



**ROYAUME DU MAROC**  
*Université Mohamed V - Rabat*  
*Faculté de Médecine et de Pharmacie*  
**RABAT**



Année 2021

N° : MM0052021

## MÉMOIRE DE MASTER

MASTER de « **BIOTECHNOLOGIE MÉDICALE** »

OPTION : « **BIOMÉDICALE** »

Intitulé :

### **Évaluation des biomarqueurs de sévérité liés à la COVID-19**

Présenté et soutenu le 17 Février 2022 par :

**ABANI Fatima-Zahra**

Devant le jury :

Pr. <b>OUADGHIRI Mouna</b> , Faculté de Médecine et de Pharmacie de Rabat	<b>Présidente</b>
Pr. <b>BELLAOUI Hicham</b> , Faculté des Sciences de Rabat	<b>Encadrant</b>
Pr. <b>ZAÏD Younes</b> , Hôpital Universitaire International Cheikh Zaid Rabat	<b>Co-Encadrant</b>
Pr. <b>OUMZIL Hicham</b> , Faculté de Médecine et de Pharmacie de Rabat	<b>Examineur</b>

## **Remerciements**

Je saurais gré à toutes les personnes qui ont contribué au succès de mon stage et qui m'ont prêté la main, de loin ou de près, lors de la rédaction de ce mémoire :

Dans un premier temps, je voudrais témoigner toute ma gratitude à tous **mes professeurs du Master Biotechnologie Médicale**, qui ont déployé un double effort et ont fourni tous les outils nécessaires à la réussite de notre formation au cours de ces deux années malgré les conditions sanitaires sans précédentes.

J'aimerais, également, exprimer toute ma reconnaissance à mon Maitre **Pr. IBRAHIMI Azeddine**, directeur du laboratoire de Biotechnologie Médicale de la Faculté de Médecine et de Pharmacie de Rabat, pour l'honneur qu'il nous a fait en contribuant à notre formation, en nous offrant le meilleur modèle des qualités humaines et professionnelles à suivre et surtout en nous fournissant ses orientations et ses judicieux conseils qui ont su alimenter nos réflexions.

Je désire, de même, exprimer mes sincères remerciements à mon encadrant **Pr. BELLAOUI Hicham**, et à mon Co-encadrant **Pr. ZAID Younes** pour avoir eu la patience de répondre à mes innombrables questions, pour le temps qu'ils ont consacré afin de m'apporter les outils indispensables pour la bonne conduite de cette recherche en dépit de leurs grandes occupations, et qui par leurs critiques, orientations, conseils et soutien inestimable m'ont guidé pour mener mon projet de fin d'étude à bon port. Veuillez accepter messieurs l'assurance de mon estime et de mon respect.

J'adresse un grand merci à **Pr. LOUATI Sara**, Professeur à la Faculté de Médecine et de Pharmacie de Rabat pour l'honneur que vous m'avez fait en acceptant de présider le jury de ce Mémoire, et à **Pr. OUMZIL Hicham** qui a bien voulu compter parmi les membres de jury me faisant, par conséquent, le grand honneur. Veuillez trouver ici mes plus vifs remerciements pour le temps que vous avez apporté à la lecture et l'évaluation de ce modeste travail.

À tous ces intervenants, je témoigne ma vive gratitude et mon plus profond respect.

## Dédicaces

J'aimerais profiter de l'occasion pour passer mes dédicaces à plusieurs personnes qui ont participé à différents niveaux pour que mes études soient une expérience enrichissante et motivante.

À **mes chers parents**, je ne pourrais en aucun mot vous exprimer ma réelle reconnaissance pour les sacrifices que vous avez faits pour mon instruction et mon bien être. Merci pour votre présence inconditionnelle, pour votre soutien constant et pour vos encouragements permanents. Je vous aime et j'espère vous combler à mon tour.

À l'âme de **mes grands-parents**.

À **ma sœur, mon frère et mes amis proches**, pour le support continu qu'ils ont su m'apporter tout au long de mon parcours universitaire. Un sincère merci à vous tous pour avoir été présents, votre soutien a su guider mes pas au travers des méandres de mes études universitaires.

## ملخص

تتميز الإصابة بالفيروس التاجي الجديد بألية عمل تؤدي إلى العديد من الظواهر المرضية المسؤولة بدورها عن العديد من المضاعفات التي تؤثر على أعضاء مختلفة والتي يمكن أن تتراوح شدتها من مستوى خفيف إلى مستوى حرج أو مميت.

يعد فهم هذه المضاعفات والتغيرات البيولوجية الناتجة عن الإصابة أمرًا ضروريًا من أجل تحديد الجزيئات الحيوية التي تميز الشكل الحاد لعدوى سارس كوف اثنان ، والتي كانت موضوع الكثير من البحوث العلمية.

وفي نفس السياق ، كان هدف هذه الدراسة تقييم مدى فائدة ثلاثة بروتينات، متموضعة في الصفائح الدموية، كمؤشرات حيوية لحدة الإصابة بمرض كوفيد 19 عند 6 أشخاص 3 منهم مصابون بشدة بفيروس كورونا المستجد و 3 آخرين أصحاء من أجل مقارنة النتائج و إثبات مجاعتها.

من ناحية، قمنا بتقييم مستوى تعبير P-sélectine عند المرضى المصابين بشدة بفيروس كورونا المستجد من خلال تحليل بتقنية *cytométrie en flux* و مقارنة النتائج بنظائرها التي تم الحصول عليها عند المتبرعين الأصحاء. و من ناحية أخرى، قمنا بمقارنة التغيرات التي تتبع الترجمة في PKC $\delta$  و P-VASP عند فئتي المتبرعين المدروسين عن طريق تحليل Western Blot .

**كلمات مفتاحية :** سارس كوف اثنان، كوفيد 19، مؤشرات حيوية، P-sélectine، Cytométrie en flux، PKC $\delta$ ، P-VASP، Western Blot.

## Résumé

L'infection par le nouveau coronavirus est caractérisée par un mécanisme d'action qui déclenche de nombreux phénomènes pathogéniques aboutissant à plusieurs complications qui touchent différents organes et dont la gravité peut aller d'un niveau léger jusqu'à un niveau critique susceptible d'engager le pronostic vital de la personne atteinte.

La compréhension de ces complications et des modifications biologiques qui en résultent est nécessaire afin d'identifier des biomolécules qui marquent la forme sévère de l'infection par le SARS-CoV-2, ce qui a fait l'objet de nombreuses recherches scientifiques.

De même, cette étude avait comme objectif l'évaluation de l'utilité de trois protéines plaquettaires en tant que biomarqueurs de sévérité de la COVID-19 chez 6 sujets : 3 patients développant la forme sévère de la COVID-19 et 3 sujets sains témoins.

D'une part, nous avons apprécié le niveau d'expression de la P-sélectine chez des patients sévèrement infectés par le nouveau coronavirus à travers une analyse en cytométrie de flux et la comparaison du résultat avec celui obtenu chez des sujets sains témoins. Et d'autres parts, nous avons comparé les modifications post-translotionnelles de la PKC $\delta$  et de la P-VASP chez les deux catégories de patients donneurs par une analyse par Western Blot.

**Mots clés :** SARS-CoV-2 ; COVID-19 ; Biomarqueurs de sévérité ; P-sélectine ; Cytométrie de flux ; PKC $\delta$  ; P-VASP ; Western Blot.

## **Abstract**

The infection by the new coronavirus is characterized by a mechanism of action that triggers numerous pathogenic phenomena leading to several complications that affect different organs and whose severity can range from a mild level to a critical level likely to engage the vital prognosis of the affected person.

The comprehension of these complications and the resulting biological changes is necessary, to identify biomolecules that mark the severe form of SARS-CoV-2 infection, which has been the focus of much scientific research.

Similarly, the objective of this study was to evaluate the utility of three platelet proteins as biomarkers of COVID-19 severity in 6 subjects: 3 patients developing the severe form of COVID-19 and 3 healthy control subjects.

On the one hand, we assessed the expression level of P-selectin in patients severely infected with the new coronavirus through flow cytometry analysis and comparison of the result with that obtained in healthy control subjects. And on the other hand, we compared the posttranslational changes in PKC $\delta$  and P-VASP in the two categories of donor patients by Western blot analysis.

**Keywords :** SARS-CoV-2; COVID-19; Biomarkers of severity; P-selectin; Flow cytometry; PKC $\delta$ ; P-VASP; Western blot.

## **Table des matières**

<b>Liste des abréviations .....</b>	<b>1</b>
<b>Liste des tableaux .....</b>	<b>3</b>
<b>Liste des figures .....</b>	<b>4</b>
<b>Introduction .....</b>	<b>5</b>
<b>Chapitre I : Volet Bibliographique .....</b>	<b>6</b>
<b>I. Généralités.....</b>	<b>6</b>
<b>1. Le coronavirus 2 du syndrome respiratoire aigu sévère : SRAS-CoV-2 .....</b>	<b>6</b>
a. Généralités sur les coronavirus.....	6
b. Classification .....	6
c. Structure.....	7
<b>2. La COVID-19 .....</b>	<b>8</b>
a. Définition.....	8
b. Symptômes.....	8
c. Épidémiologie .....	9
<b>II. Les mécanismes d'action du SRAS-CoV-2 .....</b>	<b>9</b>
<b>III. Mécanismes pathogéniques déclenchés par la COVID-19 .....</b>	<b>10</b>
<b>1. Tempête des cytokines .....</b>	<b>10</b>
<b>2. Lymphopénie .....</b>	<b>11</b>
<b>3. Augmentation du nombre des neutrophiles .....</b>	<b>11</b>
<b>4. Réaction inflammatoire exacerbée .....</b>	<b>11</b>
<b>5. Coagulopathies .....</b>	<b>12</b>
<b>6. Production des anticorps .....</b>	<b>12</b>
<b>IV. Complications liées à la COVID-19 .....</b>	<b>12</b>
<b>1. Atteintes pulmonaires et troubles respiratoires .....</b>	<b>12</b>
<b>2. Coagulopathies .....</b>	<b>13</b>
<b>3. Atteintes rénales.....</b>	<b>13</b>
<b>4. Atteintes hépatiques .....</b>	<b>13</b>
<b>5. Atteintes cardiovasculaires.....</b>	<b>13</b>
<b>V. Marqueurs de l'infection au SRAS-CoV-2 et progression sévère de la maladie ....</b>	<b>13</b>
<b>1. Biomarqueurs hématologiques .....</b>	<b>14</b>
<b>2. Biomarqueurs biochimiques .....</b>	<b>15</b>
<b>3. Biomarqueurs inflammatoires .....</b>	<b>15</b>
<b>4. Biomarqueurs de la coagulation .....</b>	<b>15</b>

<b>5. Cas de la P-sélectine .....</b>	<b>16</b>
a. Caractéristiques de la P-sélectine .....	16
b. Implication de la P-sélectine dans certaines maladies humaines .....	18
c. Implication de la P-sélectine dans la sévérité de la COVID-19 .....	19
<b>6. Cas de la protéine kinase C-<math>\delta</math> : PKC<math>\delta</math> .....</b>	<b>19</b>
a. Caractéristiques de la PKC $\delta$ .....	19
b. Rôle de la PKC $\delta$ dans l'activation des plaquettes.....	22
c. Implication de la PKC $\delta$ dans la sévérité de l'atteinte par la COVID-19.....	23
<b>7. Cas de phosphoprotéine stimulée par les vasodilatateurs : VASP .....</b>	<b>24</b>
a. Caractéristiques de la VASP .....	24
b. Protéine VASP et activation plaquettaire .....	27
<b><i>VI. Diagnostic biologique de l'infection au SRAS-CoV-2.....</i></b>	<b><i>27</i></b>
<b>1. Diagnostic direct.....</b>	<b>27</b>
a. Bilan hématologique .....	27
b. Bilan biochimique.....	28
c. Bilan immunitaire.....	28
<b>2. Diagnostic indirect .....</b>	<b>28</b>
a. Tests moléculaires.....	28
b. Tests antigéniques .....	29
c. Tests sérologiques.....	29
<b><i>VII. La cytométrie en flux et la détection du SRAS-CoV-2 .....</i></b>	<b><i>31</i></b>
<b>1. La détection des virus par cytométrie en flux « virométrie en flux » .....</b>	<b>31</b>
a. Marquage à l'aide d'un colorant lipophile fluorescent .....	32
b. Marquage avec des anticorps couplés à des fluorochromes .....	32
c. Marquage avec des nanoparticules magnétiques marquées par immunoglobuline fluorescente (MNP) .....	32
<b>2. Application au SRAS-CoV-2.....</b>	<b>32</b>
<b><i>Chapitre II : Partie expérimentale .....</i></b>	<b><i>35</i></b>
<b><i>I. Objectifs du travail .....</i></b>	<b><i>35</i></b>
<b><i>II. Matériel et méthodes .....</i></b>	<b><i>36</i></b>
<b>1. Phase pré-analytique .....</b>	<b>36</b>
a. Matériel.....	36
b. Solutions et réactifs.....	36
c. Échantillons biologiques.....	37
d. Isolation du plasma riche en plaquette .....	38
<b>2. Phase analytique .....</b>	<b>39</b>
a. Western Blot.....	39
b. Cytométrie en flux.....	45
<b><i>III. Résultats .....</i></b>	<b><i>47</i></b>
<b>1. Western Blot .....</b>	<b>47</b>
a. La PKC $\delta$ .....	47



b. La P-VASP.....	48
<b>2. Cytométrie en flux .....</b>	<b>49</b>
<b><i>Chapitre III : Discussion .....</i></b>	<b><i>50</i></b>
<b><i>Chapitre IV : Conclusion et perspectives .....</i></b>	<b><i>56</i></b>
<b><i>Conclusion.....</i></b>	<b><i>56</i></b>
<b><i>Perspectives .....</i></b>	<b><i>56</i></b>
<b><i>Références .....</i></b>	<b><i>58</i></b>

## Liste des abréviations

- **ACE2** : Enzyme de Conversion de l'Angiotensine 2
- **Ag** : Antigène
- **ALT** : ALanine aminoTransférase
- **APS** : Persulfate d'aluminium
- **AST** : Aspartate aminotransférase
- **AT1R** : Récepteur de l'Angiotensine II de Type 1
- **AT2R** : Récepteur de l'Angiotensine II de Type 2
- **BSA** : Albumine de sérum bovin
- **COVID-19**: CronaVirus Disease appeared in 2019
- **CK** : Créatinine Kinase
- **CRP** : Protéine C Réactive
- **DAG** : Diacylglycérol
- **ddH<sub>2</sub>O** : Double distilled water
- **DENV** : Virus de Dengue
- **ELISA** : Enzyme-Linked Immunosorbent Assay
- **ESR** : Vitesse de Sédimentation des Érythrocytes
- **FAB** : filamentous actin binding
- **FSC** : Forward Scatter
- **GAB** : Globular Actin Binding
- **GB** : Globules Blancs
- **HE**: Hémagglutinine Estérase
- **IgG** : Immunoglobuline classe G
- **IgM** : Immunoglobuline classe M
- **LDH** : Lactate déshydrogénase

- **MNP** : Nanoparticules Magnétiques
- **NK** : cellules Natural Killer
- **NLR** : Rapport Neutrophiles / Lymphocytes
- **OMS** : Organisation Mondiale de la Santé
- **PAR1**: proteases activated receptor 1
- **PAR4**: proteases activated receptor 4
- **PBS** : Solution Saline au Phosphate
- **PCT** : ProCalciTnine
- **PF4** : facteur plaquettaire 4
- **PKC** : Protéines kinases C
- **PKC $\delta$**  : Protéine Kinase C Delta
- **PKH67** : Green fluorescent Cell Linker
- **PNN** : Polynucléaires Neutrophiles
- **PSGL-1**: glycoprotéine ligand-1 de la P-sélectine
- **PT** : Temps de Prothrombine
- **RT-LAMP** : Reverse Transcriptase - Loop-Mediated Isothermal Amplification
- **RT-PCR** : Reverse Transcriptase – Polymerase Chain Reaction
- **SRAS-CoV-2** : Syndrome Respiratoire Aiguë Sévère dû au CoronaVirus 2
- **SDRA** : Syndrome de Détresse Respiratoire Aiguë
- **SRC** : Syndrome de Libération des Cytokines
- **SSC** : Side Scartter
- **VASP** : phosphoprotéine stimulée par les vasodilatateurs
- **VIH** : Virus d'Immunodéficience Humaine

## Liste des tableaux

<i>Tableau 1 : Classification des coronavirus.....</i>	<i>6</i>
<i>Tableau 2 : Anomalies des biomarqueurs chez les patients atteints de la COVID-19.</i>	<i>14</i>
<i>Tableau 3 : principaux domaines structuraux de la PKCδ et leurs fonctions .....</i>	<i>21</i>
<i>Tableau 4 : principaux domaines structuraux de la VASP et leurs fonctions.....</i>	<i>26</i>
<i>Tableau 5 : Composition du tampon HBSS complet.....</i>	<i>36</i>
<i>Tableau 6 : Composition du tampon citrate HBSS .....</i>	<i>37</i>
<i>Tableau 7 : Principaux réactifs et solution utilisés dans le Western Blot .....</i>	<i>40</i>

## Liste des figures

<b>Figure 1</b> : Structure du SRAS-CoV-2 et ses principales composantes .....	<b>7</b>
<b>Figure 2</b> : Les principaux symptômes de la maladie à coronavirus 2019 .....	<b>8</b>
<b>Figure 3</b> : Voie de signalisation ACE2 .....	<b>10</b>
<b>Figure 4</b> : Représentation schématique de la structure des sélectines. (CR: domaine homologue aux protéines régulatrices du complément, E: domaine homologue au facteur de croissance EGF, L: domaine lectinique de type C) .....	<b>17</b>
<b>Figure 5</b> : Cascade d'évènements menant au recrutement des leucocytes .....	<b>18</b>
<b>Figure 6</b> : Différence structurales et enzymatiques entre les trois catégories des protéines kinases C .....	<b>20</b>
<b>Figure 7</b> : Domaines structuraux et sites de phosphorylation sur la PKC $\delta$ . .....	<b>21</b>
<b>Figure 8</b> : Phosphorylation de la PKC $\delta$ et activation des plaquettes .....	<b>24</b>
<b>Figure 9</b> : Représentation schématique d'un monomère de VASP avec ses domaines et fonctions .....	<b>25</b>
<b>Figure 10</b> : les composantes principales d'un cytomètre de flux.....	<b>30</b>
<b>Figure 11</b> : Étapes de préparation des échantillons et de détection du SRAS-CoV-2 par cytométrie en flux .....	<b>33</b>
<b>Figure 12</b> : Principales étapes utilisées pour l'analyse Western Blot des deux protéines : VASP et PKC $\delta$ .....	<b>45</b>
<b>Figure 13</b> : protocole utilisé pour l'analyse de la P-sélectine par cytométrie en flux.....	<b>47</b>
<b>Figure 14</b> : Les niveaux de phosphorylation de la PKC $\delta$ sur deux sites différents (Tyr311 et Thr505) chez des patients ayant la COVID-19 sévères et chez des patients sains obtenus par analyse Western Blot. ....	<b>47</b>
<b>Figure 15</b> : Les niveaux de phosphorylation de la P-VASP sur le site Ser157 chez des patients ayant la COVID-19 sévères et chez des patients sains obtenus par analyse Western Blot.....	<b>48</b>
<b>Figure 16</b> : Comparaison des niveaux d'expression de la P-sélectine chez des patients COVID-19 et chez des donneurs sains. ....	<b>49</b>

## Introduction

La pandémie COVID-19 a infiltré plus de 220 pays dans le monde entier, et touché plus de 264 millions de personnes [1]. Le diagnostic de ces personnes atteintes et leur stratification selon la gravité de la maladie a nécessité l'examen de différents biomarqueurs afin d'apprécier s'ils permettent l'évaluation des résultats cliniques et leur corrélation avec la gravité de la maladie [1].

Nombreuses recherches scientifiques ont été menées sur l'évaluation des biomarqueurs suivants : protéine C-réactive, amyloïde sérique A, interleukine-6, lactate déshydrogénase, rapport neutrophiles / lymphocytes, D-dimères, troponine cardiaque, biomarqueurs rénaux, lymphocytes et numération plaquettaire [1]. Toutes ces études ont comme objectif commun la découverte de biomarqueurs fiables permettant la catégorisation immédiate des patients en groupe à risque après le diagnostic permettant, de ce fait, le dépistage, la prise en charge clinique et la prévention des complications graves via un traitement précoce approprié pour chaque groupe de patients [2].

En plus des biomarqueurs utilisés pour diagnostiquer l'infection par le SARS-CoV-2, de nouveaux biomarqueurs sont nécessaires afin de mettre en évidence les patients qui pourront avoir une évolution de la maladie vers des complications graves, voire mortelles [2]. Ces marqueurs biologiques permettent, désormais, la classification des patients en patients légers, sévères et critiques et, donc, l'intervention thérapeutique pourra être suffisamment précoce pour éviter l'installation des complications graves [1].

Dans ce travail nous allons apprécier le niveau de gravité de l'infection en se basant sur l'étude des modifications post-translationnelles de la PKC $\delta$  et de la VASP et sur l'évaluation des niveaux d'expression de la P-sélectine chez les différents patients étudiés.

