

SESSION 2022

**AGRÉGATION
CONCOURS INTERNE
ET CAER**

Section : BIOCHIMIE - GÉNIE BIOLOGIQUE

PREMIÈRE ÉPREUVE

Durée : 6 heures

*Le dictionnaire bilingue anglais-français est autorisé.
L'usage de la calculatrice est autorisé.*

Si vous repérez ce qui vous semble être une erreur d'énoncé, vous devez le signaler très lisiblement sur votre copie, en proposer la correction et poursuivre l'épreuve en conséquence. De même, si cela vous conduit à formuler une ou plusieurs hypothèses, vous devez la (ou les) mentionner explicitement.

NB : Conformément au principe d'anonymat, votre copie ne doit comporter aucun signe distinctif, tel que nom, signature, origine, etc. Si le travail qui vous est demandé consiste notamment en la rédaction d'un projet ou d'une note, vous devrez impérativement vous abstenir de la signer ou de l'identifier.

Tournez la page S.V.P.

INFORMATION AUX CANDIDATS

Vous trouverez ci-après les codes nécessaires vous permettant de compléter les rubriques figurant en en-tête de votre copie.

Ces codes doivent être reportés sur chacune des copies que vous remettrez.

► **Concours interne de l'Agrégation de l'enseignement public :**

Concours	Section/option	Epreuve	Matière
EAI	7100A	101	0809

► **Concours interne du CAER / Agrégation de l'enseignement privé :**

EAH	7100A	101	0809
-----	-------	-----	------

Cette épreuve prend appui sur un dossier technique relatif à un problème biotechnologique. Elle permet d'évaluer les capacités du candidat à :

- mobiliser ses connaissances scientifiques et technologiques pour expliciter ou valider les solutions retenues ;
- utiliser une ressource proposée pour élaborer un support pédagogique permettant la transmission ou l'évaluation de connaissances et méthodes par les élèves à un niveau de formation déterminé.

Le candidat doit situer l'exercice dans un processus d'apprentissage et par rapport aux autres enseignements scientifiques ou technologiques qui lui sont associés.

Dans le sujet, les lettres **ST** identifient les questions mobilisant les compétences et connaissances scientifiques et technologiques, la lettre **P** identifie les questions d'ordre pédagogique.

Les biotechnologies au service du diagnostic et de la prise en charge des maladies cardiovasculaires (MCV)

Selon le Haut Conseil des Biotechnologies, les biotechnologies rouges concernent les domaines de la santé humaine et animale. Leur essor a révolutionné le secteur de la santé que ce soit en termes de connaissances, de produits ou de services. Elles contribuent ainsi à une meilleure prise en charge des patients depuis le diagnostic jusqu'à des propositions de traitements.

Partie 1 : Evolution des tests diagnostiques des maladies cardiovasculaires

Le diagnostic des MCV est basé sur des critères définis par l'OMS : douleur à la poitrine, anomalie des électrocardiogrammes et augmentation de marqueurs biochimiques cardiaques dans le sang. Un patient est considéré comme malade s'il répond à au moins deux de ces trois critères. Cependant, les symptômes des maladies cardiovasculaires apparaissent une fois que cette dernière est installée et les électrocardiogrammes peuvent sembler normaux à cause de symptômes transitoires. La mesure des biomarqueurs cardiaques est donc l'élément critique pour le diagnostic. Suite à un infarctus aigu du myocarde, la libération de marqueurs protéiques dans le sang résulte d'une nécrose cellulaire initiée par un événement ischémique. Les protéines présentes aux concentrations les plus élevées, ainsi que les plus solubles, comme la myoglobine, apparaissent d'abord dans le sang. Les protéines structurales et mitochondriales des myocytes, comme l'isoforme MB de la créatine kinase (CKMB) et les protéines du complexe troponine, dont la troponine I, apparaissent un peu plus tard.

1.1 Détection de la CKMB plasmatique

La créatine kinase (CK) est une enzyme présente principalement dans le cytosol des muscles squelettiques et du muscle cardiaque. On la retrouve également en moindre quantité dans d'autres organes et dans les mitochondries. Plusieurs isoformes de cette enzyme existent (**document 1**).

ST1. Présenter le principe de l'électrophorèse sérique de détection des isoformes de la créatine kinase et expliciter la position relative des 3 isoformes cytosoliques observée sur le profil électrophorétique.

En cas d'infarctus du myocarde, on constate une augmentation de la concentration plasmatique de l'isoforme CKMB.

Les premières techniques de dosage de la CKMB étaient basées sur la mesure spécifique de son activité enzymatique dans le sérum ou le plasma des patients. Une des techniques consistait à séparer les isoformes par électrophorèse afin de déterminer la proportion des différentes isoenzymes. L'activité CKMB était ensuite déterminée à partir de l'activité CK totale. Une des techniques plus récemment utilisée était la technique d'immuno-inhibition (**document 2**).

ST2. Etablir l'équation aux grandeurs, l'équation aux unités et l'équation aux valeurs numériques permettant le calcul du facteur 6667 indiqué dans le **document 2**.
Donnée : le coefficient d'extinction molaire du NADH à 340 nm dans les conditions opératoires est de $6300 \text{ L}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$ (ou $630 \text{ m}^2\cdot\text{mol}^{-1}$)

ST3. Argumenter l'affirmation suivante : "la technique d'immuno-inhibition conduit à une surestimation du taux de CKMB en cas de présence de macroCK".

P1. Proposer une approche imagée permettant aux élèves de terminale STL biotechnologies d'acquérir les différentes grandeurs du concept d'activité enzymatique z.

La technique d'immuno-inhibition a été remplacée par la technique de dosage "massique" de la CKMB (**document 3**).

- ST4.** Réaliser le schéma d'un édifice moléculaire obtenu à l'issue de la mise en œuvre de cette procédure opératoire en cas de présence de CKMB.
- ST5.** Proposer des hypothèses afin d'expliquer pourquoi, parmi les trois techniques présentées dans la partie 1.1, la technique de dosage massique est devenue la technique de référence de dosage de la CKMB.

1.2 Les tests "point of care" (POCT) ou examens de biologie médicale délocalisée (EBMD)

Les examens de biologie médicale délocalisée sont des examens de biologie médicale dont la phase analytique est réalisée à proximité du patient, en dehors des locaux du laboratoire de biologie médicale et par du personnel extérieur à celui-ci. Le développement des EBMD permet d'établir des tests diagnostiques plus précoces et d'accélérer la prise en charge du patient. De nombreux dispositifs EBMD, comme le Quidel Triage Cardiac® (**document 4**), ont été développés pour l'analyse des marqueurs cardiaques.

- ST6.** Rappeler les contraintes techniques des examens de biologie médicale délocalisée et montrer en quoi le test Quidel Triage Cardiac® apporte des solutions.
- ST7.** Proposer, en l'argumentant, une correction des confusions d'utilisation du vocabulaire de métrologie employé dans le **document 4**. Discuter de l'intérêt de l'utilisation d'un vocabulaire international normalisé (**document 5**).

La sensibilité et la spécificité clinique du test Quidel Triage Cardiac® ont été déterminées (**document 6**).

- ST8.** Expliquer les différences d'approche pour évaluer les sensibilités et spécificités analytiques et cliniques d'une méthode.
- ST9.** Analyser les résultats de spécificité et sensibilité clinique de la méthode de détection des différents marqueurs présentée dans le **document 6**. Expliquer l'intérêt de détecter ces trois marqueurs dans le cadre d'un diagnostic précoce réalisé au lit du patient.

