



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



**Année 2021**

**N° : MM0342021**

## **MEMOIRE DE MASTER**

**MASTER DE « BIOTECHNOLOGIE MÉDICALE »**  
**OPTION : « BIOMÉDICALE »**

Intitulé

**Évaluation de la fonction plaquettaire chez les sujets  
vaccinés (AstraZeneca)**

Soutenu par :

**Soukayna JABLI**

Date de soutenance :

**17/02/2022**

**Devant le jury composé de :**

**Pr. OUADGHIRI Mouna**, Faculté de Médecine et de Pharmacie-RABAT, Présidente

**Pr. BELLAOUI Hicham**, Faculté des Sciences- RABAT, Encadrant

**Pr. ZAID Younes**, Faculté des Sciences- RABAT, Co-encadrant

**Pr. OUMZIL Hicham**, Faculté de Médecine et de Pharmacie-RABAT, Examineur

# Remerciements

---

En tout premier lieu, je remercie Allah, tout puissant, de m'avoir donné la force, la patience et le courage pour mener à terme ma formation et pouvoir réaliser ce travail, ainsi que l'audace pour dépasser toutes les difficultés.

J'adresse ensuite mes vifs remerciements au **corps professoral du master Biotechnologie Médicale** pour leurs efforts et leur patience afin de réussir notre formation durant ces deux années d'études.

Je tiens, également, à exprimer ma profonde gratitude à mon Maître **Pr. IBRAHIMI Azeddine**, directeur du laboratoire de Biotechnologie Médicale à la Faculté de Médecine et de Pharmacie de Rabat pour sa contribution à notre formation et ses encouragements. Sa bonté, sa modestie et son dévouement au travail nous ont énormément marqué et nous servent d'exemple. Veuillez trouver ici l'expression de notre respectueuse considération et notre profonde admiration pour toutes vos qualités scientifiques et humaines.

J'adresse de chaleureux remerciements à mon encadrant **Pr. BELLAOUI Hicham** et mon Co-encadrant **Pr. ZAID Younes**, des professeurs à la Faculté des Sciences de Rabat qui ont fait l'honneur d'accepter de diriger ce travail. Merci, pour votre suivi tout au long de l'élaboration de ce travail et de m'avoir aidé avec patience et bienveillance malgré vos grandes occupations, vos orientations ont permis à ce travail de voir le jour et vos remarques judicieuses ont permis de le valoriser. Veuillez trouver ici, Messieurs, l'expression de ma sincère gratitude, et l'assurance de ma très haute considération.

Je remercie sincèrement **Pr. OUADGHIRI Mouna**, coordinatrice du Master Biotechnologie Médicale d'avoir bien voulu présider le jury. Veuillez accepter Madame, l'assurance de mon estime et de mon profond respect.

Mes sincères remerciements à Pr. **OUMZIL Hicham**, professeur à la Faculté de Médecine et de Pharmacie de Rabat, qui a fait l'honneur d'accepter de juger ce modeste travail, pour le temps apporté à la lecture et à l'évaluation de ce mémoire. Veuillez trouver ici l'expression de mes sincères gratitudes et mon grand respect.

# Dédicaces

---

Je dédie ce travail :

## À mes chers parents

À qui je dois tout, et pour qui aucun mot et aucune dédicace ne saurait exprimer ma considération, ma gratitude et mon profond amour pour les sacrifices que vous avez endurés pour mon éducation et mon bien-être. Vous n'avez jamais cessé de lutter. Je souhaite que vous trouviez dans ce travail le témoignage de ma vive reconnaissance. J'espère vous combler à mon tour.

## À mes chers frères Said et Nabil

Votre amour fraternel et votre soutien m'ont donné force et encouragement. J'implore Dieu qu'il vous apporte tout le bonheur et toute la réussite et vous aide à réaliser tous vos rêves. Veuillez accepter cette dédicace comme l'expression de mon fort et inlassable attachement.

## À ma chère grand-mère, paternelle lalla Khadija

Tes prières et ta bénédiction m'ont été d'un grand secours pour mener à bien mes études. J'implore Allah, le tout puissant de vous accorder santé et longue vie.

## À mes chères amies

En souvenir des moments agréables passés ensemble et pour l'amitié inconditionnelle qui nous réunit. Je suis vraiment chanceuse de vous avoir à mes côtés.

# Résumé

---

Le nouveau coronavirus SARS-CoV-2 a provoqué une pandémie mondiale avec des taux d'infections à 6 chiffres et des milliers de décès par jour. Des efforts considérables ont été déployés pour développer et mettre en œuvre des vaccins efficaces à un rythme étonnant. En un an, plusieurs types de vaccins ont été mis au point, et des milliards de doses ont été administrées. Bien que, les campagnes de vaccination massives ont permis d'atténuer considérablement cette pandémie, un événement thrombotique rare mais sévère avec thrombocytopenie a été signalé, notamment dans le contexte du vaccin ChAdOx1 nCoV-19 (AstraZeneca) basé sur un adénovirus de chimpanzé recombinant codant pour la protéine de pointe du SARS-CoV-2.

Par conséquent, cette étude visait, dans un premier temps, à mettre en évidence des modifications post-translationnelles subies par la PKC $\delta$  notamment l'augmentation de la phosphorylation au niveau du site Tyr311 par la méthode d'analyse western blot. Dans un deuxième temps, à mesurer la sécrétion plaquettaire d'une petite chimiokine dénommée le facteur plaquettaire 4 (PF4/CXCL4) à travers le test immuno-enzymatique Elisa et dernièrement, à évaluer l'agrégation plaquettaire par un agrégomètre optique à huit canaux. Cette analyse a été effectuée sur six participants dont trois sujets immunisés avec le vaccin Oxford/AstraZeneca et trois donneurs sains non vaccinés. Le niveau de phosphorylation de la PKC $\delta$  Tyr311, la sécrétion plaquettaire du PF4 et l'agrégation des thrombocytes ne différaient pas significativement entre les deux cohortes de sujets donneurs.

**Mots clés :** SARS-CoV-2, Vaccin, ChAdOx1 nCoV-19 (AstraZeneca), Plaquette, PKC $\delta$  Tyr311, Western blot, PF4, test Elisa, Agrégation plaquettaire, Agrégométrie optique.

# Abstract

---

Novel coronavirus SRAS-CoV-2 has caused a global pandemic with six-figure infection rates and thousands of deaths per day. Considerable efforts have been made to develop and implement effective vaccines at an amazing rate. Within a year, several types of vaccines were developed and billions of doses were administered. Although, massive vaccination campaigns have significantly mitigated this pandemic, a rare but severe thrombotic event with thrombocytopenia has been reported, particularly in the context of the ChAdOx1 nCoV-19 (AstraZeneca) vaccine based on a recombinant chimpanzee adenovirus vector encoding the spike protein of SRAS-CoV-2.

Therefore, this study aimed, first, to reveal post-translational modifications undergone by PKC $\delta$  especially phosphorylation at the Tyr311 site by western blot analysis. Secondly, to measure the secretion by platelets of a small chemokine called platelet factor 4 (PF4/CXCL4) using the Elisa test and lately, to evaluate platelet aggregation using an eight-channel optical aggregometer. This analysis was performed on six participants including three subjects immunized with Oxford/AstraZeneca vaccine and three unvaccinated healthy donors. The level of PKC $\delta$  Tyr311 phosphorylation, platelet secretion of PF4, and platelet aggregation did not differ significantly between the two cohorts of donor subjects.

**Keywords :** SRAS-CoV-2, Vaccine, ChAdOx1 nCoV-19 (AstraZeneca), Platelet, PKC $\delta$  Tyr311, Western blot, PF4, Elisa test, Platelet aggregation, Platelet aggregometry.

## ملخص

تسبب فيروس كورونا المستجد « سارس-كوف-2 » في حدوث جائحة عالمية بمعدلات إصابة مرتفعة وآلاف الوفيات يوميا ، في هذا الصدد ، بُدلت جهود كبيرة لتطوير وتنفيذ لقاحات فعالة بوتيرة مذهلة ، فخلال عام واحد فقط، تم تطوير عدة أنواع من اللقاحات، وتم إعطاء ملايين الجرعات. على الرغم من أن هذه الحملات التطعيمية المكثفة قد خففت بشكل كبير من هذا الوباء، إلا أنه تم الإبلاغ عن حدوث جلطات نادرة لكنها خطيرة مع قلة الصفائح الدموية، على وجه الخصوص بعد لقاح أسترازينيكا القائم على ناقل فيروسي قردي مُضعف الانتساخ يحوي التسلسل المرمز مُحسن الشيفرات كامل الطول لبروتين الحسكة (البروتين البارز من الغلاف) الموجود في فيروس سارس-كوف-2.

لذلك، هدفت هذه الدراسة بداية، إلى تسليط الضوء على التعديلات التي خضعت لها ما بعد الترجمة بروتين كيناز سي دلتا، على وجه الخصوص، الزيادة في الفسفرة في موقع Tyr311 بطريقة لطخة ويسترن. ثانياً، لقياس إفراز مادة كيميائية صغيرة من طرف الصفائح الدموية التي تدعى عامل الصفائح الدموية 4 (PF4 / CXCL4) من خلال تحليل الإليزا . وأخيراً، لتقييم تكدُّس الصفائح الدموية باستخدام اُختِيارُ تكدُّس الصفِّحات. في المجمل تم إجراء هذه الدراسة على ستة مشاركين بما في ذلك ثلاثة أشخاص تلقوا لقاح أسترازينيكا وثلاثة متبرعين أصحاء غير محصنين. في الأخير، لم يختلف بشكل كبير مستوى الفسفرة لبروتين كيناز سي دلتا في موقع Tyr311 و تحرير عامل الصفائح الدموية 4 من طرف الصفائح، كذلك تكدُّس الصفِّحات بين المجموعتين : الملقحين والأصحاء الغير الملقحين.

**كلمات مفتاحية :** سارس-كوف-2، لقاح، لقاح أسترازينيكا، الصفائح، بروتين كيناز سي دلتا Tyr311، لطخة ويسترن، عامل الصفائح الدموية 4، تحليل الإليزا، تكدُّس الصفائح الدموية، اُختِيارُ تكدُّس الصفِّحات.

# Liste des figures

---

|   |    |
|---|----|
| <b>Figure 1 :</b> Étapes de développement d'un vaccin.....  | 18 |
| <b>Figure 2 :</b> Phases de production d'un vaccin dans la situation normale (non pandémique) et lors d'une menace pandémique accélérée de type COVID-19 .....  | 19 |
| <b>Figure 3 :</b> Nombre de vaccins en essai préclinique et clinique développés contre la COVID-19.....   | 20 |
| <b>Figure 4 :</b> Différents types de technologies vaccinales développés pour la maladie COVID-19 .....   | 20 |
| <b>Figure 5 :</b> Mécanisme d'action du vaccin à vecteur d'adénovirus (ChAdOx1 nCov-19).....  | 25 |
| <b>Figure 6 :</b> Vaccin contre la COVID-19 AstraZeneca.....  | 27 |
| <b>Figure 7 :</b> Pays ayant suspendu temporairement l'utilisation du vaccin AstraZeneca, 16 mars 2021 .....  | 31 |
| <b>Figure 8 :</b> Rôle centrale du PF4 dans la thrombopénie induite par l'héparine (TIH) et la TIH auto-immune .....  | 34 |
| <b>Figure 9 :</b> Physiopathologie proposée de la thrombocytopénie thrombotique immunitaire induite par le vaccin (VITT) .....  | 36 |
| <b>Figure 10 :</b> Étapes d'adhésion et début de l'activation plaquettaire .....  | 38 |
| <b>Figure 11 :</b> Phases successives de la formation d'un thrombus blanc : adhésion, activation, sécrétion et agrégation des plaquettes.....   | 41 |
| <b>Figure 12 :</b> Structure du PF4 .....   | 43 |
| <b>Figure 13 :</b> Structure des trois principales classes de protéines kinases C (PKC) avec leurs activateurs respectifs.....  | 45 |
| <b>Figure 14 :</b> Différentes phases obtenues après la première centrifugation du sang .....   | 52 |
| <b>Figure 15 :</b> Méthode d'analyse western blot .....   | 58 |
| <b>Figure 16 :</b> Test Elisa pour la détermination quantitative du PF4 .....   | 61 |
| <b>Figure 17 :</b> Thrombo-agrégomètre TA 4V SD Medical.....  | 62 |
| <b>Figure 18 :</b> Principe de l'agrégométrie optique .....   | 63 |
| <b>Figure 19 :</b> Comparaison des niveaux de phosphorylation de la PKC $\delta$ au résidu Tyr311 chez des sujets vaccinés avec AstraZeneca et chez des sujets sains non immunisés obtenus par la méthode western blot..... | 66 |
| <b>Figure 20 :</b> Détermination quantitative du PF4 sécrété par les plaquettes chez les sujets vaccinés avec Oxford/AstraZeneca et chez les donneurs sains non vaccinés.....   | 67 |

**Figure 21 :** *Tracés d'agrégation plaquettaire par transmission lumineuse des sujets vaccinés avec AstraZeneca et des sujets sains non vaccinés en réponse à un agoniste plaquettaire ...68*



## Liste des tableaux

---

|   |           |
|---|-----------|
| <i>Tableau 1 : Principales caractéristiques des vaccins anti-COVID-19 autorisés par l’OMS .</i>                     | <b>21</b> |
| <i>Tableau 2 : Doses de vaccin anti-COVID-19 administrées dans les pays africains jusqu’à 28 février 2021 .....</i> | <b>24</b> |
| <i>Tableau 3 : Incidence de la VITT après la vaccination avec AstraZeneca.....</i>                                  | <b>32</b> |
| <i>Tableau 4 : Principaux substances libérées par les granules denses et alpha ainsi que leurs propriétés .....</i> | <b>40</b> |
| <i>Tableau 5 : Distribution tissulaire et facteurs d’activation requis pour les PKCs .....</i>                      | <b>46</b> |
| <i>Tableau 6 : Tampon HBSS complet .....</i>  | <b>50</b> |
| <i>Tableau 7 : Tampon citrate HBSS.....</i>   | <b>51</b> |
| <i>Tableau 8 : Gel de résolution .....</i>  | <b>53</b> |
| <i>Tableau 9 : Gel d’empilement .....</i>   | <b>54</b> |

# Liste des abréviations

---

- **Ac** : Anticorps
- **ACD** : Citrate dextrose anticoagulant
- **ACE2** : Enzyme de conversion de l'angiotensine 2
- **ADN** : Acide désoxyribonucléique
- **ADP** : Adénosine diphosphate
- **Ad26** : Adénovirus humain de type 26
- **Ad26.COV2.S** : Vaccin contre la COVID-19 à base d'adénovirus de Johnson & Johnson/Janssen
- **Ad5** : Adénovirus humain de type 5
- **Ad5-nCoV** : Vaccin à base d'adénovirus de CanSino
- **AMPc** : Adénosine monophosphate cyclique
- **APS** : Ammonium persulfate solution
- **ARN** : Acide ribonucléique
- **ARNm-1273** : Vaccin COVID-19 à base d'ARNm de Moderna
- **ATP** : Adénosine triphosphate
- **AZD1222** : Vaccin AstraZeneca
- **BBIBP-CorV** : Vaccin COVID-19 à virus inactivé de Sinopharm
- **BBV152** : Vaccin COVID-19 à virus inactivé de Bharat Biotech
- **BNT162b2** : Vaccin COVID-19 à base d'ARNm de Pfizer-BioNTech
- **BSA** : Albumine de sérum bovin
- **CAT** : Thrombogramme automatisé calibré
- **CD40L** : Ligand du CD40
- **CI** : PF4 Contrôle I

- **CII** : PF4 Contrôle II
- **Ca<sup>2+</sup>** : Calcium
- **CaCl<sub>2</sub>** : Chlorure de calcium
- **CAR+** : Récepteur de coxsackievirus et d'adénovirus positif
- **CD** : Diluant pour immunoconjugué
- **CD39** : Clusters de différenciation 39
- **CH** : Chimiotine
- **ChAdOx1 nCov-19** : Vaccin COVID-19 à base d'adénovirus d'Oxford-AstraZeneca
- **ChAdOx1-S** : Vecteur d'adénovirus simien déficient en réplication
- **CK** : Cytokine
- **COVID-19** : Maladie causée par une infection par le coronavirus 2 du syndrome respiratoire aigu sévère
- **CRP** : Protéine C réactive
- **CXCL4** : Ligand 4 de la chimiotine (motif C-X-C)
- **C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>Na<sub>3</sub>O<sub>7</sub>·2H<sub>2</sub>O** : Citrate trisodique dihydrate
- **DAG** : Diacylglycérol
- **ddH<sub>2</sub>O** : Eau bidistillée
- **ECL** : Chimiluminescence renforcée
- **ELISA** : Technique de dosage d'immunoabsorption par enzyme liée
- **EMA** : Agence Européenne des Médicaments
- **ETA** : Événements thrombotiques artériels
- **ETV** : Événements thrombotiques veineux
- **FcR** : Récepteur Fc
- **FcγRIIa** : Fragment Fc du récepteur IIa de l'immunoglobuline G
- **Fg** : Fibrinogène

- **FVW** : Facteur de Von Willebrand
- **GAG** : Glycoaminoglycanes
- **GP** : Glycoprotéine
- **GPIa/IIa** : Complexe de glycoprotéine Ia/ IIa (GPIa/IIa = intégrine  $\alpha_2\beta_1$ )
- **GPIba** : Glycoprotéine Iba
- **GPIb $\beta$**  : Glycoprotéine Ib $\beta$
- **GPIb-IX-V** : Complexe de glycoprotéine Ib-IX-V
- **GPIIb/IIIa** : Complexe d'intégrine formé des deux glycoprotéines (GPIIb et GPIIIa)
- **GPV** : Glycoprotéine V
- **GPVI** : Glycoprotéine VI
- **GPIX** : Glycoprotéine IX
- **HBSS** : Solution saline équilibrée de Hank
- **HCl** : Acide chlorhydrique
- **HEK 293** : Cellules embryonnaires humaines du rein 293
- **HEPES** : Acide 4-(2-hydroxyéthyl)-1-pipérazine éthane sulfonique
- **HRP** : Peroxydase de raifort
- **H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>** : Eau oxygénée
- **IC** : Immunoconjugué
- **IC** : Intervalle de confiance
- **IFN- $\gamma$**  : Interféron gamma
- **IgA** : Immunoglobuline A
- **IgG** : Immunoglobuline G
- **IL** : Interleukine
- **KCl** : Chlorure de potassium
- **KDa** : kilo dalton

- **KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>** : Phosphate de potassium monobasique
- **LTA** : Transmission lumineuse
- **MHRA** : Agence britannique de réglementation des médicaments et des produits de santé
- **MgSO<sub>4</sub>.7 H<sub>2</sub>O** : Sulfate de magnésium heptahydraté
- **NaCl** : Chlorure de sodium
- **NaHCO<sub>3</sub>** : Bicarbonate de sodium
- **Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O** : Heptahydratedibasicsodium Phosphate
- **Ng** : Nanogramme
- **NO** : Monoxyde d'azote
- **OD** : Densité optique
- **OMS** : Organisation Mondiale de la Santé
- **PAR1** : Récepteurs activés par des protéases 1
- **PAR4** : Récepteurs activés par des protéases 4
- **PDK1** : Protéine kinase 3-phosphoinositide-dépendante
- **PF4** : Facteur plaquettaire 4
- **PGE1** : Prostaglandine E1
- **PKC** : Protéine kinase C
- **PKCa** : Protéine kinase C atypique
- **PKCc** : Protéine kinase C conventionnelle
- **PKCn** : Protéine kinase nouvelle
- **PLC** : Phospholipase C
- **PPP** : Plasma pauvre en plaquettes
- **PRP** : Plasma riche en plaquettes
- **PS** : Phosphatidylsérine

- **PTI** : Purpura thrombopénique idiopathique
- **PVS** : Polyvinylsulfonate polyanionique
- **P2Y12 et P2Y1** : Récepteurs de l'ADP
- **RACK** : Récepteur de la protéine kinase C activée
- **RPM** : Rotations par minute
- **RU** : Royaume-Uni
- **SA** : Acide sulfurique
- **SARS-CoV-2** : Coronavirus 2 du syndrome respiratoire aigu sévère
- **SD** : Diluant échantillon
- **Ser** : Sérine
- **SDS 10%** : Solution de dodécylsulfate de sodium 10 %
- **SFC** : Syndrome de fuite capillaire
- **SIG** : Petits gènes inductibles
- **TBS-Tween** : Un mélange de solution saline tamponnée au tri et de polysorbate 20
- **TEMED** : Tétraméthyléthylènediamine
- **TGF- $\beta$**  : Facteur de croissance transformant beta
- **Thr** : Thréonine
- **TIH** : Thrombopénie induite par l'héparine
- **TLR4** : Toll Like Receptor 4
- **TMB** : 3,3', 5,5' – Tétraméthylbenzidine
- **TNF  $\alpha$**  : Facteur de nécrose tumorale de type  $\alpha$
- **TRAP-6** : Peptide-6 activateur du récepteur de la thrombine
- **TRIS** : Trisaminométhane, ou 2-amino-2-hydroxyméthylpropane-1,3-diol
- **TSVC** : Thrombose des sinus veineux cérébraux
- **TVC** : Thromboses veineuses cérébrales

- **TXA2** : Thromboxane A2
- **Tyr311** : Tyrosine 311
- **UE** : Union Européenne
- **VIH-1** : virus de l'immunodéficience humaine
- **VITT** : Thrombocytopénie thrombotique immunitaire induite par un vaccin
- **WS** : Washing solution

# Table des matières

---

|  |           |
|--|-----------|
| <b>Résumé.....</b>   | <b>1</b>  |
| <b>Abstract .....</b>  | <b>2</b>  |
| <b>ملخص .....</b>  | <b>3</b>  |
| <b>Chapitre I : Revue bibliographique.....</b>   | <b>17</b> |
| <b>I. Vaccins anti-COVID-19 .....</b>  | <b>18</b> |
| 1. Développement du vaccin.....  | 18        |
| 2. Vaccins autorisés contre le SARS-COV-2.....   | 21        |
| 3. État des lieux des populations vaccinées contre la COVID-19 à l'échelle nationale et internationale ..... | 22        |
| a. À l'échelle mondiale .....  | 22        |
| b. Au Maroc .....  | 23        |
| <b>II. Vaccin ChAdOx1 nCoV-19 (Oxford/AstraZeneca) .....</b>   | <b>24</b> |
| 1. Aperçu sur les vaccins à vecteur viral recombinant .....  | 24        |
| 1. Caractéristiques générales du vaccin AstraZeneca .....  | 26        |
| a. Composition .....   | 26        |
| b. Administration.....   | 27        |
| c. Efficacité .....  | 27        |
| d. Immunogénicité .....  | 28        |
| e. Contre-indications .....  | 29        |
| f. Précautions d'emploi.....   | 29        |
| <b>III. VITT signalée après la vaccination avec Oxford/AstraZeneca .....</b>                                 | <b>30</b> |
| 1. Politique vaccinale .....   | 30        |
| 1. Incidence .....   | 32        |
| 2. Physiopathologie .....  | 33        |
| <b>IV. Généralité sur l'hémostase et rôle des plaquettes .....</b>   | <b>36</b> |
| 1. Rappel sur l'hémostase .....  | 36        |
| 2. Rôle des plaquettes dans l'hémostase .....  | 37        |
| a. Adhésion plaquettaire.....  | 37        |
| b. Activation plaquettaire .....   | 38        |
| c. Sécrétion plaquettaire .....  | 39        |
| d. Agrégation plaquettaire .....   | 40        |
| <b>V. Facteur plaquettaire 4 et protéines kinases C dans les plaquettes .....</b>                            | <b>41</b> |



|   |           |
|---|-----------|
| 1. Facteur plaquettaire 4 (PF4/CXCL4) .....                     | 41        |
| a. Généralité .....   | 42        |
| b. Structure .....  | 42        |
| c. Activité biologique .....                                    | 43        |
| 2. Protéines kinases C (PKC) dans les plaquettes .....          | 44        |
| a. Classification et structure des PKC .....                    | 44        |
| b. Localisation et maturation des PKC .....                     | 45        |
| c. Phosphorylation et activation des PKC .....                  | 46        |
| d. Rôle de la PKC $\delta$ dans l'activation plaquettaire ..... | 47        |
| <b>Chapitre II : Matériel et méthodes .....</b>                 | <b>49</b> |
| <b>I. Phase préanalytique .....</b>                             | <b>50</b> |
| 1. Matériel .....   | 50        |
| 2. Solutions et réactifs .....                                  | 50        |
| 3. Collecte de sang .....                                       | 51        |
| 4. Isolation du PRP (plasma riche en plaquettes) .....          | 51        |
| 5. Lavage et préparation des plaquettes .....                   | 52        |
| <b>II. Phase analytique .....</b>                               | <b>53</b> |
| 1. Western blot .....   | 53        |
| 2. Test Elisa .....   | 59        |
| 3. Agrégométrie optique .....                                   | 61        |
| <b>Chapitre III : Résultats .....</b>                           | <b>65</b> |
| <b>I. Western blot .....</b>                                    | <b>66</b> |
| <b>II. Test Elisa .....</b>                                     | <b>66</b> |
| <b>III. Agrégométrie optique .....</b>                          | <b>67</b> |
| <b>Chapitre IV : Discussion .....</b>                           | <b>69</b> |
| <b>Chapitre V : Conclusion et perspectives .....</b>            | <b>74</b> |
| <b>Conclusion .....</b>   | <b>75</b> |
| <b>Perspectives .....</b>                                       | <b>76</b> |
| <b>Références bibliographiques .....</b>                        | <b>77</b> |

# Introduction

---

La COVID-19 est une maladie infectieuse due à un nouveau coronavirus : le SARS-CoV-2 (Severe acute respiratory syndrome coronavirus 2), elle est apparue en décembre 2019 à Wuhan, Province du Hubei en Chine. L'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) a déclaré la maladie comme une pandémie mondiale le 11 mars 2020, avec installation obligatoire, dans plusieurs pays, d'interventions préventives rigoureuses telles que le confinement à domicile, la distanciation sociale, la fermeture des écoles, le port obligatoire du masque et le dépistage des cas contacts [1] [2].