## Chapitre I : Volet Bibliographique

---

### I. Généralités

La pandémie actuelle, COVID-19, est une nouvelle maladie respiratoire engendrée par le coronavirus 2 du syndrome respiratoire aigu sévère, un nouveau virus qui a émergé de la Chine à la fin Décembre 2019, et s'est étendu vers la majorité des pays du monde engendrant des répercussions sanitaires et socio-économiques sans précédentes, raison qui a poussé l'OMS à le déclarer en tant qu'urgence de santé publique à portée internationale en 11 Mars 2020 [3] [4].

#### 1. Le coronavirus 2 du syndrome respiratoire aigu sévère : SRAS-CoV-2

##### a. Généralités sur les coronavirus

Les CoV correspondent en abrégé à un groupe de virus sphériques, hautement enveloppés et caractérisés par un taux de mutation élevé ce qui est à l'origine de leur fort pouvoir infectieux [5], ce type de virus est connu pour infecter à la fois la faune et l'Homme en attaquant leurs systèmes respiratoire, gastro-intestinal, hépatique et neurologique, induisant chez eux une maladie dont la gravité peut aller d'un état asymptomatique jusqu'à des syndromes respiratoires aigus sévères nécessitant une hospitalisation dans des unités de soins intensifs [6].

##### b. Classification

Tableau 1 : Classification des coronavirus

Type	Virus
Ordre	Nidovirales
Sous-ordre	Coronavirinae
Famille	Coronaviridae
Sous-famille	Orthocoronavirinae
Genres	$\alpha$ -coronavirus

	<ul style="list-style-type: none"> <li>• HCoV-229E</li> <li>• HCoV-NL63</li> </ul> <p><b>β-coronavirus</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• HCoV-EC43</li> <li>• HCoV-HKU1</li> <li>• SARS-CoV</li> <li>• MERS-CoV</li> </ul>
--	---

### c. Structure

Les coronavirus sont des particules de forme sphérique ou pléomorphes, enveloppés, mesurant entre 60 et 220 nm [7]. Sur la membrane virale, plusieurs protéines de pointe S (Spike) forment des péplomères surfaciques fournissant au virion une morphologie ressemblant à une couronne à la microscopie électronique d'où dérive la nomination « corona » [8].

À l'intérieur du virus se situe une nucléocapside de forme hélicoïdale formée de la protéine nucléocapsidique N complexée à un ARN monocaténaire d'environ 29 kb de longueur [8]. Les protéines M et E sont également présentes sur la membrane virale et participent dans l'assemblage des virus sous forme sphérique [6].

La protéine hémagglutinine estérase (HE) est une caractéristique des virus appartenant au genre β-coronavirus, présente sur la surface virale et semble être impliquée dans l'entrée du virion dans la cellule hôte [7].

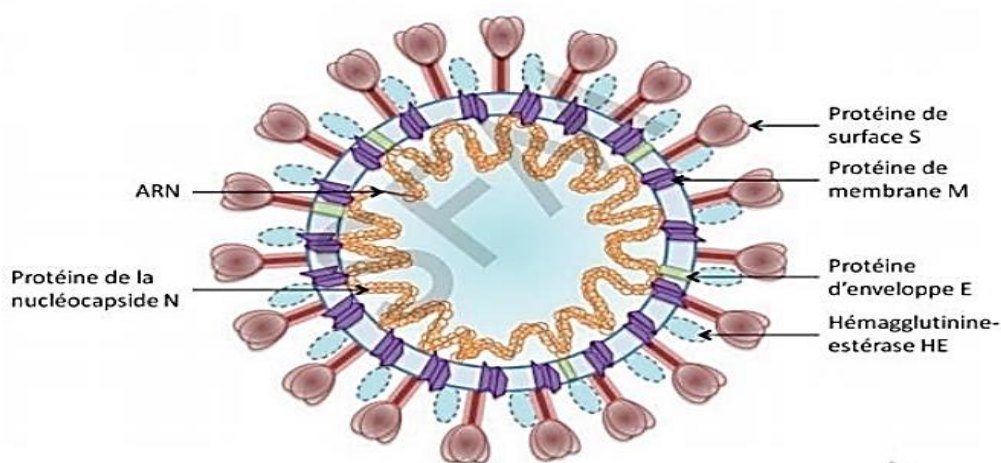


Figure 1 : Structure du SRAS-CoV-2 et ses principales composantes [9]



## 2. La COVID-19

### a. Définition

La maladie à coronavirus 2019 (COVID-19) est une maladie contagieuse pouvant se propager d'une personne à une autre par voie aérienne et qui a été identifiée lors d'une enquête sur l'épidémie apparue à Wuhan, en Chine en Décembre 2019 et s'est propagé rapidement vers les autres pays du monde pour devenir, par la suite, une pandémie mondiale [10].

### b. Symptômes

La COVID-19 provoquée par l'infection au SRAS-CoV-2 se traduit chez l'Homme par divers symptômes dont certains sont présents chez presque toutes les personnes atteintes, certains d'autres sont moins courants et d'autres sont caractéristiques de la forme grave de la maladie [11]. Les symptômes les plus fréquents sont les suivants : fièvre, toux sèche, essoufflement, fatigue, perte du goût et de l'odorat, congestion nasale, mal de gorge, maux de tête, douleurs musculaires, nausées et vomissements, diarrhée, vertiges et frissons [12].

D'autres symptômes, moins fréquents, peuvent se manifester chez certains cas, à savoir, une perte d'appétit, une hyperthermie, anxiété, courbatures, troubles de conscience et pneumonie [11].

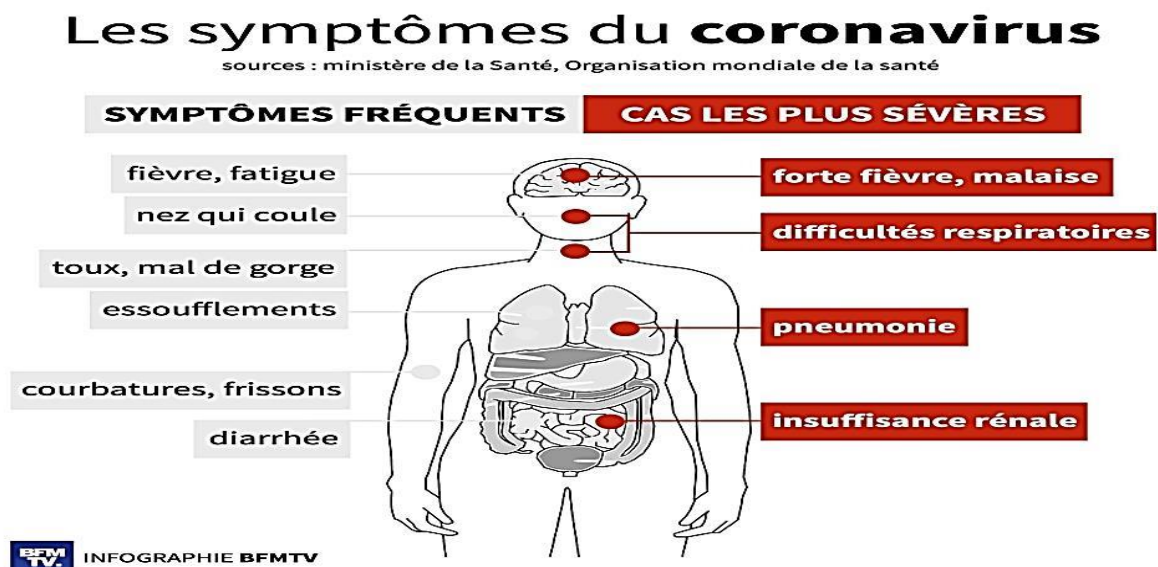


Figure 2 : Les principaux symptômes de la maladie à coronavirus 2019 [13]

### c. Épidémiologie

Depuis sa découverte dans la province de Hubei en Chine en 2019, le SARS-CoV-2, responsable de la maladie à coronavirus, baptisée COVID-19, s'est propagé rapidement dans plus de 220 pays sur les 5 continents du monde. Ce virus a touché, jusqu'à la date de 02 décembre 2021, 263 510 704 personnes dont plus de 5 224 655 ont été décédés [14].

Le premier cas de COVID-19 a été enregistré au Maroc en date de 02 Mars 2020 et il s'agissait d'un Marocain résidant en Italie. Grâce à sa grande vigilance, le Maroc a pu réagir efficacement à travers un verrouillage total du pays et une déclaration d'un état d'urgence dans l'ordre de contenir la propagation de la maladie [15] [16].

En date de 02 décembre 2021, 950 000 cas infectés au SARS-CoV-2 sont confirmés au Maroc dont 14.779 en sont décédés [17].

## II. Les mécanismes d'action du SRAS-CoV-2

Dans l'ordre d'identifier des biomarqueurs prédictifs de complications graves ou de décès associés à l'infection au SRAS-CoV-2, il faudrait, tout d'abord, connaître les mécanismes moléculaires liés aux lésions virales sur les cellules humaines [2].

Le principal mécanisme d'infection par le SRAS-CoV-2 est la formation d'une liaison de haute affinité entre la protéine de pointe de coronavirus (S) et la forme membranaire de l'enzyme de conversion de l'angiotensine 2 (ACE2) [18], et l'internalisation du complexe par la cellule hôte via le traitement de la protéine S par la sérine protéase 2 transmembranaire (TMPRSS2) [2].

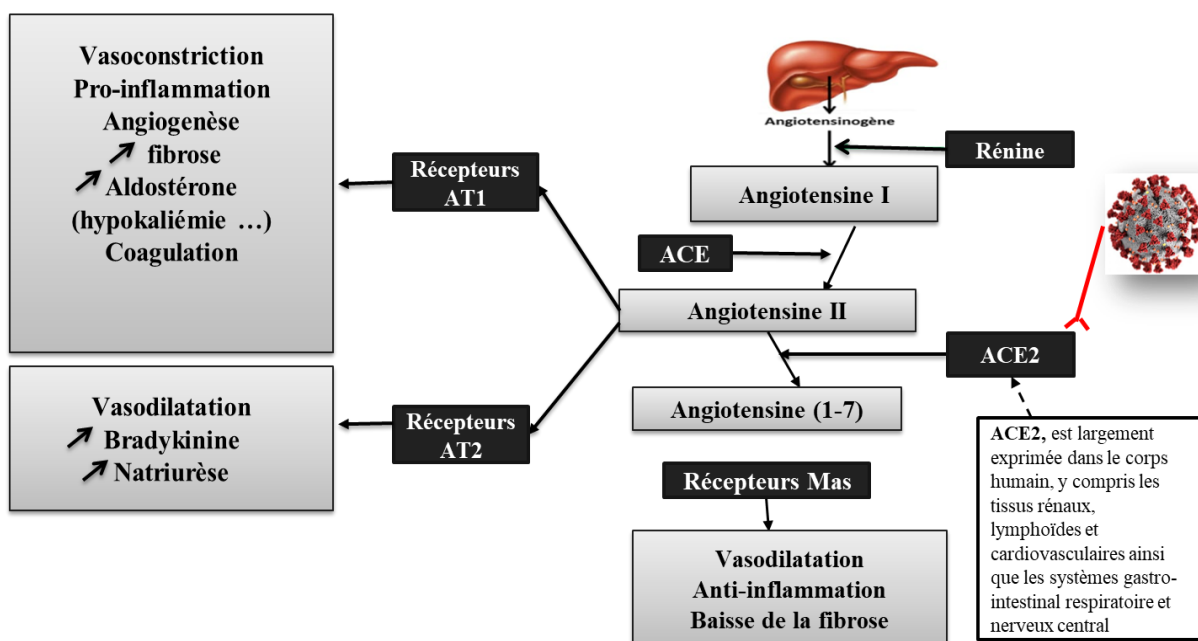
En effet, L'angiotensine I générée par le clivage de la rénine est convertie par l'enzyme de conversion de l'angiotensine ACE pour produire de l'Ang II [19]. Cette dernière, à son tour, va se lier à différents types de récepteurs : le récepteur de l'angiotensine II de type 1 (AT1R), le récepteur de l'angiotensine II de type 2 (AT2R) et l'ACE2 [19].

- **Le complexe Ang-II-AT1R** contribue à l'augmentation de la pression artérielle et de l'équilibre hydrique, à la vasoconstriction, au stress oxydatif et à la signalisation pro-inflammatoire [19].
- **Le complexe Ang-II-AT2R** entraîne une vasodilatation et une augmentation de la **bradykinine** (*une hormone peptidique qui agit sur les muscles lisses, qui dilate les vaisseaux sanguins et qui augmente la perméabilité des capillaires*) et de la

**natriurèse** (la concentration en sodium (Na) des urines pour une diurèse donnée) [19].

→ **Le complexe Ang-II-ACE2** aboutit au clivage de l'Ang-II en Ang (1-7), cette dernière se lie aux récepteurs de types MasR et favorise les effets anti-inflammatoires, vasodilatation et anti-fibrotiques [18].

Étant donné que le SRAS-CoV-2 prend la place de l'ANG II et se fixe à l'ACE2, il devrait entraîner une réduction de la production d'Ang (1-7) et une accumulation d'Ang-II qui induit donc une vasoconstriction en excès, une exacerbation de l'inflammation et, également, une hypercoagulation [18].



**Figure 3 : Voie de signalisation ACE2 [20]**

### III. Mécanismes pathogéniques déclenchés par la COVID-19

Après son entrée dans le corps humain, le SRAS-CoV-2 déclenche un ensemble de mécanismes pathogéniques [18], notamment des cascades inflammatoires, des tempêtes de cytokines et une activation des cascades de coagulation [2].

#### 1. Tempête des cytokines

Une réponse immunitaire hyperactive qui se traduit par une augmentation systémique excessive des cytokines pro-inflammatoires en réponse à l'infection par le SRAS-CoV-2, génère ce qu'on appelle syndrome de libération des cytokines (SRC), également appelé

«tempête de cytokines», y compris l'**IL-6**, l'**IL-10**, le facteur de nécrose tumorale  $\alpha$  (**TNF- $\alpha$** ) et l'**IFN- $\gamma$**  [19].

## 2. Lymphopénie

L'expression du récepteur ACE2 sur les lymphocytes, en particulier sur les cellules T, favorise l'entrée du SRAS-CoV-2 dans les lymphocytes ce qui est une caractéristique clé de la pathogenèse médiée par ce virus [18]. De plus, le récepteur ACE2 est exprimé également sur la surface des organes lymphatiques, notamment la rate et les ganglions lymphatiques, ce qui favorise l'entrée du nouveau coronavirus dans ces organes induisant davantage l'épuisement des lymphocytes [18].

En outre, une augmentation du taux de **l'acide lactique** a été détectée dans le sang des patients atteints de la COVID-19 sévère, ce qui peut inhiber la prolifération des lymphocytes [18].

## 3. Augmentation du nombre des neutrophiles

Ce symptôme est étroitement associé à la lymphopénie. En effet, une infection par des microbes peut induire directement le recrutement des neutrophiles vers les sites tissulaires. Par conséquent, les lymphocytes altérés chez les patients atteints de la COVID-19 peuvent facilement conduire à une infection par des microbes, favorisant ainsi l'activation et le recrutement des neutrophiles dans le sang des patients [21].

Les neutrophiles et le rapport **neutrophiles / lymphocytes** sont, généralement, des indicateurs importants des cas graves [21].

## 4. Réaction inflammatoire exacerbée

Comme il est susmentionné, l'infection au SRAS-CoV-2 aboutit à une augmentation de l'angiotensine II ce qui est à l'origine d'un taux élevé des complexes Ang-II-AT1R formés [18]. Ces derniers sont responsables du recrutement d'un grand nombre de cellules immunitaires par des molécules d'adhésion. Ces cellules activées vont à leur tour libérer des **molécules pro-inflammatoires** en excès et donc une réaction inflammatoire exagérée va se mettre en place [21].

## 5. Coagulopathies

Suite à la lymphopénie, l'élévation du **lactate déshydrogénase** et la libération des marqueurs d'inflammation tels que l'**IL-6**, la **ferritine** et la **CRP**, les facteurs de coagulation (comme les **D-dimères**, les **plaquettes**, les **anticoagulants circulants** et la **fibrinogène**) commencent à s'activer automatiquement permettant la formation excessive des thrombus qui sont à l'origine d'une hypercoagulation [22]. En effet, des études ont montré que l'injection du sang des patients atteints de la COVID-19, et présentant une tempête de cytokines, chez des personnes saines entraîne la libération du facteur tissulaire TF (principal responsable de l'activation des cascades de la coagulation) et donc une activation plaquettaire massive qui, elle-même, donnera naissance à l'hypercoagulation [23].

Ainsi, la sévérité d'une infection au SRAS-CoV2 peut être expliquée par diverses coagulopathies responsables d'une augmentation significative du risque de décès [22].

## 6. Production des anticorps

Tandis que la réponse humorale à la COVID-19 est faible chez certains patients, à l'inverse elle peut être très forte chez d'autres. En effet, une infection par le SRAS-CoV-2 permet de déclencher la production des anticorps neutralisants le virus. Ces anticorps faisaient l'objet du travail de plusieurs laboratoires d'immunologie afin d'isoler les anticorps monoclonaux thérapeutiques les plus neutralisants qui auraient pu contribuer au développement d'un vaccin [18].

## IV. Complications liées à la COVID-19

Tous les mécanismes pathogéniques déclenchés par l'infection au SRAS-CoV-2 peuvent être à l'origine de nombreuses complications de gravité légère à critique, atteignant divers organes selon la sévérité de l'atteinte chez chaque patient [24].

Parmi les complications entraînées par la maladie au nouveau coronavirus, on trouve :

### 1. Atteintes pulmonaires et troubles respiratoires

Le SRAS-CoV-2 peut infecter les pneumocytes qui expriment l'ACE2 et provoque, de ce fait, une réaction inflammatoire se traduisant par une détresse respiratoire de gravité variable. Dans les cas les plus graves, elle aboutit à un SDRA qui présente la cause la plus fréquente de mortalité chez les personnes ayant la COVID-19 [21].

L'analyse histologique des poumons infectés a permis la détection des lésions d'œdème pulmonaire évocatrices de SDRA et des microthrombus pulmonaires diffuses [18].

## 2. Coagulopathies

L'infection par le SRAS-CoV-2 est caractérisée par un allongement du taux de prothrombine, une thrombopénie, des taux élevés de D-dimères, du fibrinogène du facteur VIII et du facteur de Van Willebrand [22]. D'autres études ont détecté chez des personnes malades des taux circulants élevés du facteur plaquettaire 4 (PF4), de la thrombopoéïtine (TPO) et de la P-sélectine soluble (sP-sélectine) [25].

## 3. Atteintes rénales

La liaison du nouveau coronavirus aux ACE2 exprimés dans, presque, tous les segments tubulaires des reins, a pour conséquences une hématurie et une protéinurie dans les cas les plus fréquents, et dans très peu de cas cette liaison peut donner lieu à une insuffisance rénale aiguë [18].

## 4. Atteintes hépatiques

L'expression de l'ACE2 au niveau des voies biliaires évoque la présence des atteintes hépatiques par le SRAS-CoV-2. Ainsi, les analyses histologiques montraient des foies de très grande taille, œdématiés et infiltrés par des cellules inflammatoires [7].

## 5. Atteintes cardiovasculaires

L'ACE2 est exprimée par plusieurs cellules myocardiques ce qui explique le grand nombre des cas de myocardite qui ont été rapportés à la maladie au nouveau coronavirus [18].

## **V. Marqueurs de l'infection au SRAS-CoV-2 et progression sévère de la maladie**

La compréhension des mécanismes pathogéniques liés à la maladie au nouveau coronavirus a permis la détection de nombreux biomarqueurs [26]. Ces derniers jouent un rôle clé dans la prédiction de l'infection au SRAS-CoV-2 et, pareillement, dans la classification des patients atteints dans des groupe à risque allant d'une affection légère, grave, sévère jusqu'à une affection critique [27]. Cette stratification des patients aident les cliniciens à mieux choisir les démarches thérapeutiques à suivre pour chaque personne afin de pouvoir éviter des complications graves ou mortelles qui peuvent se mettre en place [2].

L'ensemble des complications, entraînées par la maladie de COVID-19, a permis de mettre en évidence un ensemble de biomarqueurs hématologiques, biochimiques, inflammatoires et immunitaires permettant le diagnostic précoce et l'identification des patients gravement malades [2].

**Tableau 2 : Anomalies des biomarqueurs chez les patients atteints de la COVID-19.**

<b>Biomarqueurs hématologiques</b>	<b>Biomarqueurs biochimiques</b>	<b>Biomarqueurs de coagulation</b>	<b>Biomarqueurs inflammatoires</b>
Nombre de GB	Bilirubine totale	TP	ESR
Nombre de PNN	Urée sanguine	D-dimères	CRP
Numération lymphocytaire	CK	Fibrinogène	Ferritine sérique
Numération plaquettaire	LDH		PCT
Numération des éosinophiles	Troponine cardiaque		IL-2, IL-6, IL-8 et IL-10
Nombre des NK	Myoglobine		
NLR	Albumine		
	Créatinine		

### 1. Biomarqueurs hématologiques

Chez environ 80% des patients atteints de la COVID-19 et gravement malades, une **lymphopénie** a été détectée ce qui justifie sa corrélation à la gravité de l'infection [28]. Ainsi, les analyses qui ont porté sur les marqueurs de dérégulation de la réponse immunitaire, chez les cas graves, ont montré une augmentation du **nombre des leucocytes et des neutrophiles** [2]. En outre, le **nombre des éosinophiles** a été positivement corrélé au nombre des lymphocytes [2].

