



**HAL**  
open science

# Intérêt du dosage de la troponine dans les exosomes en pathologie cardiovasculaire

Maxime Doublier

► **To cite this version:**

Maxime Doublier. Intérêt du dosage de la troponine dans les exosomes en pathologie cardiovasculaire. Sciences pharmaceutiques. 2023. dumas-04097598

**HAL Id: dumas-04097598**

**<https://dumas.ccsd.cnrs.fr/dumas-04097598>**

Submitted on 15 May 2023

**HAL** is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.



Distributed under a Creative Commons Attribution - NonCommercial - NoDerivatives 4.0 International License

## **THÈSE D'EXERCICE / DOCTEUR JUNIOR**

Phase d'Approfondissement du DES de Biologie Médicale

Soutenu le 31 mars 2023

Par M. Maxime DOUBLIER

Né le 5 mars 1997

À Hyères

Conformément aux dispositions de l'Arrêté du 12 avril 2017  
portant organisation du troisième cycle des études de Médecine et de  
Pharmacie

THÈSE

POUR LE DIPLÔME D'ÉTAT DE DOCTEUR EN  
PHARMACIE

----oOo----

INTÉRÊT DU DOSAGE DE LA TROPONINE DANS LES EXOSOMES EN  
PATHOLOGIE CARDIOVASCULAIRE

----oOo----

**JURY :**

Président : Madame le Professeur Nathalie BARDIN

Membres : Monsieur le Professeur Régis GUIEU (Directeur de thèse)

Monsieur le Docteur Julien FROMONOT

Madame le Docteur Marion MARLINGE

27 Boulevard Jean Moulin – 13385 MARSEILLE Cedex 05  
Tel. : 04 91 83 55 00 – Fax : 04 91 80 26 12

**ADMINISTRATION :**

<i>Doyen :</i>	M. Jean-Paul BORG
<i>Vice-Doyens :</i>	Mme Florence SABATIER-MALATERRE, M. François DEVRED, M. Pascal RATHELOT, Mme Alexandrine BERTAUD
<i>Chargés de Mission :</i>	Mme Pascale BARBIER, Mme Alexandrine BERTAUD, M. David BERGELFRANC, Mme Manon CARRE, Mme Caroline DUCROS, M. Philippe GARRIGUE, M. Guillaume HACHE, M. Thierry TERME
<i>Conseiller du Doyen :</i>	M. Patrice VANELLE, Mme Françoise DIGNAT-GEORGE
<i>Doyens honoraires :</i>	M. Patrice VANELLE, M. Pierre TIMON-DAVID,
<i>Professeurs émérites :</i>	M. José SAMPOL, M. Athanassios ILIADIS, M. Philippe CHARPIOT, M. Riad ELIAS
<i>Professeurs honoraires :</i>	M. Guy BALANSARD, M. Yves BARRA, Mme Claudette BRIAND, M. Jacques CATALIN, Mme Andrée CREMIEUX, M. Gérard DUMENIL, M. Alain DURAND, Mme Danielle GARÇON, M. Maurice JALFRE, M. Joseph JOACHIM, M. Maurice LANZA, M. Patrick REGLI, M. Jean-Claude SARI
<i>Chef des Services Administratifs :</i>	Mme Sylvie BUREAU
<i>Chef de Cabinet :</i>	Mme Manon BONIFAY
<i>Responsable de la Scolarité :</i>	Mme Nathalie BESNARD

**DEPARTEMENT BIO-INGENIERIE PHARMACEUTIQUE**

Responsable : Professeur Philippe PICCERELLE

**PROFESSEURS**

BIOPHYSIQUE	M. Vincent PEYROT M. Hervé KOVACIC M. François DEVRED
GENIE GENETIQUE ET BIOINGENIERIE	M. Christophe DUBOIS
PHARMACIE GALENIQUE, PHARMACOTECHNIE INDUSTRIELLE, BIOPHARMACIE ET COSMETOLOGIE	M. Philippe PICCERELLE

## MAITRES DE CONFERENCES

BIOPHYSIQUE

Mme Odile RIMET-GASPARINI  
Mme Pascale BARBIER  
Mme Manon CARRE  
M. Gilles BREUZARD  
Mme Alessandra PAGANO

GENIE GENETIQUE ET BIOTECHNOLOGIE

M. Eric SEREE-PACHA  
Mme Véronique REY-BOURGAREL

PHARMACIE GALENIQUE, PHARMACOTECHNIE INDUSTRIELLE,  
BIOPHARMACIE ET COSMETOLOGIE

M. Pierre REBOUILLON  
M. Emmanuel CAUTURE  
Mme Véronique ANDRIEU  
Mme Marie-Pierre SAVELLI

BIO-INGENIERIE PHARMACEUTIQUE ET BIOTHERAPIES  
PHARMACO ECONOMIE, E-SANTE

M. Jérémy MAGALON  
Mme Carole SIANI  
Mme Muriel MASI

## ENSEIGNANT CDI

ANGLAIS

Mme Angélique GOODWIN

## A.H.U.

PHARMACOTECHNIE

Mme Mélanie VELIER

**DEPARTEMENT BIOLOGIE PHARMACEUTIQUE**  
Responsable : Professeur Françoise DIGNAT-GEORGE

## PROFESSEURS

BIOLOGIE CELLULAIRE

M. Jean-Paul BORG

HEMATOLOGIE ET IMMUNOLOGIE

Mme Françoise DIGNAT-GEORGE  
Mme Laurence CAMOIN-JAU  
Mme Florence SABATIER-MALATERRE  
Mme Nathalie BARDIN  
M. Romaric LACROIX

MICROBIOLOGIE

M. Jean-Marc ROLAIN  
M. Philippe COLSON

PARASITOLOGIE ET MYCOLOGIE MEDICALE, HYGIENE ET  
ZOOLOGIE

Mme Nadine AZAS-KREDER

## MAITRES DE CONFERENCES

BIOCHIMIE FONDAMENTALE, MOLECULAIRE ET CLINIQUE	M. Edouard LAMY Mme Alexandrine BERTAUD Mme Claire CERINI Mme Edwige TELLIER M. Stéphane POITEVIN Mme Sandra GHAYAD
HEMATOLOGIE ET IMMUNOLOGIE	Mme Aurélie LEROYER Mme Sylvie COINTE
MICROBIOLOGIE	Mme Anne DAVIN-REGLI Mme Véronique ROUX M. Fadi BITTAR Mme Isabelle PAGNIER Mme Sophie EDOUARD M. Seydina Mouhamadou DIENE
PARASITOLOGIE ET MYCOLOGIE MEDICALE, HYGIENE ET ZOOLOGIE	Mme Carole DI GIORGIO M. Aurélien DUMETRE Mme Magali CASANOVA Mme Anita COHEN
BIOLOGIE CELLULAIRE BIOLOGIE CELLULAIRE ET MOLECULAIRE	Mme Anne-Catherine LOUHMEAU Mme Alexandra WALTON

## A.H.U.

HEMATOLOGIE ET IMMUNOLOGIE	Mme Amandine BONIFAY
----------------------------	----------------------

## MAITRES DE CONFERENCE ASSOCIES A TEMPS PARTIEL (M.A.S.T.)

PRATIQUE OFFICINALE	M. Jérôme JOUVE Mme Emmanuelle TONNEAU-PFUG
---------------------	--

## DEPARTEMENT CHIMIE PHARMACEUTIQUE

Responsable : Professeur Patrice VANELLE

## PROFESSEURS

CHIMIE ANALYTIQUE, QUALITOLOGIE ET NUTRITION	Mme Catherine BADENS
CHIMIE PHYSIQUE – PREVENTION DES RISQUES ET NUISANCES TECHNOLOGIQUES	M. David BERGE-LEFRANC
CHIMIE THERAPEUTIQUE - CHIMIE MINERALE ET STRUCTURALE	M. Pascal RATHELOT M. Maxime CROZET
CHIMIE ORGANIQUE PHARMACEUTIQUE	M. Patrice VANELLE M. Thierry TERME
PHARMACOGNOSIE, ETHNOPHARMACOLOGIE	Mme Sok Siya BUN

## MAITRES DE CONFERENCES

BOTANIQUE ET CRYPTOLOGIE, BIOLOGIE CELLULAIRE	Mme Anne FAVEL M. Quentin ALBERT
CHIMIE ANALYTIQUE, QUALITOLOGIE ET NUTRITION	Mme Catherine DEFOORT M. Alain NICOLAY Mme Estelle WOLFF Mme Elise LOMBARD Mme Camille DESGROUAS M. Charles DESMARCHELIER M. Mathieu CERINO
CHIMIE PHYSIQUE – PREVENTION DES RISQUES ET NUISANCES TECHNOLOGIQUES	M. Duje BURIC M. Pascal PRINDERRE
CHIMIE THERAPEUTIQUE - CHIMIE MINERALE ET STRUCTURALE	Mme Sandrine ALIBERT Mme Caroline DUCROS M. Marc MONTANA Mme Manon ROCHE Mme Fanny MATHIAS
CHIMIE ORGANIQUE PHARMACEUTIQUE HYDROLOGIE	M. Armand GELLIS M. Christophe CURTI Mme Julie BROGGI M. Nicolas PRIMAS M. Cédric SPITZ M. Sébastien REDON
PHARMACOGNOSIE, ETHNOPHARMACOLOGIE	Mme Valérie MAHIOU-LEDDER Mme Béatrice BAGHDIKIAN M. Elnur GARAYEV

## MAITRES DE CONFERENCE ASSOCIES A TEMPS PARTIEL (M.A.S.T.)

CHIMIE ANALYTIQUE, QUALITOLOGIE ET NUTRITION CHIMIE PHYSIQUE – PREVENTION DES RISQUES ET NUISANCES TECHNOLOGIQUES	Mme Haïfa LAYACHI RAHABI M. Cyril PUJOL
DROIT ET ETHIQUE	Mme Laurie PAHUS
GESTION PHARMACEUTIQUE, PHARMACOECONOMIE ET ETHIQUE PHARMACEUTIQUE OFFICINALE, DROIT ET COMMUNICATION PHARMACEUTIQUES A L'OFFICINE ET GESTION DE LA PHARMAFAC	Mme Félicia FERRERA
DISPOSITIFS MEDICAUX	Mme Valerie MINETTI-GUIDONI

**DEPARTEMENT MEDICAMENT ET SECURITE SANITAIRE**

Responsable : Professeur Benjamin GUILLET

**PROFESSEURS**

PHARMACIE CLINIQUE	M. Stéphane HONORÉ
PHARMACODYNAMIE	M. Benjamin GUILLET
TOXICOLOGIE ET PHARMACOCINETIQUE	M. Bruno LACARELLE M. Joseph CICCOLINI
TOXICOLOGIE GENERALE	Mme Caroline SOLAS-CHESNEAU

**MAITRES DE CONFERENCES**

PHARMACIE CLINIQUE	M. Florian CORREARD Mme Marie-Anne ESTEVE
PHARMACODYNAMIE	M. Guillaume HACHE Mme Ahlem BOUHLEL M. Philippe GARRIGUE
PHYSIOLOGIE	Mme Sylviane LORTET
PHYSIOLOGIE / PHARMACOLOGIE	Mme Anaïs MOYON
TOXICOLOGIE ET PHARMACOCINETIQUE	Mme Raphaëlle FANCIULLINO Mme Florence GATTACECCA Mme Anne RODALLEC M. Nicolas FABRESSE
TOXICOLOGIE GENERALE	M. Pierre-Henri VILLARD

**A.H.U.**

PHYSIOLOGIE / PHARMACOLOGIE	M. Vincent NAIL
PHARMACIE CLINIQUE	Mme Maeva MONTALEYTANG Mme Charlotte BERARD

## CHARGES D'ENSEIGNEMENT A LA FACULTE

Mme Valérie AMIRAT-COMBRALIER, Pharmacien-Praticien hospitalier

M. Pierre BERTAULT-PERES, Pharmacien-Praticien hospitalier

Mme Martine BUES-CHARBIT, Pharmacien-Praticien hospitalier

Mme Annie CILIA, Pharmacien-Praticien hospitalier

M. Yann COTTE, Pharmacien Assistant

M. Nicolas COSTE, Pharmacien-Praticien hospitalier

Mme Nicole FRANCOIS, Pharmacien-Praticien hospitalier

Mme Sophie GENSOLLEN, Pharmacien-Praticien hospitalier

M. Sylvain GONNET, Pharmacien titulaire

Mme Céline HIRSCH, Pharmacien Conseil de l'Assurance Maladie

Mme Christelle LABRANDE, Pharmacien-Praticien hospitalier

Mme Florence LEANDRO-DIJON, Pharmacien adjoint

Mme Nathalie MARTIN, Pharmacien-Praticien hospitalier

Mme Sophie MERLIN, Pharmacien Assistant

Mme Vanessa METZ, Pharmacien hospitalier

Mme Alice PERINEAU, Pharmacien Assistant

Mme Florence PEYRON, Pharmacien-Praticien hospitalier

M. Stéphane PICHON, Pharmacien titulaire

M. Bertrand POURROY, Pharmacien-Praticien hospitalier

Mme Clémence TABELLE, Pharmacien-Praticien attaché

M. Badr Eddine TEHHANI, Pharmacien – Praticien hospitalier

M. Joël VELLOZZI, Expert-Comptable

Mise à jour le 23 février 2023

« L'Université n'entend donner aucune approbation, ni improbation aux opinions émises dans les thèses. Ces opinions doivent être considérées comme propres à leurs auteurs. »

## Remerciements

### Aux membres du jury,

A **Madame le Professeur Nathalie BARDIN**, qui m'a fait l'honneur de présider ce jury de thèse.

Je tiens à vous remercier, Madame la Présidente du jury, pour votre expertise, votre bienveillance et votre soutien tout au long de mes années d'études qui ont été essentiels pour la réussite de ce travail. Merci pour votre soutien inaltérable depuis la deuxième année de pharmacie et cette Unité d'Enseignement facultative visant à décider d'un projet professionnel. Merci de m'avoir donné goût aux spécialités hospitalières de la pharmacie et de continuer à partager encore aujourd'hui votre inspiration pour la biologie médicale à travers ce semestre d'immunologie que je réalise actuellement dans votre service.

A **Monsieur le Professeur Régis GUIEU**, merci tout d'abord de m'avoir proposé ce sujet de thèse et d'avoir accepté de m'accompagner durant ce travail en tant que Directeur de thèse. Merci pour votre encadrement, vos conseils avisés et votre disponibilité permanente. Vous avez su me motiver, m'orienter et me rassurer tout au long de cette aventure. Votre professionnalisme, calme et positivisme que j'ai décelé dès ma première année de faculté et le difficile concours d'entrée aux études de santé font partie des raisons pour lesquelles j'ai poursuivi dans cette voie. Je vous en suis infiniment reconnaissant.

A **Monsieur le Docteur Julien FROMONOT**, merci d'avoir accepté d'évaluer mon travail. Tes remarques constructives et tes conseils m'ont permis d'améliorer considérablement ma thèse. Merci pour ta détermination sans faille, cette énergie qui gagne chaque personne que tu rencontres. Merci infiniment pour la passion que tu transmets. Ton sens de poser et comprendre le bon diagnostic pour la bonne prise en charge du patient m'a beaucoup apporté depuis ce semestre en biochimie. Je ne l'oublierai jamais.

A **Madame le Docteur Marion MARLINGE**, merci également d'avoir accepté d'évaluer mon travail. Merci de m'avoir convaincu, pendant mon semestre en biochimie, d'approfondir le sujet de cette thèse et de ta confiance en moi dès le début de ce travail, ton soutien m'a permis de me lancer avec détermination et de mener à bien cette thèse. Merci pour ton enthousiasme, ton omniprésence dans l'accompagnement et la formation des internes du service, ainsi que pour ta personnalité sans cesse positive qui nous imprègne et qui imprègnera les internes de demain.

**Aux personnes ayant contribué de près ou de loin à l'élaboration de cette thèse,**

**A mes parents**, à ma mère, merci pour ton amour, ta patience d'archange et ton soutien tout au long de mes études. Ton dévouement et ta force de caractère n'ont eu de cesse de me guider et me guideront encore pendant mon exercice professionnel.

A mon père, je tiens également à te remercier évidemment pour ton amour inconditionnel et ton soutien constant. Ta persévérance dans le travail m'a toujours poussé à donner le meilleur de moi-même.

**A mes frères**, Laurent, Georges-Alexandre et Thierry, merci pour vos encouragements et votre soutien sans faille pendant ces études. Merci pour ces parties infernales sur ces jeux de sport parfaitement réalistes. Même si aujourd'hui nous sommes dispersés aux quatre coins du pays, tous ces moments en familles, ça ne s'oublie pas. Comme un 4-0 qui finit sans manette. Et non ce n'était pas « à cause du jeu ». Même si les années ont passé, même si la distance est douloureuse, nos liens sont éternels.

**A ma grand-mère**, Suzanne, que mon cœur chérira sans fin et dont le souvenir restera gravé à jamais.

**A mon amour**, mon cœur, merci pour ton soutien émotionnel, ta compréhension et ta générosité. Merci pour tous ces moments formidables que tu m'as fait vivre. Je ne serai pas le même aujourd'hui sans toi.

**A mes amis**, Patrick, Alexandre, Anthony, Luna, Anaïs, Matthieu, Claudia, Bilal, Aurélien, Sofiane, merci de m'avoir accompagné pendant toutes ces années qu'elles datent du lycée ou de la faculté. Merci pour votre bienveillance, pour tous ces moments de joie passés et futurs. Merci au trio du RU pour ces taboulés endiablés, ils n'auraient pas eu la même saveur sans vous.

**A mes co-internes**, Clara, Lucille, Marc-Antoine, Laura, Lucas, Cléa, Julia, Elisabeth, Camille, Yassina, Maëlle, Yassine, je ne remercierai jamais assez le destin de m'avoir fait croiser votre chemin. Vous êtes des personnes, amis, et futurs soignants formidables.

**A toute ma famille, tous mes amis et toutes les personnes qui m'ont permis de me sentir exister.**

## INDEX DES ABREVIATIONS

AFSSAPS : Agence Française de Sécurité Sanitaire des Produits de Santé

AHA : American Heart Association

ANSM: Agence Nationale de Sécurité du Médicament et des Produits de Santé

AVC : Accident vasculaire cérébral

BNP: Brain natriuretic peptide

CAD : Coronary artery disease

CD: Cluster Differentiation

CK-MB: Créatine-kinase Muscular Brain

CPO: Chest Pain onset (début de douleur thoracique)

CPR: Cardiopulmonary resuscitation (Réanimation cardiopulmonaire)

CRP : protéine C réactive

cTnC : Troponine cardiaque C

cTnI : Troponine cardiaque I

cTnT : Troponine cardiaque T

ECG : Electrocardiogramme

ESC : European Society of Cardiology

ESCRT: Endosomal sorting complex required for transport

FFP: Faux faux positif

GRACE : Global Registry of Acute Coronary Events

GPIIb : glycoprotéine IIb

GSLA : Groupe Suisse Lipides et Athérosclérose

Hs-cTn : troponine cardiaque hautement sensible.

HTA : Hypertension artérielle

IC : Insuffisance cardiaque

IDM : Infarctus du myocarde

ISEV: International Society for Extracellular Vesicles

MACE : Major adverse cardiovascular events

MI: Myocardial infarction

MCV : Maladie cardiovasculaire

NSTEMI : Non ST elevation myocardial infarction

NTA : Nanoparticle Tracking Analysis

PBMC: Peripheral blood mononuclear cell

PROCAM : Prospective Cardiovascular Münster Study

SCA : syndrome coronarien aigu

SCORE : Systematic Coronary Risk Evaluation

SSC: Syndrome coronarien chronique

TIMI : thrombolysis in myocardial infarction risk score

US : Ultrasensible

VE-cadherine : Vascular-Endothelial cadherine

VFP: Vrai faux positif

VPN : Valeur Prédictive Négative

VPP : Valeur Prédictive Positive

# Table des matières

<b>I. Introduction</b> .....	15
<b>II. Rappels sur les maladies cardiovasculaires</b> .....	16
A. Epidémiologie des maladies cardiovasculaires .....	16
B. Physiopathologie des maladies cardiovasculaires ischémiques .....	19
C. Les facteurs de risques cardiovasculaires .....	21
D. Evaluations du risque cardiovasculaire : des grilles en évolution .....	23
1. Grille SCORE2 et SCORE2-OP.....	23
2. Score PROCAM/GSLA .....	25
3. Avènement des outils d'intelligence artificielle .....	27
<b>III. Marqueurs biologiques</b> .....	28
A. Les troponines .....	29
B. La myoglobine.....	30
C. La CK-MB massique.....	30
D. Les facteurs natriurétiques.....	31
E. La copeptine .....	33
F. La Protéine C réactive .....	33
G. Structure des troponines .....	34
H. Les différentes mesures et sensibilités de dosage.....	37
I. Protocoles actuellement retenus par l'ESC pour le diagnostic.....	41
<b>IV. Intérêt croissant de l'analyse des vésicules extracellulaires en pathologie humaine</b> .....	44
A. Application à la cancérologie .....	45
B. Application dans les maladies cardiovasculaires.....	46
C. Application lors de la grossesse .....	46
D. Application en maladies infectieuses .....	47
<b>V. Les exosomes</b> .....	48
A. Composition .....	50
1. Protéines .....	50
2. ARN .....	50
3. Lipides.....	51
B. Techniques d'isolation et de mesure des exosomes .....	51
C. Techniques de caractérisation et d'étude des exosomes.....	54
D. Intérêt de mesure des biomarqueurs tels que la troponine dans les exosomes .....	55
<b>VI. Etude préliminaire</b> .....	57
A. Méthode et résultats.....	57
B. Patients .....	59

C. Perspectives .....	65
<b>VII. Conclusion</b> .....	66
BIBLIOGRAPHIE .....	67
ANNEXES .....	74

## Table des figures

Figure 1: Prévalence standardisée selon l'âge des cardiopathies ischémiques dans les pays membres de l'ESC (2017). selon: Global Burden of Disease Study 2017, Institute for Health Metrics and Evaluation. (IHD : ischemic heart disease) .....	18
Figure 2: Classification évolutive des lésions d'athérosclérose selon Stary et al. ....	20
Figure 3: Etablissement des Odd Ratio des différents facteurs de risques et facteur protecteurs des IDM via les études INTERHEAD et INTERSTROKE (9,10) .....	22
Figure 4: Schématisation simplifiée de la synthèse du NT-proBNP (29) .....	32
Figure 5: Modèle du filament mince du muscle selon Marston et al. avec l'actine (blanc), la tropomyosine (rouge), TnC (rose), TnI (magenta) et TnT (jaune) .....	34
Figure 6: Modèle en trois dimension du complexe troponines (densité électronique calculée en jaune) du filament fin (deux monomères de tropomyosine en bleu sur un noyau de monomère d'actine en magenta) (40) .....	36
Figure 7: Principe général du dosage de troponine US .....	38
Figure 8: Plage de détection de la troponine en fonction de groupes de patients de diagnostic précisément connu selon les générations de dosage (vert : patient sain, orange : libération cytosolique induite par ischémie ou micro-nécrose, rouge : nécrose myocardique étendue)(44) .....	39
Figure 9: Recommandations de prise en charge avec l'algorithme 0h/1h, selon l'ESC 2020. ....	42
Figure 10: Potentielles utilisations thérapeutiques ou de suivi des exosomes en pathologie humaine (58). ....	47
Figure 11: Biosynthèse des exosomes .....	49
Figure 12: Résultats des mesures de troponine exosomale .....	61
Figure 13: Comparaison de la troponine dosée directement dans le plasma et dans les exosomes.....	62
Figure 14: Comparaison de la cTnT exosomale avec les 7 patients possédant une cTnT indétectable	63
Figure 15: Etude statistique corrélative entre les troponines plasmatiques et exosomales .....	64

## Table des tableaux

Tableau 1: Classification clinique des IDM (4ème classification universelle 2018) .....	21
Tableau 2: Risque absolu de subir un évènement cardiovasculaire (fatal ou non) sur 10 ans selon les 2 tables SCORE2 et PROCAM modifié, selon l'AGLA/GSLA .....	27
Tableau 3: Cut off des troponines US selon la technique de mesure, pour utiliser l'algorithme H0/H1 et H0/H2 (TBD : To Be Determined).....	43
Tableau 4: Tableau récapitulatif des principales techniques d'isolation des exosomes (90) .....	53
Tableau 5: Exemples pratiques de méthode de caractérisation des exosomes selon Zhang et al.....	55
Tableau 6: Tableau des patients ayant une troponine T plasmatique positive .....	59
Tableau 7: Tableau des patients ayant une troponine T plasmatique négative (en jaune, les patients avec clinique de MCV).....	60

## I. Introduction

Les maladies cardiovasculaires (MCV) sont une des principales causes de mortalité dans le monde et en France (1). Chaque année, des millions de décès sont imputables aux MCV, dont la plupart à une cardiopathie d'origine coronarienne ou aux accidents vasculaires cérébraux (AVC). Ainsi, on estime que 17,9 millions de personnes sont décédées des suites de maladies cardiovasculaires en 2019, ce qui représente 32 % de tous les décès dans le monde. Parmi ces décès, 85 % étaient dus à un accident vasculaire cérébrale ou un infarctus du myocarde (IDM), selon l'OMS 2019 (2).

