



**HAL**  
open science

# Analyses quantitative et qualitative sur puce de vésicules extracellulaires en milieux complexes au sein d'une plateforme nanobioanalytique

Sameh Obeid

► **To cite this version:**

Sameh Obeid. Analyses quantitative et qualitative sur puce de vésicules extracellulaires en milieux complexes au sein d'une plateforme nanobioanalytique. Biotechnologies. Université Bourgogne-Franche-Comté, 2017. Français. NNT: . tel-01785472v1

**HAL Id: tel-01785472**

**<https://theses.hal.science/tel-01785472v1>**

Submitted on 16 May 2018 (v1), last revised 18 May 2018 (v2)

**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.

Université de Franche-Comté

Ecole doctorale SPIM

---

**Thèse de Doctorat**

Spécialité Sciences pour l'ingénieur

Présentée et soutenue publiquement le 11 mai 2017 par

**Sameh OBEID**

Pour l'obtention du titre de docteur de l'université de Franche-Comté

**Analyses quantitative et qualitative sur puce de  
vésicules extracellulaires  
en milieux complexes au sein d'une plateforme  
nanobioanalytique**

**Jury:**

**Dr. Pierre FONTANA (Rapporteur)**

**Dr. Yoann ROUPIOZ (Rapporteur)**

**Dr. Alexandre BERQUAND**

**Dr. Florence GAZEAU**

**Dr. Céline ELIE-CAILLE**

**Dr. Wilfrid BOIREAU**



**“We all die. The goal isn't to live forever, the goal is to create something that will.”**

**Unknown**

# Remerciements

Le travail de thèse exposé dans ce manuscrit a été réalisé au sein de l'équipe BioMicroDevices (BMD) du département Micro Nano sciences & systèmes (MN2S) de l'institut FEMTO-ST. Je remercie ainsi le Pr. **Laurent LARGER**, directeur de l'institut FEMTO-ST, Pr. **Thérèse LEBLOIS**, directrice de l'équipe BMD, et tous les membres de l'institut.

J'exprime ma plus sincère reconnaissance aux Pr. **Pierre FONTANA** et Dr. **Yoanne ROUIPOZ** pour avoir accepté de rapporter mon travail de thèse et de faire partie de mon jury. Je tiens également à remercier le Dr. **Alexandre BERQUAND** et Dr. **Florence GAZEAU** pour avoir accepté de faire partie de mon jury.

Je remercie profondément mon directeur de thèse, Dr. **Wilfrid BOIREAU**, chargé de recherche HDR CNRS et directeur du département MN2S, et Dr. **Céline ELIE-CAILLE**, co-encadrante de thèse et Maître de conférences à l'université de Bourgogne-Franche Comté, pour m'avoir donné cette chance et fait confiance. Merci pour vos conseils, votre souplesse, la liberté de recherche que vous m'avez accordée et pour m'avoir offert l'opportunité de ma première communication orale dans un congrès international.

Je souhaite remercier tous nos collaborateurs pour leur précieuse contribution à ce projet ; le Dr. **Gaël BELLIOU**, CHU Dijon, pour fournir les particules virales ; le Pr. **Philippe SAAS**, Dr. **Guillaume MOUREY** et Dr. **Adam CEROI**, de l'établissement français du sang (EFS, Bourgogne Franche Comté), et le Pr. **Thierry BURNOUF**, de l'université de médecine de Taipei (Taiwan), pour les projets collaboratifs et pour fournir différents échantillons de vésicules extracellulaires.

Je tiens à remercier les différentes personnes que j'ai pu côtoyer tout au long de ma thèse ; **Alain ROULEAU**, pour ses remarques, ses conseils et sa disponibilité que ça soit à la paillassette comme dans la discussion. Aussi d'autres personnes ont été très présentes pour moi : **Audrey GUITTON**, **Annie BARRAND**, **Fabien REMY-MARTIN**, **Rabah ZEGGARI**, **Benoit LEROY**, **Stéphanie SEGUIN**, **Karine CHARRIERE** et **Ksenia MAXIMOVA**. Mes remerciements vont aussi aux doctorants passés et présents de FEMTO-ST, **Charles-Louis AZZOPARDI**, **Vivien LACOUR**, **Juliana CHAWICH** et **Claude HUMBERT**.

Vous m'avez accompagné et soutenu pendant les dernières années. Merci pour votre bonne humeur et votre gentillesse qui ont contribué à créer une ambiance mémorable.

Je voudrais également exprimer toute ma gratitude au Dr. **Pierre-Henry PUECH**, mon ancien maître de stage de M2. C'est grâce à lui que j'ai pu être engagé dans ce projet de thèse.

Je remercie aussi **mes parents** pour leur aide financière et morale; c'est grâce à eux que j'ai pu réaliser cette thèse.

Un grand merci à ma copine, **Kyriaki TSALKITZI**, qui m'a accompagné et soutenu durant la période de thèse.

# Résumé

Les vésicules extracellulaires (VEs) sont des nanovésicules circulantes (30 à 1000 nm de diamètre) libérées dans l'espace extracellulaire par la plupart des cellules humaines, suite à leur activation ou à leur apoptose. Les VEs se divisent en 3 grandes catégories : les exosomes (EXO), les microparticules (MPs) et les corps apoptotiques (cAPO). Les VEs sont présentes à l'état physiologique dans les différents fluides biologiques du corps humain (plasma, salive, urine, etc.) et jouent un rôle majeur dans différents processus physio-pathologiques.

De nos jours, plusieurs techniques, dont certaines en routine, sont utilisées pour étudier les VEs. Cependant, aucune d'entre elles ne permet de déterminer à la fois leur concentration, leur taille et leurs caractéristiques biochimiques. Un consensus existe sur la nécessité de combiner des techniques pour disposer enfin d'une caractérisation fine et complète des VEs. Il est donc d'un intérêt majeur de développer des plateformes analytiques pour améliorer la qualification des échantillons biologiques et découvrir, au sein de sous-populations vésiculaires, de nouveaux biomarqueurs de pathologies humaines ou bio-indicateurs de suivi thérapeutique.

Notre projet consiste à développer une plateforme NanoBioAnalytique (NBA) combinant trois techniques : l'imagerie par Résonance des Plasmons de Surface (SPRi), la Microscopie à Force Atomique (AFM) et la Spectrométrie de Masse (MS). L'enjeu est de valider une interface biopuce-instruments qui permettra d'effectuer des investigations multi-physiques et multi échelles apportant, en une stratégie globale, les informations les plus complètes sur les différentes populations de VEs.

La technique SPRi représente la première étape analytique en permettant la capture spécifique des VEs en format multiplex. Cette capture sélective est le résultat d'une architecture de biopuce présentant (i) différents biorécepteurs spécifiques immobilisés en spot et (ii) une surface biofonctionnalisée limitant les interactions non spécifiques au contact d'échantillons biologiques complexes. La SPRi permet de suivre le taux de capture et de quantifier les vésicules extracellulaires sur les différentes zones de biorécepteurs, en temps réel et sans marquage.

A partir de ces biopuces à VEs, différentes investigations peuvent être menées pour parfaire leur caractérisation. L'une d'entre elle consiste en la caractérisation nano-métrologique par AFM (taille, morphologie, dénombrement...) des VEs sélectivement capturées. L'AFM dispose d'une résolution telle qu'elle permet de discriminer des vésicules uniques jusqu'aux agrégats (protéiques, vésiculaires), conduisant ainsi à une caractérisation précise des différentes sous-populations de VEs. Le couplage SPRi-AFM a été adapté pour simplifier l'imagerie des différentes zones de biorécepteurs, avoir une vue globale représentative de la surface et mesurer la taille de milliers de particules individuelles.

Une autre possibilité porte sur une interrogation de la biopuce par spectrométrie de masse (MS) qui permet de générer une signature protéomique spécifique des VEs capturées. Cette

stratégie permet une analyse protéomique sélective de VEs, ce qui permet de mieux caractériser les différentes sous-populations de VEs et mieux comprendre les mécanismes exacts impliqués dans leur biogenèse et leurs fonctions biologiques.

Le développement d'outils et de méthodes pour le dosage et la métrologie de particules nécessite une étape de calibration, et, pour cela, nous avons mis au point des calibrants internes. Ici, deux calibrants couvrant le domaine de taille des VEs ont été développés: (i) des particules virales CP50 (diamètre moyen de 50 nm), et (ii) des particules synthétiques CP920 biofonctionnalisées par la protéine LAG-3 (diamètre de 920 nm). Les tests d'immuno-capture des calibrants en SPRi ont montré une grande spécificité avec une gamme dynamique de  $10^7$  à  $10^{12}$  particules/mL et sans interférence avec les milieux biologiques. Nous avons démontré que cette gamme recouvrait la gamme de concentrations physiologiques en VEs des 3 projets collaboratifs que comporte cette étude. D'autre part, l'interrogation *in-situ* des calibrants sur biopuce par l'AFM a pu être mise en place et conduire à leur analyse nanométrique. Ainsi, la densité des particules calibrants à la surface de la puce, déterminée par AFM, a été corrélée avec le taux de capture de ces dernières déterminé par SPR.

Dans un deuxième temps, nous avons éprouvé notre plateforme NBA vis-à-vis de différents échantillons naturels de VEs issus de deux collaborations : (i) un projet avec une équipe INSERM (U1098, EFS Bourgogne Franche-Comté, Besançon, France) qui s'intéresse à l'exploitation du rôle des VEs plaquettaires (PVEs) générées sous différentes conditions dans la modulation de la réponse inflammatoire. Dans ce cas, la plateforme NBA a été utilisée pour la caractérisation des VEs générées à partir des plaquettes dans leur état basal et des VEs libérées par les plaquettes suite à leur activation par du collagène. (ii) Une collaboration avec le professeur T. Burnouf (Université de Médecine de Taipei, Taiwan) qui vise à mieux comprendre l'effet des VEs sur les patients dans le cadre de la transfusion sanguine et d'explorer comment la nanofiltration du plasma pourrait diminuer le risque de thrombogénicité. L'équipe du professeur Burnouf a mis en évidence le rôle des PVEs générées sous différentes conditions, en particulier dans l'induction de l'agrégation des cellules monocytaires et de la libération des VEs exprimant le facteur tissulaire par ces dernières. L'impact de la nanofiltration du plasma sur l'élimination d'une partie de VEs plasmatiques et la diminution de risque de thrombogénicité *in-vitro* est également un objectif poursuivi. Dans ce cadre, la plateforme NBA a été utilisée dans un premier temps pour comparer les PVEs d'origine plaquettaire, qu'elles soient basales ou activées à la thrombine. Ensuite, l'objectif était de comparer le contenu en VEs dans des échantillons de plasma ayant subi ou non une étape de nanofiltration à travers un filtre de 75 nm.

Ces travaux ont montré la capacité de notre plateforme à détecter sélectivement différentes sous-populations de VEs co-existantes dans un échantillon complexe, tel que le plasma, en s'appuyant sur l'expression différentielle de 6 marqueurs membranaires simultanément. Les taux de capture se sont avérés être directement corrélés à la concentration des vésicules dans

l'échantillon injecté. L'analyse AFM a permis de déterminer la distribution en taille de différentes sous-populations de VEs sur la gamme de 20 à 1000 nm. Cette analyse montre que la majorité des vésicules ( $\approx 98\%$ ) sont inférieures à 300 nm avec une population majeure ( $\approx 80\%$ ) en dessous de 100 nm. De plus, une analyse différentielle a permis de révéler une distribution en taille liée aux conditions de leur genèse (ex. état basales ou activées) mais aussi impactée par les protocoles de préparation des échantillons (ex. nanofiltration). Enfin, des études protéomiques « sur-puce » ont également été engagées afin de caractériser la composition en protéines des VEs libérées sous différentes conditions. Cette analyse de grande sensibilité ( $<1\mu\text{g}$  de protéines totales) a permis d'établir des premiers profils protéomiques différentiels des VEs, permettant l'identification de centaines de protéines du « vésiculome ».

La plateforme NBA se révèle être une méthode efficace pour caractériser et quantifier les VEs, sans-marquage et avec une grande sensibilité, sur une large gamme dynamique ( $\approx 10^7$  à  $10^{12}$  particules/mL), cohérente avec celle existante en fluide physiologique et sur une plage de taille couvrant deux décades. Elle s'inscrit parmi les approches les plus prometteuses pour l'investigation des VEs, en complément de la cytométrie en flux. La grande adaptabilité de cette méthode d'analyse des VEs ouvre de larges perspectives de déploiement dans les secteurs de la Santé, de l'Environnement et de l'Agro-alimentaire.



# Abstract

Extracellular vesicles (EVs) are small vesicles (30 to 1000 nm) released from different cell types, upon activation or apoptosis, and present in most body fluids (Blood, Urine...). Based on the current state of knowledge of their biogenesis and biochemical properties, EVs can be divided into three distinct populations: exosomes (EXO), microparticles (MPs) and apoptotic bodies (APOB). EVs have been found to play important biological roles and are also biomarkers of different pathologies.

Despite the numerous technics used to study EVs, none of them allows to characterize and quantify EVs at the same time. Consequently, it's believed that only a combination of techniques can provide the required set of information needed for assessing EVs.

Our project aims to develop a NanoBioAnalytical (NBA) platform for on-chip, label-free, quantification and characterization of EVs in their crude sample. This NBA platform consists of combining three techniques: Surface Plasmon Resonance (SPR) technique, Atomic Force Microscopy (AFM) and Mass Spectrometry (MS). The challenge is to bring all the analysis on the surface of a multiplexed gold biochip presenting different specific bioreceptors organized into arrays.

The first step consists of the injection of the samples containing EVs onto the biochip surface. This step is accomplished by SPR technique that allows label-free monitoring of EVs immunocapture onto the surface of a biochip presenting different specific bioreceptors. Following the capture of EVs, a nanometrological investigation of the biochip surface by AFM is engaged to characterize the physical properties of captured vesicles (size, morphology, etc.). Owing a nanometrical resolution, AFM can discriminate between individual EVs and vesicles or protein aggregates, leading to an accurate characterization of individual vesicles. The coupling of SPR technique with AFM was adapted to offer a representative global view of each array of bioreceptors and to measure the size of thousands of individual EVs.

A proteomic investigation was also engaged to characterize the proteomic compositions of the different subpopulations of EVs. Such an investigation could contribute to the understanding of EVs biogenesis, biology and pathophysiology.

To evaluate the potential of our platform to detect, quantify and characterize nanoparticles, two calibration particles, which cover the lower and upper size range of EVs, were chosen: (i) virus-like particles of 50 nm of diameter, also called CP50, and (ii) protein-functionnalized synthetic beads of 920 nm of diameter, called CP920. The capture tests in SPR showed a specific capture of these two calibration particles with their specific bioreceptors, immobilized onto the biochip surface, regardless the complexity of the media in which they were diluted. Also, a positive correlation was obtained between the capture level, measured by SPR, and the particle

concentration in the injected solution over a dynamic range about  $10^7$  to  $10^{12}$  particles/mL. This concentration range matches the typical range of VEs in biological fluids. On the other side, we have showed a positive correlation between the capture level (SPR signal) and the surface density (number of particles/mm<sup>2</sup>) as measured by AFM, for CP50, and by optical microscopy for CP920.

In a second time, we have applied the NBA platform to study EVs in different types of samples provided within two collaboration projects: (i) First, a project with a team of INSERM U1098 (EFS Bourgogne Franche-Comté, Besançon, France) which is interested to investigate the effect of platelet-EVs in the modulating of the inflammatory response. The NBA platform was used to characterize two types of EVs: EVs generated from resting platelets or collagen activated platelets. (ii) Another project has been implemented with the Professor T. Burnouf (Medical university of Taipei, Taiwan) that aims to evaluate the EVs impact on patients during blood transfusion. In this context we have characterized EVs released from resting and thrombin activated platelets and also the EVs content in plasma samples that have undergone, or not, a nanofiltration process.

These studies have proved the potential of our NBA platform to detect selectively and simultaneously different EVs subpopulations in complex samples, such as plasma, on the basis of their expression of up to 6 different membrane markers. The capture level seems to be representative of the concentration of EVs in the injected sample. AFM analysis was able to provide nanometrological characterization of the captured EVs. Results show that the majority of EVs ( $\approx 98\%$ ) are smaller than 300 nm with a major population ( $\approx 80\%$ ) below 100 nm. Also, different size distribution profiles were related to the experimental condition adopted to generate EVs (ex. Resting vs activation states of cells) and to the preparation protocol of the samples (ex. Nanofiltration). Finally, a proteomic analysis was engaged to study the protein compositions of EVs generated under different conditions. This highly sensitive analysis ( $< 1 \mu\text{g}$  of total proteins) has provided preliminary differential proteomic profiles of EVs in different samples.

This platform offers a promising novel, sensitive and label-free method to characterize EVs on their whole size-range and over a wide concentration range dynamique ( $\approx 10^7$  to  $10^{12}$  vesicles/mL) that matches with EVs concentration ranges in body fluids. The great adaptability of this method opens up wide-ranging opportunities for applications in health, environmental and food-industry sectors.



# Table des matières

<b>Remerciements</b> .....	<b>4</b>
<b>Résumé</b> .....	<b>5</b>
<b>Abstract</b> .....	<b>8</b>
<b>Tables des matières</b> .....	<b>11</b>
<b>Abréviations</b> .....	<b>16</b>
<b>Introduction</b> .....	<b>18</b>
<b>I. Les vésicules extracellulaires (VEs)</b> .....	<b>20</b>
<b>1. Aspect général</b> .....	<b>20</b>
1.1. Historique .....	20
1.2. Rôles physiologiques et pathologiques des VEs .....	22
1.2.1. Inflammation .....	22
1.2.2. Coagulation.....	22
1.2.3. Cancer .....	22
1.2.4. Maladies infectieuses.....	23
1.2.5. Protection des cellules .....	23
1.3. Interaction des VEs avec les cellules cibles.....	24
1.4. Clairance des VEs.....	25
<b>2. Classifications des VEs</b> .....	<b>25</b>
2.1. Les exosomes (Exo) .....	26
2.1.1. Généralités.....	26
2.1.2. Biogenèse.....	27
2.1.3. Compositions biomoléculaires des exosomes .....	29
2.2. Les microparticules (MPs).....	30
2.2.1. Généralités.....	30
2.2.2. Biogenèse.....	30
2.2.3. Compositions biomoléculaires des microparticules .....	33
2.3. Les corps apoptotiques (cAPO).....	34
2.3.1. Généralités.....	34
2.3.2. Biogenèse.....	34
2.3.3. Compositions biomoléculaires des corps apoptotiques .....	35
2.4. Tableau récapitulatif des caractéristiques de VEs .....	35

<b>3. Détection et caractérisation .....</b>	<b>36</b>
3.1. Aspect pré-analytique.....	36
3.1.1. Centrifugation différentielle.....	36
3.1.2. Centrifugation sur gradient .....	39
3.1.3. Filtration .....	40
3.1.4. Chromatographie d'exclusion.....	41
3.1.5. Immunocapture .....	42
3.1.6. Précipitation par des polymères .....	42
3.1.7. Tableau comparatif des techniques d'isolement de VEs .....	42
3.2. Aspect analytique.....	43
3.2.1. Techniques de caractérisation des VEs en solution (3D).....	43
3.2.1.1. Quantification et détermination du phénotype.....	43
3.2.1.2. Profil métrologique .....	45
3.2.1.3. Profil chimique.....	47
3.2.2. Techniques de caractérisation sur surface (2D) .....	48
3.2.2.1. Biodétection avec marquage .....	48
3.2.2.2. Biodétection sans marquage .....	49
3.2.2.3. Profil morphologique et métrologique.....	50
3.2.3. Analyse protéomique et lipidomique.....	52
3.2.4. Combinaison de techniques .....	53
<b>II. Mise au point de la plateforme NanoBioAnalytique NBA .....</b>	<b>57</b>
<b>1. La biopuce d'or .....</b>	<b>58</b>
1.1. La fabrication des puces d'or.....	58
1.2. Fonctionnalisation chimique des puces .....	59
1.2.1. Les monocouches autoassemblées (SAMs).....	59
1.2.2. Greffage des ligands sur SAM.....	61
1.2.3. Blocage et désactivation de la puce .....	62
<b>2. Techniques sans marquage mises en jeu dans la plateforme NBA .....</b>	<b>63</b>
2.1. La résonance des plasmons de surface .....	63
2.1.1. Historique.....	63
2.1.2. Principe de fonctionnement.....	64
2.1.3. Les différents types d'interrogation du plasmon .....	66
2.1.3.1. L'appareil BIAcore .....	67
2.1.3.2. L'appareil SPRi-Plex II.....	68

2.2. La microscopie à force atomique.....	70
2.2.1. Historique.....	71
2.2.2. Principe de fonctionnement.....	72
2.3. La spectrométrie de masse .....	76
2.3.1. Principe de fonctionnement.....	76
2.3.2. NanoLC-ESI-TRAP .....	77
2.3.3. MALDI-TOF/TOF.....	79
<b>3. Aspects expérimentaux et méthodologies.....</b>	<b>80</b>
3.1. Réactifs et produits chimiques.....	80
3.2. Préparation de la biopuce .....	80
3.2.1. Fonctionnalisation chimique .....	80
3.2.2. Activation et greffage des biorécepteurs .....	81
3.2.3. Optimisation des conditions de greffage des ligands.....	83
3.2.4. Blocage et passivation de la surface .....	84
3.2.5. Capture des analytes .....	85
3.3. Analyse protéomique.....	85
<b>4. Interfaçage : la plateforme NBA.....</b>	<b>87</b>
4.1. Couplage SPRi-AFM.....	87
4.1.1. Préparation de la surface pour l'analyse AFM .....	87
4.1.2. Analyse AFM.....	88
4.1.3. Traitement et analyse des images AFM .....	89
4.2. Couplage SPRi-MS .....	91
<b>III. Mise au point des calibrants .....</b>	<b>94</b>
<b>1. Matériels et méthodes .....</b>	<b>94</b>
1.1. Réactifs et produits chimiques.....	94
1.2. Ligands et particules calibrants .....	94
1.2.1. Les différents ligands de capture.....	94
1.2.2. Les particules virales : CP50.....	95
1.2.3. Billes de résine-mélatamine : CP920 .....	96
1.3. Analyse TRPS.....	96
1.4. Analyse AFM.....	97
1.5. Préparation des VEs plaquettaires et caractérisation par cytométrie en flux.....	97
<b>2. Résultats.....</b>	<b>97</b>
2.1. Préparation des ligands et optimization des conditions de greffage.....	97
2.1.1. Purification de l'anti-CP50 à partir de l'ascite .....	97

2.1.2. Optimisation des conditions de greffage des ligands.....	99
2.2. Biofonctionnalisation des billes par LAG-3 .....	100
2.3. Tests de capture des calibrants par leurs anticorps spécifiques .....	101
2.3.1. Capture des CP50.....	101
2.3.2. Capture des CP920.....	110
2.4. Validation de la capture des calibrants dans un milieu complexe .....	112
2.5. Corrélation entre le signal SPR et la densité surfacique en particules capturées.....	113
2.5.1. Capture et comptage des CP50 .....	113
2.5.2. Capture et comptage des CP920 .....	115
<b>3. Conclusion .....</b>	<b>116</b>
<b>IV. Validation de la plateforme NBA en échantillons complexes .....</b>	<b>117</b>
<b>1. Matériels et méthodes .....</b>	<b>117</b>
1.1. Analyse par cytométrie en flux (FC) .....	117
1.2. Analyse TRPS .....	117
1.3. Capture des VEs à la surface de la biopuce en SPRi.....	118
1.4. Analyse AFM des PVEs .....	119
1.5. Analyse protéomique.....	119
<b>2. Tests de préconcentration .....</b>	<b>119</b>
<b>3. Etude des VEs plaquettaires .....</b>	<b>120</b>
3.1. Etude différentielle des VEs plaquettaires basales et activées au collagène (EFS) .....	120
3.1.1. Analyse des PVEs par la cytométrie en flux (FC) .....	121
3.1.2. Immunocapture des PVEs sur puce .....	122
3.1.3. Analyse TRPS des PVEs .....	124
3.1.4. Nanométrie des PVEs .....	125
3.1.4.1. Analyse AFM des PVEs en “milieu liquide” et “en air” .....	125
3.1.4.2. Comparaison de la distribution en taille des PVEs basales et activées au collagène .....	128
3.1.5. Conclusion sur l’étude des PVEs-basales et PVEs-col par SPRi/AFM .....	130
3.2. Etude différentielle des PVEs basales et des PVEs activées à la thrombine .....	131
3.2.1. Immunocapture des PVEs.....	132
3.2.2. Nanométrie des PVEs .....	134
3.2.3. Conclusion sur l’étude de N- et T-PVEs par SPRi/AFM.....	136
3.2.4. Analyse protéomique de PVEs.....	137
3.2.4.1. Conditionnement de la puce en vue de l’analyse MS.....	138
3.2.4.2. Impact de la quantité de PVEs capturées sur les résultats MS .....	139

3.2.4.3.	Analyse protéomique différentielle de N et T-PVEs.....	139
3.2.4.4.	Exploitation des données protéomiques par le logiciel STRING.....	142
3.2.4.5.	Conclusion sur l'étude protéomique de PVEs .....	142
<b>4.</b>	<b>Etude des VEs plasmatiques .....</b>	<b>144</b>
4.1.	Immunocapture des VEs plasmatiques .....	144
4.2.	Analyse TRPS des VEs plasmatiques .....	146
4.3.	Nanométrie des VEs plasmatiques .....	148
4.4.	Phénotypage des VEs capturées sur puce .....	150
4.5.	Conclusion sur l'étude des VEs plasmatiques par la plateforme NBA.....	151
<b>5.</b>	<b>Conclusion .....</b>	<b>152</b>
<b>V.</b>	<b>Conclusion et perspectives.....</b>	<b>155</b>
<b>Annexes</b>	<b>.....</b>	<b>158</b>
<b>Références</b>	<b>.....</b>	<b>175</b>



## Abréviations

NanoBioAnalytique	NBA
Vésicules extracellulaires	VEs
Microparticules	MPs
Exosomes	EXO
Corps apoptotiques	cAPO
VEs plaquettaires	PVEs
Plasma dépourvu en plaquettes	PFP
Plasma pauvre en plaquettes	PPP
Lipopolysaccharide	LPS
Résonance des Plasmons de Surface	SPR
Imagerie de la résonance des plasmons de surface	SPRi
Microscopie à Force Atomique	AFM
Spectrométrie de Masse (MS)	MS
Annexine-V	Annex-V
Phospholipide	PL
Phosphatidylsérine	PS
Phosphatidylcholine	PC
Phosphatidyléthanolamine	PE
Sphingomyéline	SM
Corps multivésiculaires	MVB
Cytométrie en flux	FC
Microscopie électronique	EM
Résonance magnétique nucléaire	RMN
Dynamic Light Scattering	DLS
Nanoparticle Tracking Analysis	NTA
Tunable Resistive Pulse Sensing	TRPS
Diffusion des rayons X aux petits angles	SAXS
Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay	ELISA
Microbalance à quartz	QCM



# Introduction

Les vésicules extracellulaires, VEs, sont produites par la majorité, sinon tous, les types cellulaires et ont été identifiées chez les procaryotes (archées<sup>1</sup> et bactéries<sup>2,3</sup>) comme chez les eucaryotes<sup>4-6</sup>. Par conséquent, elles existent dans l'environnement (sol, eau douce, eau de mer, air...), l'alimentation (fromages, vins, bière, lait, etc.) et sont des constituants de nos fluides biologiques. Ce sont des vésicules libérées dans l'espace extracellulaire par les cellules suite à l'activation ou l'apoptose de ces dernières. Les VEs se retrouvent dans les différents liquides physiologiques du corps humain (plasma, salive, urine, liquide céphalo-rachidien, etc...) de manière stable et à une concentration relativement abondante. Après avoir été longtemps considérées comme des débris cellulaires, l'implication dans de nombreux processus physiopathologiques des ces vésicules est actuellement reconnue et elles sont donc pressenties comme des biomarqueurs de différentes pathologies et des bio-indicateurs de suivi thérapeutique.

L'étude des vésicules extracellulaires, chez l'homme, a commencé il y a environ cinq décennies. Depuis les années 2000, l'émergence de nouvelles instrumentations et leur diffusion dans les domaines de la biologie conjuguée au potentiel fonctionnel de ces particules biologiques ont contribué à un essor considérable des axes de recherche sur les VEs conduisant à une croissance exponentielle du nombre de publications internationales sur ce sujet<sup>7</sup>.

Cependant, les recherches portant sur les VEs rencontrent de nombreux obstacles méthodologiques et instrumentaux, à la fois dans les technologies pré-analytiques (séparation, fractionnement, purification...) mais aussi analytiques qui ne permettent pas une caractérisation fine et exhaustive du pool des VEs. En effet, aucune technique, prise isolément, ne permet de fournir simultanément des informations biochimiques et métrologiques robustes et précises sur les VEs (permettant d'accéder à leur concentration, leur phénotype, leur taille, leur contenu vésiculaire...). Basé sur ce constat, seule une combinaison de méthodes imbriquées au sein d'une plateforme analytique peut fournir des informations exhaustives sur les VEs.

C'est dans ce contexte que nous avons conçu et validé une plateforme analytique, fruit d'un rapprochement de plusieurs technologies multi-physiques et multi-échelles, pour accéder à un triptyque « dosage/phénotypage/métrologie » des VEs.

Dans ce manuscrit, le chapitre I présentera assez largement les vésicules extracellulaires, leurs caractéristiques physiques et biochimiques, leurs rôles physiologiques et leurs implications dans les différentes pathologies. Nous détaillerons ensuite les différentes techniques qui existent aujourd'hui pour la détection et l'étude des VEs ainsi que les défis rencontrés dans ce domaine.

Dans le chapitre II, nous présenterons la plateforme nano-bioanalytique (NBA), que nous avons développée, qui consiste en une biopuce d'or, pierre angulaire de la plateforme, et de la

combinaison entre trois techniques : l'imagerie de la Résonance des Plasmons de Surface (SPRi), la Microscopie à Force Atomique (AFM) et la Spectrométrie de Masse (MS).

La plateforme NBA a d'abord été caractérisée et calibrée à l'aide des vésicules synthétiques et biomimétiques dont les dimensions encadrent l'intervalle de taille des VEs. Les résultats de conception et de validation de ces agents calibrants seront présentés dans le chapitre III.

Le chapitre IV exposera les résultats de la plateforme obtenus sur des échantillons biologiques réels issus des recherches de deux collaborateurs experts du domaine des VEs. A savoir, des VEs plaquettaires issues de plaquettes basales ou activées ainsi que l'investigation du devenir des VEs contenues dans du plasma ayant subi ou non un protocole de nanofiltration. L'objectif premier était de confronter la plateforme NBA à des échantillons complexes pour évaluer son potentiel analytique.

Le manuscrit présente enfin une conclusion et les perspectives de ce travail. L'ambition scientifique ultime de cet axe de recherche et développement est d'inscrire cette plateforme dans la stratégie analytique de la communauté des VEs en participant à leur qualification et en contribuant à l'élucidation de leurs rôles fonctionnels.

# I. Les vésicules extracellulaires (VEs)

Les vésicules extracellulaires VEs sont des petites vésicules (30 nm à 1 µm de diamètre) libérées par la majorité, sinon tous, les types de cellules humaines, dans l'espace extracellulaire, suite à l'activation ou à l'apoptose de ces dernières. Ce sont des petits compartiments clos impliqués dans le transfert de signaux biologiques entre les cellules et ils jouent ainsi un rôle majeur dans différents processus physiologiques et pathologiques.

Les VEs se retrouvent dans les différents fluides biologiques du corps humain (plasma, salive, urine, liquide céphalo-rachidien, etc...) à une concentration relativement abondante. Ces vésicules sont constituées de biomolécules spécifiques de leur origine cellulaire ainsi que de l'état de leurs cellules mères.