D'ailleurs, l'augmentation du **NLR** est expliquée par l'augmentation aberrante des **neutrophiles** et par la régulation positive des gènes impliqués dans la mort des lymphocytes induit par le mécanisme d'infection du nouveau coronavirus [21].

Au surplus, la **numération plaquettaire**, étant un biomarqueur bon marché et disponible au sein des laboratoires, il est le marqueur le plus utilisé. Généralement, la **thrombopénie** est associée à un risque 5 fois plus élevé chez les patients atteints de la COVID-19 [22].

## 2. Biomarqueurs biochimiques

Plusieurs études qui ont été menées sur des patients atteints du SRAS-CoV-2 et comparant les différents groupes de risque, ont montré une élévation significative de la **bilirubine totale**, de la **CK**, de **LDH** et de la **troponine cardiaque** [2]. De même, l'augmentation des enzymes hépatiques, **ALT** et **AST**, est mise en évidence chez les patients non-survivants et associée à des changements graves de la fonction rénale (augmentation de l'**azote uréique** et de la **créatinine**) [2].

## 3. Biomarqueurs inflammatoires

L'affection à la COVID-19 entraîne l'activation de la production écrasante des cytokines, notamment l'**IL-6**. L'augmentation de ce dernier est responsable de l'induction de la **CRP** dont l'élévation est directement associée à l'augmentation de la sévérité de la maladie [1].

Outre, chez les patients atteints de la COVID-19 compliquée, la concentration de l'**IL-6** était 2,9 fois supérieures à celle chez les patients légèrement malades ce qui permet de conclure qu'une augmentation proportionnelle de l'**IL-6** est corrélée à la gravité de la maladie [1]. De même pour la **ferritine** sérique et la **PCT** [2].

## 4. Biomarqueurs de la coagulation

La plupart des cas graves de la maladie à nouveau coronavirus est caractérisée par une élévation des **D-dimères** au-delà de 3g/L, cette augmentation est fortement associée à la sévérité de l'infection avec un risque plus important de recours à la ventilation mécanique ou de décès [22]. De plus, un seuil de 8g/L du **fibrinogène** est associé à un risque élevé d'accidents thromboemboliques dans la maladie à la COVID-19 induisant, en conséquence, l'augmentation de la fréquence du décès [22].

Ainsi, dans de nombreuses études à grande échelle, la **PT** prolongée s'est avérée corrélée à la sévérité de l'affection au SRAS-CoV-2 en raison de son augmentation importante chez la plupart des patients qui n'ont pas pu survivre [2].



## 5. Cas de la P-sélectine

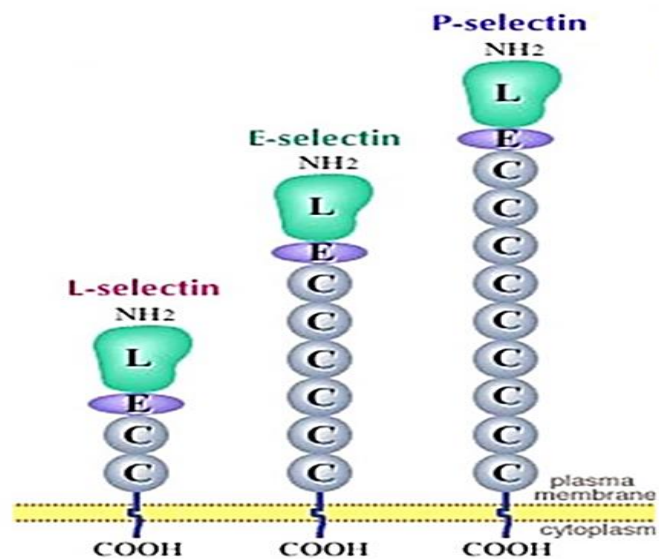
### a. Caractéristiques de la P-sélectine

#### ⇒ Définition

La famille des sélectines est connue pour médier l'adhérence des cellules immunitaires à l'endothélium leur permettant, de ce fait, de pénétrer dans les sites d'inflammations. Cette famille est composée, généralement de trois protéines dont les noms sont fonction de leurs sites d'expression, la L-sélectine exprimée sur les leucocytes, l'E-sélectine exprimée sur les cellules endothéliales et la P-sélectine exprimée sur les plaquettes à raison de 10 000 molécules par plaquette et sur les cellules endothéliales activées avec des quantités plus faibles [29]. La P-sélectine est connue, également, sous le nom de **padgem**, **Gmp-140** et **Cd62p**, caractérisée par un poids moléculaire de 140 kDa et formé de 768 acides aminés [30]. Seule la P-sélectine fera objet de notre étude.

#### ⇒ Structure

Les sélectines sont composées de trois domaines : un domaine intracellulaire, un domaine transmembranaire et un domaine extracellulaire [31]. Ce dernier est, lui-même, formé d'un domaine homologue au facteur de croissance EGF (Epidermal Growth Factor), des domaines structuraux répétés nommés CR et sont des domaines homologues aux protéines régulatrices du complément et d'un domaine externe de type lectine à l'extrémité N-terminal [30].



**Figure 4 : Représentation schématique de la structure des sélectines. (CR: domaine homologue aux protéines régulatrices du complément, E: domaine homologue au facteur de croissance EGF, L: domaine lectinique de type C) [32].**

L'épissage alternatif donne lieu à deux formes de P-sélectine, une forme membranaire possédant un domaine transmembranaire et une forme soluble dépourvue de ce domaine [30].

#### ⇒ Expression

La P-sélectine est une protéine transmembranaire exprimée de façon constante sur les mégacaryocytes et les cellules endothéliales et codée par un gène nommé SELP, situé sur le chromosome 1q21-q24 et qui s'étend sur plus de 50 kb formant 17 exons [33].

L'expression de la P-sélectine est induite par deux mécanismes différents. En effet, les précurseurs plaquettaires et les cellules endothéliales produisent la P-sélectine et la déposent au niveau des granules alpha dans les plaquettes et au niveau des corps de Weibel-Palade dans les cellules endothéliales ; lorsqu'un stimulus, tels que la thrombine et le TNF, entraîne l'activation d'une cellule, la p-sélectine sera transloquée, rapidement à sa membrane plasmique sans aucune nécessité d'une transcription ou d'une traduction. Cependant, cette augmentation de l'expression de la P-sélectine ne dure pas longtemps, parce que cette protéine est rapidement internalisée et recyclée à l'intérieur des cellules [33].

#### ⇒ Ligand : PSGL-1

La P-sélectine est capable de se lier à l'héparane sulfate et aux fucoïdanes, mais son ligand principal est la PSGL-1, appelé également cluster de différenciation 162 (CD162) est une glycoprotéine homodimérique de type mucine à liaison disulfure exprimée sur, pratiquement, tous les leucocytes, jouant un rôle essentiel dans l'adhésion cellulaire et présente une très haute affinité pour la P-sélectine [34].

#### ⇒ Fonction

La P-sélectine a une fonction principale dans la fixation initiale et le roulement des plaquettes et des cellules endothéliales vers les organes et les tissus blessés ou enflammés. En effet, la stimulation des cellules endothéliales ou des plaquettes par des médiateurs inflammatoires, tels que l'IL-1 et la thrombine, déclenche la synthèse de la P-sélectine dont le principal ligand est la glycoprotéine ligand-1 de la P-sélectine (PSGL-1) exprimée sur les leucocytes comme il est susmentionné [29]. De ce fait, l'interaction P-sélectine-PSGL-1 se

traduit par le roulement des leucocytes et des plaquettes sur la surface des cellules endothéliales suivi par une adhérence et une émigration de ces cellules vers le tissu infecté, donc l'activité plaquettaire et leucocytaire deviennent étonnamment similaires [34]. Cette interaction pourra être traduite, également, par une hyperactivation des plaquettes entraînant des dysfonctionnements au niveau des cascades de la coagulation [35].

La cascade du roulement, adhérence et transmigration des leucocytes vers les tissus enflammés, s'effectue selon les quatre étapes successives, les deux premières étapes sont essentiellement dépendantes des sélectines et les deux dernières étapes sont dépendantes des intégrines [36] :

- ◆ Capture : étape transitoire et réversible ;
- ◆ Roulement des leucocytes sur la surface endothéliale ;
- ◆ Activation des leucocytes dépendamment des chimiokines suivie de l'adhérence à la surface endothéliale contrôlée par les intégrines ;
- ◆ Diapédèse : transmigration des leucocytes à travers des cellules du tissu endothélium.

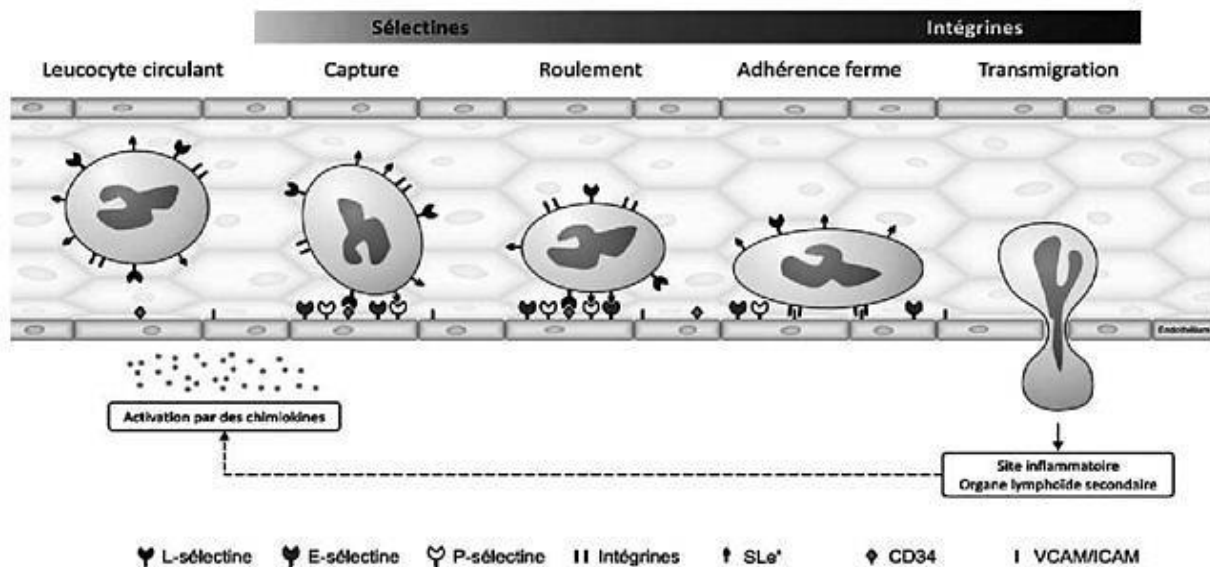


Figure 5 : Cascade d'évènements menant au recrutement des leucocytes [32]

### b. Implication de la P-sélectine dans certaines maladies humaines

De nombreuses études ont prouvé l'implication de la P-sélectine dans plusieurs maladies humaines via la présence de taux élevés de cette protéine dans le plasma des patients. En effet, les interactions cellule-cellule, responsables des crises de vaso-occlusion et

de douleur drépanocytaire, sont favorisées et régulées positivement par la P-sélectine [37]. Ainsi, des taux élevés de la P-sélectine ont été enregistrés chez des patients atteints de maladies cardiovasculaires aiguës et chroniques à savoir les maladies artérielles périphériques, les maladies coronariennes, l'hypertension et l'infarctus aigu du myocarde [38]. De même, l'implication de la P-sélectine dans l'athérosclérose et dans l'hypercholestérolémie a été confirmée [39].

### **c. Implication de la P-sélectine dans la sévérité de la COVID-19**

L'infection au SRAS-CoV-2 induit, chez les patients atteints, un syndrome de détresse respiratoire caractérisé par une mortalité élevée. Ce syndrome est très hétérogène car plusieurs agents sont impliqués dans son développement, notamment la **P-sélectine** qui intervient dans le recrutement des leucocytes au niveau des poumons pendant le SDRA suite à l'infection à la COVID-19 [40].

En effet, une étude a utilisé des anticorps monoclonaux contre la P-sélectine chez des personnes ayant la maladie au nouveau coronavirus. Cette expérience a permis de réduire les lésions pulmonaires chez ces patients [40].

**Donc, une inhibition du recrutement des leucocytes, médié par la P-sélectine, pourrait-elle réduire l'acuité du SDRA et, de ce fait, limiter la progression grave de la COVID-19 ?**

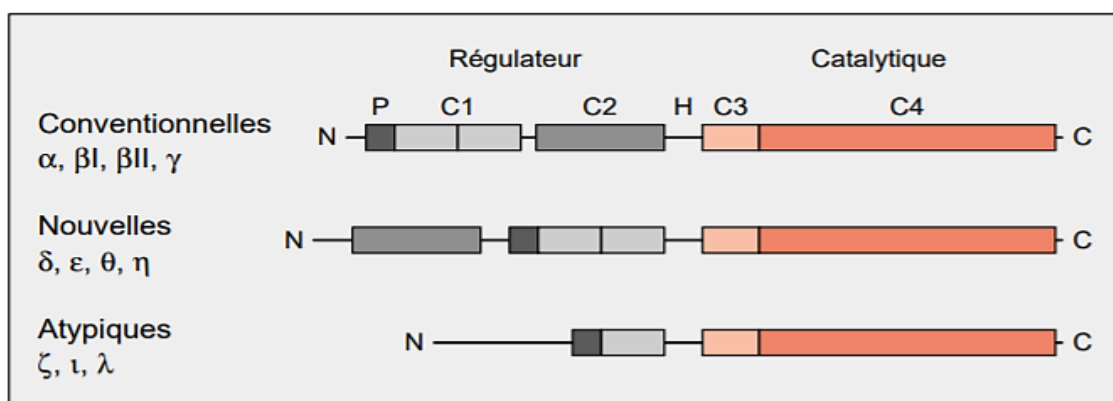
## **6. Cas de la protéine kinase C- $\delta$ : PKC $\delta$**

### **a. Caractéristiques de la PKC $\delta$**

⇒ Famille des PKCs

Les kinases C sont des protéines exprimées ubiquitairement dans tous les tissus de l'organisme et qui, à l'état inactif, sont situées au niveau du cytosol. Cette famille regroupe un ensemble de 11 isoenzymes caractérisés par leur capacité de se lier à des phospholipides et qui jouent un rôle primordial au cours de la vie cellulaire, en particulier lors de la prolifération et de la différenciation des cellules [41]. Les enzymes de cette famille peuvent être subdivisés en 3 catégories en se basant sur de nombreuses différences structurales et enzymatiques, notamment, leurs localisations, leur réseau d'expression tissulaire, leur distribution, leurs cofacteurs et leurs substrats [42] :

- ◆ **Les PKC conventionnelles ou classiques**, baptisées en (**cPKCs**), comprend les isoformes  $\alpha$ ,  $\beta I$ ,  $\beta II$  et  $\gamma$ , activées sous l'action du diacylglycérol et caractérisées par leur dépendance du  $Ca^{2+}$  [41].
- ◆ **Les PKCs nouvelles**, baptisées en (**nPKCs**), comprend les isoformes  $\delta$ ,  $\epsilon$ ,  $\theta$  et  $\eta$ , il s'agit de protéines  $Ca^{2+}$  - indépendantes qui s'activent par le diacylglycérol [43] [44].
- ◆ **Les PKCs atypiques**, baptisées en (**aPKCs**), comprend les isoformes  $\zeta$ ,  $\iota$  et  $\lambda$ , sont aussi des protéines  $Ca^{2+}$  - dépendantes mais non réactives au diacylglycérol [43] [44].



**Figure 6 : Différence structurales et enzymatiques entre les trois catégories des protéines kinases C [41].**

⇒ Définition : PKC $\delta$

La PKC $\delta$  est la première nouvelle isoforme de la PKC qui a été identifiée en 1986 en se basant sur l'homologie des séquences nucléotidiques de cette protéine avec celles des protéines isoformes conventionnelles, il s'agit d'une protéine  $Ca^{2+}$  - indépendante qui est activée par le diacylglycérol issu de l'hydrolyse de l'inositol membranaire, et également par l'ester de phorbol suite à leur liaison à la région C1 du domaine régulateur de cette protéine [45]. Cette protéine peut être clivée par la caspase donnant naissance à un fragment catalytique qui se convertit en une forme active suite à une phosphorylation de tyrosine [41].

La PKC $\delta$  est connue pour son implication dans de nombreuses voies de signalisation cellulaires, notamment, la prolifération cellulaire, l'apoptose, l'inflammation et le stress oxydatif [46].

## ⇒ Structure

La PKC $\delta$  est une protéine caractérisée par un poids moléculaire de 78 kDa et par l'existence de deux domaines principaux : domaine catalytique et domaine régulateur liés entre eux par une région charnière [47]. Le domaine catalytique C-terminal est constitué de 2 motifs conservés C3 et C4 responsables de l'activité enzymatique de la protéine en permettant la formation de la liaison ATP/substrat [44] ; deux autres motifs C1 et C2 sont situés au niveau du domaine régulateur N-terminal, responsable de la liaison des cofacteurs de l'enzyme, précédés par une région auto-inhibitrice, formée d'une courte séquence d'acides aminés, nommée pseudosubstrat bloquant l'accès du substrat au domaine catalytique et inhibant la fixation de la PKC $\delta$  à la membrane cellulaire. En revanche, le C1 permet la liaison au DAG ce qui favorise la translocation de la PKC $\delta$  aux membranes [43]. La PKC $\delta$  contient également cinq régions variables (V). La région variable 3 (V3), appelée région charnière, qui sépare les domaines catalytique et régulateur [48].

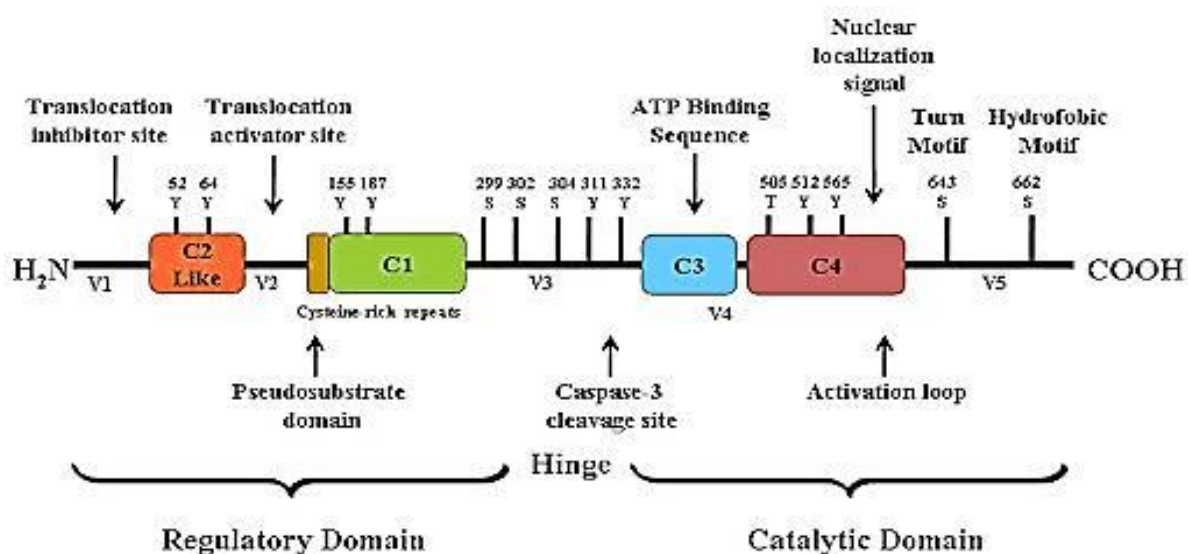


Figure 7 : Domaines structuraux et sites de phosphorylation sur la PKC $\delta$ . [47]

### ◆ Domaines importants de la PKC $\delta$

Tableau 3 : principaux domaines structuraux de la PKC $\delta$  et leurs fonctions

Domaine	Fonction
Inhibiteur de translocation de PKC $\delta$	Empêche la translocation de la protéine vers la membrane cellulaire [49]
Activateur de translocation de PKC $\delta$	Favorise la liaison de la protéine avec la

	membrane cellulaire [50]
<b>Le domaine pseudosubstrat</b>	Empêche l'activation de PKC $\delta$ en bloquant la poche de liaison du substrat [51]
<b>Site de clivage de la caspase</b>	Séquence clivée par la caspase-3 [52]
<b>Séquence de liaison à l'ATP</b>	Offre l'énergie nécessaire pour l'activité catalytique de la protéine [53]
<b>Boucle d'activation</b>	Contient des sites de phosphorylation importants nécessaires à l'activation catalytique [54]
<b>Signal de localisation nucléaire (NLS)</b>	Cible la PKC $\delta$ vers le noyau [55]
<b>Tourner le motif</b>	Site d'auto-phosphorylation important pour la maturation de la PKC $\delta$ [54]
<b>Motif hydrophobe</b>	Facilite la régulation négative de PKC $\delta$ en la libérant de la membrane cellulaire [54]

### ◆ Sites de phosphorylation de la PKC $\delta$

La PKC $\delta$  est caractérisée par un nombre important de sites phosphorylables impliqués dans la régulation de son activation notamment, trois résidus Ser/Thr (Thr<sup>505</sup>, Ser<sup>643</sup> et Ser<sup>662</sup>) et neuf résidus tyrosine (Tyr<sup>311</sup>, Tyr<sup>52</sup>, Tyr<sup>64</sup>, Tyr<sup>155</sup>, Tyr<sup>187</sup>, Tyr<sup>332</sup>, Tyr<sup>512</sup>, Tyr<sup>523</sup> et Tyr<sup>565</sup>) [56]. Après son activation la PKC $\delta$  sera transloquée du cytosol vers les membranes plasmiques où elle va interagir avec des protéines afin d'assurer de nombreuses fonctions [57].