Depuis le début de la pandémie COVID-19 jusqu'à la fin du mois d'octobre 2021, ce virus hautement transmissible a infecté plus de **244 millions** personnes dans le monde, entraînant plus de **4,8 millions** de décès. Au Maroc, le SARS-COV-2 a infecté plus de **956 119** personnes et au moins **14 828** de décès. Le besoin de solutions de protection et en particulier d'un vaccin sûr et efficace constitue une priorité incontournable. En effet, les communautés scientifiques du monde entier ont travaillé avec rigueur pour développer un vaccin puissant en utilisant des stratégies vaccinales conventionnelles et nouvelles. En juillet 2021, l'OMS a déclaré plus de 200 candidats vaccins contre la COVID-19 dont 104 sont en essais cliniques et 184 en phases précliniques. Parmi les 104 candidats-vaccins anti-COVID-19 en essais cliniques, 6 ont été approuvés par l'OMS [3] [4] [5].

Jusqu'à le mois de janvier 2022, plus de **8 milliards** doses du vaccin anti-SARS COV-2 ont été administrées dans le monde et **592 millions** doses que du vaccin Oxford/AstraZeneca ont été injectées. En effet, ce vaccin est basé sur un adénovirus de chimpanzé recombinant codant pour la glycoprotéine de pointe S du SARS-CoV-2, développé par l'Université d'Oxford au Royaume-Uni et la société pharmaceutique suédoise AstraZeneca avec une efficacité globale de 70,4 %. En février 2021, l'OMS a recommandé l'utilisation de ChAdOx1 nCov-19 pour l'immunisation active des adultes de 18 ans ou plus avec une recommandation d'administration de deux doses dans un intervalle de 4 à 12 semaines [6] [7] [8].

À partir de fin février 2021, plusieurs cas d'événements thrombotiques inhabituels associés à une thrombopénie dénommés thrombocytopenie thrombotique immunitaire induite par un vaccin (VITT) ont été observés chez les patients récemment vaccinés avec ChAdOx1 nCov-19. Des études récentes ont rapporté que la VITT était associée à des anticorps IgG qui reconnaissent le facteur plaquettaire 4 (PF4), activent les plaquettes via leurs récepteurs Fcγ et

imite cliniquement la thrombopénie induite par l'héparine (TIH). L'incidence de cet évènement thrombotique était de **1 503 sur 592 millions** d'injections du vaccin Oxford/AstraZeneca [9] [7].

L'objectif de mon travail est d'évaluer l'activation, la sécrétion et l'agrégation des plaquettes chez les sujets vaccinés avec Oxford/AstraZeneca en utilisant respectivement, la méthode d'analyse western blot, le test immuno-enzymatique Elisa et l'agrégométrie optique.

En premier lieu, l'analyse de l'activation plaquettaire par le western blot est focalisée sur la protéine Kinase C-delta (PKC $\delta$ ) pour mettre en évidence des modifications post-translacionnelles subies par cette protéine en utilisant un anticorps anti-phospho-PKC $\delta$  Tyr311 approprié chez des sujets vaccinés avec ChAdOx1 nCov-19 et leur comparaison avec celles des individus sains non vaccinés (témoins).

En deuxième lieu, les taux du facteur plaquettaire (PF4) sécrété par les thrombocytes chez les sujets immunisés avec Oxford/AstraZeneca sont comparés à ceux des individus sains non vaccinés par la technique immuno-enzymatique Elisa.

En dernier lieu, l'agrégation plaquettaire est évaluée par un agrégomètre optique à huit canaux sur un plasma riche en plaquettes (PRP) chez des sujets qui ont reçu le vaccin suédo-britannique AstraZeneca et chez des témoins.

# **Chapitre I :**

## **Revue bibliographique**

## I. Vaccins anti-COVID-19

### 1. Développement du vaccin

Un vaccin contre la COVID-19 avant d'être mis sur le marché doit passer essentiellement par cinq grandes étapes [10].

D'abord, des études précliniques sur des modèles animaux qui fournissent des informations sur les effets protecteurs, la reconnaissance des antigènes, la sécurité et les aspects toxicologiques du vaccin. Puis, des essais de phase I qui visent généralement à trouver la meilleure posologie de vaccin avec peu ou pas d'effets secondaires. Les études de phase II sont des essais contrôlés randomisés réalisés sur des centaines de sujets pour étudier, l'innocuité, l'immunogénicité, le calendrier des vaccinations et les doses proposées ainsi que la méthode d'administration du vaccin candidat. La durée de ces études peut aller jusqu'à deux ans et environ 33% des vaccins candidats passent en phase III. Les études de cette phase sont des essais randomisés en double aveugle contrôlés par placebo, réalisés sur une grande échelle et pendant une longue durée pour étudier l'efficacité et la tolérance du vaccin. Enfin, après la mise sur le marché, les études de phase IV permettent de contrôler en permanence l'innocuité et l'immunogénicité des vaccins candidats (figure 1) [10] [11].

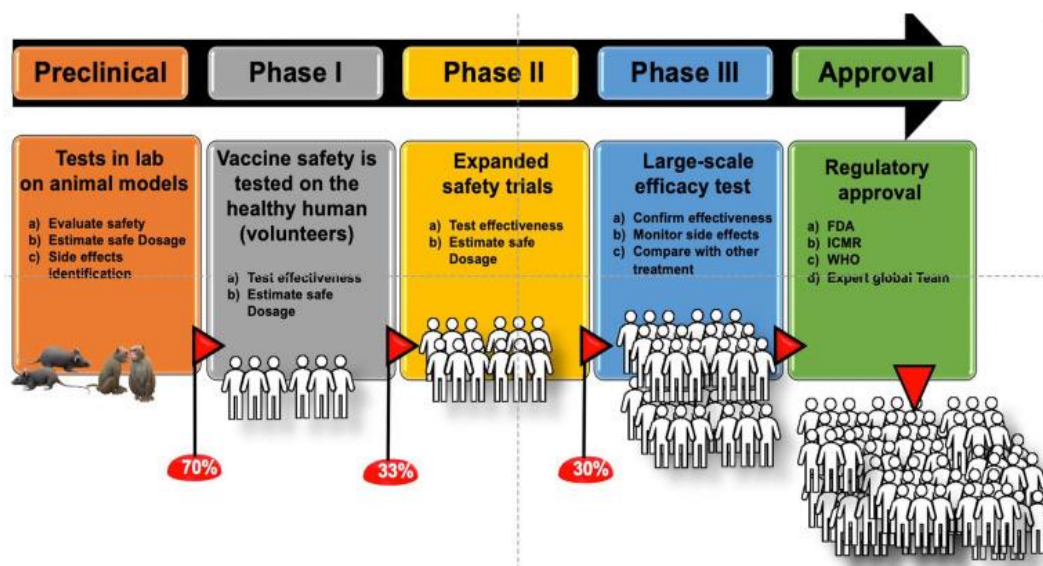
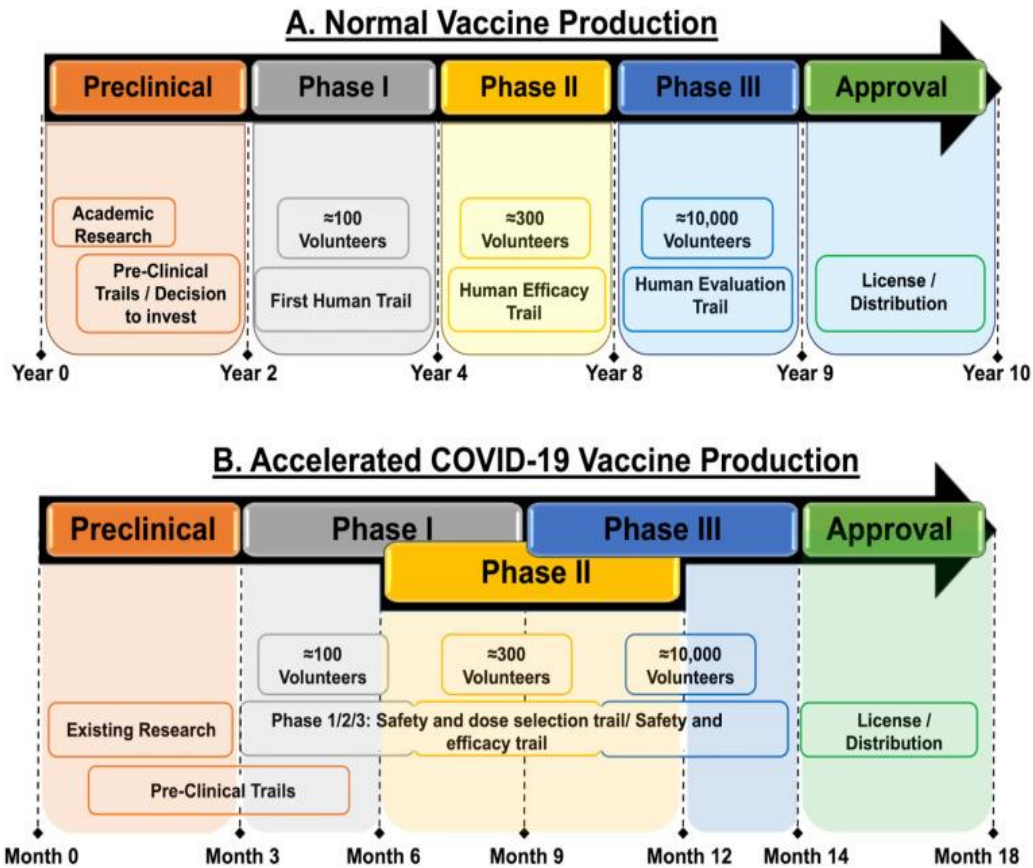


Figure 1 : Étapes de développement d'un vaccin [10].

En réalité, il faut parfois jusqu'à dix ans pour qu'un vaccin voie le jour selon la voie conventionnelle. Mais la situation pandémique peut conduire au déploiement de stratégie de développement accéléré des vaccins. Le vaccin anti-COVID19 Moderna (ARNm-1273) à titre

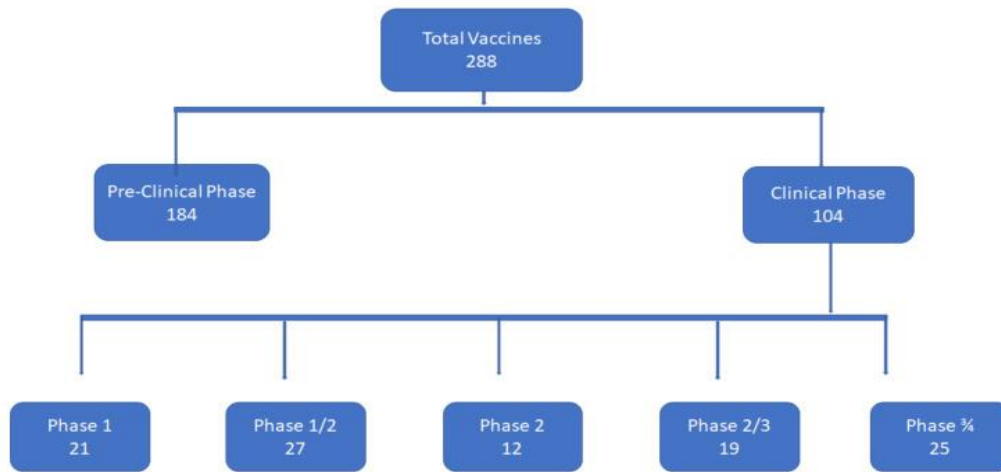
d'exemple, est entré en phase I des essais le 16 mars 2020, environ dix semaines après la publication des premières séquences génétiques du SARS COV-2 (figure 2) [10].



**Figure 2 : Phases de production d'un vaccin dans la situation normale (non pandémique) et lors d'une menace pandémique accélérée de type COVID-19 [10].**

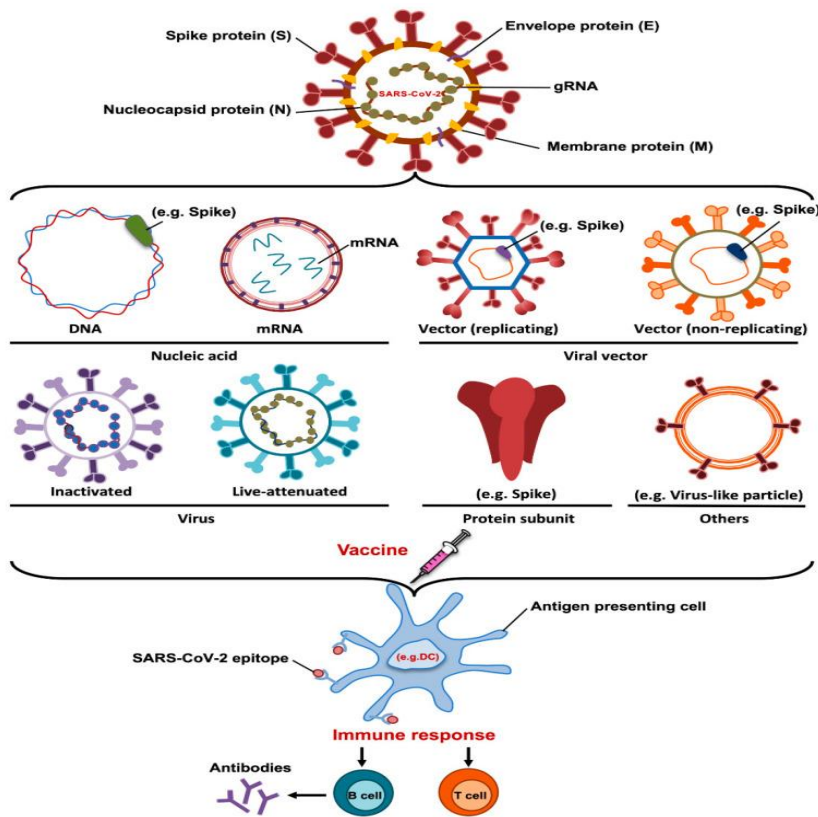
(A). Dans la situation normale, la validation d'un seul vaccin prend environ 10 ans. (B). Dans la situation de pandémie COVID-19, le délai d'approbation a été raccourci à 18-20 mois.

Depuis le début de la pandémie COVID-19, de nombreux candidats vaccins ont été recherchés, développés, testés et évalués. Selon l'OMS, plus de 288 candidats-vaccins anti-COVID-19 (figure 3) sont en cours de développement, 104 sont à divers stades des essais cliniques dont 12 sont à des stades avancés d'investigation clinique et 184 candidats font l'objet de recherche dans les phases précliniques [12].



**Figure 3 : Nombre de vaccins en essai préclinique et clinique développés contre la COVID-19 [5].**

Ces vaccins sont le résultat de multiples technologies vaccinales : des vaccins à base d'acide nucléique (ADN ou ARN), des vaccins viraux (atténués ou inactivés), des vaccins à base de protéines ou de peptides (sous-unités protéiques ou particules pseudo-virales) et des vaccins à base de vecteurs viraux (réplicatifs ou non réplicatifs) (figure 4) [13].



**Figure 4 : Différents types de technologies vaccinales développés pour la maladie COVID-19 [14].**

## 2. Vaccins autorisés contre le SARS-COV-2

Jusqu'à le mois de janvier 2022, l'OMS a autorisé 9 vaccins contre la COVID-19, 2 vaccins à base d'ARNm : BNT162b2 (Pfizer – BioNTech) et ARNm-1273 (Moderna), 4 vaccins à base d'adénovirus : ChAdOx1 nCoV-19 (AstraZeneca/Université d'Oxford), Sputnik V (Gamaleya Research Institute), Ad26.COV2.S (Johnson & Johnson) et Ad5-nCoV (CanSino), 3 vaccins viraux inactivés : BBIBP-CorV (Sinopharm), CoronaVac (Sinovac) et BBV152 (Covaxin) [12] [14].

**Tableau 1 : Principales caractéristiques des vaccins anti-COVID-19 autorisés par l'OMS [13].**

| Pays développeur        | Établissement      | Nom du vaccin | Stratégie | Nombre de doses | Efficacité   | Stockage     | Approbations des pays                        |
|-------------------------|--------------------|---------------|-----------|-----------------|--|--------------|--|
| États-Unis et Allemagne | Pfizer-Biotech     | BNT162b2      | ARNm      | Deux doses      | 95 %   | -80 à -60 °C | 79 approbations (US, UK, UE, AR, AU, autres) |
| États-Unis et Allemagne | Janssen            | Ad26.COV 2.S  | Ad26      | Une dose        | 74,4 % (États-Unis),<br>64,7 % (AmLat),<br>52,0 % (ZA) | 2 à 8 °C     | 35 approbations (US, UE, CA, ZA, autres)     |
| États-Unis              | Moderna            | ARNm-1273     | ARNm      | Deux doses      | 94,0 %   | -25 à -15 °C | 41 approbations (US, UK, UE, IL, autres)     |
| Royaume-Uni et Suède    | Oxford-AstraZeneca | AZD-1222      | ChAdOx1   | Deux doses      | 70,4 %   | 2 à 8 °C     | 81 approbations (UK, UE, BR, IN, MA, autres) |
| Russie                  | Gamaleya           | Sputnik-V     | Ad26,     | Deux doses      | 91,6 %   | -18 °C       | 55 agréments (RU, AR, AE,                    |



|              |                |                              | Ad5      |               |        |          | GN, autres)  |
|--------------|----------------|------------------------------|----------|---------------|--------|----------|--|
| <b>Chine</b> | CanSino        | Ad5-nCoV<br>(Convidecia<br>) | Ad5      | Une dose      | NA     | NA       | 4 agréments<br>(CN, HU,<br>MX, PK)                         |
| <b>Chine</b> | Sinopharm      | BBIBP-<br>CorV               | Inactivé | Deux<br>doses | NA     | 2 à 8 °C | 27 agréments<br>(BH, EG, HU,<br>IQ, PE, CS,<br>AE, autres) |
| <b>Chine</b> | Sinovac        | CoronaVac                    | Inactivé | Deux<br>doses | 50,4 % | 2 à 8 °C | 19 agréments<br>(BR, CL, CN,<br>ID, TR,<br>autres)         |
| <b>Inde</b>  | Bharat Biotech | BBV152<br>(Covaxin)          | Inactivé | Deux<br>doses | NA     | 2 à 8 °C | 5 agréments<br>(IN, IR, MA,<br>NP, ZW)                     |

*AR : Argentine ; AE : Émirats arabes unis ; UA : Australie ; BH : Bahreïn ; BR : Brésil ; CA : Canada ; CL : Chili ; CN : Chine ; CS : République de Serbie ; EG : Égypte ; UE : Union Européenne ; GN : Guinée ; HU : Hongrie ; ID : Indonésie ; IL : Israël ; IN : Inde ; IR : Iran ; IQ : Irak ; LatAm : Amérique latine ; MA : Maroc ; MA : Maurice ; MX : Mexique ; NP : Népal ; PE : Pérou ; PK : Pakistan ; RU : Russie ; TR : Turquie ; UK : Royaume-Uni ; ZA : Afrique du Sud ; ZW : Zimbabwe. NA : Non disponible.*

### 3. État des lieux des populations vaccinées contre la COVID-19 à l'échelle nationale et internationale

#### a. À l'échelle mondiale

Les campagnes de vaccination contre le nouveau coronavirus ont commencé dans la plupart des pays développés au mois de décembre 2020. Après 8 mois, plus de 3,5 milliards de doses au total ont été administrées. En réalité, seulement 83 pays ont administré au moins une dose du vaccin anti-SARS COV-2 à plus de 30% de leur population, alors que le taux de vaccination reste inférieur à 30% dans 133 pays, ce qui met en évidence un état d'inégalité vaccinale [15] [16] [17].

À la mi-janvier 2022, plus de **8 milliards** de doses ont été administrées dans le monde et 36,35 millions sont désormais administrées chaque jour. Environ 4,5 milliards personnes ont reçu au moins une dose d'un vaccin contre la COVID-19, représentant 57,3% de la population mondiale et plus de 3,77 milliards sont complètement vaccinées soit 48,3% de la population. Par ailleurs, plus de 448 millions de sujets ont pris une dose de rappel [18].

Dans certains pays, des niveaux de couverture très élevés ont été atteints. En Chine 2,55 milliards de doses ont été administrées. En Inde, États-Unis et Brésil environ 1,28 Milliard, 470,30 millions et 314,61 millions doses ont été injectées, respectivement. Alors que, 5 autres pays n'ont pas encore commencé la vaccination jusqu'à la fin juillet 2021 à savoir la Burundi, Erythrée, Haïti, Corée du Nord et Tanzanie [15] [19].

