coagulé ou citraté mais dans tous les cas sur du sang total non centrifugé. Par ailleurs, s'il est identifié que l'hémolyse impacte les résultats en ACT+, il faudra trouver une solution pour que le clinicien identifie si son échantillon est hémolysé ou non avant mesure d'ACT+.

Dans cette optique, un nouvel automate, développé en biologie délocalisée afin de permettre la mesure de l'hémolyse en sang total pourrait être utilisé. Cet automate est le HemCheck® Sweden (figure 23).



Figure 23 : Automate HemCheck® (Sweden) : détection de l'hémolyse en sang total en biologie délocalisée

Grâce à ce dernier, l'hémolyse peut être détectée en dehors du laboratoire, sur sang total, ce qui permet de se passer de la centrifugation. Il a deux types d'utilisation, soit les cliniciens fixent un seuil d'hémolyse (en mg/dL) à partir duquel le système donne une réponse qualitative : le seuil d'hémolyse est dépassé ou non ; soit les cliniciens souhaitent avoir un résultat quantitatif avec le taux exact et ils décident de leurs attitudes (seuil de détection ou de rejet). Le résultat quantitatif nécessite de se connecter à l'interface du système (58). Cet automate devra être utilisé avant d'analyser un échantillon sur l'Hémochron afin de savoir si l'échantillon est conforme ou non et de ce fait si le résultat est interprétable.

Ainsi, ce travail n'a pas permis d'apporter une solution immédiatement applicable au laboratoire d'hémostase du CBPE grâce au ROTEM®. Cependant, il a permis de réfléchir à une autre alternative à explorer puisque, actuellement, le rendu des héparinémies sur des prélèvements fortement hémolysés est impossible. Cette interférence représente donc encore aujourd'hui, une impasse pour le suivi correct des patients.

5. Conclusion générale

Dans les laboratoires de biologie médicale, la phase pré-analytique est la plus critique. Les erreurs pré-analytiques sont nombreuses et sont une réelle problématique. L'étude de la littérature montre que la présence d'hémolyse dans les échantillons est, au sein de cette phase, l'interférence la plus fréquente. L'origine de l'hémolyse peut être pathologique mais aussi exogène lorsqu'elle survient au décours du prélèvement ou de son traitement. Concernant ces prélèvements hémolysés, il existe un manque de standardisation quant à la manière de les détecter, ainsi que dans le choix du seuil de rejet où l'hémolyse serait responsable d'un d'impact sur les résultats rendus. Enfin, il existe peu d'alternative permettant de rendre les résultats et ils sont de ce fait le plus souvent rejetés.

L'étude de prévalence réalisée au laboratoire d'hématologie du Centre de Biologie et Pathologie Est des Hospices Civils de Lyon, confirme que l'hémolyse est l'interférence pré-analytique majoritaire de notre centre d'étude. Elle représente 5,4 % des prélèvements reçus en hémostase et 1,3% en hématologie cellulaire, avec, de la même manière que dans la littérature, une fréquence accrue pour les services des urgences et de pédiatrie représentant à eux seul plus de 67 % des prélèvements hémolysés.

Dans les laboratoires d'hémostase confrontés à cette problématique, la prise en charge d'un prélèvement hémolysé dans le cadre du suivi de patients traités par héparines est une difficulté puisque la mesure de l'activité anti-Xa ou héparinémie doit être réalisée à heures fixes. Le rejet d'un prélèvement hémolysé impacte donc fortement le suivi des patients. Le rejet est également une difficulté pour le suivi des patients avec une circulation extracorporelle à fort risque d'hémolyse. Au laboratoire d'hémostase du Centre de Biologie et Pathologie Est des Hospices Civils de Lyon, la mesure de l'héparinémie est réalisée sur plasma sur l'automate ACL TOP 750® (Werfen). L'alternative proposée dans notre étude en cas d'hémolyse trop importante, supérieure à 3 g/L, est l'utilisation d'un autre automate d'hémostase du service, le ROTEM® (Werfen). L'objectif de notre travail a été d'évaluer l'impact de l'hémolyse sur les tests INTEM et HEPTM réalisés sur le ROTEM en présence d'héparine non fractionnée.