Partie 2 : Biothérapies et maladies cardiovasculaires

La thérapie cellulaire consiste à greffer des cellules afin de restaurer la fonction d'un tissu ou d'un organe défaillant. L'objectif est de soigner durablement le patient grâce à une injection unique de « cellules thérapeutiques ». Ces cellules sont obtenues à partir de cellules souches provenant du patient lui-même ou d'un donneur.

Afin de traiter une patiente atteinte d'insuffisance cardiaque sévère, les équipes des professeurs Menasché (hôpital Georges-Pompidou, Paris) et Larghero (hôpital Saint-Louis, Paris) ont réalisé en 2014 la première implantation mondiale de cellules cardiaques dérivées de cellules souches embryonnaires humaines pluripotentes. Les cellules ont été implantées sous forme de patch, incluses au sein d'un gel de fibrine.

2.1 Utilisation des cellules souches pluripotentes induites

Les cellules souches utilisées pour réparer les tissus cardiaques lésés à la suite d'un infarctus peuvent avoir plusieurs origines possibles. Le **document 7** précise différents niveaux de différenciation de cellules souches utilisables pour réaliser cette réparation.

ST10. Après avoir défini et caractérisé une cellule souche, préciser la signification des mots : pluripotente, multipotente et unipotente.

Une des stratégies d'obtention de cellules souches est de dédifférencier des cellules spécialisées pour former des cellules iPSC (« induced pluripotent stem cell »), puis de les redifférencier en cellules plus spécialisées. Des cardiomyocytes (fibroblastes cardiaques) humains ont été reprogrammés en cellules souches hiPSCs (« human induced pluripotent stem cells »). La culture de ces cellules dans différents milieux de culture inducteurs de différenciation a permis l'obtention de trois lignées cellulaires : hiPSC-CMs (cardiomyocytes), hiPSC-ECs (cellules endothéliales) et hiPSC-SMCs (cellules musculaires lisses).

ST11. Présenter les mécanismes moléculaires et cellulaires généraux impliqués dans le processus de différenciation permettant l'obtention de lignées cellulaires différents.

Le **document 8** présente les résultats de différents marquages de chacune des trois lignées cellulaires ainsi que des informations sur les marqueurs cellulaires recherchés pour les caractériser.

ST12. Associer les trois lignées cellulaires hiPSC-CMs, hiPSC-ECs et hiPSC-SMCs aux clichés A à I (**document 8.2**). Argumenter la réponse.

ST13. Après avoir rappelé le principe général de fonctionnement d'un microscope à fluorescence et à partir des données spectrales des fluorochromes fournies dans le **document 8**, expliquer comment a été obtenue l'image B à partir de la lame marquée.

Actuellement, les chercheurs souhaitent créer des banques de cellules hiPSC caractérisées pour leur profil immun du CMH (complexe majeur d'histocompatibilité) en vue d'une implantation chez les patients.

ST14. Rappeler, en explicitant les mécanismes, les conséquences d'une implantation de cellules allogènes dans un organisme et expliquer l'intérêt de la création de telles banques.

Des études récentes visent à étudier les substances sécrétées par les cellules souches au sein de vésicules extracellulaires nommées exosomes. Ces substances sécrétées seraient capables d'activer *in vivo* des voies de réparation du muscle cardiaque de patients. Le **document 9** compare les résultats obtenus après l'implantation *in vivo* de cellules reprogrammées hiPSC (Cell) ou d'exosomes (Exo) dans un muscle cardiaque ayant subi un infarctus du myocarde (MI).

ST15. Analyser les résultats des expériences présentés dans les **documents 9A** et **9B** puis ceux des **documents 9C**, **9D** et **9E** afin de déterminer les rôles des exosomes dans la réparation cardiaque. Proposer une conclusion qui pourrait servir de titre à ce document.

En France, depuis la loi de bioéthique de 2013, la recherche sur les cellules souches embryonnaires est autorisée et encadrée par l'agence de la biomédecine. La quatrième version de cette loi, qui encadre davantage l'utilisation des embryons, a été promulguée le 2 août 2021 (**document 10**).

P2. Présenter la démarche pour construire, à partir du texte réglementaire proposé, une activité pédagogique qui permette de développer une réflexion éthique chez les élèves. Cette réflexion portera en particulier sur l'apport des cellules hiPSC ou des exosomes pour s'affranchir de certains problèmes éthiques.

2.2 La production d'exosomes à des fins thérapeutiques

Afin d'utiliser les exosomes à des fins thérapeutiques, ils doivent être extraits et purifiés de surnageants de cultures cellulaires ou de prélèvements sanguins. Il existe différentes techniques de purification des exosomes. Ces dernières sont présentées de manière synthétique dans le **document 11**.

ST16. Classer les différentes méthodes de purification du **document 11** selon les critères de séparation utilisés.

L'utilisation des exosomes comme médicaments implique l'obtention en grande quantité de fractions homogènes et les plus pures possibles. On se propose donc de comparer les populations exosomales obtenues à l'issue de la mise en œuvre de quatre méthodes (**document 12.1**).

- ST17.** Analyser les résultats présentés dans le **document 12.2** afin d'estimer le rendement de purification relatif des quatre méthodes utilisées.
- ST18.** Analyser les résultats présentés dans le **document 12.3** afin d'estimer l'enrichissement en exosomes CD63+ dans les fractions obtenues à l'issue des quatre méthodes de purification.
- ST19.** Discuter les avantages et les inconvénients de chacune des quatre méthodes de purification utilisées dans le contexte d'une production d'exosomes à des fins thérapeutiques.

Dans le domaine pharmaceutique, les exosomes sont également étudiés comme système de transport et de transfert de molécules thérapeutiques d'intérêt vers une cible cellulaire. La composition lipidique de leur membrane est étudiée afin d'optimiser les processus de chargement des exosomes et de transfert entre l'exosome et la cellule cible (**document 13**).

- ST20.** Analyser les compositions lipidiques des membranes afin de montrer que les exosomes sont des particules vectrices de médicaments chimiquement intéressantes et qu'une production industrielle est concevable.

La production d'exosomes thérapeutiques repose sur l'efficacité du chargement de ces derniers avec des molécules d'intérêt. Leur chargement peut être réalisé après leur purification à l'aide de diverses techniques passives ou actives. Ces différentes techniques de chargement ont été comparées à l'aide de modèles de molécules thérapeutiques, les porphyrines, dont les structures sont présentées dans le **document 14.1**.

- ST21.** Proposer des hypothèses permettant d'expliquer les différences de chargement observées des porphyrines por et porBA à l'intérieur des exosomes (**document 14.2**).
- ST22.** Proposer, éventuellement sous forme d'un schéma, un mécanisme expliquant comment la saponine permet d'augmenter l'efficacité de chargement de la porphyrine porBA dans les exosomes (**document 14.3**).
- P3.** Etablir une procédure méthodologique qui permette à un élève d'identifier, au sein de supports, les points clefs permettant de répondre à une question de synthèse qu'il présentera à l'oral. Valider la procédure en la mettant en œuvre sur l'ensemble des documents d'une des parties du sujet.

Document 1 : les isoformes de la créatine kinase

Source : <https://lesbiologistesmedicaux.fr/images/cahiers/2002-Bioforma-27-Les%20marqueurs%20cardiaques.pdf>

La créatine kinase est une enzyme importante du métabolisme énergétique. Elle présente des isoformes cytosoliques de masses moléculaires semblables et des isoformes mitochondriales. Les formes cytosoliques sont formées de l'association de deux sous-unités M (muscle) et B (brain) qui conduisent à trois isoenzymes différentes : la CKMM, la CKMB et la CKBB. Le muscle squelettique contient 99 % de CKMM et environ 1 % de CKMB. Celui d'un marathonien peut contenir jusqu'à 8 % de CKMB. Le myocarde contient 5 à 40 % de CKMB, le reste étant de la CKMM. La CKBB est exprimée essentiellement dans le cerveau, le colon, l'iléon, l'estomac et la vessie.