En outre, le vaccin AstraZeneca est l'un des vaccins anti-COVID-19 les plus utilisés dans le monde. Il est actuellement validé dans plus de 130 pays. En juillet 2021, plus de 65 millions doses ont été distribuées dans le Royaume-Uni, le Canada, le Brésil, l'Ukraine, l'Arabie saoudite, l'Égypte et le Maroc. Pourtant, plus de 400 millions doses ont été administrées rien qu'en Inde [20].

## **b. Au Maroc**

Le 28 janvier 2021, le Maroc a été le premier pays d'Afrique à lancer sa campagne de vaccination contre la COVID-19 basé sur deux vaccins : le vaccin chinois Sinopharm et le vaccin britannique AstraZeneca pour atteindre l'immunité collective en vaccinant 25 millions d'adultes soit 80% de la population. Les premières injections ont été réservées en priorité aux professionnels de la santé de plus de 40 ans, aux militaires, aux enseignants de plus de 45 ans, les personnes âgées et les personnes souffrant de problèmes de santé sous-jacents. Par la suite, la vaccination a été étendue à la population générale par tranche d'âge [21].

Après un mois de la vaccination (28 février 2021), le Maroc a administré 3,5 millions doses soit 9,75 % pour 100 habitants, alors que les taux de vaccination dans les autres pays africains ne dépassaient pas 1 %. Ce taux de vaccination a été ainsi légèrement supérieur à celui de la France (6,97 %), de l'Italie (7,12 %) et de l'Espagne (7,71 %) en 2 mois de vaccination [22].

**Tableau 2 : Doses de vaccin anti-COVID-19 administrées dans les pays africains jusqu'à 28 février 2021 [22].**

| <b>Pays</b>           | <b>Doses totale administrées</b> | <b>Doses administrées pour 100 personnes</b> |
|-----------------------|----------------------------------|--|
| <b>Maroc</b>          | 3 597 903                        | 9,75   |
| <b>Algérie</b>        | 75 000                           | 0,17   |
| <b>Afrique du Sud</b> | 70 725                           | 0,12   |
| <b>Sénégal</b>        | 25 653                           | 0,15   |
| <b>Zimbabwe</b>       | 18843                            | 0,13   |
| <b>Egypte</b>         | 1315                             | 0.0  |

Au début du mois de janvier 2022, plus de 24 millions personnes ont reçu la première dose du vaccin au Maroc (67,46% de la population), plus de 22 millions ont pris les deux doses (61,74 %) et environ 1,5 millions de sujets ont injectés la troisième dose soit un totale de **48 072 306 millions doses** du vaccin anti-COVID-19 administrées dans notre pays [4].

## **II. Vaccin ChAdOx1 nCoV-19 (Oxford/AstraZeneca)**

### **1. Aperçu sur les vaccins à vecteur viral recombinant**

Les vaccins à base de vecteurs viraux recombinants utilisent des virus génétiquement modifiés qui ne peuvent pas provoquer de maladies. Ils sont recombinés avec un gène d'intérêt codant pour une protéine antigénique désirée [23].

Il existe des vaccins à vecteur viral non répliquatif dont le vecteur pénètre dans les cellules et gère la production des protéines du SARS-CoV-2 mais ne peut pas se répliquer car des gènes clés ont été désactivés et d'autres à vecteur viral répliquatif dont le vecteur se réplique lentement, portant les protéines du SARS-CoV-2 à sa surface. Les vecteurs viraux sont sélectionnés de façon à pouvoir infecter aisément les cellules humaines et à être détectés par les cellules présentatrices d'antigènes [24].

D'ailleurs, cette technologie vaccinale se caractérise par une forte immunogénicité sans adjuvant et une bonne stimulation de la réponse des lymphocytes T et B pour conduire finalement à l'élimination des cellules infectées par le virus. De plus, pour minimiser les

risques d'immunité préexistante de l'hôte, des virus non humains sont généralement utilisés [14].

Jusqu'à le mois de janvier 2022, quatre vaccins anti-COVID-19 à vecteur viral recombinant sont autorisés dont le vaccin Oxford/AstraZeneca qui est basé sur un adénovirus de chimpanzé non pathogène pour l'Homme et non réplicatif (ChAdOx1) portant un gène à double brin codant pour la glycoprotéine S du SRAS-CoV-2 [5].

L'ADN n'est pas aussi fragile que l'ARN, et l'enveloppe protéique résistante de l'adénovirus protège le matériel génétique à l'intérieur. Une fois capté par les cellules hôtes, le vecteur viral entre dans le noyau sans intégrer le génome de l'hôte. Le gène porté est transcrit en une séquence d'ARNm codante pour la protéine Spike (S). L'ARNm sort ensuite du noyau, est traduit par les ribosomes cytoplasmiques pour produire l'antigène spiculaire (protéine S). Certaines des protéines Spike produites dans le cytoplasme, ainsi qu'une quantité variable de protéines Spike fragmentées est exprimées à la surface des cellules et diffusées pour être finalement reconnues par les cellules du système immunitaire et déclencher une réponse immunitaire (figure 5) [25] [26].

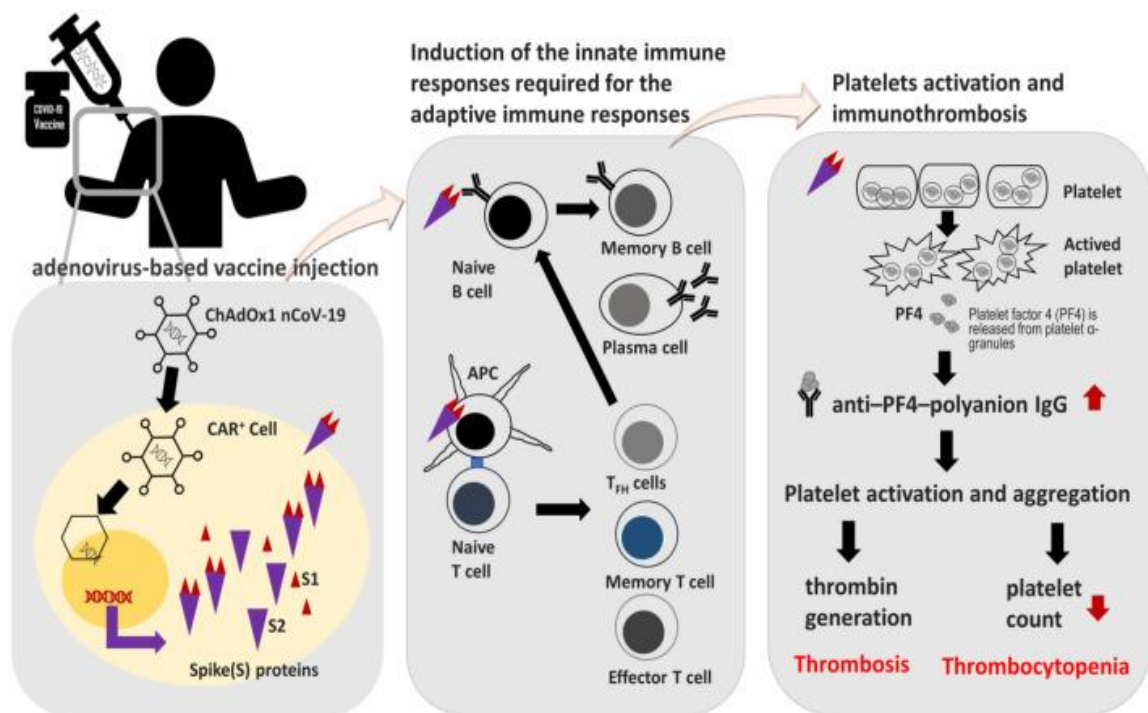


Figure 5 : Mécanisme d'action du vaccin à vecteur d'adénovirus (ChAdOx1 nCov-19)

[27].

## 1. Caractéristiques générales du vaccin AstraZeneca

Le vaccin ChAdOx1 nCoV19 (initialement appelé AZD1222) a été développé par l'Université d'Oxford au Royaume-Uni et la société pharmaceutique suédoise AstraZeneca. En février 2021, l'OMS a recommandé l'utilisation de ce vaccin pour tous les adultes [8].

### a. Composition

Le vaccin se présente sous forme d'une solution incolore à légèrement brunâtre, limpide à légèrement opaque, sans agent de conservation. Il s'agit de flacons multidoses contenant 8 ou 10 doses de 0,5 ml par flacon. Chaque dose (0,5 ml) est constituée de plus de  $2,5 \times 10^8$  unités infectieuses de ChAdOx1-S qui est un vecteur recombinant non répliquatif dérivé d'un adénovirus de chimpanzé codant pour la glycoprotéine Spike du SARS-CoV-2 [28].

Le ChAdOx1-S est produit par la technologie de l'ADN recombinant, cultivé sur des cellules rénales embryonnaires humaines (human embryonic kidney, HEK 293) génétiquement modifiées.

#### ⇒ Les excipients présents dans le vaccin

- L-histidine ;
- Chlorhydrate de L-histidine monohydraté ;
- Chlorure de magnésium hexahydraté ;
- Polysorbate 80 (E 433) ;
- Éthanol ;
- Saccharose ;
- Chlorure de sodium ;
- Édétate disodique (dihydraté) ;
- Eau pour préparations injectables [29].



**Figure 6 : Vaccin contre la COVID-19 AstraZeneca [30].**

### **b. Administration**

Le vaccin AstraZeneca est administré sous forme de suspension pour injection, exclusivement par voie intramusculaire chez les sujets âgés de 18 ans et plus, de préférence dans le muscle deltoïde de la partie supérieure du bras. Le vaccin ne doit pas être injecté par voie intraveineuse, sous-cutanée ou intradermique. En général, le schéma recommandé est de deux doses (0,5 ml chacune) en respectant un intervalle de 4 à 12 semaines [28].

### **c. Efficacité**

Les résultats de trois essais contrôlés randomisés en simple aveugle, réalisé au Royaume Unis, au Brésil et en Afrique du sud (entre le 23 avril et le 6 décembre 2020) ont montré, qu'une seule dose du vaccin AstraZeneca est accompagnée d'une diminution de 43 % et de 80 %, respectivement, du risque d'hospitalisation d'urgence et d'infection grave à l'origine de l'hospitalisation après une infection par la COVID-19. Deux doses complètes (doses standard) de ce vaccin avec un intervalle d'au moins 14 jours après l'administration de la seconde dose à des adultes, induit une efficacité de 70,4 % (IC à 95 % = 54,8 à 80,6) contre l'infection par le SARS-CoV-2 [7] [31].

Il a été noté, une augmentation de l'efficacité du vaccin lorsque l'intervalle d'injection de la deuxième dose était plus long. En effet, l'efficacité du vaccin après deux doses standard était de 55,1 % (IC à 95 % 33,0 à 69,9) avec un intervalle de moins de 6 semaines et de 81,3 % (60,3 à 91,2) à 12 semaines ou plus. Par conséquent, un retard dans la réception de la dose de rappel serait bénéfique pour le vaccin ChAdOx1 nCov-19. En général, 28 à 34 jours après la

première dose du vaccin Oxford/AstraZeneca anti-COVID-19, l'hospitalisation a été réduite de 94%, tandis que ce taux était de 81% chez les personnes âgées de plus de 80 ans [7].

Par ailleurs, de nouveaux variants, notamment B.1.1.7 (**Alpha**) identifié au Royaume-Uni, B.1.351 (**Beta**) en Afrique du Sud, P.1 (**Gamma**) au Brésil et B.1.617.2 (**Delta**) en Inde, ont été associés à un risque plus élevé pour les campagnes de vaccination à cause de leur transmissibilité accrue et de la possibilité d'échapper au vaccin. Le vaccin Oxford/AstraZeneca a montré une bonne protection contre le variant britannique du SARS-CoV-2, cependant, il n'a pas réussi à montrer une bonne protection contre le variant sud-africain avec une efficacité d'environ 10 %. Le titre de neutralisation contre le variant Beta (variant sud-africain) était environ neuf fois inférieure à celui du virus de type sauvage. En outre, ce vaccin a présenté une efficacité de l'ordre de 48,7 % et 30,7 % contre les variants Alpha et Delta, respectivement, après la première dose d'immunisation et suite à une vaccination complète (administration de deux doses), l'efficacité contre le variant Delta était de 67 %, pourtant, son efficacité contre le variant Alpha était d'environ 74,5 % [7] [14].

#### **d. Immunogénicité**

Il a été rapporté que la vaccination avec ChAdOx1 nCoV-19 a pu induire une réponse humorale et à médiation cellulaire chez les souris et les macaques rhésus sans que les animaux vaccinés ne soient atteints d'une maladie d'origine immunitaire. Une seule vaccination avec AstraZeneca a montré une réduction de la charge virale dans le liquide céphalorachidien et le tissu pulmonaire avec la prévention de la pneumonie interstitielle chez les macaques rhésus, toutefois, la vaccination n'a pas bloqué l'infection par le virus [32].

Chez l'Homme, le vaccin ChAdOx1 nCoV-19 a produit des anticorps neutralisants et des anticorps IgA et IgG spécifiques de la glycoprotéine Spike après une seule dose. Les réponses IgG anti-Spike ont augmenté au jour 28 et se sont considérablement améliorées après la deuxième dose. De plus, ce vaccin a induit de puissantes réponses des lymphocytes T qui ont atteint un pic au 14<sup>ième</sup> jour après l'injection d'une seule dose, avec une sécrétion d'IFN- $\gamma$ , et de TNF $\alpha$  par les cellules T CD4+. Des réponses cytotoxiques robustes des cellules T CD8+ ont également été rapportées [33] [34].

## **e. Contre-indications**

Le vaccin AstraZeneca est contre indiqué en cas d'hypersensibilité à la substance active ou à l'un des excipients ainsi que chez les personnes qui ont présenté une thrombose veineuse et/ou artérielle majeure accompagnée d'une thrombocytopénie après avoir reçu la première dose du vaccin. Les personnes qui présentent une réaction anaphylactique après la première dose de ChAdOx1 nCoV-19 ne doivent pas recevoir une seconde dose du même vaccin.

En outre, ce vaccin ne doit pas être utilisé chez les sujets qui ont des antécédents de syndrome de fuite capillaire (SFC). Le 11 juin 2021, l'EMA a conclu que le vaccin AstraZeneca peut entraîner de façon très rare ce syndrome [29].

## **f. Précautions d'emploi**

### **⇒ Hypersensibilité et anaphylaxie**

Des réactions d'hypersensibilité notamment l'anaphylaxie et l'angioœdème, sont survenues après l'administration d'AstraZeneca. Ce vaccin doit être donc injecté sous surveillance médicale, en assurant la disponibilité du traitement approprié en cas de réaction allergique. Une surveillance étroite pendant au minimum 15 minutes est recommandée après la vaccination. Pour les personnes qui ont présentées une réaction d'hypersensibilité après l'administration de la première dose de ChAdOx1 nCov-19, ne doit pas administrer la deuxième dose [35].

### **⇒ Maladie concomitante**

La vaccination doit être reportée chez les individus présentant une infection aiguë ou une affection fébrile aiguë sévère. Néanmoins, ne doit pas être reportée en cas d'infection mineure et/ou de légère fièvre [35].

### **⇒ Thrombose et thrombocytopénie**

Une association de cas de thrombose et de thrombocytopénie, dont certains accompagnés de saignements, a été très rarement rapportée dans les trois premières semaines suivant la vaccination avec ChAdOx1 nCov-19. Cela comprend des cas graves touchant des endroits inhabituels y compris la thrombose de la veine splanchnique, la thrombose artérielle et des



sinus veineux cérébraux (TSVC) accompagnée d'une thrombocytopénie. Certains cas ont eu une issue fatale.

Les sujets vaccinés développant les symptômes suivants : essoufflement, douleur thoracique ou abdominale persistante, enflure ou douleur aux jambes, une apparition soudaine de maux de tête sévères, de maux de tête persistants ou qui s'aggravent, une vision trouble, confusion des convulsions et éruption cutanée inexplicée ou ecchymose au-delà du site d'injection, après la vaccination, il est recommandé de consulter rapidement un médecin et d'obtenir immédiatement des soins médicaux.

Les personnes qui ont déjà présenté une thrombocytopénie induite par l'héparine (TIH) ou une TSVC avec thrombocytopénie ne doivent pas recevoir le vaccin d'AstraZeneca que si les bienfaits potentiels est supérieurs aux risques potentiels. En plus, les patients qui ont présenté une thrombose veineuse ou artérielle majeure accompagnée d'une thrombocytopénie après l'injection de ce vaccin ne doivent pas recevoir une deuxième dose [29].

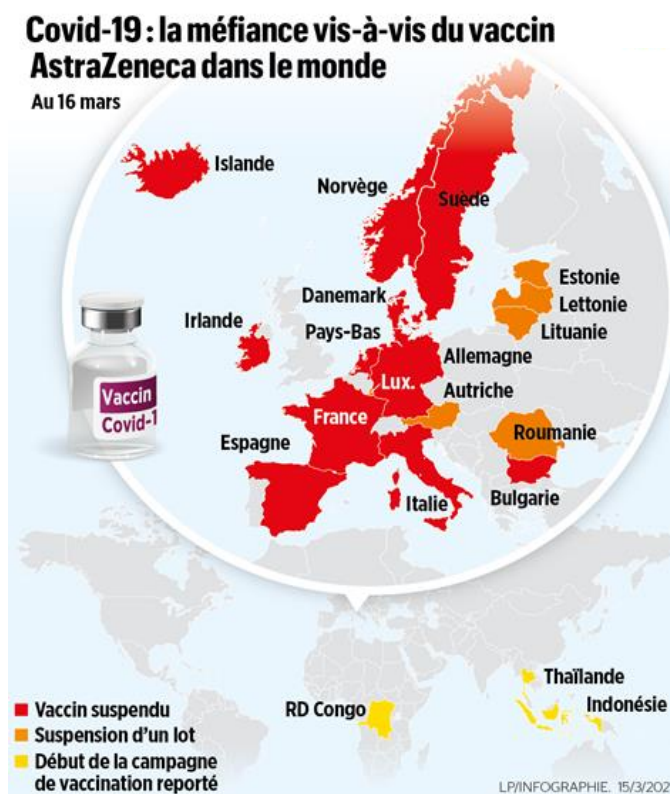
### ⇒ Risque de saignements causés par une administration intramusculaire

Comme pour les autres injections par voie intramusculaire, le vaccin AstraZeneca doit être administré avec attention chez les personnes présentant une thrombocytopénie ou qui reçoivent un traitement anticoagulant ou tout autre trouble de la coagulation comme l'hémophilie, car un saignement ou une ecchymose peuvent être observés chez ces sujets à la suite d'une injection intramusculaire [29].

## III. VITT signalée après la vaccination avec Oxford/AstraZeneca

### 1. Politique vaccinale

À la mi-mars 2021, seize pays d'Europe ont interrompu temporairement l'utilisation du vaccin AstraZeneca : L'Allemagne, la Bulgarie, la Chypre, le Danemark, l'Espagne, la France, l'Islande, l'Italie, la Norvège et le Portugal ainsi que la Slovénie ont suspendu toute utilisation de ce vaccin tandis que, cinq autres pays : Autriche, Estonie, Lettonie, Lituanie et Luxembourg ont suspendu l'utilisation d'un seul lot comprenant un million de doses de vaccin. Ces mesures sont intervenues après des rapports faisant état d'événements thrombotiques de localisation inhabituelle (cérébrale et viscérale) associés à une thrombopénie chez les personnes récemment vaccinées avec ChAdOx1 nCoV-19 (figure 7) [36].



**Figure 7 : Pays ayant suspendu temporairement l'utilisation du vaccin AstraZeneca, 16 mars 2021 [37].**

Le 18 mars 2021, l'Agence Européenne des Médicaments (EMA) a déclaré qu'un lien causal avec le vaccin est possible, mais n'est pas prouvé, et cela nécessite des analyses plus poussées. La comité a souligné également que la balance bénéfices-risques restait en faveur du vaccin et a conclu que ce dernier n'était pas associé à une augmentation du risque global d'événements thromboemboliques ou de caillots sanguins et qu'il n'y a aucune preuve d'un problème de qualité ou d'un lot spécifique ainsi qu'elle a exhorté les pays européens à recommencer leur utilisation [38].

De nombreux pays notamment : Autriche, Bulgarie, Chypre, Estonie, Irlande, Italie, Luxembourg, Portugal, Roumanie, Slovénie, Espagne et le Royaume-Uni ont recommencé l'utilisation du vaccin pour tous les adultes. Dans six autres pays à savoir la Finlande, la France, l'Allemagne, l'Islande, la Lituanie et la Suède, l'utilisation d'AstraZeneca est limitée aux plus de 55 ans. Toutefois, quatre autres pays européens, n'ont pas repris le déploiement de ce vaccin notamment le Danemark, la Lettonie, les Pays-Bas et la Norvège [39].

## 1. Incidence

Il est difficile de déterminer l'incidence exacte de ces événements thrombotiques. En effet, le risque déclaré de la VITT varie considérablement d'un pays à l'autre et entre les personnes ayant reçu le vaccin AstraZeneca. Cela est en partie due à des différences importantes dans l'âge et le sexe des personnes vaccinées ainsi qu'à des incohérences dans la manière dont les données sont collectées et rapportées [40].

Au début de mars 2021, l'EMA a déclaré qu'il y avait eu 30 rapports d'événements thromboemboliques veineux parmi près de 5 millions de personnes ayant reçu ce vaccin. Au Royaume-Uni, l'Agence britannique de réglementation des médicaments et des produits de santé a déclaré à la fin de mars 2021, 79 cas de thrombose associés à un faible taux de plaquettes, dont 44 étaient des TVC. Parmi ces 79 cas, 51 étaient des femmes (13 ont été décédées) et 28 étaient des hommes (6 ont été décédés) [38] [41].

Au 4 avril 2021, parmi environ 34 millions de personnes vaccinées avec AstraZeneca en Europe, un total de 169 cas de thrombose des sinus veineux cérébraux (TSVC) et 53 cas de thrombose de la veine splanchnique ont été signalés à EudraVigilance [42].

**Tableau 3 : Incidence de la VITT après la vaccination avec AstraZeneca [27].**

| Pays (population étudiée) | Cas de la VITT | Incidence | Principales conclusions   |
|---------------------------|----------------|-----------|---|
| Europe (34 000 000)       | 222 (ETV: 222) | 1/153 153 | Incidence inférieure aux taux estimés pour la population générale, mais des thromboses inhabituelles ont été rapportées comme un effet secondaire rare du vaccin ChAdOx1 nCov-19. |
| Royaume-Uni (21 200 000)  | 77 (ETV : 77)  | 1/275 325 | Risque thrombotique après la vaccination est inférieur à celui observé chez les patients COVID-19 hospitalisés.   |

|                                   |                               |       |   |
|-----------------------------------|-------------------------------|-------|---|
| Écosse (1 707 962)                | 4 319 (ETV: 893; ETA : 3 288) | 1/395 | Une association a été trouvée entre la vaccination avec ChAdOx1 nCov-19 et un risque plus élevé d'PTI et d'ETA. |
| Corée du Sud (5 589 femmes; 77 %) | 0                             | 0     | Aucun cas de la VITT n'a été noté.  |

**ETA** : Événements thrombotiques artériels ; **ETV** : Événements thrombotiques veineux ; **PTI** : Purpura thrombopénique idiopathique.

L'incidence de ces effets indésirables reste extrêmement faible. Un total de 467 cas de la VITT (0,000024 %) a été signalé au Royaume-Uni (RU), au Nord d'Europe, au Canada et en Australie [43].