Notre étude a montré que la différence entre le CT INTEM et le CT HEPTEM est corrélée à l'héparinémie dans des plasmas avec surcharge en héparine non fractionnée ou dans des plasmas de patients traités, sans hémolyse. Le modèle n'est pour autant pas linéaire mais exponentiel. Cependant, en présence d'hémolyse, nous avons montré qu'il n'est pas possible d'établir la même corrélation. Nous pouvons donc conclure que les tests réalisés sur l'automate ROTEM® sont eux aussi impactés par l'hémolyse en présence d'héparine non fractionnée. Le ROTEM® n'est donc pas une alternative à l'ACL TOP 750® pour le dosage de l'héparinémie en cas de prélèvements hémolysés.

Comme alternative au ROTEM®, nous nous interrogeons sur un autre analyseur d'hémostase, l'Hémochron® (Werfen), fonctionnant avec des prélèvements en sang total et utilisé actuellement en biologie délocalisée pour le suivi en temps réel des patients traités par héparine non fractionnée. Nous pourrions envisager une étude utilisant cet automate, l'Hémochron n'ayant actuellement encore jamais été testé en termes de fiabilité vis-à-vis d'un prélèvement hémolysé. Par ailleurs, ne fonctionnant qu'avec des échantillons en sang total, il est nécessaire de l'associer à un système capable de détecter l'hémolyse en sang total. En cela, le nouvel analyseur, HemCheck® (Sweden), est lui aussi à évaluer.

A travers ce travail, nous avons pu faire le point sur la prévalence et la gestion actuelle des prélèvements hémolysés dans le laboratoire d'hématologie du Centre de Biologie et Pathologie Est et montrer que c'est un enjeu encore d'actualité. En effet, en hémostase, le rendu des héparinémies sur des prélèvements fortement hémolysés est impossible et représente donc encore une impasse pour le suivi correct des patients.

Le Président de la thèse,
Nom : Christine VINCIGUERRA

Vu et permis d'imprimer, Lyon, le **3 AVR. 2023**
Vu, le Directeur de l'Institut des Sciences Pharmaceutiques et
Biologiques, Faculté de Pharmacie

Signature :

Pour le Président de l'Université Claude Bernard Lyon 1,



Professeur C. DUSSART



Serment des Pharmaciens Au moment d'être reçu Docteur en Pharmacie,

*En présence des Maitres de la Faculté, je fais
le serment :*



L'Apothicaire

(Musée des Hospices Civils de Lyon)

- *D'honorer ceux qui m'ont instruit(e) dans les préceptes de mon art et de leur témoigner ma reconnaissance en restant fidèle aux principes qui m'ont été enseignés et d'actualiser mes connaissances*
- *D'exercer, dans l'intérêt de la santé publique, ma profession avec conscience et de respecter non seulement la législation en vigueur, mais aussi les règles de Déontologie, de l'honneur, de la probité et du désintéressement*
- *De ne jamais oublier ma responsabilité et mes devoirs envers la personne humaine et sa dignité*
- *En aucun cas, je ne consentirai à utiliser mes connaissances et mon état pour corrompre les mœurs et favoriser des actes criminels.*
- *De ne dévoiler à personne les secrets qui m'auraient été confiés ou dont j'aurais eu connaissance dans l'exercice de ma profession*
- *De faire preuve de loyauté et de solidarité envers mes collègues pharmaciens*
- *De coopérer avec les autres professionnels de santé.*

Que les Hommes m'accordent leur estime si je suis fidèle à mes promesses. Que je sois couvert(e) d'opprobre et méprisé(e) de mes confrères si j'y manque.