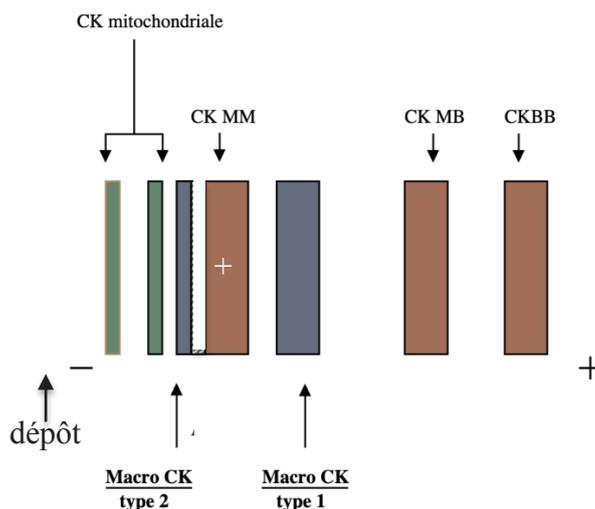


Figure 1 : profil électrophorétique obtenu en fin de migration des isoenzymes de la créatine kinase. Les isoenzymes sériques ont été séparées sur gel d'agarose ou acétate de cellulose en milieu alcalin (pH 8,4). Le dépôt a été fait à la cathode. La révélation a été faite par ajout d'un substrat chromogène spécifique de la créatine kinase.

Dans le sérum d'un sujet normal, la CKMM représente plus de 95 % de la CK-totale, la CKMB est inférieure à 5 % et la CKBB est indétectable. D'autres formes ont été trouvées, il s'agit de macroCK dont la masse moléculaire est supérieure à 200 kDa. On distingue des macroCK de type 1, résultant de la formation de complexes isoenzyme – immunoglobuline, et des macroCK de type 2 qui sont des polymères de CK mitochondriales.

Les caractéristiques de ces macroCK sont résumées dans le tableau ci-dessous.

	Macro CK Type 1	Macro CK Type 2
Forme de CK	CKBB ou CKMM	CK mitochondriale
Immunoglobuline liée	IgG (parfois IgA)	Aucune
Masse moléculaire	340 kDa	250 à 750 kDa
Présence dans le sérum	Persistante	Transitoire
Circonstances pathologiques	Aucune	Cirrhose du foie, métastases

Tableau 1 : caractéristiques des macroCK de types 1 et 2

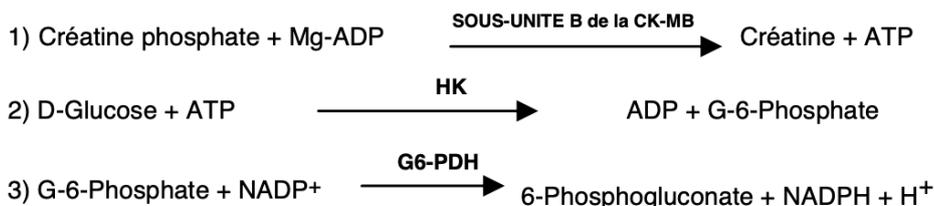
Document 2 : dosage de l'activité CKMB par la technique d'immuno-inhibition

Source : www.biolabo.fr/biolabo/pdfs/noticesFR/biochimieFR/FT-97317.pdf

PRINCIPE

Le dosage de l'activité CKMB par la technique d'immuno-inhibition repose sur le principe d'un dosage d'activité enzymatique en présence d'un inhibiteur de l'activité du monomère CKM. En effet, le réactif CK-NAC contient un anticorps polyclonal spécifique du monomère CKM. Cet anticorps inhibe donc la totalité de l'activité CKMM et la moitié de l'activité CKMB. Cette méthode estime que la proportion de CKBB dans l'échantillon analysé est tellement faible que son activité est négligeable.

Les équations du dosage sont les suivantes :



L'augmentation de l'absorbance due à la synthèse de NADPH mesurée à 340 nm est proportionnelle à l'activité CKMB dans l'échantillon.

MODE OPERATOIRE

- Introduire dans une cuve de lecture de 1 cm de trajet optique :
 - 1 mL de réactif de travail
- Laisser la température s'équilibrer à 37 °C
- Puis, introduire :
 - 50 µL de l'échantillon à doser
- Mélanger et attendre 5 minutes que la température s'équilibre à 37 °C
- Après 5 minutes, lire l'absorbance à 340 nm toutes les minutes pendant 5 minutes
- Calculer la moyenne des variations d'absorbance par minute ($\Delta A \cdot \text{min}^{-1}$)
- Calculer la concentration d'activité CKMB en utilisant la formule suivante :

$$b_{(U \cdot L^{-1})} = \Delta A \cdot \text{min}^{-1} \times 6667$$

Document 3 : dosage de l'activité CKMB par technique immunométrique (COBAS)

Test principle

Sandwich principle. Total duration of assay: 9 minutes.

- 1st incubation: the sample reacts with a biotinylated monoclonal anti-CKMB antibody and a monoclonal CKMB specific antibody labeled with ruthenium complex^{a)} to form a sandwich complex.
- 2nd incubation: after addition of streptavidin-coated microparticles, the complex becomes bound to the solid phase via interaction of biotin and streptavidin.
- The reaction mixture is aspirated into the measuring cell where the microparticles are magnetically capture onto the surface of the electrode. Unbound substances are then removed.
- Application of a voltage to the electrode induces chemiluminescent emission which is measured by a photomultiplier.
- Results are determined via a calibration curve which is instrument-specifically generated by 2-point calibration and a master curve provided via the reagent barcode.

a) Tris(2,2'-bipyridyl)ruthenium(II)-complex ($\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$)

Document 4 : extrait de la fiche technique Quidel Triage Cardiac®

Principes de la procédure

Le panel Quidel Triage Cardiac est une méthode de dosage par immunofluorescence à usage unique conçue pour déterminer la concentration de CK-MB, de myoglobine et de troponine I dans des échantillons de sang total ou de plasma anticoagulés recueillis sur EDTA.

La technique de dosage implique l'ajout de plusieurs gouttes d'échantillon de sang total ou de plasma recueillis sur anticoagulant (EDTA) à l'emplacement échantillon de la cassette-test. Une fois l'échantillon déposé, les cellules de sang total sont séparées du plasma à l'aide d'un filtre contenu dans la cassette-test. L'échantillon réagit avec des conjugués anticorps fluorescents et circule à travers la cassette-test par capillarité. Les complexes de chaque conjugué anticorps fluorescent sont capturés sur des zones distinctes, spécifiques de chaque substance à analyser.

La cassette-test est introduite dans l'Quidel Triage Meter (appelé ci-après le Meter). Le Meter est programmé pour effectuer automatiquement l'analyse après la réaction de l'échantillon avec les réactifs de la cassette-test. L'analyse repose sur la quantité de fluorescence détectée par le Meter dans une zone de mesure de la cassette-test. La concentration d'analyte(s) dans l'échantillon est directement proportionnelle à la fluorescence détectée. Les résultats s'affichent sur l'écran du Meter environ 20 minutes après l'ajout de l'échantillon. Tous les résultats sont conservés dans la mémoire du Meter et peuvent être affichés ou imprimés au besoin. S'il est connecté, le Meter peut transmettre les résultats au laboratoire ou au système d'information hospitalier.