## 1. Aspect général

### 1.1. Historique

En 1946, Erwin Chargaff et Rodolph West, ont découvert la présence, dans le plasma dépourvu en plaquettes (*Platelet Free Plasma PFP*), d'un facteur précipitable qui peut accélérer la génération de la thrombine. Ils démontrèrent que l'ultracentrifugation à 31000 g, permettait de réduire significativement la capacité du plasma à entraîner une coagulation sanguine<sup>4</sup>. Ces résultats ont montré, pour la première fois, la présence d'autres facteurs que les plaquettes, qui sont responsables de la coagulation sanguine. Dans les années suivantes, des études ont montré une activité coagulante dans le sérum (liquide sanguin dépourvu de cellules et des protéines de la coagulation)<sup>8</sup> ainsi qu'une augmentation de cette activité au cours du stockage de plasma citraté riche en plaquettes, augmentation qui a été attribuée aux plaquettes<sup>9</sup>.

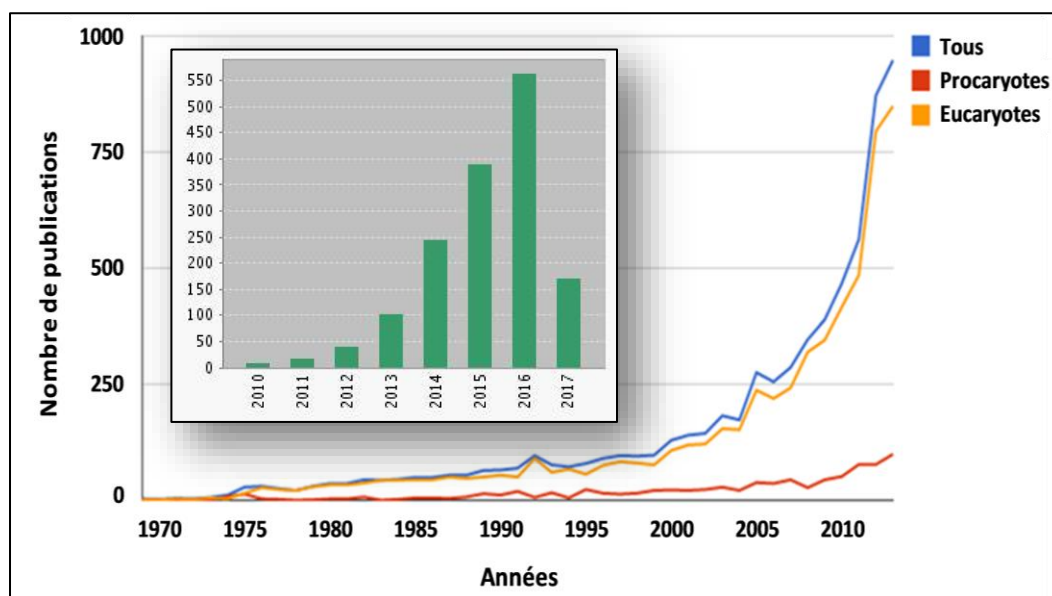
En 1967, Peter Wolf<sup>10</sup> rapporte que des petites vésicules cellulaires riches en lipides sudanophiliques, présentes dans le PFP, permettent la génération de thrombine. Il démontra, à l'aide d'un microscope électronique, que ces vésicules sont d'origine plaquettaire, et sont appelées ainsi « débris plaquettaires » (*platelet dust*). De plus, il confirma l'observation de *Chargaff* sur le fait que le temps de coagulation augmente après ultracentrifugation de plasma. Il démontra que l'augmentation de l'activité coagulante lors du stockage de plasma citraté riche en plaquettes était liée à l'augmentation du nombre de vésicules libérées par les plaquettes, renforçant ainsi la théorie précédente sur l'augmentation de l'activité des plaquettes.

Des vésicules extracellulaires ont été ensuite identifiées dans des tissus solides, comme le cartilage<sup>11</sup>. En 1970, Webber et Johnson mettent en évidence, à l'aide d'un microscope électronique, la génération des vésicules par des plaquettes activées à la thrombine. Ils démontrèrent que ces vésicules englobent les contenus des granules alpha des plaquettes<sup>12</sup>. Ultérieurement, des VEs ont été rapportées dans le sang<sup>13</sup> et le liquide séminal<sup>14</sup>.

Suite à ces études, plusieurs travaux ont été menés sur les vésicules extracellulaires dans le

but de déterminer leurs diverses origines cellulaires. Une étude menée en 1983 a montré des vésicules libérées par des cellules cancéreuses et présentant une activité coagulante<sup>15</sup>. En 1994, Satta et al.<sup>16</sup> rapportent la génération de microparticules circulantes à partir des monocytes activés par le lipopolysaccharide (LPS). En 1996, des vésicules libérées à partir d'une lignée de lymphocytes B infectés par le virus d'Epstein Barr (EBV) ont été décrites par Raposo et al.<sup>17</sup>. Ces vésicules exprimaient fortement les molécules de classe II du Complexe Majeur d'Histocompatibilité (CMH-II), ayant la capacité d'interagir avec les lymphocytes T-CD41+ et de les activer *in-vitro*. Dans une autre étude, Zitvogel et al. ont rapporté la libération, par des cellules dendritiques, de vésicules qui ont la capacité de supprimer la croissance des tumeurs *in-vivo*<sup>18</sup>. De même, Combes et al.<sup>19</sup> démontrèrent la libération des vésicules à partir de cellules endothéliales (Human Umbilical Vein Endothelial Cells HUVEC) en culture après stimulation par le Facteur de Nécrose Tumorale-alpha (TNF- $\alpha$ ). Parallèlement à ces études, d'autres travaux ont été menés dans le but d'investiguer le rôle des VEs dans la coagulation, la communication intercellulaire, l'inflammation, la réponse immunitaire, etc.

Au cours de la dernière décennie, le nombre d'études sur les vésicules extracellulaires, plus précisément sur celles libérées par les cellules eucaryotes, a fortement augmenté (Fig 1).



**Fig. 1 :** Evolution du nombre de publications traitant des VEs (procaryotiques et eucaryotiques) entre 1970 et 2010 (<http://EVpedia.info>). L'encart montre le nombre de publications possédant dans le titre le terme « extracellular vesicles », entre 2010 et 2017, obtenu par interrogation de la base entière de Web of Science (WoS).

La première réunion rassemblant des scientifiques autour des exosomes a eu lieu à Montréal, Canada en 2005. Six ans plus tard, en 2011, un colloque international sur les exosomes a été organisé à l'institut Curie à Paris, France. Dans cette même année, la Société Internationale des Vésicules Extracellulaires (ISEV) a été fondée. En 2012, une autre société, la

Société Américaine pour les Exosomes et les Microvésicules (ASEMV) s'est constituée. Début 2017, la communauté française de recherche sur les VEs s'est organisée pour devenir la French Society of EVs (FSEV).

## **1.2. Rôles physiologiques et pathologiques des VEs**

Les VEs sont considérées comme des entités biologiques actives et des effecteurs susceptibles d'interagir avec différents types cellulaires, de transférer des biomolécules aux cellules cibles afin de moduler leurs fonctions, et de participer à différents processus physiologiques et physiopathologiques. Les fonctions biologiques des VEs peuvent être classées en 6 catégories principales : angiogenèse, communication intercellulaire, survie cellulaire, inflammation et réponse immunitaire, coagulation et gestion des déchets cellulaires<sup>20</sup>.

### **1.2.1. Inflammation**

Les VEs participent au processus inflammatoire par leur influence sur l'interaction entre les cellules (ex. interaction leucocytes-cellules endothéliales) et leur rôle dans l'induction de l'expression des molécules d'adhésion et la libération des cytokines par différents types de cellules (ex. cellules endothéliales et monocytes). Cependant, les VEs possèdent aussi des activités anti-inflammatoires<sup>21</sup>. De plus, des stimuli inflammatoires peuvent contribuer à la génération des VEs, et une augmentation de leur nombre est rapportée dans différentes maladies inflammatoires<sup>22-24</sup> (Tableau 1).

### **1.2.2. Coagulation**

Les VEs ont un rôle dans la coagulation car leur absence, comme dans le cas des syndromes de Castaman et de Scott, est associée à une tendance hémorragique<sup>25,26</sup>.

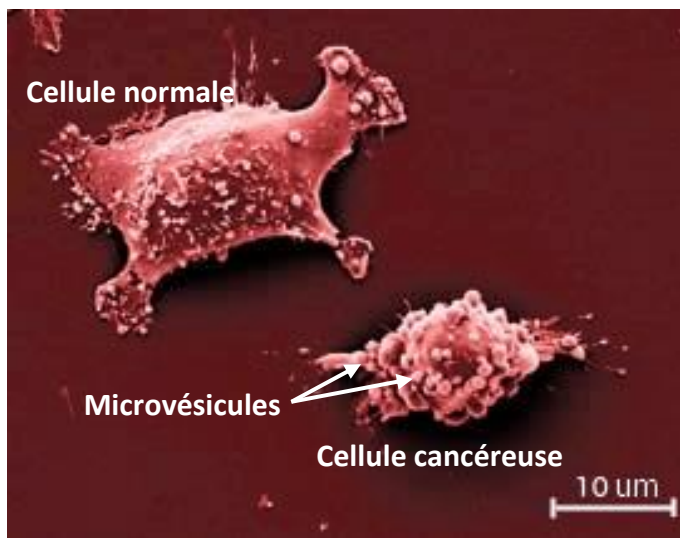
L'activité pro-coagulante des VEs provient essentiellement de l'exposition des phospholipides chargés négativement, essentiellement la phosphatidylsérine, et du facteur tissulaire qui offrent un site d'assemblage des facteurs de la coagulation. Il a été montré que les VEs libérées par les plaquettes possèdent une activité pro-coagulante qui est 50 à 100 fois plus élevée que celle des plaquettes activées<sup>27</sup>. Au contraire, les VEs de différentes origines ont montré une activité anticoagulante. Ceci montre un rôle possible des VEs dans le maintien de l'équilibre entre les états pro- et anti-thrombotiques<sup>28</sup>.

### **1.2.3. Cancer**

Une augmentation du nombre de VEs, essentiellement les VEs plaquettaires, a été rapportée dans le plasma de patients atteints de cancer<sup>29</sup> (Tableau 1). Le cancer est associé à un risque élevé de thrombose qui implique une libération et un transfert des VEs entre les cellules tumorales et les plaquettes. En fait, les cellules tumorales activent les plaquettes, leur agrégation et la libération des vésicules plaquettaires (PVEs)<sup>30</sup>; ces dernières exercent une activité

procoagulante très élevée et participent au processus d'angiogenèse qui facilite les métastases et exercent une influence directe sur le microenvironnement tumoral<sup>31,32</sup>. Les cellules cancéreuses libèrent aussi des VEs soit porteuses du Facteur Tissulaire (TF) qui participent au processus de thrombose<sup>33</sup>, soit porteuses des ARNm et diverses biomolécules actives qui modulent l'activité des monocytes et des cellules endothéliales pour induire l'angiogenèse<sup>34-36</sup>.

D'autre part, plusieurs études ont montré le rôle des VEs dans le développement tumoral à travers le transport des oncogènes entre les cellules cancéreuses tumorales<sup>37,38</sup> mais également leur rôle dans le mécanisme d'échappement au système immunitaire de ces cellules cancéreuses en modulant l'activité des cellules T<sup>39,40</sup> et des monocytes<sup>41</sup>.



**Fig. 2 :** Une cellule cancéreuse - cancer du sein- génère des microvésicules qui se déplacent entre les cellules et s'attachent à une cellule saine -fibroblaste- pour décharger leur cargaison en transformant cette dernière en cellule cancéreuse (Image de microscopie électronique).

Crédits : Dr. Richard Cerione et Dr. Marc Antonyak

#### 1.2.4. Maladies infectieuses

D'autres études ont montré un rôle des VEs dans le développement des maladies infectieuses en favorisant le transport de récepteurs, de facteurs de virulences et de matériel génétique entre les cellules, ce qui aboutit à la propagation des pathogènes et de leur effets néfastes<sup>42-44</sup>. D'autre part, il a été montré que des facteurs de virulence bactériens, comme la protéine M1 de *S. pyogenes* et le lipopolysaccharide (LPS) d'*E. coli* induisent la libération de VEs procoagulantes à partir des cellules mononucléaires du sang périphérique<sup>16,45</sup>. Il faut noter qu'une élévation du nombre de VEs a été rapportée dans différentes maladies infectieuses comme présenté dans le tableau 1 ci-après.

#### 1.2.5. Protection des cellules

Les VEs peuvent participer au mécanisme de gestion des déchets cellulaires et de la protection des cellules contre le stress intracellulaire et l'apoptose<sup>46</sup>. De même, les cellules cancéreuses libèrent des VEs dans le but de se débarrasser de l'accumulation intracellulaire des médicaments chimiothérapeutiques, ce qui rend ces cellules résistantes aux traitements<sup>47,48</sup>.



Condition clinique	Origine cellulaire	Taux de VEs	Références
<b>Individu sain</b>			
Fumeurs	Cellules endothéliales	↑	49
Grossesse	Tous	↑	50,51
Exercices physiques	Cellules endothéliales	↓	52
	Plaquettes	↑	53
<b>Pathologies cardiovasculaires et thrombose</b>			
Hypertension	Cellules endothéliales et plaquettes	↑	54
Syndrome coronarien aigu	Cellules endothéliales et plaquettes	↑	55,56
Athérosclérose	Macrophages, érythrocytes, muscles lisses et plaquettes	↑	57
Thromboembolie veineuse	Cellules endothéliales et plaquettes	↑	58,59
Syndrome de Scott	Plaquettes	↓	26
Purpura thrombotique et thrombocytopénique	Cellules endothéliales et plaquettes	↑	60,61
<b>Cancer</b>			
Cancer de l'estomac	Plaquettes	↑	62
Cancer du poumon	Monocytes et plaquettes	↑	63
Cancer colorectal	Cellules épithéliales cancéreuses	↑	39
Mélanome	Cellules de mélanome	↑	64
<b>Maladies infectieuses</b>			
Choc septique	Monocytes	↑	45
VIH	Lymphocytes T	↑	65
Malaria	Plaquettes	↑	66

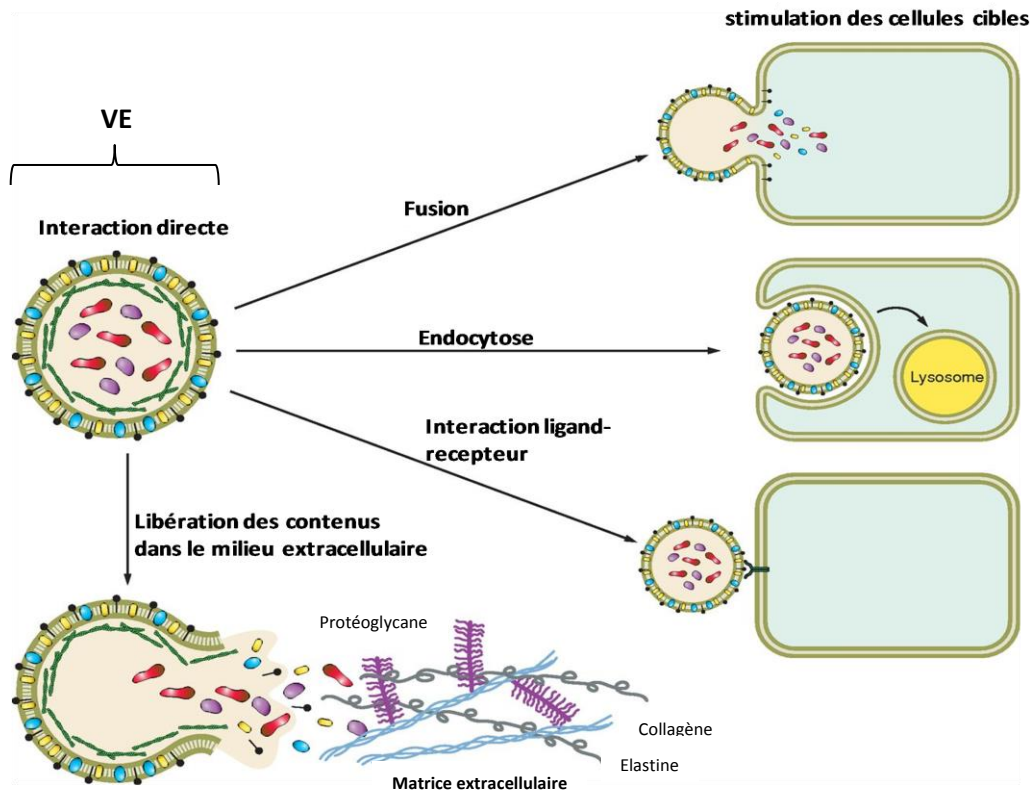
**Tableau 1.** Variation du taux de vésicules extracellulaires dans certains comportements physio(patho)logiques

### 1.3. Interaction des VEs avec les cellules cibles

Les VEs contiennent diverses biomolécules provenant de leurs cellules d'origine. Ces molécules peuvent être transmises aux autres cellules (cellules cibles) par différents mécanismes<sup>67,68</sup>. Les VEs peuvent fusionner et/ou être internalisées (par endocytose) par différents types de cellules, comme les cellules endothéliales et les macrophages, et alors transmettre des biomolécules actives (protéines, lipides et acides nucléiques) à l'intérieur des cellules, ce qui engendre chez ces cellules cibles des changements fonctionnels et phénotypiques<sup>37,69,70</sup>.

D'autre part, les VEs peuvent interagir directement avec les cellules cibles par une liaison ligand-récepteur et activer différentes voies de signalisation cellulaire<sup>71-73</sup>. Les VEs peuvent aussi agir directement, dans le milieu extracellulaire, via l'exposition ou la libération de molécules

bioactives comme les métalloprotéases et les facteurs tissulaires<sup>74-76</sup> (Fig.3).



**Fig. 3:** Mécanismes d’action des VEs sur cellules cibles : Les vésicules peuvent activer la signalisation cellulaire dans les cellules cibles suite à la fusion ou à l’endocytose par ces dernières, ou par des interactions ligand/récepteur. Elles peuvent également libérer leur contenu dans l’espace extracellulaire (Turturici et al. 2014).

#### 1.4. Clairance des VEs

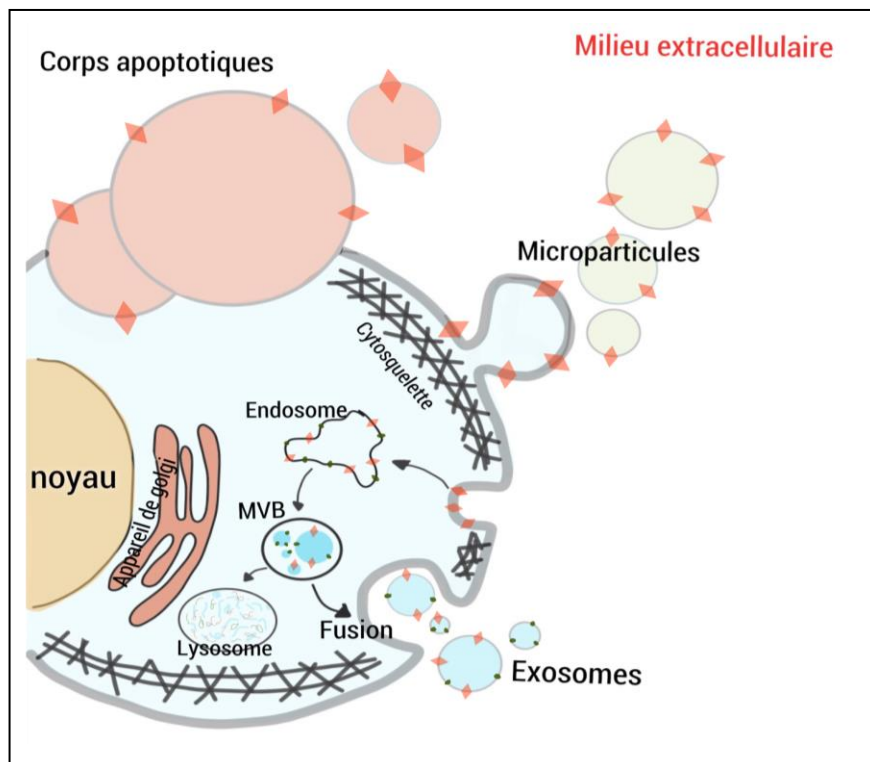
Différents mécanismes de clairance des VEs sont décrits dans la littérature; ces mécanismes incluent essentiellement l’endocytose, la phagocytose et la fusion. De plus, les organes qui montrent un rôle essentiel dans la clairance des VEs sont le foie, les poumons et la rate.

La vitesse d’élimination des VEs à partir de la circulation sanguine est largement influencée par l’exposition des molécules spécifiques à la surface des VEs comme la PS qui intervient dans l’interaction des EVs avec les cellules phagocytaires et endothéliales. Par conséquent, la demi-vie des VEs peut être variable, de quelques minutes jusqu’à plusieurs heures<sup>77</sup>.

## 2. Classifications des VEs

Plusieurs termes ont été utilisés pour désigner les vésicules libérées par les cellules, faisant référence à (i) leur taille (nanoparticules, microparticules.....), (ii) à leur origine cellulaire, comme les oncosomes, pour les VEs libérées par les cellules cancéreuses<sup>37,78</sup>, et prostasomes, celles libérées par les cellules épithéliales de la prostate<sup>79</sup>, et (iii) à leur fonction biologique, comme les vésicules matricielles calcifiant<sup>80</sup>, les tolérosomes<sup>81</sup> et argosomes<sup>82</sup>.

A ce jour, la classification des VEs n'est pas clairement établie et fait toujours débat<sup>83-86</sup>. En effet, une classification basée sur une des caractéristiques physicochimiques (taille, densité, compositions protéiques, lipides....) ne parait pas suffisante pour identifier un type de vésicules, en raison d'un large chevauchement de ces caractéristiques entre les différents sous-types de VEs. Cependant, la terminologie la plus répandue est basée sur deux principaux critères : le mode de biogenèse et les marqueurs biochimiques. Cela divise alors les VEs en 3 grandes catégories : les exosomes, les microparticules (aussi nommées microvésicules ou ectosomes) et les corps apoptotiques (Fig. 4).



**Fig. 4** : La biogenèse des VEs : Les exosomes, les microparticules et les corps apoptotiques.

Par la suite, nous présenterons, en détails, ces trois catégories de VEs, en précisant leur biogenèse et leurs caractéristiques physiques et biochimiques. Il faut noter que des bases de données existent, comme ExoCarta<sup>87</sup>, vesiclepedia<sup>88</sup> et EVpedia<sup>89</sup>, qui collectent les derniers résultats relatifs aux compositions des VEs (protéiques, lipidiques et acides nucléiques).

## 2.1. Les exosomes (EXO)

### 2.1.1. Généralités

Ce terme, proposé en 1981 par *Trams* et al.<sup>90</sup>, désignait l'ensemble des vésicules (40 – 500 nm) libérées par des cellules néoplasiques et ayant une activité 5' nucléotidase (glycoprotéine membranaire jouant un rôle dans le métabolisme des nucléotides). Ensuite, le terme "exosomes" a été adopté en 1987, par *Johnstone* et al.<sup>91</sup>, pour décrire des vésicules d'origine endosomique

(endocytique), libérées pendant la différenciation des réticulocytes en érythrocytes. Actuellement, les exosomes sont considérés comme une population homogène de petites vésicules libérées à partir des endosomes (sous-compartiments intracellulaires) par un mécanisme d'exocytose et présentant les caractéristiques suivantes : une taille comprise entre 30 et 200 nm, une densité de 1,10-1,20 g/mL<sup>92-95</sup>, et une sédimentation à une accélération d'environ 100 000 g. Ces dernières caractéristiques sont celles aujourd'hui admises pour les exosomes par la communauté scientifique.

Les EXO contiennent des protéines et des biomolécules endosomales, cytoplasmiques et membranaires de leurs cellules d'origine telles que les tétraspanines (CD9, CD81 et CD63), les protéines de choc thermique (HSPs), des protéines de cytosquelette ainsi que des acides nucléiques (ARNm et micro-ARN)<sup>87,96</sup>.

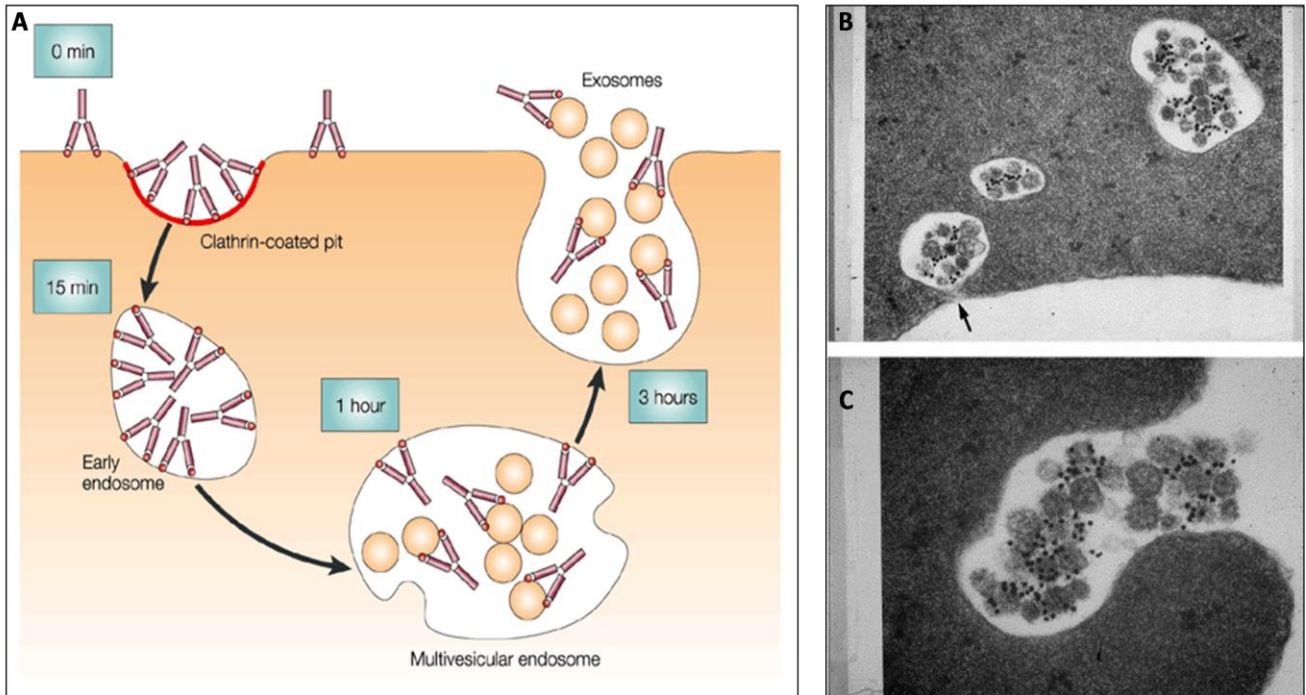
### 2.1.2. Biogenèse

Les EXO peuvent être générés de manière spontanée ou induite par la majorité des cellules (sinon toutes). Différents types de cellules libèrent des exosomes suite à l'activation de leurs récepteurs de surface, comme les lymphocytes T<sup>97,98</sup> et les lymphocytes B<sup>99,100</sup>. De même, les cellules B infectées par le virus EBV<sup>17</sup>, les cellules dendritiques<sup>18</sup> et les macrophages<sup>101</sup> libèrent des EXO *in-vitro*. L'augmentation de la concentration intracellulaire en calcium (Ca<sup>2+</sup>) joue un rôle majeur dans la libération des exosomes<sup>102</sup>.

Le mécanisme de formation et de libération des EXO fut observé il y a plus de 30 ans<sup>103-105</sup> (Fig. 5). Ce mécanisme consiste en l'invagination de la membrane des endosomes, (compartiments intracellulaires), résultant en la formation de vésicules intraluminales. Les endosomes deviennent des corps multivésiculaires (MVB, pour MultiVesicular Bodies) qui peuvent soit se diriger vers les lysosomes et être dégradés, soit fusionner avec la membrane plasmique de la cellule et libérer les EXO dans l'espace extracellulaire<sup>106,107</sup> (Fig. 6). Ce mécanisme implique différents complexes protéiques tel que le complexe ESCRT (Endosomal Sorting Complexes Required for Transport) et d'autres protéines associées, comme ALIX (programmed cell-death 6 interacting protein « PDCD6IP ») et TSG 101 (Tumor Susceptibility Gene 101 protein) qui jouent un rôle crucial dans le transport des protéines ubiquitinylées vers les endosomes et la formation des MVB<sup>108-111</sup>. De même, des protéines comme les tétraspanines semblent être impliquées dans le processus de formation de MVB<sup>112</sup>.

La biogenèse des EXO peut aussi se produire selon une voie ESCRT-indépendante ; cette voie implique la formation de radeaux lipidiques, dans lesquels la sphingomyéline est transformée en céramide sous l'action de la sphingomyélinase<sup>113</sup>. Ces domaines riches en céramide provoquent l'invagination de la membrane des endosomes et la génération des vésicules intraluminales.

Parallèlement à ce mécanisme de biogenèse des exosomes, les exosomes peuvent aussi se

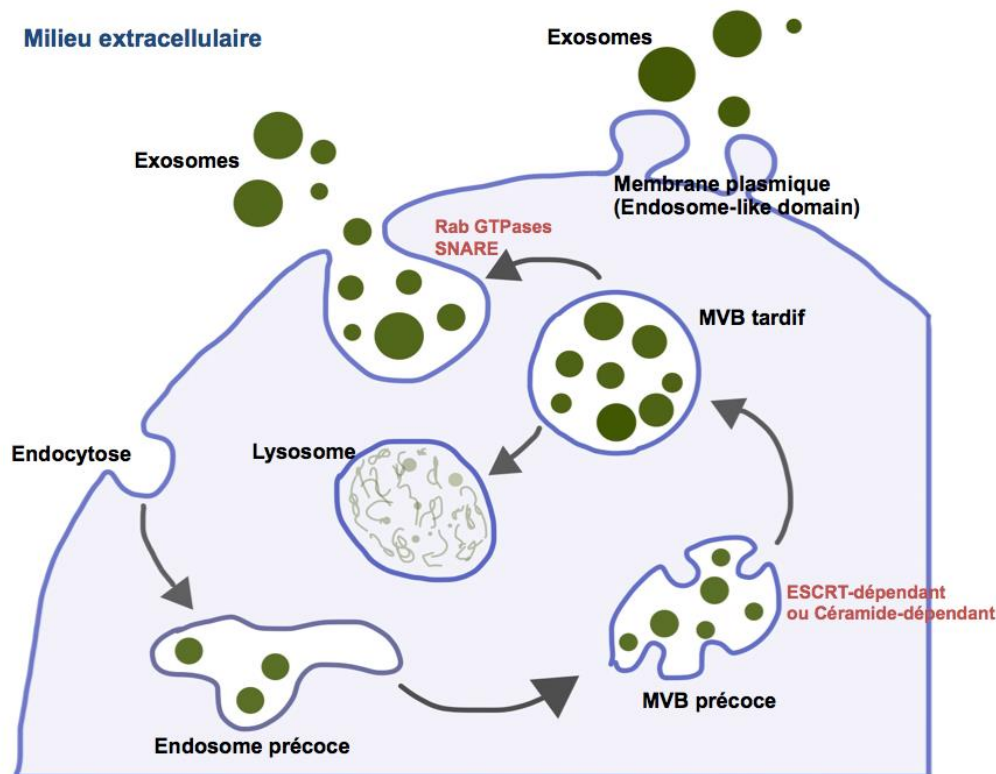


**Fig. 5 :** (A) Biogenèse des EXO, comme observé et décrit pour la première fois par l'étude de *Harding et al.* en 1983 et confirmé par *Pan et al.* en 1985. A T0 min, des cellules de réticulocytes fixées sont incubées avec des anti-récepteurs de la transferrine attachés à des billes d'or. Ces anticorps interagissent avec leur cible présente au niveau de la membrane plasmique des réticulocytes. A T15 min, les anticorps marqués sont retrouvés au niveau des endosomes. A T1h, les anticorps sont liés à des vésicules intraluminales dans le MVB. A T3h, et suite à la fusion du MVB avec la membrane plasmique, les anticorps sont libérés avec ces vésicules (exosomes) dans l'espace extracellulaire (Théry et al. 2002). (B) Images de microscopie électronique à transmission (TEM) montrant les exosomes, dans le MVB, marqués par des anti-récepteur de la transferrine attachées à des billes d'or. La flèche noire montre le début de fusion d'un MVB avec la membrane plasmique. (C) Autre image de microscopie montrant la libération des exosomes dans le milieu extracellulaire (exocytose). Les images en B et C sont tirées de l'article de *Johnston et al.* 2005.

former par un bourgeonnement direct à partir des domaines de la membrane plasmique enrichis en protéines endosomales et exosomales, appelés « endosome-like domains »<sup>84,114,115</sup> (Fig. 6). Ces vésicules présentent les marqueurs classiques des exosomes comme CD9, CD63 et CD81 et possèdent une densité similaire à ces dernières.