#### ⇒ Ligand GPIb- $\alpha$

La GPIb- $\alpha$  est une glycoprotéine transmembranaire portant les propriétés réceptrices du récepteur GPIb-IX-V qui est un récepteur riche en leucine présent au niveau des plaquettes à raison de 50 000 récepteurs par plaquette, formé d'un complexe de quatre glycoprotéines transmembranaires dont la GPIb- $\alpha$ . Cette protéine est caractérisée par sa capacité de se lier à de nombreuses molécules telles que la thrombine et le facteur de Van Will Brand et joue rôle prépondérant dans l'activation plaquettaire [57].

### b. Rôle de la PKC $\delta$ dans l'activation des plaquettes

Dans les plaquettes, plusieurs isoformes de la famille des PKCs sont identifiés, à savoir les PKCs  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\delta$ ,  $\theta$ ,  $\epsilon$ ,  $\eta$ ,  $\zeta$  et  $\mu$ . Cette élucidation permet de conclure que la famille des PKCs est essentielle pour l'équilibre des voies de signalisation stimulatrices et inhibitrices qui permettent l'activation et le bon fonctionnement des plaquettes en réponse à la signalisation par la thrombine via les récepteurs de haute affinité pour la thrombine particulièrement, les

PAR-1 et PAR-4 et le GPIb $\alpha$  [57]. Parmi ces isoformes on s'intéresse à la PKC $\delta$ , s'intervient dans la régulation positive ou négative des grandes fonctions plaquettaires, notamment la dégranulation, la sécrétion et l'agrégation des granules plaquettaires dépendamment de la nature des stimuli et des récepteurs activés : l'activation des récepteurs PARs entraîne la sécrétion des granules denses par les plaquettes tandis que l'activation du GPIb $\alpha$  régule négativement la dégranulation plaquettaire [58].

La thrombine est l'activateur le plus puissant des plaquettes, cette fonction est assurée au moyen de ses récepteurs couplés à la protéine G, nommés PARs, comme elle peut se lier, également, au récepteur GPIb- $\alpha$ . Étant donné que les PKCs sont des régulateurs qui stimulent l'agrégation plaquettaire et la formation du thrombus, la liaison de la thrombine sur le récepteur GPIb- $\alpha$  induit la phosphorylation de la PKC $\delta$  au niveau de nombreux sites notamment, la Tyr<sup>311</sup>, la Tyr<sup>565</sup> et la Thr<sup>505</sup> régulant, de ce fait, le degré d'expression et la localisation de la protéine. En fait, la PKC $\delta$  est fortement exprimée dans les plaquettes, donc la phosphorylation de cette protéine a un impact direct sur le processus de l'activation plaquettaire [57] [43].

### **c. Implication de la PKC $\delta$ dans la sévérité de l'atteinte par la COVID-19**

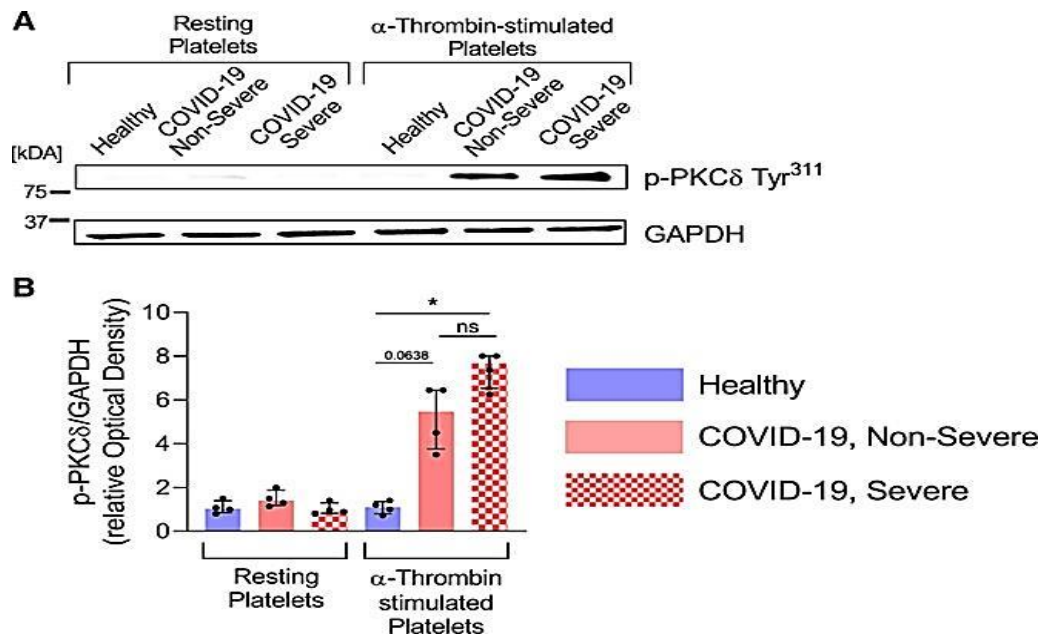
L'infection sévère au nouveau coronavirus 2 est caractérisée, chez la plupart des patients, par de nombreuses complications plaquettaires qui se manifestent par une thrombose microvasculaire, une thrombose veineuse ou artérielle et une coagulation intravasculaire disséminée aboutissant à un blocage des petits vaisseaux sanguins. Étant donné que la PKC $\delta$  joue un rôle prépondérant dans l'agrégation plaquettaire et la formation des thrombus, plusieurs études ont été menées sur cette protéine dans l'ordre d'élucider le degré de son implication dans l'apparition de ces complications afin de pouvoir moduler la fonction plaquettaire au cours de la COVID-19 [57].

En fait, une étude menée sur deux groupes de patients : 71 cas COVID 19 non sévère et 44 cas COVID 19 sévère, dont les plaquettes ont été prélevées et stimulées avec une faible dose de thrombine, a démontré une dégranulation des plaquettes lors d'une infection par le SRAS-CoV-2 indépendamment de la gravité de la maladie, en utilisant des marqueurs de dégranulation, plaquettaire PF4 pour les granules alpha et sérotonine pour les granules denses, ce qui élucide la possibilité de la survenue d'une dégranulation plaquettaire lors de l'infection par le SARS-CoV-2. Ainsi, une augmentation de la phosphorylation de PKC $\delta$  sur



le résidu Tyr<sup>311</sup>- site de phosphorylation potentialisant l'activité de l'enzyme- a été remarquée chez les 2 groupes de patients par rapports aux sujets témoins, ce qui suggère que les voies de signalisation de l'activation plaquettaire peuvent être sensibilisées dans la COVID-19 [59].

Au surplus, deux autres tests : l'agrégométrie optique et l'immunofluorescence à base de rhodamine ont conduit à suggérer que les plaquettes sont plus enclines à coaguler en cas d'atteinte sévère au SRAS-CoV-2 [59].



**Figure 8 : Phosphorylation de la PKCδ et activation des plaquettes [59] :**

**La phosphorylation de la PKCδ (protéine kinase C) est augmentée dans les plaquettes des patients atteints de la maladie à coronavirus 2019 (COVID-19).**

## 7. Cas de phosphoprotéine stimulée par les vasodilatateurs : VASP

### a. Caractéristiques de la VASP

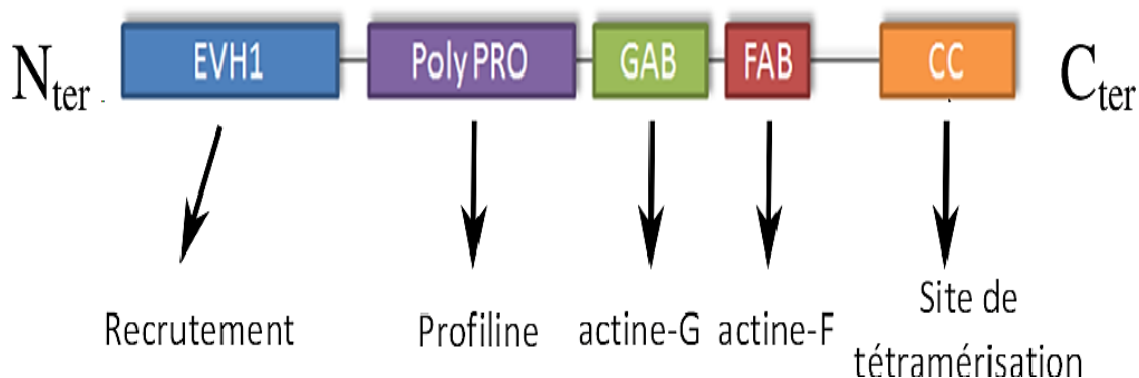
#### ⇒ Définition

La VASP est une protéine appartenant à la famille des protéines Ena/VASP, qui a été caractérisée pour la première fois comme un substrat des protéines kinases dépendantes de la GMPc (cGK) et les kinases dépendantes de l'AMPc (cAK). Les protéines de cette famille sont connues pour leur implication dans la motilité, la migration et l'adhésion cellulaires, et qui grâce à sa capacité de liaison à l'actine et à la profiline, elle joue, également, un rôle dans le recrutement de la profiline, la nucléation de l'actine, le groupement et la formation de filaments. Elle est révélée largement exprimée dans plusieurs types cellulaires, notamment,

les cellules neuronales, les lymphocytes T, les macrophages, les cellules endothéliales, les cellules musculaires lisses et les fibroblastes. Cependant, son expression est autant plus élevée au niveau des plaquettes à raison de 7800 copies par plaquette, équivalent en quantité à 2,45g/mg, et elle est connue pour son rôle majeur dans la régulation des événements sécrétoires et adhésifs de ces cellules [60].

### ⇒ Structure

La VASP est caractérisée par un poids moléculaire de 50 kDa, ayant une structure, homologue à toutes les autres protéines de la famille Ena/VASP, hautement conservée et tripartite constituée d'un domaine d'homologie EVH1 N-terminal responsable du recrutement de la VASP aux adhésions focales, d'un domaine EVH2 C-terminal d'environ 160 à 190 résidus d'acides aminés et qui, lui-même, formé de 3 domaines distincts nécessaires à la tétramérisation de la protéine la permettant de jouer un rôle prépondérant dans l'adhésion et la motilité cellulaire, et d'une région centrale riche en proline moins conservée et permet l'interaction physique de VASP avec la profiline, et qui, elle-même composée d'une protéine de 14 kDa se liant à la G-actine, et des protéines avec domaines SH3 et WW (domaines d'interaction protéine-protéine contenant deux résidus tryptophane conservés) [61].



**Figure 9 : Représentation schématique d'un monomère de VASP avec ses domaines et fonctions [60]**

## ◆ Domaines importants de la VASP

**Tableau 4 : principaux domaines structuraux de la VASP et leurs fonctions**

Domaine		Fonction
Domaine EVH1		Responsable de la liaison des séquences polyproline (FPPPP) des protéines partenaires et cible les protéines Ena-VASP aux membranes cellulaires ce qui permet le recrutement de cette protéine aux adhésions focales [62].
Domaine Polyproline		Permet l'interaction physique de la VASP avec des protéines contenant les domaines SH3 et WW la permettant d'avoir plusieurs partenaires protéiques et, donc, différents mécanismes de régulations [63].
Domaine EVH2	Site de liaison à l'actine G : GAB	Permet à la protéine VASP de se lier à l'actine G. il est essentiel à la localisation des protéines dans les fibroblastes [60].
	Site de liaison à l'actine F : FAB	Permet à la protéine VASP de se lier à l'actine F. il est essentiel à la localisation des protéines au front de migration de la cellule [60].
	Domaine Coiled-coil : CC	Nécessaire à l'oligomérisation de la protéine en tétramère et participe à la localisation de la protéine au front de migration des fibroblastes [64].

## ◆ Sites de phosphorylation de la VASP

La VASP est un substrat majeur de la PKA (protéine kinase A) et de la PKG (protéine kinase G), qui la phosphoryle en trois sites : Ser<sup>157</sup>, Ser<sup>239</sup> et Thr<sup>278</sup>. Ces sites sont phosphorylés, avec des cinétiques différentes, à la fois *in vitro* et dans des plaquettes humaines intactes. La PKA présente une cinétique similaire *in vitro* et *in vivo*, Ser<sup>157</sup> étant le site préféré de phosphorylation, suivi de Ser<sup>239</sup>. PKG, en revanche, présente des cinétiques différentes *in vitro* et *in vivo*, puisque, *in vitro*, Ser<sup>239</sup> est le site de phosphorylation préféré, alors que *in vivo*, la PKG phosphoryle Ser<sup>157</sup> et Ser<sup>239</sup> avec une cinétique similaire [61].

Récemment, il a été démontré que la PKA et la PKG ne sont pas les seules kinases capables de phosphoryler la VASP, mais que la PKC (protéine kinase C) pourrait également avoir cette capacité sur le site Ser<sup>157</sup>, mais pas sur le site Ser<sup>239</sup> [61].

## **b. Protéine VASP et activation plaquettaire**

L'activation de la VASP nécessite sa phosphorylation qui est médiée par les protéines kinases dépendantes de l'AMPc et de la GMPc, et il est prouvé que cette protéine est phosphorylée directement sur le résidu Ser<sup>157</sup>. En effet, la stimulation par des agents vasodilatateurs, tels que la prostaglandine I<sub>2</sub> et l'oxyde nitrique, entraîne une élévation des niveaux de l'AMPc et de la GMPc nécessaires à l'activation des protéines kinases (en particulier la PKA, la PKG et la PKC) qui, à leur tour, vont activer la VASP, leur substrat majeur, en catalysant sa phosphorylation sur trois sites principaux Ser<sup>157</sup>, Ser<sup>239</sup> et Thr<sup>278</sup> avec des cinétiques différentes soit *in vitro* ou *in vivo* (dans les plaquettes humaines vivantes) [61].

Le résidu Ser<sup>157</sup> étant considéré comme le site de phosphorylation préféré à la fois pour la PKA et la PKG, des études ont montré qu'un changement de mobilité de la protéine VASP est un marqueur de sa phosphorylation sur ce site. La phosphorylation de la VASP sur ce site a été jusqu'à présent corrélée avec une activation réduite de l'intégrine  $\alpha$ IIb $\beta$ 3 et une inhibition de l'agrégation plaquettaire [65]. Ainsi, une VASP phosphorylée est caractérisée par une capacité réduite d'interaction physique avec l'actine, et de ce fait, les propriétés de nucléation et de regroupement de l'actine par VASP seront régulées négativement [66].

## **VI. Diagnostic biologique de l'infection au SRAS-CoV-2**

### **1. Diagnostic direct**

Ce type de diagnostic est basé sur la réalisation de nombreuses analyses de routine visant à l'identification d'expression ou de taux anormaux de certaines molécules vitales, ou un défaut dans le fonctionnement normal de l'organisme.

#### **a. Bilan hématologique**

La numération formule sanguine permet de montrer une augmentation des PNN, une diminution des lymphocytes T CD4<sup>+</sup> et CD8<sup>+</sup>, et une thrombopénie importante. Ainsi, un bilan de coagulation permet d'observer une diminution du TP et une élévation écrasante du taux des D-dimères, entraînant les coagulopathies associées à des formes graves de la maladie [67].

## **b. Bilan biochimique**

Ce bilan révèle une forte diminution de l'albumine sanguine, une hyperferritinémie, et une augmentation des transaminases, de la bilirubine et du LDH. Ainsi le taux de la CRP augmente jusqu'à des valeurs égales à 150mg/L [67].

## **c. Bilan immunitaire**

Le statut immunitaire des patients est indiqué par l'évaluation des facteurs de l'inflammation, notamment l'IL-6, l'IL-10 et le TNF- $\alpha$  sont augmentés [67].

## **2. Diagnostic indirect**

Ce type de diagnostic a pour but de déterminer directement la présence du virus ou de l'une de ses composantes, notamment le génome, un Ag, une protéine spécifique ou encore des anticorps libérés, suite à l'infection par le SRAS-CoV-2, dans les échantillons à analyser [7]. Pour ce fait, plusieurs types de tests biologiques peuvent être employés :

### **a. Tests moléculaires**

La méthode moléculaire la plus utilisée pour la mise en évidence des personnes atteintes de la COVID-19 est la RT-PCR en temps réel. Cette dernière est la technique, la plus fiable, employée au Maroc pour la détection du matériel génétique du nouveau coronavirus [67].

#### **⇒ RT-PCR**

Cette méthode d'analyse consiste en l'utilisation des marqueurs fluorescents afin de détecter le génome d'intérêt. En effet, l'ARN du nouveau coronavirus est rétrotranscrit, par l'intermédiaire d'une transcriptase inverse, en ADN complémentaire. Ce dernier sera amplifié par la suite. La quantité de l'ADN polymérisé est mesurée à chaque cycle de PCR au moyen des marqueurs fluorescents ce qui permet de suivre cette quantité en temps réel [7].

#### **⇒ RT-LAMP**

L'amplification isotherme médiée par boucle est, également, une méthode rapide et efficace qui permet l'amplification du matériel génétique viral du SRAS-CoV-2 en employant des amorces nucléotidiques spécialement conçues [68].

## **b. Tests antigéniques**

Ces tests sont basés sur l'identification des protéines spécifiques du SRAS-CoV-2, qui ont été produites suite à la réplication active du virus au sein des cellules infectées. Or, malgré que ces tests assurent un diagnostic précoce de la maladie dès la phase aiguë, ils restent très peu recommandés pour la mise en évidence d'une atteinte par la COVID-19 en raison de leur faible performance en cas d'une charge virale basse [7] [67].

## **c. Tests sérologiques**

La recherche sérologique, quant à elle, a pour objectif de détecter des anticorps spécifiques du SRAS-CoV-2 dans le sang du patient afin de pouvoir confirmer son infection par ce virus. En fait, une personne atteinte du nouveau coronavirus a la tendance de libérer des anticorps de type IgG ou IgM anti-nucléocapside du virus, ces derniers deviennent détectables dans le sang à partir du 5<sup>ème</sup> jour après l'infection [67]. Ces tests sérologiques peuvent être effectués par deux techniques d'analyse distinctes :

### **⇒ Technique immuno-enzymatique : ELISA**

ELISA est une méthode qualitative simple de détection des anticorps de type IgG ou IgM libérés en réponse à l'infection au SRAS-CoV-2 en se basant sur la visualisation d'une réaction antigène-anticorps produite suite à l'action sur le substrat d'une enzyme préalablement fixée à l'anticorps monoclonal employé [69].

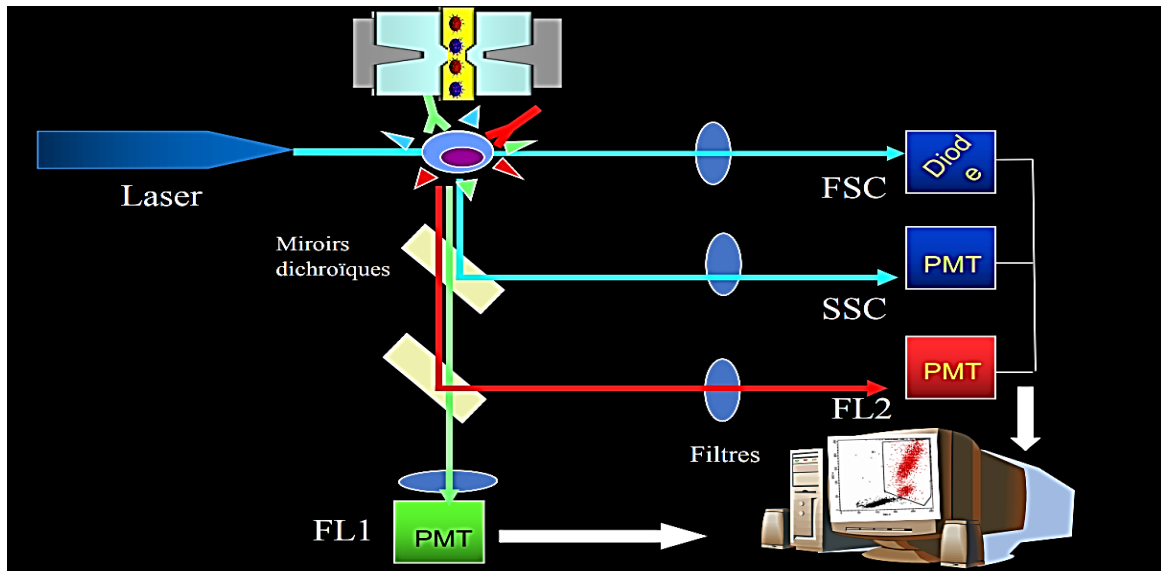
Les anticorps identifiés par cette technique sont, généralement, dirigés contre la protéine S, la protéine N ou les sous unités S1 du nouveau coronavirus.