Réactifs et matériels fournis

La cassette-test contient tous les réactifs nécessaires à la quantification simultanée de la CK-MB, de la myoglobine et de la troponine I dans des échantillons de plasma ou de sang total anticoagulés recueillis sur EDTA.

Contenu de la trousse:

Composant	Quantité	Description
TEST DEVICE	25	Cassettes-tests
	25	Pipettes de transfert
	1	Module CODE CHIP™ du réactif
	1	Rouleau de papier pour imprimante



Caractéristiques de performance

Sensibilité analytique

La sensibilité analytique, définie comme étant la plus faible concentration détectable différente de zéro pour les 3 analytes, a été déterminée en testant 20 fois un étalon zéro et en utilisant à chaque fois 3 lots de réactifs et 5 Meters sur une période de 3 jours. La sensibilité analytique de chaque dosage du panel Quidel Triage Cardiac est la suivante :

CK-MB :	1,0 ng/ml
Myoglobine :	5 ng/ml
Troponine I :	0,05 ng/ml

Imprécision

L'imprécision sur une journée et totale a été déterminée au moyen du modèle ANOVA, par analyse des contrôles et des pools de plasma humain auxquels ont été ajoutés les analytes à des concentrations proches des seuils décisionnels du dosage et réparties sur toute la gamme de courbe standard. L'étude s'est déroulée sur 10 jours, chaque contrôle étant testé 10 fois par jour.

CK-MB		
Précision moyenne sur une journée		
Moyenne (ng/ml)	Écart-type (ng/ml)	CV
4,8	0,5	11,4 %
15,8	2,1	13,4 %
38,4	5,5	14,3 %
Précision moyenne totale		
Moyenne	Écart-type	CV
4,8	0,6	11,6 %
15,8	2,2	14,2 %
38,4	5,4	14,1 %

Les données proviennent de 10 mesures par jour pendant 10 jours, chaque cassette-test étant lue sur un seul Meter

Document 5 : vocabulaire de métrologie relatif aux performances d'une méthode

Source : Le guide de métrologie pour les laboratoires (Christiane Joffin, Françoise Lafont, Elisabeth Mathieu) d'après le VIM (vocabulaire international de métrologie)

Justesse : étroitesse de l'accord entre la moyenne d'un nombre infini de valeurs mesurées répétées et une valeur de référence.

La fidélité d'un appareil ou d'une méthode est son aptitude à fournir une mesure qui doit être toujours la même lorsque l'on répète le même mesurage sur un même matériau ou objet un très grand nombre de fois dans des conditions spécifiées (répétabilité, répétabilité intermédiaire, reproductibilité).

La limite de détection est la plus petite valeur du mesurande au-delà de laquelle il est permis de conclure, avec un certain niveau de confiance, qu'un échantillon est différent d'un blanc et donc que l'analyte est présent dans l'échantillon avec ce niveau de confiance.

Pour déterminer cette valeur, on procède au mesurage d'au moins 10 blancs (préparés indépendamment), on calcule la moyenne et l'écart-type des valeurs mesurées : \bar{y}_{blanc} et $s(\bar{y}_{blanc})$
La limite de détection $L_D = \bar{y}_{blanc} + 3 s(\bar{y}_{blanc})$

La sensibilité est la capacité d'une méthode à donner deux signaux de valeur différente pour deux échantillons de concentration différente. On la calcule par le quotient de la variation d'une indication de mesure par la variation correspondante de la valeur de la grandeur mesurée.

La sélectivité d'une méthode est la capacité d'un système de mesure à déterminer exclusivement la valeur de un (ou plusieurs) mesurande(s) correspondant à des constituants donnés dans un mélange, ces valeurs étant indépendantes les unes des autres. Autrement dit, il y a sélectivité s'il y a absence d'interférence de constituants autres que le (ou les) analyte(s).

Il est d'usage courant d'employer le terme **spécificité** lorsque la procédure de mesure permet de déterminer exclusivement la valeur d'un seul mesurande, avec la garantie que l'indication obtenue provient uniquement de l'analyte considéré.

La **spécificité** est donc un cas particulier de la sélectivité.

Document 6 : sensibilité et spécificité clinique du test Quidel Triage Cardiac®

Document 6.1 : étude de la sensibilité et de la spécificité clinique du test pour les trois marqueurs par intervalle de temps

Sensibilité clinique			Spécificité clinique		
Temps Nb d'échantillons	0 à 6 h 40	12 à 24 h 43	Temps Nb d'échantillons	0 à 6 h 89	12 à 24 h 90
Sensibilité de la CK-MB	77,5 %	79,1 %	Spécificité de la CK-MB	91,0 %	82,2 %
Intervalle de confiance 95 %	64,6 % à 90,4 %	66,9 % à 91,2 %	Intervalle de confiance 95 %	85,1 % à 97,0 %	74,3 % à 90,1 %
Sensibilité de la myoglobine	75,0 %	72,1 %	Spécificité de la myoglobine	74,2 %	67,8 %
Intervalle de confiance 95 %	61,6 % à 88,4 %	58,7 % à 85,5 %	Intervalle de confiance 95 %	65,1 % à 83,3 %	58,1 % à 77,4 %
Sensibilité de la troponine I cardiaque	65,0 %	93,0 %	Spécificité de la troponine I cardiaque	100,0 %	94,4 %
Intervalle de confiance 95 %	50,2 % à 79,8 %	85,4 % à 100 %	Intervalle de confiance 95 %	100 % à 100 %	89,7 % à 99,2 %

Document 6.2 : définition de la sensibilité et de la spécificité clinique

Source : SFMU 2015

Dans la démarche diagnostique, utiliser de nouveaux outils nécessite de mesurer leur performance. Les performances d'un test se mesurent par rapport à une référence « gold standard » qui peut être un examen de référence ou une expertise permettant de catégoriser les patients en « malade » ou « non malade ».

Les résultats des tests en fonction de la classification des patients en malades ou non malades peuvent être résumés dans un tableau de contingence.

Tableau de contingence

	Patients malades	Patients non malades
Test positif	Vrai positif (VP)	Faux positif (FP)
Test négatif	Faux négatif (FN)	Vrai négatif (VN)

Sensibilité et spécificité expriment la capacité informative du test, c'est-à-dire la capacité du test à catégoriser les patients. Elles s'expriment en termes de probabilité et par un pourcentage sur un échantillon. De ce fait, elles doivent s'accompagner d'un intervalle de confiance classiquement à 95 %.

La sensibilité (Se) est déterminée sur une population de patients dont le statut « malade » est connu grâce au test de référence. C'est la probabilité (p) du résultat positif du test (T+) chez les sujets porteurs de la maladie (M+) telle qu'elle est définie par le « gold standard » appelée également taux de vrais positifs.

$$Se = p(T+/M+) = \frac{VP}{VP+FN}$$

La spécificité (Spé) est déterminée sur une population de patients dont le statut non malade est connu. C'est la probabilité du résultat négatif de test (T-) chez les patients définis comme non malades (M-) appelée également taux de vrais négatifs.

$$Spé = p(T-/M-) = \frac{VN}{VN+FP}$$

Document 7 : différents types de cellules souches

Cellules souches	Caractéristiques
iPSC, ESC	pluripotente
MSC, CSC	multipotente
EPC	unipotente

CSC, cardiac stem cell; EPC, endothelial progenitor cell; ESC, embryonic stem cell; iPSC, induced pluripotent stem cell; MSC, mesenchymal stem cell.