D'autre part, il a été montré que la liaison actine-myosine joue un rôle dans la formation des MVBs et la biogenèse des exosomes<sup>116</sup>.

A partir de ces observations, nous pouvons donc noter que le mécanisme exact responsable de la formation et la libération des EXO reste discuté dans la littérature, et il semble que la présence de différents mécanismes de biogenèse des exosomes dépende du type de cellule et/ou de conditions intracellulaires. De plus, les marqueurs spécifiques utilisés pour identifier les exosomes sont à valider. Par exemple, le CD63 est aussi détecté dans d'autres processus biologiques comme chez les neutrophiles subissant une apoptose<sup>117</sup> et chez les granulocytes éosinophiles<sup>118</sup>.



**Fig. 6 :** La biogénèse des exosomes : Voie classique de la formation et sécrétion des exosomes impliquant la voie ESCRT-dépendante et/ou la voie céramide-dépendante. En plus de cette voie classique, il a été montré que les exosomes peuvent bourgeonner directement à partir des domaines spécifiques de la membrane plasmique appelés « endosome-like domains ».

### 2.1.3. Compositions moléculaires des exosomes

Les exosomes sont composés de protéines, lipides et d'acides nucléiques. Cette composition est différente de celles de la membrane plasmique des cellules parentales<sup>119,120</sup>. De plus, la membrane des exosomes est enrichie en cholestérol, céramide, sphingomyéline (SM) et hexasphingomyéline au détriment de la phosphatidylcholine (PC) et la phosphatidyléthanolamine (PE)<sup>121-123</sup>, et elle expose des lipides spécifiques des endosomes comme l'acide lysobisphosphatidique<sup>92</sup>. De même, il a été montré que la phosphatidylsérine (PS), un phospholipide qui se trouve normalement sur le feuillet interne de la membrane plasmique des cellules, peut être présentée, de manière minime, à la surface des exosomes<sup>92,124</sup>. D'autre part, la membrane des exosomes contient des « radeaux lipidiques » avec des protéines associées (ex. flotillines). Ce sont des domaines de la membrane résistants aux détergents, ce qui suggère que ces domaines participent à la biogénèse des EXO<sup>120,125</sup>.

Grâce à leur machinerie de formation et de libération, les EXO peuvent apporter des protéines d'origine endosomique et cytosolique telles que celles impliquées dans la formation et la fusion des MVBs avec la membrane plasmique (exp. Rab GTPase, SNAREs, annexines, Alix, TSG101)<sup>68</sup>, des tétraspanines (exp. CD9, CD81, CD63), les molécules du CMH et les protéines de choc thermique (HSP70, HSP90)<sup>68,107,126-128</sup>. Ces molécules sont généralement présentes

dans les exosomes quelle que soit leur origine cellulaire. Les EXO représentent aussi une signature spécifique en ce qui concerne la composition en glycanes et polysaccharides<sup>120,129</sup>. Il est à noter que ces différentes molécules sont discutées dans la littérature en terme de spécificité. A ce sujet, des molécules longtemps considérées comme marqueurs spécifiques des exosomes, dont CD9 et CD63, semblent être aussi exprimées par d'autres types de vésicules, alors que d'autres molécules, comme TSG101 et ALIX, semblent plus spécifiques donc plus pertinentes<sup>125,130,131</sup>.

Les EXO contiennent aussi du matériel génétique comme les ARNm, des micro-ARN et de l'ADN mitochondrial<sup>96,132</sup>.

Ces différentes signatures moléculaires des exosomes ont été longtemps considérées comme indépendantes de leur cellule d'origine. En effet, des auteurs ont montré l'existence de signatures spécifiques des cellules d'origine dans les EXO. L'étude menée par Mathivanan et al. a permis d'identifier, en plus des marqueurs exosomiques, des protéines spécifiques des cellules d'origine dans l'échantillon d'exosomes préparé à partir d'une lignée de cellules cancéreuses du colon, telles que la protéine A33 (marqueur des cellules épithéliales du colon), EPCAM et le récepteur du facteur de croissance épidermique<sup>128</sup>. A noter que, dans cette étude, les EXO ont été isolés par centrifugation différentielle combinée à une étape de filtration sur une membrane ayant des pores de 100 nm; les EXO culottés par une ultracentrifugation à 100 000 g (pendant 3h) ont été ensuite isolés par immunopurification sur des billes magnétiques modifiées par des anticorps spécifiques de A33. Ces EXO ont montré une taille comprise entre 40-100 nm, par microscopie électronique, et une densité de 1,10-1,12 g/mL.

A partir de ces observations, nous pouvons conclure que les exosomes sont caractérisées essentiellement par leur petite taille (30-200 nm) et leur composition en protéines qui reflète leur origine endosomique (protéines de la voie ESCRT, tétraspanines, etc.).

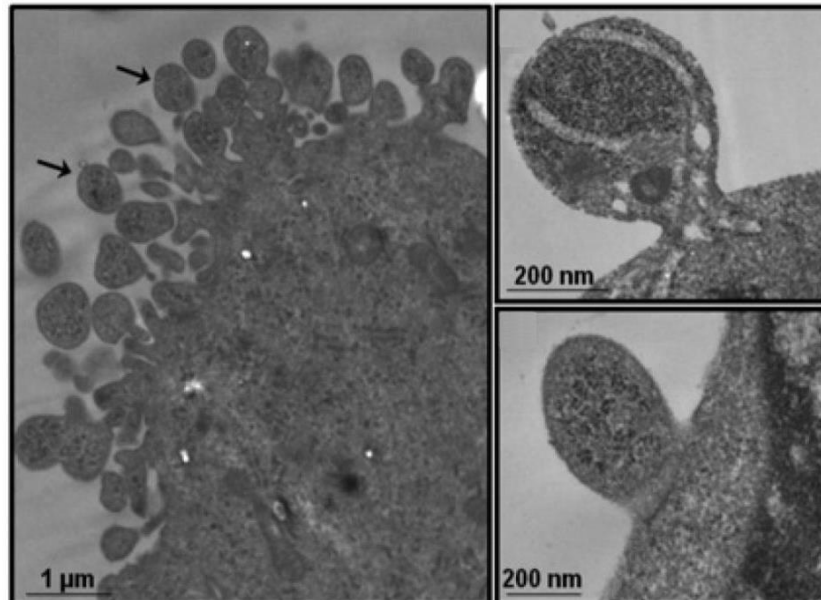
## **2.2. Les microparticules (MPs)**

### **2.2.1. Généralités**

Les MPs sont des vésicules qui bourgeonnent directement à partir de la membrane plasmique; elles ont une taille de 30 à 1000 nm de diamètre, une densité de 1,14 – 1,20 g/mL<sup>125,133-135</sup>, et elles sédimentent préférentiellement à 10 000 - 20 000 g. Les MPs sont générées à la suite d'un processus de réorganisation du cytosquelette et d'un remodelage de la membrane plasmique qui conduit à un bourgeonnement et à la libération des MPs dans l'espace extracellulaire (Fig. 7).

### **2.2.2. Biogenèse**

Les MPs peuvent être libérées suite à l'activation des cellules par différents stimuli physicochimiques. Les plaquettes libèrent des MPs suite à l'activation par la thrombine,



**Fig. 7 :** Bourgeonnement et libération des microparticules à partir de la membrane plasmique de la cellule – image par microscopie électronique en transmission (Doeuvre et al. 2010).

l'ionophore du calcium, le collagène, l'Adénosine DiPhosphate (ADP), etc. Les cellules endothéliales, monocytaires, hépatocytaires et musculaires lisses artérielles libèrent des MPs suite à l'activation par le lipopolysaccharide (LPS) et les cytokines (comme le facteur alpha de nécrose tumorale et l'interleukine-1) <sup>136</sup>.

Les mécanismes exacts de formation et de libération des MPs *in-vivo*, à partir de différents types de cellules, ne sont toujours pas complètement élucidés. Les connaissances actuelles sur ce mécanisme proviennent majoritairement d'études réalisées *in-vitro*.

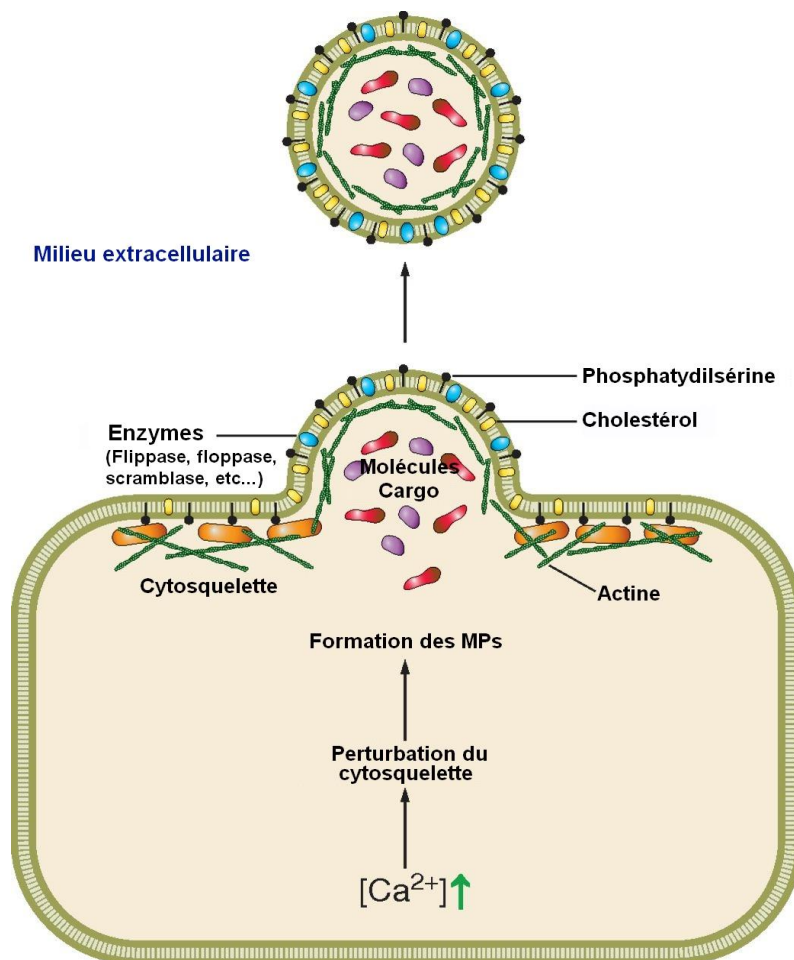
La membrane plasmique des cellules eucaryotes est constituée d'une double couche phospholipidique (PL) et de cholestérol, avec deux feuillettes, externe et interne (cytoplasmique), dans lesquels sont insérées les protéines. Au repos, les lipides ont une distribution asymétrique, cruciale pour la stabilité de la membrane. En effet, la PC et la SM sont les composants majeurs du feuillet externe, alors que le feuillet interne est composé essentiellement de phospholipides anioniques, la PS et la PE. Cette asymétrie est maintenue par un complexe enzymatique transmembranaire impliquant la translocase, la floppase et la scramblase.

Dans les années 80, Bevers et al. <sup>137,138</sup> ont rapporté, pour la première fois, qu'un afflux de calcium intracellulaire, suite à l'activation des plaquettes, aboutit à la perte de l'asymétrie phospholipidique membranaire et à l'exposition du PS sur le feuillet externe de la membrane plasmique. Par la suite, il a été montré que la PS jouait un rôle important dans différents processus biologiques comme la coagulation et la phagocytose des cellules <sup>139,140</sup>. En outre, la perte de l'asymétrie phospholipidique et l'exposition des PL anioniques sur le feuillet externe de la membrane plasmique, accompagnée de la perturbation du cytosquelette (qui implique essentiellement la calpaïne et la gelsoline), suite à l'activation ou l'apoptose de la cellule, est une



étape essentielle dans le mécanisme de la biogenèse des MPs <sup>141-144</sup>.

La libération des MPs peut se faire dans les conditions physiologiques normales et sous stimuli. De manière générale, un stimulus de la cellule entraîne une augmentation de la concentration intracellulaire de calcium ( $\text{Ca}^{2+}$ ) qui inhibe l'aminophospholipide translocase et active la scramblase, ce qui aboutit à la perte de l'asymétrie lipidique et à l'expression de la PS au niveau du feuillet externe de la membrane plasmique. Ce même stimulus est responsable de l'activation de la calpaïne et de la gelsoline, ce qui a pour conséquence de dégrader localement les protéines du cytosquelette. L'ensemble de ces événements conduit à un bourgeonnement de la membrane et à la libération des MPs exposant la PS sur leur feuillet externe (Fig. 8). Chez les patients atteints du syndrome de Scott, le déficit héréditaire en scramblase entraîne une diminution de l'exposition de la PS sur le feuillet externe de la membrane plasmique des plaquettes, entraînant un défaut dans l'activité procoagulante des plaquettes et des hémorragies, et une impossibilité de relarguer des MPs. Ceci met en évidence le rôle des remodelages de la membrane plasmique dans la libération des MPs et l'hémostase<sup>26</sup>. De même, l'inhibition de la calpaïne atténue le bourgeonnement des MPs par les plaquettes<sup>145</sup> et les neutrophiles<sup>146</sup>.



**Fig. 8** : Mécanisme de biogenèse des MPs à partir de la membrane plasmique des cellules (Turturici et al. 2013).

Par contre, la libération des MPs n'est pas reliée exclusivement à l'augmentation du taux de calcium intracellulaire. Au repos, les plaquettes peuvent libérer des MPs suite à une déstabilisation des filaments d'actine du cytosquelette par une voie dépendante de l'intégrine  $\alpha\text{IIb}\beta_3$ , indépendamment du taux de calcium ou de la calpaïne <sup>147</sup>.

D'autres protéines participent au processus de libération des MPs. La caspase-2, par exemple, a été rapportée pour participer à la génération des MPs chez les cellules en clivant le ROCK II (une protéine kinase) <sup>148</sup>. De même, la transglutaminase 2, une enzyme impliquée dans la réorganisation du cytosquelette, participe à la formation des MPs par les cellules musculaires lisses vasculaires <sup>149</sup>.

### 2.2.3. Composition biomoléculaire des MPs

Les MPs sont plus hétérogènes en taille et en composition que les EXO; leurs marqueurs sont moins bien établis. Leurs compositions dépendent largement du type de cellules d'origine et des stimuli impliqués dans leur formation<sup>150-153</sup> (tableau 2).

Origine cellulaire des VEs	Marqueurs
Plaquettes	CD41
	CD31
	CD42a
	CD42b
	CD61
	CD62P
Cellules endothéliales	CD144
	CD31
	CD34
	CD62E
	CD51
	CD105
Lymphocytes	CD4
	CD8
	CD45
	CD3
	CD66b
Monocytes	CD14
Globules rouges	CD235a

**Tableau. 2 :** Exemples de marqueurs utilisés pour la détermination de l'origine cellulaire des VEs.

Les MPs expriment une grande diversité de protéines telles que des glycoprotéines membranaires, comme les GPIb et GPIIb-IIIa, la P-sélectine et le facteur tissulaire (TF) <sup>124,153-156</sup>, des intégrines<sup>157</sup>, des récepteurs<sup>37</sup> et des protéines associées au cytosquelette<sup>152</sup>.

Au contraire, certaines protéines exprimées par les cellules d'origine ne sont pas présentes dans les MPs libérées par ces dernières. C'est le cas des MPs originaires des lymphocytes T, qui n'expriment pas le CD28 et CD45, alors que ces protéines sont présentes abondamment dans la

membrane plasmiques des cellules d'origine<sup>98</sup>. D'autre part, une étude récente, réalisée par Keerthikumar et al., a montré que les MPs sont riches en protéines d'origine ribosomique, centrosomique et mitochondriale et appauvries en protéines comme ESCRT, les tétraspanines et les annexines qui participent à la biogenèse des exosomes<sup>125</sup>, cependant, des protéines communes aux EXO et MPs ont été aussi identifiées, comme les Rab GTPases.

La membrane plasmique des MPs est enrichie en PC, sphingomyéline, PS et cholestérol<sup>158,159</sup>. Ce dernier est présent en forte concentration dans les radeaux lipidiques, ce qui suggère la participation de ces domaines dans le bourgeonnement et la libération des MPs<sup>160-162</sup>. L'exposition des PL chargés négativement, tel que la PS, sur la membrane est considérée comme une caractéristique des MPs. Cependant, comme nous l'avons vu précédemment, la PS peut être présente à la surface des exosomes, et d'autres études ont montré l'absence de PS à la surface de certaines MPs<sup>142,150,152,163</sup>.

Il faut noter que la PS intervient dans la liaison des facteurs de la coagulation (ex : facteurs Va et VIIIa) et la formation des complexes ténase et prothrombinase, ce qui conduit à la génération de thrombine et l'initiation de la coagulation.

Les MPs peuvent contenir des ARNm, micro-ARN, pré-microARN et de l'ADN mitochondrial<sup>34,35,164,165</sup>. Ainsi, bien qu'il ait été montré que l'ADN n'était transporté que par les corps apoptotiques (cAPO), Reich et al.<sup>166</sup> ont identifié des ADN et ARN dans une préparation de vésicules libérées par des cellules Jurkat et HL-60 et exemptes de vésicules les plus volumineuses (> 1 µm) éliminées par ultracentrifugation.

### **2.3. Les corps apoptotiques (cAPO)**

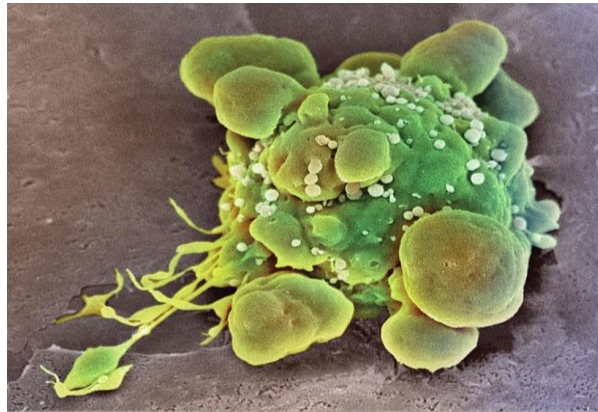
#### **2.3.1. Généralités**

Les cAPO, ou apoptosomes, sont des vésicules libérées suite à la fragmentation des cellules en apoptose avancée (mort cellulaire programmée). Les cAPO, peu décrites dans la littérature, sont très hétérogènes en taille avec un diamètre variant de 500 à 5000 nm, ont une densité de 1,16-1,28 g/mL<sup>85,95,107</sup> et sédimentent à une accélération de 1 200 – 10 000 g<sup>107,120</sup>. Les cAPO contiennent des organites et des fragments nucléaires (ex. histones et fragments d'ADN)<sup>106,167</sup>.

#### **2.3.2. Biogenèse**

L'apoptose est le mécanisme majeur de la mort cellulaire à la fois chez les cellules normales et cancéreuses. Une cellule d'apoptose passe par différentes étapes qui commencent par la condensation de la chromatine nucléaire et la fragmentation du noyau, et finissent par le bourgeonnement des corps apoptotiques à partir de la membrane plasmique par un mécanisme qui résulte en l'externalisation de la PS, de manière similaire à celle de la biogenèse des MPs. Celui-ci implique le réseau de cytosquelette (actine et myosine) par une voie dépendante de caspase-3 et de ROCK-1<sup>168,169</sup>.

**Fig. 9 :** Cellule cancéreuse en cours d'apoptose. Les corps apoptotiques bourgeonnent à partir de la surface de la cellule. Image de Microscopie Electronique à Balayage (MEB), grossissement 2500x. (crédits : Steve Gschmeissner)



### 2.3.3. Composition biomoléculaire des cAPO

Les cAPO sont constitués de différentes molécules d'origine nucléaire, cytosolique et endosomique telles que la PS, les protéines de choc thermique, les histones, la thrombospondine, le C3b, le facteur tissulaire et l'annexine (Annex-V)<sup>85,170-173</sup>. De plus, il a été montré que les vésicules libérées à partir des cellules au cours de l'apoptose présentent des molécules de surface (ex : Phospholipides) oxydées alors qu'une telle oxydation est absente chez les VEs obtenues à partir de cellules activées à l'ionophore du calcium<sup>174</sup>. Ces molécules oxydées, en plus de la forte expression de la PS, font partie des signaux « eat me » responsables de la reconnaissance des cAPO par les cellules phagocytaires<sup>175,176</sup>. Les cAPO sont ensuite rapidement ingérés par les phagocytes ou les cellules avoisinantes suite à leur libération. De plus, un changement dans le profil de glycosylation des protéines et des lipides de la surface a été établi pendant l'apoptose et a été aussi considéré comme un signal « eat me »<sup>177</sup>.

Les cAPO contiennent également différents types de matériels génétiques ARN et ADN<sup>38,178</sup>.

### 2.4. Tableau récapitulatif des caractéristiques de VEs

Le tableau 3 présente une comparaison entre les différents types de VEs (EXO, MPs et cAPO) au niveau de leurs caractéristiques physicochimiques.

	<i>Exosomes</i>	<i>MPs</i>	<i>Corps apoptotiques</i>
<b>Taille (nm)</b>	30-200	30-1000	500-5000
<b>Densité (g/mL)</b>	1,10 - 1,20	1,14 - 1,20	1,16 - 1,28
<b>Biogénèse</b>	Exocytose de MVB	Bourgeonnement de la membrane plasmique	Fragmentation des cellules
<b>Marqueurs</b>	CD9, CD63, CD81, HSP70, Rabs, Alix, Lamp1, TSG101	ARF6, VCAMP3, MMP et marqueurs spécifiques des cellules parentales	Annexine-V, Thrombospondine, C3b, histones
<b>Compositions</b>	ARNm, microARN, protéines membranaires et cytosoliques	ARNm, microARN, protéines membranaires et cytosoliques	Protéines membranaires et cytosoliques, fragments nucléaires, histones, ADN ARN et organites
<b>Isolement</b>	100 000 – 200 000 g	10 000 – 20 000 g	1200 – 10 000 g

**Tableau 3 :** Caractéristiques de différents type de vésicules extracellulaires

### 3. Détection et caractérisation

L'intérêt croissant d'investigation des VEs se heurte à un manque de standardisation dans les protocoles d'isolement, de stockage et de mesure de ces vésicules. Les résultats obtenus par les différents centres de recherches sont souvent contradictoires, ce qui nuit au potentiel de ces vésicules pour le diagnostic ou le suivi thérapeutique. Dans cette partie, nous allons parler des stratégies les plus utilisées de préparation et d'isolement des VEs, ainsi que des différentes techniques employées pour leur analyse.

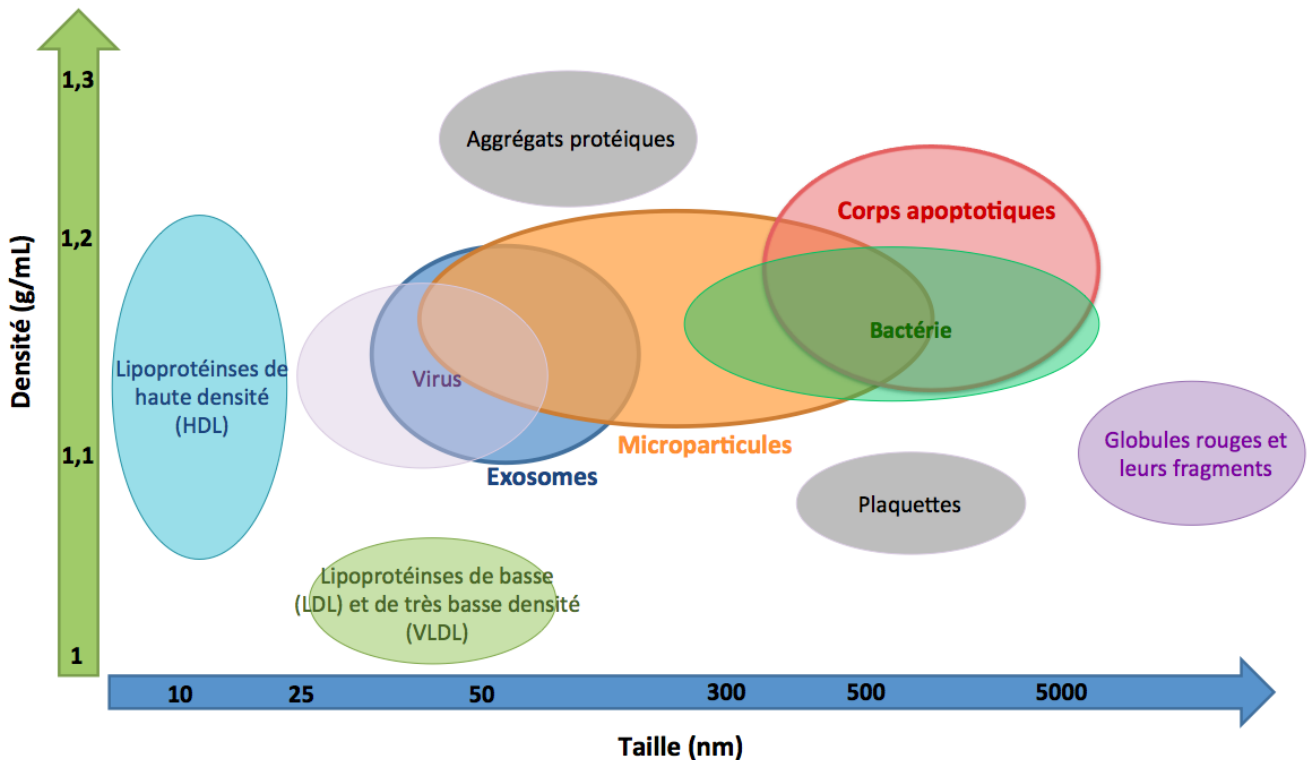
#### 3.1. Aspect pré-analytique

Tout d'abord, les propriétés physiques des différents VEs (EXO, MPs et cAPO) se chevauchent au moins partiellement. De plus, d'éventuels contaminants, tels que les agrégats protéiques et les lipoprotéines<sup>94,179,180</sup> peuvent coexister lors de la préparation et/ou isolement des VEs (Fig.10). Leur identification qui se base sur une de leurs caractéristiques physicochimiques (taille, densité, compositions protéiques, lipides... ) semble alors être insuffisante pour une distinction claire et robuste des différentes sous-populations de VEs<sup>112</sup>.

Les VEs sont généralement isolées à partir du sang et de surnageant de cultures cellulaires, mais aussi à partir des différents liquides biologiques ou tissus. L'étape cruciale pour quantifier et caractériser les VEs, est de les séparer des cellules et des autres constituants qui sont présents dans l'échantillon. Pour cela, plusieurs méthodes et techniques sont utilisées comme la centrifugation différentielle, qui est la technique de choix, la centrifugation sur gradient, la filtration, la chromatographie d'exclusion et l'immunocapture.

##### 3.1.1. Centrifugation différentielle

La centrifugation différentielle (CD) est la technique la plus communément utilisée<sup>181</sup>. Elle



**Fig. 10 :** Caractéristiques physiques (notamment densité et taille) des VEs et d'autres éléments qui peuvent être présents dans l'échantillon.

consiste à appliquer plusieurs cycles de centrifugation à différentes accélérations afin d'isoler et concentrer les VEs dans les différents liquides biologiques (sang, urine, etc.) ainsi que dans les surnageants de culture cellulaire.

Dans le cas des échantillons sanguins, le fluide biologique le plus complexe, il est recommandé de manipuler ces derniers immédiatement après leur collecte afin de limiter le plus possible l'activation des cellules sanguines et la génération artificielle des VEs. Les échantillons sont collectés dans des tubes de citrate de sodium et conservés à température ambiante pour éviter la lyse des plaquettes qui peut entraîner une quantification erronée des VEs. Le diamètre de l'aiguille de prélèvement et la nature de l'anticoagulant utilisé lors de la prise du sang semblent avoir un effet. En général, des aiguilles d'une taille minimum de 21 Gauge, et des tubes de citrate de sodium sont utilisés et il est recommandé de limiter l'agitation des tubes<sup>182-184</sup>.

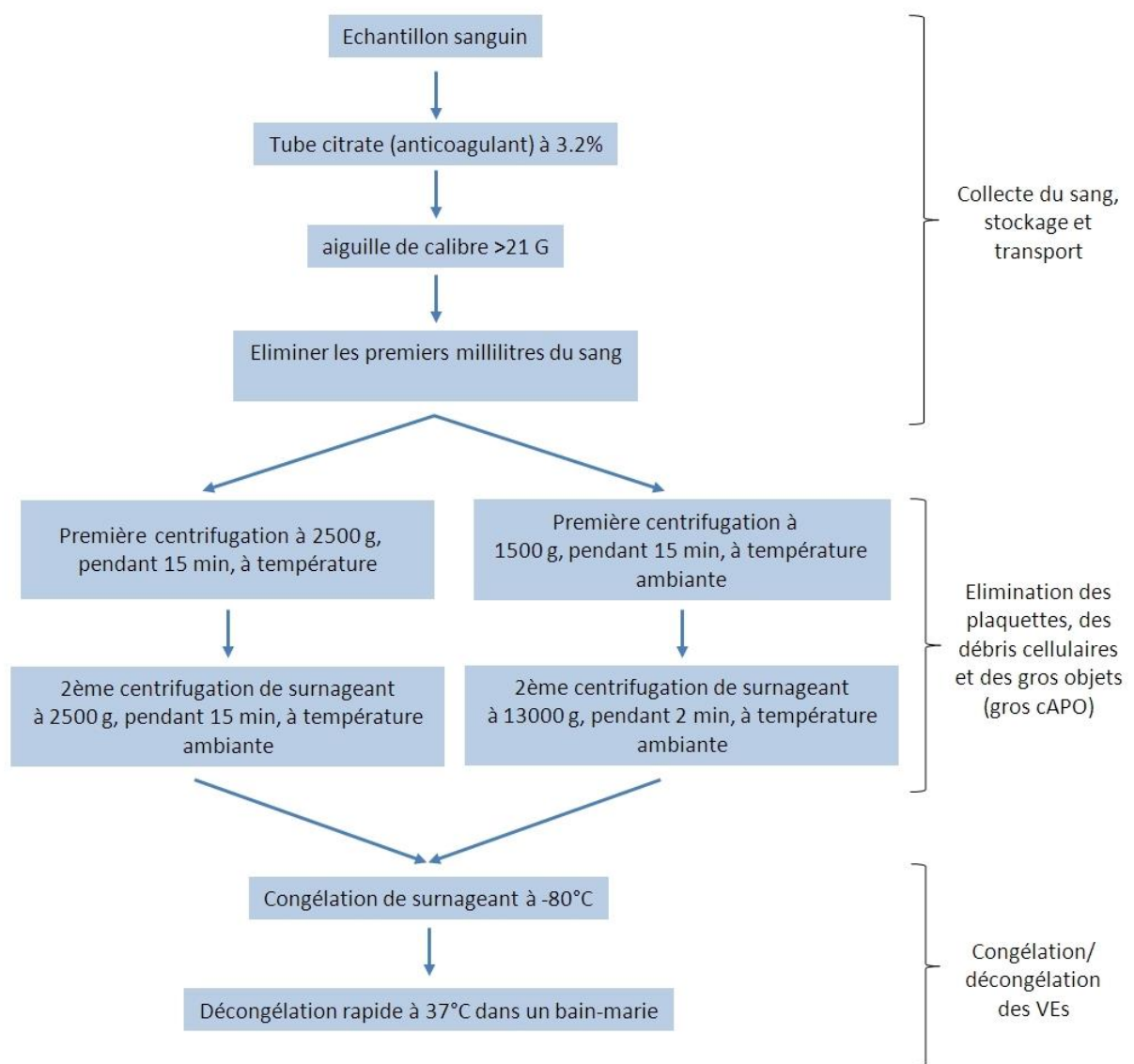
### - 1<sup>er</sup> étape : Élimination des cellules et des débris cellulaires

La première étape consiste à éliminer les cellules et les débris cellulaires contenus dans l'échantillon à étudier. Pour cela, une ou plusieurs centrifugations à faible accélération ( $\approx 300 - 3000$  g) sont généralement utilisées.