Par ailleurs, la majorité des patients présentant la VITT ont moins de 50 ans avec une prédominance potentielle des femmes, sans aucun facteur de risque prédisposant identifié de manière concluante à ce jour. La MHRA estime que le risque de la VITT après la première dose du vaccin ChAdOx1 nCoV-19 est de 1/100 000 pour les personnes de plus de 50 ans et de 1/50 000 pour celles de 49 ans ou moins. De plus, la plupart de ces événements indésirables ont été enregistrés dans un intervalle de temps de moins de 4 semaines après la vaccination avec AstraZeneca [40] [44].

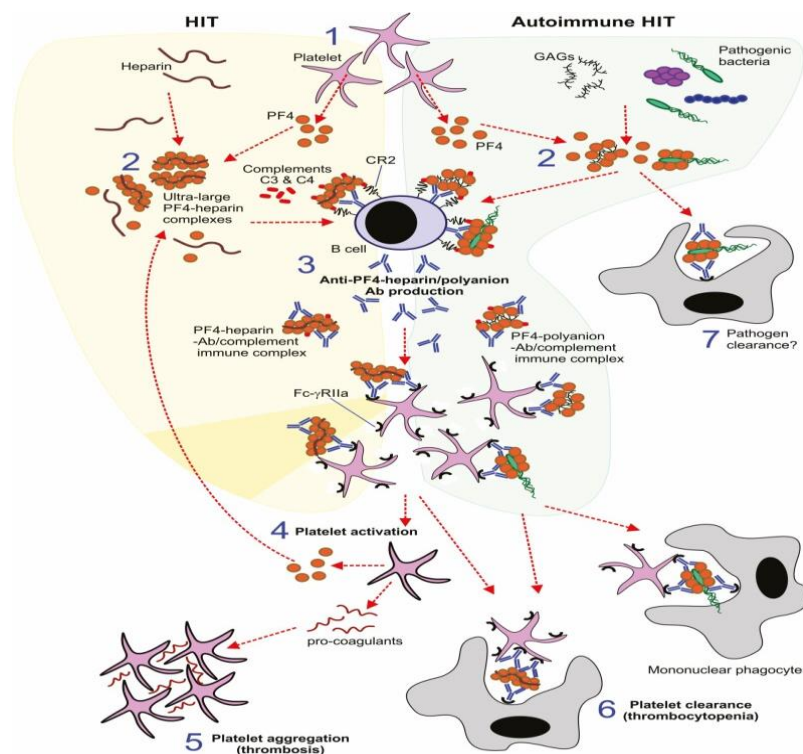
## 2. Physiopathologie

L'Institut Paul Ehrlich en Allemagne a conclu à un phénomène auto-immun qui mène une activation plaquettaire massive, une réduction de la numération plaquettaire et un état pro-thrombotique après la vaccination avec ChAdOx1 nCoV-19, cette condition a été nommée thrombocytopénie thrombotique immunitaire induite par un vaccin (VITT), imite la thrombocytopénie induite par l'héparine (TIH), mais elle ne nécessite pas l'héparine comme déclencheur [45] [46].

Jusqu'à la fin du mois de janvier 2022, la pathogénèse de la VITT n'est pas bien établie, toutefois, Greinacher et *al.* ont démontré un rôle essentiel des anticorps anti-facteur plaquettaire 4 (PF4) dans le développement de la VITT et ont émis l'hypothèse que le mécanisme ressemble à celui de la TIH [40] [47].

Dans la plupart des cas, la TIH est déclenchée par l'exposition à l'héparine. Néanmoins, dans un sous-type rare, nommé thrombocytopenie auto-immune induite par l'héparine (TIH auto-immune), d'autres molécules hautement anioniques sont impliquées, à savoir le polysulfate de pentosane, le sulfate de chondroïtine et des parties de la paroi cellulaire bactérienne, qui prennent la place de l'héparine et forment des complexes avec le PF4 (CXCL4) qui est une protéine tétramérique de charge positive, sécrétée lors de l'activation plaquettaire, conduisant à la production d'anticorps. Les nouveaux complexes formés, contenant de l'héparine, du PF4 et des anticorps anti-PF4, se lient au récepteur FcγRIIIa (une protéine transmembranaire de type I) à la surface des plaquettes entraînant leur activation et créant une boucle de rétroaction positive par laquelle le facteur plaquettaire 4 libéré par les plaquettes activées amplifie la production d'anticorps anti-PF4-héparine. Un état prothrombotique sévère est finalement créé.

Les complexes anticorps PF4/polyanion peuvent aussi se lier aux FcR des cellules effectrices immunitaires telles que les monocytes et les neutrophiles induisant leur activation ce qui augmente encore le risque thrombotique. En outre, une thrombocytopenie peut également se produire en raison de l'élimination accrue des plaquettes par les phagocytes mononucléaires (figure 8) [27] [48].

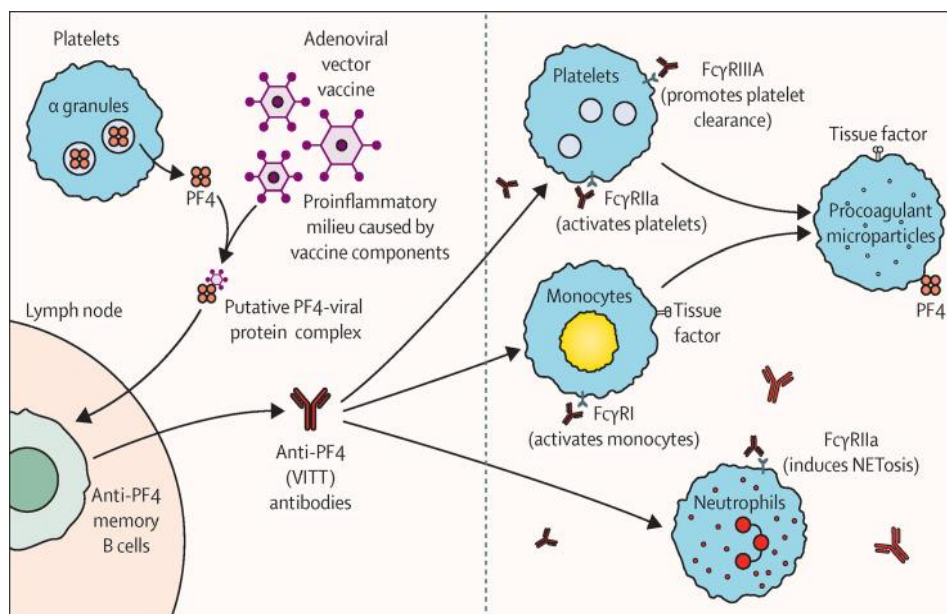


**Figure 8 : Rôle central du PF4 dans la thrombopénie induite par l'héparine (TIH) et la TIH auto-immune [47].**

Dans la VITT, la plupart des cas n'ont pas été exposés aux héparines. La cause de la VITT peut ne pas être la même pour tous les cas, et donc différents mécanismes sont largement évalués et explorés. Dans ce contexte, Greinacher et ses collègues ont supposé que l'ADN libre dans le vaccin peut se lier au PF4 sécrété par les plaquettes et déclencher la production d'anticorps comme la TIH (figure 9). De plus, le sulfate de chondroïtine peut être également un candidat pour la source de polyanion. Il s'agit d'un composant majeur du glycocalyx de la cellule endothéliale, facilement endommagé et libéré dans la circulation pendant l'inflammation [27].

Un autre mécanisme est proposé, il implique une interaction directe entre les plaquettes et les protéines de pointe du SARS-CoV-2 produites après la vaccination. On sait que l'interaction entre la protéine de pointe du SARS-CoV-2 et les récepteurs de l'enzyme de conversion de l'angiotensine 2 (ACE2) à la surface des thrombocytes peut activer directement ces derniers. Après l'injection d'un vaccin à base de vecteur d'adénovirus ChAdOx1 nCoV-19. Les adénovirus contenus dans ce dernier pénètrent dans les cellules CAR+ (coxsackievirus and adenovirus receptor-positive), ensuite, ces cellules produisent et présentent les protéines de pointe du SARS-CoV-2 afin de déclencher une réponse immunitaire.

Dans des rares cas, des petites quantités de l'adénovirus peuvent pénétrer dans la circulation sanguine et interagir directement avec les thrombocytes conduisant à leur activation (libération du PF4 et la formation des anticorps anti-PF4), et la formation d'agrégats plaquettes-leucocytes ainsi que l'activation endothéliale, entraînant au final une thrombose et une thrombocytopenie. En effet, les plaquettes une fois liées par les adénovirus, elles sont éliminées par les cellules de Kupffer [43].



**Figure 9 : Physiopathologie proposée de la thrombocytémie thrombotique immunitaire induite par le vaccin (VITT) [40].**

## **IV. Généralité sur l'hémostase et rôle des plaquettes**

### **1. Rappel sur l'hémostase**

L'hémostase est un processus physiologique déclenché par une lésion vasculaire. Elle concerne l'ensemble des mécanismes qui contribuent à arrêter les hémorragies, à la prévention des saignements spontanés et à empêcher les phénomènes de thrombose. En effet, l'hémostase implique des mécanismes biochimiques intracellulaires et l'activation des facteurs plasmatiques de la coagulation, circulant sous forme de précurseurs inactifs dans le sang, l'équilibre entre ces mécanismes est fondamental pour assurer le maintien de l'état liquide du sang dans l'appareil cardiovasculaire et d'empêcher l'apparition d'un processus hémorragique ou thrombotique [49].

Les principaux acteurs de ce processus sont : les plaquettes, la paroi vasculaire, les facteurs de la coagulation, ceux de la fibrinolyse et d'autres protéines plasmatiques.

L'hémostase se compose de trois étapes essentielles intriquées et interdépendantes, qui se nomment l'hémostase primaire, la coagulation et la fibrinolyse :

- ◆ L'hémostase primaire est la première étape d'urgence qui conduit à la formation d'un clou plaquettaire (ou « thrombus blanc »), constitué par un agrégat des plaquettes reliées entre elles par le Fg pour fermer la brèche vasculaire en une durée de trois à



cinq minutes. Elle met en jeu quatre acteurs majeurs : la paroi vasculaire, les plaquettes, le facteur de Von Willebrand (FVW) et le fibrinogène. Il se déroule en plusieurs étapes :

- Vasoconstriction ;
  - Adhésion plaquettaire ;
  - Activation plaquettaire et le recrutement des autres plaquettes circulantes ;
  - Sécrétion des granules ;
  - Agrégation formant un caillot plaquettaire.
- 
- ◆ L'hémostase secondaire ou coagulation permet la consolidation du premier thrombus, en formant un réseau de fibrine emprisonnant des globules rouges en une durée de cinq à dix minutes. Elle met en jeu une cascade de réaction enzymatique impliquant les facteurs de la coagulation.
  
  - ◆ La fibrinolyse assure la destruction du caillot de fibrine et donc de restaurer la perméabilité vasculaire en une durée de 48 à 72 heures. Elle fait intervenir une enzyme protéolytique : la plasmine, présente dans le plasma sous forme d'un précurseur inactif, le plasminogène [49] [50].

## **2. Rôle des plaquettes dans l'hémostase**

### **a. Adhésion plaquettaire**

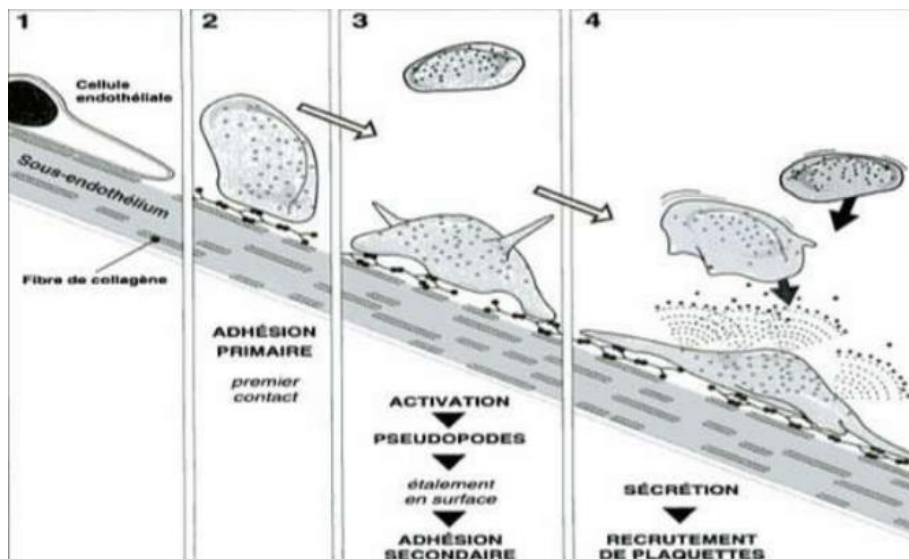
En cas d'une lésion vasculaire, la fonction inhibitrice de l'endothélium intact en particulier, la production de prostacycline, d'oxyde nitrique et l'expression de CD39 est diminuée ainsi que de nombreuses protéines du sous-endothélium et de couches plus profondes du vaisseau sont exposées au sang circulant à savoir le vWF, le collagène et le Fg. Chacune des protéines interagissent avec des glycoprotéines réceptrices de la membrane des plaquettes : GPIb-IX-V, GPVI et GPIIb/IIIa respectivement, favorisant l'adhésion plaquettaire sur l'endothélium lésé [51].

En fait, la liaison initiale des plaquettes au site endommagé, diffère selon le niveau de contrainte de cisaillement dans la circulation. En présence des forces de cisaillement faibles,



les plaquettes adhèrent principalement au collagène par l'intermédiaire de leurs intégrines GPIa/IIa. En revanche, lorsque ces forces sont élevées (artérioles et la microcirculation), l'adhésion se fait par le complexe des glycoprotéines GPIb-IX-V qui se lie au vWF, lui-même lié au collagène du sous-endothélium. Le complexe GPIbV-IX est composé de quatre sous-unités transmembranaires : la GPIb $\alpha$ , la GPIb $\beta$ , la GPIX et la GPV. La fonction principale de liaison du vWF est portée par la sous-unité GPIb $\alpha$  au niveau de son extrémité N-terminale extracellulaire [52] [53].

Cette première interaction aboutit au ralentissement des plaquettes au niveau du flux sanguin ainsi qu'elle favorise les interactions d'autres types de récepteurs plaquettaire pour renforcer leur adhésion (figure 10) [52].



**Figure 10 : Étapes d'adhésion et début de l'activation plaquettaire [54].**

### **b. Activation plaquettaire**

L'activation plaquettaire joue un rôle fondamental dans l'hémostase primaire, elle est enclenchée après une adhésion stabilisée au niveau de la lésion vasculaire. En générale il existe 4 principales voies d'activation via : l'ADP médiée par les récepteurs P2Y1 et P2Y12, la thrombine : ligand des récepteurs PAR1 et PAR4, le thromboxane A2 et l'acide arachidonique, ainsi que le facteur Von Willebrand via les récepteurs GPIb-V-IX et GPV [55].

L'activation plaquettaire aboutie à des modifications biochimiques comme la mobilisation de calcium intracytosolique, l'inhibition de l'AMPc (leur rôle est d'inhiber la libération des granules et donc l'agrégation et l'amplification de la réponse plaquettaire) et la libération de

l'acide arachidonique ainsi que des changements de conformation de GPIIb/IIIa et la sécrétion du contenu des granules denses et  $\alpha$  en émettant des substances pro coagulantes (facteur V, FVW, fibrinogène), proagrégantes (ADP, fibrinogène, sérotonine) ou vasomotrices (sérotonine, NO, TXA<sub>2</sub>) sans oublier des changements morphologiques, en fait, les plaquettes à l'état de repos sont discoïdes, une fois activées deviennent sphériques, émettent des pseudopodes et s'étalent sur la surface d'adhésion [56].

### c. Sécrétion plaquettaire

Les plaquettes sont des cellules complexes qui contiennent trois types distincts de granules à savoir les granules  $\alpha$ , les granules denses ou granules  $\delta$  et les lysosomes dont la fonction est de stocker des molécules biologiquement actives précisément impliquées dans l'initiation de la coagulation et le recrutement d'autres cellules lors de l'inflammation [57].

Les granules  $\alpha$  sont les plus abondants et contiennent diverses protéines (à titre d'exemple : GPIIb/IIIa, fibrinogène et vWf), des chimiokines/cytokines et des facteurs de croissance. Les  $\delta$ -granules plaquettaires contiennent des petites molécules telles que l'ADP, la sérotonine, le glutamate, l'histamine et les polyphosphates ainsi que le calcium. Alors que les lysosomes comportent des enzymes telles que les glycohydrolases et des enzymes qui dégradent les glycoprotéines, les glycolipides et les glycosaminoglycanes (tableau 4) [58].

L'activation plaquettaire entraîne alors, la contraction des plaquettes, une centralisation des granules ainsi que la sécrétion de leur contenu à l'extérieur de la plaquette par exocytose impliquant un réarrangement du réseau cytoplasmique d'actine. Les substances libérées sont biologiquement actives et constituent une rétro régulation positive pour renforcer l'adhérence, l'agrégation et la sécrétion des plaquettes. Parmi les substances libérées, certaines induisent l'activation d'autres plaquettes, il s'agit d'un phénomène d'amplification [59].

**Tableau 4 : Principaux substances libérées par les granules denses et alpha ainsi que leurs propriétés [56].**

| <b>Organites</b>       | <b>Substances</b>  | <b>Propriétés</b>   |
|------------------------|--|---|
| <b>Granules denses</b> | <ul style="list-style-type: none"> <li>- ADP</li> <li>- Sérotonine</li> <li>- Calcium ionisé</li> </ul>  | <ul style="list-style-type: none"> <li>- Agrégation</li> <li>- Agrégation, vasoconstriction</li> <li>- Cofacteur de l'adhérence et de l'agrégation</li> </ul>   |
| <b>Granules alpha</b>  | <ul style="list-style-type: none"> <li>- Facteur Von Willebrand plaquettaire</li> <li>- Fibrinogène</li> <li>- Facteur V plaquettaire</li> <li>- Facteur de croissance cellulaire</li> </ul> | <ul style="list-style-type: none"> <li>- Adhérence et agrégation</li> <li>- Agrégation</li> <li>- Coagulation</li> <li>- Prolifération des fibroblastes et des myocytes (guérison du vaisseau)</li> </ul> |

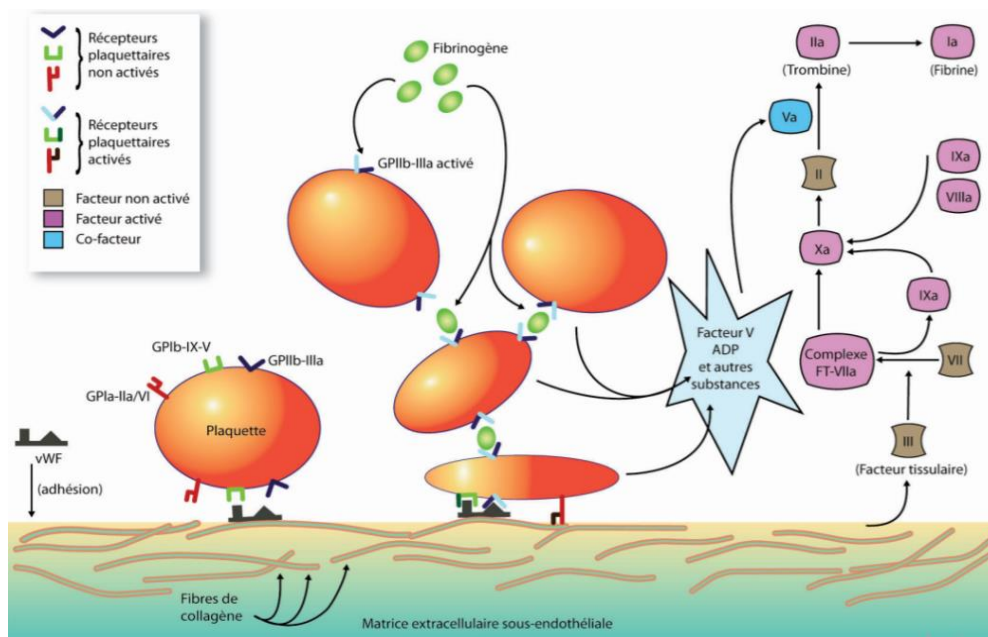
#### **d. Agrégation plaquettaire**

L'agrégation des plaquettes se produit quand les glycoprotéines adhésives essentiellement le fibrinogène se lie à la fois sur GPIIbIIIa des deux plaquettes différentes. En effet, l'agrégation plaquettaire est généralement favorisée par l'augmentation du Ca<sup>2+</sup> qui provoque un changement conformationnel du complexe GPIIb-IIIa [56].

La GPIIb-IIIa dont le ligand principal est le fibrinogène joue donc un rôle central durant la phase d'agrégation en permettant l'établissement des ponts inter-plaquettaires. Par reconnaissance des séquences d'acides aminés particulières de type RGD du chaîne  $\alpha$ , la GPIIb-IIIa se lie au fibrinogène. D'autres protéines telles que le VWF, la vitronectine, et la fibronectine, d'affinité moindre, possèdent également la séquence peptidique et peuvent aussi se fixer au domaine  $\beta_3$  du complexe GPIIb-IIIa en provoquant une agrégation. Pour la

fixation du fibrinogène, il est nécessaire que les chaînes  $\alpha$  et  $\beta$  du complexe GPIIb-IIIa soient reliées par des ponts calciques [54].

Les récepteurs GPIIbIIIa activés sur les plaquettes adhérentes peuvent alors se lier vWF et/ou fibrinogène et attendre l'interaction avec d'autres plaquettes activées par l'exposition à l'ADP et au TXA2 libérés. Ce processus de la liaison récepteur-ligand se répète, ce qui entraîne le recrutement des couches supplémentaires de plaquettes et finalement la formation d'un thrombus blanc [56].



**Figure 11 : Phases successives de la formation d'un thrombus blanc : adhésion, activation, sécrétion et agrégation des plaquettes [49].**

## V. Facteur plaquettaire 4 et protéines kinases C dans les plaquettes

### 1. Facteur plaquettaire 4 (PF4/CXCL4)

Les plaquettes sécrètent une grande variété des cytokines et des chimiokines, qui dans la majorité des cas sont stockées dans les granules  $\alpha$ . Ces CK/CH contribuent à réguler les cellules environnantes notamment leur prolifération, différenciation et activation. Il est intéressant de noter que les thrombocytes peuvent aussi exprimer des récepteurs de plusieurs CK/CH qu'elles libèrent, montrant leur capacité potentielle d'établir des boucles autocrines et paracrines bidirectionnelles [52].

## a. Généralité

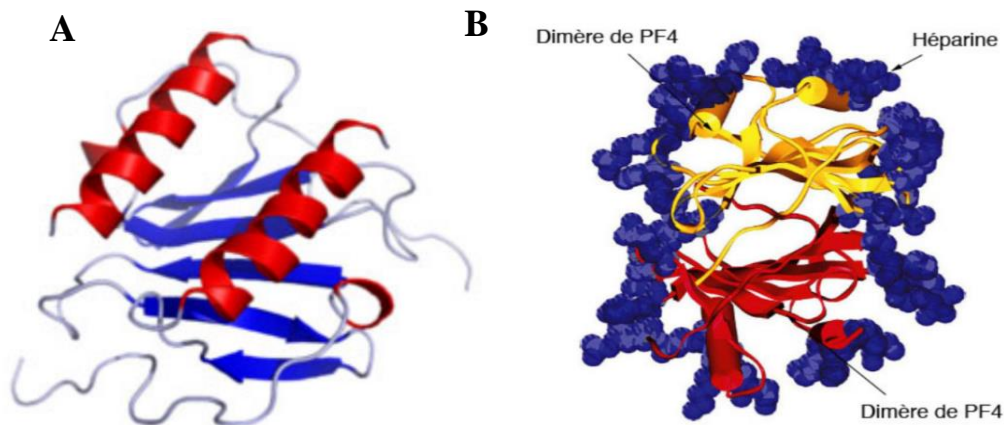
Le PF4 humain mature a un poids moléculaire d'environ 7,8 kDa. Il s'agit d'une protéine de 70 acides aminés, riche en lysine, stockée dans les granules alpha des thrombocytes, relâchée en concentrations élevées lors d'activation plaquettaire, ses taux sont estimés à  $12 \pm 5 \text{ ng} / 10^6$  plaquettes et sa demi de vie dans le plasma est très courte de l'ordre de trois minutes [60].