Document 8 : recherche de marqueurs spécifiques des lignées hiPSC-CMs, hiPSC-SMCs et hiPSC-ECs

Document 8.1 : quelques caractéristiques des cellules étudiées et des marqueurs recherchés

Caractéristiques des cellules musculaires cardiaques (CMs) : les myofilaments sont composés de deux protéines contractiles, l' α -actine sarcomérique et la myosine, et sont organisés en sarcomère. L'isoforme de la chaîne légère de myosine spécifique des cellules du ventricule est la chaîne légère de myosine 2v. Les protéines associées à ces filaments sont les troponines T, I, C et la tropomyosine. La connexine 43 est régulièrement retrouvée entre les cellules adjacentes et est considérée comme un marqueur des cellules cardiaques.

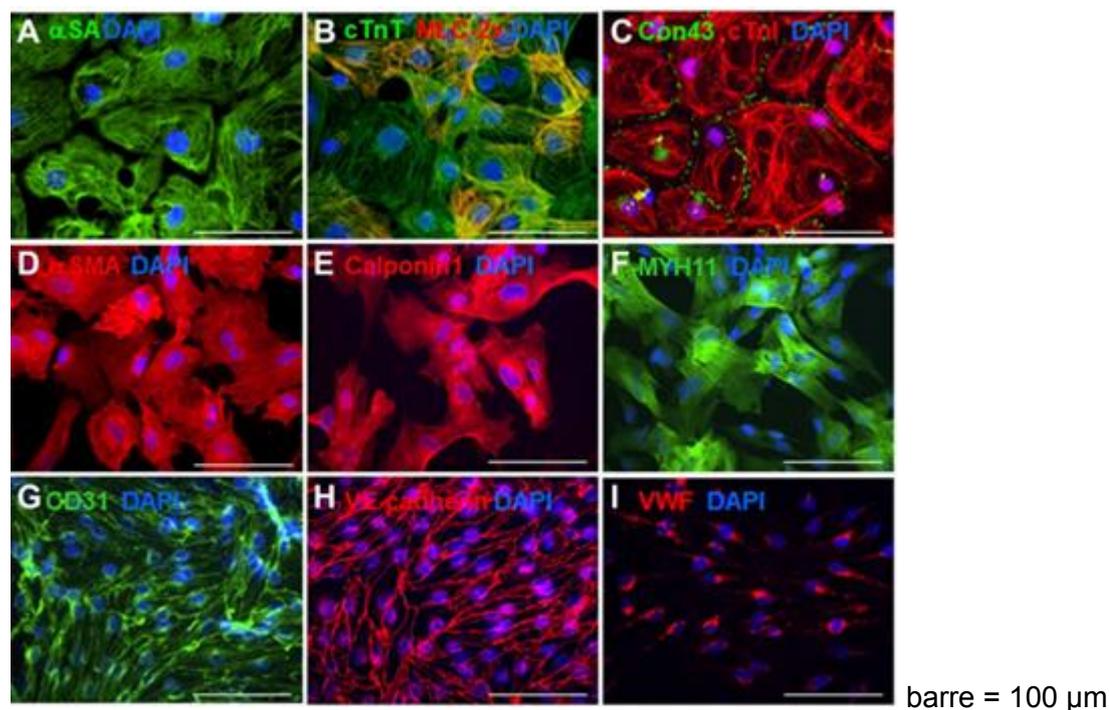
Caractéristiques des cellules musculaires lisses (SMCs) : les myofilaments sont composés de deux protéines contractiles, l'actine et la myosine, mais ne sont pas organisés en sarcomère. Du point de vue biochimique, les filaments d'actine sont constitués d' α -actine du muscle lisse, une isoforme que l'on retrouve relativement spécifiquement dans le muscle lisse. Les filaments de myosine contiennent une chaîne lourde de myosine 11, une isoforme strictement spécifique du muscle lisse. Il n'y a pas de troponine dans le muscle lisse mais de la calponine et de la caldesmone.
(https://fr.wikipedia.org/wiki/Muscle_lisse)

Caractéristiques des cellules endothéliales (ECs) : ces cellules forment la paroi interne des vaisseaux sanguins et du cœur. De nombreuses protéines transmembranaires sont retrouvées au niveau de ces cellules et leur permettent d'assurer différents rôles dans l'hémostase et dans l'inflammation. CD31 est le marqueur le plus sensible et spécifique des cellules endothéliales. La VE-cadhérine permet l'adhésion entre les cellules endothéliales et est nécessaire à la survie de ces cellules. Les corps de Weibel-Palade sont des granules de stockage des cellules endothéliales. Ils stockent et libèrent principalement deux molécules, le facteur de von Willebrand (VWF) et la P-sélectine. Le stockage de longs polymères de VWF confère à cette structure lysosomale spécialisée une forme oblongue et un aspect strié au microscope électronique.

Suite du document en page suivante

Document 8.2 : caractérisation des cellules hiPSC-CMs, hiPSC-SMCs et hiPSC-ECs par immunofluorescence (A à I)

D'après Gao L. *et al.* Exosomes secreted by hiPSC-derived cardiac cells improve recovery from myocardial infarction in swine. *Science Translational Medicine*, 2020.

