

Électrochimie et coagulation du sang

Jean-Maxime Nigretto

1. La coagulation du sang

La coagulation du sang se présente comme une cascade de réactions enzymatiques dont la plupart forment des boucles rétroactives (Fig 1). Dans ce processus, on peut décrire schématiquement chaque étape réactionnelle par une réaction simple où chacune des protéines impliquée (qualifiée de proenzyme et initialement dépourvue de propriété catalytique) est le substrat de l'enzyme formée dans l'étape qui précède. Au cours de la réaction d'activation, la protéine-substrat (facteur) est convertie en enzyme (facteur activé), laquelle intervient ensuite dans l'étape suivante (Fig 2).

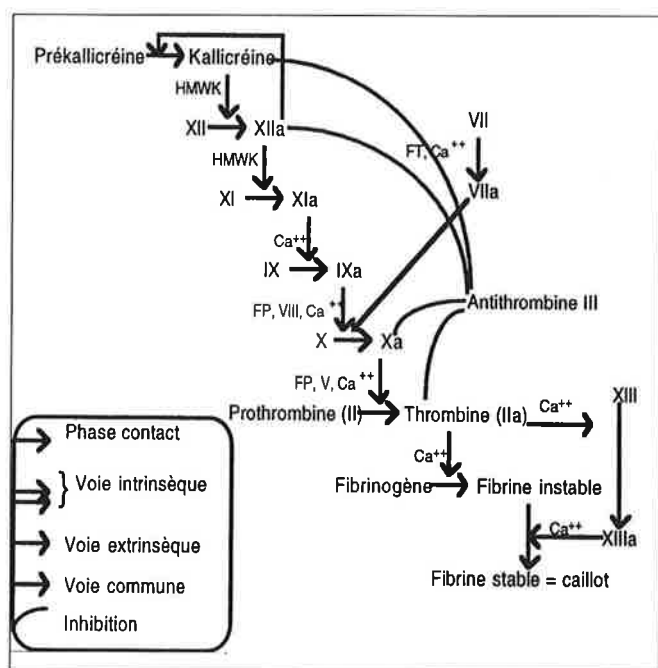


Figure 1 - Schéma simplifié de la coagulation.

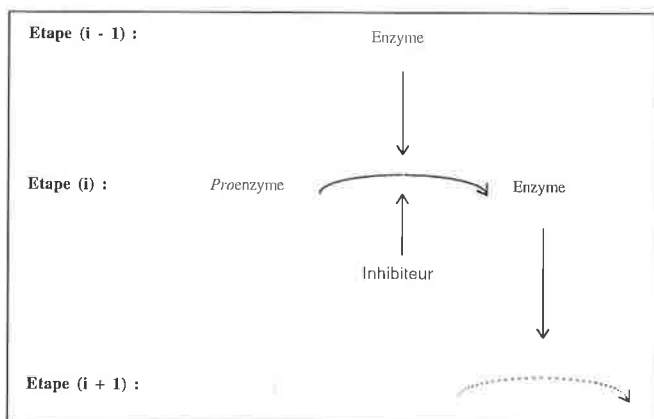


Figure 2 - Mécanisme schématisé d'une réaction d'activation protéolytique.

Le processus peut être déclenché par deux voies distinctes, selon la nature de l'agression du système sanguin: la voie intrinsèque au cours de laquelle se produit l'activation du facteur XII (80 kDa, 0,38 mM) en facteur XIIa (même masse moléculaire) ou la voie extrinsèque qui passe par l'activation du facteur VII (60 kDa). La cascade réactionnelle principale s'achève par la formation du caillot qui résulte de la polymérisation du fibrinogène (330 kDa, 9 mM) par l'enzyme formée en dernier, la thrombine (facteur IIa) (40 kDa). Cette dernière provient de l'activation de la prothrombine (72 kDa, 1,4 mM). Pour éviter la coagulation de l'ensemble du tissu sanguin, chaque étape est régulée par l'action d'inhibiteurs. L'anticoagulant le plus connu, l'héparine (17 kDa), y intervient en catalysant les réactions d'inhibition par l'antithrombine III (58 kDa, 5 mM). Enfin, il existe une boucle régulatrice (système fibrinolytique) par laquelle le réseau de fibrine est dépolymérisé une fois le caillot formé.