Dans le cas des échantillons sanguins, le protocole le plus utilisé est une double centrifugation à une accélération de 2500 g, pendant 15 min à température ambiante (Fig. 11). Cette étape permet l'obtention du plasma pauvre en plaquette (PPP). Une fois les plaquettes et les cellules

sanguines éliminées, les échantillons contenant les VEs peuvent être congelés à -80°C pour un stockage de longue durée ou bien conservés à 4°C pour une courte période. D'autres stratégies sont utilisées afin d'éliminer la totalité des plaquettes dans le plasma pour obtenir du plasma dépourvu en plaquettes (PFP). Une de ces stratégies consiste à appliquer une première centrifugation à faible accélération ( $\approx 1500$  g) pendant 20 min, et puis une seconde centrifugation à moyenne accélération ( $\approx 13\,000$  g) durant 2 min<sup>185-187</sup> (Fig. 11). Cependant, des études démontrèrent que le nombre de VEs dans le PFP est plus faible que dans celui le PPP, suggérant que l'étape de centrifugation à moyenne accélération aboutit à l'élimination d'une partie des VEs<sup>188,189</sup>.

Dans certains protocoles, ces étapes de centrifugation sont remplacées par une filtration de l'échantillon sur une membrane de filtration qui sépare les VEs des cellules et des débris cellulaires<sup>190</sup> (cf. partie « 3.1.3. Filtration »).



**Fig. 11** : Protocoles recommandés pour l'isolement de VEs à partir des échantillons sanguins par centrifugation (Burnouf et al. 2014).

Il faut noter que, si l'étape de séparation de cellules n'est pas complète, les cellules contaminantes peuvent générer artificiellement des VEs au cours du stockage et des cycles de congélation/décongélation.

### **- 2<sup>e</sup> étape : sédimentation des VEs**

L'isolement des VEs est réalisé par centrifugation à moyenne accélération (10 000 à 20 000 g), pour culotter les vésicules de taille moyenne (MPs), alors qu'une ultracentrifugation (100 000 à 200 000 g) est utilisée pour culotter les petites VEs (EXO). D'ailleurs, peu d'informations sont disponibles sur l'isolement des cAPO; cet isolement se fait en général, suite à l'élimination des cellules et des débris cellulaires, par une centrifugation à une faible accélération  $\approx 2000 \text{ g}$ <sup>191</sup>.

En revanche, la centrifugation différentielle ne permet pas une séparation absolue d'un sous-type de VEs. Une comparaison entre des études menées sur la quantification des MPs directement dans le PPP ou suite à leur isolement à partir de ce dernier, par une centrifugation à moyenne accélération ( $\approx 20\,000 \text{ g}$ ), montre que le nombre de VEs semble être plus élevé dans le PPP par rapport aux fractions isolées. Ces résultats démontrent que la centrifugation à une accélération moyenne n'est pas suffisante pour sédimenter toutes les MPs d'intérêt présentes dans l'échantillon<sup>183</sup>.

De plus, Aatonen et al.<sup>192</sup> ont montré que la séparation des MPs et des exosomes par centrifugation à moyenne accélération et par ultracentrifugation, respectivement, est inefficace pour l'obtention d'un sous-type de VEs pure, car ces deux types de VEs coexistent dans les deux préparations.

En conclusion, il faut noter que l'isolement des vésicules par centrifugation différentielle ne dépend pas seulement de la taille et de la densité des vésicules, mais aussi de leur forme et de différents paramètres comme la viscosité, la température du fluide dans lequel se trouvent les vésicules et le temps de centrifugation. La spécificité de la centrifugation différentielle est faible et résulte en une suspension des VEs de différents types, ainsi qu'à une potentielle contamination par des agrégats protéiques<sup>180,193</sup>, des débris cellulaires, des lipoprotéines<sup>194</sup> et d'autres constituants qui possèdent des propriétés physiques similaires à celles des VEs. L'ultracentrifugation (100 000 – 200 000 g) peut également induire une fusion/aggrégation des vésicules ainsi qu'une contamination par des agrégats protéiques<sup>195,196</sup>. Enfin, cette méthode est relativement longue (4-5 h).

#### **3.1.2. Centrifugation sur gradient**

La centrifugation sur gradient (CG) repose sur le même principe que la centrifugation différentielle, mais met en œuvre une solution visqueuse avec un gradient de densité comme le saccharose ou le chlorure de césium. Cette technique, basée sur la densité des vésicules, permet d'obtenir une meilleure pureté et un taux de récupération plus élevé par rapport à la



centrifugation différentielle. Malheureusement, à cause du chevauchement en densité entre les différents types de VEs, ainsi qu'avec d'autres constituants « moléculaires » de l'échantillon, cette technique ne permet pas l'isolement d'un type de VEs spécifique de manière fiable<sup>179,197,198</sup>.

### 3.1.3. Filtration

La filtration a été introduite récemment dans le but de séparer les VEs. Cette méthode est utilisée, souvent, en combinaison avec d'autres techniques (comme l'ultracentrifugation et la chromatographie d'exclusion). Généralement, des filtres ayant des pores d'environ 0,8 µm sont utilisés afin d'éliminer les cellules et les débris cellulaires à partir de l'échantillon<sup>193</sup>. Des filtres ayant des plus petites pores (ex. 0,1 - 0,2 µm) sont ensuite utilisés pour séparer des VEs dans une gamme de taille désirée<sup>190,199</sup>. De plus, des membranes dont la filtration opère sur de faible poids moléculaire (10 - 500 KDa) sont utilisées pour isoler et concentrer les VEs sur la membrane<sup>199-201</sup>.

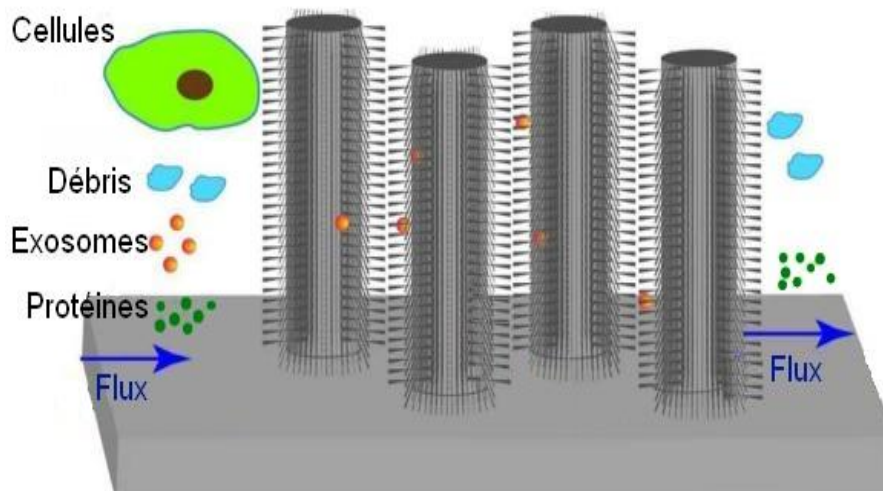
La filtration a montré une plus grande capacité d'isolement (recouvrement) des VEs, précisément pour les exosomes, par rapport l'ultracentrifugation<sup>202</sup>. Néanmoins, cette technique souffre de différentes limitations telles que la contamination des VEs par des protéines<sup>180</sup>, une possible déformation et rupture des grosses vésicules et des plaquettes, ainsi qu'une possible adsorption des VEs dans la membrane du filtre<sup>182</sup>.

D'autre part, Davies et al.<sup>203</sup> ont proposé un dispositif microfluidique dédié à l'isolement des VEs par filtration contrôlée par la pression ou par l'électrophorèse; le taux de récupération des VEs par cette méthode semble cependant être faible ( $\approx 2\%$ )<sup>204</sup>.

Un dispositif développé par Wang et al.<sup>205</sup>, composé des micropilliers ciliés formant un réseau nanostructuré (Fig. 12), a permis de piéger sélectivement les petites vésicules (40-100 nm) qui ont pu être récupérées. Bien que le temps de piégeage des VEs à partir d'un échantillon soit court ( $\sim 10$ min), le temps de récupération est lent et nécessite la dissolution du nano-réseau pendant des heures. Cependant, le taux de récupération des VEs est de 45 à 60%.

Un dispositif appelé Exodisc a été développé par Woo et al.<sup>206</sup>; ce dispositif consiste en un disque comportant deux filtres, le premier à 600 nm et le deuxième à 20 nm. L'échantillon contenant les VEs est chargé sur le disque et passe à travers les deux filtres, consécutivement, suite à une rotation du disque à 500 g pendant 15 min, ce qui permet la séparation de VEs à partir des gros objets qui seront retenus sur le premier filtre, alors que les VEs qui traversent le premier filtre seront retenues par le deuxième filtre de 20 nm. Le taux de récupération des VEs par ce dispositif est très élevé ( $> 95\%$ ), et le temps d'isolement est court ( $< 30$  min). Pour l'instant, ce dispositif n'a été appliqué qu'à la séparation des vésicules à partir de l'urine et de surnageant de culture cellulaire suite à l'élimination des gros objets (ex. débris cellulaire) par centrifugation à 500 g, pendant 2 min, en dehors du disque. Par conséquent, il paraît intéressant d'appliquer ce dispositif pour isoler les VEs dans des milieux plus complexes comme le plasma.

D'autre part, un test ELISA a été engagé, *in-situ*, pour étudier le phénotype des VEs récupérées sur le deuxième filtre.



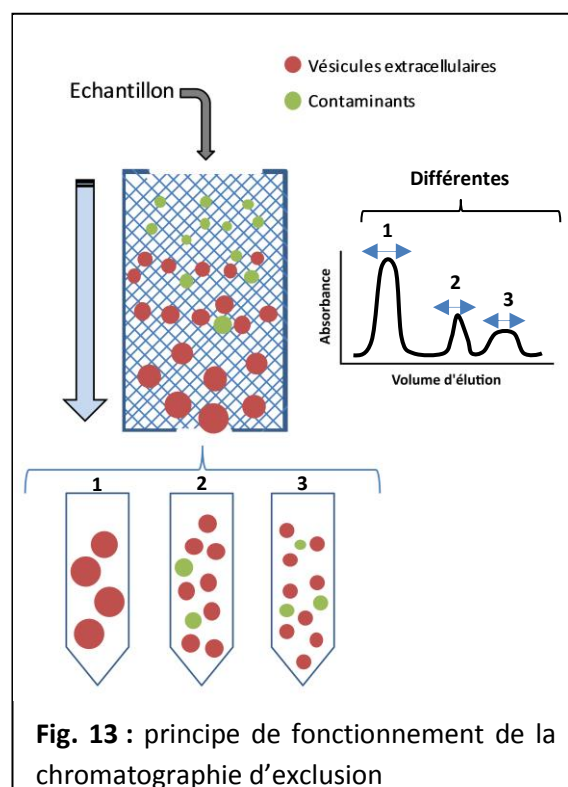
**Fig. 12** : Dispositif de Wang et al., qui permet de piéger et d'isoler les VEs par un nano-réseau formé par des micropilliers ciliés (Wang et al. 2013).

### 3.1.4. Chromatographie d'exclusion

La chromatographie d'exclusion est aussi une technique prometteuse puisqu'elle permet de séparer, en une seule étape, les VEs selon leur taille (Fig.13). Cette séparation est intéressante puisque des études ont montré que la composition / fonctions des VEs dépend de leur taille<sup>207,208</sup>. Cette technique a été utilisée en combinaison avec la centrifugation différentielle et la filtration pour isoler les VEs à partir de différents types d'échantillons (ex : plasma et urine) de manière rapide et efficace sans en affecter les propriétés biophysiques<sup>195,202,209,210</sup>. De plus, la chromatographie d'exclusion est efficace pour l'élimination des contaminants protéiques et lipoprotéiques à partir des VEs.

Cependant, il faut noter que la chromatographie d'exclusion mène néanmoins à la dilution de l'échantillon;

ainsi, la limite basse de séparation des vésicules dépend de la taille des pores du gel de séparation utilisé. Par exemple, Boing et al.<sup>209</sup> ont utilisé une colonne de gel de sépharose (CL-2B) pour isoler les VEs à partir du plasma et des concentrés plaquettaires qui ont été soumis à des cycles de centrifugation différentielle pour éliminer les cellules et les débris cellulaires. Ils ont



**Fig. 13** : principe de fonctionnement de la chromatographie d'exclusion

réussi à isoler les VEs dans la gamme de taille de 70 à 500 nm avec un taux de récupération de 43%. Les petites vésicules (< 70 nm) semblent être sorties avec les contaminants protéiques et lipoprotéiques.

### **3.1.5. Immunocapture**

La méthode d'isolement par immunocapture est la plus spécifique et efficace des techniques<sup>197,211</sup>. Contrairement aux autres techniques basées sur les propriétés physiques, cette méthode est basée sur la capture des vésicules selon l'expression, ou non, dans leur membrane plasmique d'une molécule d'intérêt, en utilisant des ligands spécifiques généralement immobilisés, pour de nombreuses études, sur des billes magnétiques<sup>128,197,212,213</sup>.

Les billes magnétiques modifiées par les ligands sont mises en suspension dans l'échantillon à étudier; après un certain temps d'incubation, l'utilisation d'un aimant permet de piéger les billes magnétiques, qui lient les VEs d'intérêt alors que le reste de l'échantillon est éliminé. Finalement, les VEs sont éluées des billes et récupérées en utilisant un tampon d'éluion approprié.

D'autres méthodes basées sur des dispositifs microfluidiques ont été plus récemment développées pour isoler les VEs. Ces dispositifs, basés sur l'immunocapture<sup>214-216</sup>, sont aussi dédiés à l'analyse des VEs capturées à leur surface. Pour cela, ils seront présentés dans la partie «3.2. Aspect analytique».

### **3.1.6. Précipitation par des polymères**

D'autres méthodes sont utilisées pour isoler les VEs telles que la méthode de précipitation, qui utilise des polymères (en général du polyéthylène glycol, PEG) afin de précipiter les VEs<sup>217,218</sup>. Cette méthode existe sous forme de kit commercial, et malgré le fait qu'elle ait montré un plus grand rendement par rapport à la centrifugation, la chromatographie et l'immunocapture<sup>219</sup>, son inconvénient majeur est la co-précipitation des constituants non-vésiculaires et la présence de polymères dans la solution finale<sup>182,202</sup>.

Suite à cette présentation de différentes techniques utilisées pour l'isolement des VEs, nous pouvons conclure que les étapes de préparation et d'isolement des VEs manquent de standardisation. De plus, il n'existe pas de méthode optimale pour l'isolement et la purification des VEs, car cela dépend de la problématique spécifique visée par l'étude. En revanche, il est préconisé d'appliquer une étape préanalytique qui introduit le moins de biais et de décrire en détail les méthodes utilisées pour l'isolement des VEs afin de permettre aux chercheurs de mieux interpréter les résultats<sup>7</sup>.

### **3.1.7. Tableau comparatif des techniques d'isolement de VEs**

Le tableau 4 dresse une comparaison des principales méthodes utilisées pour isoler les VEs dans un échantillon à savoir la centrifugation différentielle, l'ultracentrifugation, la

chromatographie d'exclusion, l'immunocapture et la filtration sur membrane.

	<b>Centrifugation différentielle (CD) et sur gradient (CG)</b>	<b>Chromatographie</b>	<b>Immunocapture</b>	<b>Filtration</b>
<b>Spécificité</b>	Densité et taille (CD) Densité (CG)	Taille	Marqueurs	Taille
<b>Temps</b>	>4h	≈1h	<1h	<1h
<b>Avantages</b>	La CD est la technique la plus utilisée. La CG permet une séparation plus efficace de VEs par rapport à la CD	La structure des VEs reste intacte	Très spécifique pour une sous-population donnée de VEs	VEs peuvent être concentrées par filtration
<b>Inconvénients</b>	Contaminants, fusion et aggrégation des VEs, peut affecter les fonctions biologiques des VEs	Possible contamination et dilution des échantillons	Cette méthode en général ne convient pas pour les gros volumes	Possible dégradation des grosses vésicules et des cellules, possible adhésion des VEs sur le filtre, généralement utilisée en combinaison avec l'UC
<b>Rendement/récupération</b>	5-65%	≈40-75%	42-49%	≈80%

**Tableau 4 :** Comparaison des différentes techniques d'isolement des VEs

### 3.2. Aspect analytique

De nombreuses techniques sont utilisées pour étudier les VEs. Ces différentes techniques peuvent être classées en deux grandes catégories : (I) les techniques permettant la caractérisation des VEs en volume (3D), et (II) celles caractérisant les VEs après interaction sur une surface (2D).

Selon une étude récente menée par Gardiner et al.<sup>181</sup> auprès de la communauté scientifique, les techniques les plus utilisées pour étudier les VEs sont : la technique électrophorétique d'immuno-transfert (western-blot), les techniques de mesure de taille des particules uniques (NTA, TRPS et DLS), la microscopie électronique et la cytométrie en flux qui représente le gold standard car utilisée par près de 40% des laboratoires.

Dans la partie suivante, nous allons présenter les techniques les plus utilisées dans ce domaine ainsi que leurs avantages et inconvénients.

#### 3.2.1. Techniques de caractérisation des VEs en solution (3D)

##### 3.2.1.1. Quantification et détermination du phénotype

###### a) La cytométrie en flux

Cette technique a longtemps été considérée comme la technique de choix pour étudier les

VEs<sup>181,220</sup>. La cytométrie en flux (FC pour « *Flow cytometry* ») est une technique d'analyse multiparamétrique permettant une détection rapide des MPs, leur quantification et la détermination de leur origine cellulaire ainsi que leur taille.

Cette technique utilise un faisceau laser ( $\lambda \approx 300$  à  $500$  nm) devant lequel passent les VEs, une par une, grâce à un courant fluide à très grande vitesse. La lumière diffusée par les VEs est collectée et mesurée par la FC. La diffusion axiale de la lumière (Forward Scatter ou FSC) est proportionnelle à la taille des particules, alors que la diffusion orthogonale de la lumière est dépendante de la composition interne des objets mesurés. Cette technique permet de caractériser des échantillons dont la taille est supérieure à la longueur d'onde du laser. Dans le cas des VEs, la FSC et la SSC sont directement liées à la taille des VEs dans le domaine de taille allant de  $\approx 300$  nm au  $1 \mu\text{m}$ <sup>221</sup>. De plus, les VEs peuvent être préalablement marquées par différents ligands fluorescents, ce qui permet de déterminer, en plus de la taille, leur phénotype et leur origine cellulaire.

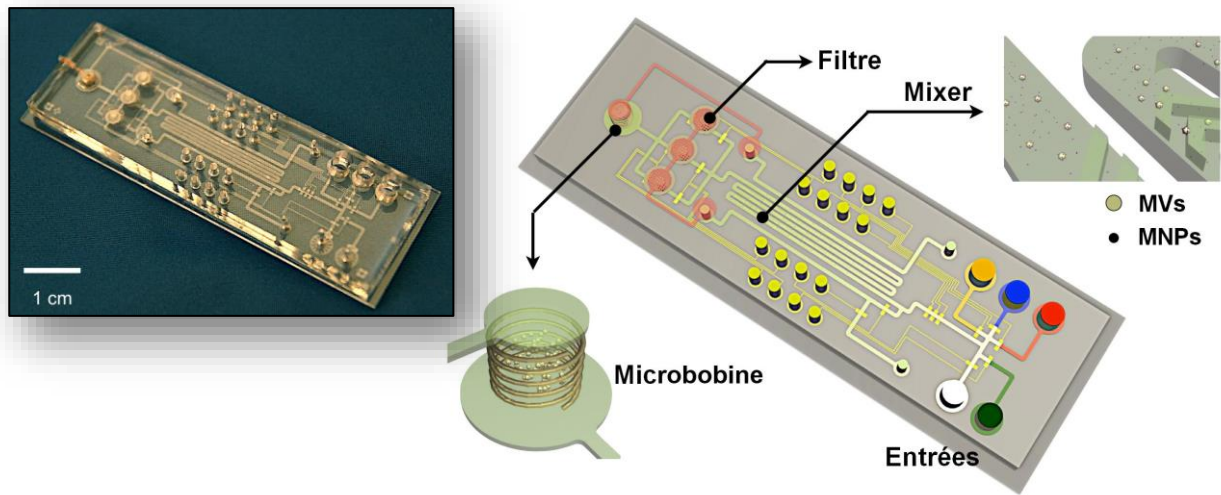
Dans le but de standardiser la détection et la quantification des VEs par la FC<sup>220</sup>, des billes de calibration, de taille connue, sont utilisées, et la détermination de la taille des VEs se fait par une comparaison de l'intensité de la lumière diffusée par ces vésicules avec celle des billes de calibration, généralement en polystyrène. Cependant, cette intensité ne dépend pas uniquement de la taille des particules, mais aussi de leur morphologie et de leur indice de réfraction. Étant donné que ce dernier est différent entre les vésicules biologiques et les billes de polystyrène, une telle comparaison et calibration présente donc des limites certaines<sup>221,222</sup>.

De plus, les petites VEs, ayant une taille inférieure à la longueur d'onde du faisceau de laser, ne sont donc pas détectées par cette technique.

Des optimisations de cette technologie ont permis une amélioration de la résolution, jusqu'à une LOD de  $100$  nm, avec une technique appelée « cytométrie en flux à haute résolution » (HR-FC pour « High-Resolution Flow Cytometry »)<sup>223,224</sup>; cependant, la concentration en VEs des échantillons à tester influence directement les résultats obtenus par cette technique<sup>225</sup>.

## **b) Résonance Magnétique Nucléaire (RMN)**

Un dispositif microfluidique qui utilise le principe de la résonance magnétique nucléaire (RMN) a été développé et appliqué pour la détection des VEs<sup>226</sup> (Fig. 14). Ce système consiste en une puce microfluidique et un détecteur RMN (micro coil); les VEs sont mélangées avec des nanoparticules magnétiques conjuguées à des anticorps spécifiques. Le dispositif mesure ensuite la susceptibilité magnétique de l'échantillon en réponse à un champ magnétique appliqué. Shao et al.<sup>226</sup> ont utilisé ce dispositif pour la détection et le phénotypage des exosomes à partir d'une culture des cellules de glioblastome multiforme ainsi qu'à partir du plasma de patients atteints de glioblastome. Cette technique permet une détection sélective des sous-populations des VEs et une quantification relative des vésicules dans un faible volume ( $\approx 1 \mu\text{L}$ ). De plus, elle a montré



**Fig. 14 :** Dispositif  $\mu$ RMN utilisé pour la détection des microvésicules (MVs). Il consiste en un mélangeur (Mixer) qui permet de mélanger les VEs (ici MVs) avec les nanoparticules magnétiques (MNPs), et des filtres qui séparent les MNPs des VEs avant la détection de ces dernières à l'aide d'une microbobine (Shao et al. 2012).

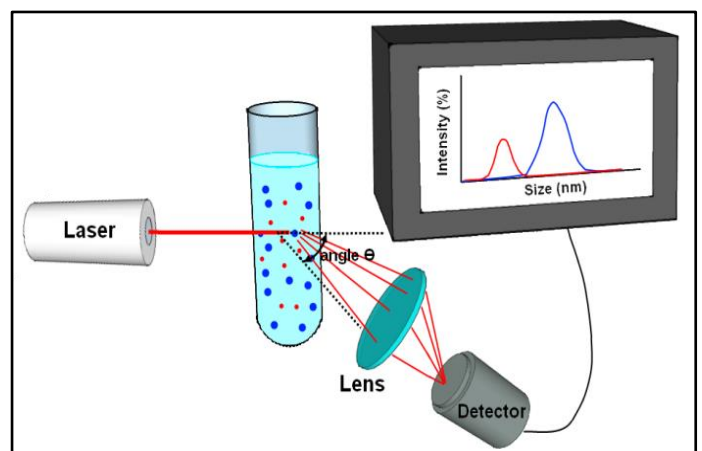
une sensibilité 1000 fois plus élevée que l'approche ELISA<sup>227,228</sup>, et le signal généré par seulement  $10^4$  vésicules a pu être détecté. Cependant, à l'heure actuelle, cette technique manque de multiplexage, ainsi les VEs doivent préalablement être isolées et la détection est limitée aux vésicules dans la gamme de taille de 50 à 150 nm. De plus, aucune information sur les propriétés physiques et métrologiques n'est fournie par ce système.

### 3.2.1.2. Profil métrologique

#### a) Les techniques de la diffusion de lumière

Les techniques de diffusion de la lumière, comme la DLS (*Dynamic Light Scattering*) et le NTA (*Nanoparticle Tracking Analysis*), permettent de déterminer la taille des VEs en solution grâce à la mesure de l'intensité de la lumière diffusée par ces particules qui sont animées d'un mouvement aléatoire, appelé mouvement brownien<sup>222,229</sup>.

En DLS, la distribution relative de la taille des VEs est mesurée à travers la détection de la fluctuation moyenne de la lumière diffusée par un échantillon<sup>230,231</sup>. La caractérisation des vésicules en DLS est néanmoins délicate sur une population hétérogène d'objets. Or, dans le cas des VEs qui couvrent 2 ordres de grandeur, en taille, l'analyse peut être altérée par cette hétérogénéité en taille des vésicules<sup>222,232</sup>. Ceci fait de la DLS une méthode performante en particulier pour la mesure d'échantillons monodisperses dans



**Fig. 15 :** Principe de fonctionnement des techniques basées sur la mesure de la diffusion de lumière (NTA et DLS).

une gamme de taille de 1 à 10 000 nm.

Le NTA permet la mesure de la taille individuelle des VEs (50 – 1000 nm) et leur quantification en utilisant un microscope optique conventionnel couplé à une caméra CCD. Pour cela, le NTA est mieux adapté à la mesure de la taille des particules dans un échantillon polydispersé<sup>233</sup>. Un mode fluorescence (F-NTA) permet également la caractérisation de particules marquées et donne accès à la caractérisation biochimiques des VEs<sup>234</sup>. Néanmoins, le système est généralement équipé de 1 à 2 lasers ce qui limite sa capacité vis à vis de la détection simultanée de plusieurs antigènes exprimés par les VEs, en utilisant plusieurs ligands fluorescents.

Ces deux techniques, hormis le mode F-NTA, ne permettent pas de clairement différencier les VEs des autres constituants de même taille (ex. agrégats protéiques). De plus, le NTA ne permet pas de détecter les VEs inférieures à 50nm<sup>222,229</sup>.

Dragovic et al.<sup>234</sup> ont utilisé le NTA pour étudier les VEs isolées à partir du placenta et du plasma par centrifugation différentielle avec une étape finale d'ultracentrifugation à 150 000 g pour sédimenter les VEs. Ils ont mesuré la taille et la concentration des vésicules en solution et ont montré que la grande majorité des vésicules dans les deux échantillons ont un diamètre compris entre 50 et 300 nm. De plus, avec le mode fluorescent, ils ont pu différencier les VEs des contaminants (notamment les vésicules lipoprotéiques) ce qui n'est pas possible lors de la mesure en mode « diffusion de lumière ».

### **b) Tunable Resistive Pulse Sensing « TRPS »**

Le TRPS est une technique qui permet la mesure de la taille (de 50 nm à 10 µm) et de la concentration des VEs en suspension. Elle est basée sur la mesure de la résistance électrique causée par le passage individuel des VEs à travers un pore au sein d'une membrane isolante (Fig. 16). Cette membrane sépare deux chambres contenant chacune une électrode unique immergée dans une solution d'électrolytes. Dans cette configuration, il existe alors un courant ionique entre les deux chambres<sup>235</sup>, et chaque particule passant ce pore provoque un pic de résistivité dont l'amplitude est proportionnelle à la taille de la particule.

La sensibilité de cette technique dépend de la taille du nanopore, allant de 100 à 4000 nm. Les membranes élastiques font encore l'objet de développement afin de permettre de contrôler la taille de pore pour l'adapter au large spectre de taille des VEs et éviter ainsi les problèmes de colmatage<sup>236</sup>.

Le TRPS, comme les techniques de la diffusion de lumière, ne permet pas néanmoins de discriminer les VEs des complexes protéiques. Elle possède une limite de détection de 50 nm, et nécessite une calibration avec des billes synthétiques rigides de taille connue.

Dans notre projet, nous utiliserons cette technique pour mesurer la taille et la concentration des VEs, en solution, dans différents échantillons biologiques.

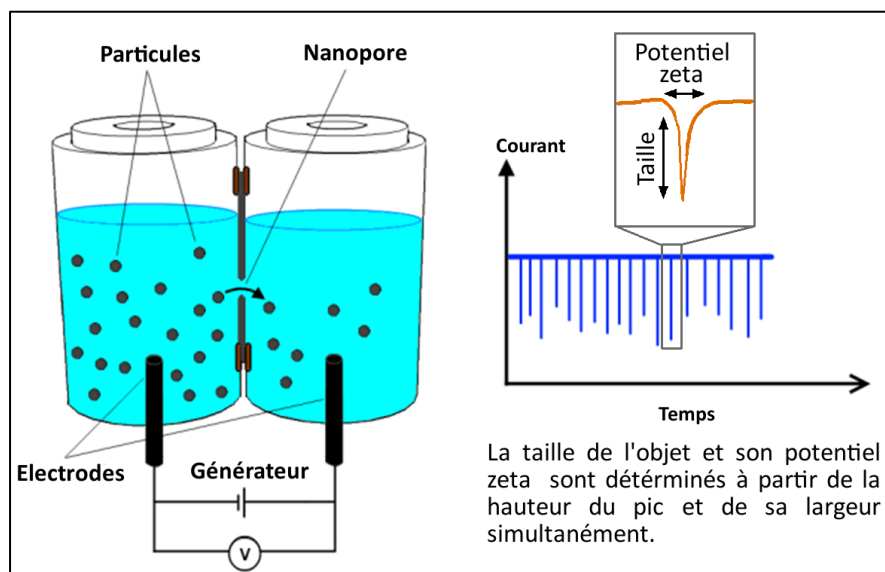


Fig. 16 : Principe de fonctionnement de la technique de TRPS.