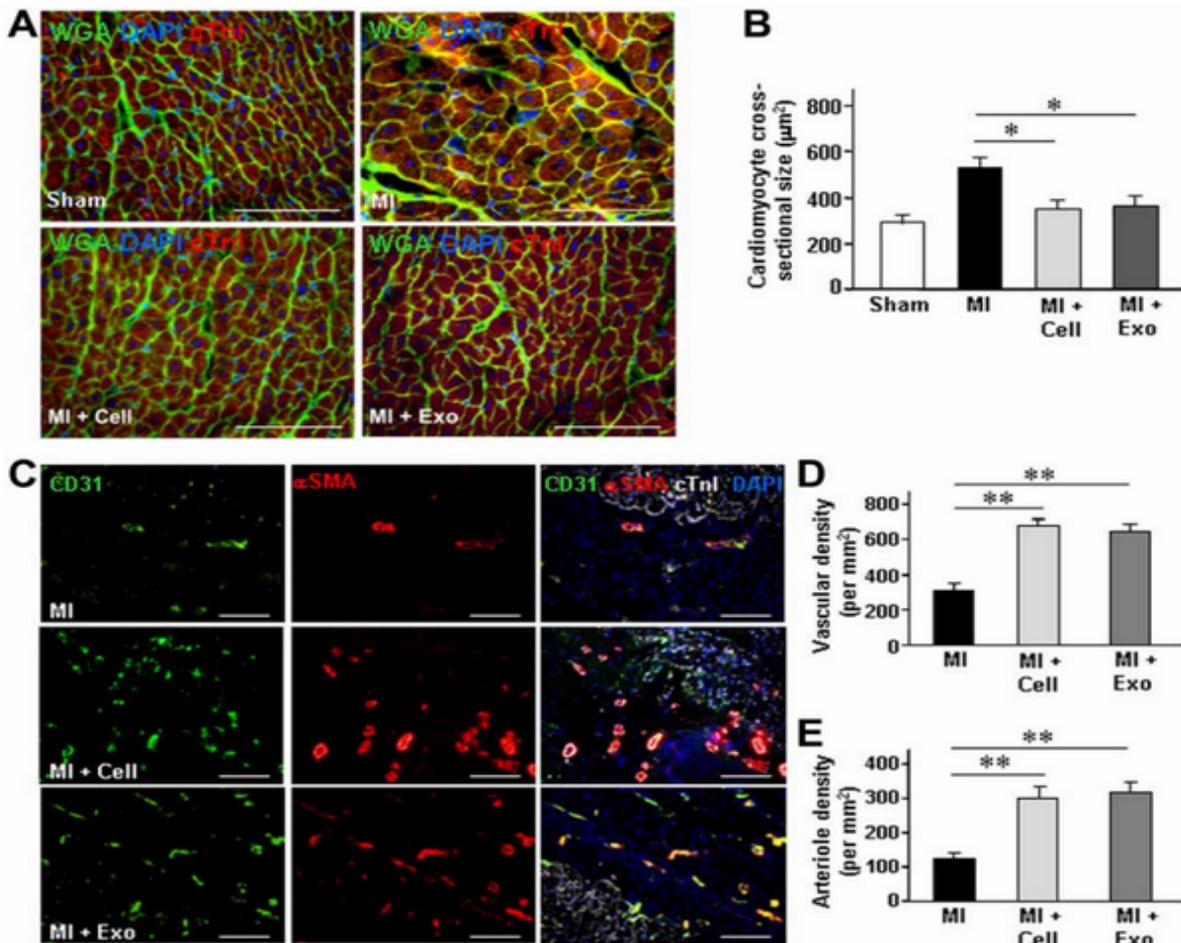


Les cellules ont été perméabilisées et incubées respectivement avec les anticorps primaires dirigés spécifiquement contre les protéines indiquées ci-dessous (voir tableau) et couplés à des fluorochromes. Au terme de l'incubation, les cellules sont observées à l'aide d'un microscope confocal à fluorescence (lasers d'excitation à 405 nm, 488 nm et 533 nm).

Les noyaux ont été marqués par le 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) ($\lambda_{\max(\text{excitation})} = 358 \text{ nm}$; $\lambda_{\max(\text{émission})} = 461 \text{ nm}$)

Fluorochrome couplé à l'anticorps	Fluorescéine $\lambda_{\max(\text{excitation})} = 493 \text{ nm}$ $\lambda_{\max(\text{émission})} = 515 \text{ nm}$	Rhodamine $\lambda_{\max(\text{excitation})} = 550 \text{ nm}$ $\lambda_{\max(\text{émission})} = 573 \text{ nm}$
Protéine révélée	<ul style="list-style-type: none"> • α-actine sarcomérique (αSA) • troponine T cardiaque (cTnT) • connexine 43 (Con43) • chaine lourde de myosine 11 (MYH11) • CD31 (CD31) 	<ul style="list-style-type: none"> • troponine I cardiaque (cTnI) • chaine légère de myosine 2v (MLC-2v) • α-actine de muscle lisse (αSMA) • calponine 1 (calponin1) • cadhérine VE (VE cadherin) • Facteur de von Willebrand (VWF)

Document 9 :



Hearts were obtained from Sham, MI, MI + Cell, and MI + Exo animals at week 4 after MI or Sham surgery and sectioned. (A) Sections from the infarct were stained with wheat germ agglutinin (WGA - green) to identify the cellular borders and with cTnI antibodies (red) to visualize CMs, and nuclei were counterstained with DAPI (blue); then, (B) CM cross-sectional surface areas were measured. (C) sections were stained with fluorescent CD31 (green), α SMA (red), and cTnI (white) antibodies, and nuclei were counterstained with DAPI (blue); then, (D) vascular density was determined by quantifying the number of structures that expressed CD31, and (E) arteriole density was determined by quantifying the number of structures that expressed both CD31 and α SMA. Scale bars, 100 μ m. Quantified data are presented as means \pm SE ($n = 5$ to 7 per experimental group), and significance was evaluated via one-way ANOVA followed by Tukey's posthoc test. * $P < 0.05$ and ** $P < 0.01$.

« Sham » : animaux témoins, « simulés », qui ont subi les mêmes actes chirurgicaux que les animaux MI ayant eu un infarctus du myocarde.

« MI » : infarctus du myocarde

Document 10 : extrait de la loi du 2 août 2021 de bioéthique

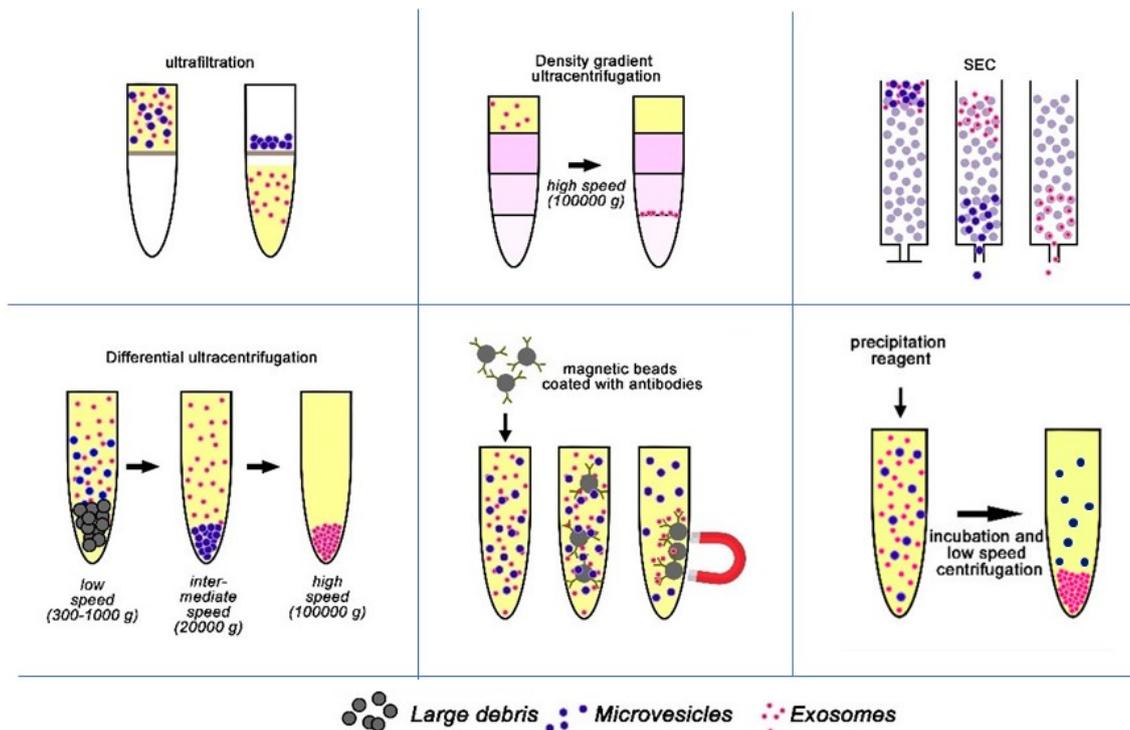
La recherche sur les embryons et les cellules souches

La recherche sur les embryons est davantage encadrée et certains interdits sont réaffirmés : création de chimères par adjonction de cellules animales dans un embryon humain, création d'embryon à des fins de recherche, clonage et réimplantation d'embryons destinés à être réimplantés.

Afin de faciliter les recherches, la procédure pour les demandes d'autorisation de recherche sur les embryons et les cellules souches embryonnaires (cellules prélevées dans un embryon à son tout premier stade de développement et qui peuvent se transformer en tous types de cellules - peau, muscles, cœur...) est allégée. En outre, une durée limite de 14 jours est fixée pour la culture *in vitro* des embryons humains inclus dans un protocole de recherche (embryons surnuméraires provenant d'un couple n'ayant plus de projet parental et ayant consenti à les proposer à la recherche).