Le facteur plaquettaire 4 (PF4/CXCL4) appartient à la famille des chimiokines CXC. Son gène est localisé sur le chromosome 4 qui fait partie de la famille multigénique regroupée sous le terme de « small inducible genes (SIG) ». Ensemble des protéines codées par ces gènes jouent des rôles importants dans les phénomènes de coagulation, d'inflammation et de croissance cellulaire [61].

## b. Structure

À pH physiologique, le PF4 se présente sous forme d'un tétramère constitué de quatre sous unités identiques liés de manière non covalente. D'abord, le PF4 se dimérise, deux monomères s'assemblent de façon antiparallèle. Puis, ces dimères vont se coller dos-à-dos pour former un tétramère [61].

La structure cristalline révèle que chaque monomère est constitué d'une boucle N-terminale étendue, d'une feuille  $\beta$  intermédiaire formée de trois brins antiparallèles et d'une extrémité C- hélicoïdale  $\alpha$ . Les extrémités N et C-terminales se trouvent sur la surface extérieure de la molécule, alors que les feuilletts  $\beta$  hydrophobes se retrouvent masqués au centre du tétramère et forment un noyau. Les hélices  $\alpha$  des C-terminale riches en lysine contribuent à une bande circonférentielle de résidus d'acides aminés chargés positivement qui s'impliquent dans la liaison à l'héparine (figure 12). En solution, le PF4 existe dans un équilibre dynamique entre les formes monomères, dimères et tétramères [62].



**Figure 12 : Structure du PF4 [61].**

(A). Structure tertiaire du PF4 : deux monomères de PF4 s'associent au niveau du premier feuillet- $\beta$ , en antiparallèle. (B). Forme tétramérique de PF4 : deux dimères de PF4 s'associent grâce aux extrémités N-terminales flexibles des protéines. Les hélices  $\alpha$  se retrouvent à l'extérieur formant ainsi un anneau de charges positives pouvant interagir avec l'héparine.

### c. Activité biologique

La principale fonction physiologique du facteur plaquettaire 4 est de favoriser la coagulation du sang. Le PF4 chargé positivement, présent en effet, une forte affinité de liaison pour l'héparine et d'autres glycosaminoglycanes (GAG). La liaison de ce facteur, entraîne la neutralisation de la charge négative des chaînes latérales d'héparane sulfate des GAG à la surface des plaquettes et des cellules endothéliales, ce qui facilite l'agrégation des plaquettes et la formation du thrombus. En plus de la coagulation du sang, cette chimiokine joue également un rôle dans l'immunité innée et adaptative quand les plaquettes sont activées en réponse à des infections [63] [64].

Il est important de noter que lorsque les patients sont exposés à l'héparine, celle-ci se lie au PF4 et favorise la formation des complexes PF4-héparine ultra volumineux et antigéniques, ce qui entraîne chez certains patients, le développement des anticorps IgG. Les complexes circulants PF4-héparine-anticorps ainsi formé peuvent se lier à la surface des thrombocytes sur le récepteur Fc $\gamma$ RIIA provoquant une activation plaquettaire. La conséquence est un état pro-thrombotique sévère affectant souvent la circulation veineuse mais parfois aussi artérielle [41].

Le facteur plaquettaire 4 a également un rôle essentiel dans la clairance des virus, les souris knock-out CXCL4 présentent une clairance virale réduite du poumon par rapport aux souris

de type sauvage. Cela est en accord avec la diminution de l'immunité innée observée chez les souris PF4 knock-out pendant les premières infections [63].

Ses effets ne se limitent pas uniquement à cela, le PF4 est décrit comme étant la première chimiokine pouvant inhiber la néovascularisation. En effet, son rôle sur l'angiogenèse a été mis en évidence, *in vitro* et *in vivo*, par plusieurs études. *In vitro*, Feraud et *al.* ont démontré que le PF4 bloque la migration des cellules endothéliales mais aussi la tubulogenèse, dans du collagène de type I. *In vivo*, Maione et *al.* ont trouvé que le PF4 peut inhiber l'angiogenèse de la membrane choriollantoïdienne de poulet, cependant, il ne bloque pas la prolifération des cellules tumorales *in vitro* selon Sharpe et *al.* [61].

Par ailleurs, le CXCL4 est impliqué dans la pathologie d'une variété de maladies inflammatoires, notamment les syndromes myélodysplasiques, le paludisme, l'athérosclérose, le VIH-1, les maladies inflammatoires de l'intestin et l'arthrite psoriasique ainsi que l'arthrite rhumatoïde [63].

## **2. Protéines kinases C (PKC) dans les plaquettes**

Depuis leur découverte en 1977 par Nishizuka et ses collègues, les protéines kinases C (PKC) ont occupé un énorme intérêt scientifique se rapportant à plusieurs domaines d'étude. En fait, elles constituent une famille ubiquitaire de kinases sérine/thréonine occupant un rôle primordial dans le contrôle et la régulation de multitudes mécanismes cellulaires : la prolifération, la différenciation cellulaire, l'apoptose, la survie et la sécrétion [65].

### **a. Classification et structure des PKC**

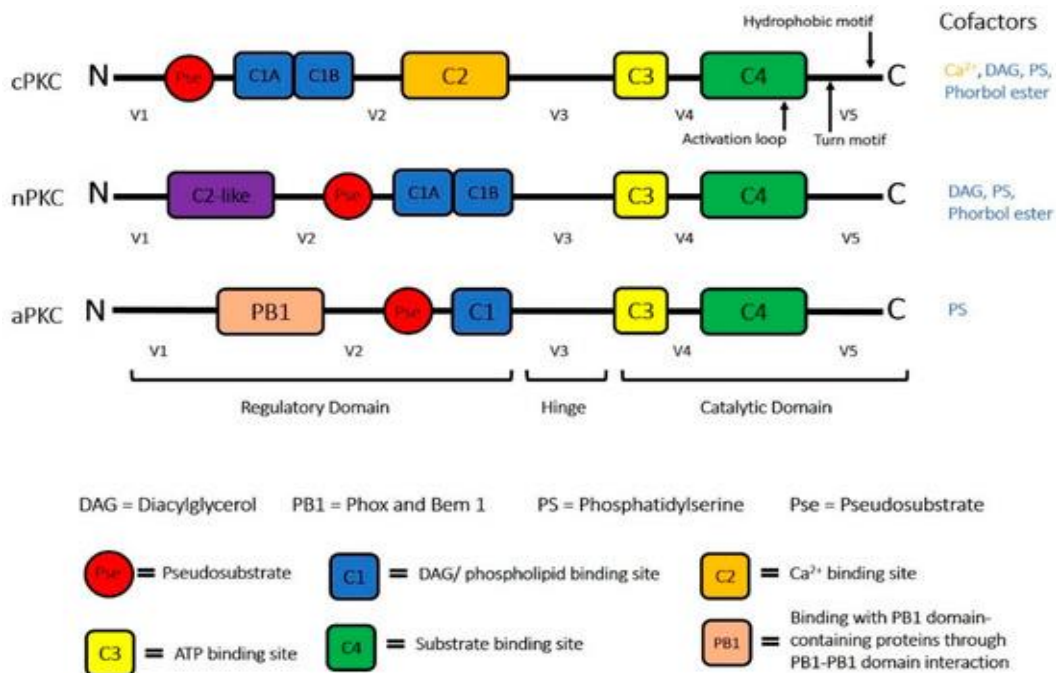
La famille des PKCs comprend 12 isoformes classées en trois sous-groupes sur la base des éléments structurels et des exigences en matière de cofacteurs, soit les isoformes conventionnelles (PKCc) ou classiques ( $\alpha$ ,  $\beta$ I/II et  $\gamma$ ), les isoformes nouvelles (PKCn) ( $\eta$ ,  $\epsilon$ ,  $\delta$  et  $\theta$ ) et les isoformes atypiques (PKCa) ( $\zeta$  et  $\eta$ / $\iota$ ) [66].

Les différentes PKCs partagent plusieurs caractéristiques structurelles communes. Elles sont composées d'un domaine catalytique situé à l'extrémité C-terminale, contient le site de liaison à l'ATP, ainsi que les sites de liaison au substrat et d'un domaine régulateur qui est responsable de la liaison des cofacteurs à l'enzyme, et détermine ainsi les différences existant entre les isoformes des PKCs et une région charnière relie le domaine catalytique au domaine régulateur. En effet, la structure primaire des PKCs est divisée en quatre domaines conservés,



C1-C4, séparés par 5 régions variables, V1-V5. Les régions C3, C4, V4 et V5 en CO2H forment le domaine catalytique, alors que les régions C1, C2, V1, V2 et une partie de V3 de la portion NH2-terminale de la chaîne polypeptidique constituent le domaine régulateur [65] [67].

La classe des PKCc contient un domaine C1 en tandem capable de lier le diacylglycérol (DAG), et un domaine C2 liant le  $Ca^{2+}$ . Elle est donc activée à la fois par le calcium et le DAG. Les nouvelles isoformes (PKCn) contiennent également des domaines C1, mais n'ont pas la capacité de lier  $Ca^{2+}$  au domaine C2. Cette classe ne peut alors être activée que par le DAG. Finalement, les isoformes atypiques qui n'ont pas de domaine C2 et ont un domaine C1 atypique, sont insensibles au DAG et au calcium. D'ailleurs, le pseudo-substrat est une courte séquence des acides aminés présente dans le domaine de régulation des trois sous-familles des PKCs capable de se lier à C4 lorsqu'il n'est pas activé pour maintenir l'enzyme inactive. Lors de la translocation des PKCs à la membrane après leur activation, le pseudo-substrat est libéré, ce qui permet la liaison de l'enzyme à son substrat (figure 13) [67] [68].



**Figure 13 : Structure des trois principales classes de protéines kinases C (PKC) avec leurs activateurs respectifs [67].**

## b. Localisation et maturation des PKC

Les protéines kinases C sont exprimées ubiquitairement à travers les différents tissus de l'organisme, toutefois, chaque isoforme montre une distribution distincte (tableau 5) [65].



Les PKCs sont localisées dans le cytosol, à l'état non activé de la cellule. Une fois activée, les protéines kinases C reçoivent un signal en aval des récepteurs membranaires et sont transloquée du cytosol vers la membrane plasmique afin d'acquérir leur maturité. Le RACK (Receptor for Activated Protein Kinase C-1) est une protéine spécifique d'échafaudage se lie aux PKC après leur activation et les transloquent vers leurs substrats cibles, chaque PKC possède un RACK unique qui régule le positionnement de la PKC à proximité de ses substrats cibles [69] [70].

**Tableau 5 : Distribution tissulaire et facteurs d'activation requis pour les PKCs [65].**

| Sous-groupes de la PKCs | Isoformes    | Distribution tissulaire             | Co-facteurs requis |     |    |
|-------------------------|--------------|-------------------------------------|--------------------|-----|----|
|                         |              |                                     | Ca <sup>2+</sup>   | DAG | PS |
| PKCc (conventionnelles) | $\alpha$     | Ubiquitaire                         | ✓                  | ✓   | ✓  |
|                         | $\beta$ I    | Ubiquitaire                         | ✓                  | ✓   | ✓  |
|                         | $\beta$ II   | Ubiquitaire                         | ✓                  | ✓   | ✓  |
|                         | $\gamma$     | Cerveau                             | ✓                  | ✓   | ✓  |
| PKCn (nouvelles)        | $\delta$     | Ubiquitaire                         | -                  | ✓   | ✓  |
|                         | $\epsilon$   | Cerveau, cœur                       | -                  | ✓   | ✓  |
|                         | $\eta$       | Cœur, peau, poumons                 | -                  | ✓   | ✓  |
|                         | $\theta$     | Muscle, cerveau, cellules sanguines | -                  | ✓   | ✓  |
|                         | $\mu$        | Cellules épithéliales des poumons   | -                  | ✓   | ✓  |
| PKCa (atypiques)        | $\zeta$      | Ubiquitaire                         | -                  | -   | ✓  |
|                         | $\eta/\iota$ | Reins, cerveau, pancréas            | -                  | -   | ✓  |

### c. Phosphorylation et activation des PKC

Les PKC nouvellement synthétisées sont catalytiquement inactives et doivent être phosphorylées sur trois sites. Après leur activation, les PKCs sont transloquée du cytosol vers la membrane plasmique où elles vont interagir avec des protéines afin d'assurer de nombreuses fonctions. En général, il existe deux principaux types de phosphorylation :

l'autophosphorylation sur des résidus sérine/thréonine et la transphosphorylation sur des résidus tyrosine et/ou sérine/thréonine. La transphosphorylation représente une phosphorylation provenant d'une autre kinase [69].

En effet, il est difficile d'élaborer un schéma de phosphorylation universelle qui s'applique à toutes les protéines kinase C. Néanmoins, certains événements de phosphorylation semblent essentiels à l'activité de la grande majorité des PKCs, il est alors possible d'établir une certaine cascade de phosphorylation pouvant s'appliquer aux PKC en général. Les PKCs passent par 3 phases de phosphorylation essentielles lors de leur activation, afin d'atteindre la maturation complète. En premier, la protéine kinase 3-phosphoinositide-dépendante (PKC $\delta$ ) phosphoryle une thréonine conservée près de la boucle d'activation de la PKC. Cette étape produit une autophosphorylation au niveau du "motif hydrophobe" et du "motif turn" ce qui donne une kinase résistante aux phosphatases et aux protéases qui peut répondre aux médiateurs secondaires intracellulaires, mais avec la poche de liaison au substrat occupée par le motif pseudo-substrat [71] [65].

Dans plusieurs types de cellules, la PKC $\delta$  est phosphorylée de manière stable au niveau de Ser 643 (motif turn) et Ser 662 (motif hydrophobe), toutefois, conserve peu de phosphorylation au niveau de la boucle d'activation (Thr 505). La phosphorylation de Thr 505 est associée à une activité kinase accrue. En plus, de ces trois résidus Ser/Thr (Thr 505, Ser 643 et Ser 662) connus comme sites de phosphorylation de la PKC $\delta$ , neuf résidus tyrosine ont été définis (Tyr 52, Tyr 64, Tyr 155, Tyr 187, Tyr 311, Tyr 332, Tyr 512, Tyr 523 et Tyr 565) [72].

#### **d. Rôle de la PKC $\delta$ dans l'activation plaquettaire**

Plusieurs isoformes de la PKCs ont été identifiées dans les plaquettes à savoir les PKCS  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\delta$ ,  $\theta$ ,  $\epsilon$ ,  $\eta$ ,  $\zeta$  et  $\mu$ . Chacune de ces isoformes joue un rôle distinct dans la fonction plaquettaire, en réponse à la thrombine qui signale et active les plaquettes via des récepteurs de moyenne/faible et de hautes affinités : les (PAR-1, PAR-4) et le GPIb $\alpha$ , respectivement [69].

Dans les plaquettes, la PKC $\delta$  a été identifiée dans différentes voies de signalisation et peut être un régulateur positif ou négatif de l'activation et de la sécrétion plaquettaire, tout dépendamment de la nature des stimuli et des récepteurs activés. Dans certaines voies telles que les récepteurs de la thrombine et du collagène, la PKC $\delta$  est directement impliquée. En effet, lorsque les plaquettes sont stimulées à l'aide d'agonistes spécifiques des récepteurs à la thrombine, PAR-1 et PAR-4, la PKC $\delta$  est positivement impliquée dans la dégranulation

plaquettaire. À l'inverse, la PKC $\delta$  limite la sécrétion des granules denses, lorsque les plaquettes sont activées par un agoniste spécifique du GPVI $\alpha$ . Dans d'autres voies telles que l'activation des récepteurs TLR-4 et ADP, la PKC $\delta$  peut être impliquée indirectement [73] [74].

Étant donné que l'activation plaquettaire par la thrombine phosphoryle le résidu Tyr565 et l'activation plaquettaire par la thrombine et le collagène, qui active les récepteurs PAR-1 et PAR-4, induit la phosphorylation de la PKC $\delta$  au niveau du résidu Tyr311. La phosphorylation de ces deux résidus dépend de la kinase Src et de la PLC [69].

# **Chapitre II :**

## **Matériel et méthodes**

## I. Phase préanalytique

L'étude a été réalisée à l'Hôpital Universitaire International Cheikh Zaid de Rabat sur six prélèvements sanguins, trois échantillons de sujets vaccinés avec Oxford/AstraZeneca et trois échantillons de donneurs sains non vaccinés (témoins).

### 1. Matériel

- 8 × tubes coniques stériles 50 mL (Sarstedt, 62.547.004)
- 2 × Embouts de micropipette 10 µL (Sarstedt, 70.1116)
- 2 × Embouts de pipette 5000 µL (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
- Centrifugeuse
- Bain-marie 37°C
- Compteur de coures (Beckman Coulter, AcT Diff)

### 2. Solutions et réactifs

- 20 mL de Citrate Dextrose Anticoagulant (ACD) (Fenwall, C4B7891X) ;
- 50 ml de tampon HBSS complet (tableau 6) placé dans un tube conique de 50 ml dont le pH est ajusté à 7.4 et conservé à 4°C ;
- 25 ml de tampon citrate HBSS (tableau 7) placé dans un tube conique de 50 ml dont le pH est ajusté à 7.4 et conservé à 4°C ;
- Concentration mère de Prostaglandine PGE1 à 10000 µg/ml (dissoute dans l'éthanol) conservée à -20°C (Sigma, P5515).

**Tableau 6 : 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                |

|   |       |        |         |
|---|-------|--------|---------|
| <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>MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O</b> | 0.2   | 0.1    | 0.81 mM |
| <b>CaCl<sub>2</sub> anhydre</b>         | 0.144 | 0.072  | 1.3 mM  |

**Tableau 7 : Tampon citrate HBSS**

| <b>Composés</b>   | <b>g/1000ml</b> | <b>g/500ml</b> | <b>Concentrations finales</b> |
|---|-----------------|----------------|-------------------------------|
| <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<br/>Sodium citrate</b> | 3.794           | 1.897          | 12.9 mM                       |

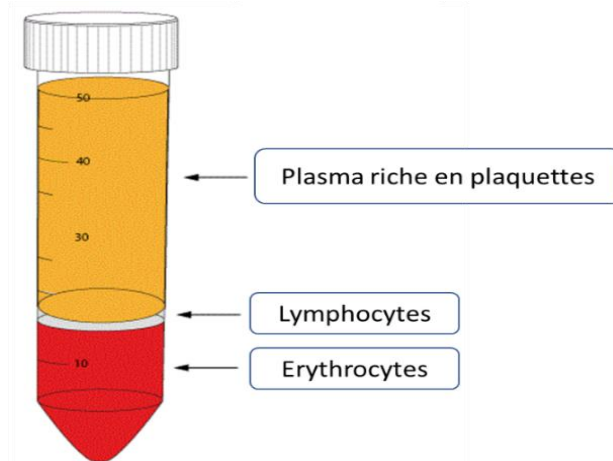
### **3. Collecte de sang**

- ◆ 5 ml d'ACD a été placé dans chacune des seringues de 30 ml ;
- ◆ Après avoir obtenu le consentement du donneur, 25 ml de sang veineux a été prélevé dans chacune des 6 seringues ;
- ◆ Le sang contenu dans les seringues a été vidé lentement dans les tubes coniques de 50 ml (le volume de sang a été égal dans chaque tube conique) ;
- ◆ Une numération formule sanguine a été effectuée au moyen du compteur Coulter ;
- ◆ Les tampons HBSS complet et citrate HBSS ont été placés au bain-marie à 37°C pour les réchauffer ;

### **4. Isolation du PRP (plasma riche en plaquettes)**

- ◆ Le sang collecté a été centrifugé dans des tubes coniques de 50 ml à 1000 RPM (200 g) pendant 15 minutes ;

- ◆ Une fois la centrifugation est terminée, le PRP a été séparé des couches lymphocytaire et érythrocytaire (figure 14) ;
- ◆ À l'aide d'une pipette de transfert en plastique, la couche supérieure de PRP a été transférée soigneusement et lentement dans un nouveau tube conique de 50 ml ;
- ◆ La PGE1 a été ajoutée au PRP à une concentration finale de 1  $\mu\text{g}/\text{mL}$  (1  $\mu\text{L}$  de solution mère de PGE1 pour chaque 10 mL de PRP) pour éviter l'activation des plaquettes ;
- ◆ Avec une pipette de transfert en plastique, la PGE1 a été mélangée doucement et lentement avec le PRP ;
- ◆ Le PRP a été centrifugé à 2300 PRM (1000 g) pendant 10 minutes ;
- ◆ Une fois la centrifugation est terminée, le PPP (plasma pauvre en plaquettes) a été prélevé par aspiration sans perturber le culot plaquettaire contenant les plaquettes avec d'autres débris ;



**Figure 14 : Différentes phases obtenues après la première centrifugation du sang.**

## **5. Lavage et préparation des plaquettes**

- ◆ Les plaquettes ont été lavées avec 25 ml de citrate HBSS tampon afin de se débarrasser des débris et d'obtenir des plaquettes pures ;
- ◆ 1,25  $\mu\text{L}$  (concentration finale 0,5  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) de PGE1 a été ajouté à la suspension plaquettaire pour éviter l'activation lors de la centrifugation finale ;
- ◆ La suspension plaquettaire a été centrifugée à 2000 RPM (800 g) pendant 10 minutes ;
- ◆ 5 ml de tampon complet HBSS a été ajouté doucement au culot plaquettaire ;
- ◆ À l'aide d'une pipette de transfert en plastique, le culot de plaquettes a été remis très délicatement en suspension avec le tampon complet HBSS ;

- ◆ Selon la taille du culot plaquettaire, un volume approprié de tampon HBSS complet a été ajouté pour avoir une suspension de plaquettes qui pourrait être analysée par le compteur Coulter ;
- ◆ Une numération plaquettaire initiale a été effectuée avec le compteur Coulter ;
- ◆ Selon le comptage, la concentration plaquettaire a été ajustée à  $250 * 10^6$  plaquettes/mL avec le tampon complet HBSS ;
- ◆ Une deuxième numération plaquettaire a été effectuée pour s'assurer que le comptage a été bien effectué ;
- ◆ Finalement, les plaquettes ont été lysées en ajoutant 50  $\mu$ L de la solution de lyse (cette étape que pour l'analyse par western blot et Elisa).

## II. Phase analytique

### 1. Western blot

La méthode d'analyse western blot a été réalisée pour diriger un anticorps approprié contre la PKC $\delta$  phosphorylée au niveau du site Tyr311.