Les dosages biologiques, en particulier celui des troponines, est déterminant car la douleur rétro-sternale peut être très atypique ou sans signe probant à l'ECG. L'objectif de ce travail est de comparer les méthodes biologiques de dosages habituels sur plasma au dosage de la troponine effectué dans les exosomes, qui sont des vésicules extracellulaires de taille nanométrique sécrétées par les cellules (3). Dans ce travail, une approche toute particulière aux cardiopathies ischémiques sera réalisée, et on s'intéressera principalement à l'intérêt du dosage de la troponine dans les exosomes. Avant cela, nous ferons un rappel sur les MCV, puis nous détaillerons les différents marqueurs biologiques existants et disponibles en laboratoire de biologie médicale pour ces pathologies. Enfin, puisqu'il existe de nos jours un intérêt croissant pour l'analyse des vésicules extracellulaires dans les pathologies cardiovasculaire, cela sera illustré par une étude préliminaire comparative réalisée en milieu hospitalier. La traduction de ces résultats et leur positionnement au cœur de la prise en charge des patients atteints de nécrose myocardique seront étudiés, ainsi que l'intérêt de modifier analytiquement la matrice du dosage et surtout les modifications pré-analytiques qu'un tel dosage exige.

## **II. Rappels sur les maladies cardiovasculaires**

### **A. Epidémiologie des maladies cardiovasculaires**

Selon l’OMS, les maladies cardiovasculaires regroupent :

- Les cardiopathies coronariennes (dont l’IDM, qui est caractérisé par une souffrance des cellules myocardiques dû aux manques de dioxygène et de nutriments. De nombreux tests diagnostiques cliniques et biologiques ont été développés afin de déceler rapidement ces pathologies dans le but de les prendre en charge rapidement).
- Les maladies cérébro-vasculaires (dont l’AVC, qui est un arrêt brutal de la circulation sanguine au niveau d’une partie du cerveau d’origine ischémique ou hémorragique) ;
- Les artériopathies périphériques, qui sont des pathologies touchant les vaisseaux sanguins alimentant les bras et les jambes ;
- Les cardiopathies rhumatismales, qui sont dues à une lésion des valves cardiaques causée par au moins un épisode de rhumatisme articulaire aigu provoqué par un streptocoque du groupe A ;
- Les thromboses veineuses profondes (dont l’embolie pulmonaire).

Nous pouvons également citer deux affections particulièrement courantes :

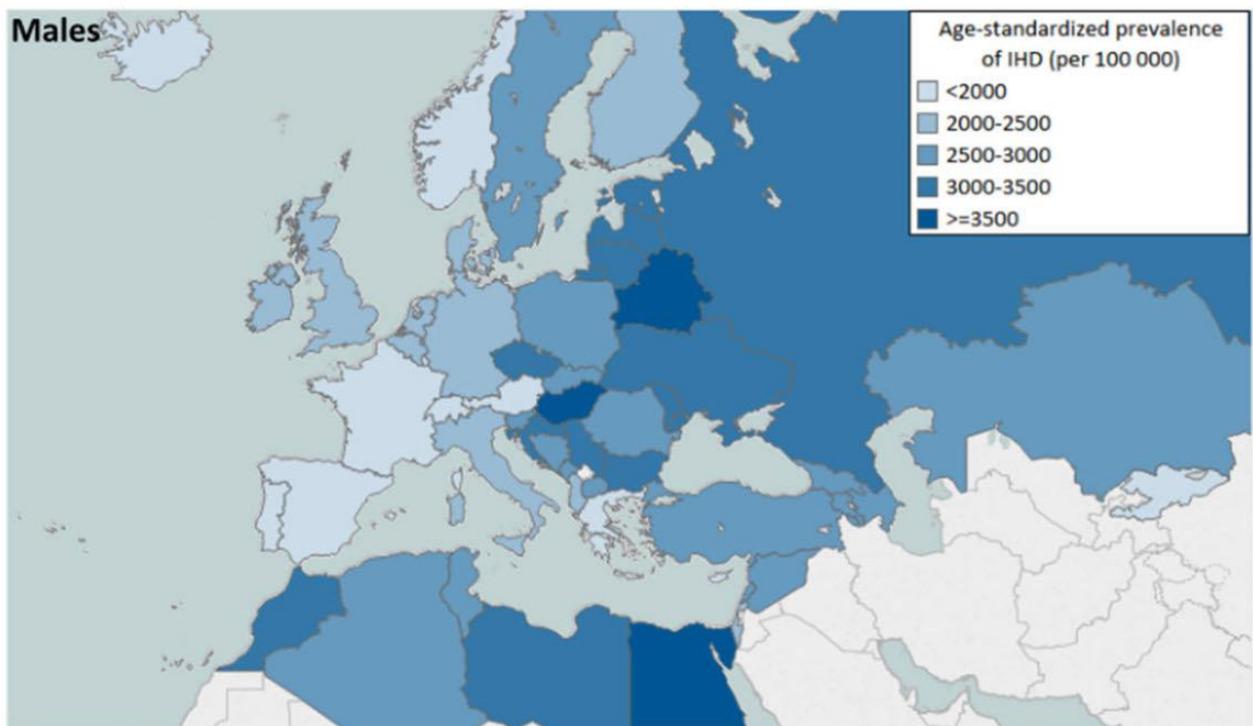
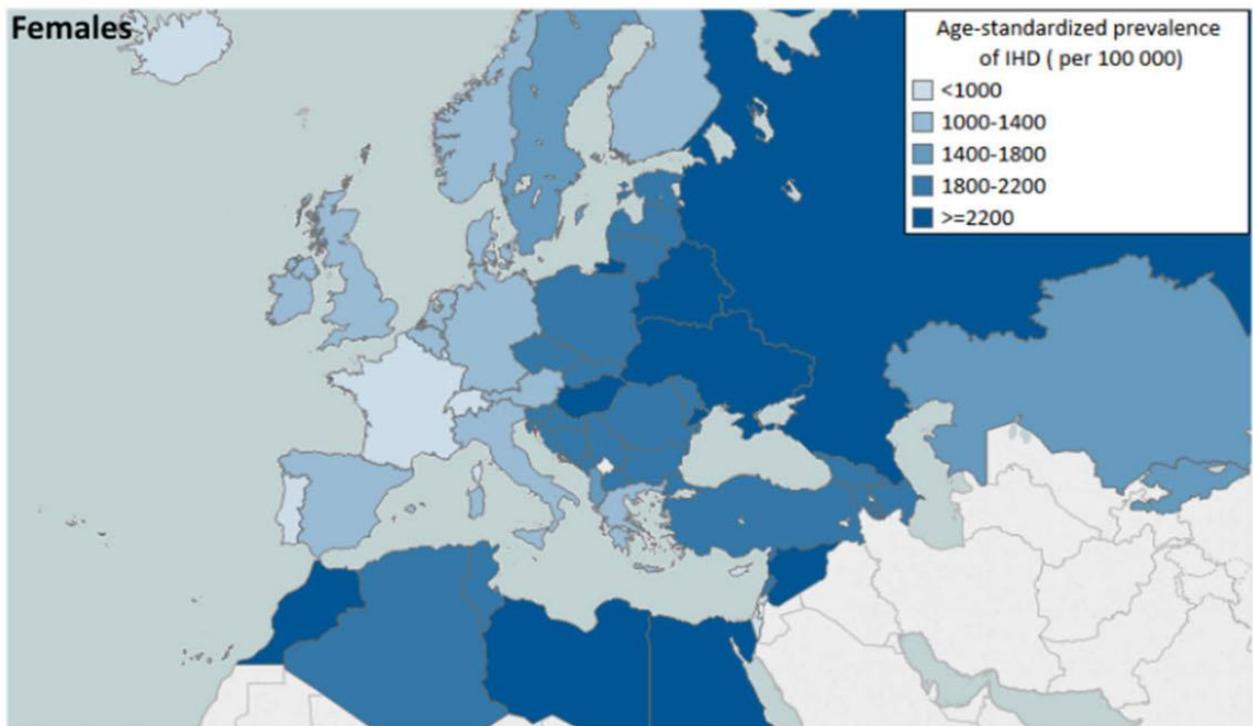
- L’hypertension artérielle, qui est une élévation persistante de la pression dans les artères;
- L’insuffisance cardiaque, qui est une anomalie fonctionnelle contractile du muscle cardiaque ;

D’après l’European Society of Cardiology (ESC), l’infarctus aiguë du myocarde est défini par un faisceau d’argument clinico-biologiques en faveur d’une nécrose myocardique chez un patient présentant des signes d’ischémie ou de nécrose myocardique aiguë.

En 2012, 17,5 millions de décès ont été imputés à des MCV dans le monde dont 7,4 millions sont secondaires à des maladies cardiaques ischémiques (CAD) et ceux malgré une meilleure prise en charge des MCV et de la réduction des facteurs de risques (4). En 2019, toujours d’après

l'OMS, les MCV représentent 32% des décès totaux, qui dans la majorité des cas proviennent des maladies coronariennes et de l'AVC (15 millions de décès pour ces dernières). La France, quant à elle, possède le taux de MCV le plus bas d'Europe (5) et son incidence a tendance à encore diminuer. Cependant, les MCV constituent la deuxième cause de mortalité en France (la première en Europe) et la troisième cause de mortalité prématurée. Comme illustré plus bas (Figure 1), chez les hommes comme chez les femmes, la France possède un taux de pathologie ischémique en dessous de 1000 pour 100.000, ce qui figure parmi les meilleurs taux d'Europe.

Selon Santé Publique France en 2015, en France, on recense 144 626 décès par MCV, la majorité étant imputable à l'AVC (21,6%) et l'IDM (10,1%). L'âge moyen était de 83,5 ans (77,7 ans pour IDM). Le taux standardisé de mortalité par MCV était de 204,1/100000 habitants, ce taux étant 1,6 fois plus élevé chez les hommes que chez les femmes(6). La mortalité par MCV représentait 12,4% de la mortalité prématurée globale. Le nombre d'années potentielles de vie perdues dépassent les 10 ans, chez les hommes comme chez les femmes.



*Figure 1: Prévalence standardisée selon l'âge des cardiopathies ischémiques dans les pays membres de l'ESC (2017). selon: Global Burden of Disease Study 2017, Institute for Health Metrics and Evaluation. (IHD : ischemic heart disease)*

## B. Physiopathologie des maladies cardiovasculaires ischémiques

Les cardiopathies ischémiques sont assimilées à la formation d'une plaque d'athérosclérose limitant le débit des artères coronaires qui perfusent les cardiomyocytes. Ces plaques d'athérome ou d'athérosclérose, sont constituées d'un excès de lipides (majoritairement LDL-cholestérol) qui vont se déposer, le plus souvent dans la paroi des zones de bifurcation artérielles (7).

Il existe une classification histogénétique des types lésionnels par l'American Heart Association (AHA). Ainsi, 6 stades lésionnels sont reconnus, chacun renvoyant au stade précédent (Figure 2). Dès le stade II, on note l'induction d'une réaction inflammatoire chronique et l'augmentation du nombre de cellules spumeuses. A noter que la réversibilité n'existe que pour le dernier type de lésion (lésion compliquée) qui peut cicatriser et repasser en type V (lésion non compliquée) ; et que le type IV peut passer directement au type VI en cas de plaque fragile sans formation de chape fibreuse. L'évolutivité d'une lésion d'athérosclérose est complexe, très variable et imprévisible. Ce sont les lésions dites instables qui vont provoquer des cardiopathies ischémiques, dont l'IDM (noyau lipidique volumineux associée à une plaque fibreuse très fine).

Nomenclature et histologie principale	Stades de progression	Principale mécanisme de croissance	Apparition	Corrélation clinique
Type I: Lésion initiale Macrophages isolés, spumeux		Croissance principalement par accumulation de lipides	Dès la première décennie	Asymptomatique
Type II: Stries lipidiques			Dès 30 ans	
Type III: Lésion intermédiaire				
Type IV: lésion athéromateuse Formation d'un centre lipidique sans fibrose		Augmentation du collagène et des cellules musculaires lisse	Dès 40 ans	Asymptomatique ou symptomatique
Type V: lésion fibro-athéromateuse. Avec ou sans calcification				
Type VI: lésion Compliquée				

Figure 2: Classification évolutive des lésions d'athérosclérose selon Stary et al.

La diminution du débit par la plaque d'athérome provoque l'ischémie myocardique. L'ischémie peut être chronique (angor) ou aiguë, et peut se poursuivre par une nécrose et/ou une rupture de la plaque.

Au cours des dernières années, d'autres mécanismes ont été décrit, hormis la formation de plaques d'athérome, incluant des mécanismes complexes et imbriqués (inflammation, vasospasme, dysfonction microvasculaire et macrovasculaire, implication du système nerveux...) (8).

Les cardiopathies ischémiques sont provoquées par la diminution des apports en dioxygène au muscle cardiaque. Deux pathologies sont à distinguer : le SCA (diagnostic essentiellement clinique) et l'IDM (utilité majeure des marqueurs biologiques). L'IDM est diagnostiqué si une preuve de nécrose myocardique est apportée dans un contexte d'ischémie myocardique aiguë.

<b>Type 1</b>	IDM spontané causé par l'ischémie due à un événement coronarien primaire
<b>Type 2</b>	IDM secondaire à une ischémie (déséquilibre apport/consommation O2)
<b>Type 3</b>	Mort subite d'origine cardiaque soudaine et inattendue
<b>Type 4a</b>	IDM lié à une intervention coronaire percutanée (moins de 48h après l'intervention index)
<b>Type 4b</b>	IDM associée à une thrombose du stent documentée
<b>Type 4c</b>	IDM associé à une resténose liée à une intervention coronarienne percutanée
<b>Type 5</b>	IDM associée à un pontage aorto-coronarien (moins de 48h après l'intervention index)

*Tableau 1: Classification clinique des IDM (4ème classification universelle 2018)*

Selon l'ESC, la définition clinique de l'IDM indique la présence d'une lésion myocardique aiguë, détectée par l'élévation ou la diminution des taux de biomarqueurs cardiaques dans le contexte d'une ischémie myocardique aiguë ; dont il existe une classification (Tableau 1).

### C. Les facteurs de risques cardiovasculaires

Les facteurs de risque sont des paramètres qui augmentent le risque de développer une MCV.

Certains d'entre eux sont non modifiables (9):

- Age
- Sexe
- Origine ethnique
- Antécédents familiaux

D'autres sont modifiables, c'est-à-dire qu'ils peuvent être améliorés en modifiant les habitudes de vie. Ils sont particulièrement ciblés dans la lutte préventive (primaire et secondaire) contre les MCV :

- Tabagisme
- Obésité, alimentation
- Alcool

- Sédentarité
- Facteurs psychosociaux
- Pathologies sous-jacente (diabète, dyslipidémie, HTA).

Réalisés chez tous les âges et dans toutes les régions du monde, les études INTERHEART et INTERSTROKE (Figure 3) montrent que le tabagisme, la dyslipidémie, l'hypertension, le diabète, l'obésité abdominale et les facteurs psychosociaux étaient fortement et significativement associés à un risque accru d'infarctus du myocarde. Au contraire, la consommation quotidienne de fruits et de légumes, et les activités physiques régulières étaient associées à un risque réduit.

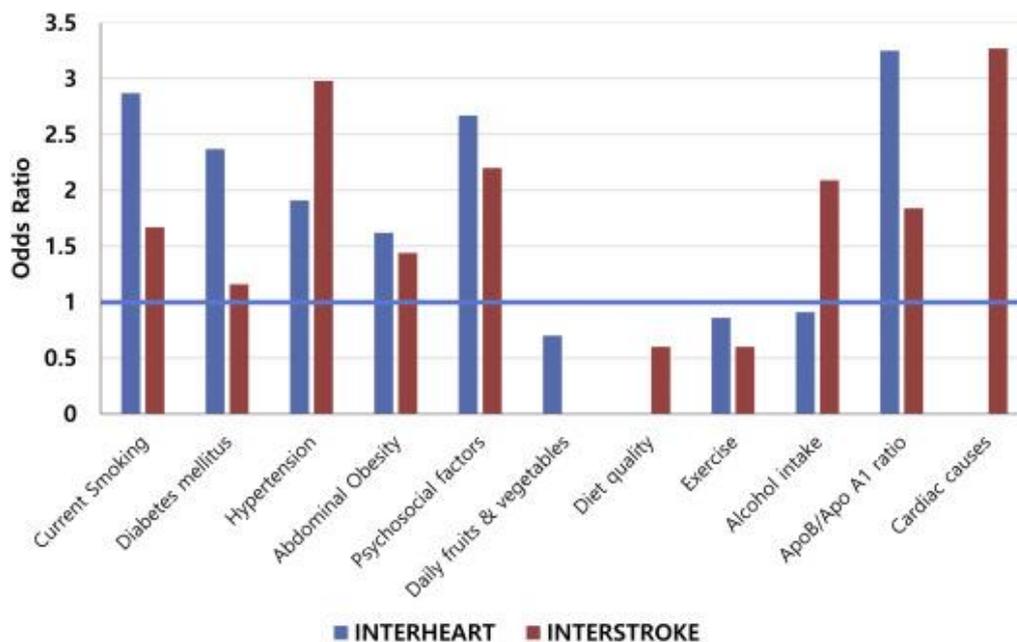


Figure 3: Etablissement des Odds Ratio des différents facteurs de risques et facteur protecteurs des IDM via les études INTERHEART et INTERSTROKE (9,10)

Les facteurs de risque principaux étant l'âge, le sexe, le tabagisme, le diabète, l'HTA et la dyslipidémie.

En France en 2017, 21% des adultes sont atteints d'obésité (peu de différence en fonction du sexe) ; 25% des femmes de plus de 15 ans fument chaque jour contre 33% des hommes de plus de 15 ans ; le taux standardisé selon l'âge de l'hypertension artérielle est parmi les meilleurs des membres de l'European Society of Cardiology (ESC) (22<sup>ème</sup>/54) (10).

A noter que les facteurs psychologiques et sociaux ne sont pas encore pris en compte dans les bases de données mondiales.

#### D. Evaluations du risque cardiovasculaire : des grilles en évolution

Plusieurs grilles ou scores diagnostiques ont été mis au point ces dernières décennies. Leur objectif est en général :

- Soit de déterminer le risque de développer une pathologie cardiovasculaire
- Soit de déterminer un risque de mortalité.

Les versions de ces algorithmes prédictifs évoluent avec le temps et de nouvelles versions remplacent régulièrement les anciennes.

##### 1. Grille SCORE2 et SCORE2-OP

L'outil SCORE2 (Systematic Coronary Risk Evaluation 2) est un algorithme évaluant le risque de développer une MCV (mortelle et non mortelle) sur 10 ans chez les personnes sans antécédents de MCV ou de diabète, âgées de 40 à 69 ans en Europe. Cette grille utilise des modèles de prédictions utilisant 45 cohortes dans 13 pays (plus de 650.000 personnes représentant un peu plus de 30.000 événements cardiovasculaires) (11).

Les événements cardiovasculaires ne sont ici plus restreints aux événements cardiovasculaires les plus graves que sont les syndromes coronariens, mais élargies aux événements cérébrovasculaires, cardiomyopathies ischémiques, arythmies, etc...

S'agissant d'établir un risque chez des personnes sans antécédent personnel de MCV, cette grille a pour stratégie la prévention primaire. Il s'agit de modèles mathématiques et statistiques complexes pour estimer un risque cardiovasculaire chez des adultes apparemment en bonne santé. Si l'ancienne grille SCORE1 était régulièrement modifiée pour convenir à la population d'un pays en particulier (12), et se basait sur des bases de données trop anciennes (jusqu'aux années 1970), la nouvelle grille SCORE2 datant de 2021 s'adapte d'elle-même aux pays européens. En effet, quatre régions à risque en Europe ont été définies en fonction de la mortalité par MCV. (Annexe 1).