Document 11 : techniques de purification des exosomes

Adapté de Zarà M. *et al.* - Exosomes in cardiovascular diseases. *Diagnostics*, 2020 (review)

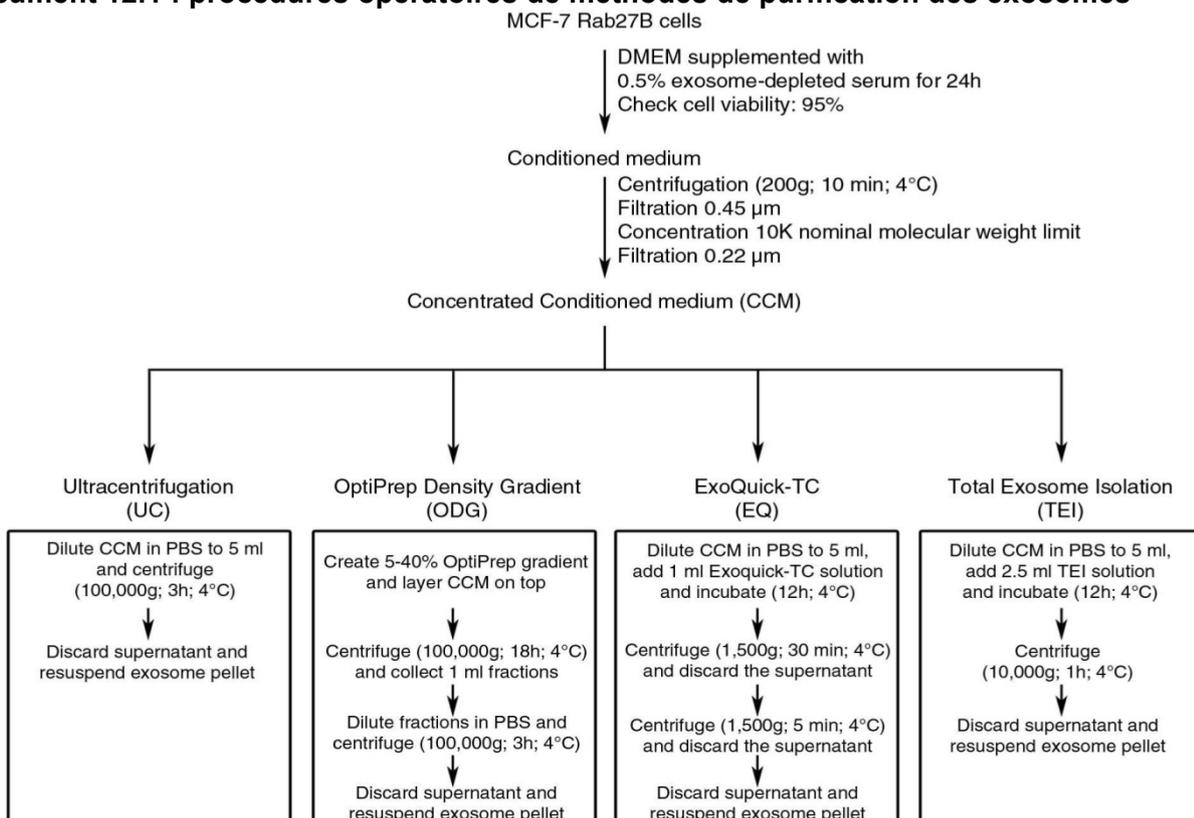


« SEC » : size exclusion chromatography

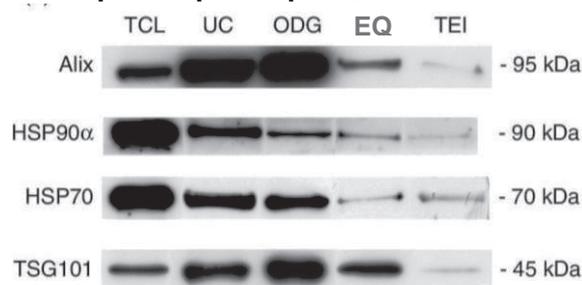
Document 12 : étude de l'impact de méthodes de purification sur la qualité des fractions exosomales

Adapté de Van Deun J. *et al.* The impact of disparate isolation methods for extracellular vesicles on downstream RNA profiling. *Journal of Extracellular Vesicles*, 2014

Document 12.1 : procédures opératoires de méthodes de purification des exosomes

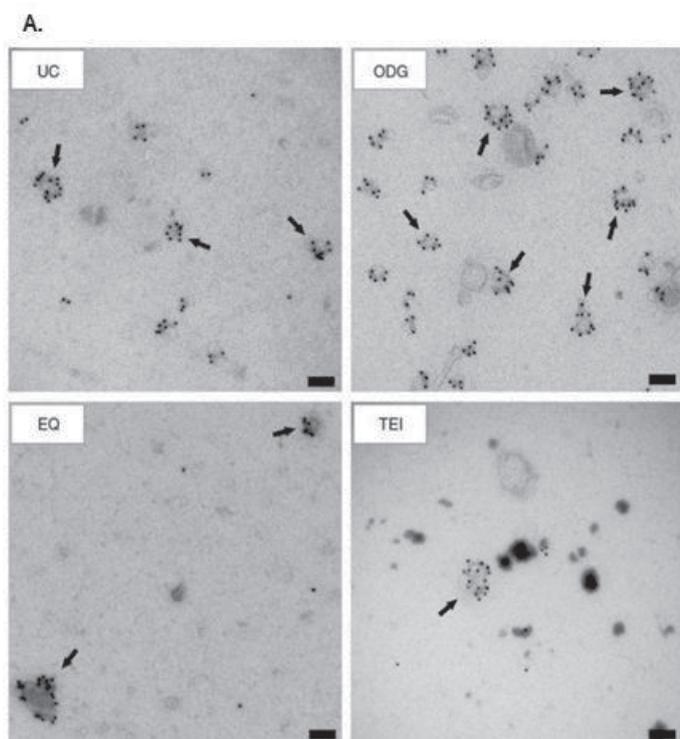


Document 12.2 : comparaison des profils protéiques par SDS-PAGE



Les culots contenant les exosomes, obtenus à partir des méthodes de purification présentées en **document 12.1**, sont lysés et leur contenu en protéines quantifié. Dix microgrammes de protéines sont séparés par SDS-PAGE en conditions réductrices. Après électrophorèse, les protéines sont transférées sur une membrane de PVDF puis incubées avec des anticorps dirigés spécifiquement contre des marqueurs protéiques spécifiques des exosomes, Alix, Hsp90 α , Hsp70 et TSG101.
« TCL » : total cell lysate