#### a. Préparation des gels

**Tableau 8 : Gel de résolution**

| 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%                      | 75 $\mu$ l  |        |        |        |        | 0.09% (vol/vol)   |
| APS 10% (ajouter en dernier) | 75 $\mu$ l  |        |        |        |        | 0.09% (vol/vol)   |
| TEMED (ajouter en dernier)   | 3.8 $\mu$ l |        |        |        |        | 0.0004% (vol/vol) |



**Tableau 9 : Gel d'empilement**

| 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% (ajouter en dernier) | 38µl   | 0.01% (vol/vol)  |
| TEMED (ajouter en dernier)   | 3.8µl  | 0.001% (vol/vol) |

### b. Réactifs et solutions utilisés

- **SDS 10%** : 1g du dodécylsulfate de sodium dilué dans 10 ml d'H<sub>2</sub>O stérile (solution conservée à -20°C) ;
- **TRIS 1.5M pH 8.8** : 45, 43g du TRIS dilué dans 200 ml d'H<sub>2</sub>O stérile, le PH est ajusté à 8.8 avec 12N HCl puis la solution est complétée à 250 ml avec H<sub>2</sub>O stérile (solution conservée à 4°C) ;
- **TRIS 0.5M pH 6.8** : 15,14g du TRIS dilué dans 200 ml d'H<sub>2</sub>O stérile, le PH est ajusté à 6.8 avec 12N HCl puis la solution est complétée à 250 ml avec H<sub>2</sub>O stérile (solution conservée à 4°C) ;
- **Persulfate d'ammonium (APS) 10 %** : 1g de Persulfate d'Ammonium dissout dans 10 ml d'H<sub>2</sub>O stérile (aliquotes de 150µl conservées à -20°C) ;
- **Acrylamide Bis-Acrylamide (29:1)** : 20g d'acrylamide et 1g de Bis-Acrylamide sont dissouts dans 100 ml d'H<sub>2</sub>O stérile. La solution est protégée de la lumière en enveloppant la bouteille avec de l'aluminium (solution conservée à 4°C) ;
- **Tampon de migration 10X** : 30g du TRIS, 144g de glycine et 10g SDS dissouts dans 1000 ml d'H<sub>2</sub>O stérile (solution conservée à 4°C et diluée à 1/10 avant l'utilisation) ;
- **Tampon de transfert** : 12,115g du TRIS, 57,6 g de glycine, 800 ml méthanol et 4g SDS dissouts dans 3200 ml d'H<sub>2</sub>O stérile pour obtenir un volume final de 4L (solution conservée à 4°C) ;
- **TBS 10X** : 24.2g du TRIS et 87.66g NaCl dissouts dans 900 ml d'H<sub>2</sub>O stérile, le PH est ajusté à 7.5 avec 12N HCl. La solution est complétée jusqu'à un volume de 1L et diluée au 1/10, enfin, 1ml de Tween a été ajouté pour obtenir (0,1%) dans 1L ;
- **Ac anti-phospho-PKCδ Tyr311** : anticorps primaire ;

- **Chèvre-anti-lapin-HRP** : anticorps secondaire ;
- **Des anticorps anti-béata actine** : pour s'assurer que la lyse des plaquettes a été bien effectuée et que toutes les protéines issues de la dégranulation plaquettaire sont présentes, avec les mêmes concentrations, dans les échantillons à analyser ;
- **BSA à 5%** ;
- **ddH<sub>2</sub>O** ;
- **Lait écrémé en poudre** ;
- **Solution ECL.**

### c. Principe

Les protéines ont été soumises à une électrophorèse en gel de polyacrylamide (4-8%) et transférées par la suite sur des membranes de nitrocellulose dans du tampon de transfert pendant 120 min à 4 °C. Ces membranes, par après, ont été soumises à une solution de blocage pendant 60 min et incubées avec un anticorps anti-phospho-PKCδ Tyr311 approprié pendant une nuit à 4 °C. Après, 3 lavages avec du TBS-Tween, elles ont été incubées encore pendant 60 min à température ambiante avec un anticorps secondaire dilué au 1/10 000. De nouveau, les membranes ont été lavées dans du TBS-Tween et traitées avec des réactifs ECL pendant 1 minute.

Enfin, les membranes ont été exposées sur un film radiographique pendant 5 minutes et les bandes correctes ont été identifiées en utilisant des standards SDS PAGE pré-colorés (marqueur) avec des poids moléculaires connus.

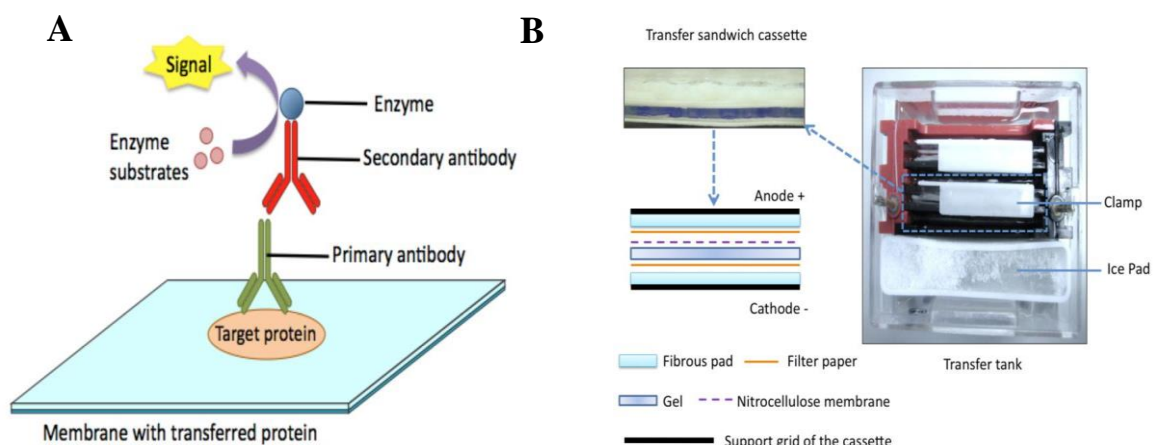
### d. Protocole de l'analyse

- ◆ Les moules en verre (1.5mm) pour les gels ont été nettoyé avec de l'éthanol et chacun, monté sur le porte-verre vert qui, lui-même, monté sur le support (une eppendorf a été utilisé pour créer une pression sur le support) ;
- ◆ Une solution de gel de résolution à 8 % et une solution de gel d'empilement à 4 % ont été préparé (tableaux 8 et 9) ;
- ◆ Une fois la solution est prête, l'APS a été ajouté puis le TEMED, la solution a été bien mélangée et suffisamment placée dans le moule en verre jusqu'à l'atteinte de la ligne verte du support ;

- ◆ 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 et une fois le gel est polymérisé, l'eau restante a été absorbé avec un Kimwipe ;
- ◆ L'APS puis le TEMED ont été ajouté à la solution de gel d'empilage et la solution a été mélangée et placée sur le gel de résolution ;
- ◆ Une fois que le gel d'empilement est polymérisé, les puits ont été remontés avec du ddH<sub>2</sub>O ;
- ◆ Les moules en verre contenant les gels ont été placé dans la boîte de migration, le tampon de migration 1X a été ensuite ajouté à la boîte jusqu'à ce qu'elle soit pleine ;
- ◆ Les protéines ont été chargées dans les puits (les puits vides ont été remplis avec le tampon Lammeli 1X approprié, et l'étalon de poids moléculaire a 15µl) ;
- ◆ 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) ;
- ◆ Une fois que la ligne bleue a dépassé le gel d'empilement, la migration a été passée en tension constante (100V pour 1 gel, 120V pour 2 gels) ;
- ◆ Lorsque la ligne bleue atteint le fond du gel, la migration a été arrêtée ;
- ◆ Un morceau de la 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 X7cm) ;
- ◆ Le sandwich de transfert a été préparé pour chaque gel dans l'ordre suivant (en veillant à ce que le côté noir de la cassette soit en bas, et que le sandwich soit préparé tout en étant immergé dans le tampon de transfert) ;
  - a. Éponges
  - b. 2 papiers de chromatographie
  - c. Gel soigneusement retiré du moule en verre (le bon ordre du gel a été gardé sans inversion)
  - d. Membrane de nitrocellulose
  - e. 2 papiers de chromatographie
  - f. Éponges
- ◆ 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), puis la boîte a été remplie avec le tampon de transfert ;

- ◆ Les électrodes ont été branchées, le transfert a été démarré sous ampérage constant (400mA pour 1 ou 2 gels). Le temps a été réglé pour 120 minutes ;
- ◆ Une fois le transfert est terminé, la solution TBS 1X a été préparée en diluant la solution 10X et le volume approprié de Tween (1ml pour 1L de TBS) pour obtenir une solution de 0,1% ;
- ◆ Un peu de TBS-Tween a été ajouté dans un récipient à tapotement placé sur la plate-forme à bascule ;
- ◆ La cassette de transfert a été retirée de la boîte de transfert, et a été démontée soigneusement pour retirer la membrane de nitrocellulose (en veillant à conserver son orientation), puis la membrane a été placée dans la solution TBS-Tween ;
- ◆ Deux lavages de 5 minutes chacun ont été effectués ;
- ◆ 25ml de la solution de lait à 5% a été préparé dans du TBS-Tween pour chaque membrane (0.5g de lait en poudre pour 10ml de TBS-Tween) ;
- ◆ La membrane a été placée dans la solution de lait à 5 % et a été laissée incuber pendant 1 heure sur la plate-forme à bascule (réglée à vitesse moyenne) ;
- ◆ Après l'incubation de blocage d'une heure, la membrane a été lavée 3 fois avec TBS-Tween pendant 5 minutes chacune ;
- ◆ 5ml de BSA à 5% a été préparé dans du TBS-Tween pour chaque membrane (0.5g de BSA pour 10ml de TBS-Tween) et a été placé dans le flacon d'incubation ;
- ◆ 5 $\mu$ l d'Ac anti-phospho-PKC $\delta$  Tyr311 approprié a été ajouté aux 5ml de BSA 5% pour obtenir une dilution de 1/1000 ;
- ◆ Une fois les 3 lavages sont effectués, la membrane a été placée dans le flacon contenant l'anticorps dilué dans la BSA. Ce flacon a été ensuite, fixé sur le rotor avec un ruban adhésif et a été laissé incubé pendant toute la nuit à 4°C ;
- ◆ Le lendemain, la membrane a été retirée du flacon et lavée 3 fois avec du TBS-Tween fraîchement préparé ;
- ◆ De nouveau, 5ml de lait à 5% a été préparé dans TBS-Tween pour chaque membrane ;
- ◆ 0,5 $\mu$ l d'anticorps secondaire (chèvre-anti-lapin-HRP à 4°C) pour 5ml de lait à 5% a été ajouté pour obtenir une dilution de 1/10000 ;
- ◆ 5 ml d'anticorps secondaire dilué a été placé dans le lait dans un nouveau flacon d'incubation propre ;

- ◆ Une fois les 3 lavages terminés, la membrane a été placée dans le flacon contenant l'anticorps secondaire qui est préalablement fixé au rotor avec du ruban adhésif et on l'a incubé pendant 1 heure à température ambiante ;
- ◆ Une fois l'incubation terminée, les membranes ont été lavées 3 fois dans du TBS-Tween ;
- ◆ La solution ECL a été préparée : 2ml de la solution du flacon brun + 2ml de la solution du flacon blanc ;
- ◆ La cassette d'exposition a été préparée ;
- ◆ Une fois les lavages effectués, la membrane a été incubée pendant 1 minute dans la solution ECL, ensuite, elle a été placée entre les feuilles de plastique de la cassette d'exposition ;
- ◆ Déplacer à la pièce sombre, toutes les lumières ont été fermées et seule la lumière rouge a été allumée ;
- ◆ Un morceau de film a été coupé en fonction de la taille de la membrane ;
- ◆ Le film a été placé sur la membrane (en évitant tout mouvement du film sur la membrane) ;
- ◆ La cassette d'exposition a été fermée et le film a été exposé pendant 5 minutes ;
- ◆ Le film a été retiré, puis incubé dans la solution de développement jusqu'à ce que les bandes commencent à apparaître ;
- ◆ Le film a été soigneusement lavé avec de l'eau, puis placé dans la solution de fixation ;
- ◆ Le film a été retiré de la solution de fixation, puis lavé dans l'eau.



**Figure 15 : Méthode d'analyse western blot.**

(A). Principe de western blot ;(B). Illustration de la mise en place de la cassette sandwich dans la cuve de transfert observée depuis le haut.

## 2. Test Elisa

### a. Matériel nécessaire

- **Microplaque ELISA** : contenant 12 barrettes de 8 puits, sensibilisée avec un anticorps polyclonal de lapin, purifié par affinité, stabilisée et emballé dans un sachet d'aluminium en présence d'un déshydratant ;
- **Pipettes à 8 canaux** : permettant de distribuer des volumes de 50 à 300 µl ;
- **Pipettes à volume variable** : de 0 à 20 µl, de 20 à 200 µl et de 200 à 1000 µl ;
- **Agitateur** ;
- **Laveur pour les microplaques** ;
- **Lecteur des microplaques ELISA** : réglé à une longueur d'ondes de 450 nm.

### b. Réactifs

- **SD** : 2 flacons de 50 ml de diluant échantillon-PF4, prêt à l'emploi ;
- **CI** : 1 flacon de 0,5 ml de PF4 contrôle I (Haut) ;
- **CII** : 1 flacon de 0,5 ml de PF4 contrôle II (Bas) ;
- **IC** : 3 flacons d'immunoconjugué, anticorps polyclonal de lapin, immuno-purifié, spécifique du PF4 et couplé à la peroxydase ;
- **CD** : 1 flacon de 25 ml de diluant pour immunoconjugué, prêt à l'emploi ;
- **WS** : 1 flacon de 50 ml de la solution de lavage, 20 fois concentrée ;
- **TMB** : 1 flacon de 25 ml de substrat de la peroxydase : 3,3', 5,5'-Tétraméthylbenzidine, contenant du peroxyde d'hydrogène, prêt à l'emploi ;
- **SA** : 1 flacon contenant 6 ml d'Acide Sulfurique 0,45M, prêt à l'emploi (Stop solution).

### c. Principe

La plaque ELISA a été recouverte par des anticorps polyclonaux de lapin, purifiés par immuno-affinité, spécifiques du facteur plaquettaire 4 (PF4).

Les échantillons dilués à analyser ont été introduits dans les puits de la plaque sensibilisée. Puis le facteur plaquettaire 4 présent, a été fixé sur l'anticorps déjà immobilisé. À la suite d'une étape de lavage, le PF4 fixé sur la plaque a été décelé par l'immunoconjugué, anticorps

polyclonal de lapin purifié par immuno-affinité et couplé à la peroxydase (HRP), qui se lie aux épitopes libres du PF4. Après une nouvelle étape de lavage, Tetramethylbenzidine (TMB) en présence d'eau oxygénée ( $H_2O_2$ ) (substrat de la peroxydase), a été introduit dans les puits de la plaque et une coloration bleue est apparaît.

L'arrêt de la réaction par l'acide sulfurique a fait virer la coloration au jaune. Cette coloration a été proportionnelle à la quantité du PF4 humain présent dans les échantillons analysés.

#### **d. Protocole de l'analyse**

- ◆ Le kit d'Elisa a été conservé à 4°C, avant le démarrage du test tous les réactifs ont été ramenés à température ambiante (21°C) et homogénéisés par retournement ;
- ◆ La solution de lavage concentrée a été agitée pour assurer la dissolution des cristaux puis diluée au 20<sup>ième</sup> dans l'eau distillée ;
- ◆ Les six échantillons à analyser ont été dilués au 1/50 dans le diluant échantillon (PF4-Sample Diluent) et les contrôles I et II dilués au 1/20 dans l'eau distillée ;
- ◆ 200 µl et 100 µl de chaque échantillon à tester et du contrôle I et II dilué, respectivement, ont été introduits dans les puits ;
- ◆ Après une 1 heure d'incubation à température du laboratoire (18-25°C), les puits ont été vidés et lavés 5 fois avec 300 µl de solution de lavage diluée ;
- ◆ 200 µl d'immunoconjugué Anti-PF4-HRP reconstitué par 7.5 ml de diluant pour immunoconjugué a été ajouté, puis, les puits ont été incubés pendant une 1 heure à température du laboratoire (18-25°C) ;
- ◆ Après 5 lavages avec 300 µl de la solution de lavage diluée, 200 µl du substrat TMB /  $H_2O_2$  a été immédiatement introduit dans les puits et ont été couverts et incubés pendant 5 min dans l'obscurité ;
- ◆ La réaction a été arrêtée en ajoutant 50 µl d'acide sulfurique, la solution a été introduite dans le même ordre que la solution du substrat ;
- ◆ Les densités optiques à 450 nm ont été lues dans les 30 min suivant l'ajout de la solution d'arrêt.



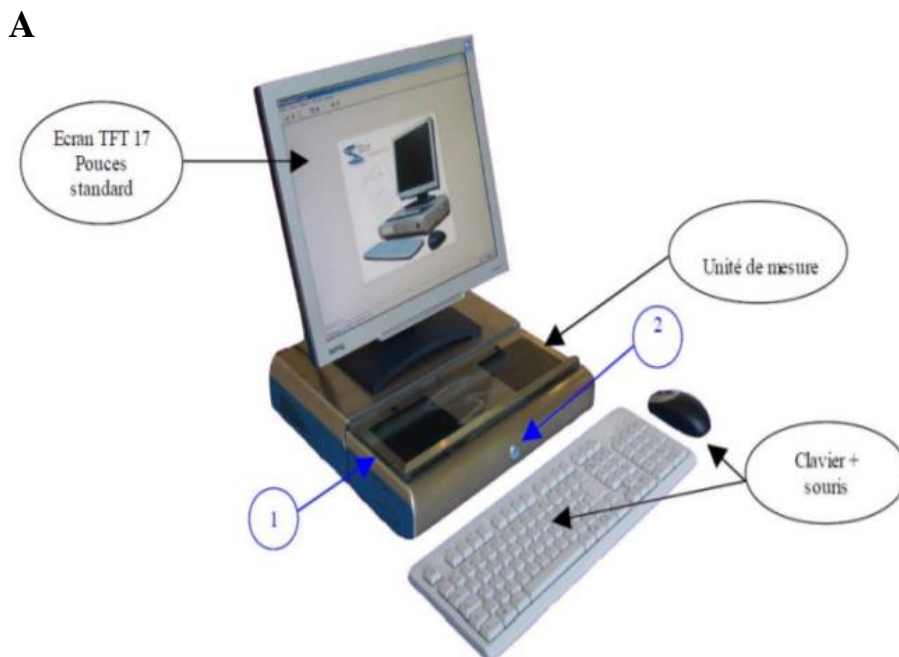
**Figure 16 : Test Elisa pour la détermination quantitative du PF4.**

*(A). Kit Elisa contenant la microplaque Elisa et les réactifs; (B). Lecture des résultats*

### **3. Agrégométrie optique**

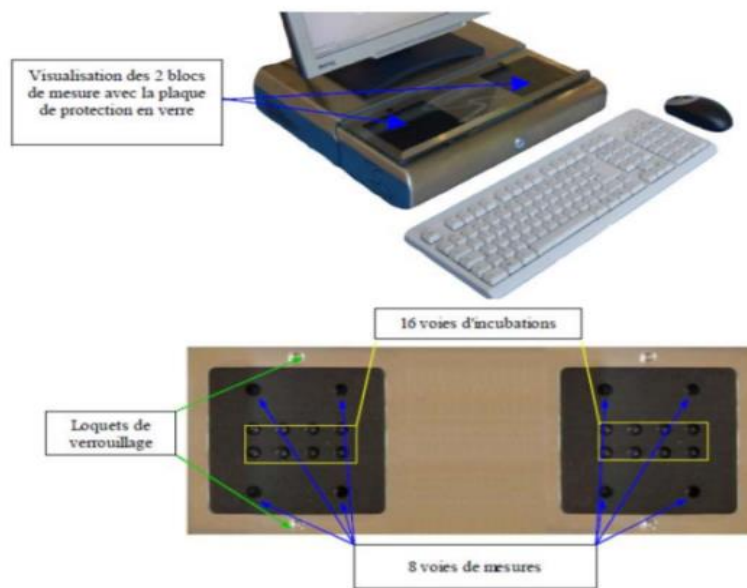
#### **a. Matériel**

- **Un thrombo-agrégomètre TA 4V (SD Medical, France) (figure 17) ;**
- **Pipette automatique de 200µL-1000µL ;**
- **Tube de polystyrène de 5mL ;**
- **Centrifugeuse ;**
- **Agitateur magnétique.**





## B



**Figure 17 : Thrombo-agrégomètre TA 4V SD Medical.**

(A). 1: Plaque en verre de protection permettant l'isolation du bloc de mesure, 2 : Bouton Marche/Arrêt ; (B). Les deux blocs de mesure du thrombo-agrégomètre TA 4V SD Médical.

### b. Préparation des réactifs

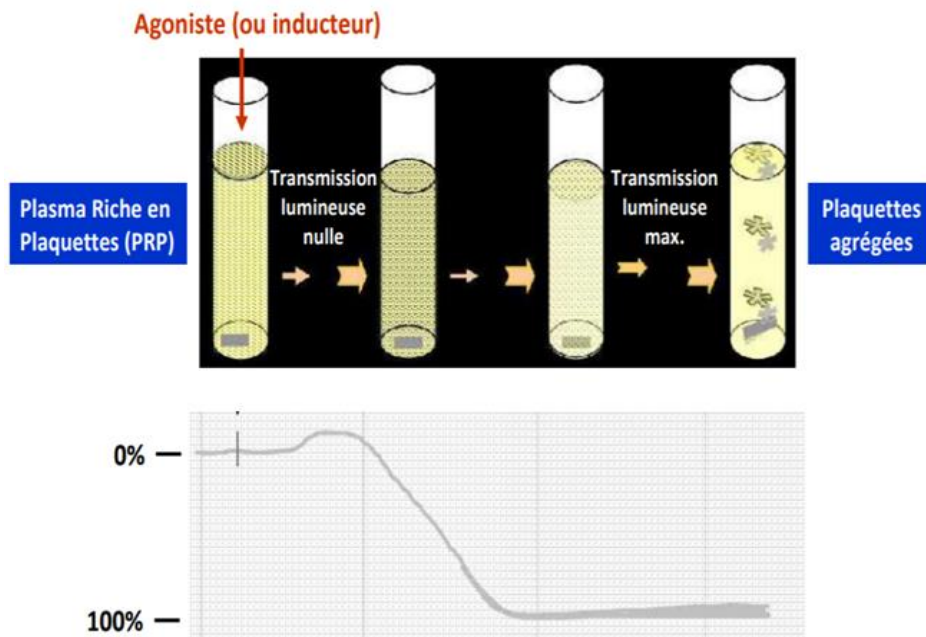
- **ADP, un agoniste plaquettaire (marque SD Medical, France)** : chaque flacon de 0,5 ml a été reconstitué avec 0,5 ml d'eau distillée, pour obtenir une solution à 200  $\mu\text{M}$  d'ADP et après avoir bien agité la préparation jusqu'à dissolution complète, la solution a été laissée se stabiliser à température ambiante pendant 30 minutes en agitant de temps en temps.

### c. Principe

L'agrégation plaquettaire a été évaluée par un agrégomètre optique à huit canaux (SD Medical Innovation, Frouard, France).

Le principe du test est basé sur la mesure de la transmission lumineuse à travers un échantillon de plasma riche en plaquettes (PRP) obtenu par centrifugation d'un échantillon de sang entier. Le plasma riche en plaquettes est un milieu turbide où la lumière passe peu, l'ajout d'un agoniste plaquettaire exogène à savoir l'ADP, le PRP devient plus clair du fait de la précipitation des agrégats plaquettaires au fond de la cuvette et les rayons lumineux traversent plus facilement le plasma.