2. L'investigation clinique de la coagulation du sang

La routine des bilans de coagulation effectués en laboratoire d'analyse médicale vise à détecter d'éventuelles anomalies de concentration ou de structure touchant l'un ou l'autre des facteurs ou cofacteurs. Les mesures, à présent réalisées par des automates, consistent à détecter les activités protéolytiques par colorimétrie. L'enzyme à doser réagit avec un substrat synthétique dont il reconnaît l'ossature peptidique. En général, on obtient une spécificité suffisante à partir d'un enchaînement de trois acides aminés. L'hydrolyse protéolytique des substrats chromogènes commerciaux libère une amine, généralement la *p*-nitroaniline jaune, qui est alors détectée par colorimétrie à 405 nm (Fig 3). La vitesse de l'augmentation de la concentration de l'amine est proportionnelle à l'activité enzymatique recherchée. Pour doser une proenzyme ou un inhibiteur, on introduit un excès d'activateur (enzyme).

Le dosage des facteurs qui participent à l'une des premières réactions d'activation du sang est important car ces protéines interviennent dans les mécanismes liés à l'hémostase. Le sous-système auquel elles se rattachent est appelé système contact.

Le recours à la photométrie comme technique d'analyse spécifique des facteurs de la coagulation du sang nécessite une étape préalable de centrifugation du sang afin de rendre le milieu homogène et non coloré. Le plasma ainsi obtenu est débarrassé des principaux éléments figurés du sang, notamment les globules rouges.

Ce traitement demeure cependant contraignant si l'on projette la mise au point de dispositifs de dosage portables

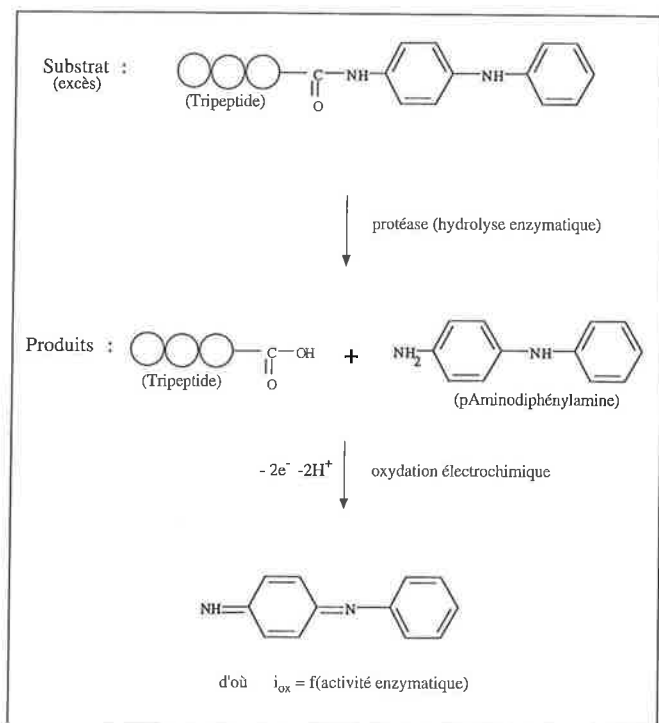


Figure 3 - Schéma de l'hydrolyse d'un substrat électrogène par une protéase.

de terrain (« home-tests ») alimenté par des batteries ou pour des applications en médecine périnatale où les faibles volumes des prélèvements de sang excluent la centrifugation. A ce titre, l'électrochimie offre une solution alternative dans la mesure où l'inconvénient de l'hétérogénéité et/ou de la couleur du milieu ne se pose pas et où la miniaturisation des systèmes de mesure permet d'opérer sur des microvolumes de liquide.

3. L'alternative électrochimique à la détection des activités protéolytiques

Dans ce but, il convient de synthétiser des substrats dont l'amine libérée par la réaction enzymatique possède des propriétés électrochimiques. Différents essais ont conduit à retenir la *p*-aminodiphénylamine, dont l'oxydation est obtenue avec une électrode de platine ou de carbone vers + 0,35 V/ENH. De tels substrats, « libérateurs d'électrons », sont appelés électrogènes. La séquence spécifique reconnue par l'enzyme est un tripeptide identique à celui des substrats chromogènes utilisés pour la colorimétrie.

En milieu à forte charge protéique (sang total ou plasma), l'allure du signal électrochimique de l'amine est modifiée par rapport à celle obtenue en solution aqueuse. Toutefois, son amplitude est reproductible une fois que l'électrode de platine poli est recouverte d'un dépôt de protéines réalisé dans des conditions contrôlées. En pratique, le dépôt est réalisé *in situ* par application, pendant environ une minute, d'une série de signaux électrochimiques encadrant le potentiel de détection de l'amine. Les formules des substrats utilisés et les protéines plasmatiques qui ont été dosées électrochimiquement (enzymes, proenzymes, cofacteurs et inhibiteurs) figurent dans le *tableau I*.