Date :

Signatures de l'étudiant et du Président du jury

6. Bibliographie

1. [En ligne]. Laboratoire d'Hématologie Cellulaire du CHU d'Angers; [cité le 21 juin 2021]. Disponible: <http://www.hematocell.fr/index.php/enseignement-de-lhematologie-cellulaire/globules-rouges-et-leur-pathologie/42-lhemolyse-et-son-exploration>
2. Vinciguerra C. Cours DFASP2 Hématologie. 2020.
3. hemolyse.pdf [En ligne]. [cité le 21 juin 2021]. Disponible: http://staff.univ-batna2.dz/sites/default/files/kacha_fairouz/files/hemolyse.pdf
4. Hemolyse capsule [En ligne]. [cité le 8 juill 2021]. 13:37. Disponible: <https://www.youtube.com/watch?v=KNbX6LR91go>
5. [En ligne]. HÉMOLYSE & SYNDROMES HÉMOLYTIQUES - Encyclopædia Universalis; [cité le 21 juin 2021]. Disponible: <https://www.universalis.fr/encyclopedie/hemolyse-et-syndromes-hemolytiques/>
6. Lippi G, Plebani M, Favalaro EJ. Interference in Coagulation Testing: Focus on Spurious Hemolysis, Icterus, and Lipemia. *Semin Thromb Hemost*. Thieme Medical Publishers; avr 2013;39(3):258-66.
7. D'Angelo G, Villa C, Tamborini A, Villa S. Evaluation of the main coagulation tests in the presence of hemolysis in healthy subjects and patients on oral anticoagulant therapy. *Int J Lab Hematol*. 2015;37(6):819-33.
8. Édition professionnelle du Manuel MSD [En ligne]. Revue générale des anémies hémolytiques - Hématologie et oncologie; [cité le 21 juin 2021]. Disponible: <https://www.msmanuals.com/fr/professional/h%C3%A9matologie-et-oncologie/an%C3%A9mies-h%C3%A9molytiques/revue-g%C3%A9n%C3%A9rale-des-an%C3%A9mies-h%C3%A9molytiques>
9. pnds_ahai_version_actualisee_2017.pdf [En ligne]. [cité le 21 juin 2021]. Disponible: https://www.has-sante.fr/upload/docs/application/pdf/2017-02/pnds_ahai_version_actualisee_2017.pdf
10. [En ligne]. Laboratoire d'Hématologie Cellulaire du CHU d'Angers; [cité le 21 juin 2021]. Disponible: <http://www.hematocell.fr/index.php/enseignement-de-lhematologie-cellulaire/globules-rouges-et-leur-pathologie/84-anemies-hemolytiques-acquises-non-immunologiques>
11. Factors-Affecting-Hemolysis-Preanalytical-Specimen-Workflow-Chart.pdf [En ligne]. [cité le 21 juin 2021]. Disponible: <https://specimencare.com/wp-content/uploads/2021/02/Factors-Affecting-Hemolysis-Preanalytical-Specimen-Workflow-Chart.pdf>
12. Yin P, Lehmann R, Xu G. Effects of pre-analytical processes on blood samples used in metabolomics studies. *Anal Bioanal Chem*. 1 juill 2015;407(17):4879-92.
13. Directeur des Plateaux Médicaux Techniques (DPMT). Manuel de prélèvement du LBMMS. 2019.