Les pays ont été regroupés en quatre régions à risque en fonction de leurs taux de mortalité globaux par MCV normalisés selon l'âge et le sexe les plus récemment signalés par l'OMS (année de référence pour la France : 2014). A noter que la France est classée en tant que pays à « faible risque ».

Les critères pris en compte sont (Annexe 2) :

- La mesure de la pression artérielle systolique
- Le sexe
- L'âge
- Le tabagisme
- Le non-HDL cholestérol

L'objectif de cette grille est avant tout pédagogique ; les patients peuvent voir qu'en arrêtant de fumer ou qu'en stabilisant leur dyslipidémie, leur risque diminue. Mais cette grille peut aussi conditionner la mise sous traitement. Le modèle de mise sous traitement est d'ailleurs plus efficient que sur l'ancienne grille SCORE1, avec laquelle les personnes plus âgées étaient « surtraitées » (13).

Cette grille SCORE2 est celle recommandée par l'ESC depuis 2021 et précise que les différentes catégories de risque ne sont pas automatiquement reliées à une mise sous traitement médicamenteux. En effet, si le risque est faible, la prise en charge sera pédagogique avec modification de l'hygiène de vie. Pour les autres catégories de risque, l'introduction d'un traitement médicamenteux doit se faire en tenant compte des autres facteurs de risque cardiovasculaires non pris en compte par la grille SCORE2, des comorbidités ainsi que de la décision du patient lui-même.

La grille SCORE2-OP (Older persons) a été dérivée de l'étude CONOR , une collection de données sur la santé et d'échantillons de sang provenant de plusieurs études, et a pour but d'améliorer la précision de l'appréciation du risque chez les personnes âgées et d'élever l'âge maximum d'évaluation du risque à 89 ans (nouvelles catégories de 70 à 89 ans) (14).

Bien qu'améliorant nettement la prise en charge des MCV, la nouvelle grille SCORE-2 n'est certainement qu'une étape et n'est pas définitive. En effet, cette approche nécessite de poser

l'hypothèse que les risques relatifs obtenus dans l'ensemble des données sont transférables entre différentes populations d'un même pays. Ceci n'est pas ce qui est observé en pratique avec des habitudes de vie et des taux d'incidence plus faibles dans certaines régions d'un même, voire de régions englobant plusieurs pays (exemple : bordure Méditerranéenne possédant un taux de MCV bien plus bas que le Nord de la France et de l'Italie).

Une autre limite est que l'outil SCORE-2 n'a pas pris en compte lors de son évaluation les patients déjà sous traitement de prévention cardiovasculaire, ce modèle de risque pourrait avoir sous-estimé le risque de MCV (15).

## 2. Score PROCAM/GSLA

Le score PROCAM (depuis 2002) a été établi sur la base de l'étude allemande PROCAM faite à Münster auprès de 5 389 hommes de 35 à 65 ans. L'addition des points attribués à chaque facteur de risque définit les 3 catégories de risque (à sa création) d'évènement coronarien mortel ou non à 10 ans :

- Bas (< 10 %)
- Intermédiaire (10-20 %)
- Élevé (> 20%)

Il a été postulé, sans être confirmé, que le risque des femmes ménopausées est identique à celui des hommes du même âge, ce risque étant divisé par 4 avant la ménopause (15). Le GSLA (Groupe Suisse Lipides et Athérosclérose) a proposé une modification de ce score afin qu'il s'adapte à la population suisse. Dans la littérature et en pratique en France, les outils SCORE-2 et PROCAM/GSLA sont souvent comparés.

Ce score prend en compte plusieurs critères :

- L'âge
- Le sexe
- La pression artérielle systolique
- Les taux de LDL et HDL cholestérol
- Le taux de triglycérides
- Le tabagisme
- Les antécédents familiaux d'infarctus du myocarde (parents, grands-parents ou frères et sœurs avant 60 ans).

Certaines maladies conditionnent d'emblée à une catégorie de risque (antécédent personnel de maladie cardiovasculaire, diabète, maladie rénale chronique et hypercholestérolémie familiale). Ce score promeut donc à la fois la prévention primaire et secondaire de survenue d'un événement coronarien mortel ou d'un infarctus du myocarde non mortel sur 10 ans (16). Ceci avec 4 catégories de risque en fonction du pourcentage de risque absolu (faible, modéré, élevée et très élevée). A noter que seules certaines pathologies font entrer un(e) patient(e) dans la catégorie « très élevée ».

	Risque très élevé	Risque élevé	Risque modéré	Risque faible
<b>SCORE2/ SCORE2- OP</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Age &lt; 50 ans : ≥ 7.5 %</li> <li>Age 50–69 ans : ≥ 10 %</li> <li>Age ≥ 70 ans : ≥ 15 %</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Age &lt; 50 ans : 2.5 % à 7.5 %</li> <li>Age 50–69 ans : 5 % à 10 %</li> <li>Age ≥ 70 ans : 7.5 % à 15 %</li> </ul>		<ul style="list-style-type: none"> <li>Age &lt; 50 ans : &lt; 2.5 %</li> <li>Age 50–69 ans : &lt; 5 %</li> <li>Age ≥ 70 ans : &lt;7.5 %</li> </ul>
<b>Score PROCA M/GSLA</b>	Réservé aux patients avec certaines comorbidités, pas de calcul de risque absolu. Mise sous traitement et surveillance accrue.	>20%	10-20%	<10%

Tableau 2: Risque absolu de subir un événement cardiovasculaire (fatal ou non) sur 10 ans selon les 2 tables SCORE2 et PROCAM modifié, selon l'AGLA/GSLA

Bien que ces deux scores aient une méthodologie différente et que l'algorithme GSA soit plus complet, en l'absence d'algorithme PROCAM détaillé à l'échelle européenne, c'est l'outil SCORE2 qui est utilisé en pratique et recommandé par l'ESC. En effet, les critères du GSLA comme le diabète ou les antécédents personnels sont déjà très bien connus des cliniciens et ne nécessite pas d'être pleinement intégré au score.

### 3. Avènement des outils d'intelligence artificielle

L'évaluation du risque cardiovasculaire (RCV) étant complexe, des outils utilisant l'intelligence artificielle font surface pour prendre en compte des paramètres plus complexes dans des scores très élaborés.

Actuellement, l'étude suédoise SCAPIS, présentée à l'AHA en 2020, utilise une combinaison des données du scanner coronaire à l'intelligence artificielle pour améliorer la prévention primaire. L'objectif est de développer un modèle prédictif de la présence d'un athérome coronaire important défini par au moins quatre segments artériels avec plaque coronarienne au coroscanner (17,18).

On retrouve aussi une étude américaine montrant qu'il est possible de prédire le risque cardiovasculaire en analysant des images de rétine grâce à une intelligence artificielle capable d'observer et de quantifier des associations de clichés difficiles à interpréter. En effet, cette étude a notamment permis de quantifier certaines caractéristiques uniquement avec des fonds rétiniens (âge, sexe, tabagisme, pression artérielle,...) grâce à l'analyse des caractéristiques du fonctionnement des récepteurs rétiniens et de la rétine de chaque patient (19).

Enfin, *Leite at al* ont proposé en 2022 un simple dosage ultra-sensible de troponine cardiaque. Celle-ci étant désormais détectable et quantifiable chez le patient sain (plus de la moitié de la population générale possède une troponine plasmatique détectable). En effet, certaines valeurs en dessous du 99<sup>ème</sup> percentile couplé au RCV global du patient seraient associées à une prise en charge plus poussée.

On peut imaginer qu'à l'avenir une analyse précise de la variation du taux de troponine dosée régulièrement par une intelligence artificielle permettrait une prévention primaire du RCV (cTnI et cTnT) et un suivi rapproché des patients traités (études en cours pour la cTnI) (20).

### **III. Marqueurs biologiques**

On a pu voir précédemment que les MCV voyaient leur diagnostic et leur suivi évoluer avec une apparition d'outils de pointe avec une nécessité permanente d'amélioration en particulier concernant la spécificité des outils.

Les dernières recommandations concernant la prise en charge globale des MCV ont été émises en 2005 par l'AFSSAPS (ex ANSM), elles restent pertinentes mais ont malgré tout ont été améliorées grâce aux différents travaux réalisés depuis cette date.

Les recommandations concernant l'utilisation de marqueurs biologiques dans les MCV chez les sujets à risque plaident pour (21) :

- L'utilisation du dosage de la troponine dans la prise en charge initiale des patients avec suspicion de SCA.
- L'utilisation du dosage de peptides natriurétiques dans l'insuffisance cardiaque

- L'utilisation du dosage de l'ApoB (Apolipoprotéine B) dans l'estimation du risque et le suivi des patients présentant des troubles métaboliques (reflète la quantité totale de particules athérogènes), remplacée en pratique par le non-HDL cholestérol.
- L'utilisation du dosage de la CRP pour mieux orienter les patients à risque intermédiaire.

## A. Les troponines

Concernant l'utilisation du dosage des troponines (1990), le consensus recommande préférentiellement le dosage de celles à tropisme cardiaque ; leur augmentation faisant partie intégrante de la définition de l'IDM (22). L'objectif de ces marqueurs est de détecter une nécrose myocardique ; sachant qu'il n'existe à ce jour pas de marqueur spécifique d'ischémie.

Le dosage de la troponine fait partie de nombreux scores diagnostics différents (TIMI, GRACE, HEART score, Vancouver Chest Pain Rule).

La troponine augmente considérablement dans les 4 à 10 heures après le début de l'IDM (23), mais une augmentation significative peut être enregistrée dès la deuxième heure avec les nouvelles générations de troponine ultrasensible.

Il existe 3 isoformes de troponine, qui interviennent dans la régulation de la contraction myocardique en tant que protéines structurelles du système contractile du myocarde, et qui constituent un complexe macromoléculaire avec l'actine et la tropomyosine. Les 3 isoformes sont les troponines T, I et C. Cette dernière est commune à tous les muscles striés et n'a pas d'intérêt de dosage en cardiologie.

La grande spécificité et sensibilité des troponine T et I font qu'actuellement elles constituent le gold standard du diagnostic et du pronostic des SCA(24).

La sensibilité diagnostique de la troponine est supérieure à celle des autres marqueurs de la nécrose myocardique. De plus, le dosage de troponine hautement sensible (hs) présente, comparativement au dosage dit « classique », une grande précision analytique (coefficient de variation CV <10 %) au seuil diagnostique (99ème percentile d'une population de référence) . (25).

Actuellement, le dosage de la troponine hautement sensible est effectué sous forme de cinétique avec 2 protocoles principaux (dosage +1h et dosage +2h), une augmentation significative de la concentration de troponine traduit une nécrose des cellules myocardiques, sans pour autant informant sur le mécanisme étiologique.

## B. La myoglobine

La myoglobine est une métalloprotéine formée d'une chaîne de globine et d'une partie héminique. Elle est notamment présente dans le cytoplasme des cellules myocardiques et assure un stockage du dioxygène dans le muscle. Ainsi, une lyse des cellules myocardiques entraîne une libération de myoglobine.

Elle constitue un des marqueurs biologiques de nécrose cardiaque et est utilisée pour sa précocité en cas d'IDM. En effet, il s'agit d'un des premiers marqueurs biologiques à se positiver, cependant elle reste peu spécifique vis-à-vis du muscle cardiaque, et son usage n'est plus guère réservé qu'au diagnostic de rhabdomyolyse (26).

## C. La CK-MB massique

La CK-MB (Créatine-kinase Muscular Brain) est d'une enzyme catalysant la réaction de phosphorylation de la créatine par l'ATP. Elle est formée d'un dimère de 2 sous-unités (muscle et cerveau). Il existe 3 isoformes dont l'ensemble constitue ce que l'on appelle les CK totale ou CPK.

Les isoformes sont les suivant :

- Isoforme MM (M pour muscle) est caractéristique du muscle strié
- Isoforme BB (B pour brain) caractéristique du cerveau
- Isoforme mixte MB

L'isoforme MB est la plus spécifique du muscle cardiaque car intervient dans la contraction musculaire du muscle strié, en particulier le myocarde (27).

Son utilité dans la détection de nécrose myocardique réside dans sa spécificité. Elle est utilisée pour déceler les récurrences précoces d'IDM. Elle peut également être utile en cas de suspicion de faux positif ou de faux négatif concernant l'élévation de la concentration en troponines.

Le dosage de la CK-MB est préférable à celui de la CK totale en raison de sa spécificité myocardique supérieure. Le calcul du rapport CK-MB/CK est celui orientant le plus vers une origine cardiaque. Cependant, ce marqueur n'est pas le plus cardiospécifique et peut se positiver lors de situations physiopathologiques variées (cancer, embolie pulmonaire, hypothyroïdie, insuffisance rénale et traumatisme musculaire) (27).

#### D. Les facteurs natriurétiques

Le BNP (Brain Natriuretic Peptide) est un peptide principalement synthétisé par les myocytes des ventricules, en particulier le ventricule gauche. Il est synthétisé en réponse à une surcharge volumique.

Lors de sa synthèse, son précurseur (le préproBNP) est clivé en pro-BNP, lui-même clivé en NT-proBNP (N-Terminal proBNP) qui est biologiquement inactif et en BNP (Figure 4). La production du BNP et du NT pro BNP est donc équimolaire (28). Le BNP est la forme active du peptide, qui en se fixant sur son récepteur, induit des effets diurétiques et vasodilatateurs. Le NT-proBNP n'a aucune action connue.

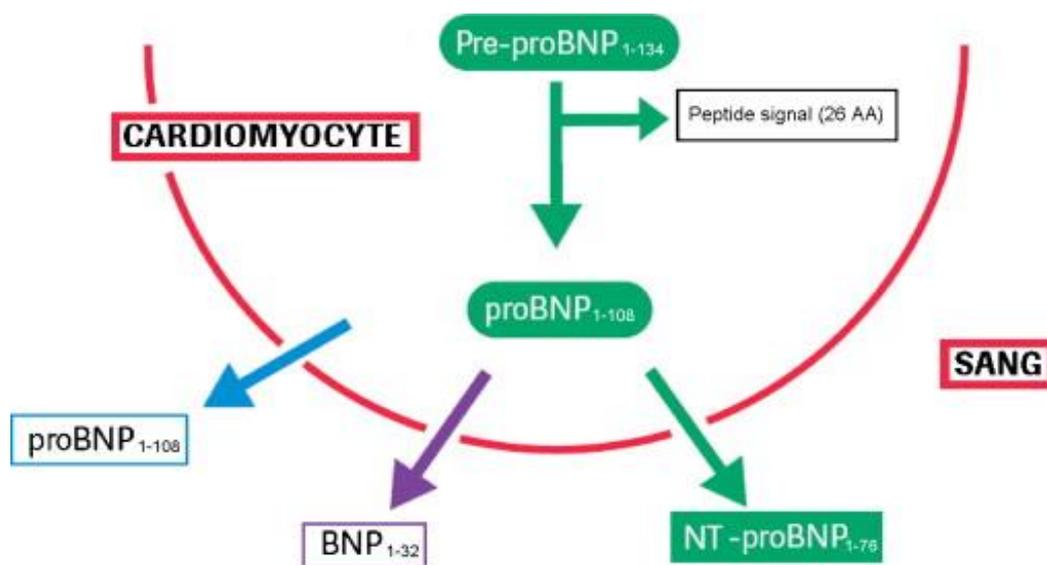


Figure 4: Schématisation simplifiée de la synthèse du NT-proBNP (29)

Le dosage du BNP est souvent préférable, bien que le NT-proBNP soit plus stable, car a un poids moléculaire plus petit, et est donc moins sensible à la fonction rénale. Le NT-proBNP augmente en concentration lors de l'insuffisance rénale sévère même en dehors de toute insuffisance cardiaque. Le dosage du NT-proBNP peut toutefois être recommandé dans des cas spécifique, comme pour le suivi des patients traités par des médicaments contenant un inhibiteur de l'endopeptidase neutre (Entresto®), cette enzyme faisant partie de la dégradation du BNP ; ou encore lorsque le délai d'acheminement du prélèvement au laboratoire est long.

Ce marqueur est utilisé dans le diagnostic de l'insuffisance cardiaque (30). En effet, il existe une corrélation entre les concentrations en facteurs natriurétiques et la fraction d'éjection d'une part et le pronostic d'autre part. Selon la société européenne de cardiologie, en présence de signes cliniques évoquant une IC, il convient de rechercher le plus tôt possible la présence d'une cardiopathie par un ECG, une radiographie de thorax ou le dosage de peptides natriurétiques (BNP ou NT-pro-BNP). Il est intéressant de mentionner que le dosage de ces facteurs possède une grande valeur prédictive négative pour l'insuffisance cardiaque chronique (28).

## E. La copeptine

La copeptine constitue la partie C-terminale de l'hormone pro-arginine vasopressine, sécrétée par la neurohypophyse et l'hypothalamus. Si sa fonction précise n'est pas encore connue, elle était utilisée dans le diagnostic de l'IDM car sa production répond à un stress en particulier le stress lié à la douleur thoracique. Elle possède une très bonne sensibilité et une augmentation dans le sang extrêmement précoce. Cette caractéristique a aussi son pendant négatif : il s'agit d'un marqueur non spécifique du muscle cardiaque.

Son utilisation dans le cadre cardiovasculaire n'est désormais plus recommandée, cependant des études suggèrent que son utilisation couplée à celle des troponine cardiospécifiques permet de considérablement augmenter la sensibilité (100% à 1h des symptômes, 100% à 2h et 98,5% à 3h avec un seul dosage) par rapport au dosage isolé de l'un ou de l'autre de ces paramètres (31,32).

## F. La Protéine C réactive

La CRP est une protéine produite par le foie en réponse à l'inflammation et est souvent utilisée comme marqueur de l'inflammation dans l'athérosclérose. Des concentrations élevées de CRP ont été associés à un risque accru de maladies cardiovasculaires, y compris l'athérosclérose et la thrombose. Les techniques de dosage de la CRP possédant désormais une méthode dite « Ultrasensible », il est possible de détecter une inflammation même minime grâce à l'amélioration de la sensibilité de la méthode (33). Puisque les mécanismes athérogènes sont associés à une inflammation à bas bruits, il a été montré que le dosage de la CRP ultrasensible était corrélé à l'apparition de complication cardiovasculaire. Plusieurs études s'accordent sur le fait qu'il s'agisse d'un marqueur de risque (34–36).

Bien que l'utilisation de la CRP ultrasensible dans les pathologies cardiovasculaires soit prometteuse pour aider à évaluer le RCV ainsi que pour aider à la prédiction de la réponse thérapeutique de certains traitements utilisés pour réduire ce RDC (notamment l'étude Jupiter avec les statines (34)), elle doit être utilisée en parallèle d'autres indicateurs de risque et son utilisation n'est pas encore généralisée dans ce cadre en pratique courante.

En effet, il est difficile d'intégrer l'utilisation de ce marqueur en pratique clinique puisque son interprétation reste complexe. En effet, les variations en fonction de l'âge, du sexe et d'autres

facteurs de risque cardiovasculaire viennent perturber son interprétation. De plus, il a été montré que le suivi de ce marqueur en cas de traitement anti-inflammatoire n'était pas utile pour suivre une éventuelle protection cardiovasculaire.

Enfin, les plupart des auteurs concluent que l'utilisation de la CRP de haute sensibilité en combinaison avec d'autres marqueurs de risque peut aider à identifier les personnes à haut risque de maladies cardiovasculaires et à guider les décisions de traitement (35,36).

### G. Structure des troponines

Les troponines sont des protéines régulant la contraction cardiaque. Les 3 sous-unités (TnT, TnI et TnC) possèdent des séquences primaires différentes et sont codés par des gènes distincts. Les différences de structure, leur structure active et leur changement de conformation post-phosphorylation lié ou non par le calcium sont tous des mécanismes complexes dont l'explication et l'interprétation demeurent toujours un défi de nos jours.

Au niveau cardiaque, les 3 sous-types de troponines coexistent et son reliées entre elles (37), leur structure moléculaire montre leur rôle de protéines de structure positionnées entre filament d'actine et tropomyosine (Figure 5).

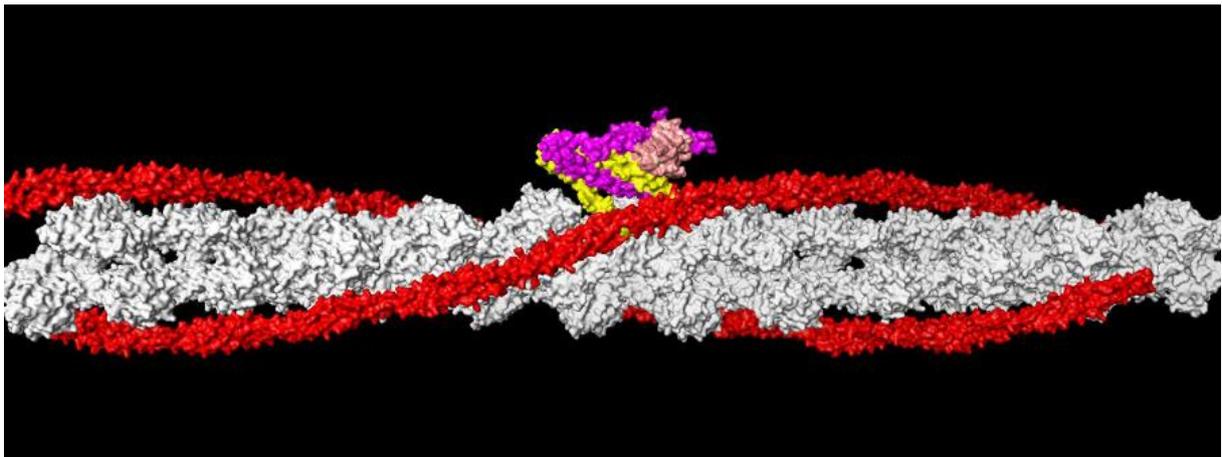


Figure 5: Modèle du filament mince du muscle selon Marston et al. avec l'actine (blanc), la tropomyosine (rouge), TnC (rose), TnI (magenta) et TnT (jaune)

### La troponine C

Elle constitue la sous-unité de détection du calcium, de laquelle elle porte son nom. Elle est contenue dans les muscles squelettiques rapides sous une seule isoforme, ce qui exclut son utilisation en cardiologie. Son poids moléculaire est d'environ 18 kDa et contient neuf hélices  $\alpha$  et quatre sites de fixations aux cations divalents, le plus fréquent étant le  $\text{Ca}^{2+}$ . La première moitié de ces derniers sont des sites dits catalytiques c'est-à-dire de faible affinité pour le  $\text{Ca}^{2+}$  mais avec une haute sélectivité. La seconde moitié est dite structurelle puisque toujours occupée par le calcium dans les conditions physiologiques car constitué par un site de forte affinité. Grâce à son rôle de détecteur de calcium, la troponine C change de conformation et passe d'un état « fermé » à un état « ouvert », la réorientation des hélices entraîne la libération d'un patch hydrophobe qui crée un site de fixation pour la troponine I qui, en présence de calcium cesse son rôle inhibiteur (24).