La variation du faisceau lumineux a été analysée grâce à un ordinateur. Les résultats ont été représentés sous la forme d'une courbe, agrégation (%) en fonction du temps (figure 18).



**Figure 18 : Principe de l'agrégométrie optique.**

#### **d. Protocole de l'analyse**

- ◆ Le thrombo-agrégomètre a été mis en marche 20 minutes avant la réalisation de tests afin qu'il atteigne une température de 37°C de façon stable ;
- ◆ Pipeter 450 µl de PPP déjà préparé (voir la phase préanalytique) dans une cuvette réactionnelle ;
- ◆ Après l'introduction d'une cuve de PPP dans chacune des voies de mesure que l'on comptait employer, ces voies ont été calibrées à 100% d'agrégation (0% de transmission) ;
- ◆ Pipeter 450 µl de PRP dans une seconde cuvette réactionnelle ;
- ◆ Les cuves de PPP ont été enlevées pour les remplacer par des cuves de PRP afin de calibrer ces voies à 0% d'agrégation (100% transmission) ;
- ◆ Une fois le calibrage est terminé, les cuves de PRP n'ont plus été déplacées afin d'éviter toutes manipulations inutiles et laisser le milieu biologique dans les conditions de mesures ;
- ◆ Un agitateur magnétique tournant à 1000 tours/min a été placé dans chaque cuvette réactionnelle avant l'établissement du 100 % d'agrégation sur le thrombo-agrégomètre avec le PPP et ensuite, du 0 % d'agrégation avec le PRP ;

- ◆ À l'aide d'une pipette, 25  $\mu$ L d'ADP a été ajouté directement dans le PRP après avoir contrôlé la ligne de base et l'absence d'une agrégation spontanée ;
- ◆ L'agrégation des plaquettes a été enregistrée jusqu'à la stabilisation des traces et la transmission de la lumière a été mesurée au moment de l'agrégation maximale.

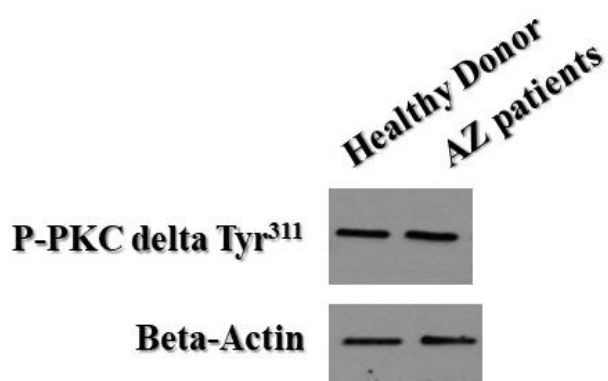
## **Chapitre III : Résultats**

## I. Western blot

Les deux bandes sur la première ligne présentent un même niveau de phosphorylation de la PKC $\delta$  au site Tyr311 chez les 2 cohortes à savoir les sujets immunisés avec ChAdOx1 nCov-19 et les témoins (figure 19).

Pour la protéine de contrôle (Bêta-actine), le profil des deux bandes est semblable ce qui prouve que toutes les protéines issues de la dégranulation plaquettaire sont présentes avec les mêmes concentrations et que la lyse des plaquettes a été bien effectuée.

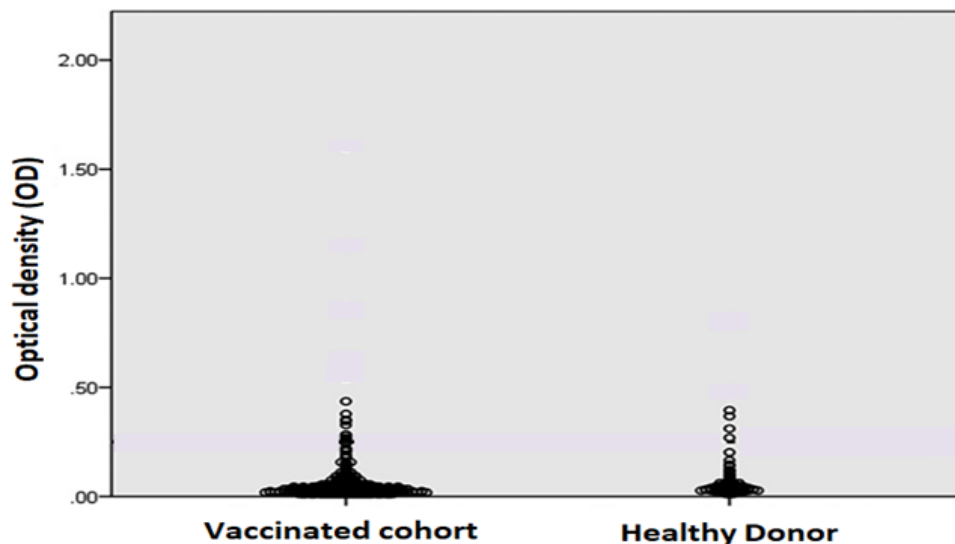
En concluant, alors, que la PKC $\delta$  n'a pas été affectée suite au vaccin.



**Figure 19 : Comparaison des niveaux de phosphorylation de la PKC $\delta$  au résidu Tyr311 chez des sujets vaccinés avec AstraZeneca et chez des sujets sains non immunisés obtenus par la méthode western blot.**

## II. Test Elisa

Les résultats de la technique de dosage d'immunoabsorption par enzyme liée (Elisa) obtenus, montrent que la quantité du PF4 sécrétée par les plaquettes n'a pas augmentée suite à l'immunisation avec AstraZeneca en comparaison avec le taux sécrété de ce facteur chez les donneurs sains non vaccinés (figure 20).

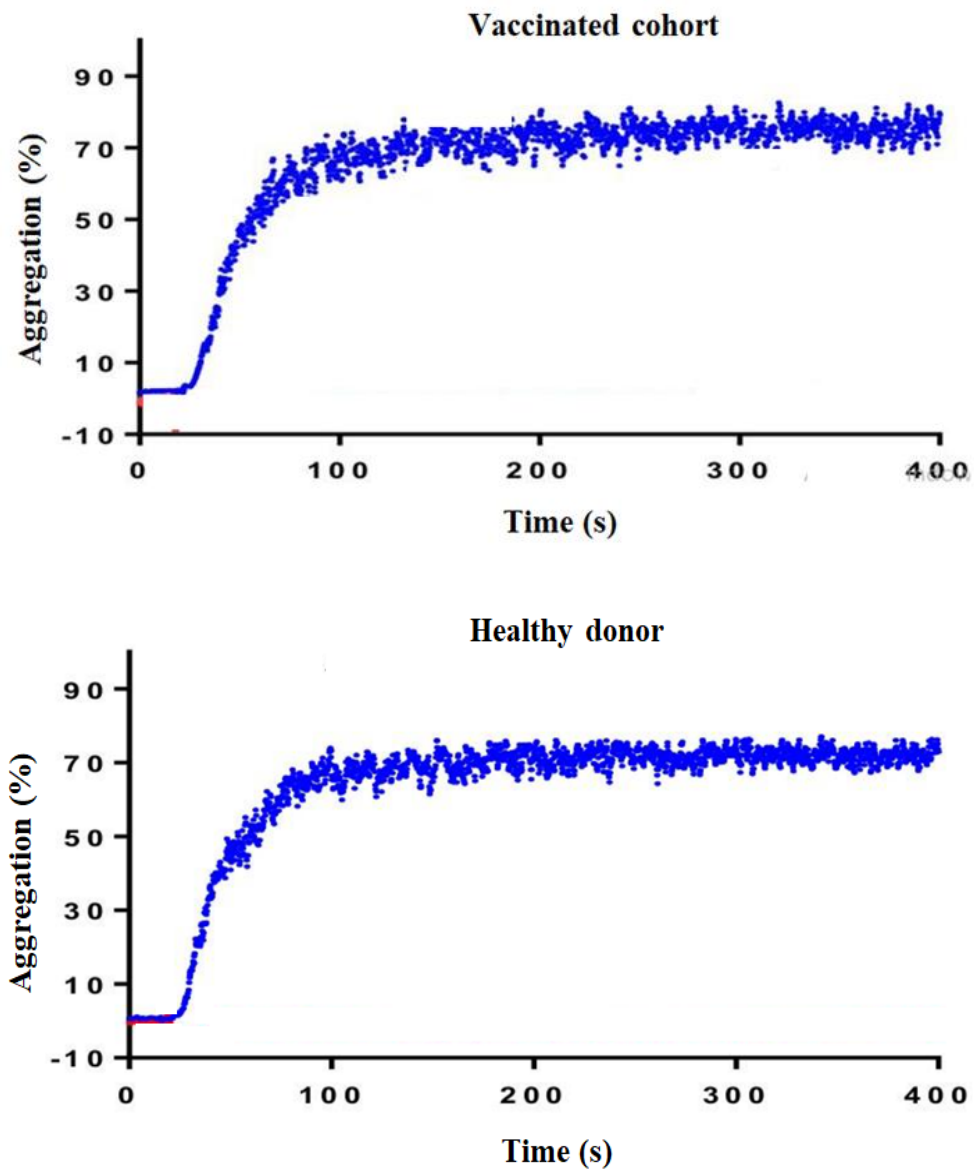


**Figure 20 : Détermination quantitative du PF4 sécrété par les plaquettes chez les sujets vaccinés avec Oxford/AstraZeneca et chez les donneurs sains non vaccinés.**

### **III. Agrégométrie optique**

Le profil d'agrégation plaquettaire induite par une forte dose d'ADP (25  $\mu$ L) est semblable chez les 2 groupes de patients dont le maximum d'agrégation correspond à 70 %.

En effet, les deux courbes présentent une phase de latence moyenne de l'ordre de 27 secondes après l'ajout d'ADP, suivi d'une augmentation progressive de l'agrégation plaquettaire correspond à la liaison de l'agoniste aux récepteurs P2Y1 et P2Y12 présents à la surface des plaquettes et la libération de granules alpha et denses qui stimulent le métabolisme de l'acide arachidonique avec la libération du thromboxane A2. Cela conduit à une libération marquée de l'ADP endogène et vers la fin à une seule phase d'agrégation irréversible (figure 21).



**Figure 21 : Tracés d'agrégation plaquettaire par transmission lumineuse des sujets vaccinés avec AstraZeneca et des sujets sains non vaccinés en réponse à un agoniste plaquettaire.**

# **Chapitre IV : Discussion**



La vaccination massive contre le SARS-CoV-2 a mis en évidence l'apparition d'une complication grave mais rare qui n'avait pas été mis en évidence auparavant lors des essais cliniques. En effet, quelques jours après la vaccination initiale avec ChAdOx1 nCov-19, certains cas d'événements indésirables caractérisés par une activation des plaquettes et des anomalies de la coagulation qui en découlent, observés également chez des patients atteints de la COVID-19 sévère, ont été rapportés chez des sujets en bonne santé qui ne présentent aucun événement prothrombotique antérieur ou de la thrombophilie héréditaire [75].

Dans cette optique, notre travail a été réalisé à l'Hôpital Universitaire International Cheikh Zaid de Rabat pour évaluer la fonction plaquettaire chez deux cohortes différentes : des sujets récemment immunisés avec Oxford/AstraZeneca et des témoins (individus sains non vaccinés). En effet, la phosphorylation de la Protéine Kinase C delta au site Tyr311 à l'intérieur des plaquettes a été analysée par la technique du western blot en utilisant des anticorps anti-phospho-PKC $\delta$  Tyr311 approprié. L'hypothèse d'un lien entre l'augmentation de la phosphorylation de la PKC $\delta$  Tyr311 et la vaccination avec ChAdOx1 nCov-19 n'a pas été confirmée par les résultats.

Néanmoins, d'autres études ont évalué l'impact de la vaccination avec Oxford/AstraZeneca sur l'activation des plaquettes, en évaluant d'autres biomarqueurs hors que l'augmentation de la phosphorylation au niveau du résidu Tyr311 de la PKC $\delta$ .

Une étude menée par Ostrowski et *al.* sur 3 groupes : 80 personnes récemment vaccinées (55 avec Oxford/AstraZeneca et 25 avec un vaccin à ARNm ([au total : n =16 vaccins Pfizer/BioNTech et n=9 Moderna]) et 55 individus sains non vaccinés (témoins) a démontré, une augmentation de l'activation plaquettaire et de l'activation endothéliale vasculaire ainsi que de l'inflammation pour les groupes vaccinés, bien que la vaccination avec ChAdOx1 nCov-19, ait induit une augmentation plus prononcée des biomarqueurs d'activation plaquettaire (P-sélectine, TGF- $\beta$ , sCD40L), des plusieurs marqueurs d'inflammation (CRP, TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8, IL-10) et de la génération de thrombine par rapport à la vaccination à base d'ARNm. En plus, aucune différence n'a été observée entre ces groupes vaccinés en ce qui concerne le taux d'anticorps anti-PF4 ou la proportion d'individus présentant des anticorps anti-PF4 positifs [76].

En outre, les résultats obtenus par ce groupe de chercheurs scientifiques ont été conforme à ceux d'une étude épidémiologique publiée récemment, selon laquelle la vaccination avec Oxford/AstraZeneca a été associée à une augmentation des événements thromboemboliques

veineux y compris la TVC et à des taux légèrement plus élevés de la thrombocytopénie, des troubles de la coagulation et des saignements [77].

Parallèlement, la quantité du facteur plaquettaire 4 (PF4) sécrétée par les plaquettes a été mesurée par le test immuno-enzymatique Elisa. Pourtant, plusieurs études publiées récemment ont été focalisées sur la détection des anticorps anti-PF4/polyanion chez des sujets immunisés avec AstraZeneca en utilisant la même technique ELISA.

En réalité, le facteur plaquettaire 4 (PF4/CXCL4) a été suggéré comme un facteur central qui médie les événements de la coagulation aberrants produits après l'immunisation avec des vaccins à base de vecteur d'adénovirus. Lors de l'activation plaquettaire, la chimiokine CXCL4/facteur plaquettaire 4 est libérée en quantité abondante et représente un tétramère chargé positivement (cationique) qui peut se complexer avec des molécules chargées négativement (polyanioniques) telles que l'héparine et les glycosaminoglycanes (GAG). Un certain pourcentage des patients développe des anticorps dirigés contre les complexes PF4-héparine. Les complexes formés d'anticorps/PF4 et héparine circulants peuvent se lier au récepteur FcγRIIA des plaquettes et aux récepteurs Fc des autres variétés de cellules sanguines comme les monocytes et les neutrophiles. La liaison au FcγRIIA provoque l'activation des plaquettes, en induisant la libération du contenu des granules cytoplasmiques et des microparticules procoagulantes [41] [47].

Dans ce contexte, Sørvoll et *al.* ont étudié la prévalence des anticorps anti-PF4/polyanion dans une population norvégienne récemment vaccinée avec l'AZD1222. En effet, les anticorps dirigés contre le PF4/PVS (polyvinylsulfonate polyanionique) ont été recherchés par le test immunologique LIFECODES PF4 immunoglobuline G (IgG) ELISA (Immucor, Waukesha, WI), selon les instructions du fabricant à savoir une valeur seuil de densité optique (OD)  $\geq 0,400$  et une dilution de 1/50, chez 492 agents de santé récemment vaccinés avec la première dose d'Oxford/AstraZeneca et chez 120 témoins.

Ils ont trouvé comme résultats, des faibles valeurs de DO dans le test ELISA IgG anti-PF4/PVS avec une numération plaquettaire normale pour les témoins, concernant la cohorte vaccinée, des anticorps anti-PF4/polyanion sans propriétés d'activation plaquettaire ont été détectés chez six individus (densité optique  $\geq 0,4$ , fourchette 0,58-1,16), tous avec une numération plaquettaire normale (supérieure à  $150 \times 10^9/L$ ). Ils ont conclu, donc, que la prévalence des anticorps dirigés contre les complexes PF4/polyanion et la thrombocytopénie a été faible chez les sujets vaccinés avec l'AZD1222. Semblable à ce qui a été rapporté

récemment par deux études différentes menées par des chercheurs Thaïlandais Uaprasert et *al.*, Noikongdee et *al.* qui ont trouvé une faible prévalence d'anticorps anti-PF4 et de la thrombocytopénie chez une population Thaïlandaise après la vaccination avec ChAdOx1 nCoV-19 ainsi qu'aucun de ces anticorps n'était fonctionnel et n'a été associé à la VITT [78] [79] [80].

Inversement, trois autres études publiées dans N. Engl. J. Méd. ont montré des niveaux élevés d'anticorps relatifs aux complexes PF4-polyanion détectés par la méthode immuno-enzymatique ELISA sans exposition antérieure à l'héparine chez la plupart des patients ayant reçu le vaccin ChAdOx1 nCov-19 [81] [82].

En ce qui concerne les résultats de l'agrégométrie optique, aucune agrégation plaquettaire significative n'a été observée après la vaccination avec ChAdOx1 nCov-19. Ces résultats sont similaires à celles rapportés par Campello et *al.* qui ont exclu la présence d'une hypercoagulabilité induite par le fibrinogène, d'une agrégation plaquettaire et d'une augmentation de la génération de thrombine plasmatique après la vaccination, en utilisant comme tests, la thromboélastométrie rotationnelle sur sang totale, l'agrégométrie par impédance sur sang totale et le thrombogramme automatisé calibré (CAT) sur plasma pauvre en plaquettes (PPP), respectivement. De plus, aucune baisse du nombre de plaquettes n'a été détectée.

Dans cette étude, 190 sujets ont été inclus : 101 (53,2 %) ont reçu le vaccin Oxford/AstraZeneca, 89 (46,8 %) ont pris le vaccin à ARNm BioNTech, Pfizer et 28 sujets non vaccinés ont servi de témoins. L'agrégation plaquettaire a été évaluée par l'analyseur MULTIPLATE® (Roche Diagnostics, Milan, Italie) basée sur la méthode d'impédance électrique. En particulier, les plaquettes ont été stimulées avec 3 agonistes différents : 1) le peptide-6 activant le récepteur de la thrombine (TRAP-6) 32 µmol/L ; 2) l'ADP 6,5 µmol/L ; 3) l'acide arachidonique 500 µmol/L en permettant d'évaluer l'agrégation dépendante de la cyclooxygénase. Les résultats de l'agrégation plaquettaire induite par ces 3 agonistes ont été similaires entre les 3 groupes : sujets vaccinés avec ChAdOx1, sujets vaccinés avec BNT162b2 et les témoins. La différence est restée non significative après contrôle, du sexe, de l'âge et de l'hormonothérapie par analyse de régression. Par ailleurs, les patients sous un traitement antithrombotique (cardioaspirine) ont montré une réduction significative de l'agrégation plaquettaire induite par l'acide arachidonique, qui était semblable entre les groupes [83].

À la lumière de toutes ces conclusions, on peut suggérer que l'activation plaquettaire, la libération du facteur plaquettaire 4 (PF4), la formation des complexes et la production d'anticorps anti-PF4/polyanion à des niveaux élevés semblent être une caractéristique déterminante des événements thromboemboliques graves associés à une thrombocytopénie, dénommés thrombocytopénie et thrombose immunitaire induite par le vaccin (VITT) rapportés après la vaccination avec Oxford/AstraZeneca. Toutefois, l'incidence de ces thromboses reste très rare [76].

En outre, ces événements thrombotiques, même si sont très rares, peuvent avoir un impact important sur la stratégie vaccinale et entraîner une hésitation à se faire vacciner dans la population générale, ce qui peut retarder la couverture vaccinale [78].

Finalement, en dépit de ces obstacles, nous concluons d'après la littérature et notre étude que les vaccins disponibles contre le SARS-CoV-2 sont très sûrs et protègent efficacement contre la COVID-19 sévère et constituent donc les outils les plus puissants pour empêcher que nos vies individuelles, nos systèmes de santé et notre économie ne subissent des nouveaux dommages.

# **Chapitre V :**

## **Conclusion et perspectives**

## Conclusion

---

Suite à la généralisation des vaccins contre la COVID-19, des rares cas de thromboses liés à une augmentation d'activation plaquettaire ont commencé à apparaître, notamment en relation avec le vaccin ChAdOx1 nCov-19 à base de vecteur d'adénovirus.

Nos résultats obtenus, montrent que la PKC $\delta$  phosphorylée au niveau du résidu Tyr311, la sécrétion du facteur plaquettaire 4 (PF4) ainsi que l'agrégation plaquettaire ne sont pas affectées suite à la vaccination et donc, une absence d'activation plaquettaire.

Alors, le risque de ces évènements indésirables reste très inférieur par rapport au risque de complications thrombotiques découlant de l'infection par la COVID-19, en particulier pour les cas graves hospitalisés, et le rapport bénéfice/risque reste toujours en faveur du vaccin. Toutefois, ces thromboses si ne sont pas traitées, peuvent être débilitant, voire mortel. Une procédure de gestion standardisée pour le diagnostic et le traitement serait utile pour une détection précoce et un traitement opportun.

## Perspectives

---

- ◆ Des études de population supplémentaires, incluant un large éventail de participants de différentes catégories d'âge et d'autres tests sont nécessaires pour mieux évaluer la fonction plaquettaire et mieux définir l'événement thrombotique rare apparu après l'immunisation avec ChAdOx1 nCov-19.
- ◆ Pour les rares cas développant ces thromboses, les caractéristiques cliniques et biologiques ont été rapportées mais la physiopathologie reste mal comprise surtout l'élément déclencheur de l'activation des plaquettes, ce qui nécessite de faire beaucoup plus de recherches là-dessus.
- ◆ Des investigations supplémentaires sont nécessaires pour déterminer exactement pourquoi le sexe féminin et les tranches d'âge plus jeunes sont bel et bien des facteurs de risque pour la thrombocytopénie immuno-thrombotique induite par le vaccin (VITT) rapportée après la vaccination.
- ◆ Le vaccin Johnson & Johnson (Ad26.COV2.S) est également basé sur un vecteur d'adénovirus recombinant et des rares cas de thromboses associés à une thrombocytopénie ont été aussi liés à ce vaccin. Mes perspectives est d'étudier la prévalence de la thrombocytopénie et des anticorps anti-PF4/Polyanion ainsi que l'élévation des D-dimères par des méthodes à plus haut débit chez la population marocaine récemment vaccinée avec l'Ad26.COV2.S.