### **⇒ Technique immuno-hématologique : Cytométrie en flux**

La cytométrie en flux est une technique très intéressante qui a permis de compléter les connaissances recueillies, par les techniques classiques de l'analyse, et ce grâce à ses nombreux avantages, notamment, sa rapidité, sa simplicité, sa reproductibilité, et surtout, sa capacité à effectuer des analyses multiparamétriques ce qui augmente la fiabilité des résultats obtenus [70].

Le cytomètre de flux est formé de trois composantes :

- Un système fluïdique
- Un système optique
- Un système informatique



**Figure 10 : les composantes principales d'un cytomètre de flux**

Il s'agit d'une technique d'analyse rapide permettant la séparation et le tri des cellules individuelles ou des particules d'intérêt présentes dans une solution en se basant sur l'utilisation d'un laser. En effet, ces lasers sont des sources de lumière utilisées pour exciter les cellules à analyser. Les cellules vont produire des signaux fluorescents qui seront lus par des détecteurs et convertis en signaux électroniques qui, à leur tour, vont être analysés par un ordinateur. Les résultats de cette analyse sont présentés sous forme d'histogrammes ou cytogrammes [71].

En fait, la lumière diffusée par les particules sera mesurée dans deux directions différentes, la direction à  $0^\circ$  (**FSC**) permettant de déterminer la taille de la cellule étudiée, et la direction à  $90^\circ$  (**SSC**) qui fournit des informations sur la granularité des cellules [71]. La fluorescence mesurée est obtenue par l'emploi des fluorochromes spécifiques ou des anticorps marqués par des fluorochromes dirigés contre l'antigène cible [72].

Ces dernières années, les instruments et les réactifs utilisés en cytométrie en flux ont considérablement augmenté en raison de la diversité des instruments et leurs performances [71] :

**Cytomètre en flux traditionnel** : constitué de trois systèmes : **fluidique** (se compose d'un fluide de gaine qui permet de focaliser l'échantillon vers l'interception laser), **optique** (formé d'options d'excitation et de collecte qui donnent naissance aux signaux lumineux et fluorescents nécessaires pour l'analyse) et **électronique** [71].

**Cytomètres à focalisation acoustique** : permet une meilleure focalisation des cellules en utilisant des ondes ultrasonores [71].

**Trieurs de cellules** : permet de trier les cellules d'une à 4 populations [71].

**Cytomètre d'imagerie** : associant la cytométrie en flux et la microscopie à fluorescence permettant, de ce fait, une analyse morphologique des cellules [71].

**Cytomètre de masse** : ce type associe à la fois la spectrométrie de masse à temps de vol et la cytométrie en flux [71].

## VII. La cytométrie en flux et la détection du SRAS-CoV-2

Comme il est susmentionné, la RT-PCR est la méthode de diagnostic la plus utilisée pour la détection des patients atteints de la COVID-19. Cependant, cette technique nécessite beaucoup de temps, ainsi, les tests basés sur les anticorps ne sont pas très fiables surtout lorsque la charge virale chez un patient est basse, d'où la nécessité du recours à d'autres techniques alternatives de diagnostic permettant de couvrir une large population suspectée porteuse de la maladie au nouveau coronavirus et la détection de la maladie sera suffisamment précoce pour éviter les éventuelles complications [67].

En fait, l'approche de la cytométrie en flux utilise l'immunofluorescence indirecte, dans laquelle les particules virales sont liées à des anticorps monoclonaux primaires qui, eux-mêmes, seront liés à des anticorps secondaires fluorescents permettant la détection des **complexes** formés [68].

### 1. La détection des virus par cytométrie en flux « virométrie en flux »

La détection des particules virales par cytométrie en flux s'effectue en se basant sur leur fluorescence ou sur leurs tailles. Plusieurs méthodes de marquage sont utilisées [68] :



### **a. Marquage à l'aide d'un colorant lipophile fluorescent**

Ce type de marquage est utilisé principalement pour les virus encapsidés tels que le VIH et le DENV. L'un des marqueurs les plus employés est le PKH67 : une molécule lipophile fluorescente ciblant les bicouches lipidiques. En raison de la présence d'une capsidie lipidique chez le SRAS-CoV-2, ce colorant peut être utilisé pour l'identification des cas de la COVID-19 [68].

### **b. Marquage avec des anticorps couplés à des fluorochromes**

Ce marquage utilise, généralement, des anticorps primaires de types IgG ou IgM. Dans le cas où ces anticorps ne peuvent pas être marqués directement, on utilise des anticorps secondaires ciblant les anticorps primaires [68].

### **c. Marquage avec des nanoparticules magnétiques marquées par immunoglobuline fluorescente (MNP)**

Cette méthode est basée sur la liaison directe des particules virales à des billes magnétiques. En effet, ces billes magnétiques sur lesquelles les molécules virales sont liées seront incubées avec des anticorps spécifiques, les complexes anticorps-MNP formés seront incubés à nouveau avec des virions pour immobilisation. Et enfin, les complexes nouvellement formés : anticorps-MNP-virion immobilisés seront incubés avec des anticorps secondaires liés à des fluorochromes [68].

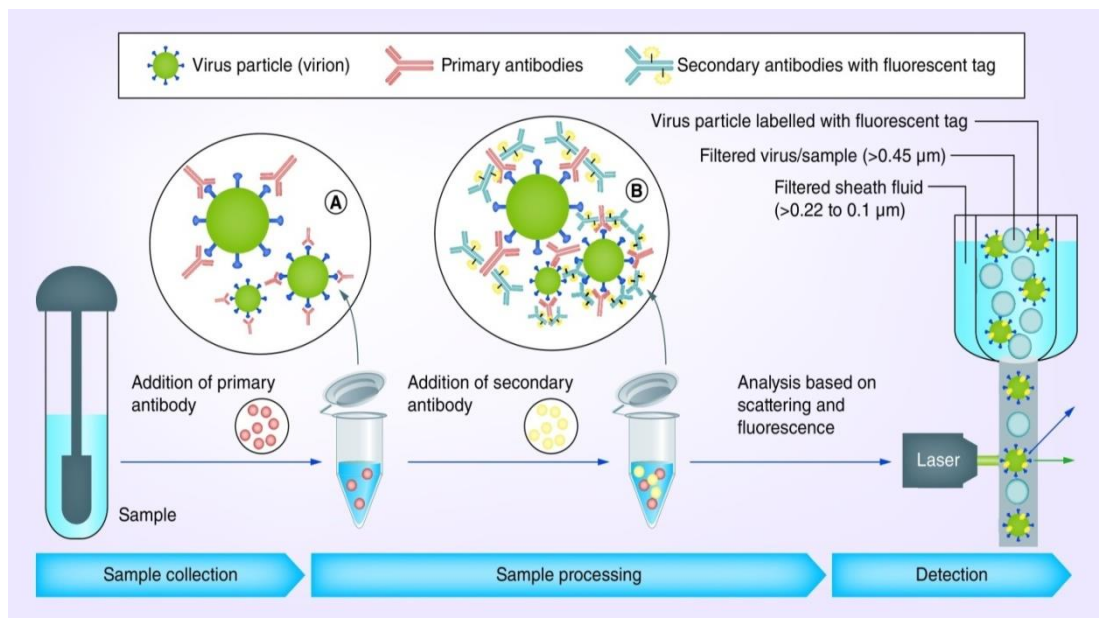
## **2. Application au SRAS-CoV-2**

La détection du SRAS-CoV-2 par cytométrie en flux s'effectue en utilisant des anticorps couplés à des fragments fluorescents ou en utilisant des MNP. En effet, dans l'ordre de détecter la présence du nouveau coronavirus, on utilise des anticorps secondaires couplés à des marqueurs fluorescents (tels que la fluorescéine, l'isothiocyanate, Cy5...) et des particules virales couplés à des anticorps primaires dirigés contre les antigènes du SRAS-CoV-2 [68].

### **Protocole et étapes de l'analyse par cytométrie en flux**

- Collecte des échantillons nasopharyngés dans des tubes contenant des milieux de transport viral permettant la conservation et la protection des prélèvements à analyser [68].

- Préparation des échantillons par une solution saline au phosphate (PBS), permettant de perfectionner l'intensité de fluorescence des particules virales [68].
- On ajoute de 0,1 à 10 µg des anticorps primaires à la solution PBS préalablement préparée, le mélange sera incubé dans un tube en obscurité à température ambiante pendant 30 min à 1 heure [68].
- Après l'incubation, l'échantillon est lavé plusieurs fois à l'aide d'une centrifugeuse, le culot est remis à nouveau en suspension de PBS [68].
- De 0,2 à 10 µg des anticorps secondaires marqués par les fluorochromes est ajouté à la suspension du mélange anticorps primaires – particules virales précédemment formé, puis les tubes seront incubés pendant 30 min à température ambiante dans obscurité [68].
- Un deuxième lavage est effectué à l'aide d'une centrifugeuse, le surnageant est éliminé et le culot est mis une deuxième fois dans une suspension de PBS glacé [68].
- Après les préparations précédentes, on passe à l'analyse des échantillons par cytométrie en flux en fixant les seuils appropriés en raison de la très petite taille du SRAS-CoV-2. En effet, les photomultiplicateurs FSC sont fixés à 1000 et les SSC à 400 [68].



**Figure 11 : Étapes de préparation des échantillons et de détection du SRAS-CoV-2 par cytométrie en flux [68].**

L'utilisation de la cytométrie en flux pour la mise en évidence des patients atteints de la COVID-19 a permis d'étendre l'analyse de 10 à 20 fois par jour en utilisant un seul équipement (durée globale de diagnostic par cytométrie en flux est d'environ 120 min) [68].

### **Précautions de l'analyse**

Comme il est évident, les particules du SRAS-CoV-2 vivantes sont très contagieuses, par conséquent, leur manipulation par un cytomètre en flux présente des risques d'exposition très élevés, pour cette raison une installation de niveau de sécurité 3 est nécessaire au sein du laboratoire d'analyse. En fait, la manipulation des particules virales s'effectue au sein d'une chambre fermée à pression négative, ainsi, une mécanisation telle qu'un bras robotisé est nécessaire afin de minimiser le risque d'infection des manipulateurs [68].

Au surplus, si la préparation des échantillons n'a pas été effectuée avec soin, il se peut qu'il ait une excrétion des anticorps marqués par la surface des particules virales ce qui pourrait être à l'origine de résultats faussement négatifs [68].

## **Chapitre II : Partie expérimentale**

---

### **I. Objectifs du travail**

Ce travail a pour objectif la confirmation de l'implication de la PKC $\delta$ , de la P-VASP et de la P-sélectine dans la sévérité de l'atteinte au SRAS-CoV-2 en utilisant des anticorps appropriés.

Pour la PKC $\delta$  et la P-VASP l'analyse par Western Blot va se focaliser sur la mise en évidence des modifications post-translotionnelles subissés par cette protéine chez des patients sévèrement atteints par la COVID-19 et leur comparaison avec celles des patients sains.

Pour la P-sélectine, on va comparer ses taux d'expression chez des cas COVID-19 sévères avec ceux des cas sains à travers une analyse par cytométrie en flux.

Et dernièrement on va faire une corrélation du niveau de gravité de l'infection au SRAS-CoV-2 avec les données propres à chaque patient donneur du sang pour cette analyse.

## II. Matériel et méthodes

Dans la partie expérimentale de notre travail nous avons ciblé une population formée de 6 sujets, 3 d'entre eux étaient des patients qui développaient la forme sévère de la COVID-19 et étaient hospitalisés dans l'unité des soins intensifs de l'Hôpital Universitaire Cheikh Zaid de Rabat et les 3 autres étaient des sujets sains témoins.

### 1. Phase pré-analytique

#### a. Matériel

- ◆ 8 × tubes coniques stériles 50 mL (Sarstedt, 62.547.004)
- ◆ 2 × Embouts de micropipette 10 µL (Sarstedt, 70.1116)
- ◆ 2 × pointes de pipette 5000 L (Eppendorf, 022492080)
- ◆ 4 × Pipette de transfert en plastique 3,5 ml (VWR 414004-004)
- ◆ 4 × Seringue stérile de 30 ml (BD, 302832)
- ◆ 1 × aiguille 21G (Terumo, NN-2125R)
- ◆ Pipette 500-5000 µL
- ◆ Micropipette 0.5-10 µL
- ◆ Centrifuger
- ◆ Bain-marie 37°C
- ◆ Compteur de coutres (Beckman Coulter, AcT Diff)

#### b. Solutions et réactifs

- ◆ 20 mL Anticoagulant Citrate Dextrose (ACD) (Fenwall, C4B7891X) ;
- ◆ 50 ml de tamp
- ◆ on HBSS complet (recette ci-dessous) placé dans un tube conique de 50 ml dont le pH est ajusté à 7.4 et conservé à 4°C ;

Tableau 5 : Composition du tampon HBSS complet

Composés	g/1000ml	g/500ml	Concentrations finales
NaCl	8	4	138 mM
KCl	0.373	0.1865	5 mM
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	0.091	0.0455	0.34 mM
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0.054	0.027	0.40 mM
NaHCO <sub>3</sub>	0.353	0.1765	4.2 mM
Glucose	1.11	0.555	5.6 mM

<b>HEPES</b>	2.383	1.1915	10 mM
<b>MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O</b>	0.2	0.1	0.81 mM
<b>CaCl<sub>2</sub> anhydrous</b>	0.144	0.072	1.3 mM

- ◆ 25 ml de tampon citrate HBSS (recette ci-dessous) placé dans un tube conique de 50 ml dont le pH est ajusté à 7.4 et conservé à 4°C;

**Tableau 6 : Composition du tampon citrate HBSS**

Composés	g/1000ml	g/500ml	Concentrations finales
<b>NaCl</b>	8	4	138 mM
<b>KCl</b>	0.373	0.1865	5 mM
<b>Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O</b>	0.091	0.0455	0.34 mM
<b>KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub></b>	0.054	0.027	0.40 mM
<b>NaHCO<sub>3</sub></b>	0.353	0.1765	4.2 mM
<b>Glucose</b>	1.11	0.555	5.6 mM
<b>HEPES</b>	2.383	1.1915	10 mM
<b>C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>Na<sub>3</sub>O<sub>7</sub>.2H<sub>2</sub>O Sodium citrate</b>	3.794	1.897	12.9 mM

- ◆ Concentration mère de Prostaglandine PGE1 à 10000 µg/mL (dissoute dans l'éthanol) conservée à -20°C (Sigma, P5515).

### c. Échantillons biologiques

Les deux analyses, Western Blot et la cytométrie en flux, vont s'effectuer sur les mêmes échantillons différemment préparés. En effet, on va travailler sur 6 prélèvements sanguins, 3 échantillons de patients COVID-19 sévères et 3 échantillons de patients sains. Ces prélèvements ont été réalisés en suivant ces étapes :

- ◆ On a utilisé des seringues de 30 ml dans lesquelles on a placé 5 ml d'ACD ;
- ◆ Après avoir obtenu le consentement du donneur, on a prélevé 25 ml de sang veineux dans chacune des 6 seringues ;
- ◆ On a vidé lentement le sang dans les seringues dans les tubes coniques de 50 ml contenant, chacun, le citrate de sodium à 129 mM et on a assuré un volume égal de sang dans chaque tube conique à raison d'un volume de citrate pour neuf volumes du sang ;
- ◆ Puis, on a effectué une numération formule sanguine au moyen du compteur Coulter ;

- ◆ On a placé les tampons HBSS complet et citrate HBSS au bain-marie à 37°C pour réchauffer.

#### **d. Isolation du plasma riche en plaquette**

Avant de commencer l'analyse, on doit avoir un plasma riche en plaquettes pures dans les échantillons, pour faire ça, nous avons suivi ces étapes :

- ◆ Une première centrifugation des prélèvements sanguins est réalisée dans les tubes coniques de 50 ml à 1000 Tr/min pendant 15 min, permettant de séparer les érythrocytes du plasma contenant les leucocytes et les plaquettes, la vitesse de centrifugation doit être lente afin d'éviter l'activation plaquettaire ;
- ◆ Une fois la centrifugation est terminée, on a éliminé le caillot contenant les globules rouges et les lymphocytes et on a conservé le surnageant riche en plaquettes ;
- ◆ On a transféré soigneusement et lentement la couche supérieure de PRP dans un nouveau tube conique de 50 ml à l'aide d'une pipette de transfert en plastique ;
- ◆ On a ajouté PGE1 au PRP à une concentration finale de 1 g/mL et on a mélangé doucement et lentement avec une pipette de transfert en plastique pour éviter l'activation des plaquettes à analyser ;
- ◆ Une deuxième centrifugation du surnageant, préalablement obtenu, est réalisée à 2300 Tr/min pendant 10 min ;
- ◆ On a éliminé le surnageant contenant le plasma pauvre en plaquettes (PPP) par une aspiration en évitant la perturbation du culot contenant les plaquettes avec d'autres débris ;
- ◆ On a lavé les plaquettes avec le citrate HBSS tampon afin de se débarrasser des débris et d'obtenir des plaquettes pures ;
- ◆ On a ajouté 1.25 ml du PGE1 à la suspension plaquettaire pour éviter son activation et on a centrifugé pour la dernière fois à 1000 Tr/min pendant 10min ;
- ◆ Puis on a reconstitué les plaquettes dans le tampon physiologique HBSS complet. En effet, on a ajouté un volume du complet qui permettra l'analyse de la suspension plaquettaire par le compteur clouter ;

- ◆ Selon le comptage on a ajusté la concentration des plaquettes dans le complet jusqu'à ce qu'elle atteigne une valeur égale à 250 millions plaquettes / mL ;
- ◆ On a réalisé une deuxième numération pour s'assurer que le comptage a été bien effectué ;
- ◆ Finalement, on a lysé les plaquettes en ajoutant 50µL de la solution de lyse.

## 2. Phase analytique

### a. Western Blot

On a fait un Western Blot pour diriger des anticorps contre la VASP phosphorylée au niveau du site Ser<sup>157</sup> et la PKCδ phosphorylée au niveau des sites Tyr<sup>311</sup> et Thr<sup>505</sup>, protéines situées au centre des plaquettes et impliquées dans la fonction plaquettaire. Pour l'exécution de cela, nous avons employé de nombreux réactifs et solutions :

→ *Mode opératoire*

#### Préparation des gels :

- ◆ **Un gel de résolution** formé de :

Produit	Volume					Concentration
	12%	10%	8%	7%	6%	
H <sub>2</sub> O	3.28ml	3.85ml	4.43ml	4.73ml	5.02ml	
TRIS 1.5M pH 8.8	1.88ml					320mM
Acrylamide (29:1)	3.5ml	2.93ml	2.35ml	2.05ml	1.76ml	
SDS 10%	75µl					0.09% (vol/vol)
APS 10% (add last)	75µl					0.09% (vol/vol)
TEMED (add last)	3.8µl					0.0004% (vol/vol)

- ◆ **Un gel d'empilement** formé de :

Produit	Volume	Concentration
H <sub>2</sub> O	2.37ml	
TRIS 0.5M pH6.8	940µl	120mM
Acrylamide (29:1)	520µl	4.0%
SDS 10%	38µl	0.01% (vol/vol)
APS 10% (add last)	38µl	0.01% (vol/vol)
TEMED (add last)	3.8µl	0.001% (vol/vol)



### Réactifs et solutions utilisés :

- ◆ **SDS 10%** : 1g du Sodio de dodécyle sulfate dilué dans 10 ml de l'eau stérile et conservé à -20°C ;
- ◆ **TRIS 1.5M** : 45.5g du TRIS dilué dans 200 ml d'H<sub>2</sub>O stérile ayant un pH ajusté à 8.8 avec du HCl et conservé à 4°C ;
- ◆ **TRIS 0.5M** : 15.14g du TRIS dilué dans 200 ml d'H<sub>2</sub>O stérile ayant un pH ajusté à 6.8 avec du HCl et conservé à 4°C ;
- ◆ **APS** : 1g de Persulfate d'Ammonium dissout dans 10 ml de l'eau stérile ;
- ◆ **Acrylamide Bis-Arylamide (29:1)** : 29g d'acrylamide et 1g de Bis-Arylamide sont dissouts dans 100 ml de l'eau stérile à l'obscurité et conservés à 4°C ;
- ◆ **Tampon de migration 10X** : formé de 30g de TRIS, 144g Glycine et 10g SDS dissouts dans 1L de l'eau stérile avec un pH entre 8.3 et 8.8 ajusté. Ce tampon est dilué à 1/10 avant son utilisation ;
- ◆ **Tampon de transfert** : formé de 12.115g TRIS, 57.6 glycine, 800ml méthanol et 4g SDS dissouts dans 3.2L de l'eau stérile avec un pH de 8.5 et conservés à 4°C ;
- ◆ **TBS- Tween 10X** ou **tampon de lavage** : 24.2 g TRIS et 87.66 g NaCl dissouts dans 900 ml de l'eau stérile avec un pH de 7.5 ajusté, puis, après dilution 1/10, on a ajouté 1ml du tween pour obtenir 0.1% dans 1L ;

**Tableau 7 : Principaux réactifs et solution utilisés dans le Western Blot**

Produits	Composés	Quantités	Concentrations	Volume d'H <sub>2</sub> O stérile utilisée	pH	Température de conservation
<b>SDS 10%</b>	Sulfate de dodécyle de Sodium	1g	10% (poids/vol)	10mL	-	-20°C
<b>Tris</b>	TRIS	45.43g	1.5M	200mL	8.8	4°C
	TRIS	15.14g	0.5M		6.8	
<b>APS 10%</b>	Persulfate	1g	10% (poids/vol)	10mL	-	-20°C

	d'ammonium					
<b>Acrylamide Bis-Acrylamide</b>	Acrylamide	29g	29% (poids/Vol)	100mL	-	4°C
	Bis-acrylamide	1g	1% (poids/vol)			
<b>Tampon de migration 10X</b>	TRIS	30g	247mM	1L	Entre 8.3 et 8.8	4°C
	Glycine	144g	1.9M			
	SDS	10g	1% (poids/vol)			
<b>Tampon de transfert</b>	TRIS	12.115g	25mM	3.2L	8.5	4°C
	Glycine	57.6g	190mM			
	Méthanol	800mL	20% (vol/vol)			
	SDS	4g	0.1% (poids/vol)			
<b>TBS 10X</b>	TRIS	24.2g	0.2M	900mL	7.5	-
	NaCl	87.66g	1.5M			

#### Autres produits utilisés

- ◆ **ddH<sub>2</sub>O** : eau bidistillée ;
- ◆ **Lait écrémé en poudre** ;
- ◆ **BSA à 5%** : Albumine de sérum bovin comme agent bloquant la migration ;
- ◆ **Des anticorps primaires** ciblant les protéines d'intérêt : **P-PKCδ Tyr<sup>311</sup>**, **P-PKCδ Thr<sup>505</sup>** et **P-VASP Ser<sup>157</sup>** ;
- ◆ **Des anticorps secondaires** ciblant les anticorps primaires : chèvre-anti-lapin conjugués à l'HRP ;
- ◆ **Solution ECL** : pour détecter le signal des protéines ;
- ◆ **Des anticorps anti-béata actine** pour s'assurer que la lyse des plaquettes a été bien faite et que toutes les protéines issues de la dégranulation plaquettaire sont présentes, avec les mêmes concentrations, dans les échantillons à analyser. En fait, les anti-béata actine sont doués d'une capacité de reconnaissance de tous les types des protéines, donc les profils de bandes qui apparaissent pour ces anticorps sont, dans ce cas, les mêmes pour les patients sains et les patients malades.