### La troponine I

Elle est située dans trois tissus musculaires différents chez l'être humain : le tissu cardiaque, le tissu musculaire squelettique à contraction lente et le tissu musculaire squelettique à contraction rapide. L'isoforme cardiaque étant, après la naissance, la seule forme de cTnI présente dans le muscle cardiaque. Cette isoforme est constituée de quatre hélices  $\alpha$  et son poids moléculaire est de 24 kDa.

L'isoforme cardiaque est la seule à exprimer la région NcTnI (région acide associée à un résidu proline pouvant former une courte hélice  $\alpha$  instable). Avec une forte concentration en  $\text{Ca}^{2+}$ , le patch hydrophobe formé grâce à la cTnC va interagir avec le peptide de commutation de la cTnI, qui est une zone proche du domaine C-terminal. L'interaction du domaine régulateur avec cTnC conduit à la dissociation du domaine inhibiteur cTnI de l'actine et au déplacement de la tropomyosine qui permet la formation du complexe actine-myosine (38). A l'inverse, des concentrations faibles de calcium vont permettre à la cTnI de rester en conformation dite inhibitrice en maintenant l'actine et la myosine dissociées l'une de l'autre.

## La troponine T

Il s'agit de la plus lourde des trois isoformes. Son rôle est principalement structurel via le maintien du complexe des troponines à la surface du filament musculaire mince. Elle existe, tout comme la cTnI, sous plusieurs isoformes : cardiaque, musculaire squelettique à contraction lente ou rapide. La troponine T3 est l'isoforme la plus répandue dans le muscle cardiaque et son poids moléculaire est de 36 kDa. La majorité de sa structure est liée à la tropomyosine (39). In vivo, le complexe des troponines est totalement intégré au filament mince d'actine (Figure 6), c'est-à-dire associé avec la tropomyosine, leur interaction avec le  $\text{Ca}^{2+}$  est à la base de la contraction musculaire.

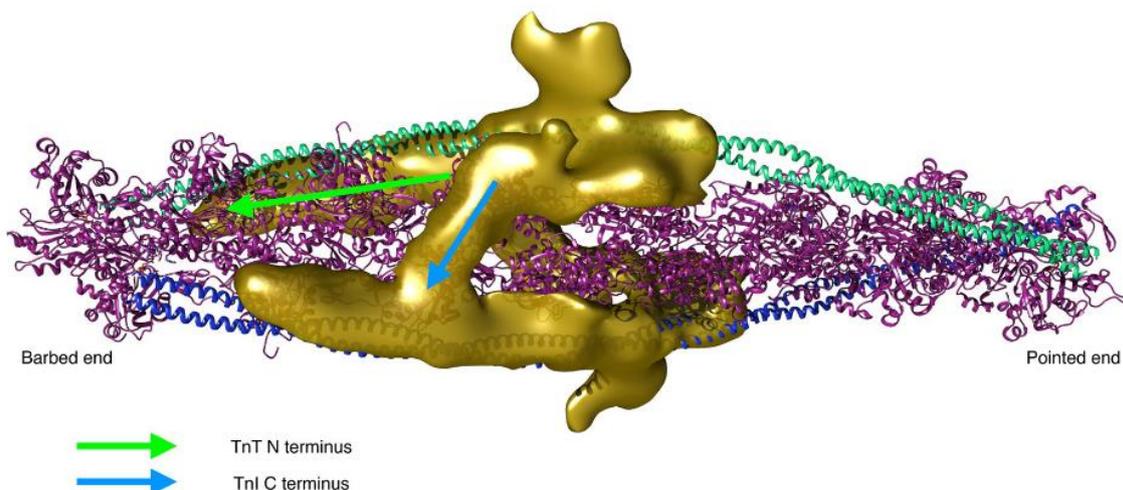


Figure 6: Modèle en trois dimensions du complexe troponines (densité électronique calculée en jaune) du filament fin (deux monomères de tropomyosine en bleu sur un noyau de monomère d'actine en magenta) (40)

En résumé, les troponines cardiaques I (cTnI) et T (cTnT) sont des composants de l'appareil contractile des cellules myocardiques et sont exprimés presque exclusivement dans le cœur. Aucune augmentation des valeurs de cTnI n'a été signalée après une lésion des tissus non cardiaques. La situation est plus complexe pour la cTnT. Les données biochimiques indiquent que le muscle squelettique lésé exprime des protéines qui sont détectées par le test cTnT,

conduisant à certaines situations où des élévations de cTnT pourraient provenir du muscle squelettique (41).

## H. Les différentes mesures et sensibilités de dosage

Le dosage de la troponine cardiaque est, depuis les années 1990, d'une importance capitale pour le diagnostic d'IDM et plus généralement, de nécrose myocardique. Cinq générations de dosages se sont succédé depuis 1990, allant d'un dosage dit « conventionnel » jusqu'à un dosage de haute sensibilité.

La triade diagnostic des patients suspects de SCA est composée de signes cliniques (principalement douleur thoracique), de l'ECG (à 12 dérivations) et du dosage de la troponine cardiaque (I ou T).

En se focalisant sur le dosage et l'utilisation de la troponine cardiaque, nous pouvons observer depuis les années 1990, une nécessité d'affiner les techniques de dosage ainsi que d'en améliorer sa sensibilité dans le diagnostic de l'IDM, et plus généralement dans le diagnostic des pathologies associées à une nécrose cardiaque.

La première génération de dosage utilisait la technique de dosage radio-immunologique qui reste une technique sensible et fiable ; alors que la 5<sup>ème</sup> génération utilise plusieurs variantes d'immuno-luminescence.

La technique utilisée en routine lors des essais de ce travail est l'immuno-electro-chimio-luminescence sur appareil ROCHE, utilisant le ruthénium comme moyen de révélation (Figure 7).

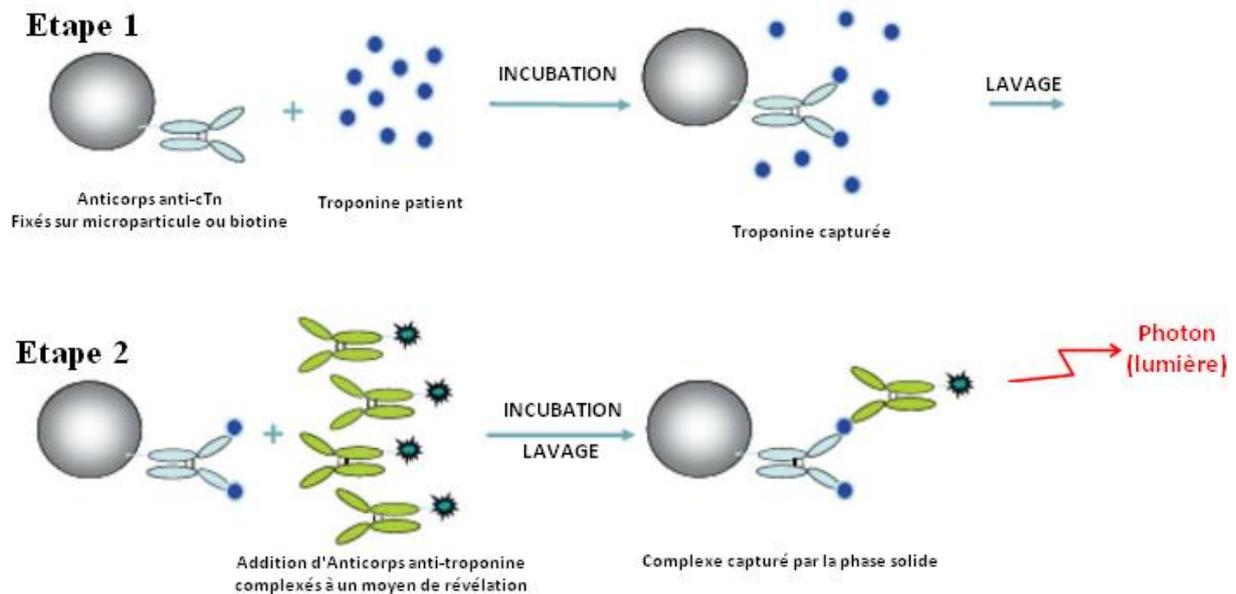


Figure 7: Principe général du dosage de troponine US

La dernière génération permettant le dosage (5<sup>ème</sup> génération, dite « ultrasensible » US ou « hautement sensible » HS) permet une meilleure précision du diagnostic des patients souffrants de douleurs thoracique (42). En effet, les générations de dosage précédentes n'étaient capables de détecter que les malades alors que le dosage US est capable de quantifier la troponine chez les sujets sains (43). Ceci améliore grandement la sensibilité et l'utilité d'un tel dosage dans un service d'urgence par exemple (Figure 8). De plus, les nouvelles générations de dosage permettent un coefficient de variation intra-essai de moins de 10%, ce qui participe à diminuer grandement les zones grises peu-interprétables.

Il est important de noter que, même si les performances des nouvelles techniques de dosage de la troponine sont excellentes, il persiste des erreurs analytiques. Les plus fréquentes étant :

- Hémolyse pouvant produire des résultats faussement négatifs
- Supplément de biotine (utilisé dans certains compléments alimentaire et parfois utilisé dans la sclérose en plaque) : interférant directement avec la biotine de la technique de dosage et provoquant des résultats faussement négatifs

- La présence en grande quantité d'anticorps (maladie auto-immune, choc septique ...) pouvant provoquant toute forme de résultat de dosage (positif ou négatif)
- Lésions importantes du muscle squelettique provoquant la libération en masse de troponine squelettique. Cette dernière peut être confondue avec l'isoforme cardiaque par certains kits de dosage, principalement la cTnT.(20)

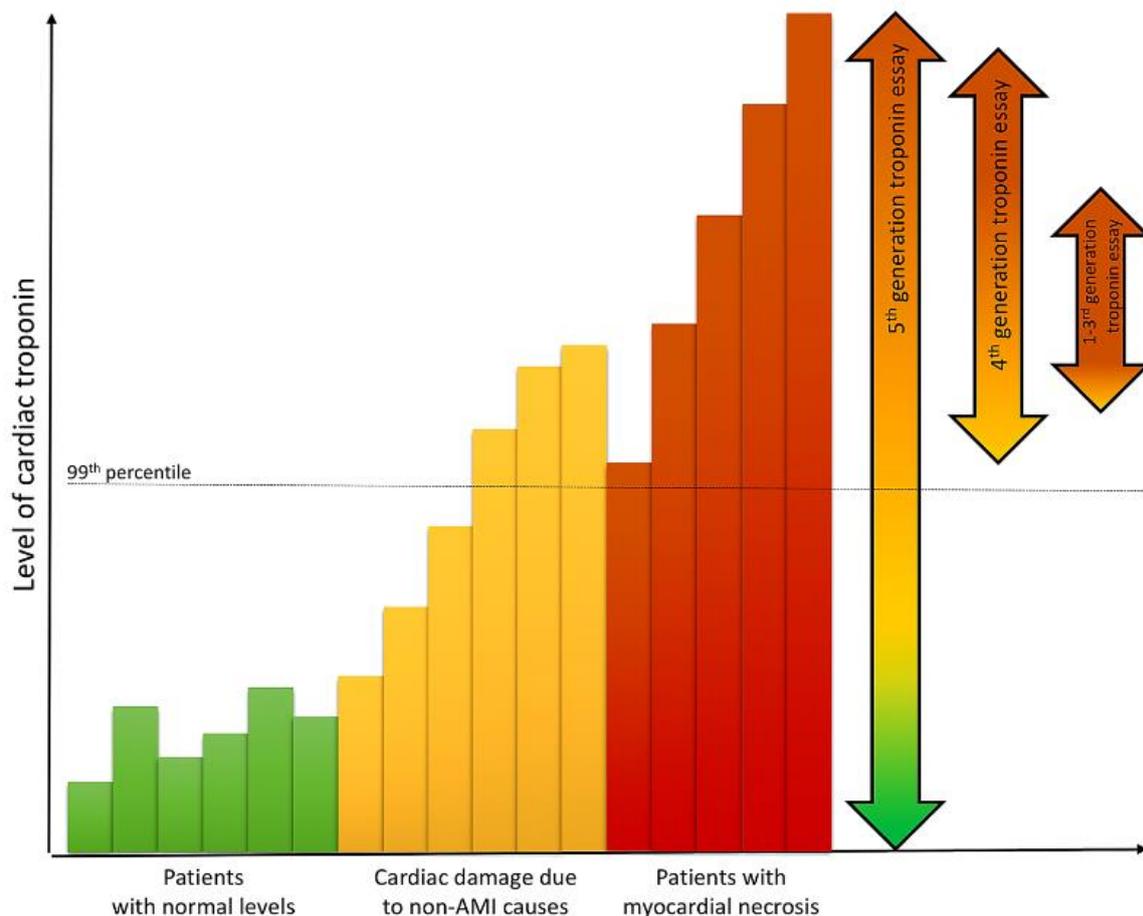


Figure 8: Plage de détection de la troponine en fonction de groupes de patients de diagnostic précisément connu selon les générations de dosage (vert : patient sain, orange : libération cytosolique induite par ischémie ou micro-nécrose, rouge : nécrose myocardique étendue)(44)

Le seuil utilisé est le 99<sup>ème</sup> percentile d'une répartition gaussienne de patients sains. Cette valeur dépend de la technique précise de dosage de troponine US utilisée et des séries de tests réalisées par le fabricant, même si la réalisation de tests supplémentaires par les services de biologie médicale reste recommandée.

La valeur prédictive négative (VPN) des tests de troponine US est de 95% sur une valeur, et atteint 100% en cyclant son dosage toutes les 3h (45). L'utilisation de cette technique permet donc l'exclusion précoce de l'IDM.

La valeur prédictive positive (VPP) en un seul dosage est cependant moins performante puisque, même si rarement évoqué en clinique, il existe plusieurs situations non-ischémiques d'élévation de la troponine (insuffisance cardiaque congestive, hypertrophie ventriculaire gauche, Tako-tsubo, bactériémie,...). Enfin il faut signaler qu'en dehors de la nécrose myocardique, il existe une sécrétion naturelle de troponine dans le sang, un turn-over. En effet les concentrations en troponines sont 40% supérieures dans le sinus coronaire, qui draine le retour veineux du ventricule gauche, par rapport au sang périphérique. Cela sous-entend un relargage de troponine par le ventricule gauche dans le sang veineux du sinus, et ceci en dehors de toute nécrose myocardique (46). De cette façon, le volume du ventricule gauche pourrait intervenir dans les valeurs de troponine, même en dehors de toute nécrose ; les « gros cœurs » ayant tendance à avoir une concentration en troponine de base plus élevée que les cœurs au volume normal.

La notion de « vrai faux positif » (VFP) et « faux faux positif » (FFP) est importante à prendre en compte. Les VFP sont des patients pour lesquels un dosage de troponine ultrasensible est faussement élevé, dû à des interférences de type immunocomplexe qui peuvent croiser avec la réaction de dosage ; les maladies auto-immunes étant la principale cause (47). Les FFP sont reliés à des situations pour lesquelles il existe une réelle augmentation de la concentration en troponine sans relation avec une ischémie coronaire (myocardite, insuffisance cardiaque sévère, insuffisance rénale).

La VPP du dosage de la troponine étant bien inférieure à sa VPN, cela explique pourquoi une troponine positive n'a pas la même valeur chez un patient à bas risque cardiovasculaire que chez un coronarien connu (48). En effet, une élévation de la troponine à 3 fois le 99<sup>ème</sup> percentile offre une VPP entre 50 et 65% contre 90% à 5 fois ce cut-off.

Bien que ces tests soient hautement sensibles, il reste moins spécifique de l'IDM lorsqu'on utilise le 99<sup>ème</sup> percentile comme seul seuil (49). C'est pour cela que, comme nous le verrons

plus tard, une valeur négative de troponine cardiaque possède un intérêt clinique conséquent. De plus, comme signalé précédemment, il a été décrit que d'autres pathologies cardiaques peuvent aboutir à une élévation de la troponine telles que la myocardite ou la cardiomyopathie de Tako-tsubo.

## I. Protocoles actuellement retenus par l'ESC pour le diagnostic

Les directives de l'ESC se reposent sur leur propre définition de l'IDM et de l'ischémie cardiaque. Si les premières générations de troponine nécessitaient un laps de temps long pour un cyclage (6 heures), les techniques de 5<sup>èmes</sup> générations ne nécessitent que 3 heures maximum.

Il est important de savoir qu'en cas de non-augmentation de la troponine cardiaque entre deux cycles, à partir d'une valeur de base supérieure au 99<sup>ème</sup> percentile, la cause la plus fréquente de cette élévation chronique de troponine est représentée par une cardiopathie dite structurelle (valvulopathie et malformation des grands vaisseaux, insuffisance cardiaque congestive...). Dans ce dernier cas, une augmentation de l'épaisseur de la paroi ventriculaire provoque une atteinte directe des filaments myofibrillaires et une augmentation de l'apoptose, qui contribue à la libération de troponine.

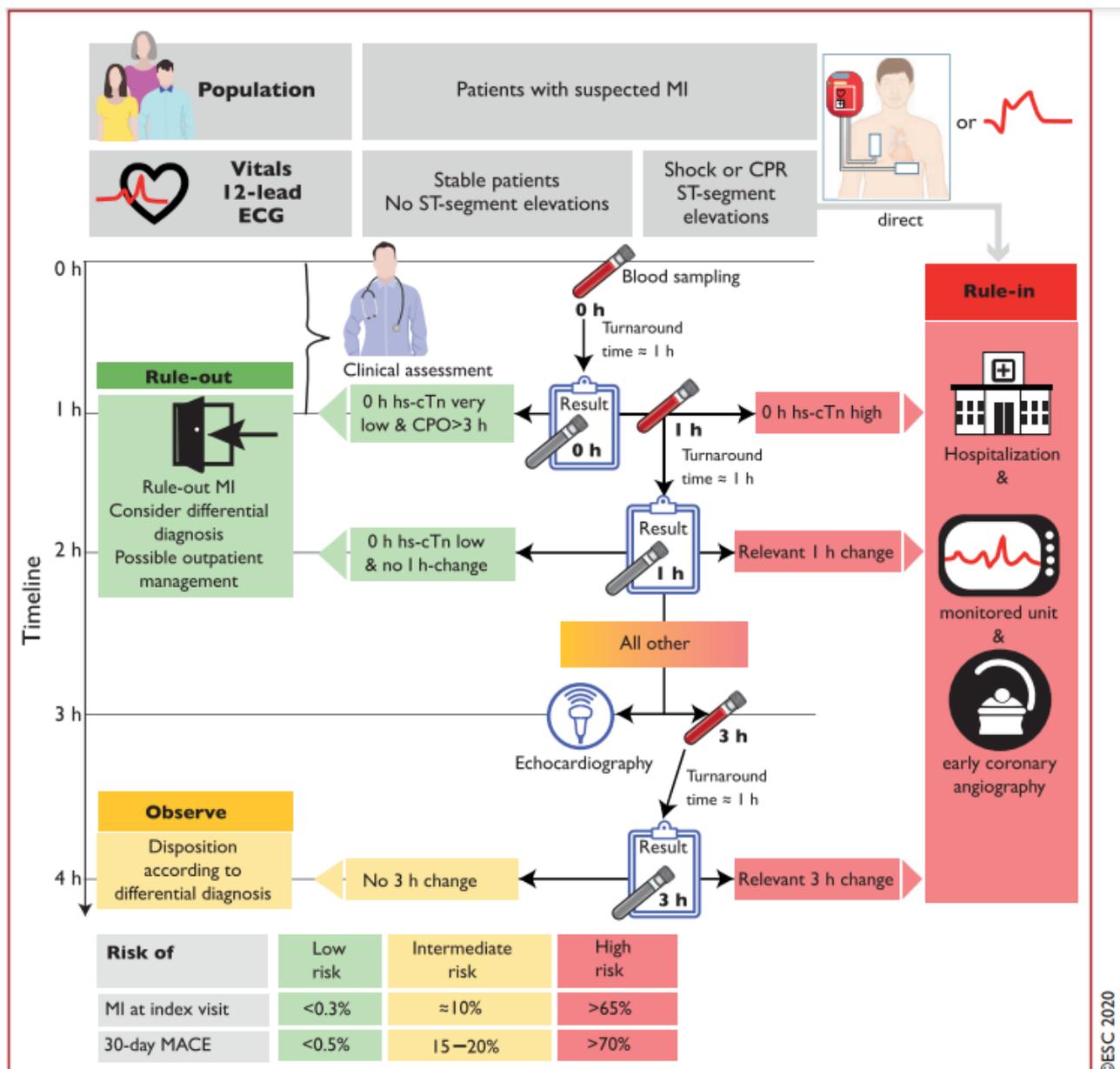


Figure 9: Recommandations de prise en charge avec l'algorithme 0h/1h, selon l'ESC 2020.

Les recommandations de l'ESC concernant l'utilisation du dosage de troponines cardiaques sont décrites avec un système d'inclusion (« Rule-in ») et d'exclusion (« Rule-out ») décrits dans la Figure 9. Cette prise en charge est clinico-biologique. En effet, les patients présentant directement des signes cliniques francs et un décalage ST à l'ECG seront d'office pris en charge (hospitalisation, monitoring et coronarographie). D'après l'ESC 2020, l'intérêt principal du dosage biologique de la troponine cardiaque US est de ne rater aucun patient nécessitant un « Rule-in ». Celle-ci est particulièrement utile lorsqu'il y a un doute à l'ECG (voire un « NSTEMI », Non ST Elevation Myocardial Infarction) ou des formes infracliniques de l'IDM.