Document 12.3 : caractérisation des exosomes par microscopie électronique



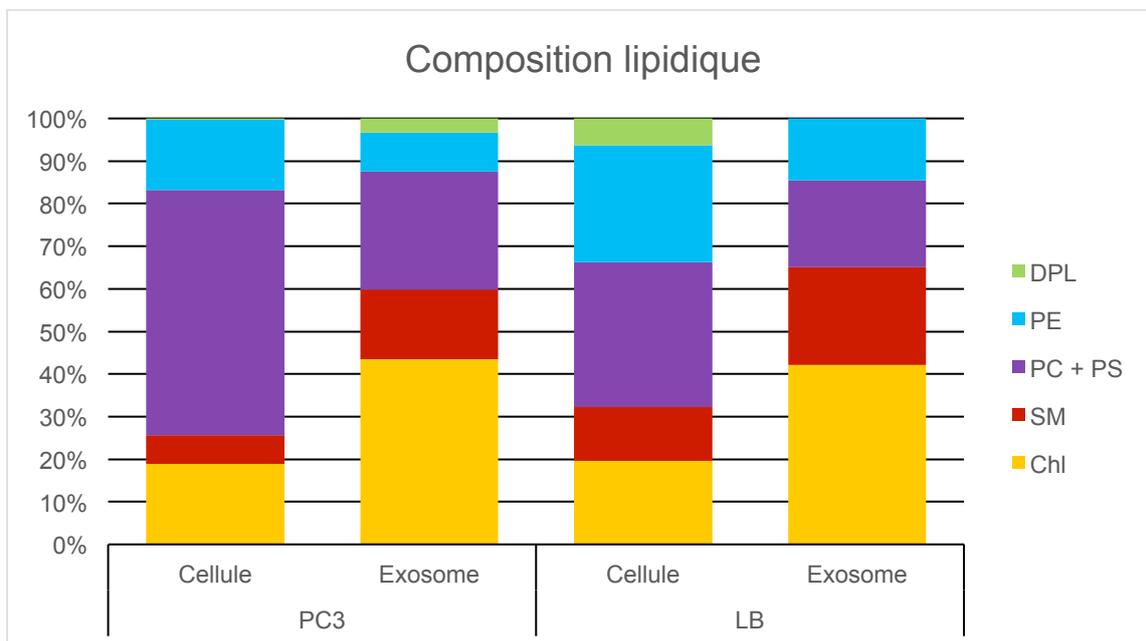
B.

Techniques	Nombre total de particules dans la fraction exosomale récupérée	Diamètre moyen (nm)
UC	$(328,2 \pm 10,8) \cdot 10^8$	$153 \pm 1,4$
ODG	$(130,3 \pm 3,3) \cdot 10^8$	$158 \pm 3,2$
EQ	$(664,5 \pm 22,5) \cdot 10^8$	$158 \pm 2,3$
TEI	$(311,4 \pm 7,2) \cdot 10^8$	$165 \pm 1,8$

A. A l'issue de chacune des techniques de purification présentées dans le **document 12.1**, les culots contenant les exosomes sont remis en suspension dans un même volume puis, une fraction aliquote de chacune de ces suspensions est analysée par microscopie électronique après marquage à l'aide d'un anticorps anti-CD63 (marqueur spécifique des membranes des exosomes) couplé à des billes d'or. Les flèches indiquent un marquage avec les billes d'or. Le trait noir représente une longueur de 100 nm. **B.** Tableau récapitulatif des résultats obtenus lors de l'analyse quantitative des images obtenues en A.

Document 13 : composition lipidique comparée de membranes d'exosomes et de membranes cellulaires totales provenant soit de cellules tumorales de prostate soit de lymphocytes B

Adapté de Ferguson SW. et Nguyen J. Exosomes as therapeutics: The implications of molecular composition and exosomal heterogeneity. *Journal of Controlled Release*, 2016 (review)



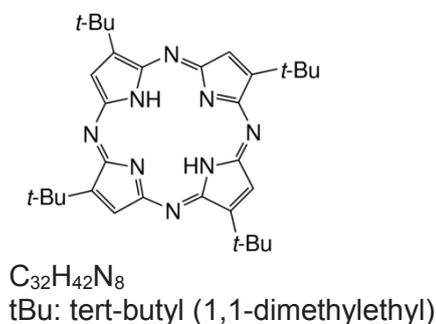
DPL : divers phospholipides, PE : phosphatidyléthanolamine, PC : phosphatidylcholine, PS : phosphatidylsérine, SM : sphingomyéline, Chl : cholestérol, PC3 : lignée de cellules tumorales de prostate, LB : culture primaire de lymphocytes B

Document 14 : étude du chargement de porphyrines dans des exosomes par méthode passive ou méthodes actives d'électroporation ou traitement à la saponine

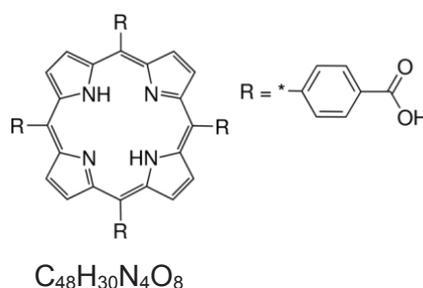
Source : Fuhrmann G *et al.* Active loading into extracellular vesicles significantly improves the cellular uptake and photodynamic effect of porphyrins. *J Control Release*, 2015.

Document 14.1 : structure of porphyrines

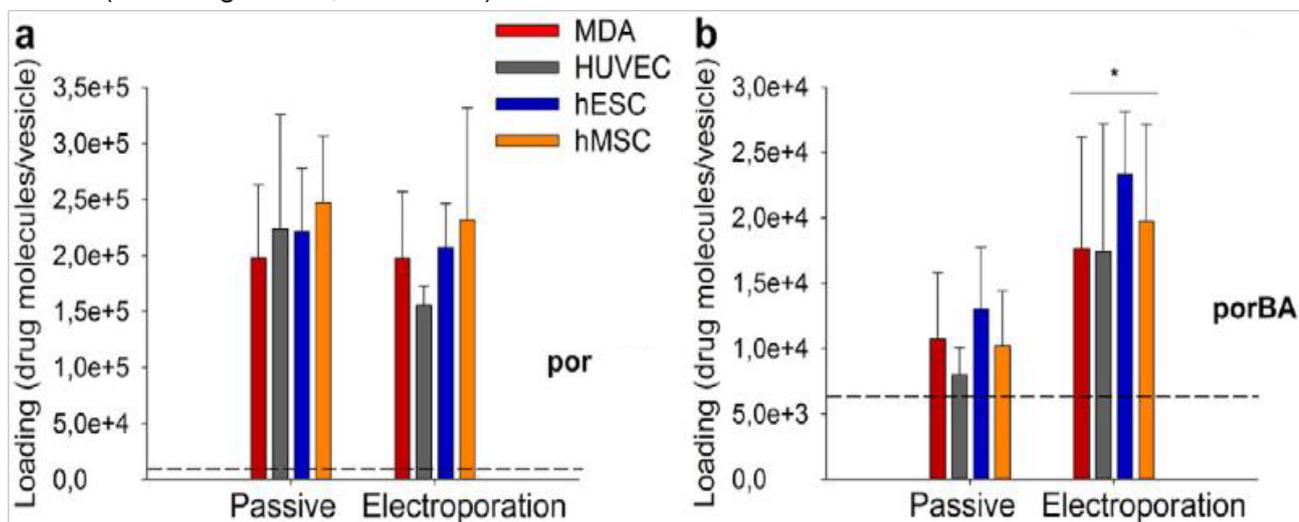
a porphyrine por



b porphyrine porBA



Document 14.2 : drug loading of exosomes (EVs) from various cell lines. Loading of (a) por, and (b) porBA, into EVs using passive incubation or electroporation. For each drug, the theoretical loading is displayed as a dashed line. This value is calculated based on the simplified assumption that EVs of 200 nm size are round-shaped spheres which are completely filled with drug solution *p = 0.02 vs. passive (linear regression, $R^2 = 0.475$).



Les exosomes sont purifiés à partir de différents types cellulaires humains : MDA (cellules cancéreuses), HUVEC (cellules endothéliales primaires), hESC (cellules souches embryonnaires), hMSC (cellules souches mésenchymateuses).

Suite du document en page suivante

Document 14.3 : encapsulation efficiency of porBA into EVs from MDA cells. (a) Different loading methods were applied to load the drug into EVs * $p < 0.05$ (ANOVA followed by Tukey). The theoretical loading is displayed as a dashed line. (b) Saponin chemical structure.