## Références bibliographiques

---

- [1] D. Pushparajah, S. Jimenez, S. Wong, H. Alattas, N. Nafissi, et R. A. Slavcev, « Advances in gene-based vaccine platforms to address the COVID-19 pandemic », *Adv. Drug Deliv. Rev.*, vol. 170, p. 113-141, mars 2021, doi: 10.1016/j.addr.2021.01.003.
- [2] N. Chekhlabi, R. Arrab, S. Ettair, et N. Dini, « Impact de la pandémie COVID-19 sur la vaccination des enfants au Maroc: enquête électronique auprès de 103 pédiatres », *Pan Afr. Med. J.*, vol. 38, n° 134, Art. n° 134, févr. 2021, doi: 10.11604/pamj.2021.38.134.24104.
- [3] G. N. Kim *et al.*, « A vesicular stomatitis virus-based prime-boost vaccination strategy induces potent and protective neutralizing antibodies against SARS-CoV-2 », *PLoS Pathog.*, vol. 17, n° 12, p. e1010092, déc. 2021, doi: 10.1371/journal.ppat.1010092.
- [4] « البوابة الرسمية لفيروس كورونا بالمغرب ». <http://www.covidmaroc.ma/Pages/AccueilAR.aspx> (consulté le 27 décembre 2021).
- [5] S. Ahmed *et al.*, « Vaccine Development against COVID-19: Study from Pre-Clinical Phases to Clinical Trials and Global Use », *Vaccines*, vol. 9, n° 8, p. 836, juill. 2021, doi: 10.3390/vaccines9080836.
- [6] H. Ritchie *et al.*, « Coronavirus Pandemic (COVID-19) », *Our World Data*, mars 2020, Consulté le: 27 décembre 2021. [En ligne]. Disponible sur: <https://ourworldindata.org/covid-vaccinations>
- [7] P. Ghasemiyeh, S. Mohammadi-Samani, N. Firouzabadi, A. Dehshahri, et A. Vazin, « A focused review on technologies, mechanisms, safety, and efficacy of available COVID-19 vaccines », *Int. Immunopharmacol.*, vol. 100, p. 108162, nov. 2021, doi: 10.1016/j.intimp.2021.108162.
- [8] R. Kandimalla *et al.*, « Counting on COVID-19 Vaccine: Insights into the Current Strategies, Progress and Future Challenges », *Biomedicines*, vol. 9, n° 11, p. 1740, nov. 2021, doi: 10.3390/biomedicines9111740.
- [9] K.-L. Muir, A. Kallam, S. A. Koepsell, et K. Gundabolu, « Thrombotic Thrombocytopenia after Ad26.COVS.2.S Vaccination », *N. Engl. J. Med.*, vol. 384, n° 20, p. 1964-1965, mai 2021, doi: 10.1056/NEJMc2105869.
- [10] A. Uttarilli *et al.*, « Super-rapid race for saving lives by developing COVID-19 vaccines », *J. Integr. Bioinforma.*, vol. 18, n° 1, p. 27-43, mars 2021, doi: 10.1515/jib-2021-0002.



- [11] M. Bayat, Y. Asemani, et S. Najafi, « Essential considerations during vaccine design against COVID-19 and review of pioneering vaccine candidate platforms », *Int. Immunopharmacol.*, vol. 97, p. 107679, août 2021, doi: 10.1016/j.intimp.2021.107679.
- [12] R. D'Amelio *et al.*, « Anti-COVID-19 Vaccination in Patients with Autoimmune-Autoinflammatory Disorders and Primary/Secondary Immunodeficiencies: The Position of the Task Force on Behalf of the Italian Immunological Societies », *Biomedicines*, vol. 9, n° 9, p. 1163, sept. 2021, doi: 10.3390/biomedicines9091163.
- [13] D. C. Carneiro, J. D. Sousa, et J. P. Monteiro-Cunha, « The COVID-19 vaccine development: A pandemic paradigm », *Virus Res.*, vol. 301, p. 198454, août 2021, doi: 10.1016/j.virusres.2021.198454.
- [14] A. Pascual-Iglesias, J. Canton, A. M. Ortega-Prieto, J. M. Jimenez-Guardeño, et J. A. Regla-Nava, « An Overview of Vaccines against SARS-CoV-2 in the COVID-19 Pandemic Era », *Pathogens*, vol. 10, n° 8, p. 1030, août 2021, doi: 10.3390/pathogens10081030.
- [15] « Vaccin anti-Covid-19 : nombre de doses administrées par pays ». <https://www.atlas-mag.net/article/vaccin-contre-le-covid-19-classement-des-pays-selon-le-nombre-de-doses-administrees> (consulté le 28 décembre 2021).
- [16] A. Stefanowicz-Bielska, M. Słomion, et J. Stefanowicz, « COVID-19 Pandemic— Knowledge, Attitudes, Behaviours, and Actions among Faculty of Health Sciences Students », *Int. J. Environ. Res. Public Health*, vol. 18, n° 22, p. 12137, nov. 2021, doi: 10.3390/ijerph182212137.
- [17] P. J. Hotez *et al.*, « Global public health security and justice for vaccines and therapeutics in the COVID-19 pandemic », *EClinicalMedicine*, vol. 39, p. 101053, août 2021, doi: 10.1016/j.eclinm.2021.101053.
- [18] « Coronavirus (COVID-19) Vaccinations - Statistics and Research - Our World in Data ». [https://ourworldindata.org/covid-vaccinations?country=OWID\\_WRL](https://ourworldindata.org/covid-vaccinations?country=OWID_WRL) (consulté le 28 décembre 2021).
- [19] « Covid : L'OMS soutient les 5 pays qui n'ont pas commencé à vacciner », *LEFIGARO*, 29 juin 2021. <https://www.lefigaro.fr/flash-actu/covid-l-oms-soutient-les-5-pays-qui-n-ont-pas-commence-a-vacciner-20210629> (consulté le 28 décembre 2021).
- [20] P. S. Kulkarni *et al.*, « A phase 2/3, participant-blind, observer-blind, randomised, controlled study to assess the safety and immunogenicity of SII-ChAdOx1 nCoV-19 (COVID-19 vaccine) in adults in India », *EClinicalMedicine*, vol. 42, p. 101218, déc. 2021, doi: 10.1016/j.eclinm.2021.101218.

- [21] « Covid-19: le Maroc poursuit sa campagne de vaccination », *RFI*, 4 février 2021. <https://www.rfi.fr/fr/afrique/20210204-covid-19-le-maroc-poursuit-sa-campagne-de-vaccination> (consulté le 6 avril 2021).
- [22] A. Drissi Bourhanbour et O. Ouchetto, « Morocco achieves the highest COVID-19 vaccine rates in Africa in the first phase: what are reasons for its success? », *J. Travel Med.*, vol. 28, n° 4, p. taab040, mai 2021, doi: 10.1093/jtm/taab040.
- [23] I. R. Humphreys et S. Sebastian, « Novel viral vectors in infectious diseases », *Immunology*, vol. 153, n° 1, p. 1-9, janv. 2018, doi: 10.1111/imm.12829.
- [24] J. Machhi *et al.*, « Nanocarrier vaccines for SARS-CoV-2 », *Adv. Drug Deliv. Rev.*, vol. 171, p. 215-239, avr. 2021, doi: 10.1016/j.addr.2021.01.002.
- [25] S. P. Kaur et V. Gupta, « COVID-19 Vaccine: A comprehensive status report », *Virus Res.*, vol. 288, p. 198114, oct. 2020, doi: 10.1016/j.virusres.2020.198114.
- [26] M. Bakhiet et S. Taurin, « SARS-CoV-2: Targeted managements and vaccine development », *Cytokine Growth Factor Rev.*, vol. 58, p. 16-29, avr. 2021, doi: 10.1016/j.cytogfr.2020.11.001.
- [27] P.-W. Chen, Z.-Y. Tsai, T.-H. Chao, Y.-H. Li, C. J.-Y. Hou, et P.-Y. Liu, « Addressing Vaccine-Induced Immune Thrombotic Thrombocytopenia (VITT) Following COVID-19 Vaccination: A Mini-Review of Practical Strategies », *Acta Cardiol. Sin.*, vol. 37, n° 4, p. 355-364, juill. 2021, doi: 10.6515/ACS.202107\_37(4).20210628A.
- [28] F. Angeli, A. Spanevello, G. Reboldi, D. Visca, et P. Verdecchia, « SARS-CoV-2 vaccines: Lights and shadows », *Eur. J. Intern. Med.*, vol. 88, p. 1-8, juin 2021, doi: 10.1016/j.ejim.2021.04.019.
- [29] « VAXZEVRIA - COVID-19 Vaccine AstraZeneca », *Mon carnet de vaccination électronique, pour être mieux vacciné, sans défaut ni excès*. <http://www.mesvaccins.net/web/vaccines/650-vaxzevria-covid-19-vaccine-astrazeneca> (consulté le 28 décembre 2021).
- [30] J.-M. Manus, « Et de trois : l'UE recommande le vaccin AstraZeneca/Oxford », *Rev. Francoph. Lab.*, vol. 2021, n° 531, p. 7, avr. 2021, doi: 10.1016/S1773-035X(21)00079-4.
- [31] M. Voysey *et al.*, « Single-dose administration and the influence of the timing of the booster dose on immunogenicity and efficacy of ChAdOx1 nCoV-19 (AZD1222) vaccine: a pooled analysis of four randomised trials », *Lancet Lond. Engl.*, vol. 397, n° 10277, p. 881-891, mars 2021, doi: 10.1016/S0140-6736(21)00432-3.

- [32] L. Li, P. Guo, X. Zhang, Z. Yu, W. Zhang, et H. Sun, « SARS-CoV-2 vaccine candidates in rapid development », *Hum. Vaccines Immunother.*, vol. 17, n° 3, p. 644-653, doi: 10.1080/21645515.2020.1804777.
- [33] H. Kelly, B. Sokola, et H. Abboud, « Safety and efficacy of COVID-19 vaccines in multiple sclerosis patients », *J. Neuroimmunol.*, vol. 356, p. 577599, juill. 2021, doi: 10.1016/j.jneuroim.2021.577599.
- [34] M. Sadarangani, A. Marchant, et T. R. Kollmann, « Immunological mechanisms of vaccine-induced protection against COVID-19 in humans », *Nat. Rev. Immunol.*, p. 1-10, juill. 2021, doi: 10.1038/s41577-021-00578-z.
- [35] « WHO-2019-nCoV-vaccines-SAGE-recommendation-AZD1222-2021.1-fre.pdf ». Consulté le: 28 décembre 2021. [En ligne]. Disponible sur: <https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/340726/WHO-2019-nCoV-vaccines-SAGE-recommendation-AZD1222-2021.1-fre.pdf>
- [36] E. Mahase, « Covid-19: WHO says rollout of AstraZeneca vaccine should continue, as Europe divides over safety », *BMJ*, vol. 372, p. n728, mars 2021, doi: 10.1136/bmj.n728.
- [37] « Covid-19 : France, Allemagne... Quels sont les pays qui ont suspendu le vaccin AstraZeneca ? », *leparisien.fr*, 15 mars 2021. <https://www.leparisien.fr/societe/sante/covid-19-quels-sont-les-pays-qui-ont-suspendu-le-vaccin-astrazeneca-15-03-2021-U6QSKFA2DNELFOTZUV5VHC2PYM.php> (consulté le 29 décembre 2021).
- [38] E. Mahase, « Covid-19: AstraZeneca vaccine is not linked to increased risk of blood clots, finds European Medicine Agency », *BMJ*, vol. 372, p. n774, mars 2021, doi: 10.1136/bmj.n774.
- [39] O. Dyer, « Covid-19: EMA defends AstraZeneca vaccine as Germany and Canada halt rollouts », *BMJ*, vol. 373, p. n883, avr. 2021, doi: 10.1136/bmj.n883.
- [40] F. A. Klok, M. Pai, M. V. Huisman, et M. Makris, « Vaccine-induced immune thrombotic thrombocytopenia », *Lancet Haematol.*, vol. 9, n° 1, p. e73-e80, janv. 2022, doi: 10.1016/S2352-3026(21)00306-9.
- [41] R. Kircheis, « Coagulopathies after Vaccination against SARS-CoV-2 May Be Derived from a Combined Effect of SARS-CoV-2 Spike Protein and Adenovirus Vector-Triggered Signaling Pathways », *Int. J. Mol. Sci.*, vol. 22, n° 19, p. 10791, oct. 2021, doi: 10.3390/ijms221910791.

- [42] J. Douxfils *et al.*, « Hypotheses behind the very rare cases of thrombosis with thrombocytopenia syndrome after SARS-CoV-2 vaccination », *Thromb. Res.*, vol. 203, p. 163-171, juill. 2021, doi: 10.1016/j.thromres.2021.05.010.
- [43] M. Othman *et al.*, « To clot or not to clot? Ad is the question—Insights on mechanisms related to vaccine-induced thrombotic thrombocytopenia », *J. Thromb. Haemost.*, p. 10.1111/jth.15485, août 2021, doi: 10.1111/jth.15485.
- [44] A. Islam, M. S. Bashir, K. Joyce, H. Rashid, I. Laher, et S. Elshazly, « An Update on COVID-19 Vaccine Induced Thrombotic Thrombocytopenia Syndrome and Some Management Recommendations », *Molecules*, vol. 26, n° 16, p. 5004, août 2021, doi: 10.3390/molecules26165004.
- [45] « Vaccine-Induced Prothrombotic Immune Thrombocytopenia (VIPIT) Following AstraZeneca COVID-19 Vaccination », *Ontario COVID-19 Science Advisory Table*. <https://covid19-sciencetable.ca/sciencebrief/vaccine-induced-prothrombotic-immune-thrombocytopenia-vipit-following-astrazeneca-covid-19-vaccination/> (consulté le 15 avril 2021).
- [46] « Signal de cas de thromboses avec thrombocytopénie après l’administration du vaccin d’AstraZeneca et du Covishield », *INSPQ*. <https://www.inspq.qc.ca/publications/3124-thromboses-astrazeneca-covishield> (consulté le 15 avril 2021).
- [47] E. R. Gaunt et N. A. Mabbott, « The clinical correlates of vaccine-induced immune thrombotic thrombocytopenia after immunisation with adenovirus vector-based SARS-CoV-2 vaccines », *Immunother. Adv.*, vol. 1, n° 1, p. ltab019, août 2021, doi: 10.1093/immadv/ltab019.
- [48] T. Iba et J. H. Levy, « The roles of platelets in COVID-19-associated coagulopathy and vaccine-induced immune thrombotic thrombocytopenia », *Trends Cardiovasc. Med.*, août 2021, doi: 10.1016/j.tcm.2021.08.012.
- [49] Y. Nizamaldin, S. Abi Najm, M. El Hage, et J. Samson, « Hémostase locale en chirurgie orale. 1<sup>ère</sup> partie : physiologie de l’hémostase », *Médecine Buccale Chir. Buccale*, vol. 18, n° 2, p. 119-127, avr. 2012, doi: 10.1051/mbcb/2012005.
- [50] M. Boutgourine, « Guide d’hémostase à l’usage de l’étudiant en médecine », Thèse de Doctorat, Cadi Ayyad, Marrakech, 2019. Consulté le: 29 décembre 2021. [En ligne]. Disponible sur: <http://wd.fmpm.uca.ma/biblio/theses/annee-htm/FT/2019/these15-19.pdf>
- [51] M. Koupenova, L. Clancy, H. A. Corkrey, et J. E. Freedman, « Circulating Platelets as Mediators of Immunity, Inflammation and Thrombosis », *Circ. Res.*, vol. 122, n° 2, p. 337-351, janv. 2018, doi: 10.1161/CIRCRESAHA.117.310795.

- [52] T. K. A. Nguyen, « Rôle inflammatoire des plaquettes sanguines : application en transfusion », Thèse de Doctorat, Université Jean Monnet de Saint-Étienne, France, 2013. Consulté le: 29 décembre 2021. [En ligne]. Disponible sur: <https://tel.archives-ouvertes.fr/tel-01058759/document>
- [53] S. W. Kerrigan et N. Moran, *The Non-Thrombotic Role of Platelets in Health and Disease*. BoD – Books on Demand, 2015.
- [54] J. Vazart, « Thrombopathies iatrogènes », Thèse de Doctorat, Université de Lorraine, France, 2013. Consulté le: 11 mai 2021. [En ligne]. Disponible sur: <https://hal.univ-lorraine.fr/hal-01733814/document>
- [55] C. Gachet, « Les mécanismes moléculaires de l'activation plaquettaire », *Natle Méd*, vol. 197, n° 2, p. 361-373, févr. 2013.
- [56] H. Cai, « Diagnostic des pathologies plaquettaires : optimisation de l'exploration des granules denses plaquettaires », Thèse de Doctorat, Université de Lorraine, France, 2016. Consulté le: 30 décembre 2021. [En ligne]. Disponible sur: <https://hal.univ-lorraine.fr/tel-01751698/document>
- [57] C. N. Morrell, A. A. Aggrey, L. M. Chapman, et K. L. Modjeski, « Emerging roles for platelets as immune and inflammatory cells », *Blood*, vol. 123, n° 18, p. 2759-2767, mai 2014, doi: 10.1182/blood-2013-11-462432.
- [58] M. Koupenova, L. Clancy, H. A. Corkrey, et J. E. Freedman, « Circulating Platelets as Mediators of Immunity, Inflammation and Thrombosis », *Circ. Res.*, vol. 122, n° 2, p. 337-351, janv. 2018, doi: 10.1161/CIRCRESAHA.117.310795.
- [59] R. Najimi, « Thrombopathies constitutionnelles : place du test d'agrégation plaquettaire », Thèse de Doctorat, Université Mohammed V, Rabat, 2019. Consulté le: 15 mai 2021. [En ligne]. Disponible sur: <http://ao.um5.ac.ma/xmlui/bitstream/handle/123456789/17826/M2322019.pdf?sequence=1&isAllowed=y>
- [60] M. M. Prechel et J. M. Walenga, « Emphasis on the Role of PF4 in the Incidence, Pathophysiology and Treatment of Heparin Induced Thrombocytopenia », *Thromb. J.*, vol. 11, n° 1, p. 7, avr. 2013, doi: 10.1186/1477-9560-11-7.
- [61] A. Dubrac, « Analyse fonctionnelle et structurale du facteur antiangiogénique PF4v », Thèse de Doctorat, Université de Bordeaux I, France, 2008. Consulté le: 30 décembre 2021. [En ligne]. Disponible sur: <https://www.theses.fr/2008BOR13751.pdf>

- [62] B. S. Sachais *et al.*, « Rational design and characterization of platelet factor 4 antagonists for the study of heparin-induced thrombocytopenia », *Blood*, vol. 119, n° 25, p. 5955-5962, juin 2012, doi: 10.1182/blood-2012-01-406801.
- [63] A. Szóstek-Mioduchowska et P. Kordowitzki, « Shedding Light on the Possible Link between ADAMTS13 and Vaccine—Induced Thrombotic Thrombocytopenia », *Cells*, vol. 10, n° 10, p. 2785, oct. 2021, doi: 10.3390/cells10102785.
- [64] C. Hermans et M. Goldman, « Thromboses et vaccins : un nouveau défi de la pandémie COVID-19 », *Louvain Med*, p. 207-215, avr. 2021.
- [65] D. Yacoub, « Implication des protéines kinases C dans l'activation et la fonction plaquettaire », Mémoire de Maître en Sciences biomédicales, Université de Montréal, Montréal, 2005. Consulté le: 11 août 2021. [En ligne]. Disponible sur: [https://papyrus.bib.umontreal.ca/xmlui/bitstream/handle/1866/15305/Yacoub\\_Daniel\\_2005\\_memoire.pdf?sequence=1&isAllowed=y](https://papyrus.bib.umontreal.ca/xmlui/bitstream/handle/1866/15305/Yacoub_Daniel_2005_memoire.pdf?sequence=1&isAllowed=y)
- [66] M. T. Harper et A. W. Poole, « Diverse functions of protein kinase C isoforms in platelet activation and thrombus formation », *J. Thromb. Haemost.*, vol. 8, n° 3, p. 454-462, 2010, doi: 10.1111/j.1538-7836.2009.03722.x.
- [67] 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, Art. n° 6, janv. 2019, doi: 10.3390/ijms20061498.
- [68] J. W. M. Heemskerk, M. T. Harper, J. M. E. M. Cosemans, et A. W. Poole, « Unravelling the different functions of protein kinase C isoforms in platelets », *FEBS Lett.*, vol. 585, n° 12, p. 1711-1716, juin 2011, doi: 10.1016/j.febslet.2011.05.017.
- [69] 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, Montréal, 2015. Consulté le: 11 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)
- [70] R. Chari *et al.*, « Protein Kinase C $\delta$  differentially regulates platelet functional responses », *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, vol. 29, n° 5, p. 699-705, mai 2009, doi: 10.1161/ATVBAHA.109.184010.
- [71] M. T. Harper et A. W. Poole, « Diverse functions of protein kinase C isoforms in platelet activation and thrombus formation », *J. Thromb. Haemost.*, vol. 8, n° 3, p. 454-462, 2010, doi: 10.1111/j.1538-7836.2009.03722.x.

- [72] 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.
- [73] 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, avr. 2018, doi: 10.1371/journal.pone.0195379.
- [74] S. Murugappan, F. Tuluc, R. T. Dorsam, H. Shankar, et S. P. Kunapuli, « Differential Role of Protein Kinase C $\delta$  Isoform in Agonist-induced Dense Granule Secretion in Human Platelets \* », *J. Biol. Chem.*, vol. 279, n° 4, p. 2360-2367, janv. 2004, doi: 10.1074/jbc.M306960200.
- [75] M. Passariello, C. Vetrei, F. Amato, et C. De Lorenzo, « Interactions of Spike-RBD of SARS-CoV-2 and Platelet Factor 4: New Insights in the Etiopathogenesis of Thrombosis », *Int. J. Mol. Sci.*, vol. 22, n° 16, p. 8562, août 2021, doi: 10.3390/ijms22168562.
- [76] S. R. Ostrowski *et al.*, « Inflammation and Platelet Activation After COVID-19 Vaccines - Possible Mechanisms Behind Vaccine-Induced Immune Thrombocytopenia and Thrombosis », *Front. Immunol.*, vol. 12, p. 779453, nov. 2021, doi: 10.3389/fimmu.2021.779453.
- [77] A. Pottegård *et al.*, « Arterial events, venous thromboembolism, thrombocytopenia, and bleeding after vaccination with Oxford-AstraZeneca ChAdOx1-S in Denmark and Norway: population based cohort study », *The BMJ*, vol. 373, p. n1114, mai 2021, doi: 10.1136/bmj.n1114.
- [78] I. H. Sørvoll *et al.*, « An observational study to identify the prevalence of thrombocytopenia and anti-PF4/polyanion antibodies in Norwegian health care workers after COVID-19 vaccination », *J. Thromb. Haemost.*, vol. 19, n° 7, p. 1813-1818, juill. 2021, doi: 10.1111/jth.15352.
- [79] N. Uaprasert *et al.*, « Prevalence of thrombocytopenia, anti-platelet factor 4 antibodies and D-dimer elevation in Thai people After ChAdOx1 nCoV-19 vaccination », *Res. Pract. Thromb. Haemost.*, vol. 5, n° 6, p. e12580, sept. 2021, doi: 10.1002/rth2.12580.
- [80] P. Noikongdee *et al.*, « Prevalence of anti-platelet factor 4/polyanionic antibodies after COVID-19 vaccination with ChAdOx1 nCoV-19 and CoronaVac in Thais », *Res. Pract. Thromb. Haemost.*, vol. 5, n° 7, p. e12600, oct. 2021, doi: 10.1002/rth2.12600.

- [81] A. Greinacher, T. Thiele, T. E. Warkentin, K. Weisser, P. A. Kyrle, et S. Eichinger, « Thrombotic Thrombocytopenia after ChAdOx1 nCov-19 Vaccination », *N. Engl. J. Med.*, vol. 0, n° 0, p. null, avr. 2021, doi: 10.1056/NEJMoa2104840.
- [82] N. H. Schultz *et al.*, « Thrombosis and Thrombocytopenia after ChAdOx1 nCoV-19 Vaccination », *N. Engl. J. Med.*, avr. 2021, doi: 10.1056/NEJMoa2104882.
- [83] E. Campello *et al.*, « Absence of hypercoagulability after nCoV-19 vaccination: An observational pilot study », *Thromb. Res.*, vol. 205, p. 24-28, sept. 2021, doi: 10.1016/j.thromres.2021.06.016.