Lorsqu'une telle situation se présente, trois dosages de troponine cardiaque peuvent être réalisés (0h, +1h, +2h). Néanmoins, l'algorithme 0h/1h ci-dessus fait référence pour le diagnostic des NSTEMI. D'après l'ESC 2020, dans 75% des cas un seul dosage de troponine suffit pour l'inclusion des patients. Cet algorithme permet de prendre en charge la quasi-totalité des patients se présentant aux urgences pour une suspicion d'IDM.

Une table des seuils critiques pour chaque méthode de dosage et est fournie (Tableau 3). Ainsi une première valeur très basse de troponine à l'entrée du patient permet d'écarter un IDM alors qu'une valeur dite haute permet d'inclure le patient dans le circuit d'hospitalisation. Si la valeur obtenue n'est pas dans ces bornes d'inclusion/exclusion, un cycle doit être réalisé avec un redosage à t+1h. C'est alors les différences de concentration de troponines qui seront prises en compte. Si le prélèvement à t+1h n'est pas réalisable, il doit être annulé et remplacé par un dosage à t+2h dont les valeurs critiques sont aussi décrites dans le Tableau 3.

On peut remarquer que, même s'il possède la meilleure VPN, le dosage en t+3h n'a plus vocation à être utilisé en pratique puisqu'il ne permet plus de maximiser les chances de prise en charge rapide devant l'urgence que constitue un IDM. Les patients qui ne sont pas éligibles pour l'« exclusion » ou l'« inclusion » sont assignés à l'observation. Ils représentent un groupe hétérogène qui nécessite généralement une troisième mesure de la troponine cardiaque à 3 h et une échocardiographie.

<b>0 h/1 h algorithm</b>	<b>Very low</b>	<b>Low</b>	<b>No 1hΔ</b>	<b>High</b>	<b>1hΔ</b>
hs-cTn T (Elecsys; Roche)	<5	<12	<3	≥52	≥5
hs-cTn I (Architect; Abbott)	<4	<5	<2	≥64	≥6
hs-cTn I (Centaur; Siemens)	<3	<6	<3	≥120	≥12
hs-cTn I (Access; Beckman Coulter)	<4	<5	<4	≥50	≥15
hs-cTn I (Clarity; Singulex)	<1	<2	<1	≥30	≥6
hs-cTn I (Vitros; Clinical Diagnostics)	<1	<2	<1	≥40	≥4
hs-cTn I (Pathfast; LSI Medience)	<3	<4	<3	≥90	≥20
hs-cTn I (TriageTrue; Quidel)	<4	<5	<3	≥60	≥8
<b>0 h/2 h algorithm</b>	<b>Very low</b>	<b>Low</b>	<b>No 2hΔ</b>	<b>High</b>	<b>2hΔ</b>
hs-cTn T (Elecsys; Roche)	<5	<14	<4	≥52	≥10
hs-cTn I (Architect; Abbott)	<4	<6	<2	≥64	≥15
hs-cTn I (Centaur; Siemens)	<3	<8	<7	≥120	≥20
hs-cTn I (Access; Beckman Coulter)	<4	<5	<5	≥50	≥20
hs-cTn I (Clarity; Singulex)	<1	TBD	TBD	≥30	TBD
hs-cTn I (Vitros; Clinical Diagnostics)	<1	TBD	TBD	≥40	TBD
hs-cTn I (Pathfast; LSI Medience)	<3	TBD	TBD	≥90	TBD
hs-cTn I (TriageTrue; Quidel)	<4	TBD	TBD	≥60	TBD

Tableau 3: Cut off des troponines US selon la technique de mesure, pour utiliser l'algorithme H0/H1 et H0/H2 (TBD : To Be Determined)

Il est important de préciser que, si ces recommandations, à travers un algorithme décisionnel, permettent de distinguer les patients atteints d'IDM de ceux atteints d'autres pathologies non-coronariennes, il ne permet pas de distinguer les IDM de type 1 et de type 2. La plupart des études montrent d'ailleurs une très bonne performance de l'algorithme de prise en charge en regroupant ces deux types d'IDM (50). Le protocole h0/h1 fait référence pour le diagnostic d'IDM et peut en cas de nécessité être confirmé voire remplacé par un contrôle à h2. Le dosage à h3 est passé du statut de test recommandé à test « à considérer » par l'ESC 2020 du fait de la haute performance des protocoles plus courts grâce à la généralisation des dosages de dernière génération de troponine T et I cardiaques.

Bien que ce protocole différencie parfaitement l'ischémie aiguë de l'ischémie chronique, il doit toujours être utilisé en relation étroite avec l'évaluation clinique, les antécédents du patient, ainsi que l'ECG à 12 dérivations.

#### **IV. Intérêt croissant de l'analyse des vésicules extracellulaires en pathologie humaine**

Au sein de MCV, les exosomes pourraient avoir un intérêt dans le diagnostic d'IDM. Par exemple, le miARN, notamment le miR-451, qui joue un rôle dans la protection des cardiomyocytes contre le stress oxydatif présent à la suite d'un IDM en inhibant l'apoptose induite par l'ischémie. Ce miARN est présent à l'intérieur des exosomes, ces derniers étant des acteurs de la communication intercellulaire (51,52). De plus, les exosomes cultivés dans des conditions d'hypoxie contiennent de la fibronectine et du collagène, ce qui suggère leur participation au réarrangement du cytosquelette et de la matrice extracellulaire, à la suite d'une ischémie (53). Un autre exemple, est qu'en réponse à une hypoxie, les cardiomyocytes produisent du TNF- $\alpha$  qui est une cytokine contribuant activement à l'inflammation et au remodelage cardiaque. Cette cytokine est présente à l'intérieur des exosomes (54).

Nous pouvons donc supposer que la capacité des exosomes à transporter une grande variabilité de molécule, permettrait de fournir une information biologique et instantanée sur l'état du patient, que l'état soit physiologique ou pathologique.

Les études concernant, cette fois, le rôle thérapeutique que peut avoir l'administration d'exosomes, dans différentes situations pathologiques, se succèdent régulièrement depuis la fin des années 2010. L'utilisation des propriétés à la fois immunologiques et clairantes des exosomes ont constitué ces dernières années de grandes avancées, les plus grandes étant retrouvé dans le domaine de la cancérologie et de la cardiologie.

### A. Application à la cancérologie

Lors de la cancérogenèse, le microenvironnement cellulaire joue un rôle capital. La communication entre les cellules cancéreuses nécessite la production d'exosomes pour favoriser la carcinogenèse et réguler la réponse immune. Pour accomplir ces tâches, les exosomes participent au remodelage de la matrice extracellulaire et favorisent l'angiogenèse (55). Leur capacité à transférer de nombreux éléments (micro-ARN, ARNm, protéines...) vers des sites distants favorise l'environnement pro-tumoral et les niches métastatiques. Il a été montré que pour contrecarrer ces phénomènes, d'autres exosomes venant parfois d'autres lignées cellulaires peuvent être utilisés. Par exemple, il a été observé in vitro que des exosomes obtenus via des cellules normales de la prostate, possédant des taux normaux de mi-ARN 16-143 et 205, peuvent inhiber la prolifération des autres cellules de la prostate possédant des taux de mi-ARN plus faibles (56). Outre les mi-ARN, certaines oncoprotéines mutantes sont transportés par les exosomes (KRAS, MET...).

Il a également été montré que les exosomes dérivés d'une tumeur, combinés avec des cytokines et des médiateurs solubles peuvent recruter des cellules de la moelle osseuse vers le site tumoral pour moduler son expansion (57).

En raison de leurs nombreuses fonctions cellulaires, dans le développement et la dissémination des tumeurs, de leur stabilité in vivo ainsi que de leur excellente biodisponibilité dans l'organisme, les exosomes sont actuellement préférées aux autres vésicules extracellulaires dans la recherche de nouveaux marqueurs pronostics et outils thérapeutiques. Ce qui est une porte aux « vaccins anti-cancéreux » mais aussi à d'autres véhicules de transports pour les médicaments anti-cancéreux (58).

## B. Application dans les maladies cardiovasculaires

Concernant le rôle thérapeutique des exosomes en pathologie cardiovasculaire, toutes les études partent du constat que ces vésicules jouent un rôle historiquement connu dans l'élimination des déchets des cellules cardiaques. En effet, il existe une association directe entre les MCV et les concentrations élevées de microvésicules circulantes. Parmi ces dernières, les exosomes ont un impact sur le tonus vasculaire et la paroi des vaisseaux de par leur capacité à transporter et à transférer des protéines, qui sont d'ailleurs modifiées en condition de stress hypoxique (59).

A ce titre, il a été montré que les exosomes dérivés de cellules progénitrices cardiaques protègent les cardiomyocytes du stress oxydatif « in vivo », en inhibant l'apoptose induite par l'ischémie/reperfusion (52). Les exosomes permettent également un relargage local de TNF- $\alpha$  par le cardiomyocyte lui-même, ce qui favorise le remodelage des tissus lésés (54). L'administration d'exosomes ayant un phénotype proche de ceux produits par le muscle cardiaque constituera donc à l'avenir un intérêt thérapeutique certain.

## C. Application lors de la grossesse

Lors d'une grossesse, un équilibre se crée entre le système maternel et le fœtus. En effet, il existe un phénomène de tolérance : le fœtus, bien que semi-allogénique, n'est pas rejeté. Le syncytiotrophoblaste synthétise bien des exosomes, cependant ils sont de tailles variables, ce qui est rarement observé. Habituellement, les exosomes produits par un même environnement cellulaires ne diffèrent pas autant par la taille. Ces exosomes-là jouent un rôle immunosuppresseurs et régulent le système immunitaire de la mère vis-à-vis du fœtus, ils participent à l'immunotolérance de la mère envers le fœtus. Ils ont également des propriétés pro-coagulantes et anti-angiogéniques. Leur utilité dans ce contexte est qu'en condition pathologique (infertilité, fausse couche, pré-éclampsie, hémorragie lors du travail), ils peuvent activer ou inhiber les voies à risque citées. Actuellement, des exosomes récupérés de femmes ayant eu une grossesse normale sont en cours d'étude pour être utilisés en cas de grossesse pathologique (60,61).

## D. Application en maladies infectieuses

Les exosomes sécrétés en réponse à une infection sont impliqués dans de nombreux processus de la biologie de l'infection. Leur utilisation en maladie infectieuse diffère de leurs autres applications. En effet, de nombreux articles de la littérature ont démontré une production d'exosomes par de nombreux agents pathogènes. La production se fait en majorité par des parasites (trématodes et nématodes) et des virus (VIH-1, virus de l'hépatite B et C, EBV, Herpès virus) (62–64) ; mais aussi par certaines bactéries (agents tuberculeux) et champignons (cryptocoque). Les exosomes isolés de cellule infectée, voire de culture d'agent pathogène peuvent donc constituer une base solide pour la conception de nouveaux vaccins dits acellulaires ou de biomarqueur d'infection en cours (58).

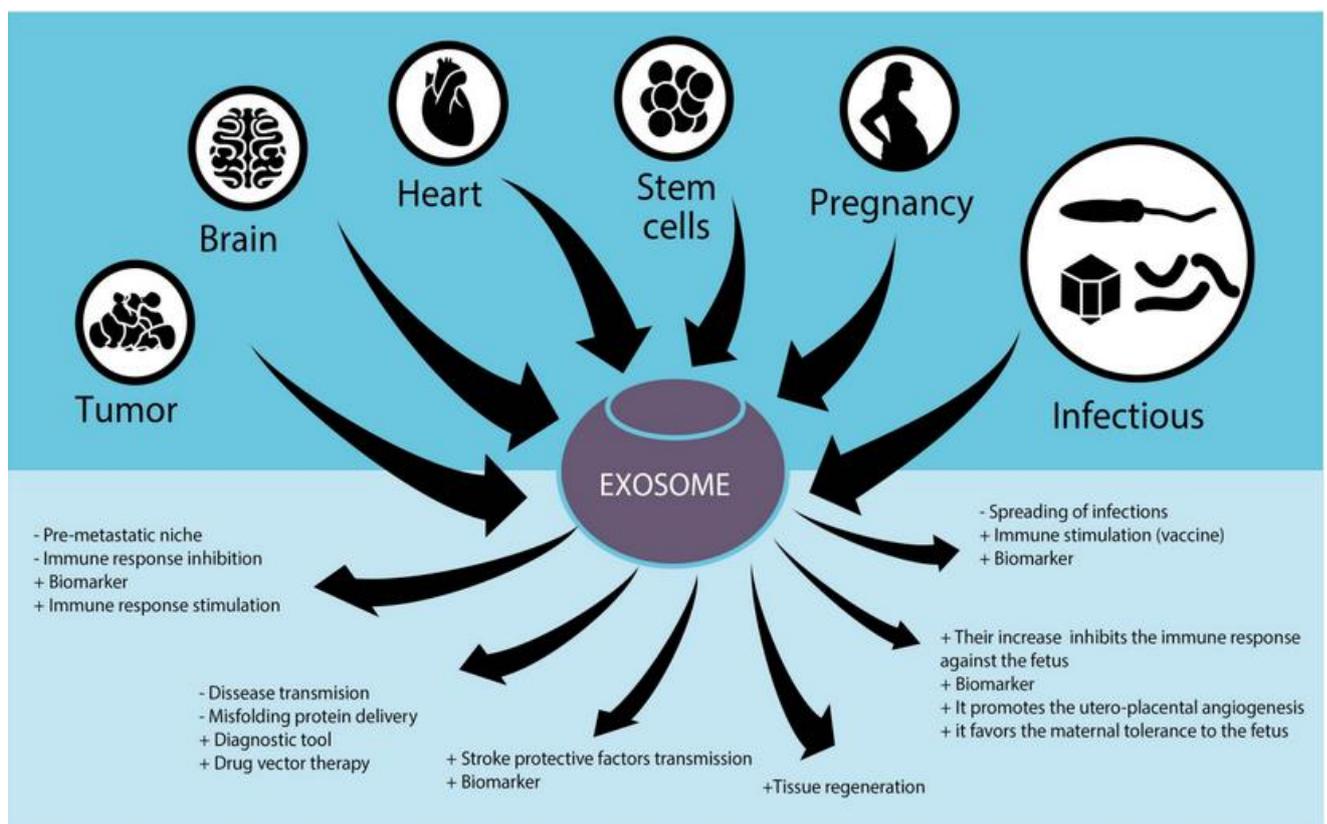


Figure 10: Potentielles utilisations thérapeutiques ou de suivi des exosomes en pathologie humaine (58).

Nous pouvons conclure que l'étude des exosomes a plusieurs champs d'application dont les principaux sont la cardiologie, l'obstétrique, l'infectiologie et la cancérologie (Figure 10).

Ils pourraient être à l'avenir être à l'origine de cellules régénératrices de tissu lésés, immunomodulateurs, voire vaccin acellulaire.

## V. Les exosomes

Les exosomes ont été décrits pour la première fois en 1977, ils avaient été premièrement appelés « prostasome » (65). Les exosomes sont décrits par l'ISEV (International Society for Extracellular Vesicles) comme des particules libérées par une cellule qui sont délimitées par une bicouche lipidique et ne peuvent pas se répliquer. Les exosomes sont présents dans tous les fluides corporels (plasma, liquide amniotique, salive, lait maternel,...) et peuvent être sécrétés par toutes les cellules de l'organisme (66).

De toutes vésicules extracellulaires, les exosomes sont les plus petites (30-100 nm) derrière les microvésicules (100-1000 nm) et les corps apoptotiques (0,5 à 2 µm). Ces vésicules jouent un rôle complexe et peu connu ; de l'élimination des déchets cellulaires jusqu'à un rôle important dans la communication intercellulaire, nos connaissances sur les exosomes ne cessent de croître. Les premières études montrèrent que leur rôle était la clairance des protéines obsolètes pour l'organisme. Cependant avec le temps, il a été montré que l'élimination protéique n'était pas le seul rôle des exosomes ; en effet, ils jouent aussi un rôle dans la régulation de la réponse immunitaire, la stimulation des lymphocytes T et la présentation de l'antigène par les lymphocytes B lors de la réponse immunitaire adaptative (67,68). Il a également été démontré que les exosomes peuvent activer les lymphocytes T, soit par une présentation directe de l'antigène, soit par une présentation indirecte par transfert de peptides antigéniques (69). En réalité, la majorité tend à penser que les rôles variés et complexes des exosomes sont expliqués par le fait qu'une énorme diversité de cellules est capable d'en synthétiser. Leur composition varie selon leur origine cellulaire. Récemment, une activité immunosuppressive envers les lymphocytes NK a même été montrée, via la modulation de l'expression du récepteur NKG2D (70) ainsi qu'en stimulant la production de lymphocytes T régulateurs (71).

Si leur composition est complexe : protéines, acides nucléiques, lipides et autres métabolites (72) ; leur biosynthèse l'est aussi. Elle peut être divisée en 3 parties (Figure 11) :

- Biosynthèse (importance du système endosomal)
- Transport jusqu'à la membrane plasmique (mettant en scène la machinerie ESCRT)
- Fusion avec la membrane plasmique et libération des exosomes dans la lumière des organites.

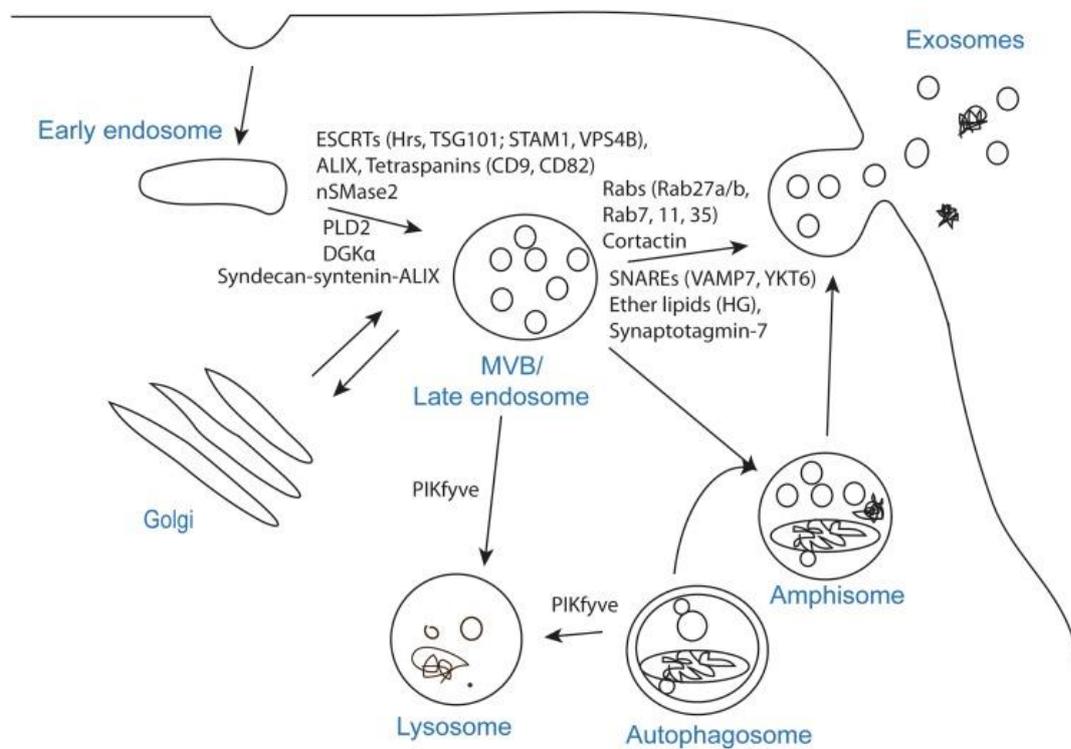


Figure 11: Biosynthèse des exosomes

## A. Composition

Les exosomes jouent un rôle encore flou en physiologie humaine. Cela s'explique par le fait que les molécules qu'ils transportent sont très variées.

### 1. Protéines

Leur origine étant cellulaire, les exosomes ont un contenu commun avec d'autres vésicules comme : l'actine, des protéines chaperonnes de régulation thermique, des molécules du complexe majeur d'histocompatibilité de type 1, annexine II (73,74).

Les clusters de différenciations (CD) 63 et 9 étant présents à la surface dans la plupart des vésicules extracellulaires (74), sont particulièrement présents à la surface des exosomes. Cependant, ces marqueurs ne sont pas exclusifs aux exosomes et sont retrouvés en grande quantité notamment sur certaines cellules cancéreuses (neuroblastome) (75). Certaines études montrent l'intérêt du CD81 puisque plus spécifique de la composition membranaire des exosomes que des cellules cancéreuses (76).

Récemment, une réévaluation de la composition membranaire et interne des exosomes a montré une possible sous-classification basée sur l'expression de la triade CD9, CD63 et CD81. En effet, les exosomes possédant à leur surface ces trois marqueurs peuvent être considérés comme des exosomes « classiques ». Il existe des particules de taille exosomale n'en possédant aucune, considérés comme une sous-population « non-classique » d'exosome dont le contenu diffère (77). Le rôle et la place de ces dernières n'ont pas encore été montrés.

### 2. ARN

La présence d'ARNm et de miARN au sein des vésicules extracellulaires est connue depuis la fin des années 2000 (78).

Dans les exosomes, la quantité d'ARN non codant comme les miARN et ARNt est plus élevée. La quantité d'ARN est cependant très faible et une grande quantité d'exosomes est nécessaire pour qu'ils aient un impact sur les cellules cibles (79).

Des miARN peuvent être transportés par voie exosomale entre les cellules cardiaques au sein du système cardiovasculaire. En effet, certains miARN dans les exosomes sont enrichis et excrétés en réponse à un stress cellulaire et provoquent une hypertrophie des cardiomyocytes.

Une notion intéressante pour l'avenir est la possible capacité de modification des ARN transportés dans les vésicules extracellulaires, notamment l'ARNt, qui pourrait nous en apprendre plus sur les rôles des différentes classes (80).

### 3. Lipides

La membrane des exosomes est constituée d'une bicouche lipidique. Il a été montré que les microvésicules au sens large contiennent des acides gras et du cholestérol, parfois en concentration très riche, tout comme des enzymes impliquées dans la synthèse de lipides.

Récemment, il a été découvert que les exosomes sont particulièrement riches en sphingomyélinases chez les patients atteints de sclérose en plaque, ce qui pourrait aboutir sur une approche thérapeutique particulière (81).