### → *Étapes de l'analyse*

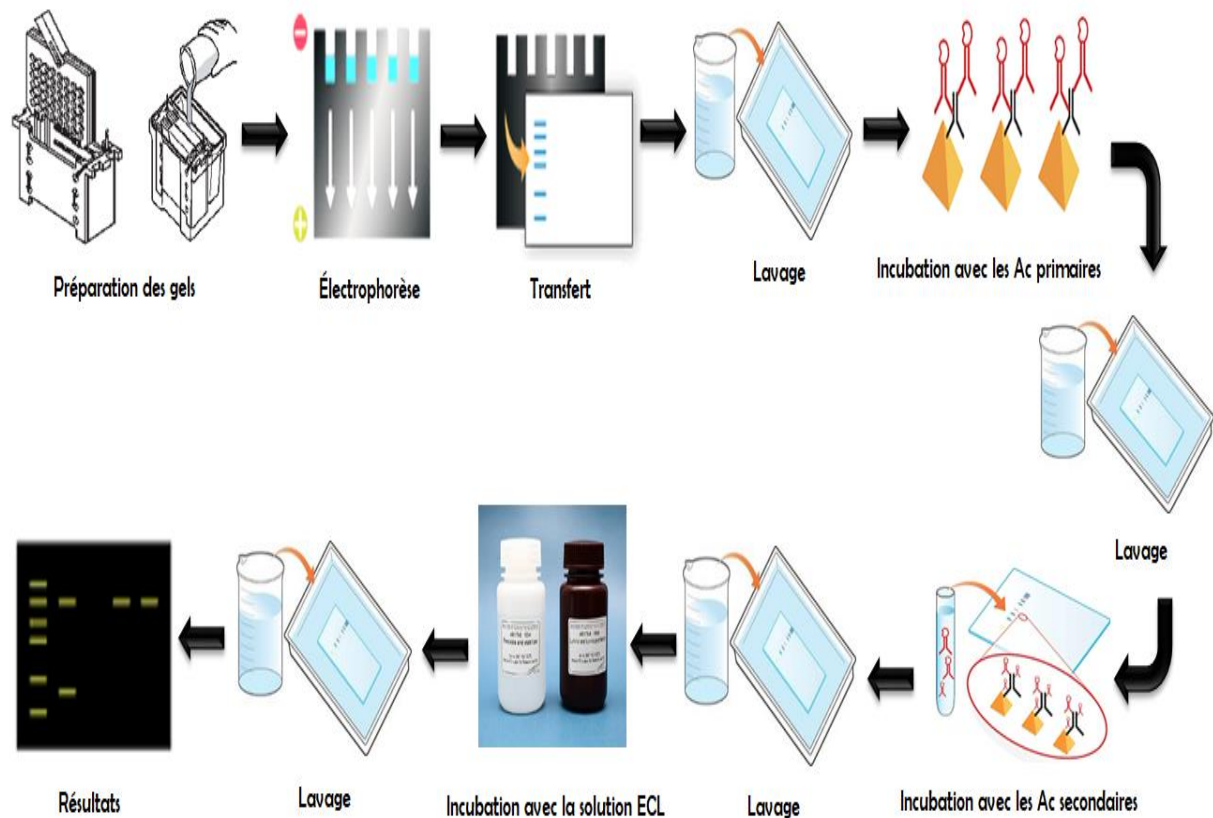
L'objectif de cette analyse est de quantifier les niveaux de la PKC $\delta$  phosphorylées sur les sites Tyr<sup>311</sup> et Thr<sup>505</sup> et des VASP phosphorylées au niveau du site Ser<sup>157</sup> chez des patients atteints d'une COVID-19 sévères et chez des patients sains.

- 1) Les moules en verre (1.5mm) pour les gels avec de l'éthanol ont été nettoyé et monté, chacun, sur le porte-verre vert qui, lui-même, monté sur le support soumis à une pression crée par un eppendorf ;
- 2) Une solution de gel de résolution à 8 % et une solution d'empilement à 4 % ont été préparé par les composés susmentionnés dans les tableaux ;
- 3) Une fois la solution prête, l'APS et le TEMED ont été ajouté. La solution a été bien mélangée et placée dans le moule en verre jusqu'à l'atteinte de la ligne verte du support ;
- 4) Le ddH<sub>2</sub>O a été versé délicatement à l'aide d'une pipette en plastique sur la solution de gel, en veillant à ne pas mélanger l'eau avec la solution ;
- 5) Une fois le gel se polymérise, l'eau restante a été absorbée avec un Kimwipe ;
- 6) L'APS et le TEMED ont été ajouté, de la même manière, à la solution du gel d'empilement, la solution a été mélangée puis placée sur le gel de résolution ;
- 7) Une fois que le gel d'empilement est polymérisé, les puits ont été remontés avec du ddH<sub>2</sub>O ;
- 8) Les moules en verre contenant les gels ont été placé dans la boîte de migration ;
- 9) Les puits de la boite sont remplis avec le tampon Lammeli 1X approprié, puis chargés par les protéines à analyser (la norme de poids moléculaire a 15  $\mu$ l).
- 10) Les électrodes ont été branchées à l'alimentation électrique puis on a fait migrer les protéines à travers le gel d'empilement avec un ampérage constant (20mA pour 1 gel, 30mA pour 2 gels) ;
- 11) Une fois que la ligne bleue a dépassé le gel d'empilement, la migration a été basculée à tension constante (100V pour 1 gel, 120V pour 2 gels) ;
- 12) Lorsque la ligne bleue atteint le fond du gel, la migration a été arrêté ;
- 13) Un morceau de membrane de nitrocellulose a été découpé pour chaque gel (dimensions : 8cm X 5cm), et aussi, 4 morceaux de papier chromatographique ont été découpé pour chaque gel (dimensions : 10cm X 7cm) ;
- 14) Le sandwich de transfert a été préparé pour chaque gel de telle sorte que le côté noir de la cassette soit en bas, et que le sandwich soit préparé en veillant qu'il soit

immergé dans le tampon de transfert, les composants du sandwich de transfert sont comme suit :

- ◆ Éponge ;
  - ◆ 2 papiers chromatographiques ;
  - ◆ Gel soigneusement retiré du moule en verre (garder le bon ordre du gel sans inversion) ;
  - ◆ Membrane de nitrocellulose.
- 15) La cassette a été placée dans le boîtier de transfert en veillant à ce que la face noire soit tournée vers l'extrémité noire du boîtier et on a rempli la boîte de transfert avec le tampon de transfert ;
  - 16) Les électrodes ont été branchés et le transfert a démarré sous ampérage constant (400mA pour 1 ou 2 gels) pendant 120 min ;
  - 17) Une fois le transfert a terminé, la solution TBS 1X a été préparée en diluant la solution 10X et le volume approprié de Tween (1ml pour 1L de TBS) afin d'obtenir une solution de 0,1% ;
  - 18) Un peu de TBS-Tween a été ajouté dans un récipient à tapotement placé sur la plate-forme à bascule ;
  - 19) On a retiré la cassette de transfert de la boîte de transfert, et démonté soigneusement pour retirer la membrane de nitrocellulose en veillant à conserver son orientation ;
  - 20) La membrane a été placée dans la solution TBS-Tween ;
  - 21) 2 lavages de 5 minutes ont été effectués ;
  - 22) 25ml de solution de lait à 5% a été préparé dans du TBS-Tween pour (0.5g de lait en poudre pour 10ml de TBS-Tween) ;
  - 23) La membrane a été incubée dans la solution de lait à 5 % pendant 1 heure sur la plate-forme à bascule réglée à vitesse moyenne, puis elle a été lavée 3 fois avec du TBS-Tween ;
  - 24) Pour chaque membrane, on a préparé 5ml de BSA à 5% dans du TBS-Tween (0.5g de BSA pour 10ml de TBS-Tween) et l'a placé dans le flacon d'incubation ;
  - 25) 5µl des anticorps primaires appropriés (anticorps phospho-VASP Ser<sup>157</sup>, anticorps phospho-PKCδ Tyr<sup>311</sup> et anticorps phospho- PKCδ Thr<sup>505</sup>) a été ajouté aux 5ml de BSA 5% pour obtenir une dilution de 1 /1000 ;

- 26) Une fois les 3 lavages sont effectués, la membrane a été placée dans le flacon d'incubation contenant les anticorps dilués dans la BSA. Ce flacon est, ensuite, fixé sur le rotor avec un ruban adhésif et laissé incubé pendant toute la nuit à 4°C ;
- 27) Le lendemain, la membrane a été retiré du flacon et lavée 3 fois avec du TBS-Tween fraîchement préparé ;
- 28) De nouveau, 5ml de lait à 5% a été préparé dans TBS-Tween pour chaque membrane ;
- 29) 0,5ul des anticorps secondaires (chèvre-anti-lapin-HRP à 4°C) pour 5ml de lait à 5% a été ajouté pour obtenir une dilution de 1 /10000 ;
- 30) 5 ml d'anticorps secondaires dilués a été placé dans le lait dans un nouveau flacon d'incubation propre ;
- 31) Une fois les 3 lavages terminés, la membrane a été placée dans le flacon, contenant les anticorps secondaires, et préalablement fixé au rotor avec du ruban adhésif et on l'a incubé pendant 1 heure à température ambiante ;
- 32) Une fois l'incubation terminée, les membranes ont été lavé 3 fois dans du TBS-Tween ;
- 33) La solution ECL a été préparée en mélangeant 2 ml de tampon peroxyde stable supersignal West dura (boîte blanche) et 2 ml de solution d'amplification de dura supersignal West (boîte brune) ;
- 34) La cassette d'exposition a été préparée ;
- 35) Une fois les lavages ont été effectués, on a incubé la membrane pendant 1 minute dans la solution ECL, puis la placée entre les feuilles de plastique de la cassette d'exposition ;
- 36) Dans la pièce sombre, toutes les lumières ont été fermées et seule la lumière rouge a été allumée ;
- 37) Un morceau de film a été placé sur la membrane (en évitant tout mouvement du film sur la membrane) ;
- 38) La cassette d'exposition a été fermée et le film a été exposé pendant 5 minutes ;
- 39)
- 40) Le film a été retiré, et incubé dans la solution de développement jusqu'à ce que des bandes commencent à apparaître ;
- 41) Le film a été soigneusement lavé avec de l'eau, puis placé dans la solution de fixation ;
- 42) Le film a été retiré de la solution de fixation, puis lavé dans l'eau.



**Figure 12 : Principales étapes utilisées pour l'analyse Western Blot des deux protéines : VASP et PKC $\delta$**

### **b. Cytométrie en flux**

Les mêmes échantillons préparés pour l'analyse Western Blot ont été utilisés pour la cytométrie en flux afin d'apprécier le taux d'expression de la P-sélectine chez les patients atteints par la forme sévère de la COVID-19.

#### *→ Matériel*

- ◆ **Tampon de marquage** en cytométrie de flux ou « **Staining Buffer** » ;
- ◆ **Tampon de perméabilisation** ou « **Permeabilization Buffer** » ;
- ◆ **Tampon de fixation intracellulaire** « **IC Fixation Buffer** » ;
- ◆ **Tampon salin phosphaté** : PBS-1X ;
- ◆ **Liquide de gaine** ;
- ◆ **Des anticorps primaires anti-P-sélectine** ;
- ◆ **Des anticorps secondaires spécifiques des anticorps primaires** ;

- ◆ Des isotypes contrôles pour s'assurer du bon cheminement de la manipulation ;
- ◆ Des pipettes ;
- ◆ Des tubes de 5ml ;
- ◆ Une centrifugeuse ;
- ◆ Un cytomètre de flux.

→ *Protocole de l'analyse*

L'analyse des niveaux d'expression de la P-sélectine dans les six échantillons plaquettaires a été effectuée en suivant ces étapes :

- 1) Préparer des échantillons par une solution saline au phosphate (PBS), permettant de perfectionner l'intensité de fluorescence des particules virales ;
- 2) Centrifuger les plaquettes à 1200 tr/min pendant 5 min, puis éliminer le surnageant et conservé le culot ;
- 3) Mettre le culot dans le tampon de liaison (1X) à une concentration de  $1 \times 10^6$  plaquette/mL ;
- 4) Transférer 100µl de la suspension dans un tube de 5mL ;
- 5) Dans le même tube, ajouter 5µl du tampon de marquage ;
- 6) Vortexer le mélange doucement puis incuber pendant 15 min à température ambiante et à l'obscurité ;
- 7) Un lavage a été effectué pour éliminer les plaquettes non marquées ;
- 8) À l'aide d'une pipette, ajouter 100 µl du tampon de fixation afin de fixer les cellules préalablement marquées, puis vortexer l'ensemble ;
- 9) Incuber le mélange obtenu à température ambiante dans l'obscurité pendant 20 min ;
- 10) Centrifuger à 2000 tr/min pendant 5 min à 4°C ;
- 11) Ajouter 1ml du tampon de perméabilisation ;
- 12) Centrifuger une deuxième fois à 2000 tr/min pendant 5 min à 4°C ;
- 13) Diluer les anticorps primaires ;
- 14) Ajouter 20 µl des anticorps primaires dilués dans le tampon de perméabilisation puis vortexer ;
- 15) Incuber les tubes dans l'obscurité pendant 20 min à température ambiante ;

- 16) Ajouter, à nouveau, 1 ml de tampon de perméabilisation ;
- 17) Centrifuger pendant 5 min à 1000 tr/min à 4°C ;
- 18) Suspendre la réaction en ajoutant dans 500 µl du tampon de fixation complétement à 2% de formaldéhyde ;
- 19) Analyser en cytométrie de flux.

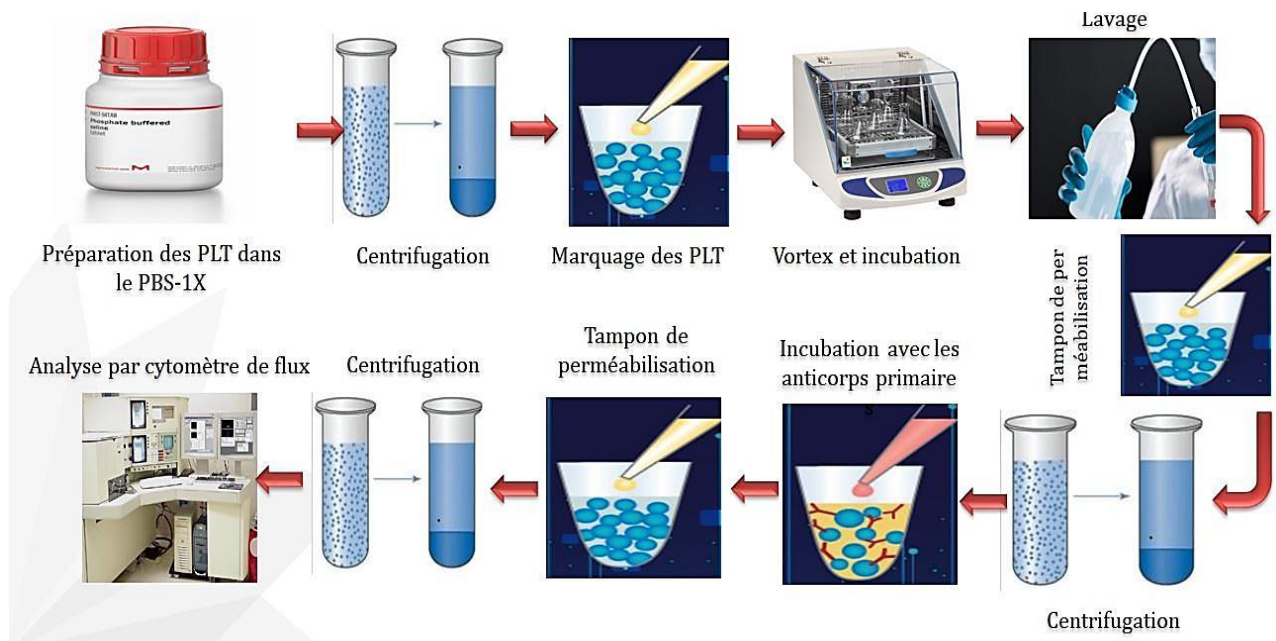


Figure 13 : protocole utilisé pour l'analyse de la P-sélectine par cytométrie en flux

### III. Résultats

#### 1. Western Blot

##### a. La PKC $\delta$

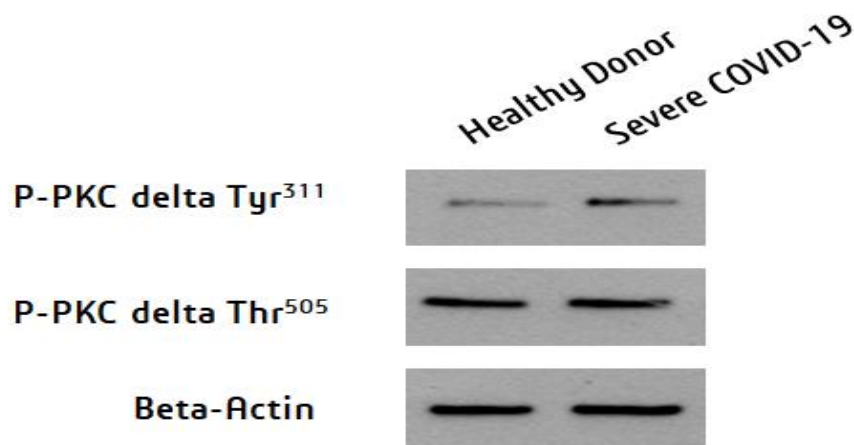


Figure 14 : Les niveaux de phosphorylation de la PKC $\delta$  sur deux sites différents (Tyr311 et Thr505) chez des patients ayant la COVID-19 sévères et chez des patients sains obtenus par analyse Western Blot.



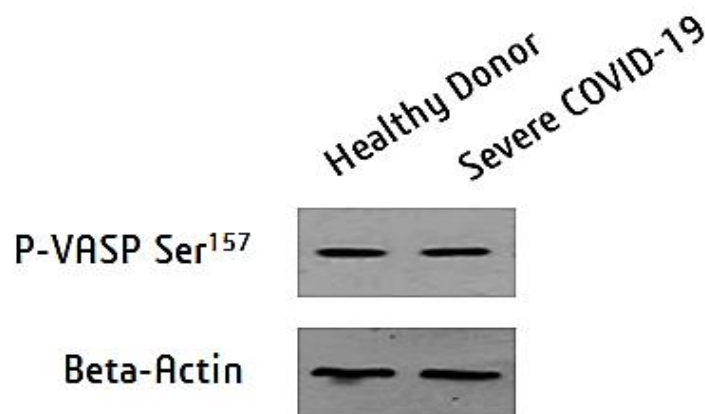
Comme il est susdit, cette étude a été réalisée sur deux cohortes distinctes : des donneurs sains et des patients qui ont développé la forme sévère de la COVID-19.