Tableau I - Substrats chromogènes utilisés pour le dosage d'activités protéolytiques.

	Substrats
Enzymes (Protéases)	
Thrombine (facteur IIa)	H-D-Phe-pipecolyl-Arg-p-aminodiphénylamine, 2HCl
Facteur Xa	Bz-Ile-Glu(-piperidyl)-Gly-Arg-p-aminodiphénylamine, 2HCl
Facteur XIIa	H-D-Pro-Phe-Arg-p-aminodiphénylamine, 2 HCl
Kallikréine	H-D-Pro-Phe-Arg-p-aminodiphénylamine, 2HCl
Plasmine	H-D-Val-Leu-Lys-Arg-p-aminodiphénylamine, 2 HCl
Proenzymes (de protéases)	
Prékallikréine	H-D-Pro-Phe-Arg-p-aminodiphénylamine, 2HCl
Plasminogène	H-D-Val-Leu-Lys-Arg-p-aminodiphénylamine, 2 HCl
Facteur X	Bz-Ile-Glu(-piperidyl)-Gly-Arg-p-aminodiphénylamine, 2HCl
Facteur XII	H-D-Pro-Phe-Arg-p-aminodiphénylamine, 2 HCl
Inhibiteurs plasmatiques	
Antithrombine III	H-D-Phe-pipecolyl-Arg-p-aminodiphénylamine, 2HCl
2-antiplasmines	H-D-Val-Leu-Lys-Arg-p-aminodiphénylamine, 2 HCl
Héparines	tous

Il convient de noter que les dosages effectués en milieu sang total donnent des concentrations de facteurs inférieures d'environ 45% à celles mesurées dans des échantillons isovolumiques de plasma. Cet écart est dû la présence de l'hématocrite, car les concentrations mesurées par données électrochimiques ne tiennent pas compte du volume mort occupé par les éléments figurés.

4. Comment l'électrochimie induit la formation d'activités protéolytiques

Plusieurs études cliniques relevées dans la bibliographie essentiellement américaine des années 75-85 ont tenté d'expliquer l'hémocompatibilité des matériaux en termes d'interactions électrochimiques [1]. Ainsi, les métaux et alliages apparaissent moins thrombogènes s'ils présentent un potentiel à courant nul spontanément négatif par rapport à l'électrode normale à hydrogène ou s'ils sont polarisés négativement. Ces comportements reposent sur des bases fondamentales explorées, il y a quelques années déjà, par deux équipes françaises [2,3].

4.1. Activation électrochimique de la prothrombine

Dans la coagulation, l'activation de la prothrombine est l'étape réactionnelle qui produit l'enzyme (la thrombine) responsable de la formation du caillot. La transformation de la prothrombine, adsorbée sur une électrode de platine poli, en thrombine n'est possible que pour des valeurs de potentiel d'électrode, comprises entre -0,40 et -0,30 V par rapport à l'électrode normale à hydrogène (ENH) [2]. La production de thrombine excédentaire a été confirmée par deux expériences complémentaires; d'une part, on retrouve la bande

caractéristique de cette protéine après séparation électrophorétique sur gel et d'autre part on observe la production de fibrinopeptides A. Ces fragments sont caractéristiques de la réaction de dégradation du fibrinogène par la thrombine. Les deux protéines résistent assez bien aux polarisations positives lorsqu'elles sont immobilisées sur l'électrode de platine mais sur carbone, l'inactivation de la thrombine est immédiate dès que l'on s'écarte du potentiel en circuit ouvert de l'électrode.

4.2. Activation électrochimique du facteur XII en XIIa

Un autre exemple concerne le facteur XII, une des protéines responsable du déclenchement de l'une des deux voies de la coagulation. Cette protéine circulante du plasma a une forte propension à s'adsorber sur des surfaces chargées négativement. C'est notamment ce qui se produit après lésion de l'épithélium vasculaire et mise à nu des sous-couches de ce tissu. Après adsorption, on observe que la protéine s'active en enzyme (facteur XIIa) au contact de la plupart des matériaux chargés négativement, qu'ils soient solubles (sulfate de dextrane, héparine) ou non (kaolin). Le mécanisme décrit pour cette activation requiert l'hydrolyse d'un seul peptide au niveau d'un résidu arginine de la molécule de FXII. Cependant, il n'est pas clair que l'activation en FXIIa soit le résultat de l'adsorption du FXII sur le support anionique ou qu'elle résulte de l'action d'une autre protéase. Quelle que soit l'hypothèse, la question de l'origine des premières traces de protéase responsables de la coagulation du sang est posée !