### c) Technique de diffusion des rayons X aux petits angles (SAXS)

La technique de diffusion des rayons X aux petits angles (SAXS pour « Small Angle X-ray Scattering ») consiste à illuminer l'échantillon avec un rayon X monochromatique, ayant une longueur d'onde inférieure à 1 nm, et le suivi de la diffraction de ces rayons aux petits angles ( $\approx 3^\circ$ ). Cette technique permet de fournir des informations sur la structure des échantillons dans une gamme de taille de 1 à 100 nm, ce qui est adapté à l'étude des vésicules en dessous de 100 nm. Elle permet de mesurer la taille des vésicules, mais cette dernière est moins pertinente dans le cas d'un échantillon polydispense en taille comme les VEs<sup>227</sup>. Pour résoudre ce problème, Varga et al.<sup>237</sup> ont réalisé une analyse des VEs libérées par des érythrocytes et isolées par chromatographie d'exclusion. La chromatographie d'exclusion a abouti à l'élimination des protéines contaminantes et des débris cellulaires conduisant à une simplification de l'échantillon de départ pour procéder à l'analyse par la technique de SAXS. Cette dernière a montré une distribution en taille des vésicules entre 50 et 200 nm avec un maximum à 125 nm. Cette distribution en taille était comparable à celle obtenue par les techniques de NTA, DLS, TRPS et la microscopie électronique (EM) pour le même échantillon.

#### 3.2.1.3. Profil chimique

Le profil chimique peut être obtenu par la microspectroscopie Raman, une technique permettant d'étudier la composition chimique des vésicules individuelles sans marquage. L'échantillon est illuminé par une lumière monochromatique ; cette dernière interagit avec l'échantillon en échangeant de l'énergie causant un décalage dans la longueur d'onde de la



lumière diffusée, cet effet est appelé l'effet Raman. Ce décalage dépend de la composition moléculaire de l'échantillon<sup>222,227</sup>. Récemment, cette technique a été appliquée pour étudier des vésicules libérées par une amibe, la *Dictyostelium discoideum*, ainsi que des exosomes isolés à partir d'échantillons d'urine humaine<sup>238</sup>. Les résultats de l'analyse des vésicules libérées par l'amibe a permis d'identifier au moins deux différents types de vésicules selon leur composition biochimique globale. Cependant, l'application de cette technique pour étudier des échantillons complexes, tel que les VEs, aboutit à l'obtention de spectres Raman très complexes qui sont difficilement interprétables. L'utilisation d'une technique d'isolement spécifique des VEs avant d'appliquer l'analyse par Raman pourrait permettre de résoudre ce problème.

Ainsi, comme l'amplitude du signal Raman est proportionnel au nombre de molécules, cette technique est quantitative vis à vis de la composition biochimique de l'échantillon.

### **3.2.2. Techniques de caractérisation sur surface (2D)**

#### **3.2.2.1. Biodétection avec marquage**

##### **a) ELISA**

L'ELISA (pour « Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay ») est une technique biochimique immuno-enzymatique sur support permettant, par le biais d'une révélation en utilisant la fluorescence, de détecter et doser un analyte. Cette méthode est adaptée au dosage à haut débit et sur un grand nombre de cibles moléculaires, macromoléculaires mais également vésiculaires comme la détection des VEs directement dans les différents liquides physiologiques (ex. le plasma). De plus, l'ELISA permet de détecter les petites vésicules qui ne sont pas détectées par d'autres techniques telle que la cytométrie en flux<sup>239</sup>.

L'ELISA est un test basé sur la capture spécifique des VEs par des ligands immobilisés dans des puits d'une plaque de microtitration. L'échantillon contenant les VEs est incubé dans les puits et ensuite ces derniers sont lavés afin d'éliminer les objets non capturés. Ensuite, deux aspects d'analyse sont possibles : (i) l'aspect fonctionnel, fourni par la mesure de l'activité des VEs capturées (ex : activité procoagulante)<sup>240-242</sup> et (ii) l'aspect quantitatif, en utilisant des anticorps marqués (ex. anticorps lié à la peroxydase)<sup>213,243,244</sup>.

L'ELISA ne mesure pas directement le nombre des vésicules dans l'échantillon et ne donne aucune information sur les caractéristiques physiques (taille et morphologie) des VEs. Ainsi, cette technique ne peut pas discriminer les antigènes liés aux VEs des antigènes hydrosolubles présents dans l'échantillon. De plus, il faut noter que l'efficacité de capture ne dépend pas seulement de l'expression de l'antigène cible à la surface des VEs, mais aussi de la quantité de ligands immobilisés, et de la spécificité/affinité de la liaison antigène-anticorps<sup>183,239</sup>. Par conséquent des équipes s'intéressèrent à la recherche de ligands ayant une forte affinité et spécificité pour les VEs. Par exemple, Nakai et al.<sup>213</sup> ont montré que la protéine Tim4 possède une grande affinité pour la phosphatidylsérine et a montré une plus grande efficacité de capture

en ELISA par rapports à d'autres ligands spécifiques des VEs (ex : Annex-V, anti-CD9, anti-CD81).

Des kits ELISA commerciaux existent, comme ExoElisa (SBI, Mountain View, CA, USA) et ExoTEST™ (HansaBioMed, Estonia), destinés au dosage des exosomes par l'intermédiaire des sondes spécifiques de tétraspanines (CD9, CD81...). Le kit Zymuphen MP activity (Hyphen Biomed, Neuville-sur-Oise, France) permet de quantifier les VEs présentant la phosphatidylsérine par la mesure de l'activité de ce phospholipide vis-à-vis de la génération de thrombine.

### **b) Immunocapture sur puce**

Jorgensen et al.<sup>245</sup> ont utilisé une surface présentant des microspots de différents ligands spécifiques pour étudier les phénotypes des vésicules extracellulaires issues des échantillons de plasma et de cultures cellulaires. L'incubation des échantillons à la surface durant plusieurs heures est suivie d'une application des anticorps secondaires biotinylés; après lavage de la surface, la révélation est réalisée avec de la streptavidine fluorescente. En utilisant cette méthode, l'équipe a pu mesurer l'expression de 21 antigènes différents par les exosomes issus du plasma des patients sains, avec une limite de détection de  $2,5 \times 10^4$  vésicules. De plus, ils ont réussi à récupérer les VEs capturées à la surface avec une efficacité d'environ 90%.

D'autre part, différentes équipes ont développé des dispositifs microfluidiques basés sur l'immunocapture des VEs et permettant de quantifier et caractériser *in-situ* les VEs<sup>214-216</sup>. Par exemple, Chen et al.<sup>214</sup> ont développé un dispositif microfluidique composé d'une puce modifiée par des ligands spécifiques d'un type donné de VEs. Ce dispositif assure un isolement rapide (~1h) et spécifique des VEs qui seront caractérisées *in-situ* par une autre méthode (étude génomique ou caractérisation métrologique par microscopie).

### **3.2.2.2. Biodétection sans marquage**

#### **a) Microbalance à quartz**

La Microbalance à quartz (QCM) est un biocapteur piézoélectrique qui comprend une lame fine de quartz métallisée (généralement en or) sur chacune des faces. L'application d'un potentiel sinusoïdal induit la résonance du quartz à une certaine fréquence. La perturbation de l'oscillation de la platine, suite à l'interaction ou la dissociation de matériels de la surface, peut être mesurée avec une très grande précision. Cette technique a été appliquée à l'étude de la libération des VEs par des cellules cancéreuses de la prostate. Elle permet la mesure de la perte en masse des cellules immobilisées à la surface comme résultat de la libération des VEs suite à la stimulation des cellules, ou de même détecter le dépôt des VEs à la surface de l'électrode en fonction du temps<sup>246,247</sup>. Cette technique n'est pas encore largement exploitée pour l'étude des vésicules extracellulaires, et elle n'est pas capable, seule, de fournir des informations sur les propriétés physiques des VEs (taille, morphologie).

## **b) Les techniques de résonance des plasmons de surface**

Le phénomène de la résonance des plasmons de surface (SPR) est une méthode de transduction optique couramment utilisée pour étudier les interactions entre molécules, à la surface d'une puce métallique (or ou argent). La SPR est une technique sensible, et sans marquage, de reconnaissance quantitative d'espèce biologique en temps réel par mesure du changement d'indice de réfraction local résultant de l'interaction à la surface du capteur<sup>248</sup>.

La SPR fonctionne en milieu liquide, sous flux, et possède une capacité de multiplexage, consistant en l'immobilisation possible et localisée (sous forme de pistes ou de spots) de différents ligands à la surface de la puce.

Différentes études ont utilisé cette méthode pour le criblage moléculaire des exosomes dérivés à partir de cultures cellulaires et au sein de fluides biologiques<sup>249-251</sup>.

Dans le chapitre suivant, nous verrons de manière détaillée cette technique car elle fait partie de la plateforme NBA que nous avons développée.

D'autre part, une méthode de dosage colorimétrique, basée sur le principe des plasmon de surface localisés (LSPR pour « Localized Surface Plasmon Resonance »), a été décrite par Maiolo et al.<sup>252</sup>. Cette technique exploite les propriétés plasmoniques des nanoparticules d'or colloïdales; ces dernières, une fois mises en suspension dans un échantillon de VEs, s'adsorbent et se regroupent à la surface de la membrane plasmique de vésicules en induisant un changement de couleur de la solution de nanoparticules d'or d'origine. Cette méthode a permis de déterminer la concentration des VEs pour une gamme dynamique (35 fM à 35 pM) correspondant à leur gamme de concentration dans les liquides physiologiques. Cette technique est rapide mais nécessite un isolement préalable des VEs et leur séparation des contaminants protéiques qui peuvent altérer le dosage.

### **3.2.2.3. Profil morphologique et métrologique**

#### **a) La microscopie électronique**

La EM utilise un faisceau d'électrons qui possède une longueur d'onde plus courte que celle de la lumière visible, utilisée dans les microscopes optiques (OM), ce qui lui permet d'atteindre des résolutions nanométriques (<1nm, contre ≈200 nm pour les OM) suffisantes pour visualiser et étudier la morphologie des VEs<sup>152,163,253,254</sup>.

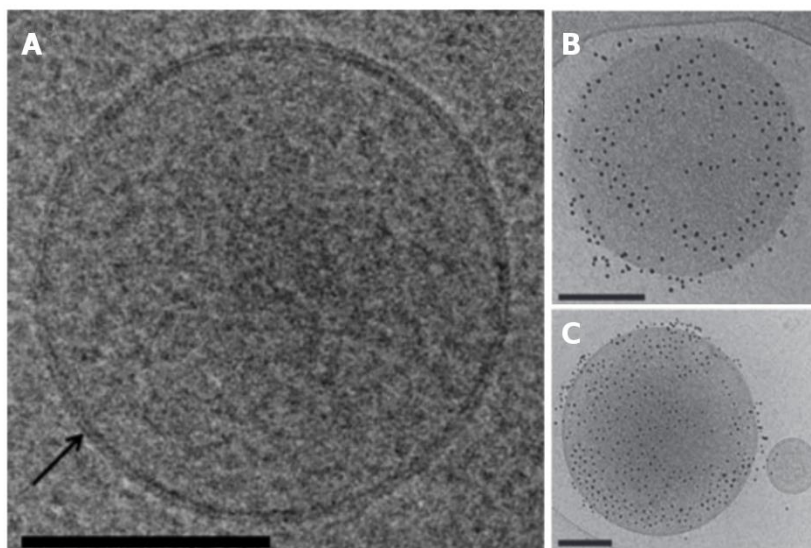
Cependant, ce type de microscope ne peut pas fonctionner en milieu aqueux, et les VEs doivent être isolées et concentrées, par ultracentrifugation, avant d'être fixées et déshydratées afin d'être visibles par EM. Ces étapes de préparation peuvent affecter la morphologie et la taille des VEs. De plus, la EM ne permet pas de quantifier les VEs.

Une autre méthode appelée cryo-EM, basée sur la congélation rapide des échantillons biologiques, permet d'éviter les étapes de préparation mentionnées ci dessus. En effet,

l'échantillon contenant les VEs est étalé sous forme d'une couche mince sur un support spécifique (grille) avant d'être congelé, et l'analyse est ensuite menée sous vide. Une stratégie de préparation de l'échantillon pour analyse en cryo-EM consiste en la fracturation de l'échantillon suite à sa congélation. Cette méthode, connue sous le nom de FF-TEM (Freeze-Fracture Transmission Electron Microscopy), a été aussi utilisée pour l'étude des VEs érythrocytaires et a mis en évidence des vésicules ayant une forme sphérique et une taille comprise entre 50-600 nm avec une population majeure entre 120-200 nm <sup>237</sup>.

Une autre stratégie d'analyse des VEs par cryo-EM, cette fois directement sur les échantillons congelés sans fracturation, a été développée plus récemment. Ces analyses menées dans des échantillons de plasma dépourvu en plaquettes (PFP) a permis de montrer l'hétérogénéité en taille (25 à 1000 nm) et en morphologie (sphérique et tubulaire) des VEs <sup>163,255</sup>. Cette technique permet de discriminer les VEs des lipoprotéines car la bicouche phospholipidique entourant les VEs est clairement visualisable (Fig. 17-A). De plus, une révélation du phénotype des VEs est possible par l'ajout de nanobilles d'or fonctionnalisées par des ligands spécifiques (Fig. 17- B et C) <sup>163,234,256</sup>.

**Fig. 17** : Images par cryo-EM montrant des VEs isolées à partir du plasma dépourvu en plaquettes (PFP) : (A) La flèche indique la bicouche phospholipidique. (B et C) Après marquage par des billes d'or, de 4 nm, couplées à l'annexine-V. (C) Deux vésicules dont une non marquée (à droite). Les barres d'échelle correspondent à 100 nm. (Arraud et al. 2014).



### **b) La microscopie à force atomique**

L'AFM appartient à la famille des microscopes à sonde locale. Elle permet de visualiser les VEs, avec une résolution nanométrique, lorsque ces dernières sont déposées sur une surface plane, de manière spécifique (capture par des ligands spécifiques) ou non-spécifique (adsorption), dans un milieu liquide, sous pression atmosphérique et sans préparation ni marquage de l'échantillon. L'AFM est basée sur l'utilisation d'une pointe, disposée à l'extrémité d'un levier flexible, qui balaye la surface de l'échantillon pour générer une image topographique de la surface.

L'AFM est incapable seule de fournir des informations quantitatives sur les VEs; elle peut

cependant tenter de corrélérer une densité d'objets sur une surface (nombre de particules par mm<sup>2</sup>) à une concentration de ces mêmes objets en solution (nombre de particules par ml).

Plusieurs études<sup>216,257-260</sup> démontrent que l'AFM peut être utilisée pour mesurer la taille relative des VEs dans un milieu liquide après adsorption sur une surface ou après capture spécifique via des anticorps dirigés contre une sous-population donnée de VEs. En plus de l'immunocapture spécifique à la surface, le couplage de l'AFM avec un microscope à fluorescence permet d'accéder à l'identification des sous-populations phénotypiques de VEs<sup>257</sup>.

Cette technique, similairement à la SPR, sera décrite en détail dans le prochain chapitre du fait qu'elle fait partie intégrante de la plateforme NBA.

### **3.2.3. Analyses protéomique et lipidomique**

L'analyse protéomique et lipidomique est aussi utilisée afin d'étudier la composition en protéines et en lipides des VEs<sup>261-264</sup>. Pour cela, des techniques basées sur l'électrophorèse sur gel (2D) et sur la spectrométrie de masse MS ont été largement exploitées au cours des dernières années.

Le Western blot fait partie des techniques utilisée pour l'identification des protéines spécifiques dans un échantillon et est une des méthodes les plus utilisées pour étudier les VEs<sup>125,157,262</sup>. Cette technique consiste à séparer les différentes protéines dans l'échantillon par électrophorèse sur gel suivi d'un transfert des protéines sur une membrane avant d'être révélées par des anticorps spécifiques marqués.

Les analyses « omiques » permettent de déterminer l'origine et d'appréhender les fonctions biologiques des VEs ainsi que les mécanismes exacts impliqués dans leur biogenèse. Ces analyses « omiques » peuvent être combinées à des techniques de purification ou d'isolement des VEs (immunocapture, centrifugation sur gradient...) ce qui permet d'optimiser l'efficacité de l'analyse. Par exemple, Kowal et al.<sup>265</sup> ont réalisé une analyse protéomique sur des VEs libérées par des cellules dendritiques. Ils ont isolé différentes sous-populations de ces VEs de différentes façons: (i) selon leur vitesse de sédimentation par centrifugation (à 2 000, 10 000 et 100 000 g), (ii) selon leur densité, par centrifugation sur gradient, et (iii) selon leur phénotype, par immunocapture via des billes magnétiques modifiées par des ligands spécifiques (CD9, CD81 et CD63). Par conséquent, la sous-population de vésicules sédimentant à 100 000 g a été nommée « petites vésicules » (pVEs), celles qui sédimentent à 10 000 g donne la sous-population de « vésicules de taille moyenne » (mVEs) et le terme « grandes vésicules » (gVEs) qualifié celles qui sédimentent à 2 000 g. Leurs analyses protéomiques montrent un grand chevauchement des compositions biomoléculaires de ces différentes sous-populations de VEs; les tétraspanines (CD9, CD81 et CD63) ont été enrichies chez les pVEs, mais CD9 et CD63 ont été aussi identifiées chez les gVEs et mVEs. Ainsi, des marqueurs considérés comme spécifiques des exosomes (ex. HSP70 et CMH-I et II) ont été identifiés chez les différents sous-types de VEs,

petites et grandes. Chez les pVEs, différentes sous-populations ont été explorées : les vésicules qui sont positives pour les différentes tétraspanines, celles exprimant CD9 mais n'exprimant pas CD63 ni CD81 et finalement celles qui sont négatives pour les tétraspanines et qui semble être indépendantes de la voie endosomique. Ainsi, des protéines ont été identifiées uniquement chez les pVEs (ex. TSG101 et ADAM10) et d'autres sont retrouvées uniquement chez les mVEs et gVEs (ex. actinin-4). Ces résultats confirment la polydispersité biochimique et morphologique des VEs.

Des études lipidomiques ont été aussi engagées pour étudier la composition en lipides et en phospholipides des VEs<sup>266</sup>. Biro et al<sup>158</sup> ont étudié la composition en phospholipides des VEs générées par des plaquettes suite à différents stimuli. Leurs données montrent que la composition en phospholipides des VEs est intermédiaire entre celle de la membrane plasmique et celle de la membrane des granules  $\alpha$  des plaquettes. En revanche, la membrane des VEs est plus riche en cholestérol. Aussi, la composition est légèrement différente selon le type de stimulation. Llorente et al.<sup>267</sup> ont analysé la composition en lipides des exosomes libérés par des cellules cancéreuses de prostate. Ces auteurs ont ainsi montré que la composition en lipides de la membrane des exosomes est différente de celle de la membrane des cellules originelles. La membrane des exosomes semble être sélectivement enrichie en certains lipides qui peuvent probablement assurer la stabilité de ces VEs dans le milieu extracellulaire.

Les différentes techniques d'analyse « omique » peuvent offrir une vue qualitative fine et une semi-quantification des VEs, mais aucune information sur leur taille, ni sur leur morphologie.

#### **3.2.4. Combinaison de techniques**

Des combinaisons de techniques ont été appliquées pour étudier les VEs. L'idée étant de coupler des approches complémentaires permettant d'aboutir idéalement à la qualification (phénotypes, taille...) et la quantification des VEs dans un échantillon biologique. Dans cette partie, nous allons citer quelques exemples de combinaisons technologiques utilisées pour étudier les VEs.

Ashcroft et al.<sup>216</sup> ont développé une méthode permettant la capture d'une sous-population spécifique de vésicules sur une surface de mica via des anticorps spécifiques. La capture est suivie d'une analyse AFM de la surface qui offre des informations sur la morphologie et la taille des vésicules. Cette méthode permet l'isolement d'une sous-population donnée de vésicules dans un échantillon complexe et leur analyse métrologique par AFM. Cependant, la capacité de la surface est limitée en termes : (i) de sous-types de VEs capturées, car une seule sous-population de VEs est ciblée (par l'anticorps greffé), (ii) d'efficacité car peu de VEs sont comptabilisées sur la surface, avec un maximum observé de 2 vésicules/ $\mu\text{m}^2$  et (iii) de quantification qui n'est fournie que de manière indirecte via le nombre de VEs par unité de surface. Ainsi, cette méthode souffre d'un manque d'efficacité, de multiplexage et

d'automatisation.

Leong et al.<sup>260</sup> ont utilisé un cytomètre en flux (Fluorescent Activated Cell-Sorting FACS) afin d'isoler une population de vésicules exprimant le ligand CD41 et de les récupérer en sortie sur une surface de mica pour en faire une analyse métrologique par AFM. Cependant, la sortie des vésicules vers la surface de mica implique une dessiccation des vésicules ce qui peut altérer leur morphologie et leur dimension.

D'autre part, Dean et al.<sup>207</sup> ont réalisé, par chromatographie d'exclusion, une séparation en taille des VEs issues des concentrés plaquettaires; quatre fractions ont été obtenues. Cette étape a été suivie par une mesure de taille, par DLS, et une analyse protéomique de chaque fraction. Cette étude a pu montrer une signature protéomique différente selon la taille des VEs.

Tatishsheff et al.<sup>238</sup> ont, simultanément, engagé de la microspectroscopie Raman, de la microscopie électronique et de l'analyse par NTA pour une caractérisation physicochimique des VEs dérivées de *D. discoideum*. Ceci leur a permis une caractérisation rapide des VEs dans une fenêtre de taille 50- 500 nm, ne nécessitant pas de préparation lourde de l'échantillon, ni de marquage. En particulier, la capacité de l'approche Raman à distinguer deux sous-populations de vésicules a été démontrée, sur la base d'un différentiel de composition chimique globale, et correspondant à deux états physiologiques de *D. discoideum*, à savoir la phase de croissance cellulaire et celle d'agrégation induite par carence nutritive. De plus, pour la première fois, des spectres Raman d'exosomes d'urine humaine ont été obtenus.

D'autre part, Gajos et al. ont utilisé une surface de silicium fonctionnalisée avec un anticorps spécifique du complexe glycoprotéique GP IIb/IIIa afin d'isoler les VEs dans des échantillons de plasma et de concentrés plaquettaires. Suite à cet isolement, une analyse par AFM et par ellipsométrie a permis de mesurer les propriétés physiques des VEs telles que leur taille et leur densité surfacique. Enfin, une analyse par spectrométrie de masse de la surface a permis la caractérisation des compositions moléculaires des VEs<sup>268</sup>.

En conclusion, nous pouvons remarquer que chacune des techniques citées auparavant possède des avantages mais aussi des limitations et aucune de ces techniques, utilisée seule, ne permet de déterminer à la fois la concentration, la taille et les caractéristiques biochimiques de VEs. A l'heure actuelle, un consensus visant à coupler des techniques apparaît comme crucial pour disposer enfin d'une caractérisation fine et complète des VEs<sup>269</sup>. De plus, comme l'a conclu la Société Internationale des Vésicules Extracellulaires (ISEV), il faut aujourd'hui éprouver et combiner au moins deux techniques différentes sur les VEs afin que les résultats soient pertinents<sup>7</sup>. Ceci est en accord avec le fait qu'une très faible proportion des chercheurs dans ce domaine utilise une seule méthode de caractérisation des VEs, alors que la grande majorité utilise deux ou plusieurs techniques de caractérisation<sup>181</sup>.

D'ailleurs, la méthode d'analyse la plus appropriée pour étudier les VEs doit respecter

plusieurs conditions :

- Assurer une analyse des VEs directement dans leur échantillon brut ou avec le minimum d'interventions préanalytiques possible,
- Permettre une caractérisation biochimique et physique des VEs,
- Accéder à une quantification / dosage des VEs,
- Caractériser à l'échelle individuelle les vésicules,
- Accéder à une analyse multiplexée,
- Assurer la reproductibilité et rendre possible l'automatisation.

Dans la suite de ce manuscrit, nous allons présenter la plateforme nanobioanalytique que nous avons développée, qui consiste en une combinaison de trois techniques, et qui est dédiée à l'étude des micro- et nanovésicules dans leur milieu biologique d'origine ou le moins traité possible. Cette plateforme, comme nous allons le montrer, respecte plusieurs conditions citées ci-dessus.



**Tableau 5.** Comparaison des différentes techniques utilisées pour la caractérisation des VES

	Limite de détection (LOD)	Quantification	Taille	Phénotype	Avantages	Limitations
<b>Cytométrie en flux</b>	≈ 300 nm (pour les conventionnels) et ≈100 nm pour les nouvelles générations	Oui	Oui	Oui	Technique pratique et nécessite un petit volume d'échantillon, mesure à haut débit	Une faible limite de détection (LOD)
<b>DLS</b>	1 nm - 6 µm	Non	Taille relative	Non	Petit volume d'échantillon, mesure rapide	N'est pas adapté pour les échantillons hétérogènes en taille
<b>NTA</b>	50 nm - 1 µm	Oui	Oui	Oui	Petit volume d'échantillon, mesure rapide, et possibilité de combiner avec de la fluorescence	N'est pas capable de différencier entre les VES et les contaminants protéiques
<b>TRPS</b>	50 nm - 1 µm	Oui	Oui	Non	Haut débit et mesure de particules individuelles	N'est pas capable de différencier entre les VES et les contaminants protéiques, problème de colmatage des pores
<b>ELISA</b>	-	Oui	Non	Oui	Haut débit et faible coût	Quantification indirecte, et artefacts dus aux molécules solubles et aux contaminants
<b>EM</b>	≈ 1 nm	Non	Oui	Limitée (avec des billes d'or)	Grande résolution	Etapes de préparations des échantillons, temps de mesure long
<b>SPRI</b>	-	Oui	Non	Oui	Multiplxage et détection en temps réel sans marquage	Quantification indirecte, équipement coûteux
<b>AFM</b>	≈ 1nm	Oui	Oui	Non	Grande résolution, différents types de milieu	Nécessite l'adsorption des VES à partir de l'échantillon sur une surface plane, temps de mesure long
<b>Spectroscopie Raman</b>	350 nm	Non	Non	Oui	Etude de la composition chimique des vésicules individuelles sans-marquage	Une technique spécialisée, temps d'opération long
<b>Analyse protéomique/lipidomique</b>	-	Semi	Non	Oui	Détection du profil protéomique/lipidomique des VES	Ne permet pas de différencier entre VES et contaminants, ne fournit pas des informations sur les propriétés physiques des Evs

## II. Mise au point de la plateforme NanoBioAnalytique

Dans le premier chapitre, nous avons fait le constat que les recherches sur les VEs se sont intensifiées au cours de la dernière décennie. Ces VEs sont des entités biologiques dotées de nombreuses activités qui jouent un rôle important dans différents processus physiologiques et pathologiques. Ceci les place comme des potentiels candidat-bioindicateurs de diagnostic et/ou de suivi thérapeutique.

Cependant, à la différence de biomarqueurs protéiques, la détection des VEs est un véritable challenge analytique devant répondre à la co-existence de différents types (exosomes, microparticules et corps apoptotiques) résultant du processus de génèse, à leur distribution en taille couvrant deux décades, leur origine cellulaire conduisant à une forte polydispersité biochimique ainsi que le chevauchement de leurs propriétés physiques voire la présence de contaminants tels que les agrégats protéiques et les complexes immuns. Une autre difficulté rencontrée porte sur la phase pré-analytique qui inclue des étapes de préparation d'échantillon et d'isolement des VEs. Les protocoles varient d'un laboratoire à un autre et manquent de standardisation même si une prise de conscience dans la communauté scientifique se produit depuis quelques années.

Dans ce contexte, nous avons développé une plateforme d'analyse, qualifiée de plateforme *NanoBioAnalytique* (NBA), combinant 3 techniques d'analyse : la résonance des plasmons de surface (SPR), la microscopie à force atomique (AFM) et la spectrométrie de masse (MS). La notion de plateforme analytique modulaire repose sur la mise au point d'une biopuce d'or sur laquelle toutes les analyses sont effectuées ; la première étape consiste en la capture spécifique des différentes sous-populations de VEs par des biorécepteurs spécifiques immobilisés à la surface de la puce selon un pattern de ligands prédéfini. Cette architecture de biopuce assure un multiplexage de la détection et la spatialisation bidimensionnelle des cibles biologiques en vue d'analyses complémentaires de type nanométrique ou omique. Ainsi l'analyse métrologique multi-échelle des VEs capturées sera assurée par l'AFM permettant d'accéder aux caractéristiques de distributions en taille et en morphologie. L'interfaçage de la puce avec les techniques de spectrométrie de masse permettra de générer une signature protéomique des différentes sous-populations phénotypique des VEs, voire de découvrir des protéines impliquées dans les mécanismes effecteurs vis-à-vis de cellules cibles.

Nous présenterons dans un premier temps la biopuce d'or, l'élément principal de notre plateforme. Nous détaillerons ensuite les différentes techniques utilisées dans le cadre de ce travail, à savoir la SPR, l'AFM et la MS. Dans un deuxième temps, nous présenterons les protocoles utilisés et déjà validés pour la fonctionnalisation chimique et le greffage des biorécepteurs à la surface de la biopuce ainsi que les aspects expérimentaux. Finalement, sera présenté le couplage entre ces différentes méthodes dans le but d'assurer une analyse

quantitative et qualitative sur biopuce des VEs contenues dans un échantillon biologique brut.

## 1. La biopuce d'or

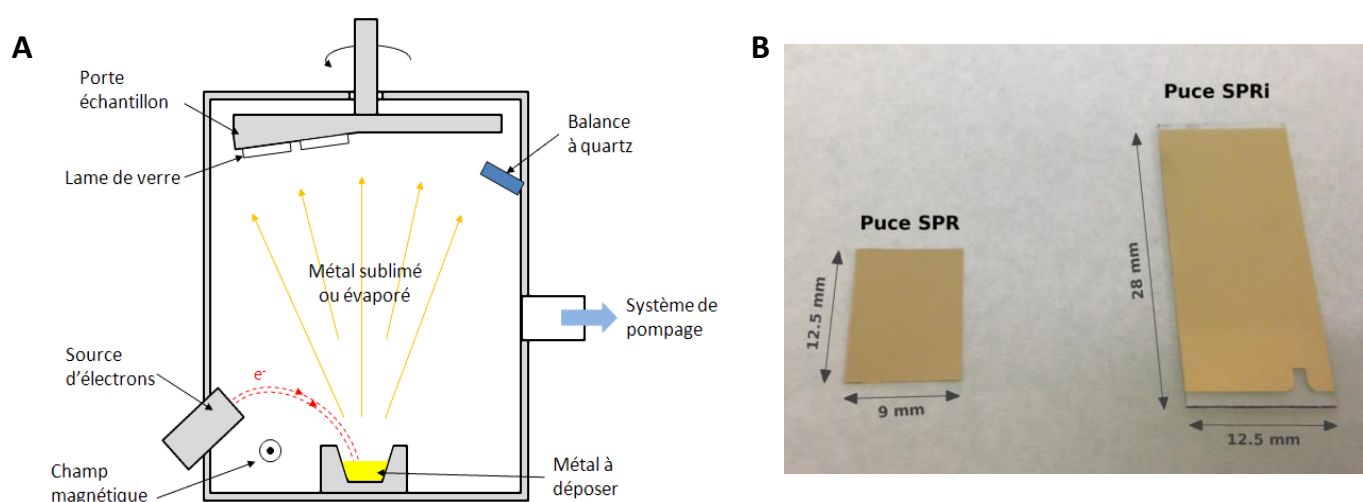
La biopuce d'or est le support d'analyse entre les différentes techniques de notre plateforme NBA. C'est à la surface de la biopuce que sont menées les différentes investigations, à savoir le suivi de la capture spécifique des VEs via des ligands spécifiques en SPR, leur analyse métrologique par AFM et l'analyse protéomique par MS.