Les deux premières bandes sur la ligne une présentent les niveaux de phosphorylation de la PKC $\delta$  sur le site Tyr<sup>311</sup>. En effet, chez les sujets sains la PKC $\delta$  est très peu phosphorylée ou non phosphorylée (apparition des traces de bande de couleur très claire), par contre chez les patients COVID-19 sévères la PKC $\delta$  est phosphorylée au niveau de la Tyr<sup>311</sup> (apparition d'une bande plus sombre).

Cependant, pour le site de phosphorylation Thr<sup>505</sup>, on n'observe aucune différence des bandes entre les deux cohortes étudiées.

Pour le cas contrôle, les bandes sont les mêmes, ce qui confirme que la lyse des plaquettes et la récupération des protéines ont été bien faites.

### b. La P-VASP



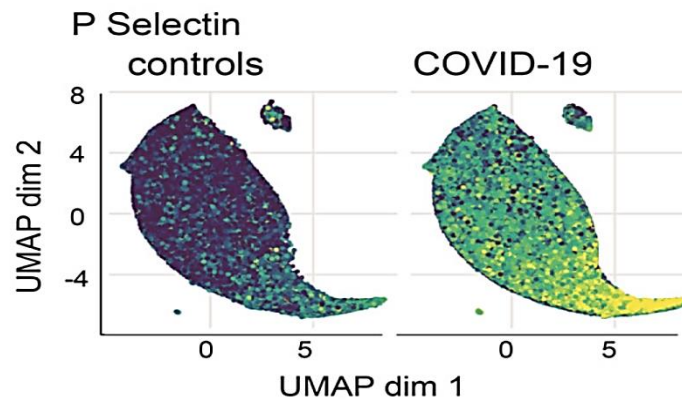
**Figure 15 : Les niveaux de phosphorylation de la P-VASP sur le site Ser157 chez des patients ayant la COVID-19 sévères et chez des patients sains obtenus par analyse Western Blot.**

Pour la deuxième protéine plaquettaire qu'on a analysé, la protéine VASP, en utilisant la même technique d'analyse et les mêmes plaquettes sanguines préalablement préparées et lysées les résultats obtenus montrent qu'il n'y a pas de différence dans le niveau de la phosphorylation de la protéine VASP entre les patients développant une COVID-19 sévère et les sujets sains.

En fait, on n'observe aucune différence entre la bande des patients donneurs sains et celle des patients atteints de la forme sévère de la COVID-19. De même, les bandes de l'anticorps contrôle, bêta actine, sont égales ce qui prouve que les protéines ont été déposées avec les mêmes quantités et donc la manipulation a été effectuée correctement.

## 2. Cytométrie en flux

Vu les conditions de la COVID-19, nous avons eu une suspension du stage et par conséquent nous n'avons pas pu réaliser la cytométrie en flux, c'est la raison pour laquelle nous avons pris les résultats de la littérature.



**Figure 16 : Comparaison des niveaux d'expression de la P-sélectine chez des patients COVID-19 et chez des donneurs sains.**

Les résultats de l'analyse des plaquettes par cytométrie en flux montrent que les niveaux de la P-sélectine sont très élevés chez les patients gravement atteints par la COVID-19, en comparaison avec les niveaux de cette protéine chez les patients développant la forme légère de la maladie et chez les sujets sains témoins.

## Chapitre III : Discussion

---

L'inflammation, la thrombose et l'hypercoagulation sont toutes des manifestations cliniques installées chez de nombreux patients suite à leur infection par le SRAS-CoV-2 avec des niveaux de gravité disparates pouvant aller jusqu'à la létalité des sujets infectés et, donc, la mise en évidence et la compréhension des effecteurs cellulaires et moléculaires impliqués dans l'aggravation de la COVID-19 peuvent aider à révéler de nouvelles approches thérapeutiques permettant de faire face aux complications graves de la maladie. Étant donné que les plaquettes sont capables d'interagir avec les virus, ils peuvent contribuer à l'inflammation, la thrombose et l'hypercoagulation, raison pour laquelle ils ont été examinés chez des patients développant la forme sévère de la COVID-19.

Concernant la protéine plaquettaire PKC $\delta$ , nos résultats ont confirmé ce qui a été, préalablement, démontré dans la littérature : la phosphorylation de la PKC $\delta$  au niveau du site Tyr<sup>311</sup> est augmenté chez les cas infectés par le SRAS-CoV-2. En effet, une étude menée sur deux groupes de 115 patients : 71 cas COVID 19 non sévère et 44 cas COVID 19 sévère a démontré, d'une part, une dégranulation des plaquettes lors d'une infection par le SRAS-CoV-2 indépendamment de la gravité de la maladie en utilisant des marqueurs de dégranulation plaquettaire notamment le PF4 et la sérotonine et, d'autre part, une augmentation de la phosphorylation de PKC $\delta$  sur le résidu Tyr<sup>311</sup> en réponse à une stimulation des plaquettes avec la thrombine [59]. Dans cette même étude, deux autres tests : l'agrégométrie optique et l'immunofluorescence à base de rhodamine ont conduit à suggérer que les plaquettes sont hyperactives et plus enclines à coaguler en cas d'atteinte sévère au SRAS-CoV-2 [59].

D'ailleurs, après avoir prouvé qu'un oligonucléotide anti-sens de la PKC $\alpha$ , nommé aprinocarsen, présente un potentiel inhibiteur de cette protéine aboutissant à une réduction de l'agrégation plaquettaire et la formation de thrombus, plusieurs études se sont orientées vers les autres kinases C, notamment la PKC $\delta$ , afin de chercher des nouvelles thérapies antiplaquettaires et anti-thrombotiques [57].

Cependant, les résultats qu'on a obtenus dans cette expérience ont exclu l'hypothèse d'une augmentation de la phosphorylation de la PKC $\delta$  au niveau du résidu Thr<sup>505</sup> chez les patients sévèrement atteints par la COVID-19. Ce résultat peut être dû au fait que la PKC $\delta$  ne nécessite pas de phosphorylation de la boucle d'activation Thr<sup>505</sup> pour assurer sa fonction

catalytique [73]. Pourtant, la phosphorylation de ce résidu peut être impliquée dans la régulation de l'activité de la PKC $\delta$  [74]. Néanmoins, l'étude réalisée par Rybin et son équipe et qui a pour objet d'examiner les contrôles de phosphorylation de PKC $\delta$  sur le site Thr<sup>505</sup> dans les cardiomyocytes, a fait preuve que la phosphorylation de PKC $\delta$ -Thr<sup>505</sup> augmente dynamiquement dans les cardiomyocytes traités avec le phorbol 12-myristate 13-acétate ou le 1-agoniste des récepteurs adrénergiques norépinéphrine [73].

De manière semblable, en utilisant comme matériel biologique les plaquettes sanguines issues de trois patients COVID-19 sévères et de trois sujets sains, et comme technique d'analyse le WESTERN BLOT, nous avons travaillé sur la corrélation de la phosphorylation de la protéine VASP à l'intérieur des plaquettes sur le résidu Ser<sup>157</sup> et la sévérité de la COVID -19, une hypothèse qui n'a pas été confirmée par les résultats. En revanche, d'autres études ont évalué la relation de la protéine VASP avec d'autres virus par exemple : l'Herpès simplex 1 en utilisant des méthodes d'analyse différentes.

En fait, ils ont commencé par l'infection des cellules MDCKII avec le virus de l'Herpès simplex 1 et ont déterminé les niveaux d'expression de VASP à différents moments après l'infection. Puis, dans les extraits protéiques de cellules MDCKII subconfluentes, ils ont utilisé un anticorps polyclonal anti-VASP qui reconnaît un doublet polypeptidique représentant la VASP non phosphorylée et la VASP phosphorylée sur la Ser<sup>157</sup> (p-Ser<sup>157</sup>-VASP). Ils ont trouvé que la p-Ser<sup>239</sup> et/ou p-Thr<sup>278</sup> de VASP migrent à la même masse moléculaire que la VASP non phosphorylée alors que la p-Ser<sup>157</sup>-VASP migre plus lentement [75].

Dans cette même étude, des extraits de protéines totales ont été analysés à partir de cellules collectées à l'aide de racloirs cellulaires (car le traitement à la trypsine augmente le niveau de p-Ser<sup>157</sup>-VASP), Les taux de VASP phosphorylée et non phosphorylée ont été déterminés dans ces extraits protéiques totaux de cellules infectées par un virus fictif (Mock) à 15, 30, 60 et 120 min après l'infection. Les protéines ont été résolues sur des gels de SDS-PAGE et l'expression de la VASP phosphorylée et non phosphorylée a été analysée avec des anticorps de lapin anti-VASP. Les cellules infectées et non infectées ont été fixées dans du paraformaldéhyde à 2 % et perméabilisées avec du paraformaldéhyde à 0,1 % de Triton X-100. La VASP phosphorylée a été colorée avec des anticorps monoclonaux de souris anti-p-Ser<sup>157</sup>-VASP (5C6), et visualisée par une IgG anti-souris conjuguée à Alexa Fluor [75].

Ils ont trouvé comme résultat que lorsque les cellules étaient infectées, les niveaux de p-Ser<sup>157</sup>-VASP diminuaient à 15 et à 30 min après l'infection, et ils augmentaient à 60 et 120 min après l'infection, tandis que la quantité totale de VASP est restée inchangée. Ils ont conclu, donc, que l'infection a modifié la phosphorylation de la VASP sur le résidu Ser<sup>157</sup>. Ainsi, des changements supplémentaires dans la phosphorylation de la VASP au niveau du site Ser<sup>239</sup> et/ou Thr<sup>278</sup> ne peuvent être exclus [75].

Comme la phosphorylation sur le Ser<sup>157</sup> contrôle la distribution subcellulaire de VASP dans les cellules endothéliales éparses, ils ont réalisé aussi des études d'immunofluorescence sur des cellules MDCKII pour analyser la localisation de VASP au cours de l'infection précoce. La coloration avec des anticorps anti-VASP n'a révélé aucune redistribution significative de la VASP dans les cellules MDCKII. Lorsque les cellules MDCKII ont été subconfluentes, elles se sont colorées avec des anticorps anti-p-Ser<sup>157</sup>-VASP, la protéine phosphorylée était enrichie au niveau des contacts cellule-cellule et des lamellipodes. De plus, une coloration diffuse (probablement non spécifique) du noyau a été observée. Ainsi, l'infection par HSV1 n'a pas modifié, de façon marquée, la localisation de VASP jusqu'à 120 min après l'infection [75].

D'une autre part, plusieurs études menées par des équipes scientifiques ont montré l'implication de la VASP dans la régulation négative des plaquettes. En effet, des souris déficientes en VASP (VASP <sup>-/-</sup>) ont été générés par recombinaison homologue, observés puis analysés dans ces expériences. L'observation de ces souris a montré un nombre de différences phénotypiques très limité ce qui peut être expliqué par la compensation des fonctions de la protéine VASP par les autres protéines de la famille Ena/VASP. Cependant, l'analyse profonde des souris VASP <sup>-/-</sup> a confirmé la présence d'une hyperplasie des mégacaryocytes dans la moelle osseuse et la rate [76].

Concernant les plaquettes, il n'ait aucune différence dans la numération plaquettaire entre les souris VASP <sup>-/-</sup> et les souris sauvages tandis que leur activation par la thrombine a engendré, chez les VASP <sup>-/-</sup>, une expression surfacique de la liaison de la P-sélectine et du fibrinogène deux fois plus élevée que celle des souris sauvages. Donc les résultats de cette expérience supportent l'hypothèse suggérant que la VASP joue le rôle d'un modulateur négatif de l'activation des plaquettes et que les souris déficientes en VASP peuvent être utilisés comme un système modèle captivant pour développer de nouvelles approches

thérapeutiques traitant les maladies dans lesquelles l'activation plaquettaire jouent un rôle prépondérant [76].

De nombreuses études ont montré que chez les patients diabétiques souffrant d'une activité prothrombotique accrue, une fibrinolyse altérée, une hyperactivité plaquettaire et une hypercoagulabilité totale, les taux de la P-sélectine dans le plasma se sont avérés élevés ce qui pousse à croire que la P-sélectine peut être responsable d'une activation plaquettaire accrue dans la thrombose veineuse profonde. De plus, la présence des taux plasmatiques élevés de la P-sélectine dans d'autres maladies a été confirmée, on cite parmi ces maladies : les maladies artérielles, les maladies coronariennes et l'ischémie cérébrale [33].

Étant donné que l'hyperactivation plaquettaire et l'hypercoagulabilité sont des manifestations très répandues chez les cas graves de la COVID-19, et puisque plusieurs recherches ont démontré une expression élevée de la P-sélectine dans des infections virales, y compris la grippe [33], nous avons focalisé sur l'analyse des taux d'expression de cette protéine lors de l'infection par le SARS-CoV-2. Pour ce fait, nous avons utilisé comme matériel biologique les plaquettes sanguines de 3 patients COVID-19 sévères et celles de 3 patients sains, et comme technique biologique d'analyse, nous nous sommes appuyés sur la Cytométrie de flux.

Les résultats qu'on a obtenus montrent que la P-sélectine est fortement exprimée chez les patients atteints de la forme sévère de la COVID-19 en comparaison avec ses taux d'expression chez les cas légèrement atteints et chez les sujets sains, ce qui permet de suggérer que la P-sélectine est, peut-être, un marqueur biologique de la forme grave de la maladie au nouveau coronavirus.

Ces résultats confirment ce qui a été mentionné dans la littérature ; en effet, une revue a examiné 20 études scientifiques, effectuées sur 936 cas et traitant les différents degrés d'implications de la P-sélectine dans la sévérité de la COVID-19.

Cinq parmi ces études ont montré que les niveaux de la P-sélectine se sont avérés élevés chez les patients COVID-19 hospitalisés dans l'unité de soins intensifs par rapport aux cas témoins, ainsi, le taux de mortalité liée à la COVID-19 est proportionnellement corrélé à l'élévation de l'expression de la P-sélectine [33].

Au surplus, de nombreuses complications associées à la COVID-19, y compris, les dommages myocardiques et la nécessité d'une ventilation mécanique, peuvent être prédits par

des niveaux de P-sélectine supérieurs à la médiane du groupe témoin ainsi que par d'autres marqueurs biologiques, particulièrement, l'expression du TF dépendante des plaquettes dans les monocytes. En fait, l'expression du TF est induite par les plaquettes préalablement stimulées par la P-sélectine ou par l'intégrine  $\alpha\text{IIb}/\beta 3$  [33].

Deux autres études n'ont montré aucune différence dans les niveaux d'expression de la P-sélectine chez les cas COVID-19 sévères en soins intensifs en comparaison avec des cas COVID-19 légère. Par contre ils se sont avérés élevés chez tous les patients par rapport aux cas témoins sains ce qui confirme que l'infection au SARS-CoV-2 influence les niveaux de la P-sélectine dans le plasma [33].

De même, chez les patients testés dans les autres études, les plaquettes circulantes et les neutrophiles sont fortement stimulés, et ont, donc, des niveaux considérablement plus élevés de la forme soluble de P-sélectine et de microparticules dérivées des neutrophiles, ce qui suggère qu'elles pourraient être utilisées comme simples indicateurs d'activation des plaquettes et des neutrophiles dans l'infection par le SRAS-CoV-2 [33].

Les résultats de notre expérience en plus de ce qui a été démontré dans la littérature existante actuellement sur le rôle de la P-sélectine dans l'évolution de l'infection au SARS-CoV-2, suggèrent que cette dernière pourrait être un biomarqueur précieux permettant de prédire les manifestations cliniques chez les patients COVID-19. Cependant, l'incohérence de certaines preuves existantes ainsi que la variabilité des tests utilisés dans chaque étude et l'absence de leur standardisation sont susceptibles de restreindre la pertinence de la P-sélectine en tant que biomarqueur de sévérité.

À partir de tous ces conclusions, on peut suggérer que les plaquettes sont en première ligne de la pathogenèse de la COVID-19, en raison de leur libération de divers ensembles de molécules au cours des différents stades de la maladie. Donc, ces éléments cellulaires contribuent, potentiellement, aux anomalies plaquettaires dans la COVID-19 telles que la thrombo-inflammation écrasante et l'hypercoagulabilité. Donc, l'inhibition des voies de signalisation liées à l'activation plaquettaire pourrait améliorer les résultats pendant l'infection par le SARS-CoV-2 en faisant face aux complications qui peuvent aggraver l'atteinte et engager le pronostic vital du patient [59].

D'ici, on peut suggérer que les médicaments ciblant l'activation et la mort des plaquettes pourraient être utiles dans le traitement des patients COVID-19. En effet, l'aspirine

est désormais recommandée dans de nombreuses revues comme un traitement efficace des complications thromboemboliques de la COVID-19. De même, certains agents antiplaquettaires prophylactiques, tels que Le dipyridamole, sont soit actuellement inclus dans les démarches thérapeutiques suivies pour la gestion des patients COVID-19, et d'autres sont en cours d'être testés cliniquement afin de confirmer ou d'exclure la possibilité de leur utilisation comme traitement lors de l'infection par le SARS-CoV-2 [33].



## Chapitre IV : Conclusion et perspectives

---

### Conclusion

L'atteinte par le nouveau coronavirus entraîne chez l'Homme des séquelles morbides, raison qui a poussé les scientifiques à démarrer plusieurs essais prospectifs à de grandes échelles afin de trouver des biomarqueurs fiables permettant la stratification des patients atteints par le SARS-CoV-2.

Dans le même ordre, cette étude a évalué l'utilité de trois protéines plaquettaires en tant que biomarqueurs d'une atteinte sévère par le SARS-CoV-2 ce qui donnera le potentiel de révéler les mécanismes à l'origine de l'hyperactivation plaquettaire et les séquelles qui en résultent au cours des différents stades de la COVID-19 et, donc, d'identifier de nouvelles voies thérapeutiques spécifiques visant à réduire les risques de l'installation de complications susceptibles de mener les patients atteints à la mort.

Les résultats qu'on a obtenus, montrent l'implication directe de la P-sélectine ainsi que la PKC $\delta$  phosphorylée au niveau du site Tyr<sup>311</sup> dans l'apparition des complications liées à l'activation plaquettaire au cours des différents stades de l'atteinte par la COVID-19.

Alors, une évaluation précoce des niveaux d'expression de ces deux protéines chez les cas infectés par le SARS-CoV-2 permettrait de les stratifier en fonction du degré de gravité de leurs symptômes et, donc, de déterminer la démarche thérapeutique appropriée à chaque patient et qui lui permet de se guérir tout en veillant à éviter l'évolution vers des complications graves pouvant engager le pronostic vital du patient.

### Perspectives

- Jusqu'à présent, le nombre de décès suite à l'infection par le SARS-CoV-2 est en augmentation continue à cause des complications qui entraînent des dysfonctionnements dans les différentes parties du corps humain, ce qui nécessite de faire beaucoup plus de recherches sur des biomarqueurs qui caractérisent chacune des complications de la COVID-19.
- La découverte des biomarqueurs plaquettaires de sévérité de la COVID-19 permettra de mieux comprendre le fonctionnement des plaquettes au cours de l'infection et

donnera la possibilité de moduler l'activité des plaquettes afin d'éviter les complications qui peuvent en résulter.

- Durant la réalisation de cette étude et dans le cadre du respect des mesures sanitaires, j'ai eu l'occasion de travailler seulement sur une petite cohorte. Mes perspectives sont de continuer à réaliser des recherches sur d'autres biomarqueurs tout en élargissant la cohorte des patients étudiés.

## Références

- [1] M. Kermali, R. K. Khalsa, K. Pillai, Z. Ismail, et A. Harky, « The role of biomarkers in diagnosis of COVID-19 – A systematic review », *Life Sci.*, vol. 254, p. 117788, août 2020, doi: 10.1016/j.lfs.2020.117788.
- [2] G. Ponti, M. Maccaferri, C. Ruini, A. Tomasi, et T. Ozben, « Biomarkers associated with COVID-19 disease progression », *Crit. Rev. Clin. Lab. Sci.*, vol. 57, n° 6, p. 389-399, août 2020, doi: 10.1080/10408363.2020.1770685.
- [3] S. Umakanthan *et al.*, « Origin, transmission, diagnosis and management of coronavirus disease 2019 (COVID-19) », *Postgrad. Med. J.*, vol. 96, n° 1142, p. 753-758, déc. 2020, doi: 10.1136/postgradmedj-2020-138234.
- [4] C. Contini *et al.*, « The novel zoonotic COVID-19 pandemic: An expected global health concern », *J. Infect. Dev. Ctries.*, vol. 14, n° 3, p. 254-264, mars 2020, doi: 10.3855/jidc.12671.
- [5] D. Kim, J.-Y. Lee, J.-S. Yang, J. W. Kim, V. N. Kim, et H. Chang, « The Architecture of SARS-CoV-2 Transcriptome », *Cell*, vol. 181, n° 4, p. 914-921.e10, mai 2020, doi: 10.1016/j.cell.2020.04.011.
- [6] N. Soraa et B. Bouzidi, « Enquête de la séro prévalence Covid 19 chez les donneurs de sang dans la région Marrakech-Safi », p. 98, 2020.
- [7] L. El Bahri, « COVID-19 ET SYSTEME CARDIOVASCULAIRE », p. 193, 2021.
- [8] S. Kannan, P. Shaik Syed Ali, A. Sheeza, et K. Hemalatha, « COVID-19 (Novel Coronavirus 2019) - recent trends », *Eur. Rev. Med. Pharmacol. Sci.*, vol. 24, n° 4, p. 2006-2011, févr. 2020, doi: 10.26355/eurrev\_202002\_20378.
- [9] « CHAPITRE38\_CORONAVIRUS\_TVM2019.pdf ». Consulté le: 27 février 2022. [En ligne]. Disponible sur: [https://www.sfm-microbiologie.org/wp-content/uploads/2020/04/CHAPITRE38\\_CORONAVIRUS\\_TVM2019.pdf](https://www.sfm-microbiologie.org/wp-content/uploads/2020/04/CHAPITRE38_CORONAVIRUS_TVM2019.pdf)
- [10] M. Nishiga, D. W. Wang, Y. Han, D. B. Lewis, et J. C. Wu, « COVID-19 and cardiovascular disease: from basic mechanisms to clinical perspectives », *Nat. Rev. Cardiol.*, vol. 17, n° 9, Art. n° 9, sept. 2020, doi: 10.1038/s41569-020-0413-9.
- [11] « COVID-19 : ce qu'il faut savoir ». <https://www.who.int/fr/emergencies/diseases/novel-coronavirus-2019/question-and-answers-hub/q-a-detail/coronavirus-disease-covid-19> (consulté le 18 mai 2021).