## B. Techniques d'isolation et de mesure des exosomes

Si l'intérêt de l'analyse des microvésicules que sont les exosomes est croissant, il n'en demeure pas moins que les techniques d'analyse de ceux-ci sont nombreuses et qu'aucune normalisation des méthodes n'a été proposée. Nous passerons en revue dans cette partie, les principales techniques d'isolation existantes. Si l'ultracentrifugation reste le gold standard, son indice de purification et sa complexité de mise en œuvre prouvent que d'autres techniques sont certainement meilleures.

Le défi d'isolation des exosomes réside dans le fait qu'il est difficile d'obtenir un isolat pur puisque les techniques entraînent généralement des mélanges complexes d'exosomes avec d'autres composants de l'espace extracellulaire. Ceci est particulièrement vrai dans le plasma, mais aussi dans d'autres fluides biologiques moins riches (82).

- Ultracentrifugation différentielle :

Il s'agit historiquement de la première technique utilisée. Plusieurs étapes permettent une bonne séparation des débris cellulaires et des éléments d'intérêt séparés. Premièrement grâce à une étape de centrifugation à 500g (10 min) qui aide à éliminer les débris cellulaires et les particules plus grosses de la matrice. Il peut s'en suivre une filtration de 0,22 µm. Ensuite, une étape de centrifugation à 10 000g (30min) purifie davantage la matrice,

éliminant les véhicules chargés de plus grandes tailles et les corps apoptotiques (83). Enfin, les exosomes sont purifiés dans l'étape de centrifugation à 100 000g (70 min). Le rendement exosomal peut être augmenté en utilisant des temps de centrifugation plus longs pendant les rotations de 100 000g.

- Centrifugation par gradient de densité :

C'est une technique similaire à la précédente, mais utilisant un gradient de densité intégré (saccharose ou iodoxinol) (84). L'échantillon est placé en surface, au sommet du gradient. Lorsque la force centrifuge est appliquée, les particules de l'échantillon traversent le gradient, qui augmente en densité de haut en bas. L'usage d'une vitesse unique permet la séparation. Les exosomes peuvent ensuite ici être récupérés dans leur zone de centrifugation.

- Précipitation des exosomes :

La précipitation des vésicules exosomales est généralement effectuée en introduisant un polymère excluant l'eau (polyéthylène glycol hydrophobe et dextrane hydrophile). Les vésicules peuvent ensuite être culottées par centrifugation classique, puis purifiées par lyophilisation. Cette méthode d'isolement est rapide, simple et nécessite peu d'expertise technique et pas d'équipement coûteux (85). Cependant, cette technique provoque la précipitation d'autres vésicules extracellulaires que les exosomes et manque de sélectivité.

- Isolation microfluid « Immuno-based » :

Il s'agit d'une technique commercialisée (ExoShip). Cette technique utilise le même principe que l'ELISA. L'isolement des exosomes est basé sur une interaction entre une protéine liée à la membrane sur la vésicule exosomale et un anticorps contre la protéine qui est immobilisé sur une puce microfluidique. Cette technique permet d'isoler directement les exosomes avec une très faible prise d'essai (10 à 100µL de plasma) (86). L'ExoShip utilise des anticorps anti-CD63, protéine étant reconnue comme un marqueur protéique exprimé dans les exosomes de nombreux types de cellules. Ces anticorps anti-CD63 permet ainsi l'isolement des exosomes à partir d'une matrice d'échantillon quelle que soit la source cellulaire (87). Même si ces clusters de différenciation sont présent plus fréquemment à la surface des exosomes, ils n'en sont pas exclusifs (88). Cette technique manque donc de sélectivité.

- Chromatographie d'exclusion de taille :

Cette technique permet une bonne séparation des exosomes tout en préservant leur structure. Il s'agit d'une technique particulière de chromatographie liquide dans laquelle la phase stationnaire est constituée de pores (résine poreuse). Les molécules les plus petites de la phase mobile passent dans les pores et sont retenues. Ce sont donc les molécules les plus grosses qui sont éluées en premières. L'amélioration de conception des phases stationnaires a permis une séparation plus précise sans endommager leur structure, elles peuvent donc préserver les activités biologiques naturelles des exosomes tout en possédant un volume initial très faible (environ 15µL) (89).

Ces techniques d'isolation montrent qu'il est difficile d'obtenir un isolat d'exosome pur sur lequel travailler. Or, la pureté de l'isolat est capitale afin d'obtenir les résultats le plus spécifique possible. La quête d'une méthode simple, rapide et possédant un indice de pureté élevée n'est pas terminée. Certains industriels développent des techniques couplant 2 méthodes d'isolation (précipitation couplée à une technique immunologique ThermoFisher®, ...) afin de répondre à ces problématiques.

Technique	Rendement	Purification	Volume nécessaire	Durée analyse
Ultracentrifugation (UC)	5-25%	Faible	100mL	8h
Densité gradient	>UC	=UC	1 mL	20h
Précipitation	NC	Faible	100µL	24h
ExoChip	NC	NC	100µL	<2h
Chromatographie d'exclusion	=UC	>UC	15µL	2h

*Tableau 4: Tableau récapitulatif des principales techniques d'isolation des exosomes (90)*

## C. Techniques de caractérisation et d'étude des exosomes

Les techniques d'isolation exosomales ne permettent pas d'atteindre un indice de pureté parfait. Des impuretés, d'autres microvésicules et même certains types de virus de morphologie proche (rétrovirus, lentivirus) sont souvent présents dans l'isolat final. C'est pour cela que plusieurs méthodes de caractérisation d'échantillon ont été mises au point.

Selon l'ISEV, cette caractérisation doit passer par la recherche d'au moins 2 protéines, qu'elles soient transmembranaires ou cytosolique (91). La recherche d'exosome dans les fluides biologiques étant bien plus complexe que dans le plasma, les méthodes d'isolation et de caractérisation sont plus contraignantes.

En pratique, les techniques d'études exosomales se divisent en 2 types :

- Caractérisation externe (morphologie)
- Caractérisation des inclusions (protéines membranaires)

Les techniques les plus courantes de caractérisation sont synthétisés dans le tableau suivant (Tableau 5) (3).

Méthode	Intérêt	Avantage/inconvénient
<b>Microscopie électronique</b>	Caractérisation externe (morphologie)	Méthode directe permettant d'apprécier la distribution de taille, mais longue et nécessitant une préparation complexe.
<b>Nanoparticle Tracking Analysis (NTA)</b>	Caractérisation externe (détection de la taille et de la concentration)	Méthode rapide en temps réel ayant une bonne résolution mais dépendant de la qualité de la camera de détection et du logiciel de distinction utilisé.
<b>Western Blot</b>	Caractérisation interne (marqueurs protéiques)	Méthode connue permettant une approche qualitative et quantitative, mais assez longue et non adaptée pour les fluides biologiques.
<b>Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)</b>	Caractérisation interne (marqueurs protéiques)	Méthode très spécifique et rapide permettant une approche qualitative et quantitative, mais souffrant d'une répétabilité insuffisante.
<b>Cytométrie de flux</b>	Caractérisation mixte (taille et biomarqueurs)	Méthode rapide et multi-canal mais la caractérisation externe est presque impossible due à une résolution trop faible.

Tableau 5: Exemples pratiques de méthode de caractérisation des exosomes selon Zhang et al.

#### D. Intérêt de mesure des biomarqueurs tels que la troponine dans les exosomes

L'élimination de la troponine fait appel à plusieurs mécanismes encore non élucidés. Si l'on sait au moins qu'elle est éliminée, en partie, par le système réticulo-endothélial du rein (92), son mode d'élimination, voire de recyclage, reste à être découvert. Par ailleurs, c'est aussi pour cette raison qu'il n'y a aucun consensus pour modifier les valeurs normales de troponine chez les insuffisants rénaux.

On peut commencer par s'intéresser à une étude de 2018, réalisée chez la souris, qui observe que le profil exosomal cardiaque du donneur prédit un rejet aigu précoce avec une grande précision. Le profil exosomal cardiaque étant la quantité d'exosome du donneur en circulation rapportée aux modifications structurelles à leur surface. (93)

Plusieurs hypothèses sur le rôle des exosomes ont été proposées, cependant, dans les maladies cardio-vasculaires, peu d'études ont été effectuées pour le moment. Récemment, l'isolation, la quantification et l'analyse intracytoplasmique des exosomes entre des patients atteints d'IDM et d'autres de syndrome coronaire chronique (SCC) a permis d'un peu avancer sur le rôle des exosomes en pathologie cardiovasculaire (94). En effet, dans cette étude italienne de 2021, il est montré que la quantité d'exosome est plus élevée chez les patients atteints d'IDM ; cependant, la quantité de troponine cardiaque exosomale est similaire chez les patients atteints d'IDM et ceux atteints de SCC. La technique utilisée est une technique commercialisée par Thermofisher® utilisant la précipitation des exosomes couplée à une centrifugation. L'analyse de la concentration et de la taille des exosomes a été faite via Nanosight® NS300 (analyse optique puis logicielle des particules). Les exosomes ont ensuite été lysés puis analysés par Western Blot. Parmi les autres marqueurs testés, la GPIIb et la VE-cadherine ont montré des valeurs plus hautes dans le groupe des patients atteints d'IDM. Même si la quantité de patient inclus dans cette étude est faible (35 patients atteints d'IDM et 32 de pathologie coronaire chronique) et que sont comparés uniquement des patients malades, il s'agit de la première étude à comparer les profils exosomaux de patients atteints de MCV. Il est à noter également que cette étude utilise des unités arbitraires pour la quantification de tous les éléments intra-exosomaux, dont la troponine.

Toujours dans le cadre du rejet cardiaque, une deuxième étude a montré en 2020 chez l'être humain que les exosomes cardiaques circulants du donneur pourraient être caractérisés et que leur contenu reflète les lésions spécifiques du cœur transplanté. Ceci pourrait permettre de prédire les rejets de greffe cardiaque médiés par l'organisme (95). En effet, via isolation par une étape de chromatographie d'exclusion puis ultracentrifugation, la présence de la troponine T et de son ARNm a été confirmée par Western Blot (après lyse), ce qui montre que le cœur transplanté libère des exosomes contenant de la troponine T en continu.

Pour finir, une meilleure compréhension des exosomes pourrait mener à la découverte de nouveaux biomarqueurs qui pourraient prédire le risque de maladie athéroscléreuse au-delà des facteurs de risque traditionnels (73,96). Notamment, certains miARN ayant un rôle dans l'inflammation et l'athérosclérose (miR-133a, miR-155, miR223...) et qui sont transportés par les exosomes. Ces derniers pourront peut-être devenir des nouveaux biomarqueurs de la formation de la plaque d'athérome (97).

## **VI. Etude préliminaire**

Cette étude se base sur hypothèse selon laquelle la voie exosomale serait une voie d'élimination précoce de la troponine cardiaque. L'objectif est de déceler plus rapidement une pathologie cardiaque nécrosante. Le dépistage précoce, permettant de ne pas attendre la saturation d'une potentielle voie d'élimination afin que la troponine soit relarguée dans le sang circulant pourrait éviter des séquelles irréversibles pour les patients. L'objectif est de comparer les concentrations en troponine cTnT dans le plasma avec la cTnT exosomale chez des patients souffrant de pathologie cardiovasculaire et des patients sains.

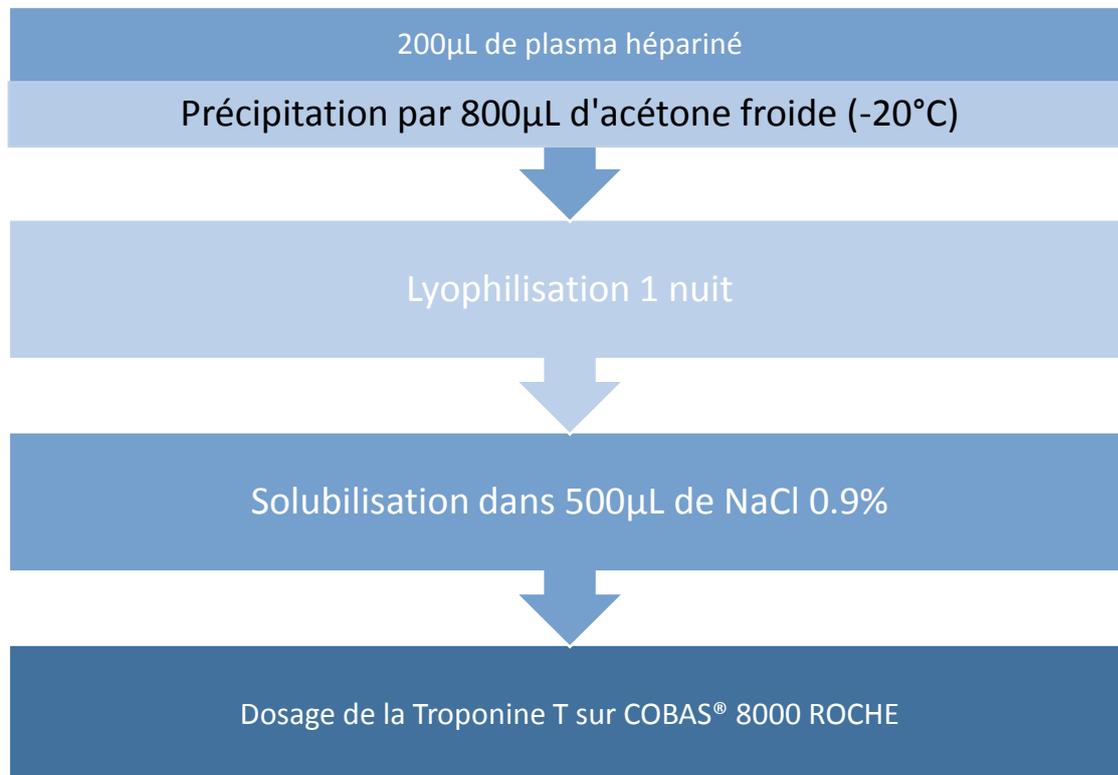
La présente étude expose des résultats préliminaires, dans l'optique d'analyser si les vésicules extracellulaires, et plus particulièrement les exosomes, pourraient apporter plus d'informations sur la cinétique d'un syndrome coronarien voire améliorer la prise en charge des patients en détectant un relargage précoce de troponines spécifiques du cardiomyocyte.

### **A. Méthode et résultats**

La méthode d'isolation des vésicules extracellulaires (dont les exosomes) utilisée ici est celle de la précipitation par l'acétone froide (-20°C). Cette méthode, rapide, efficace et bon marché a montré ses preuves. Après l'élimination des protéines contaminantes par précipitation à base de solvant, les véhicules chargés encapsulés dans les lipides sont laissés en suspension et peuvent facilement être séparés par centrifugation (98). Cette technique peut potentiellement être utilisée en unité de soin de biologie médicale hospitalière (99).

La prise d'essai était de 200µL de plasma hépariné. Après précipitation par 800µL d'acétone froide (-20°C), les échantillons ont été lyophilisés une nuit puis solubilisé dans 500µL de NaCl 0,9% à volumes de reprise égaux (99). La troponine T a ensuite été dosée sur COBAS® 8000 ROCHE.

Bien qu'il s'agisse ici d'une méthode sûre et validée pour l'isolation d'exosomes, il est à noter que cette technique d'isolation aboutit à un mélange de particules, exosomes et microvésicules.



## B. Patients

Ce travail a été réalisé dans le cadre de l'obtention d'un PHRC avec avis favorable du CPP. CPP 20 AP-HM 01 SI CNRIPH 20 04 21 46006. IDRCB : 2020-A00686-33.

Les patients ont été sélectionnés de la façon suivante :

- 11 patients ayant une concentration de troponine T plasmatique supérieure au 99<sup>ème</sup> percentile ([54 ;8408] ng/L) et présentant une pathologie cardiovasculaire.
- 15 patients avec des concentrations en troponine inférieures au 99<sup>ème</sup> percentile ( $<3$  ; 12] ng/L).

Ainsi, les résultats de troponine exosomale ont été comparés selon ces résultats biologiques et aussi selon les signes cliniques. Parmi les patients, 14 souffraient de pathologie cardiovasculaire (IDM, stent, syndrome coronarien, ...) parfois avec des concentrations en troponine plasmatique inférieures au 99<sup>ème</sup> percentile. Il est donc intéressant d'analyser les résultats également d'un point de vue clinique afin de faire la distinction entre patient atteint de MCV et patient sain.

Nom	Age (années)	cTnT exosome (ng/L)	Valeur x5 (ng/L)	cTnT plasma (ng/L)	Clinique
<b>P1</b>	38	109,7	548,5	397	Stent
<b>P2</b>	75	52,44	262,2	1065	Prothèse aortique
<b>P3</b>	66	59,42	297,1	3743	Pontage
<b>P4</b>	87	221,9	1109,5	1528	Syndrome coronarien aigu
<b>P5</b>	75	18,32	91,6	117	Insuffisance mitrale
<b>P6</b>	87	33,84	169,2	54	Infarctus
<b>P7</b>	56	32,59	162,95	8408	Choc cardiogénique
<b>P8</b>	97	27,41	137,05	950	Infarctus
<b>P9</b>	74	20,5	102,5	512	SCA ST+
<b>P10</b>	66	44,12	220,6	350	Infarctus
<b>P11</b>	61	96,7	483,5	125	SCA ST+

Tableau 6: Tableau des patients ayant une troponine T plasmatique positive

Sur le tableau ci-dessus (Tableau 6), les données concernent le groupe de patients atteint de MCV et d'une troponine positive selon les recommandations de l'ESC. La moyenne d'âge est de 71,1 ans, la valeur de troponine exosomale moyenne est 325,9 ng/L tandis que la valeur moyenne de troponine plasmatique est de 1568 ng/L. Environ la moitié des patients souffre d'une pathologie coronaire.

Nom	Age (années)	cTnT exosome (ng/L)	Valeur x5 (ng/L)	cTnT plasma (ng/L)	Clinique
P12	68	3,07	15,35	7	Aucune MCV
P13	59	5,19	25,95	12	Aucune MCV
P14	55	8,64	43,2	4	Aucune MCV
P15	71	20,75	103,75	5	Hypertension portale précapillaire
P16	50	3,18	15,9	3	Aucune MCV
P17	47	8,03	40,15	<3	Aucune MCV, chimiothérapie
P18	32	7,39	36,95	<3	Angor rythmique à ECG normal
P19	37	7,98	39,9	<3	Aucune MCV
P20	33	7,96	39,8	<3	Aucune MCV
P21	24	7,33	36,65	<3	Aucune MCV
P22	56	12,06	60,3	<3	Aucune MCV, chimiothérapie
P23	28	6,78	33,9	<3	Aucune MCV
P24	54	7,61	38,05	7	Aucune MCV
P25	53	6,82	34,1	4	Aucune MCV
P26	37	8,05	40,25	3	Aucune MCV

Tableau 7: Tableau des patients ayant une troponine T plasmatique négative (en jaune, les patients avec clinique de MCV)

Dans le tableau ci-dessus (Tableau 7), nous détaillerons les données recueillies auprès d'une patientèle ne présentant pas de troponine positive selon l'ESC. La moyenne d'âge est de 46,9 ans, la valeur de troponine exosomale moyenne est de 40,3 ng/L contre moins de 5 ng/L dans le plasma.

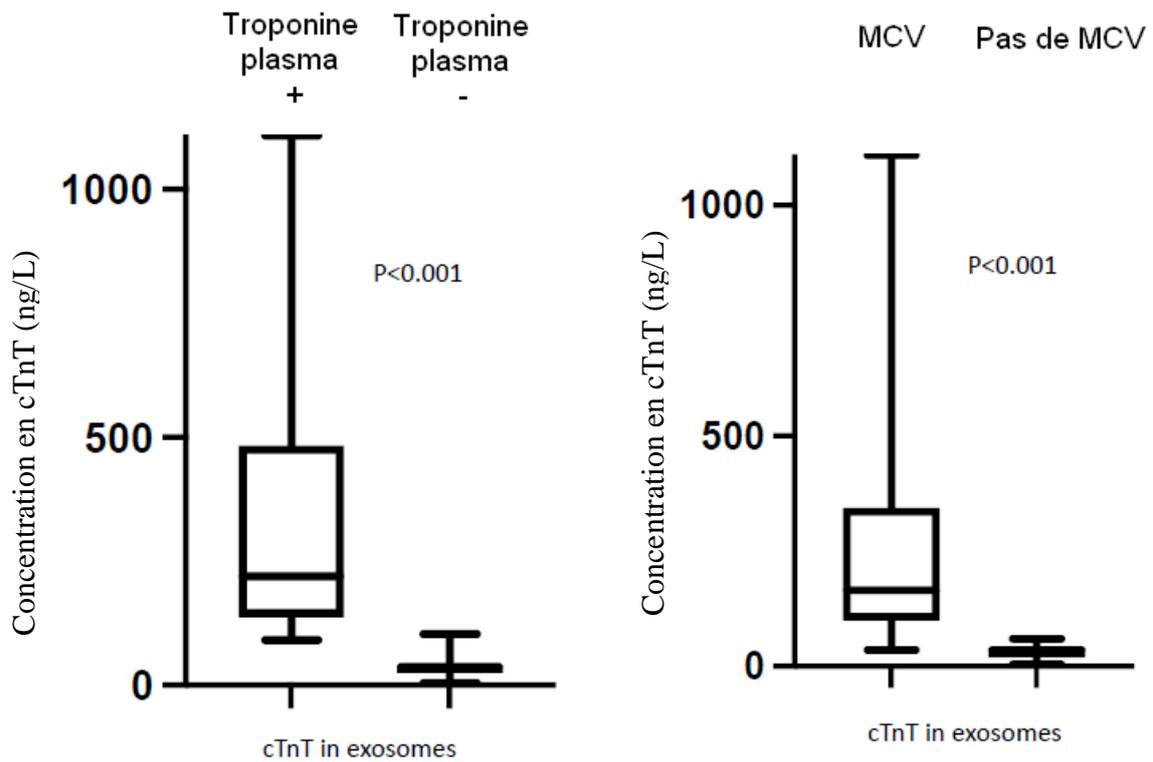


Figure 12: Résultats des mesures de troponine exosomale

En séparant les données avec le cut-off biologique uniquement (>99<sup>ème</sup> percentile) : on observe des concentrations significativement plus élevées de troponine exosomale chez les patients ayant une troponine plasmatique élevée (médiane groupe malade = 220,6 ng/L contre 38,05 ng/L dans le groupe « témoin »,  $p < 0,001$ ) (Figure 12). C'est un résultat attendu mais non moins intéressant. Cette différence significative est aussi présente en séparant les patients uniquement sur les manifestations cliniques (médiane = 169,2 ng/L contre 38,05 ng/L dans le groupe MCV négatif,  $p < 0,001$ ). Chez les patients à troponine positive, les valeurs sont significativement plus élevées dans les exosomes. Il existe également des valeurs exosomales plus élevées chez les patients atteints d'une pathologie cardiovasculaire autre que coronaropathie.