### 1.1. Fabrication des puces d'or

Les puces d'or utilisées dans ce projet sont fabriquées en salle blanche (centrale de technologie MIMENTO -*Microfabrication pour la MEcanique, les Nanosciences, la Thermique et l'Optique*-) de Besançon, par les ingénieurs de la division Biomédicale de la structure de transfert FEMTO-engineering. Les puces consistent en un dépôt d'une fine couche d'or ( $\approx 50$  nm) à la surface d'une lame de verre à l'aide de la technique d'évaporation par canon à électrons (EBPVD) avec l'évaporateur EVA 450 (Alliance Concept) (Fig. 18-A). Pour améliorer l'adhérence de l'or sur le verre, une fine couche d'accroche de chrome (1 à 2 nm) a été utilisée. Le protocole détaillé de la préparation des biopuces est décrit dans la thèse de F. Rémy-Martin<sup>270</sup>.

Dans le cadre de ce projet, deux types d'appareils SPR sont utilisés : le SPRi-Plex II (HORIBA-Scientific) et BIA3000 (Biacore) qui sont présentés dans la partie suivante. Les puces utilisées dans ces deux instruments sont préparées selon le même protocole, seules les dimensions des lames de verre changent en raison des systèmes fluidique et optique de chaque instrument (Fig. 18-B).

Après fabrication, les puces sont conditionnées dans la salle blanche, stockées à l'abri de la poussière, à température ambiante, jusqu'à leur fonctionnalisation chimique.



**Fig. 18 :** (A) Principe de fonctionnement de la technique d'évaporation par canon à électrons. (B) Photographie des biopuces home-made destinées à l'utilisation en système BIA3000 (puce SPR, à gauche) et en SPRi-Plex II (puce SPRi, à droite).

## 1.2. Fonctionnalisation chimique des puces

La stratégie de greffage des biorécepteurs à la surface de la puce d'or repose sur une immobilisation de façon covalente. Pour cela, nous utilisons des monocouches auto-assemblées (SAMs), qui sont des interfaces organiques permettant de fournir une grande densité de sites d'accroche pour les biorécepteurs<sup>271,272</sup> mais aussi pouvant former une barrière physique compacte de quelques nanomètres d'épaisseur à la surface d'or, ce qui limite les interactions non-spécifiques avec la surface<sup>273</sup>.

### 1.2.1. Les monocouches auto-assemblées (SAMs)

Les SAMs sont des monocouches constituées de molécules organiques de nature hétérobifonctionnelles composées d'un groupement de tête (ou groupe d'accroche), d'un espaceur et un groupement fonctionnel terminal.

Les groupements fonctionnels d'accroche les plus communs sont les thiols (-SH) pour les surfaces métalliques et les silanes (-Si(OR)<sub>3</sub>) pour les oxydes. Les bras espaceurs sont généralement soit des chaînes carbonées (alkyles), soit des chaînes polyéthylène-glycol (PEG) ; la compacité des SAMs assure une passivation de la surface de l'or vis-à-vis du milieu extérieur et est préconisée afin de réduire les interactions non-spécifiques, sur surface, en milieu complexe. Les groupements terminaux, faisant face au milieu extérieur à sonder, sont des groupements chimiques réactifs ou activables permettant le greffage des biorécepteurs au substrat. Différents groupement terminaux existent, tels que les groupements amine, carboxyle, etc...

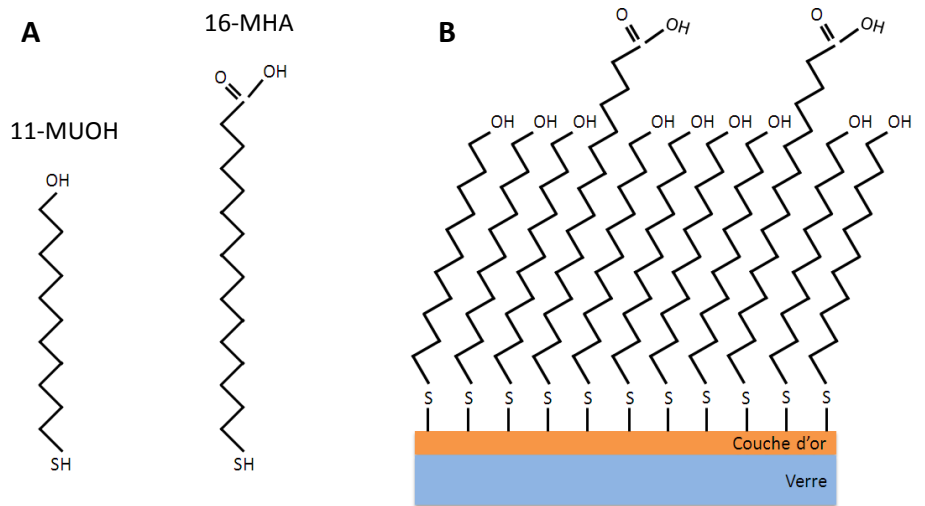
Dans notre cas, comme le substrat consiste en une biopuce d'or, nous avons choisi des architectures à base d'alkanethiols pour former la SAM. Ce sont des composés organiques qui contiennent un groupement sulfhydryle (-SH) terminal qui peut interagir avec les atomes d'or, par addition oxydante et élimination réductrice de l'hydrogène, pour former une liaison quasi-covalente avec la surface ( $\approx 40$  Kcal/mol)<sup>274</sup>, cette forte chimisorption offre une stabilité pour la monocouche. Les molécules thiolées s'adsorbent tout d'abord rapidement au substrat puis s'organisent entre elles pour former une couche ordonnée avec des structures cristallines ou semi-cristallines sur la surface du substrat au bout de quelques heures<sup>275,276</sup>.

Un mélange de deux molécules de thiols a été utilisé pour la fonctionnalisation (Fig.19) :

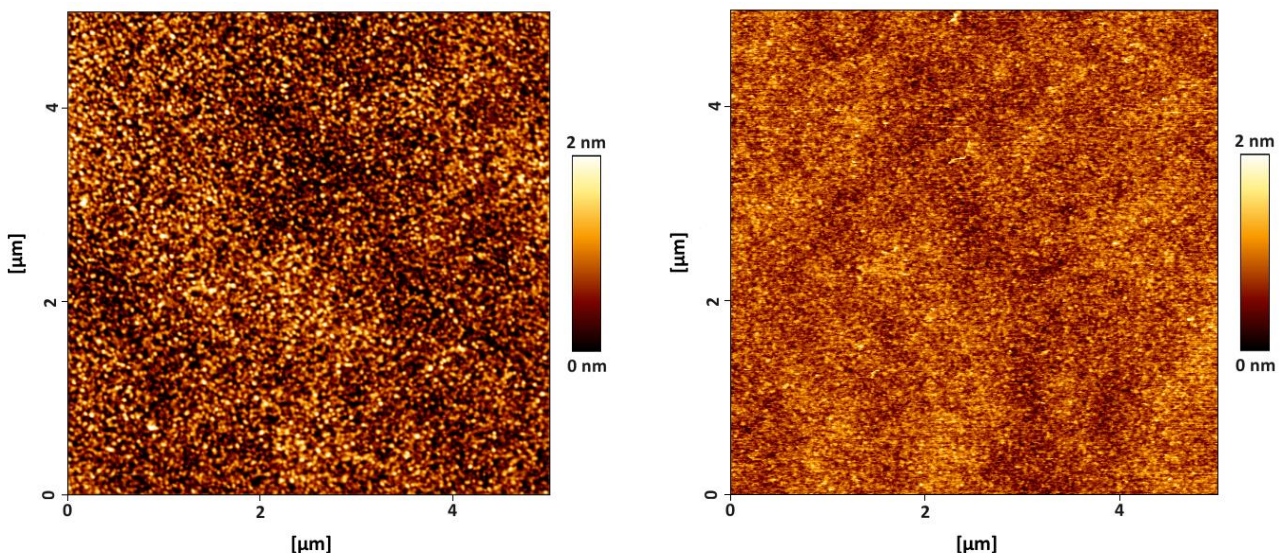
- **Acide 16-mercapto-1-hexadécanoïque (16-MHA)** : un alkanethiol, composé d'une chaîne de 16 carbones et d'un groupement terminal carboxyle (-COOH) qui va permettre la liaison covalente de ligands (liaison amide). Sa formule est SH-(CH<sub>2</sub>)<sub>15</sub>-COOH.

- **11-mercapto-1-undécanol (11-MUOH)** : un alkanethiol composé d'une chaîne de 11 carbones et d'un groupement terminal hydroxyle (-OH). Sa formule avant toute réaction est SH-(CH<sub>2</sub>)<sub>11</sub>-OH.

**Fig. 19 :** Les molécules d'alkanethiols, 11-MUOH et 16-MHA (A), utilisées pour la réalisation d'une monocouche auto-assemblée à la surface de l'or par le biais d'une liaison entre les molécules de soufre et les atomes d'or (B).



Les molécules de 11-MUOH sont utilisées en large excès dans la solution de fonctionnalisation (90% mol/mol) et assurent une compacité et une passivation de la surface d'or conduisant à une SAM présentant une surface de nature hydrophile constituée de groupements terminaux hydroxyle. L'introduction d'une faible proportion de molécules 16-MHA au sein de la SAM assure des points de greffage des macromolécules (biorécepteurs) sans altération de son auto-organisation. Le choix d'une telle SAM mixte est basé sur de nombreuses études qui ont montré que l'utilisation d'un mélange d'alkanethiols, dont le mixte 16-MHA/11-MUOH, permet d'accroître la performance de l'immuncapteur, notamment en améliorant la biodétection et la passivation de la surface envers les interactions non-spécifiques en milieux biologiques complexes<sup>277,278</sup>. Ainsi, un mélange constitué de 90% de 11-MUOH et 10% de 16-MHA, en pourcentage molaire, a été utilisé pour assurer la plus grande efficacité vis-à-vis de la capture d'antigène et de la passivation de la surface<sup>278</sup>. De plus, il a été montré que ce pourcentage



**Fig. 20 :** Image AFM d'une puce d'or nue (à gauche) et une puce d'or après fonctionnalisation chimique avec un mixte de molécules thiols (10% 16-MHA et 90% 11-MUOH). Scan en air, en mode contact, avec un levier de 0,32 N/m.

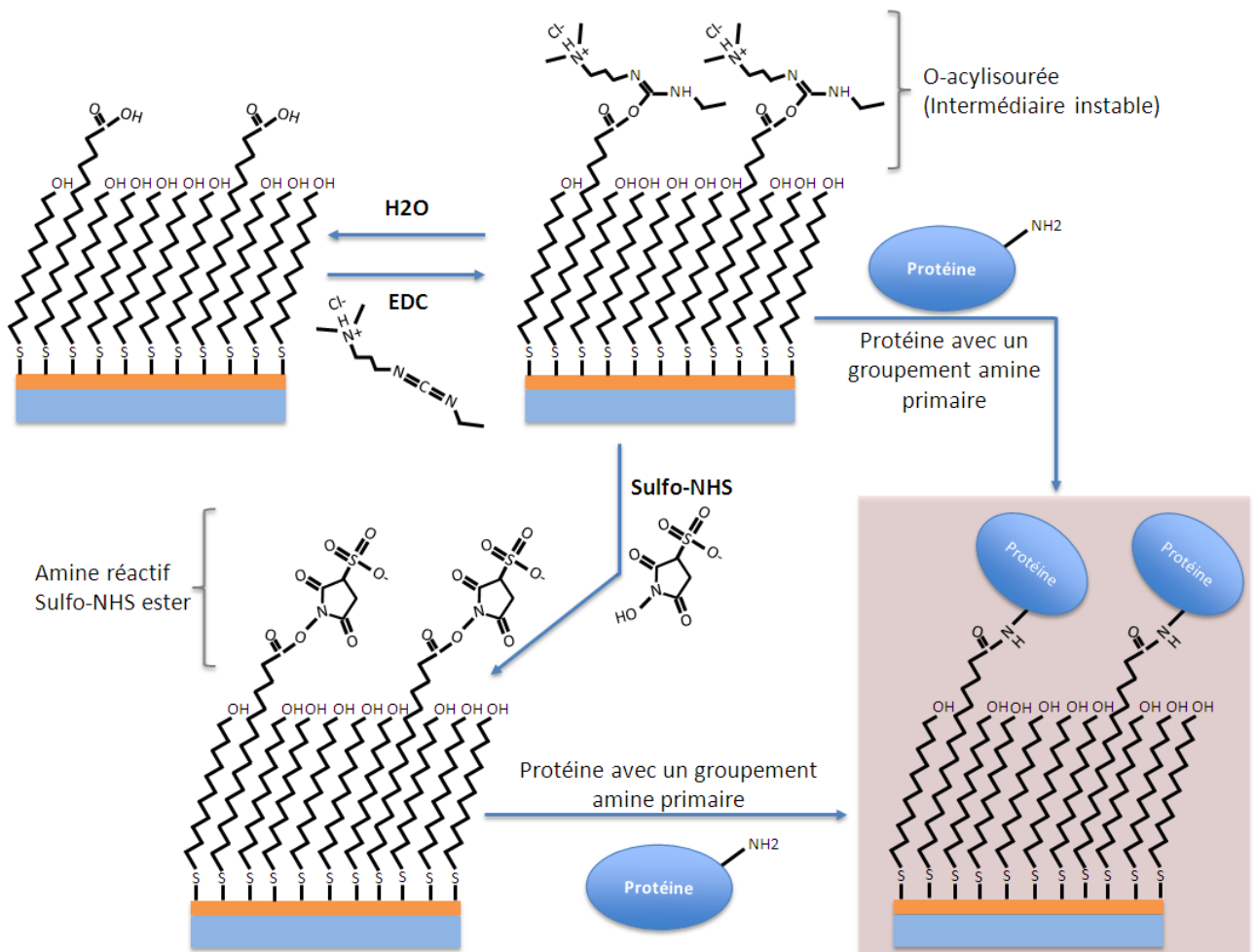
MUOH/MHA assure la meilleure uniformité en densité d'anticorps par spot <sup>289</sup>.

La fig. 20 montre des images AFM de la surface d'une biopuce d'or avant et après sa fonctionnalisation chimique avec un mixte de molécules thiols. La rugosité moyenne ( $R_q$ ) de la surface nue est d'environ 0,47 nm, alors que la surface fonctionnalisée montre une rugosité de  $\sim 0,35$  nm. Ainsi, la SAM contribue à réduire la rugosité de la surface, et ce sur l'ensemble de la surface. Cela tend à démontrer l'homogénéité de la fonctionnalisation chimique de la biopuce, ce qui est un prérequis pour un greffage lui-même homogène des différents ligands.

### 1.2.2. Greffage des ligands sur SAM

Dans le but de greffer les biorécepteurs à la surface des puces fonctionnalisées chimiquement, une étape importante consiste à activer les groupements carboxyle (-COOH) de 16-MHA, pour la formation d'une liaison covalente avec les groupements amines primaires (-NH<sub>2</sub>), sur les biorécepteurs, présents aux extrémités N-terminales des polypeptides et sur les résidus de Lysine (Lys).

Cette activation se fait par estérification des groupements carboxyle. En premier temps, la surface de la puce est mise en contact avec une solution de 1-éthyl-3-[3-



**Fig. 21:** Principe d'activation des groupements carboxyle, portés par les molécules de 16-MHA, par EDC et sulfo-NHS pour le greffage des biorécepteurs (ex : anticorps, ligands, etc) à la surface d'une biopuce.

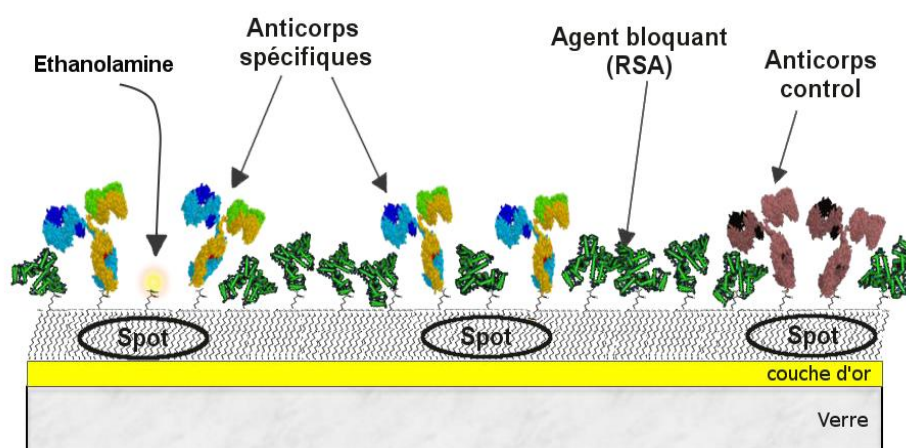
diméthylaminopropyl]carbodiimide (EDC). Ce dernier réagit avec les groupements carboxyle pour former un composé intermédiaire amine « O-acyl iso urée » qui peut directement réagir avec le groupement amine primaire du biorécepteur pour donner une liaison amide (Fig. 21). Cependant, ce composé intermédiaire est sensible à l'hydrolyse, ce qui le rend très instable en solution aqueuse. Pour cette raison, suite à l'incubation avec l'EDC et la formation du composé intermédiaire, une solution de N-hydroxysulfosuccinimide (sulfo-NHS) est appliquée à la surface de la puce<sup>279</sup>. Le sulfo-NHS interagit avec le composé intermédiaire instable pour former une amine sulfo-NHS ester qui est plus stable et plus efficace pour relier les biorécepteurs grâce à son groupement  $-SO_3$  qui, grâce à sa charge négative, améliore l'attractivité des biorécepteurs/protéines vers la surface. Par la suite, le groupement sulfo-NHS ester peut interagir avec les biorécepteurs, par une liaison amide entre les groupes carboxyliques et les groupements amine (Fig. 21).

Le greffage des anticorps à la surface de la puce activée se fait avec un tampon ayant un pH spécifique, appelé tampon d'immobilisation. Le pH du tampon d'immobilisation dépend de la composition des anticorps; le meilleur pH d'immobilisation pour un anticorps donné est celui qui donne des charges opposées entre la SAM et l'anticorps en augmentant ainsi les forces d'attractions électrostatiques entre eux. Par conséquent, le pH doit être compris entre la valeur du pKA de la monocouche et la valeur du pI (point isolélectrique) du ligand à greffer (partie «3.2.3. Optimisation des conditions de greffage des ligands »)<sup>280</sup>.

### 1.2.3. Blocage et désactivation de la puce

Suite à l'activation des groupements carboxyle de la SAM et le greffage des biorécepteurs à la surface de la puce, une étape de désactivation de la surface est nécessaire afin de bloquer les sites carboxyle activés n'ayant pas réagi. Au préalable, une étape de passivation de la surface par un agent bloquant est réalisée. Le blocage de la surface se fait dans un premier temps avec une solution d'albumine de sérum de rat (RSA). Les molécules de RSA (66 KDa) sont généralement plus petites que les biorécepteurs (ex : les anticorps), ce qui leur permet de

**Fig. 22 :** Représentation schématique de la surface de la puce suite au greffage des anticorps et le blocage à la RSA. Ainsi les groupements COOH activés, présentés par les molécules 16-MUOH, qui n'ont lié ni biorécepteurs ni molécules de RSA, sont désactivés à l'aide de l'éthanolamine.



comblent d'éventuels défauts dans la SAM et d'interagir avec les groupements carboxyle activés, ce qui limite l'adsorption et les interactions non-spécifiques à la surface<sup>281,282</sup>. Enfin, nous terminons la procédure par une étape de désactivation des groupements carboxyle, qui n'ont pas réagi avec le ligand (biorécepteur et RSA), avec de l'éthanolamine/HCl (Fig. 22).

L'aspect expérimental de la fonctionnalisation chimique et du greffage des biorécepteurs à la surface de la puce seront décrits dans la partie « Aspects expérimentaux et méthodologies » de ce chapitre.

## **2. Techniques sans marquage mises en jeu dans la plateforme NBA**

### **2.1. La résonance des plasmons de surface**

La méthode de résonance des plasmons de surface (SPR) est une méthode de transduction optique couramment utilisée pour étudier les interactions biomoléculaires à la surface d'une puce. Les technologies basées sur la SPR sont sensibles à la variation d'indice de réfraction induite à la surface de la puce dans les limites de la profondeur de pénétration d'une onde évanescente. Ces techniques sont classées parmi les méthodes de détection sans marquage (détection directe « Label-free ») qui permettent le suivi en temps réel des interactions à étudier, dans différents milieux (liquide, gaz, ..), avec une grande sensibilité (de l'ordre du pg/mm<sup>2</sup>).

#### **2.1.1. Historique**

En 1902, Wood remarque, en observant le spectre d'une source continue de lumière blanche à partir d'un réseau de diffraction en réflexion, de fines bandes sombres dans le spectre diffracté<sup>283</sup>. En 1941, des analyses théoriques entreprises par Fano<sup>284</sup> ont montré que ces anomalies étaient associées aux ondes de surface supportées par le réseau. En 1968, Otto montre que ces ondes de surface peuvent être excitées en utilisant la réflexion totale atténuée<sup>285</sup>, et dans la même année, Kretschmann et Raether<sup>286</sup> ont obtenu les mêmes ondes à partir d'une autre configuration. Suite à ces travaux, l'intérêt porté à l'étude des plasmons a considérablement augmenté et l'utilisation des plasmons s'est répandue de plus en plus pour la caractérisation de films minces et l'étude des phénomènes se déroulant sur des interfaces métalliques.

En 1983, Nylander & Liedberg<sup>287</sup> ont exploité pour la première fois la configuration de *Kretschman* pour la détection de gaz et de biomolécules. Ensuite, en 1984, la société *Pharmacia Biosensors* a commencé à développer et commercialiser des appareils SPR, et en 1990, le premier appareil Biacore® a été vendu avec pour fonction de permettre l'étude des interactions biomoléculaires de types anticorps/antigènes, ADN/ADN, ADN/protéines, etc... Depuis, cette technologie est considérée comme un outil de recherche, d'aide au développement et de contrôle dans de nombreux domaines en particulier l'industrie pharmaceutique, l'Agro-Alimentaire et le Biomédical.

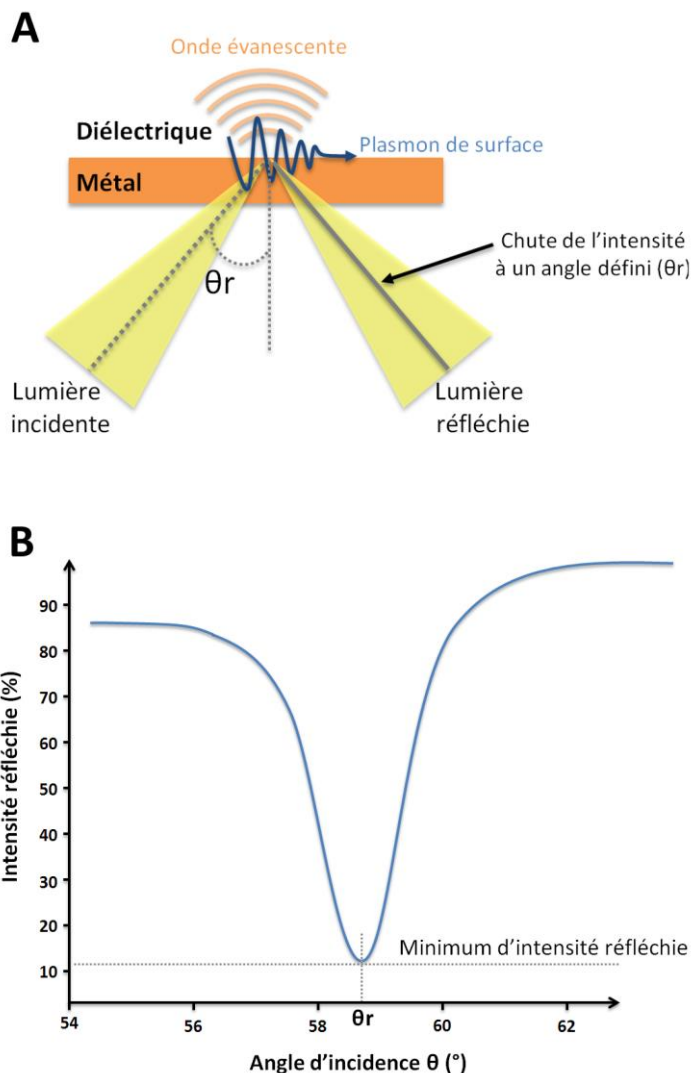


### 2.1.2. Principe de fonctionnement

Les plasmons de surface correspondent à une oscillation d'électrons qui se produit à l'interface entre deux milieux, un métal (Cu, Au, Al, ...) et un diélectrique, suite à l'illumination de cette interface par un faisceau de lumière dans des conditions particulières. Cette oscillation se propage parallèlement à l'interface métal-diélectrique et sa fréquence est perturbée par tout changement de l'indice optique local du milieu diélectrique, changement s'opérant par exemple suite à la capture d'un ligand par un récepteur immobilisé à la surface métallique.

En pratique, un faisceau de lumière incident, en polarisation Transverse Magnétique (TM) et monochromatique, illumine l'interface métal-diélectrique, et sous des conditions particulières, impliquant la longueur d'onde du rayon incident et l'angle d'incidence, une onde électromagnétique se forme, appelée onde évanescente, qui se propage perpendiculairement à l'interface et se caractérise par une décroissance exponentielle de son amplitude de part et d'autre de l'interface (en  $z$ ). Les électrons libres de la couche périphérique de l'or entrent en résonance avec l'onde évanescente, ce phénomène est appelé résonance plasmonique de surface (Fig. 23-A). Cela implique une absorption d'une partie de l'énergie apportée par la lumière et se traduit par une chute de l'intensité de la lumière réfléchie à un angle d'incidence défini, appelé angle de résonance plasmonique ( $\theta_r$ ), mais aussi angle de plasmon ou l'angle du minimum de réflexion (Fig. 23-B).

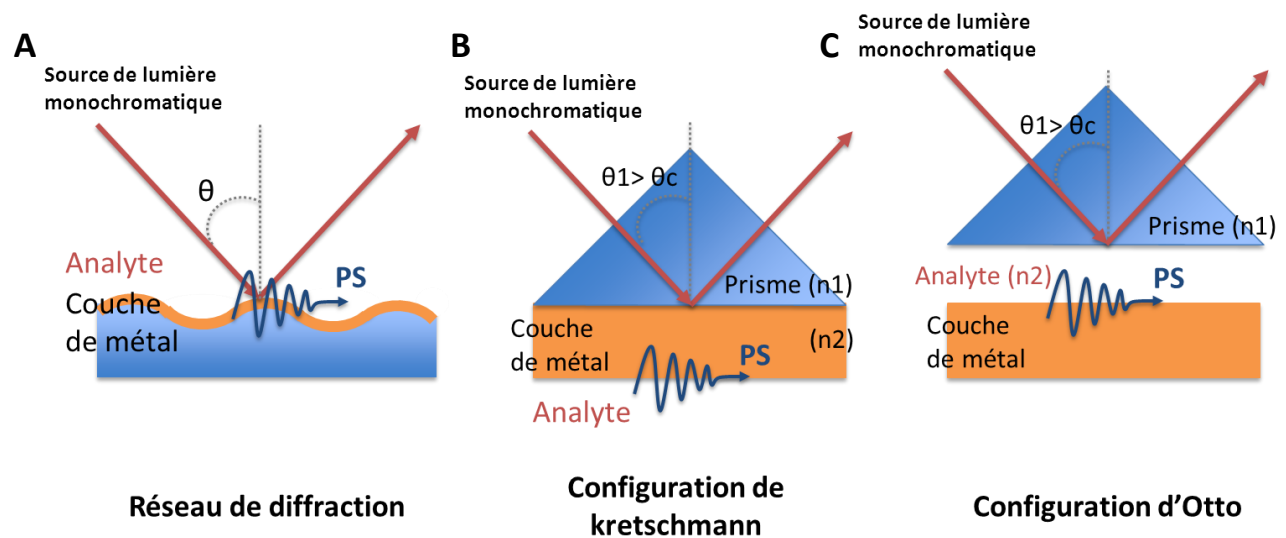
Les caractéristiques de propagation de l'onde évanescente dépendent de plusieurs paramètres, tels que la longueur d'onde de la lumière utilisée, la permittivité du milieu diélectrique ( $\epsilon_d$ ), la permittivité du métal ( $\epsilon_m$ ), et la célérité de la lumière (m/s). En connaissant les valeurs de ces différents paramètres, nous pouvons calculer les différentes caractéristiques de l'onde



**Fig. 23 :** (A) Représentation schématique du principe SPR. (B) Courbe de plasmon typique d'une puce d'or montrant l'évolution de l'intensité du faisceau réfléchi en fonction de l'angle d'incidence.

comme la pénétration dans le milieu diélectrique, qui désigne la partie sensible du système, appelé *champ évanescent*. Cette dernière est d'environ 200 nm dans les instruments SPR conventionnels<sup>288</sup>. Ainsi, les vésicules qui ont une taille entre 30-200 nm sont parfaitement adaptées à la détection SPR, alors que pour les plus grandes vésicules, uniquement une partie des vésicules contribuera à la perturbation de l'onde et donc au signal SPR. Il faut noter que les vésicules biologiques (telles que les VEs), grâce à leur souplesse, tendent généralement à se déformer suite à leur capture à la surface (Ce phénomène sera montré dans le chapitre III).

Deux principales configurations de dispositifs SPR sur puce existent. La première configuration, est celle dite de *couplage optique par un réseau de diffraction* (Fig. 24-A), où un faisceau de lumière incident interagit avec la surface d'une puce présentant une nanostructuration périodique recouverte d'un métal (ex. : or). La réflexion de la lumière, captée par un détecteur, sera sensible aux interactions biomoléculaires qui se déroulent à la surface de l'or. Malgré le fait que cette technique est plus avantageuse vis-à-vis de la miniaturisation de capteurs, elle souffre d'un défaut majeur manifesté par le fait que les faisceaux incidents et réfléchis doivent traverser le milieu couvrant et peuvent être perturbés par les variations optiques des liquides injectés<sup>289</sup>.



**Fig. 24 :** Les deux principales configurations des technologies SPR : la méthode de couplage optique par réseau de diffraction (A) et la réflexion totale atténuée avec les deux modèles, celui de *Kretschmann* (B) et celui d'*Otto* (C). PS désigne le « plasmon de surface » et  $\theta_c$  l'angle critique.