- [12] C. L. Atzrodt *et al.*, « A Guide to COVID-19: a global pandemic caused by the novel coronavirus SARS-CoV-2 », *FEBS J.*, vol. 287, n° 17, p. 3633-3650, sept. 2020, doi: 10.1111/febs.15375.
- [13] « Les symptômes (croquis), forum Vietnam », <https://www.expat.com/>.  
<https://www.expat.com/forum/viewtopic.php?id=887875> (consulté le 27 février 2022).
- [14] « Suivez la propagation de la COVID-19 à travers le monde », *Le Devoir*.  
[https://www.ledevoir.com/documents/special/20-03\\_covid19-carte-dynamique/index.html](https://www.ledevoir.com/documents/special/20-03_covid19-carte-dynamique/index.html) (consulté le 11 septembre 2021).
- [15] M. Daw, A. El-Bouzedi, M. Ahmed, C. Yebouk, et K. Dougman, « Spatial Distribution & Geographic mapping of COVID-19 in North Africa », juill. 2020, doi: 10.24966/CIIT-8844/1000032.
- [16] R. E. Kahkahi, M. Moustaine, M. Hafidi, R. Zouhair, et R. Errakhi, « Coronavirus disease (COVID-19) in Morocco: situation update and proposed remedial measures », *Germs*, vol. 10, n° 2, p. 129-131, juin 2020, doi: 10.18683/germs.2020.1197.
- [17] « Statistiques sur le coronavirus (COVID-19) - Aide Recherche Google ».  
[https://support.google.com/websearch/answer/9814707?p=cvd19\\_statistics&hl=fr-MA&visit\\_id=637670497048829170-384407982&rd=1](https://support.google.com/websearch/answer/9814707?p=cvd19_statistics&hl=fr-MA&visit_id=637670497048829170-384407982&rd=1) (consulté le 12 septembre 2021).
- [18] V. Bonny, A. Maillard, C. Mousseaux, L. Plaçais, et Q. Richier, « COVID-19 : physiopathologie d'une maladie à plusieurs visages », *Rev. Med. Interne*, vol. 41, n° 6, p. 375-389, juin 2020, doi: 10.1016/j.revmed.2020.05.003.
- [19] D. S. Battagello, G. Dragunas, M. O. Klein, A. L. P. Ayub, F. J. Velloso, et R. G. Correa, « Unpuzzling COVID-19: tissue-related signaling pathways associated with SARS-CoV-2 infection and transmission », *Clin. Sci. Lond. Engl. 1979*, vol. 134, n° 16, p. 2137-2160, août 2020, doi: 10.1042/CS20200904.
- [20] H. Valdes-Socin, J. Jouret François, et L. Vroonen, « VALDES-SOCIN Pandémie COVID19 RmLg 8.2020 », *Rev. Médicale Liège*, vol. 75, p. 123-129, nov. 2020.
- [21] J. P. Hussman, « Cellular and Molecular Pathways of COVID-19 and Potential Points of Therapeutic Intervention », *Front. Pharmacol.*, vol. 11, juill. 2020, doi: 10.3389/fphar.2020.01169.
- [22] L. Satre Buisson, « Coagulopathie associée au COVID-19 : les éléments essentiels pour l'anesthésiste-réanimateur », *Prat. En Anesth. Reanim.*, vol. 24, n° 4, p. 190-195, sept. 2020, doi: 10.1016/j.pratan.2020.07.007.

- [23] P. Canzano *et al.*, « Platelet and Endothelial Activation as Potential Mechanisms Behind the Thrombotic Complications of COVID-19 Patients », *JACC Basic Transl. Sci.*, vol. 6, n° 3, p. 202-218, mars 2021, doi: 10.1016/j.jacbts.2020.12.009.
- [24] M. Schiller *et al.*, « Coronavirus disease (COVID-19): observations and lessons from primary medical care at a German community hospital », *J. Community Hosp. Intern. Med. Perspect.*, vol. 10, n° 2, p. 81-87, mai 2020, doi: 10.1080/20009666.2020.1763079.
- [25] S. P. Comer *et al.*, « COVID-19 induces a hyperactive phenotype in circulating platelets », *PLoS Biol.*, vol. 19, n° 2, p. e3001109, févr. 2021, doi: 10.1371/journal.pbio.3001109.
- [26] M. d'Alessandro *et al.*, « Peripheral biomarkers' panel for severe COVID-19 patients », *J. Med. Virol.*, vol. 93, n° 3, p. 1230-1232, 2021, doi: <https://doi.org/10.1002/jmv.26577>.
- [27] Y. Tjendra *et al.*, « Predicting Disease Severity and Outcome in COVID-19 Patients: A Review of Multiple Biomarkers », *Arch. Pathol. Lab. Med.*, vol. 144, n° 12, p. 1465-1474, août 2020, doi: 10.5858/arpa.2020-0471-SA.
- [28] X. Yang *et al.*, « Clinical course and outcomes of critically ill patients with SARS-CoV-2 pneumonia in Wuhan, China: a single-centered, retrospective, observational study », *Lancet Respir. Med.*, vol. 8, n° 5, p. 475-481, mai 2020, doi: 10.1016/S2213-2600(20)30079-5.
- [29] M.-H. Ruchaud-Sparagano, « Etude structurale et fonctionnelle de la P-sélectine (CD62P) : une protéine exprimée par les plaquettes et les cellules endothéliales activées », These de doctorat, Lyon 1, 1995. Consulté le: 22 avril 2021. [En ligne]. Disponible sur: <https://www.theses.fr/1995LYO10168>
- [30] M. Lechaftois, « Rôle de la poly(ADP-ribose)polymérase dans l'activation et l'agrégation plaquettaire à la suite d'une ischémie cérébrale », These de doctorat, Paris 5, 2013. Consulté le: 22 avril 2021. [En ligne]. Disponible sur: <http://www.theses.fr/2013PA05P622>
- [31] « cavailles\_pierre\_p02.pdf ». Consulté le: 22 avril 2021. [En ligne]. Disponible sur: [http://unf3s.cerimes.fr/media/paces/Grenoble\\_1112/cavailles\\_pierre/cavailles\\_pierre\\_p02/cavailles\\_pierre\\_p02.pdf](http://unf3s.cerimes.fr/media/paces/Grenoble_1112/cavailles_pierre/cavailles_pierre_p02/cavailles_pierre_p02.pdf)
- [32] J. J. Jebali *et al.*, « Les sélectines: acteurs de l'adhérence cellulaire et potentiel cible thérapeutique », p. 17, 2011.
- [33] C. Agrati *et al.*, « The Role of P-Selectin in COVID-19 Coagulopathy: An Updated Review », *Int. J. Mol. Sci.*, vol. 22, n° 15, p. 7942, juill. 2021, doi: 10.3390/ijms22157942.

- [34] K. L. Moore, « Structure and function of P-selectin glycoprotein ligand-1 », *Leuk. Lymphoma*, vol. 29, n° 1-2, p. 1-15, mars 1998, doi: 10.3109/10428199809058377.
- [35] D. Bongiovanni *et al.*, « SARS-CoV-2 infection is associated with a pro-thrombotic platelet phenotype », *Cell Death Dis.*, vol. 12, n° 1, p. 50, janv. 2021, doi: 10.1038/s41419-020-03333-9.
- [36] J. Jebali *et al.*, « [Selectins as adhesion molecules and potential therapeutic target] », *Arch. Inst. Pasteur Tunis*, vol. 88, n° 1-4, p. 3-18, 2011.
- [37] N. R. Karki et A. Kutlar, « P-Selectin Blockade in the Treatment of Painful Vaso-Occlusive Crises in Sickle Cell Disease: A Spotlight on Crizanlizumab », *J. Pain Res.*, vol. 14, p. 849-856, mars 2021, doi: 10.2147/JPR.S278285.
- [38] C. Song, G. Wu, S. Chang, et L. Bie, « Plasma P-selectin level is associated with severity of coronary heart disease in Chinese Han population », *J. Int. Med. Res.*, vol. 48, n° 6, p. 0300060519896437, juin 2020, doi: 10.1177/0300060519896437.
- [39] S. D. Nguyen *et al.*, « Lysophosphatidylcholine in phospholipase A2-modified LDL triggers secretion of angiopoietin 2 », *Atherosclerosis*, vol. 327, p. 87-99, juin 2021, doi: 10.1016/j.atherosclerosis.2021.04.007.
- [40] T. Neri, D. Nieri, et A. Celi, « P-selectin blockade in COVID-19-related ARDS », *Am. J. Physiol. - Lung Cell. Mol. Physiol.*, vol. 318, n° 6, p. L1237-L1238, juin 2020, doi: 10.1152/ajplung.00202.2020.
- [41] F. Bornancin, « Phosphorylation of Protein Kinase C- $\alpha$  on Serine 657 Controls the Accumulation of Active Enzyme and Contributes to Its Phosphatase-resistant State », *Med. Sci. MS*, vol. 14, p. 322-325, mars 1998, doi: 10.1074/jbc.272.6.3544.
- [42] C. H. Benes, N. Wu, A. E. H. Elia, T. Dharia, L. C. Cantley, et S. P. Soltoff, « The C2 domain of PKCdelta is a phosphotyrosine binding domain », *Cell*, vol. 121, n° 2, p. 271-280, avr. 2005, doi: 10.1016/j.cell.2005.02.019.
- [43] M. Gschwendt, « Protein kinase C delta », *Eur. J. Biochem.*, vol. 259, n° 3, p. 555-564, févr. 1999, doi: 10.1046/j.1432-1327.1999.00120.x.
- [44] Q. Yang, J. C. Langston, Y. Tang, M. F. Kiani, et L. E. Kilpatrick, « The Role of Tyrosine Phosphorylation of Protein Kinase C Delta in Infection and Inflammation », *Int. J. Mol. Sci.*, vol. 20, n° 6, p. 1498, mars 2019, doi: 10.3390/ijms20061498.
- [45] U. Kikkawa, H. Matsuzaki, et T. Yamamoto, « Protein kinase C delta (PKC delta): activation mechanisms and functions », *J. Biochem. (Tokyo)*, vol. 132, n° 6, p. 831-839, déc. 2002, doi: 10.1093/oxfordjournals.jbchem.a003294.

- [46] K.-H. Chun, S.-J. Cho, J.-W. Lee, J. H. Seo, K.-W. Kim, et S.-K. Lee, « Protein kinase C- $\delta$  interacts with and phosphorylates ARD1 », *J. Cell. Physiol.*, vol. 236, n° 1, p. 379-391, janv. 2021, doi: 10.1002/jcp.29866.
- [47] « PRKCD (protein kinase C, delta) ». [http://atlasgeneticsoncology.org/Genes/GC\\_PRKCD.html](http://atlasgeneticsoncology.org/Genes/GC_PRKCD.html) (consulté le 23 août 2021).
- [48] W. Cho, « Membrane Targeting by C1 and C2 Domains \* », *J. Biol. Chem.*, vol. 276, n° 35, p. 32407-32410, août 2001, doi: 10.1074/jbc.R100007200.
- [49] K. Inagaki *et al.*, « Inhibition of delta-protein kinase C protects against reperfusion injury of the ischemic heart in vivo », *Circulation*, vol. 108, n° 19, p. 2304-2307, nov. 2003, doi: 10.1161/01.CIR.0000101682.24138.36.
- [50] S. Jaken et P. J. Parker, « Protein kinase C binding partners », *BioEssays News Rev. Mol. Cell. Dev. Biol.*, vol. 22, n° 3, p. 245-254, mars 2000, doi: 10.1002/(SICI)1521-1878(200003)22:3<245::AID-BIES6>3.0.CO;2-X.
- [51] E. C. Dempsey *et al.*, « Protein kinase C isozymes and the regulation of diverse cell responses », *Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol.*, vol. 279, n° 3, p. L429-438, sept. 2000, doi: 10.1152/ajplung.2000.279.3.L429.
- [52] R. A. Blake, P. Garcia-Paramio, P. J. Parker, et S. A. Courtneidge, « Src promotes PKCdelta degradation », *Cell Growth Differ. Mol. Biol. J. Am. Assoc. Cancer Res.*, vol. 10, n° 4, p. 231-241, avr. 1999.
- [53] J. H. Hurley et S. Misra, « Signaling and subcellular targeting by membrane-binding domains », *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.*, vol. 29, p. 49-79, 2000, doi: 10.1146/annurev.biophys.29.1.49.
- [54] V. O. Rybin, A. Sabri, J. Short, J. C. Braz, J. D. Molkenin, et S. F. Steinberg, « Cross-regulation of novel protein kinase C (PKC) isoform function in cardiomyocytes. Role of PKC epsilon in activation loop phosphorylations and PKC delta in hydrophobic motif phosphorylations », *J. Biol. Chem.*, vol. 278, n° 16, p. 14555-14564, avr. 2003, doi: 10.1074/jbc.M212644200.
- [55] T. A. DeVries, M. C. Neville, et M. E. Reyland, « Nuclear import of PKCdelta is required for apoptosis: identification of a novel nuclear import sequence », *EMBO J.*, vol. 21, n° 22, p. 6050-6060, nov. 2002, doi: 10.1093/emboj/cdf606.
- [56] A. Welman, J. R. Griffiths, A. D. Whetton, et C. Dive, « Protein kinase C delta is phosphorylated on five novel Ser/Thr sites following inducible overexpression in human colorectal cancer cells », *Protein Sci. Publ. Protein Soc.*, vol. 16, n° 12, p. 2711-2715, déc. 2007, doi: 10.1110/ps.072874607.

- [57] Y. Zaid, « Rôle de la PKC delta dans la fonction plaquettaire en réponse à la thrombine via le récepteur GPIb alpha », Thèse de doctorat, Université de Montréal, 2015. Consulté le: 24 août 2021. [En ligne]. Disponible sur: [https://papyrus.bib.umontreal.ca/xmlui/bitstream/handle/1866/13539/Zaid\\_Younes\\_2015\\_These.pdf?isAllowed=y&sequence=4](https://papyrus.bib.umontreal.ca/xmlui/bitstream/handle/1866/13539/Zaid_Younes_2015_These.pdf?isAllowed=y&sequence=4)
- [58] E. Liverani, M. J. Mondrinos, S. Sun, S. P. Kunapuli, et L. E. Kilpatrick, « Role of Protein Kinase C-delta in regulating platelet activation and platelet-leukocyte interaction during sepsis », *PloS One*, vol. 13, n° 4, p. e0195379, 2018, doi: 10.1371/journal.pone.0195379.
- [59] Y. Zaid *et al.*, « Platelets Can Associate with SARS-Cov-2 RNA and Are Hyperactivated in COVID-19 », *Circ. Res.*, sept. 2020, doi: 10.1161/CIRCRESAHA.120.317703.
- [60] P. Noguera, « Etude du rôle de la protéine VASP dans la dynamique et la mécanique des réseaux d'actine avec un système biomimétique de la motilité cellulaire », phdthesis, Université Pierre et Marie Curie - Paris VI, 2012. Consulté le: 1 septembre 2021. [En ligne]. Disponible sur: <https://tel.archives-ouvertes.fr/tel-00834288>
- [61] J. K. T. Wentworth, G. Pula, et A. W. Poole, « Vasodilator-stimulated phosphoprotein (VASP) is phosphorylated on Ser157 by protein kinase C-dependent and -independent mechanisms in thrombin-stimulated human platelets », *Biochem. J.*, vol. 393, n° Pt 2, p. 555-564, janv. 2006, doi: 10.1042/BJ20050796.
- [62] M. Zimmer *et al.*, « Cloning of the VASP (vasodilator-stimulated phosphoprotein) genes in human and mouse: structure, sequence, and chromosomal localization », *Genomics*, vol. 36, n° 2, p. 227-233, sept. 1996, doi: 10.1006/geno.1996.0457.
- [63] F. B. Gertler *et al.*, « enabled, a dosage-sensitive suppressor of mutations in the Drosophila Abl tyrosine kinase, encodes an Abl substrate with SH3 domain-binding properties », *Genes Dev.*, vol. 9, n° 5, p. 521-533, mars 1995, doi: 10.1101/gad.9.5.521.
- [64] C. Bachmann, L. Fischer, U. Walter, et M. Reinhard, « The EVH2 domain of the vasodilator-stimulated phosphoprotein mediates tetramerization, F-actin binding, and actin bundle formation », *J. Biol. Chem.*, vol. 274, n° 33, p. 23549-23557, août 1999, doi: 10.1074/jbc.274.33.23549.
- [65] K. Horstrup, B. Jablonka, P. Hönig-Liedl, M. Just, K. Kochsiek, et U. Walter, « Phosphorylation of focal adhesion vasodilator-stimulated phosphoprotein at Ser157 in intact human platelets correlates with fibrinogen receptor inhibition », *Eur. J. Biochem.*, vol. 225, n° 1, p. 21-27, oct. 1994, doi: 10.1111/j.1432-1033.1994.00021.x.



- [66] B. Harbeck, S. Hüttelmaier, K. Schluter, B. M. Jockusch, et S. Illenberger, « Phosphorylation of the vasodilator-stimulated phosphoprotein regulates its interaction with actin », *J. Biol. Chem.*, vol. 275, n° 40, p. 30817-30825, oct. 2000, doi: 10.1074/jbc.M005066200.
- [67] I. Jamai Amir, Z. Lebar, G. yahyaoui, et M. Mahmoud, « Covid-19 : virologie, épidémiologie et diagnostic biologique », *Option/Bio*, vol. 31, n° 619, p. 15-20, 2020, doi: 10.1016/S0992-5945(20)30178-1.
- [68] N. Soni, P. Pai, G. R. Krishna Kumar, V. Prasad, S. Dasgupta, et B. Bhadra, « A flow virometry process proposed for detection of SARS-CoV-2 and large-scale screening of COVID-19 cases », *Future Virol.*, août 2020, doi: 10.2217/fvl-2020-0141.
- [69] M. F. Clark, R. M. Lister, et M. Bar-Joseph, « ELISA techniques », in *Methods in Enzymology*, vol. 118, Academic Press, 1986, p. 742-766. doi: 10.1016/0076-6879(86)18114-6.
- [70] F. Chau, A. Lefort, et B. Fantin, « Intérêt et applications de la cytométrie de flux en bactériologie médicale », *Antibiotiques*, vol. 10, n° 4, p. 226-231, déc. 2008, doi: 10.1016/j.antib.2008.08.006.
- [71] K. M. McKinnon, « Flow Cytometry: An Overview », *Curr. Protoc. Immunol.*, vol. 120, p. 5.1.1-5.1.11, févr. 2018, doi: 10.1002/cpim.40.
- [72] T. S. Hawley et R. G. Hawley, *Flow Cytometry Protocols*. Springer Science & Business Media, 2004.
- [73] V. O. Rybin, J. Guo, Z. Gertsberg, H. Elouardighi, et S. F. Steinberg, « Protein Kinase C $\epsilon$  (PKC $\epsilon$ ) and Src Control PKC $\delta$  Activation Loop Phosphorylation in Cardiomyocytes \* », *J. Biol. Chem.*, vol. 282, n° 32, p. 23631-23638, août 2007, doi: 10.1074/jbc.M701676200.
- [74] A. Welman, J. R. Griffiths, A. D. Whetton, et C. Dive, « Protein kinase C delta is phosphorylated on five novel Ser/Thr sites following inducible overexpression in human colorectal cancer cells », *Protein Sci. Publ. Protein Soc.*, vol. 16, n° 12, p. 2711-2715, déc. 2007, doi: 10.1110/ps.072874607.
- [75] V. Jaeger *et al.*, « Herpes simplex virus type 1 entry into epithelial MDCKII cells: role of VASP activities », *J. Gen. Virol.*, vol. 91, n° Pt 9, p. 2152-2157, sept. 2010, doi: 10.1099/vir.0.021055-0.
- [76] W. Hauser *et al.*, « Megakaryocyte hyperplasia and enhanced agonist-induced platelet activation in vasodilator-stimulated phosphoprotein knockout mice », *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 96, n° 14, p. 8120-8125, juill. 1999.