Nous observons également que les 2 patients sous chimiothérapie possèdent une cTnT exosomale décelable alors que la cTnT plasmatique est négative (Tableau 7). L'hypothèse est que la chimiothérapie puisse provoquer une myocardite détectable par dosage exosomal de la troponine. Une évaluation clinique spécifique et une prise en charge thérapeutique des patients dans la même situation peuvent potentiellement se développer avec un tel dosage.

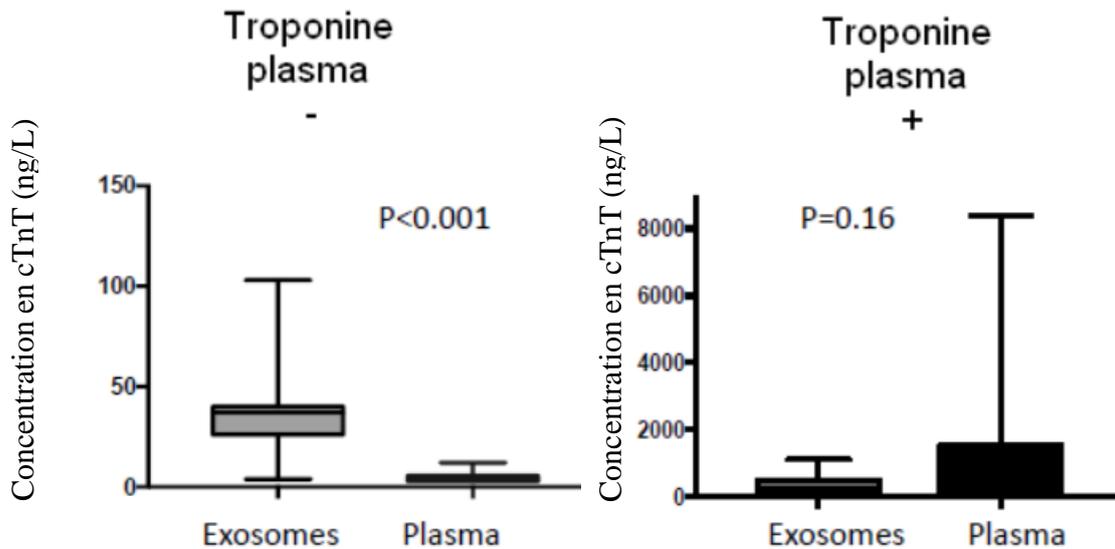


Figure 13: Comparaison de la troponine dosée directement dans le plasma et dans les exosomes

Nous observons également que si la troponine plasmatique était indosable dans le plasma de plusieurs malades. Celle-ci est détectée dans les exosomes de 7 patients, on pourrait donc penser que le dosage exosomal permet d'augmenter la sensibilité de la détection de cTnT (Figure 14). Ceci semble montrer qu'il existe un turn-over de la troponine y compris chez le sujet sain avec une dégradation journalière de la troponine. Ceci confirme les travaux de Kerbaul et al, montrant ce turn-over plasmatique, mais qui n'avait jamais été mentionné dans le compartiment exosomal.

Malheureusement, chez les patients à troponine T au-dessus du 99<sup>ème</sup> percentile, les analyses statistiques sont peu interprétables en l'état (Figure 13) puisque les valeurs plasmatiques peuvent être largement supérieures aux valeurs exosomales, ce qui n'est pas le cas chez les patients ayant une cTnT plasmatique faible, voire inférieure à la limite de détection. Par ailleurs, le nombre de patients inclus est à ce jour trop faible pour faire une analyse statistique solide.

Dans aucun groupe une véritable corrélation statistique entre les valeurs plasmatiques et exosomales n'a été retrouvée (Figure 15), sans doute en raison du petit nombre de patients inclus. Cette hypothèse est renforcée par l'existence d'une tendance à la corrélation. Ce résultat peut aussi s'expliquer par le fait qu'aucun tampon de lyse n'a été utilisé pour détruire la membrane des exosomes et être certain qu'ils libèrent tous les éléments intra-membranaire. Dans cette présente étude il existe certainement une lyse exosomale, mais elle était incontrôlée et probablement incomplète.

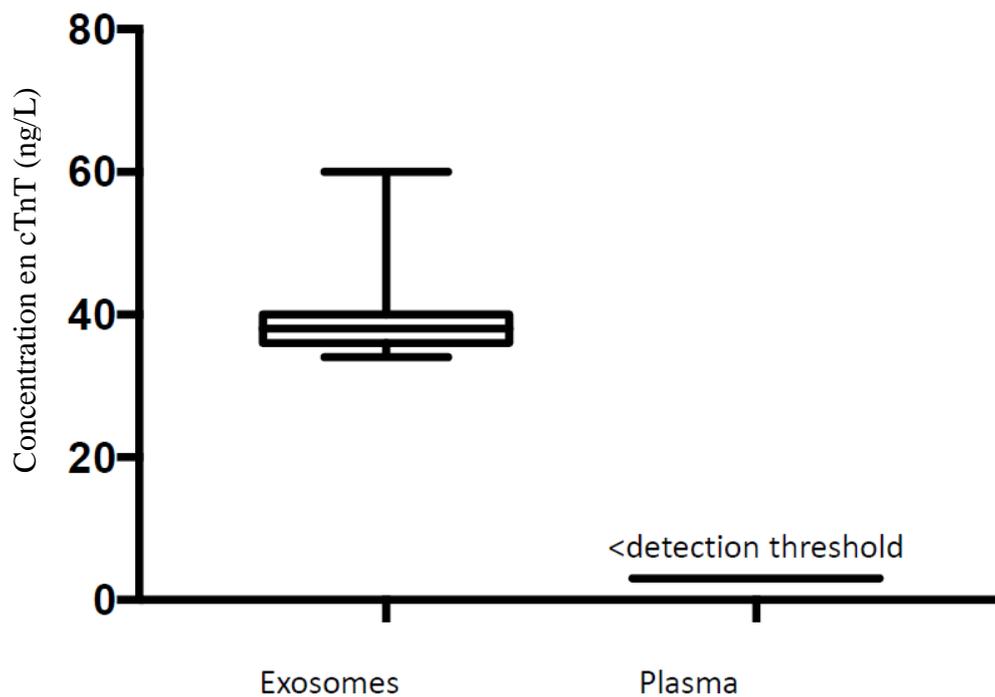


Figure 14: Comparaison de la cTnT exosomale avec les 7 patients possédant une cTnT indétectable



## C. Perspectives

Ce travail sur le dosage exosomale de la troponine T cardiaque confirme le réel intérêt d'étudier et d'utiliser la voie exosomale en pratique de soin.

Des études complémentaires sont nécessaires pour définir des valeurs seuils, notamment en augmentant le nombre de patients inclus, ainsi que de réaliser une cinétique parallèle de dosage de la voie exosomale (plus de points de dosage par patient) et plasmatique pour chaque patient afin de déterminer si l'augmentation exosomale de la troponine précède ou non l'augmentation plasmatique. Il serait également intéressant de tester l'isoforme I de la troponine pour comparer si les modèles d'apparitions sont superposables ou non.

Étant donné l'équipement nécessaire et la chronophagie de cette technique, son principal avantage à ce jour serait la surveillance des chimiothérapies. En effet, les myocardites induites par ces traitements sont redoutables, et la capacité de dépister précocement ces complications à l'aide de la troponine exosomale représente un avantage réel pour la surveillance thérapeutique. De plus, les résultats pourraient être obtenus dans un délai d'environ 24 heures, ce qui n'est pas incompatible avec la prise en charge de l'effet indésirable.

Une analyse plus poussée de l'isolat exosomal est aussi à prévoir puisque la réalisation d'un isolat par une technique plus spécifique, associée à un système d'analyse des microvésicules, puis une lyse contrôlée des exosomes permettrait de savoir si l'origine de la troponine est exosomale à proprement parler ou contenu plus largement au sein des particules.

## VII. Conclusion

Les pathologies cardiovasculaires figurent parmi les causes les plus fréquentes de morbimortalité, dont les pathologies coronariennes occupent une place importante. Le diagnostic et le suivi des MCV méritent donc des outils de pointe, ce qui nécessite des améliorations permanentes, en particulier en ce qui concerne la spécificité et la précocité des analytes étudiés. Les exosomes forment une voie de transport et de signalisation dans de nombreux types cellulaires. Il s'agit d'une voie de transport de nombreuses substances (plus diverses que les liposomes et autres particules), dont l'intérêt est de pouvoir détecter et doser la troponine potentiellement transportée depuis les cardiomyocytes.

Les résultats préliminaires de la thèse ont montré la présence de troponine T cardiaque exosomale dosable chez les patients pathologiques et les patients sans maladie cardiovasculaire, avec des valeurs plus élevées chez les patients atteints de trouble cardiovasculaire. Nous pouvons également supposer une cinétique plus précoce que la troponine sanguine, ce qui pourrait détecter des pathologies cardiaques nécrosantes dans le suivi de certaines thérapies lourdes (chimiothérapie).

Cette présente étude nécessite des analyses supplémentaires avec des méthodes d'isolation plus efficaces, afin de confirmer ou d'infirmer la précocité de cette analyse dans le cadre des pathologies cardiovasculaires et d'en déterminer la cinétique.

## BIBLIOGRAPHIE

1. Virani SS, Alonso A, Benjamin EJ, Bittencourt MS, Callaway CW, Carson AP, et al. Heart Disease and Stroke Statistics-2020 Update: A Report From the American Heart Association. *Circulation*. 3 mars 2020;141(9):e139-596.
2. Cardiovascular diseases (CVDs) [Internet]. [cité 20 nov 2022]. Disponible sur: [https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/cardiovascular-diseases-\(cvds\)](https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/cardiovascular-diseases-(cvds))
3. Zhang Y, Bi J, Huang J, Tang Y, Du S, Li P. Exosome: A Review of Its Classification, Isolation Techniques, Storage, Diagnostic and Targeted Therapy Applications. *Int J Nanomedicine*. 2020;15:6917-34.
4. *Epidémiologie Française des maladies chroniques - INSERM 2016.pdf*.
5. Townsend N, Wilson L, Bhatnagar P, Wickramasinghe K, Rayner M, Nichols M. Cardiovascular disease in Europe: epidemiological update 2016. *Eur Heart J*. 7 nov 2016;37(42):3232-45.
6. Santos F. DISPARITÉS DÉPARTEMENTALES D'ANNÉES POTENTIELLES DE VIE PERDUES PRÉMATURÉMENT PAR MALADIES CARDIOVASCULAIRES EN FRANCE (2013-2015) / DEPARTMENTAL DISPARITIES IN POTENTIAL YEARS OF LIFE LOST DUE TO PREMATURE CARDIOVASCULAR DISEASES IN FRANCE (2013-2015). 2020;11.
7. Camaré C, Pucelle M, Nègre-Salvayre A, Salvayre R. Angiogenesis in the atherosclerotic plaque. *Redox Biol*. août 2017;12:18-34.
8. Severino P, D'Amato A, Pucci M, Infusino F, Adamo F, Birtolo LI, et al. Ischemic Heart Disease Pathophysiology Paradigms Overview: From Plaque Activation to Microvascular Dysfunction. *Int J Mol Sci*. 30 oct 2020;21(21):8118.
9. Teo KK, Rafiq T. Cardiovascular Risk Factors and Prevention: A Perspective From Developing Countries. *Can J Cardiol*. mai 2021;37(5):733-43.
10. Timmis A, Townsend N, Gale CP, Torbica A, Lettino M, Petersen SE, et al. European Society of Cardiology: Cardiovascular Disease Statistics 2019. *Eur Heart J*. 1 janv 2020;41(1):12-85.
11. SCORE2 working group and ESC Cardiovascular risk collaboration, Hageman S, Pennells L, Ojeda F, Kaptoge S, Kuulasmaa K, et al. SCORE2 risk prediction algorithms: new models to estimate 10-year risk of cardiovascular disease in Europe. *Eur Heart J*. 1 juill 2021;42(25):2439-54.
12. Kotseva K, De Backer G, De Bacquer D, Rydén L, Hoes A, Grobbee D, et al. Primary prevention efforts are poorly developed in people at high cardiovascular risk: A report from the European Society of Cardiology EURObservational Research Programme EUROASPIRE V survey in 16 European countries. *Eur J Prev Cardiol*. 8 mai 2021;28(4):370-9.
13. De Bacquer D, De Backer G. Predictive ability of the SCORE Belgium risk chart for cardiovascular mortality. *Int J Cardiol*. 3 sept 2010;143(3):385-90.
14. SCORE2-OP working group and ESC Cardiovascular risk collaboration. SCORE2-OP risk prediction algorithms: estimating incident cardiovascular event risk in older persons in four geographical risk regions. *Eur Heart J*. 1 juill 2021;42(25):2455-67.

15. Vallée JP. Scores de risque cardiovasculaire. *Médecine*. 1 nov 2010;6(9):396-396.
16. Calculateur de risque du GSLA [Internet]. [cité 12 janv 2023]. Disponible sur: <https://www.agla.ch/fr/calculateurs-outils/calculateur-de-risque-du-gsla>
17. Natt Och Dag Y, Engström G, Rosvall M. Life satisfaction and coronary atherosclerosis: The SCAPIS study. *J Psychosom Res*. 7 nov 2021;152:110663.
18. SCAPIS : le scanner coronaire et l'intelligence artificielle : des outils pour améliorer la prévention cardiovasculaire [Internet]. [cité 12 janv 2023]. Disponible sur: <https://www.cardio-online.fr/Actualites/A-la-une/AHA-2020-SCAPIS>
19. Poplin R, Varadarajan AV, Blumer K, Liu Y, McConnell MV, Corrado GS, et al. Prediction of cardiovascular risk factors from retinal fundus photographs via deep learning. *Nat Biomed Eng*. mars 2018;2(3):158-64.
20. Leite L, Matos P, Leon-Justel A, Espírito-Santo C, Rodríguez-Padial L, Rodrigues F, et al. High sensitivity troponins: A potential biomarkers of cardiovascular risk for primary prevention. *Front Cardiovasc Med* [Internet]. 2022 [cité 17 janv 2023];9. Disponible sur: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fcvm.2022.1054959>
21. Intérêts des marqueurs biologiques dans les maladies cardiovasculaires – Académie nationale de médecine | Une institution dans son temps [Internet]. [cité 13 août 2022]. Disponible sur: <https://www.academie-medecine.fr/interets-des-marqueurs-biologiques-dans-les-maladies-cardiovasculaires/>
22. Thygesen K, Alpert JS, White HD, Joint ESC/ACCF/AHA/WHF Task Force for the Redefinition of Myocardial Infarction. Universal definition of myocardial infarction. *Eur Heart J*. oct 2007;28(20):2525-38.
23. Jaffe AS, Landt Y, Parvin CA, Abendschein DR, Geltman EM, Ladenson JH. Comparative sensitivity of cardiac troponin I and lactate dehydrogenase isoenzymes for diagnosing acute myocardial infarction. *Clin Chem*. nov 1996;42(11):1770-6.
24. Li MX, Hwang PM. Structure and function of cardiac troponin C (TNNC1): Implications for heart failure, cardiomyopathies, and troponin modulating drugs. *Gene*. 25 oct 2015;571(2):153-66.
25. Wu AHB, Jaffe AS. The clinical need for high-sensitivity cardiac troponin assays for acute coronary syndromes and the role for serial testing. *Am Heart J*. févr 2008;155(2):208-14.
26. Servonnet A, Dubost C, Martin G, Lefrère B, Fontan E, Ceppa F, et al. [Myoglobin: still a useful biomarker in 2017?]. *Ann Biol Clin (Paris)*. 1 avr 2018;76(2):137-41.
27. Aydin S, Ugur K, Aydin S, Sahin İ, Yardim M. Biomarkers in acute myocardial infarction: current perspectives. *Vasc Health Risk Manag*. 2019;15:1-10.
28. Boerrigter G, Costello-Boerrigter LC, Burnett JC. Natriuretic Peptides in the Diagnosis and Management of Chronic Heart Failure. *Heart Fail Clin*. oct 2009;5(4):501-14.
29. Jourdain P, Lefèvre G, Oddoze C, Sapin V, Dievert F, Jondeau G, et al. NT-proBNP en pratique « De la biologie à la clinique ». *Ann Cardiol Angéiologie*. 1 juin 2009;58(3):165-79.
30. Maisel A, Mueller C, Adams Jr. K, Anker SD, Aspromonte N, Cleland JGF, et al. State of the art: Using natriuretic peptide levels in clinical practice. *Eur J Heart Fail*. 2008;10(9):824-39.

31. Gu YL, Voors AA, Zijlstra F, Hillege HL, Struck J, Masson S, et al. Comparison of the temporal release pattern of copeptin with conventional biomarkers in acute myocardial infarction. *Clin Res Cardiol Off J Ger Card Soc.* déc 2011;100(12):1069-76.
32. Bohyn E, Dubie E, Lebrun C, Jund J, Beaune G, Lesage P, et al. Expeditious exclusion of acute coronary syndrome diagnosis by combined measurements of copeptin, high-sensitivity troponin, and GRACE score. *Am J Emerg Med.* avr 2014;32(4):293-6.
33. Moutachakkir M, Lamrani Hanchi A, Baraou A, Boukhira A, Chellak S. Immunoanalytical characteristics of C-reactive protein and high sensitivity C-reactive protein. *Ann Biol Clin (Paris).* 1 avr 2017;75(2):225-9.
34. Ridker PM, Danielson E, Fonseca FAH, Genest J, Gotto AM, Kastelein JJP, et al. Rosuvastatin to prevent vascular events in men and women with elevated C-reactive protein. *N Engl J Med.* 20 nov 2008;359(21):2195-207.
35. Badimon L, Peña E, Arderiu G, Padró T, Slevin M, Vilahur G, et al. C-Reactive Protein in Atherothrombosis and Angiogenesis. *Front Immunol.* 2018;9:430.
36. Denegri A, Boriani G. High Sensitivity C-reactive Protein (hsCRP) and its Implications in Cardiovascular Outcomes. *Curr Pharm Des.* 2021;27(2):263-75.
37. Marston S, Zamora JE. Troponin structure and function: a view of recent progress. *J Muscle Res Cell Motil.* mars 2020;41(1):71-89.
38. Solaro RJ, Henze M, Kobayashi T. Integration of troponin I phosphorylation with cardiac regulatory networks. *Circ Res.* 18 janv 2013;112(2):355-66.
39. Wei B, Jin JP. Troponin T isoforms and posttranscriptional modifications: Evolution, regulation and function. *Arch Biochem Biophys.* 15 janv 2011;505(2):144-54.
40. Papadaki M, Marston SB. The Importance of Intrinsically Disordered Segments of Cardiac Troponin in Modulating Function by Phosphorylation and Disease-Causing Mutations. *Front Physiol [Internet].* 2016 [cité 4 sept 2022];7. Disponible sur: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fphys.2016.00508>
41. Thygesen K, Alpert JS, Jaffe AS, Chaitman BR, Bax JJ, Morrow DA, et al. Fourth universal definition of myocardial infarction (2018). *Eur Heart J.* 14 janv 2019;40(3):237-69.
42. Kavsak PA, MacRae AR, Lustig V, Bhargava R, Vandersluis R, Palomaki GE, et al. The impact of the ESC/ACC redefinition of myocardial infarction and new sensitive troponin assays on the frequency of acute myocardial infarction. *Am Heart J.* 1 juill 2006;152(1):118-25.
43. White HD. Pathobiology of Troponin Elevations □ □ Editorials published in the Journal of the American College of Cardiology reflect the views of the authors and do not necessarily represent the views of JACC or the American College of Cardiology.: Do Elevations Occur With Myocardial Ischemia as Well as Necrosis? *J Am Coll Cardiol.* 14 juin 2011;57(24):2406-8.
44. Garg P, Morris P, Fazlanie AL, Vijayan S, Dancso B, Dastidar AG, et al. Cardiac biomarkers of acute coronary syndrome: from history to high-sensitivity cardiac troponin. *Intern Emerg Med.* mars 2017;12(2):147-55.