La deuxième configuration, celle par couplage en mode de *réflexion totale atténuée*, excite les plasmons de surface lorsqu'une réflexion interne totale du faisceau incident se produit. Deux modèles existent, celui de *Kretschmann-Raether*, où une couche mince de métal est en contact direct avec un coupleur optique, généralement un prisme (Fig. 24-B); le deuxième modèle est celui d'*Otto*, où la couche métallique est séparée du prisme par un espace de l'ordre de la longueur d'onde (Fig. 24-C). Le faisceau de lumière incident, en polarisation Transverse Magnétique (TM) et monochromatique, traverse un milieu d'indice de réfraction  $n_1$  (prisme) avec

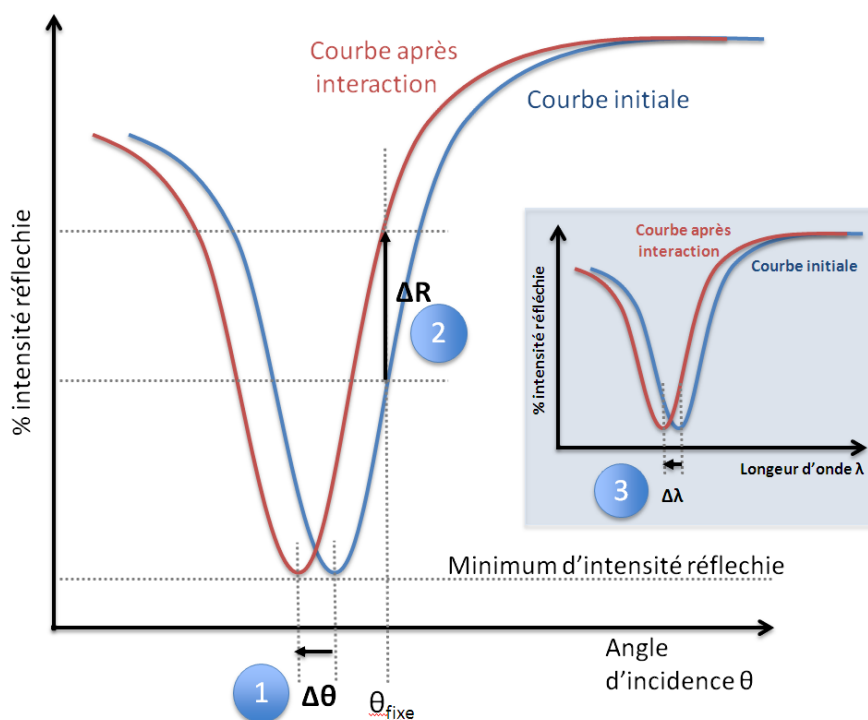
un angle  $\theta_1$  supérieur à l'angle critique  $\theta_c$ , le rayon lumineux ne pénètre pas dans le milieu d'indice optique  $n_2$  (milieu diélectrique), lorsque  $n_1 > n_2$ , pour être totalement réfléchi dans le milieu d'indice  $n_1$ : c'est la réflexion totale interne (TIR). Sous des conditions particulières, impliquant la longueur d'onde du rayon incident et l'angle  $\theta_1$ , le rayon incident peut induire la formation des plasmons et la création d'une onde évanescente; ensuite, la lumière réfléchie, qui contient les informations nécessaires, est collectée par un détecteur. Cette deuxième configuration est plus sensible que la première<sup>290</sup>.

Dans le cadre de notre projet, nos deux technologies SPR, le SPRi-Plex II et BIA3000, utilisent le modèle de *Kretschmann* qui est plus adapté à l'étude des interactions biologiques. En effet, dans cette configuration le faisceau incident ne traverse pas le milieu, dans lequel se trouvent les analytes, qui par sa composition pourrait perturber la propagation de la lumière.

### 2.1.3. Les différents types d'interrogation du plasmon

Les appareils commerciaux peuvent être basés sur trois configurations différentes. Lorsqu'un événement biologique se produit à l'interface métal / diélectrique et, si seule la longueur d'onde est fixée, l'énergie nécessaire pour exciter les plasmons de surface va changer et l'angle de résonance plasmonique va varier (interrogation angulaire), au même titre que la longueur d'onde évoluera si l'on fixe l'angle d'incidence (interrogation spectrale). Dans le cas d'un angle et d'une longueur d'onde fixe, l'intensité lumineuse va augmenter (interrogation en réflectivité) (Fig 25).

A titre d'exemple, l'appareil de BIA3000, commercialisé par BIAcore®, est basé sur l'interrogation angulaire. Comme seule la longueur d'onde est fixe, la mesure des événements à

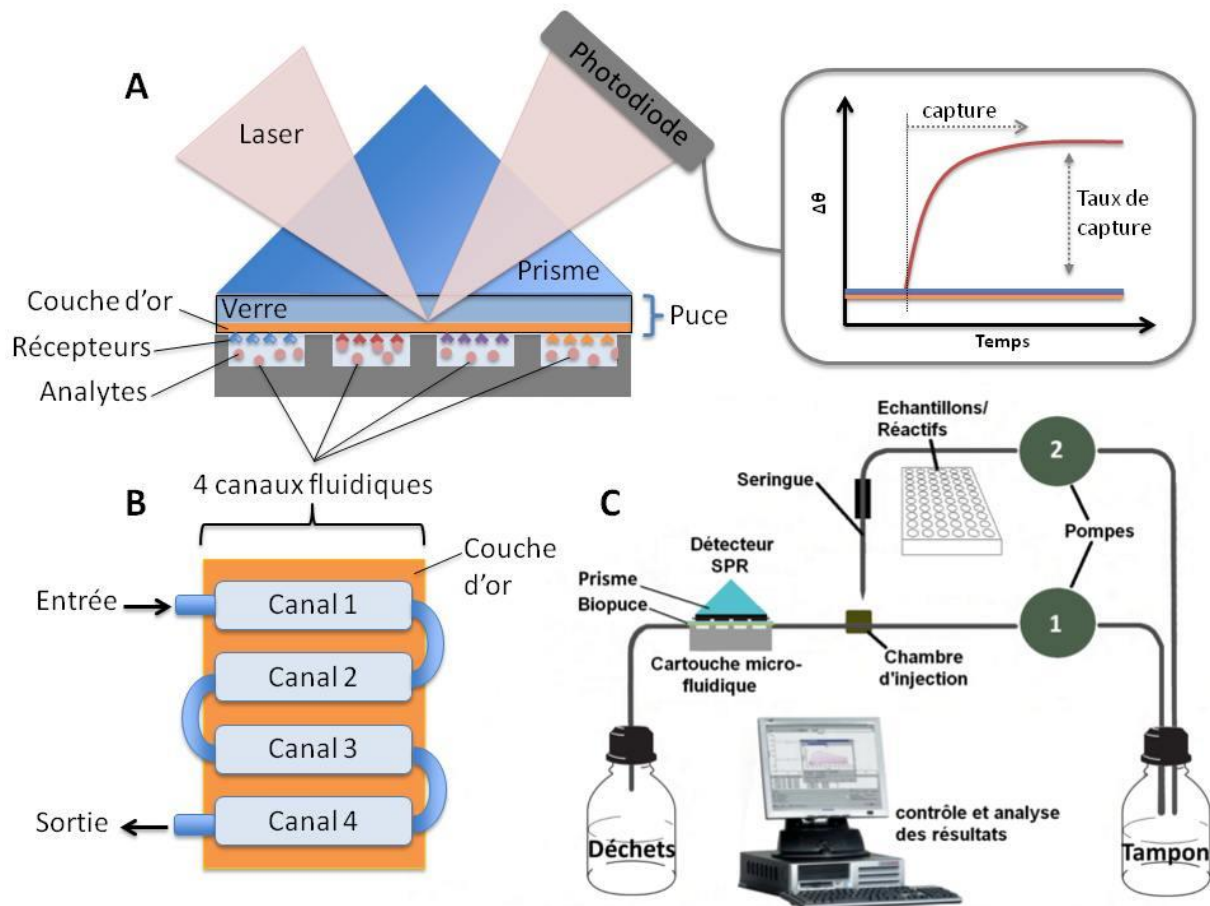


**Fig. 25** : Différentes méthodes exploitant l'évolution des courbes de plasmons : (1) interrogation angulaire, utilisée par BIAcore, (2) interrogation en réflectivité utilisée par l'imagerie SPRi et (3) interrogation spectrale.

l'interface est effectuée en mesurant le déplacement  $\Delta\theta_r$  du minimum de réflectivité de la courbe de plasmon à l'aide d'une barrette de photodiodes. Par ailleurs, l'appareil SPRi-Plex II de chez HORIBA-Scientific, est basé sur l'interrogation en réflectivité. Le faisceau de lumière incident, possède une longueur d'onde et un angle incident fixe, et la lumière réfléchiée est captée par une caméra CCD; cette dernière permet l'enregistrement de l'évolution de l'intensité de la lumière au cours du temps.

### 2.1.3.1. L'appareil BIAcore

Le schéma de principe de L'appareil BIA3000 est représenté en figure 26. Cet appareil est constitué d'un prisme qui vient en contact avec une puce d'or, décrite plus haut. Un système microfluidique, comprenant deux pompes, assure une circulation du fluide avec un débit contrôlé à la surface de la puce (Fig. 26-C). La pompe 1 assure la circulation du tampon de course en continu, alors que la pompe 2 ne s'active que lors des injections en redirigeant le tampon de course vers la seringue chargée avec l'échantillon à injecter. L'appareil BIA3000 comporte 4



**Fig. 26 :** Représentation schématisée de l'appareil Biacore : (A) La puce d'or est en contact avec le prisme, et la cellule fluidique forme 4 canaux (pistes) fluidiques successifs, à la surface de la puce. Les résultats collectés sont présentés sous forme du changement de l'angle du plasmon ( $\Delta\theta$ ) en fonction du temps. (B) Les 4 pistes fluidiques. (C) Représentation du système fluidique de BIA3000. Hors injections, le tampon de course circule toujours à la surface de la puce par l'action de la pompe n.1, lors de l'injection d'un échantillon/réactif, c'est la pompe n.2 qui sera activée.

canaux fluidiques (Fig. 26-A et B), de  $1\text{mm}^2$  chacun, qui peuvent fonctionner simultanément ou séparément. Le système de détection est formé d'un laser, avec une longueur d'onde de 760 nm, et de barrettes de photodiodes reliées à un ordinateur, et qui permettent de suivre les perturbations des plasmons de surface par interrogation angulaire en mesurant le déplacement  $\Delta\theta$  du minimum de réflectivité au cours du temps. Ainsi, il a été établi, de façon empirique, une corrélation entre la variation d'angle et celle de masse de molécules déposées sur la puce ( $\Delta\theta=0,1^\circ \Leftrightarrow 1\text{ng/mm}^2$ )<sup>291</sup>. Le  $\Delta\theta$  est fourni sous forme d'une unité arbitraire, RU (pour Response Unit), avec  $1000\text{RU} = \Delta\theta=0,1^\circ$ .

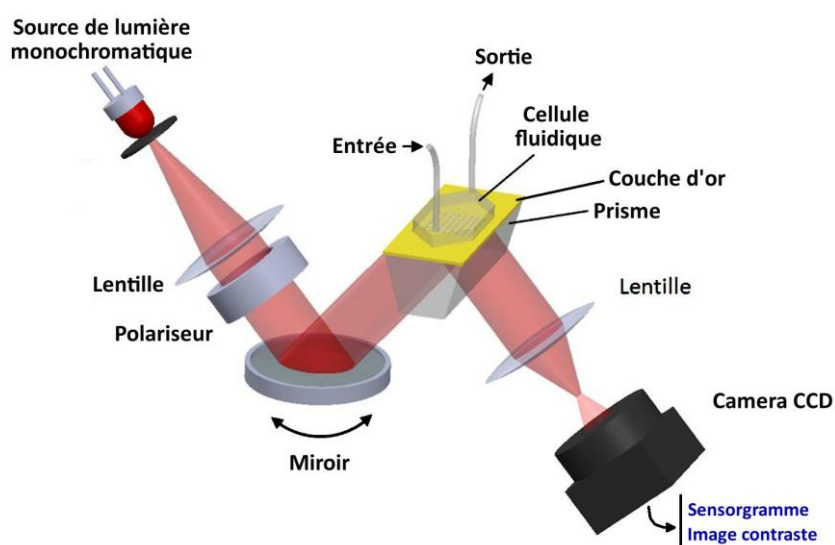
L'appareil BIA3000, offrant la capacité de travail sur 4 pistes de manière séparée, a été préférentiellement utilisé pour les tests de détermination des meilleures conditions de greffage des ligands, appelés tests de préconcentration (cf partie «Optimisation des conditions de greffage des ligands»). Cet appareil favorise le criblage des conditions réactionnelles en permettant le suivi de différentes injections des ligands à différents pH sur chaque piste.

### 2.1.3.2. L'appareil SPRI-Plex II

L'appareil SPRI-Plex II consiste en une source laser monochromatique polarisée (Transverse Magnétique) ayant une longueur d'onde de 810 nm. L'utilisateur peut choisir l'angle de travail optimal après balayage de la surface avec le faisceau grâce au miroir motorisé. Le laser ensuite traverse un prisme de haut indice optique ( $n_p= 1,76$ ), avec un angle incident donné, et interagit avec la couche d'or tout en étant réfléchi. Le faisceau réfléchi est ensuite capté par une caméra CCD, elle-même reliée à un ordinateur (Fig. 27). L'intensité de la lumière réfléchie va pouvoir être enregistrée en fonction de l'angle d'incidence du faisceau incident, il en résulte la courbe plasmon.

L'imagerie SPR permet de mesurer la variation de réflectivité moyenne sur des zones prédéfinies par l'utilisateur sur la surface de la puce. Ces zones que l'on nommera ROI (Region

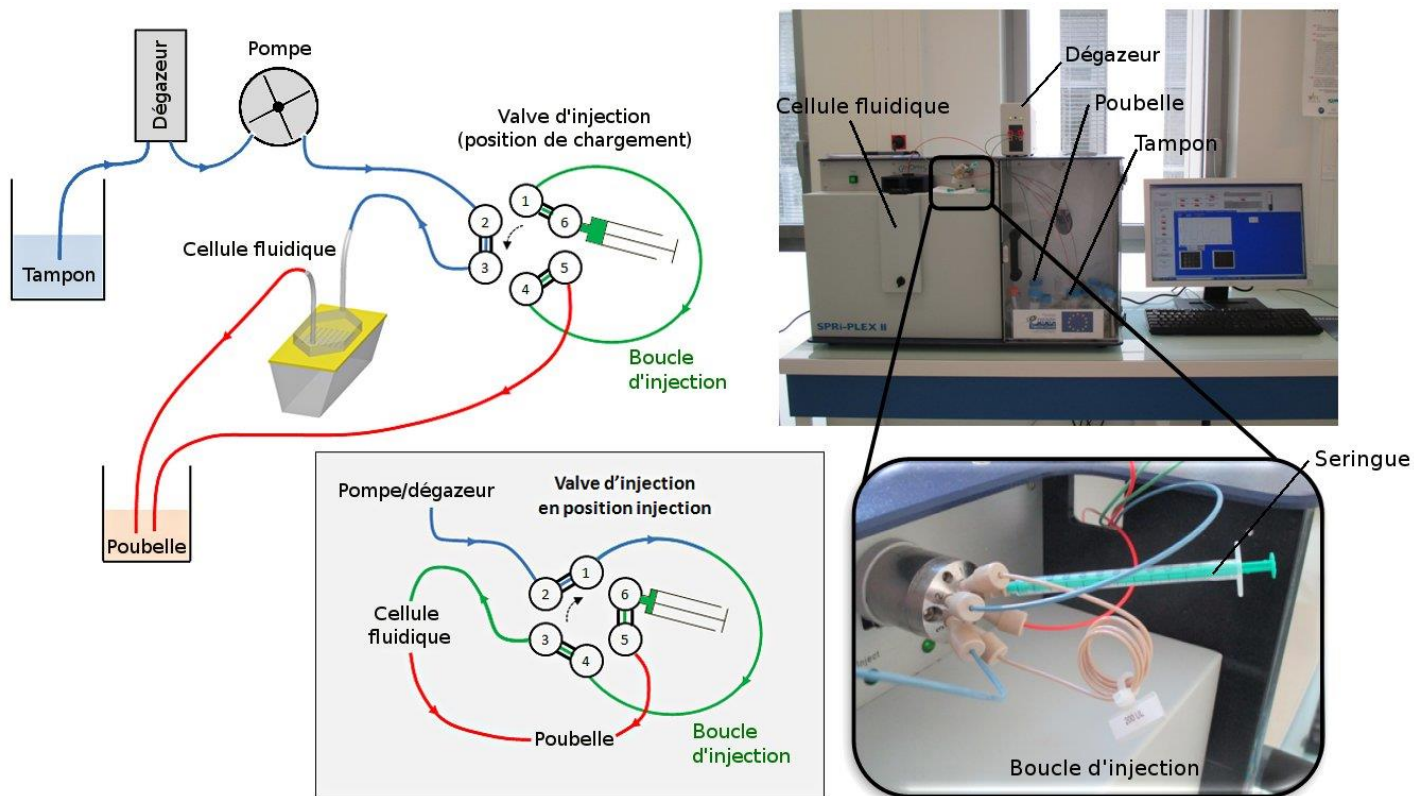
**Fig. 27 :** Représentation schématique du système optique de l'appareil SPRI-Plex II.



Of Interest) sont de forme circulaire et de taille variable (30 à 8000  $\mu\text{m}$ ). Il peut être choisi jusqu'à 500 ROIs par puce, qui sont judicieusement choisis sur les zones présentant les biorécepteurs et sur les zones contrôle. Le choix de l'angle de travail  $\theta_t$  à fixer est commun à chaque ROI, l'utilisateur doit donc choisir l'angle le plus judicieux en fonction de l'expérience à réaliser. Dans la pratique,  $\theta_t$  sera fixé à la pente maximale de la courbe plasmon des ROIs présentant le plus grand intérêt en s'aidant des valeurs de la dérivée affichées par le logiciel.

Au niveau expérimental, une corrélation a été établie entre le changement en réflectivité (%) et la quantité de matière déposée à la surface : +1% de réflectivité correspond à 125  $\text{pg}/\text{mm}^2$  de matériel déposé <sup>292</sup>.

Une fois l'angle de travail fixé, les interactions peuvent avoir lieu grâce à un dispositif fluide ajusté à la surface de la biopuce (Figure 28). Ce dispositif est équipé d'une pompe permettant la circulation du tampon de course à un débit contrôlé. Le SPRi, possède un dégazeur, en amont de la pompe, qui permet d'éliminer les bulles contenues dans le tampon de course. Ainsi, la pompe est connectée à une valve qui, selon sa position, permet d'acheminer le tampon de course soit directement dans la cellule fluide soit dans la boucle d'injection pour pousser l'échantillon dans



**Fig. 28 :** (A) Représentation schématique du système fluide de SPRi-Plex II. Les deux configurations de la valve sont représentées. La première (en haut) en position de chargement, dans laquelle le tampon de course circule en continu et directement dans la chambre fluide. Pendant ce temps-là, en parallèle il est possible de charger la boucle d'injection avec l'échantillon à injecter en utilisant une seringue. La 2<sup>ème</sup> est la position d'injection (dans le cadre en bas) où le tampon de course est dirigé dans la boucle d'injection afin de pousser l'échantillon jusque dans la cellule fluide. (B) Appareil SPRi-Plex II utilisé dans le cadre de ce travail et (C) la boucle d'injection du système.

la cellule fluidique, et donc sur la puce.

L'imagerie SPR (SPRi), et SPRi-Plex II précisément, est capable de mesurer le plasmon d'une zone de 1 cm<sup>2</sup> lui permettant d'étudier de multiples interactions simultanément. De plus, la caméra CCD offre une image en contraste de phase de la surface de la puce pendant l'expérience, ce qui offre une visualisation claire des différents spots de ligands et le suivi du phénomène d'interaction (capture, adsorption...) via l'augmentation du contraste.

Le tableau 6 montre une comparaison entre les deux instruments (BIA300 et SPRi-Plex II) utilisés dans le cadre de ce travail.

	SPRi-PLEX II	BIA3000
<b>Fournisseur</b>	<i>HORIBA scientific</i>	<i>BIACore, General Electrics</i>
<b>Longueur d'onde de Laser (nm)</b>	810	760
<b>Système de détection</b>	Caméra CCD	Barrettes de photodiodes
<b>Type de détection</b>	Interrogation en réflectivité	Interrogation angulaire
<b>Limite de détection</b>	5 pg/mm <sup>2</sup>	1 pg/mm <sup>2</sup>
<b>Cellule fluidique</b>	Une seule de 1 cm <sup>2</sup> , avec une hauteur de 80 µm	4 cellules de 1 mm <sup>2</sup> chacune, avec une hauteur de 20 µm
<b>Injection des échantillons</b>	Manuelle à l'aide d'une seringue	Automatique par une seringue
<b>Points forts</b>	La grande taille de la cellule fluidique permet l'injection de plus grands objets (particules, cellules ...)  La plus grande zone analysable (1 cm <sup>2</sup> ) offre la possibilité de réaliser des centaines de spots d'anticorps différents	La présence de 4 cellules fluidiques qui fonctionnent ou bien séparément ou simultanément  Greffage des biorécepteurs, sur chaque canal, de manière plus contrôlée dans l'appareil
<b>Points faibles</b>	L'échantillon dans la boucle d'injection se mélange avec le tampon de course lors de l'injection, ce qui peut causer un phénomène de dilution de l'échantillon	petite zone analysable
<b>Prix</b>	≈120K €/appareil	≈200K €/appareil

**Tableau 6.** Comparaison entre les systèmes SPRi-PLEX II et BIA3000

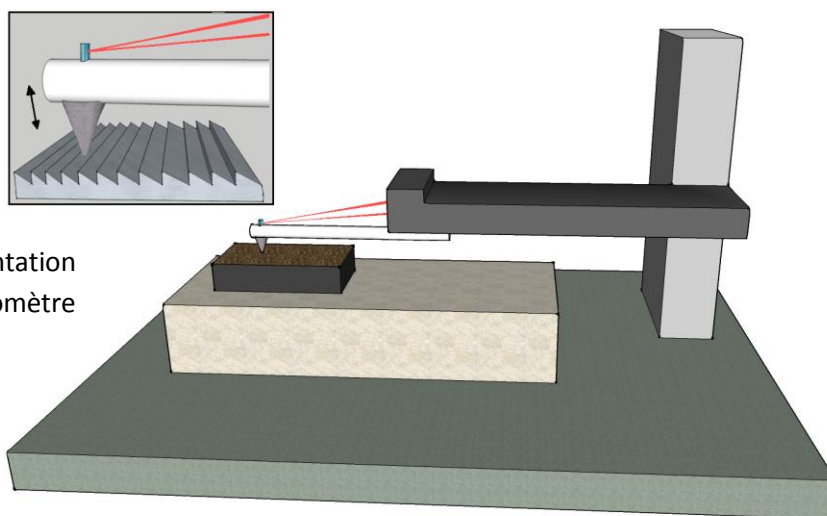
## 2.2. La microscopie à force atomique

La microscopie à force atomique (AFM) appartient à la famille des microscopies à champ proche. L'AFM permet de visualiser et de caractériser la topographie des surfaces dans les 3 dimensions (x,y et z). L'AFM fonctionne dans différents milieux (vide, air et liquide) et possède

une très grande résolution qui peut atteindre  $\approx 0,5$  nm en latéral et  $\approx 0,1$  nm en vertical.

### 2.2.1. Historique

L'idée d'utiliser une sonde dans le but de mesurer la topographie d'une surface date de 1929, lorsque Schmalz<sup>293</sup> a développé le *profilomètre* à stylet permettant de mesurer la rugosité de la surface d'un échantillon. Grâce à un ressort, le stylet est légèrement pressé contre la surface et se déplace à travers cette dernière (Fig. 29). Un faisceau de lumière réfléchi sur le dessus du stylet est redirigé vers une émulsion photographique et permet de suivre le mouvement du stylet et de fournir un profil agrandi jusqu'à 1000 fois de la surface de l'échantillon. L'inconvénient majeur de ce système était la possible déformation de la sonde suite à la collision avec la surface de l'échantillon.



**Fig. 29 :** Représentation schématique du profilomètre à stylet

Le principe de profilomètre est l'équivalent de celui de l'AFM moderne en mode contact ; la différence fondamentale entre ces deux systèmes est la résolution atteignable qui reste limitée dans le cas du profilomètre à cause des dimensions du stylet ainsi que les systèmes de mouvements et de détection qui sont sujets aux bruits acoustiques et thermiques.

En 1972, Young et al.<sup>294</sup> ont développé un microscope, appelé « *topographiner* » et basé sur le principe d'émission par effet de champs. La *topographiner* mesure le changement du courant électrique relié à la distance séparant une sonde métallique et une surface conductrice. Un circuit électronique de rétro-action et un positionneur piézoélectrique sont utilisés pour le suivi de l'émission d'électrons et ainsi pour garder une distance constante entre la sonde et la surface de l'échantillon. En surveillant la position de la sonde en x,y et z, il est possible de construire une image 3D de l'échantillon. La résolution latérale de cet instrument était proche de celle d'un microscope optique ( $\sim 500$  nm), alors que la résolution verticale était de  $3$  nm<sup>295</sup>.

En 1982, avec les avancées technologiques et en s'appuyant sur la *topographiner* de Young, Binnig et Rohrer<sup>296</sup> ont pu construire le microscope à effet tunnel (Scanning Tunneling



Microscope, STM), basé sur l'effet tunnel, qui possède une très grande résolution de 0,1 nm en latéral et de  $\approx 0,01$  nm en vertical. Le STM a été le premier instrument permettant l'imagerie de la surface avec une résolution atomique<sup>297</sup>.

Ce microscope consiste en une sonde métallique avec une extrémité très fine (un atome unique) qui est approchée à une distance d'environ 1 nanomètre de la surface d'un échantillon conducteur. Le courant tunnel, établi entre la sonde et la surface, est mesuré pendant le balayage de la

surface par la sonde, ce qui permet d'imager la topographie de la surface. Malgré la grande résolution de cette technique, elle est restreinte aux échantillons conducteurs et ne fonctionne que sous vide, ce qui limite son utilisation pour les échantillons biologiques<sup>298</sup>.

En 1986, Binnig et Rohrer reçurent le prix Nobel de physique pour leur découverte du microscope à effet tunnel. Dans cette même année, Binnig, Quate et Gerber<sup>299</sup> ont développé un nouveau microscope combinant les principes du profilomètre à stylet et du microscope à effet tunnel, et qui était capable d'étudier à la fois les surfaces conductrices et isolantes<sup>300</sup>. Ce microscope, appelé microscope à force atomique (AFM), consiste en un levier très souple portant une pointe en diamant sur son extrémité. Lorsque la pointe balaye la surface, les forces s'exerçant entre les atomes de l'extrémité de la pointe et ceux de la surface induisent une déflexion du levier. Ces déflexions étaient au départ détectées par une deuxième sonde constituée d'un levier et d'une pointe conductrice d'un STM positionné sur le dos du premier levier. Ce système était capable de mesurer les forces atomiques (forces de Van der Waals, forces coulombiennes, électrostatiques, ...) s'exerçant entre les atomes de la surface d'un échantillon et ceux de l'extrémité d'une sonde<sup>298</sup>. L'AFM, depuis, a été perfectionnée principalement au niveau du système de détection et de la fabrication des leviers qui sont aujourd'hui plus sensibles et adaptables aux différentes applications.

### 2.2.2. Principe de fonctionnement

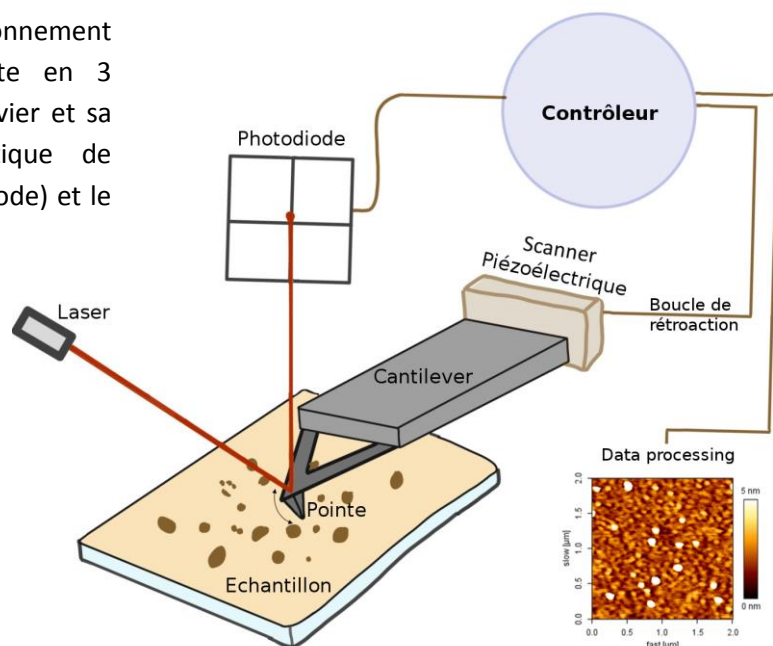
L'AFM est basée sur la mesure des forces d'interactions qui s'exercent entre une pointe fine (rayon de courbure  $\approx 10$  à  $20$  nm) située à l'extrémité d'un microlevier flexible (de  $100$ - $300$   $\mu\text{m}$  de longueur), appelé cantilever, et les atomes de la surface de l'échantillon. Les cantilevers, généralement en silicium ou en nitrure de silicium ( $\text{Si}_3\text{N}_4$ ), se comportent comme un ressort de Hooke et sont dotés d'une certaine flexibilité donnée par la constante de raideur  $K$  ( $\text{pN/nm}$ ). A l'approche de la surface, la force d'interaction ( $F$ ) aboutit à une déflexion du levier ( $Z$ ) qui est proportionnelle à la force appliquée :  $F=K*Z$ .



La pointe à l'extrémité du levier possède une hauteur comprise entre 2,5 – 8  $\mu\text{m}$ , et peut avoir une forme conique ou pyramidale, et possède une variété de rayon de courbure, généralement entre 5 et 50 nanomètres. La géométrie de la pointe est essentielle pour la qualité de l'image générée. Ainsi, le levier peut être sous forme rectangulaire ou bien sous forme triangulaire. Ces derniers sont plus stables d'un point de vue mécanique et sont plus adéquats pour l'étude des entités biologiques.

Le suivi de la déflexion du levier et de sa position en (x,y) permet la reconstitution d'une image topographique de l'échantillon. Plusieurs systèmes de détection ont été développés dans ce but; comme vu précédemment, Binnig et al. ont utilisé une deuxième sonde d'un microscope à effet tunnel afin de détecter les déflexions du levier du tout premier AFM en 1986. Ensuite d'autres systèmes ont été développés comme celui basé sur l'interférométrie<sup>301</sup> et celui basé sur la piézorésistivité<sup>302</sup>. Cependant, la détection optique, développée en 1988 par Meyer et Amer<sup>303</sup>, reste la plus couramment utilisée pour sa facilité et son application dans les différents milieux d'observation. Un système optique va suivre l'amplitude de déflexion du cantilever en focalisant un faisceau laser (600-700 nm) sur la pointe. Le faisceau se réfléchit vers un photo-détecteur (photodiode) ce qui permet le suivi de la déviation du faisceau réfléchi induite par les variations de topographie de l'échantillon. Un actionneur piézoélectrique permet de contrôler le déplacement de l'échantillon ou du cantilever dans les 3 directions (x,y,z) (Fig. 30).

**Fig. 30 :** Principe de fonctionnement de l'AFM : l'AFM consiste en 3 éléments principaux : le levier et sa pointe, le système optique de détection (laser et photodiode) et le scanner piézoélectrique.



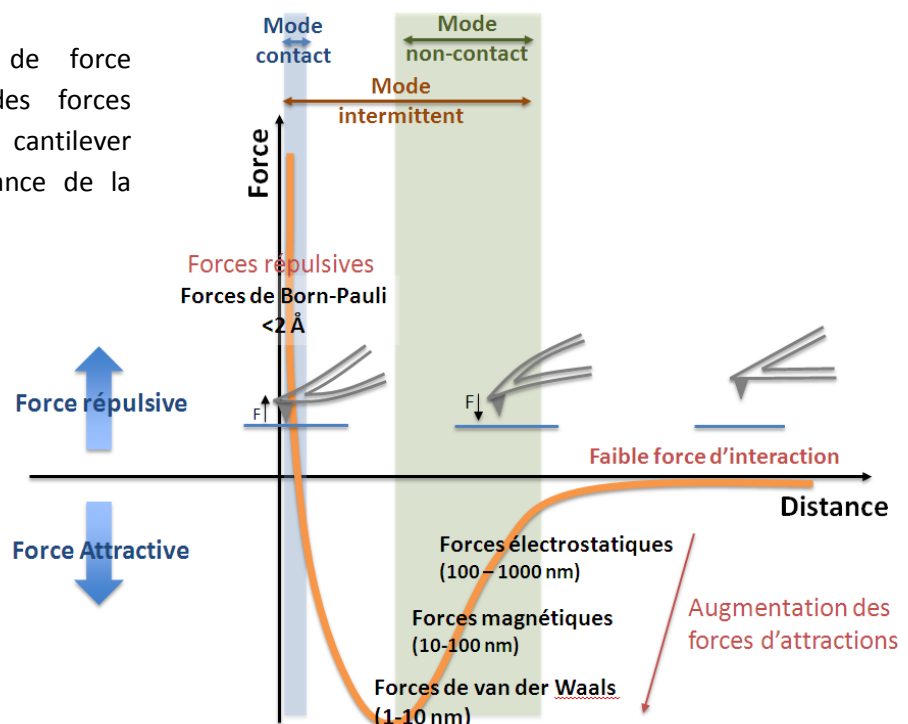
L'AFM peut fonctionner selon plusieurs modes :

- le mode contact : est le mode de fonctionnement dans lequel la pointe reste en contact permanent avec la surface (à une distance  $< 2 \text{ \AA}$ ) en exerçant une force constante. A cette distance, ce sont les forces répulsives de courtes distances (Forces de Born-Pauli) qui agissent entre le levier et la surface (Fig. 31).