14. Lippi G, Baird GS, Banfi G, Bölenius K, Cadamuro J, Church S, et al. Improving quality in the preanalytical phase through innovation, on behalf of the European Federation for Clinical Chemistry and Laboratory Medicine (EFLM) Working Group for Preanalytical Phase (WG-PRE). *Clin Chem Lab Med.* 1 mars 2017;55(4):489-500.
15. Dikmen ZG, Pinar A, Akbiyik F. Specimen rejection in laboratory medicine: Necessary for patient safety? *Biochem Medica.* 2015;25(3):377-85.
16. Plebani M. Errors in clinical laboratories or errors in laboratory medicine? *Clin Chem Lab Med.* 2006;44(6):750-9.
17. Salvagno GL, Lippi G, Bassi A, Poli G, Guidi GC. Prevalence and type of pre-analytical problems for inpatients samples in coagulation laboratory. *J Eval Clin Pract.* avr 2008;14(2):351-3.
18. Carraro P, Servidio G, Plebani M. Hemolyzed Specimens: A Reason for Rejection or a Clinical Challenge? *Clin Chem.* 1 févr 2000;46(2):306-7.
19. Jones BA, Calam RR, Howanitz PJ. Chemistry specimen acceptability: a College of American Pathologists Q-Probes study of 453 laboratories. *Arch Pathol Lab Med.* janv 1997;121(1):19-26.
20. Lippi G, Salvagno GL, Favaloro EJ, Guidi GC. Survey on the prevalence of hemolytic specimens in an academic hospital according to collection facility: opportunities for quality improvement. *Clin Chem Lab Med.* De Gruyter; 1 mai 2009;47(5):616-8.
21. Burns ER, Yoshikawa N. Hemolysis in Serum Samples Drawn by Emergency Department Personnel versus Laboratory Phlebotomists. 33(5):3.
22. Nougier C, Sobas F, Joussemme E. Effet de l'hémolyse sur les tests de routine d'hémostase. 2017.
23. Pretlow L, Gandy T, Leibach EK, Russell B, Kraj B. A Quality Improvement Cycle: Hemolyzed Specimens in the Emergency Department. :6.
24. Plebani M, Lippi G, GBV 703, Cervellin G, Author, Favaloro EJ, et al. *In Vitro and In Vivo Hemolysis an Unresolved Dispute in Laboratory Medicine.* Berlin : De Gruyter.;
25. *Archives of Pathology & Laboratory Medicine.* juill 2016;140.
26. ISO [En ligne]. 14:00-17:00. ISO 15189:2012; [cité le 21 juin 2021]. Disponible: <https://www.iso.org/cms/render/live/en/sites/isoorg/contents/data/standard/05/61/56115.html>
27. Badrick T, Barden H, Callen S, Dimeski G, Gay S, Graham P, et al. Consensus Statement for the Management and Reporting of Haemolysed Specimens. *Clin Biochem Rev.* déc 2016;37(4):140-2.
28. Lippi G, Banfi G, Buttarello M, Ceriotti F, Daves M, Dolci A, et al. Recommendations for detection and management of unsuitable samples in clinical laboratories. *Clin Chem Lab Med.* 2007;45(6):728-36.
29. Lippi G, Plebani M, Favaloro EJ. Interference in coagulation testing: focus on spurious

hemolysis, icterus, and lipemia. *Semin Thromb Hemost.* avr 2013;39(3):258-66.

30. Sysmex C. Evaluation of the influence of the interference materials. *Scientifique Affairs.* 2011;1-6.
31. Simundic AM, Nikolac N, Ivankovic V, Ferenc-Ruzic D, Magdic B, Kvaternik M, et al. Comparison of visual vs. automated detection of lipemic, icteric and hemolyzed specimens: can we rely on a human eye? *Clin Chem Lab Med.* 2009;47(11):1361-5.
32. Howanitz PJ, Lehman CM, Jones BA, Meier FA, Horowitz GL. Practices for Identifying and Rejecting Hemolyzed Specimens Are Highly Variable in Clinical Laboratories. *Arch Pathol Lab Med.* août 2015;139(8):1014-9.
33. [En ligne]. Famille ACL TOP Série 50 | Werfen en France; [cité le 9 sept 2021]. Disponible: <https://www.werfen.com/fr/fr/famille-acl-top-serie-50>
34. de Jonge G, Dos Santos TL, Cruz BR, Simionatto M, Bittencourt JIM, Krum EA, et al. Interference of in vitro hemolysis complete blood count. *J Clin Lab Anal.* juin 2018;32(5):e22396.
35. Peng Z, Xiang W, Zhou J, Cao J, Li Z, Gao H, et al. Hemolytic specimens in complete blood cell count: Red cell parameters could be revised by plasma free hemoglobin. *J Clin Lab Anal.* juin 2020;34(6):e23218.
36. Lippi G, Pavesi F, Cattabiani C, Avanzini P, Pipitone S. Influence of in vitro hemolysis on nucleated red blood cells and reticulocyte counts. *Int J Lab Hematol.* avr 2013;35(2):225-8.
37. Lippi G, Avanzini P, da Pavesi F, Bardi M, Ippolito L, Aloe R, et al. Studies on in vitro hemolysis and utility of corrective formulas for reporting results on hemolyzed specimens. *Biochem Medica.* 2011;297-305.
38. Lippi G, Musa R, Avanzini P, Aloe R, Pipitone S, Sandei F. Influence of in vitro hemolysis on hematological testing on Advia 2120. *Int J Lab Hematol.* avr 2012;34(2):179-84.
39. Lippi G, Salvagno GL, Montagnana M, Brocco G, Guidi GC. Influence of hemolysis on routine clinical chemistry testing. *Clin Chem Lab Med.* 2006;44(3):311-6.
40. Lippi G, Fontana R, Avanzini P, Aloe R, Ippolito L, Sandei F, et al. Influence of mechanical trauma of blood and hemolysis on PFA-100 testing. *Blood Coagul Fibrinolysis Int J Haemost Thromb.* janv 2012;23(1):82-6.
41. Nougier C, Jouselme E, Sobas F, Pousseur V, Négrier C. Effects of hemolysis, bilirubin, and lipemia interference on coagulation tests detected by two analytical systems. *Int J Lab Hematol.* févr 2020;42(1):88-94.
42. Kostousov V, Nguyen K, Hundalani SG, Teruya J. The influence of free hemoglobin and bilirubin on heparin monitoring by activated partial thromboplastin time and anti-Xa assay. *Arch Pathol Lab Med.* nov 2014;138(11):1503-6.
43. Lippi G, Ippolito L, Favaloro EJ. Technical evaluation of the novel preanalytical module on instrumentation laboratory ACL TOP: advancing automation in hemostasis testing. *J Lab Autom.* oct 2013;18(5):382-90.