45. Weber M, Bazzino O, Navarro Estrada JL, de Miguel R, Salzberg S, Fuselli JJ, et al. Improved diagnostic and prognostic performance of a new high-sensitive troponin T assay in patients with acute coronary syndrome. *Am Heart J.* 1 juill 2011;162(1):81-8.
46. Kerbaul F, Collard F, Benard F, By Y, Paganelli F, Saadjian A, et al. Release of markers of myocardial damage evaluated in the coronary sinus during cardiac surgery. *J Investig Med Off Publ Am Fed Clin Res.* mai 2007;55(4):195-201.
47. Dalle Carbonare L, Pizzini M, Micheletti V, Lo Cascio C, Bovo C, Girelli D, et al. Interference from immunocomplexes on a high-sensitivity cardiac troponin T immunoassay. *Clin Chem Lab Med.* 25 sept 2020;58(10):e225-7.
48. Nallet O, Gouffran G, Lavie Badie Y. L'élévation de la troponine en dehors des syndromes coronariens aigus. *J Eur Urgences Réanimation.* 1 mars 2017;29(1):40-6.
49. Agewall S, Giannitsis E, Jernberg T, Katus H. Troponin elevation in coronary vs. non-coronary disease. *Eur Heart J.* 2 févr 2011;32(4):404-11.
50. Mueller C. Biomarkers and acute coronary syndromes: an update. *Eur Heart J.* 1 mars 2014;35(9):552-6.
51. Exosomes [Internet]. [cité 5 déc 2022]. Disponible sur: <https://www.ahajournals.org/doi/epub/10.1161/CIRCRESAHA.113.300636>
52. Chen L, Wang Y, Pan Y, Zhang L, Shen C, Qin G, et al. Cardiac progenitor-derived exosomes protect ischemic myocardium from acute ischemia/reperfusion injury. *Biochem Biophys Res Commun.* 15 févr 2013;431(3):566-71.
53. de Jong OG, Verhaar MC, Chen Y, Vader P, Gremmels H, Posthuma G, et al. Cellular stress conditions are reflected in the protein and RNA content of endothelial cell-derived exosomes. *J Extracell Vesicles.* 1 janv 2012;1(1):18396.
54. Yu X, Deng L, Wang D, Li N, Chen X, Cheng X, et al. Mechanism of TNF- $\alpha$  autocrine effects in hypoxic cardiomyocytes: Initiated by hypoxia inducible factor 1 $\alpha$ , presented by exosomes. *J Mol Cell Cardiol.* 1 déc 2012;53(6):848-57.
55. Kucharzewska P, Christianson HC, Welch JE, Svensson KJ, Fredlund E, Ringnér M, et al. Exosomes reflect the hypoxic status of glioma cells and mediate hypoxia-dependent activation of vascular cells during tumor development. *Proc Natl Acad Sci.* 30 avr 2013;110(18):7312-7.
56. Kosaka N, Takeshita F, Yoshioka Y, Hagiwara K, Katsuda T, Ono M, et al. Exosomal tumor-suppressive microRNAs as novel cancer therapy: "Exocure" is another choice for cancer treatment. *Adv Drug Deliv Rev.* 1 mars 2013;65(3):376-82.
57. Peinado H, Alečković M, Lavotshkin S, Matei I, Costa-Silva B, Moreno-Bueno G, et al. Melanoma exosomes educate bone marrow progenitor cells toward a pro-metastatic phenotype through MET. *Nat Med.* juin 2012;18(6):883-91.
58. De Toro J, Herschlik L, Waldner C, Mongini C. Emerging Roles of Exosomes in Normal and Pathological Conditions: New Insights for Diagnosis and Therapeutic Applications. *Front Immunol* [Internet]. 2015 [cité 14 janv 2023];6. Disponible sur: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fimmu.2015.00203>

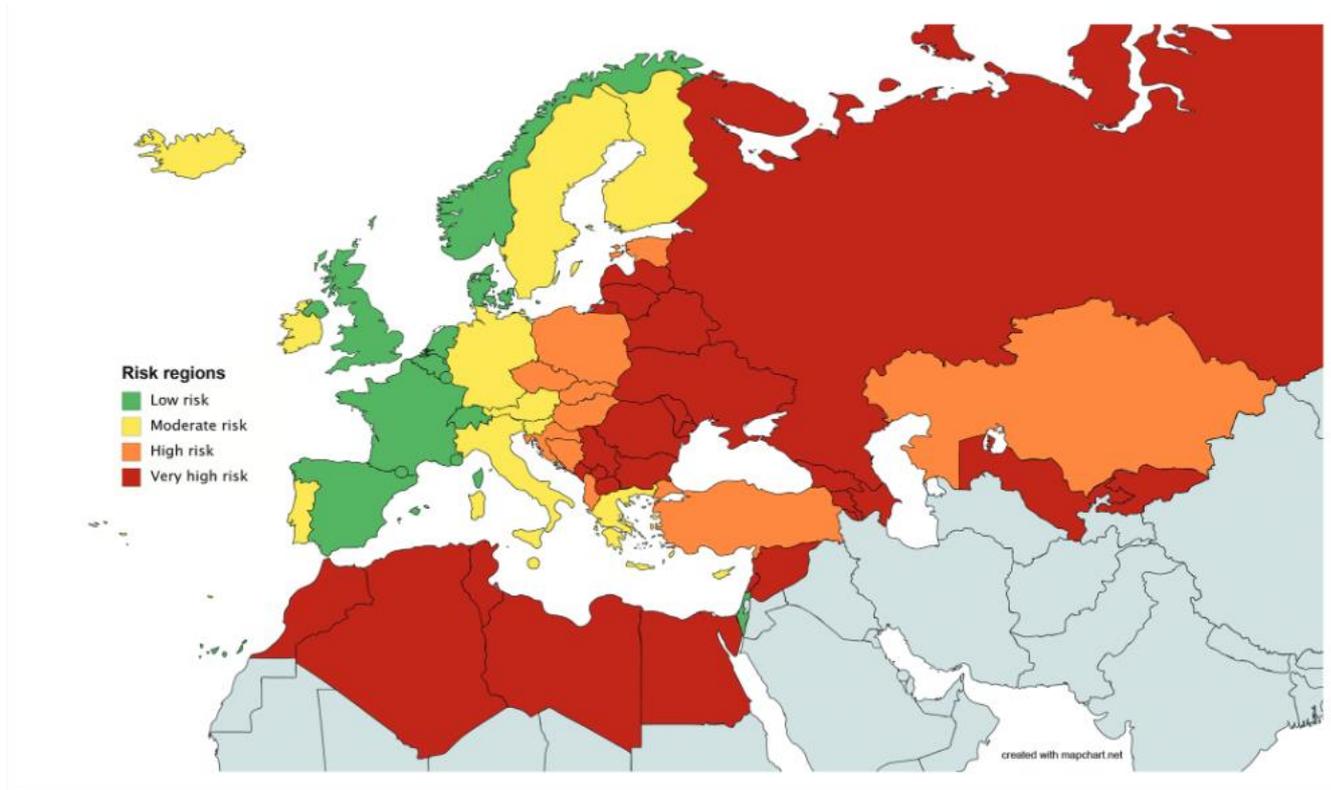
59. Amabile N, Rautou PE, Tedgui A, Boulanger CM. Microparticles: Key Protagonists in Cardiovascular Disorders. *Semin Thromb Hemost.* nov 2010;36(08):907-16.
60. Ishibashi O, Ali MM, Takeshita T, Takizawa T. Placental Exosome-Associated MicroRNAs in Normal Pregnancy and Preeclampsia. *J Nippon Med Sch.* 2011;78(1):48-9.
61. Mincheva-Nilsson L, Baranov V. Placenta-Derived Exosomes and Syncytiotrophoblast Microparticles and their Role in Human Reproduction: Immune Modulation for Pregnancy Success. *Am J Reprod Immunol.* 2014;72(5):440-57.
62. Temme S, Eis-Hübinger AM, McLellan AD, Koch N. The Herpes Simplex Virus-1 Encoded Glycoprotein B Diverts HLA-DR into the Exosome Pathway. *J Immunol.* 14 déc 2009;184(1):236-43.
63. Nguyen DG, Booth A, Gould SJ, Hildreth JEK. Evidence That HIV Budding in Primary Macrophages Occurs through the Exosome Release Pathway \*. *J Biol Chem.* 26 déc 2003;278(52):52347-54.
64. Marcilla A, Treliis M, Cortés A, Sotillo J, Cantalapiedra F, Minguez MT, et al. Extracellular vesicles from parasitic helminths contain specific excretory/secretory proteins and are internalized in intestinal host cells. *PLoS One.* 2012;7(9):e45974.
65. Ronquist G, Hedström M. Restoration of detergent-inactivated adenosine triphosphatase activity of human prostatic fluid with concanavalin A. *Biochim Biophys Acta BBA - Enzymol.* 11 août 1977;483(2):483-6.
66. Słomka A, Urban SK, Lukacs-Kornek V, Żekanowska E, Kornek M. Large Extracellular Vesicles: Have We Found the Holy Grail of Inflammation? *Front Immunol [Internet].* 2018 [cité 14 août 2022];9. Disponible sur: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fimmu.2018.02723>
67. Robbins PD, Morelli AE. Regulation of immune responses by extracellular vesicles. *Nat Rev Immunol.* mars 2014;14(3):195-208.
68. Raposo G, Nijman HW, Stoorvogel W, Liejendekker R, Harding CV, Melief CJ, et al. B lymphocytes secrete antigen-presenting vesicles. *J Exp Med.* 1 mars 1996;183(3):1161-72.
69. Admyre C, Johansson SM, Paulie S, Gabrielsson S. Direct exosome stimulation of peripheral human T cells detected by ELISPOT. *Eur J Immunol.* 2006;36(7):1772-81.
70. Clayton A, Mitchell JP, Court J, Mason MD, Tabi Z. Human Tumor-Derived Exosomes Selectively Impair Lymphocyte Responses to Interleukin-2. *Cancer Res.* 1 août 2007;67(15):7458-66.
71. Szajnik M, Czystowska M, Szczepanski MJ, Mandapathil M, Whiteside TL. Tumor-Derived Microvesicles Induce, Expand and Up-Regulate Biological Activities of Human Regulatory T Cells (Treg). *PLOS ONE.* 22 juill 2010;5(7):e11469.
72. Hessvik NP, Llorente A. Current knowledge on exosome biogenesis and release. *Cell Mol Life Sci CMLS.* janv 2018;75(2):193-208.
73. Ailawadi S, Wang X, Gu H, Fan GC. Pathologic function and therapeutic potential of exosomes in cardiovascular disease. *Biochim Biophys Acta.* janv 2015;1852(1):1-11.

74. Kowal J, Arras G, Colombo M, Jouve M, Morath JP, Primdal-Bengtson B, et al. Proteomic comparison defines novel markers to characterize heterogeneous populations of extracellular vesicle subtypes. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 23 févr 2016;113(8):E968-977.
75. Keerthikumar S, Gangoda L, Liem M, Fonseka P, Atukorala I, Ozcitti C, et al. Proteogenomic analysis reveals exosomes are more oncogenic than ectosomes. *Oncotarget*. 20 juin 2015;6(17):15375-96.
76. Minciocchi VR, You S, Spinelli C, Morley S, Zandian M, Aspuria PJ, et al. Large oncosomes contain distinct protein cargo and represent a separate functional class of tumor-derived extracellular vesicles. *Oncotarget*. 10 mai 2015;6(13):11327-41.
77. Jeppesen DK, Fenix AM, Franklin JL, Higginbotham JN, Zhang Q, Zimmerman LJ, et al. Reassessment of Exosome Composition. *Cell*. 4 avr 2019;177(2):428-445.e18.
78. Valadi H, Ekström K, Bossios A, Sjöstrand M, Lee JJ, Lötvall JO. Exosome-mediated transfer of mRNAs and microRNAs is a novel mechanism of genetic exchange between cells. *Nat Cell Biol*. juin 2007;9(6):654-9.
79. Bang C, Batkai S, Dangwal S, Gupta SK, Foinquinos A, Holzmann A, et al. Cardiac fibroblast-derived microRNA passenger strand-enriched exosomes mediate cardiomyocyte hypertrophy. *J Clin Invest*. mai 2014;124(5):2136-46.
80. Sahoo S, Adamiak M, Mathiyalagan P, Kenneweg F, Kafert-Kasting S, Thum T. Therapeutic and Diagnostic Translation of Extracellular Vesicles in Cardiovascular Diseases: Roadmap to the Clinic. *Circulation*. 6 avr 2021;143(14):1426-49.
81. Pieragostino D, Cicalini I, Lanuti P, Ercolino E, di Ioia M, Zucchelli M, et al. Enhanced release of acid sphingomyelinase-enriched exosomes generates a lipidomics signature in CSF of Multiple Sclerosis patients. *Sci Rep*. 15 févr 2018;8:3071.
82. Zaborowski MP, Balaj L, Breakefield XO, Lai CP. Extracellular Vesicles: Composition, Biological Relevance, and Methods of Study. *BioScience*. 1 août 2015;65(8):783-97.
83. Livshits MA, Khomyakova E, Evtushenko EG, Lazarev VN, Kulemin NA, Semina SE, et al. Isolation of exosomes by differential centrifugation: Theoretical analysis of a commonly used protocol. *Sci Rep*. 30 nov 2015;5(1):17319.
84. Zhang M, Jin K, Gao L, Zhang Z, Li F, Zhou F, et al. Methods and Technologies for Exosome Isolation and Characterization. *Small Methods*. 2018;2(9):1800021.
85. Zeringer E, Barta T, Li M, Vlassov AV. Strategies for isolation of exosomes. *Cold Spring Harb Protoc*. 1 avr 2015;2015(4):319-23.
86. Zhao Z, Yang Y, Zeng Y, He M. A microfluidic ExoSearch chip for multiplexed exosome detection towards blood-based ovarian cancer diagnosis. *Lab Chip*. 26 janv 2016;16(3):489-96.
87. Kanwar SS, Dunlay CJ, Simeone DM, Nagraath S. Microfluidic device (ExoChip) for on-chip isolation, quantification and characterization of circulating exosomes. *Lab Chip*. 6 mai 2014;14(11):1891-900.
88. Lötvall J, Hill AF, Hochberg F, Buzás EI, Di Vizio D, Gardiner C, et al. Minimal experimental requirements for definition of extracellular vesicles and their functions: a position statement from the International Society for Extracellular Vesicles. *J Extracell Vesicles*. 2014;3:26913.

89. Yang D, Zhang W, Zhang H, Zhang F, Chen L, Ma L, et al. Progress, opportunity, and perspective on exosome isolation - efforts for efficient exosome-based theranostics. *Theranostics*. 2020;10(8):3684-707.
90. Doyle L, Wang M. Overview of Extracellular Vesicles, Their Origin, Composition, Purpose, and Methods for Exosome Isolation and Analysis. *Cells*. 15 juill 2019;8(7):727.
91. Théry C, Witwer KW, Aikawa E, Alcaraz MJ, Anderson JD, Andriantsitohaina R, et al. Minimal information for studies of extracellular vesicles 2018 (MISEV2018): a position statement of the International Society for Extracellular Vesicles and update of the MISEV2014 guidelines. *J Extracell Vesicles*. 2018;7(1):1535750.
92. Freda BJ, Tang WHW, Van Lente F, Peacock WF, Francis GS. Cardiac troponins in renal insufficiency: Review and clinical implications. *J Am Coll Cardiol*. 18 déc 2002;40(12):2065-71.
93. Habertheuer A, Korutla L, Rostami S, Reddy S, Lal P, Naji A, et al. Donor tissue-specific exosome profiling enables noninvasive monitoring of acute rejection in mouse allogeneic heart transplantation. *J Thorac Cardiovasc Surg*. juin 2018;155(6):2479-89.
94. Zarà M, Campodonico J, Cosentino N, Biondi ML, Amadio P, Milanesi G, et al. Plasma Exosome Profile in ST-Elevation Myocardial Infarction Patients with and without Out-of-Hospital Cardiac Arrest. *Int J Mol Sci*. 28 juill 2021;22(15):8065.
95. Hu RW, Korutla L, Reddy S, Harmon J, Zielinski PD, Bueker A, et al. Circulating Donor Heart Exosome Profiling Enables Noninvasive Detection of Antibody-mediated Rejection. *Transplant Direct*. nov 2020;6(11):e615.
96. Alvarez-Llamas G, de la Cuesta F, Barderas MEG, Darde V, Padial LR, Vivanco F. Recent advances in atherosclerosis-based proteomics: new biomarkers and a future perspective. *Expert Rev Proteomics*. oct 2008;5(5):679-91.
97. Lu M, Yuan S, Li S, Li L, Liu M, Wan S. The Exosome-Derived Biomarker in Atherosclerosis and Its Clinical Application. *J Cardiovasc Transl Res*. févr 2019;12(1):68-74.
98. Gallart-Palau X, Serra A, Wong ASW, Sandin S, Lai MKP, Chen CP, et al. Extracellular vesicles are rapidly purified from human plasma by PROtein Organic Solvent PREcipitation (PROSPR). *Sci Rep*. 30 sept 2015;5:14664.
99. Ruf J, Vairo D, Paganelli F, Guieu R. Extracellular vesicles with ubiquitinated adenosine A2A receptor in plasma of patients with coronary artery disease. *J Cell Mol Med*. oct 2019;23(10):6805-11.

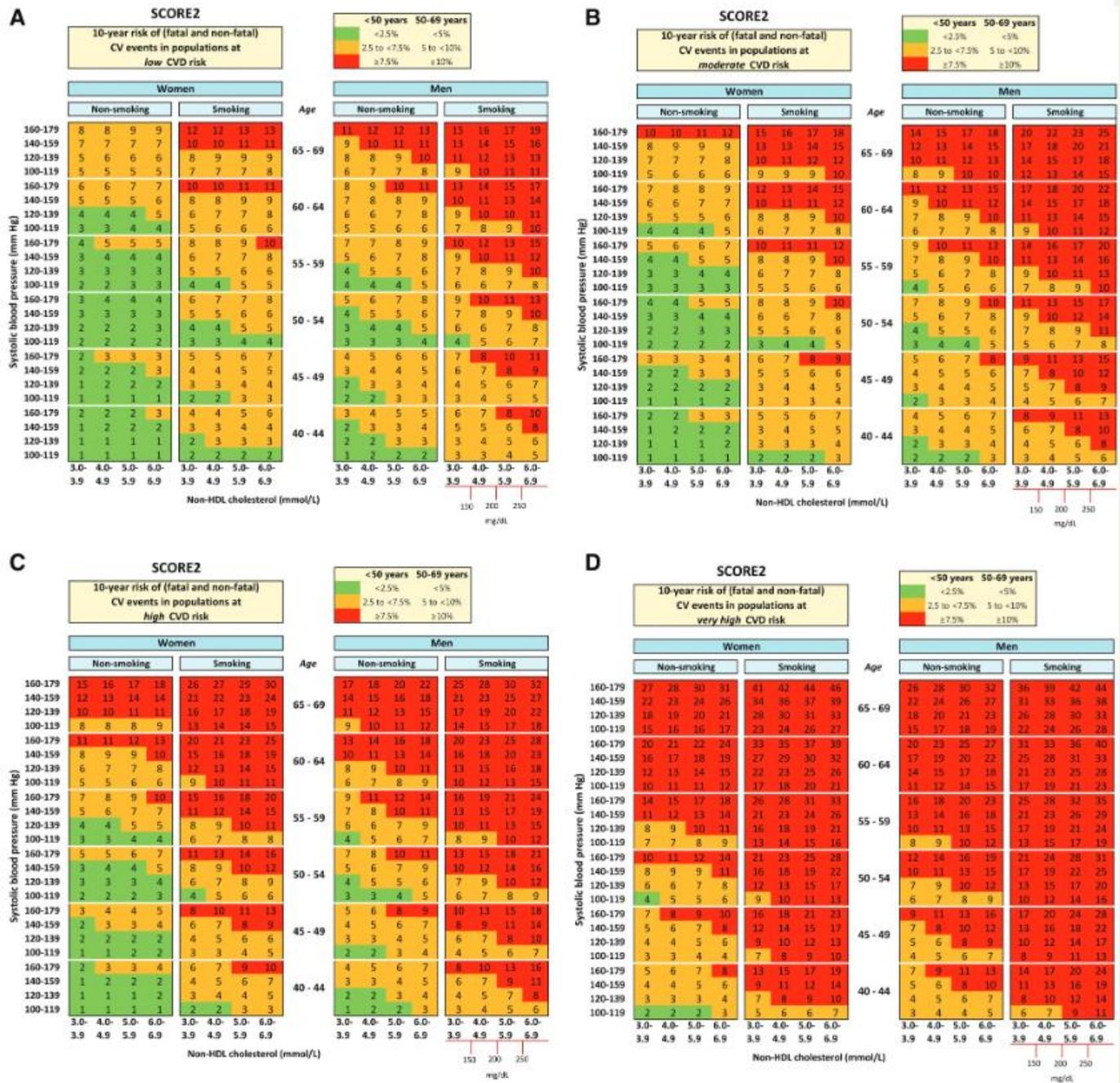
## ANNEXES

### Annexe 1 :



Régions à risque basées sur les taux de mortalité par maladies cardiovasculaires standardisés. Risque faible (<100 décès par MCV pour 100 000), risque modéré (100 à <150 décès par MCV pour 100 000), risque élevé (150 à <300 décès par MCV pour 100 000) et risque très élevé (>\_300 décès pour 100 000).

Annexe 2 :



Grille SCORE2 pour l'estimation du risque de MCV dans les quatre régions européennes à risque.

## SERMENT DE GALIEN

*Je jure, en présence de mes maîtres de la Faculté, des conseillers de l'Ordre des pharmaciens et de mes condisciples :*

- ❖ D'honorer ceux qui m'ont instruit dans les préceptes de mon art et de leur témoigner ma reconnaissance en restant fidèle à leur enseignement.*
- ❖ D'exercer, dans l'intérêt de la santé publique, ma profession avec conscience et de respecter non seulement la législation en vigueur, mais aussi les règles de l'honneur, de la probité et du désintéressement.*
- ❖ De ne jamais oublier ma responsabilité et mes devoirs envers le malade et sa dignité humaine, de respecter le secret professionnel.*
- ❖ En aucun cas, je ne consentirai à utiliser mes connaissances et mon état pour corrompre les mœurs et favoriser des actes criminels.*

*Que les hommes m'accordent leur estime si je suis fidèle à mes promesses.*

*Que je sois couvert d'opprobre, méprisé de mes confrères, si j'y manque.*



# Résumé

Les maladies cardiovasculaires sont l'une des principales causes de mortalité dans le monde. L'infarctus du myocarde est l'une des formes les plus fréquentes et les plus graves de ces pathologies. Un diagnostic précoce et précis de l'infarctus du myocarde est essentiel pour une prise en charge rapide et efficace des patients. Dans cette thèse, nous avons développé un nouveau test diagnostique basé sur le dosage d'isoforme cardiospécifique de la troponine, une protéine de structure du tissu myocardique, dans les exosomes. Ces derniers étant des vésicules de taille nanométrique excrétée par la plupart des cellules humaines, dont le myocarde. Elles peuvent transporter une grande diversité d'éléments différents comme des protéines, de l'ARN ou des lipides. L'objectif est de confirmer l'excrétion de troponine cardiaque par cette voie et de comparer ces valeurs avec le dosage plasmatique classique de la troponine, réalisé dans la plupart des protocoles diagnostiques d'infarctus du myocarde. Nous avons utilisé une technique générale de précipitation pour isoler les vésicules extracellulaires circulantes, dont les exosomes, dans le plasma de 2 groupes de patients (séparés en fonction de la positivité de la troponine T ultrasensible via le 99<sup>ème</sup> percentile). Nous avons montré que les valeurs exosomales étaient plus élevées chez les patients souffrants de maladie cardiovasculaire, ainsi qu'il existait des concentrations exosomales en troponine mesurables alors qu'indosables dans le plasma. Par ailleurs les concentrations exosomales en troponine étaient plus élevées chez quelques patients sous chimiothérapie anticancéreuse, ce qui pourrait prédire les risques de myocardites iatrogènes. Cependant, des études complémentaires sont nécessaires pour réaliser, sur des isolats mieux purifiés d'exosomes, des études incluant à la fois un plus grand nombre de patients, et des prélèvements étalés dans le temps pour déterminer des valeurs critiques ainsi qu'une cinétique d'élimination.