Une polarisation négative, appliquée à une surface de carbone sur laquelle du FXII (initialement dépourvu de propriétés enzymatiques) a été préadsorbé, provoque la génération d'une activité enzymatique [3]. Le maximum de cet effet s'observe à $-0,250$ V/ENH. Il décroît asymétriquement de part et d'autre de cette valeur et augmente en fonction du temps d'application du potentiel. L'identité de l'enzyme produite par simple application d'un potentiel négatif avec le facteur XIIa a été établie en utilisant l'enzyme adsorbée comme source de FXIIa dans la mesure d'un temps de céphaline activée (TCA). Cette mesure est un test global classique de coagulation utilisé en analyse biologique.

Conclusions

Ces résultats conduisent à s'interroger sur la spécificité inattendue apportée par l'assistance électrochimique dans l'accomplissement de deux réactions biologiques d'activation enzymatique. En dépit de la complexité moléculaire des protéines concernées, on constate que l'énergie électrochimique disponible à l'électrode permet non seulement de compenser la barrière énergétique nécessaire à la rupture de liaisons peptidiques mais qu'elle rompt les mêmes que

celles impliquées dans les réactions biologiques. L'interprétation que l'on peut donner de cette spécificité relève de la structure des protéines. Il est probable que la propension à la rupture de certaines liaisons peptidiques par le champ électrique est le fait d'une fragilité locale intrinsèque dans la protéine, fragilité qui oriente aussi l'accomplissement de la réaction biologique. A l'effet du champ électrique, il est aussi possible que se conjuguent les propriétés électrocatalytiques de la surface de l'électrode. Cette synergie se concentrerait sur les liaisons peptidiques les plus exposées à l'hydrolyse. Dans cette hypothèse, les propriétés d'adsorption de la protéine et la nature chimique de l'électrode qui supporte certaines fonctions chimiques superficielles, jouent aussi un rôle déterminant.

Hormis l'action du champ électrique, il est important que les conditions physico-chimiques dans lesquelles évoluent les protéines en contact avec l'électrode ne soient pas trop dénaturantes. Pour la plupart des expérimentations décrites ci-dessus, il est intéressant de noter que le comportement des proenzymes ou enzymes a été suivi au sein de l'interface constituée par l'électrode et la protéine soit immobilisée soit en solution. Cette situation a été provoquée, après le préconditionnement in situ de l'électrode pour les dosages électrochimiques avec les substrats électrogènes, où elle s'est spontanément instaurée après l'adsorption de la thrombine sur l'électrode pendant 10 minutes avant sa réaction avec la prothrombine en solution. La présence à la surface de l'électrode d'un environnement protéique plus proche des conditions biologiques est à la fois nécessaire et inévitable. Dans l'étude des molécules complexes d'intérêt biologique par l'électrochimie, il est à prévoir que la notion de surface d'électrode chimiquement contrôlée perde de son sens.

En conclusion, nous avons vu que l'électrochimie est en mesure d'apporter une alternative intéressante dans l'exploration des mécanismes fondamentaux de réactions biologiques aussi complexes que celles de la coagulation du sang. Malgré ses atouts, sa place sur le marché de l'analyse biologique reste encore relativement étroite. Son développement passe par une meilleure perception de ses potentialités par le monde industriel et par une plus grande familiarisation des électrochimistes avec les réactions biologiques.

Références

- [1] P.S. Chopra, S. Srinivasan, T. Lucas, P.N. Sawyer, *Nature*, **1967**, *215*, 1494 ; N. Ramasamy, B.R. Weiss, B. Stanczewski, P.N. Sawyer, *J. Electrochem. Soc.*, **1976**, *123*, 1662 ; P.N. Sawyer, *Biophysical Mechanisms in vascular homeostasis and intravascular thrombosis*, Appleton Century Crofts, New York, **1965**.
- [2] H. Durlat, C. Davet, M. Comtat, *J. Electrochem. Soc.*, **1985**, *132*, 1594.
- [3] S. Longchamp, H.N. Randriamahazaka, J.M. Nigretto, *J. Colloid Int Sci.*, **1994**, *166*, 444 ; E. Corretge, J.M. Nigretto, *Electrochim. Acta*, **1987**, *32*, 583.