44. Nagant C, Rozen L, Demulder A. HIL Interferences on Three Hemostasis Analyzers and Contribution of a Preanalytical Module for Routine Coagulation Assays. *Clin Lab*. 1 oct 2016;62(10):1979-87.
45. Woolley A, Golmard JL, Kitchen S. Effects of haemolysis, icterus and lipaemia on coagulation tests as performed on Stago STA-Compact-Max analyser. *Int J Lab Hematol*. août 2016;38(4):375-88.
46. Hernaningsih Y, Akualing JS. The effects of hemolysis on plasma prothrombin time and activated partial thromboplastin time tests using photo-optical method. *Medicine (Baltimore)*. sept 2017;96(38):e7976.
47. Laga AC, Cheves TA, Sweeney JD. The effect of specimen hemolysis on coagulation test results. *Am J Clin Pathol*. nov 2006;126(5):748-55.
48. Arora S, Kolte S, Dhupia J. Hemolyzed Samples Should be Processed for Coagulation Studies: The Study of Hemolysis Effects on Coagulation Parameters. *Ann Med Health Sci Res*. mars 2014;4(2):233-7.
49. Tang N, Jin X, Sun Z, Jian C. Effects of hemolysis and lipemia interference on kaolin-activated thromboelastography, and comparison with conventional coagulation tests. *Scand J Clin Lab Invest*. avr 2017;77(2):98-103.
50. Hedeland Y, Gustafsson CM, Touza Z, Ridefelt P. Hemolysis interference in 10 coagulation assays on an instrument with viscosity-based, chromogenic, and turbidimetric clot detection. *Int J Lab Hematol*. juin 2020;42(3):341-9.
51. Plebani M. Errors in laboratory medicine and patient safety: the road ahead. *Clin Chem Lab Med*. 2007;45(6):700-7.
52. Lippi G, Guidi GC. Risk management in the preanalytical phase of laboratory testing. *Clin Chem Lab Med*. 2007;45(6):720-7.
53. Prélèvement veineux [En ligne]. Guide de prélèvements du CISSS des Laurentides - Laboratoires de biologie médicale du site Saint-Jérôme. [cité le 28 sept 2021]. Disponible: <http://www.cdsjlabo.org/procedures-prelevement/prelevement-veineux/>
54. [En ligne]. Canal RET/PLT-O; [cité le 22 sept 2021]. Disponible: <https://www.sysmex.fr/n/academie/centre-dexpertise/technologie-sysmex/fluoro-cytometrie-en-flux/canal-ret/plt-o.html>
55. Yann M. Méthode de surveillance de l'héparine non fractionnée par TCA ou anti-Xa.
56. [En ligne]. ROTEM delta | Werfen en France; [cité le 10 avr 2023]. Disponible: <https://www.werfen.com/fr/fr/hemostase/rotem-delta>
57. Werfen, Instrumentation Laboratory. Hemochron SIGNATURE ELITE, Whole Blood Microcoagulation System. 2015.
58. eurobio SCIENTIFIC. SYSTÈME HELGE-HEM CHECK. 2022.

L'ISPB-Faculté de Pharmacie de Lyon et l'Université Claude Bernard Lyon 1 n'entendent donner aucune approbation ni improbation aux opinions émises dans les thèses ; ces opinions sont considérées comme propres à leurs auteurs.

L'ISPB-Faculté de Pharmacie de Lyon est engagé dans une démarche de lutte contre le plagiat. De ce fait une sensibilisation des étudiants et encadrants des thèses a été réalisée avec notamment l'incitation à l'utilisation de méthodes de recherche de similitudes.

BOISIS Yoan

La problématique des prélèvements hémolysés dans les laboratoires d'hématologie : prévalence dans un laboratoire des Hospices Civils de Lyon et recherche d'une alternative à la mesure de l'héparinémie en hémostase.

RESUME

Au sein des laboratoires de biologie médicale, de nombreuses erreurs sont observées lors de la prise en charge des prélèvements. Une des principales erreurs retrouvées lors de la phase pré-analytique est la présence d'hémolyse dans les prélèvements. Cette dernière peut être d'origine physiologique mais aussi pathologique et peut impacter la qualité des analyses réalisées sur le prélèvement.

Alors que l'hémolyse représente une réelle problématique, il est observé dans la littérature un manque de standardisation quant à sa détection, mais aussi dans la conduite à tenir en sa présence.

L'analyse de la littérature mais aussi notre étude menée au Centre de Biologie et Pathologie Est des Hospices Civils de Lyon démontrent que l'hémolyse est une erreur très importante dans les laboratoires et oscille entre 3 à 6 % des prélèvements avec une fréquence plus élevée en service d'urgence et de pédiatrie.

Par ailleurs, nous observons un manque d'alternative pour la prise en charge de ces prélèvements. Dans notre étude, nous nous sommes intéressés au cas particulier de la prise en charge des prélèvements hémolysés dans le cadre du suivi de patients traités par héparine non fractionnée. Ce dernier, réalisé par la mesure de l'activité anti-Xa ou héparinémie, est particulièrement complexe car il doit être fait à heure fixe. Lors de la présence d'hémolyse trop importante, supérieure à 3 g/L, empêchant de rendre le résultat, l'impact sur la prise en charge du patient est majeur et surtout lors du suivi de patient en circulation extra corporelle.

Notre étude a consisté à tester une alternative à l'automate habituellement utilisée pour la mesure de l'héparinémie sur plasma, l'ACL TOP 750 (Werfen), l'automate ROTEM (Werfen). Notre objectif a été d'évaluer l'impact de l'hémolyse sur les tests INTEM et HEPTTEM en présence d'héparine non fractionnée sur le ROTEM.

Bien qu'une corrélation exponentielle ait été trouvée en l'absence d'hémolyse entre la différence CT INTEM - CT HEMPTTEM et l'héparinémie sur des prélèvements contenant de l'héparine non fractionnée, notre étude a montré l'absence de cette corrélation en présence d'hémolyse. Nous pouvons donc conclure que les tests réalisés sur le ROTEM sont également impactés par l'hémolyse d'où la nécessité de trouver une autre alternative que celle proposée dans notre étude.

MOTS CLES

Hémolyse, Héparine non fractionnée, Prévalence, impact, seuil de détection

JURY

Mme VINCIGUERRA Christine, PU-PH,
Mme JOUSSELME Émilie, PH
M. NOUGIER Christophe, PH

DATE DE SOUTENANCE

Mercredi 19 avril 2023

CONTACT

Pr. VINCIGUERRA Christine : christine.vinciguerra@univ-lyon1.fr