La variation de la force au cours du balayage, obtenue à partir de la déflexion du levier, est directement compensée via une boucle de rétrocontrôle qui engage l'actionneur piézoélectrique, afin de conserver une force constante. Ce mode permet d'obtenir des images de haute résolution sur des échantillons peu déformables ou relativement bien immobilisés sur support. Pendant le balayage, trois types d'images peuvent être collectées simultanément : Les images en hauteur (contraste topographique), les images de déflexion (correspondant à la dérivée des mouvements de réajustement de la position relative entre la pointe et la surface) et les images de frictions (correspondant aux phénomènes d'adhérence entre la pointe et l'échantillon et qui dépendent de l'élasticité et de la composition chimique de la surface de l'échantillon). Il faut noter que ces phénomènes de frictions peuvent endommager les échantillons biologiques souples. En général, des leviers souples sont utilisés pour ce mode d'imagerie ( $k = 0,01 - 1 \text{ N/m}$ , (avec une fréquence de résonance de l'ordre de 10-100 kHz)).

• Le mode dynamique: Ce mode a été développé afin d'éviter les phénomènes de friction dus au contact de la pointe avec la surface des échantillons<sup>304</sup>. Dans ce mode, deux sous-modes existent : le premier est le *Tapping*, ou mode contact intermittent, lorsque la pointe oscille à la fréquence de résonance du cantilever grâce au scanner piézoélectrique et ne touche la surface que de façon périodique (intermittente). Dans ce mode, les forces attractives à longue distance (van der Waals, forces capillaires, magnétiques et électrostatiques) ainsi que les forces répulsives de courte distance (Born-Pauli forces) agissent sur la vibration du cantilever (Fig. 31). C'est le changement en fréquence d'oscillation du cantilever qui est suivi. Le mode *Tapping* est conseillé pour l'étude des échantillons souples, déformables et faiblement adsorbés à la surface ou qui ont une topographie très irrégulière. Différents types d'images peuvent être collectés

**Fig. 31 :** La courbe de force montrant l'évolution des forces agissant sur la pointe du cantilever en fonction de sa distance de la surface de l'échantillon.

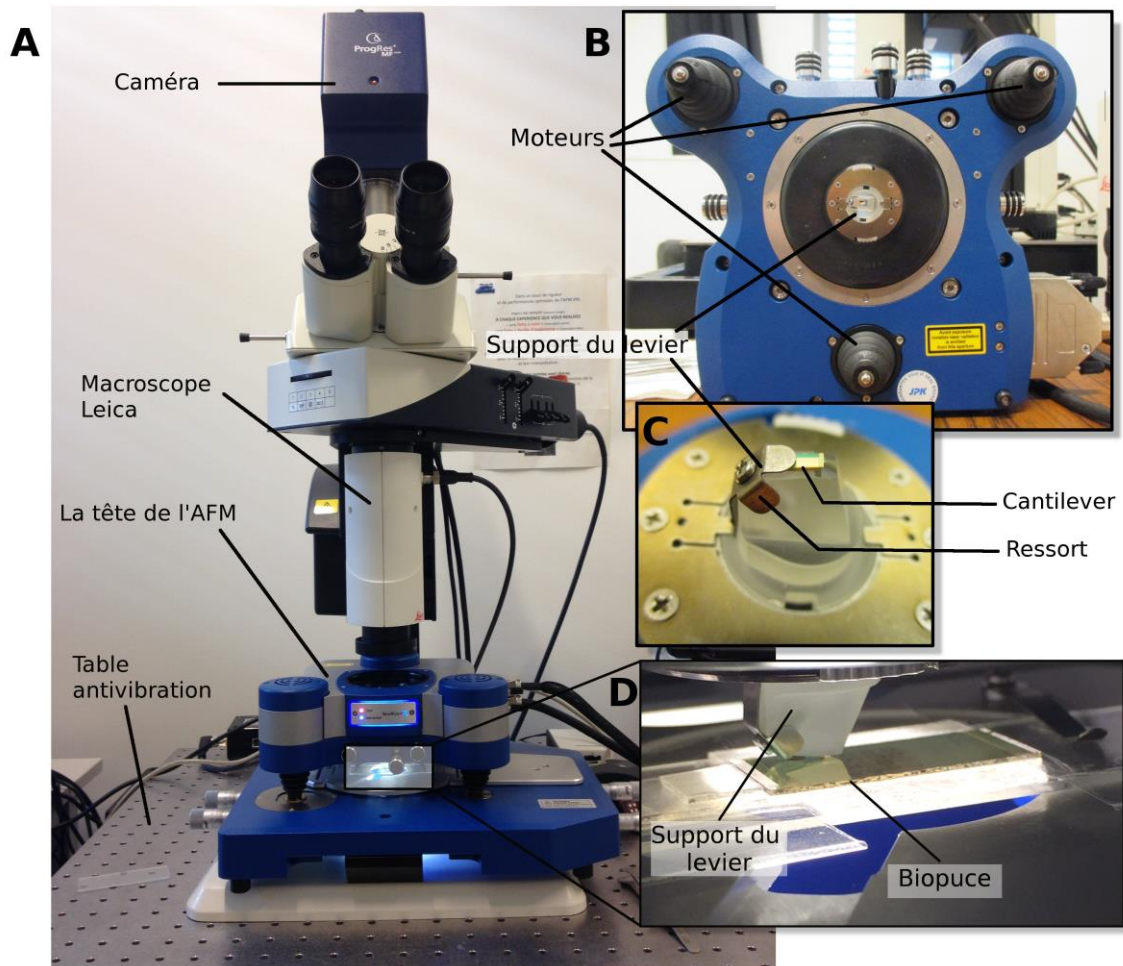


simultanément : les images en hauteur, les images en amplitude (similaire aux images de déflexion) et les images de phase (comme les images de frictions, liées aux propriétés viscoélastiques de la surface).

Le 2<sup>ème</sup> sous-mode est le mode *non-contact*, qui consiste à faire vibrer le cantilever au voisinage de la surface mais sans rentrer en contact avec cette dernière ( $> 0,3$  nm de la surface). A cette distance, ce sont les forces attractives à longue distance qui interviennent entre la pointe et la surface (Fig. 31). Ce mode est beaucoup moins utilisé en biologie que les autres modes, puisque les forces attractives peuvent attirer la pointe vers la surface et les forces capillaires rendent les mesures très complexes. Cependant, il a été montré que ce mode peut atteindre des résolutions atomiques<sup>298,305,306</sup>.

En général, des leviers plutôt rigides sont utilisés pour le mode dynamique ( $k=10-50$  N/m, et avec une fréquence de résonance de l'ordre de 200-400 kHz).

D'autres modes de fonctionnement existent, comme le *mode force* qui permet de mesurer les forces d'interaction entre une pointe, nue ou fonctionnalisée par des ligands, et la surface de



**Fig. 32** : AFM NanoWizard 3 (JPK) utilisé dans notre projet : (A) AFM monté sur un macroscopie Leica Z16-APO A. (B) Tête de l'AFM montrant l'emplacement du levier monté sur un support (bloc de verre); ce dernier est représenté en (C). (D) Levier en train de scanner la surface d'une puce d'or comportant différents spots, en air.

l'échantillon, et de mesurer d'autres caractéristiques mécaniques de l'échantillon telles que le *module de Young* ou la tension de surface<sup>307,308</sup>.

Dans notre étude, nous utilisons un AFM *JKP NanoWizard 3*, ce système est optimisé pour les applications biologiques et en milieu liquide (biocell thermostatée) et possède une grande résolution de l'ordre du pN et du nm respectivement pour les forces et les distances mesurées. Ce système permet le déplacement du levier dans les 3 directions pour scanner des zones qui peuvent aller de  $<1 \text{ nm}^2$  à  $100 \text{ }\mu\text{m}^2$ , en xy, et jusqu'à  $10 \text{ }\mu\text{m}$  en z. Des leviers NP-S10 triangulaires (Veeco, Digital instruments), ont été utilisés en mode contact, avec une constante de raideur  $K=0,32 \text{ N/m}$ , comprenant une pointe de forme pyramidale et de rayon de courbure de  $10 \text{ nm}$ . L'instrument utilisé est présenté dans la Fig. 32. Il consiste en une tête qui comprend le positionneur piézoélectrique, le laser et la photodiode à quatre quadrants. Le levier est monté et immobilisé sur un bloc de verre (cantilever holder) à l'aide d'un ressort, puis l'ensemble est monté sur la tête de l'AFM. Cette dernière repose sur une platine sur laquelle est disposé l'échantillon à étudier. Enfin, L'AFM est couplé à un microscope optique (Leica Z16 APO A) qui permet de visualiser l'échantillon et de positionner le levier sur la zone de l'échantillon que l'on souhaite scanner.

### 2.3. La spectrométrie de masse

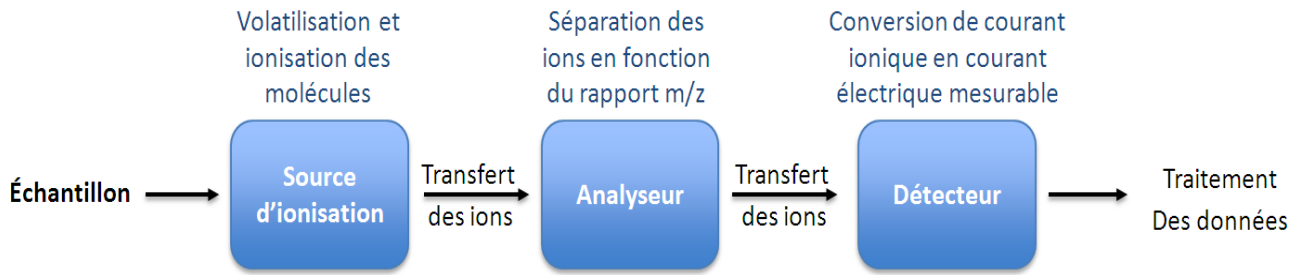
La spectrométrie de masse est une des principales méthodes utilisées pour l'identification et la caractérisation des molécules d'un échantillon, sans marquage. Elle est basée sur la mesure, en phase gazeuse, du rapport masse/charge ( $m/z$ ) de molécules ionisées ainsi que de leurs produits de fragmentations pour fournir des données quantitatives et qualitatives de la composition d'un échantillon. Cette technique est apparue dans le domaine de la biologie à la fin des années 1980, avec le développement de nouvelles techniques d'ionisation : la source electrospray (ESI)<sup>309</sup> et la source MALDI (Matrix Assisted Laser Desorption/Ionisation)<sup>310,311</sup>.

#### 2.3.1. Principe de fonctionnement

Les spectromètres de masse sont composés de 3 éléments principaux (Fig.33) :

- **Une source d'ionisation** : permettant de passer les molécules d'un échantillon en phase gazeuse et de les ioniser.

De nombreuses sources d'ionisation existent, mais les principales utilisées en protéomique sont les sources par électronébulisation ou electrospray (ESI)<sup>309,312</sup> et les sources d'ionisation/désorption laser assistée par matrice (MALDI)<sup>310,311,313</sup>, développées dans les années 80. Ces deux techniques permettent l'ionisation et le transfert en phase gazeuse de molécules vers l'analyseur de masse. Les étapes d'ionisation et le transfert des ions de la source vers l'analyseur se déroulent dans un vide secondaire atteint à l'aide de pompes turbomoléculaires ce qui permet d'éviter toutes les perturbations dans le mouvement des ions sous l'action du champ de force.



**Fig. 33** : Principe de fonctionnement de la spectrométrie de masse (MS)

- **Un analyseur de masse** : sépare les ions selon leur rapport masse/charge ( $m/z$ ) grâce à un champ électrique et/ou magnétique.

Il existe différents types d'analyseurs : quadripole (Q), magnétique (BE), temps de vol (TOF ou Time Of Flight), trappe ionique (IT), Orbitrap et cyclotron à résonance des ions (FT-ICR). Ils sont caractérisés par quatre paramètres: la résolution, la vitesse de balayage, la gamme de masse et la transmission. Il faut remarquer que des configurations hybrides d'analyseur existent, telles que Q-TOF, IT-TOF, etc.

- **Un détecteur** : permet la détection des ions via un multiplicateur d'électrons en produisant un signal électrique proportionnel au nombre d'ions détectés, vers le système de traitement.

Dans notre projet, les analyses protéomiques ont été réalisées au sein de la plateforme protéomique CLIPP (Clinical Innovation Proteomic Platform) en utilisant, consécutivement, la méthode MALDI-TOF/TOF (UltrafleXtreme, Bruker Daltonics) et la méthode ESI-Orbitrap (Orbitrap ELITE, ThermoScientific). Nous nous limiterons par la suite à la description de ces techniques.

### 2.3.2. NanoLC-ESI-Orbitrap

L'ionisation par électrospray (ESI), développée par le groupe de Fenn<sup>309</sup> (prix Nobel de chimie en 2002), est une méthode d'ionisation en phase liquide. Couplée à des méthodes de séparation de type chromatographie liquide, c'est une technique très sensible qui permet l'analyse d'échantillons très complexes<sup>314</sup>. Cette technique consiste à générer, à pression atmosphérique, des gouttelettes de solutés à l'extrémité d'un capillaire porté à un potentiel élevé. Le champ électrique est obtenu par application d'une haute tension entre le capillaire et la contre électrode. Sous un champ électrique intense et grâce à l'application d'un gaz de nébullisation ( $N_2$ ), le liquide est transformé en nuage de fines gouttelettes chargées qui subissent un processus de désolvatation et de fission par répulsion de charge (Fig.34). Les ions alors présents dans ces nanogouttelettes sont transformés en ions dans la phase gazeuse<sup>315,316</sup>. Le champ électrique appliqué permet également de diriger les ions formés vers deux cônes d'échantillonnage servant de barrières avec l'analyseur sous vide. L'ESI présente l'avantage de fonctionner à température ambiante et à pression atmosphérique et évite de rompre les liaisons covalentes en contrôlant

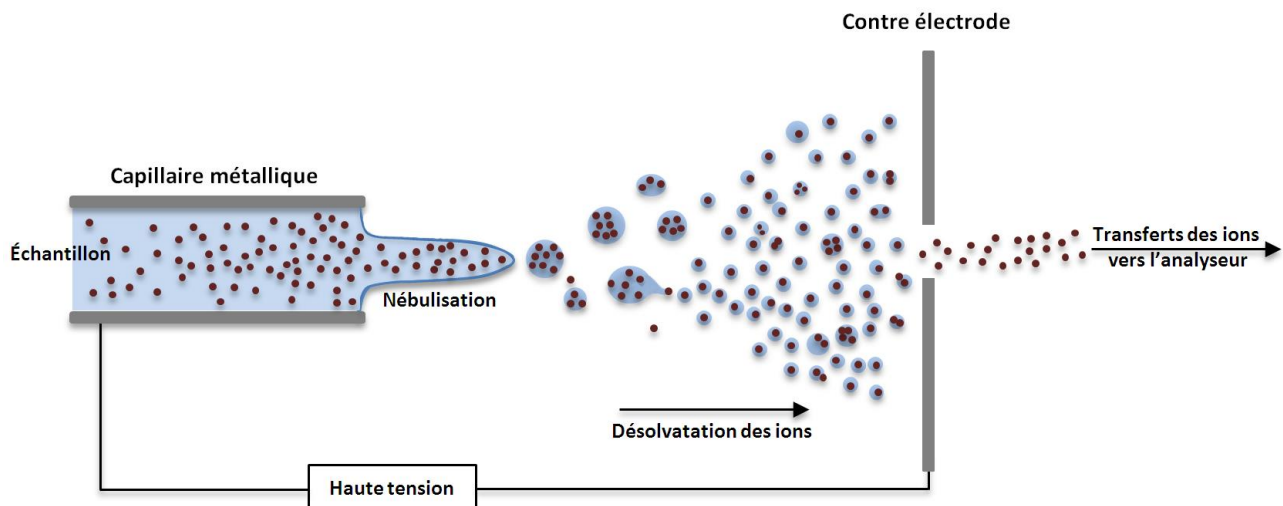


Fig. 34 : Principe de fonctionnement de l'ionisation par électrospray

l'énergie interne ajoutée aux ions lors de l'électronébulisation.

Comme indiqué ci-dessus, l'ESI peut être couplée avec les techniques de chromatographie liquide à faible vitesse de flux de l'ordre de centaines de nL/min (LC-ESI-MS, *Liquid Chromatography Electrospray Ionisation Mass Spectrometry*). La chromatographie permet de séparer les molécules de l'échantillon, souvent après digestion enzymatique, en fonction de leurs propriétés physico-chimiques (taille, point isoélectrique, affinité, polarité, etc...); les molécules sont éluées à différents temps de rétention et sont analysées en continu par ESI-MS. Les analytes étant multichargés par la source d'ionisation, l'ESI-MS permet une analyse de masse en tandem (MS-MS\*) hautement sensible (quelques atomoles à quelques fmoles selon la complexité du mélange) par l'analyseur Orbitrap.

La trappe ionique électrostatique, ou Orbitrap, est un analyseur basé sur le concept du piège orbital décrit par Kingdon et al. en 1923<sup>317</sup>. C'est une modification de la technique de trappe ionique qui est commercialisée par la société Thermo Scientific depuis le début des années 2000. L'Orbitrap repose sur le piégeage des ions par un champ électrostatique appliqué entre deux électrodes imbriquées, une externe de forme allongée et creuse dans laquelle se trouve une deuxième électrode interne fuselée alignée selon le même axe<sup>318</sup>. Les ions piégés oscillent et tournent en spirale autour de l'électrode centrale. Les valeurs  $m/z$  sont mesurées à partir de la fréquence des oscillations de chacun des ions le long de l'axe du champ électrique.

L'analyseur Orbitrap assure une analyse à haut débit, très sensible et permet de réaliser une analyse MS en tandem.

*\*La spectrométrie de masse en tandem<sup>319</sup> ou MS-MS consiste à sélectionner et isoler un ion dit « parent ou précurseur » en fonction de sa masse, puis de fragmenter cet ion par différentes approches et d'analyser la masse des ions dit « fils ou produit » issus de la fragmentation. Cette approche permet d'obtenir des informations de séquence et est utilisée, entre autres, dans le domaine de l'analyse protéomique pour le séquençage de peptides et de protéines ainsi que la caractérisation des modifications post-*

### 2.3.3. MALDI-TOF/TOF

La désorption/ionisation laser assistée par matrice est une technique de choix pour l'étude de molécules de haut poids moléculaire ( $> 100\ 000$  Da)<sup>320</sup> comme les polymères synthétiques et les biopolymères tels que les protéines, mais elle permet également l'analyse de plus petites molécules comme les peptides. Cette méthode consiste à mélanger l'analyte avec une matrice ionique solubilisée dans un solvant. Par évaporation du solvant, le mélange analyte-matrice déposé sur une surface métallique, appelée cible, cocrystallise en formant alors un dépôt solide. L'irradiation du

dépôt par des impulsions laser dont la longueur d'onde correspond à une bande d'absorption forte de la matrice (smartbeam-II avec fréquence de 1 kHz, pour l'UltrafleXtreme) entraîne une dissociation de la matrice par rupture des liaisons hydrogènes inter- et intra-moléculaires. Un transfert de charges ( $H^+$ ) se fait alors vers l'échantillon. L'analyte protoné ( $M+H^+$ ) est extrait à travers les lentilles de focalisation par le champ électrique appliqué à la surface de la cible, vers l'analyseur de masse puis le détecteur (Fig. 35).

La cible est une plaque en acier inoxydable à 384 positions (384 dépôts possibles). Le débit analytique, en mode MS, de cette méthode est bien adapté pour l'analyse clinique à haut débit. La source MALDI présente également l'avantage d'être compatible avec d'autres supports que les cibles dédiées, à condition qu'ils soient conducteurs. Ces supports peuvent servir à la fois pour la purification et la sélection des cibles, par des biorécepteurs spécifiques (comme les puces SPR), mais également comme support d'ionisation. Cette configuration est utilisée dans le domaine du couplage des biopuces avec la MS<sup>282,321</sup>.

L'analyseur à temps de vol est une zone libre de champ sous vide ( $10^{-7}$  mbar) qui permet de mesurer le rapport  $m/z$  des ions formés lors de l'ionisation MALDI. Cet analyseur fonctionne comme un chronomètre mesurant le temps de vol des différents ions. Après accélération dans la source MALDI, les ions de masses différentes n'ont pas la même énergie cinétique donc pas la même vitesse. Leur vitesse est inversement proportionnelle à la racine carrée de leur rapport

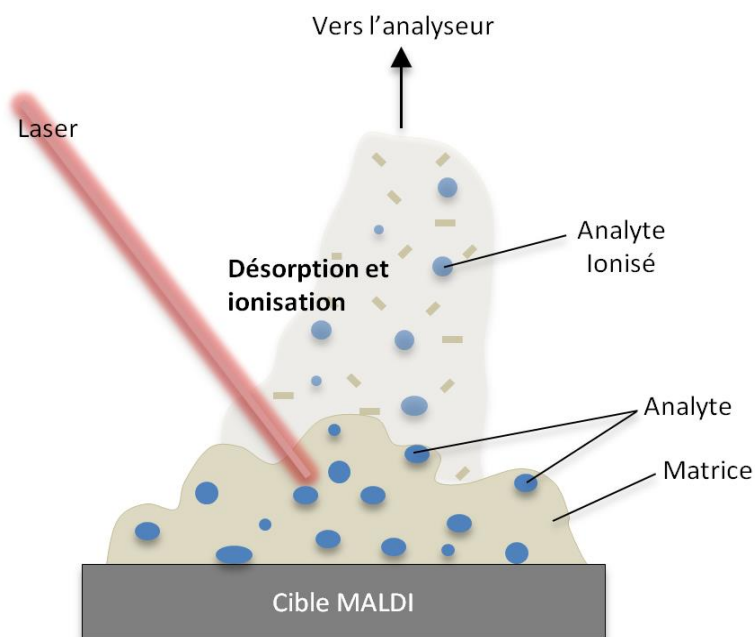


Fig. 35 : Principe de fonctionnement de la source MALDI



m/z : les petits ions volent à une vitesse plus grande que les ions les plus lourds. Moyennant une calibration adéquate, il est possible de déterminer la masse à partir du temps de vol des ions.

L'analyseur TOF offre, en théorie, une gamme de mesure en m/z illimitée. Il est bien adapté à l'ionisation de type MALDI qui est capable de générer des ions de rapport m/z élevé. Le manque de la résolution de cette technique est partiellement amélioré grâce au système reflectron, ou réflecteur électrostatique, qui permet de réaligner les ions de même masse à mi-parcours dans le tube de vol. Le réflecteur applique un champ électrique qui s'oppose à la progression des ions dans l'analyseur. Les ions les plus énergétiques pénètrent plus profondément dans le champ du réflecteur et vont donc mettre plus de temps pour être réfléchis alors qu'ils sont arrivés avant les ions les moins énergétiques dans le réflecteur. Lorsque les ions atteignent une vitesse nulle, ils font demi-tour et sont ré-accélérés en sens inverse. Ceci permet de mieux focaliser les ions de même rapport m/z et d'augmenter la résolution. L'UltrafleXtreme (Bruker Daltonics), utilisé dans le cadre de cette thèse, est équipé d'un réflecteur. L'analyse en mode reflectron n'est valable que pour des molécules de faibles poids moléculaires (peptides).

Le MALDI a aussi l'avantage d'être plus tolérant aux sels, tampon et détergent. En général, l'analyse MALDI produit des ions monochargés, ce qui facilite l'interprétation des spectres de masse. Cependant, c'est une technique moins sensible que les couplages nanoLC/ESI-Trap et peu propice à l'analyse des échantillons complexes.

Dans notre étude, l'analyse MS a été réalisée sur les VEs capturées sur puce. Le protocole de traitement de l'échantillon et d'analyse protéomique sont présentés dans la prochaine partie.

### **3. Aspects expérimentaux et méthodologies**

#### **3.1. Réactifs et produits chimiques**

11-mercapto-1-undécanol (11-MUOH), 16-mercapto-1-héxadécanoïque (16-MHA), N-hydroxysulfosuccinimide (Sulfo-NHS), glycine, glutaraldehyde et l'albumine du sérum de rat (RSA) proviennent de chez Sigma-Aldrich.

1-éthyl-3-[3-diméthylaminopropyl]carbodiimide (EDC) et éthanolamine/HCl (pH 8,5) proviennent de chez Biacore (GE Healthcare).

#### **3.2. Préparation de la biopuce**

##### **3.2.1. Fonctionnalisation chimique**

Les puces d'or sont tout d'abord nettoyées sous un jet d'éthanol ultra pur, afin d'éliminer les éventuelles poussières et de mouiller les surfaces d'or par le solvant utilisé pour la fonctionnalisation, puis elles sont immergées dans une solution d'éthanol contenant 1mM d'un mélange de molécules thiolées, avec 90% de 11-MUOH et 10% de 16-MHA, en pourcentage molaire. L'incubation se fait pendant 16h sous agitation continue, puis les puces sont retirées de

la solution de thiols et rincées par des jets d'éthanol puis de l'eau ultrapure avant d'être séchées à l'aide d'une pissette d'air. Les puces sont ensuite stockées pour une durée maximale de 3 mois, à l'abri de la lumière, afin d'éviter une irradiation aux UV de la lumière ambiante qui peut dégrader la SAM par rupture des liaisons Soufre-or<sup>322</sup>.

### 3.2.2. Activation et greffage des biorécepteurs

L'activation de la puce fonctionnalisée avec EDC/Sulfo-NHS et le greffage des biorécepteurs sont réalisés de la même façon que ce soit en SPRi-Plex II ou en BIA3000. Cependant, en BIA3000, ces étapes sont exécutées essentiellement dans l'instrument pour bénéficier du suivi cinétique des différentes réactions, alors qu'en SPRi-Plex II, ces étapes sont réalisées à l'extérieur de l'instrument dans le but d'immobiliser les anticorps sous forme de spots.

- **BIA3000** : la puce fonctionnalisée est montée dans l'instrument, et le tampon de course (HEPES ou PBS) est mis en circulation à la surface de la puce.

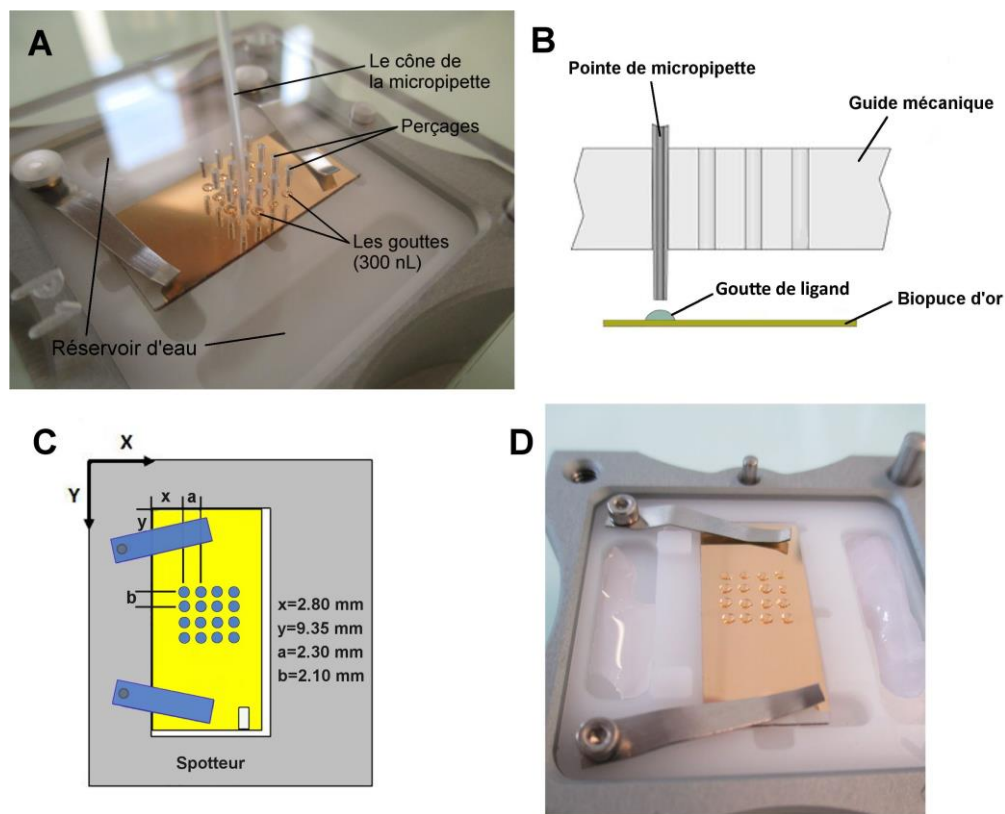
Comme noté précédemment, le BIA3000 possède 4 canaux qui peuvent être actionnés séparément ou simultanément. Ceci permet, par exemple, de greffer 4 anticorps différents, chacun sur un canal. Après montage de la puce, un mélange (v/v) d'EDC (400 mM) et de Sulfo-NHS (100 mM) est injecté à la surface de la puce pendant 15 min, à un débit de 10 µl/ min, ceci dans le but d'activer les fonctions COOH. Les anticorps sont greffés par injection, appelé aussi greffage fluide dans un tampon acétate à un pH optimal qui est déterminé pour chaque anticorps (partie « Optimisation des conditions de greffage des ligands sur la puce »), généralement à une concentration d'environ 20 µg/mL jusqu'à atteindre le taux de greffage souhaité. Cette technique d'immobilisation présente deux principaux avantages vis à vis la technique utilisée en SPRi, appelé « *spotting* », qui sera détaillée dans la partie suivante : (i) elle permet de contrôler le taux de greffage des anticorps à la surface (monitoring SPR) et (ii) elle possède une plus grande efficacité de capture avec un temps de contact plus court (greffage sous flux).

- **SPRi-Plex II** : En SPRi-Plex, toutes les étapes depuis l'activation jusqu'au greffage des anticorps sont réalisées en dehors de l'instrument. Pour cela, la puce fonctionnalisée est rincée par un jet d'eau avant d'être séchée à nouveau. Une goutte du mélange (v/v) d'EDC (400 mM) et de Sulfo-NHS (100 mM) est déposée sur la totalité de la surface de la puce d'or pendant 30 min. La puce est ensuite lavée avec de l'eau et séchée. Le greffage des anticorps est réalisé par « *spotting* » à un pH optimal (partie « Optimisation des conditions de greffage des ligands sur la puce ») via un spotteur sur des zones définies de la puce, appelées « spots », ce qui permet ensuite d'envisager une analyse multiplexée.

Le *spotting sans contact* se fait à l'aide d'un spotteur manuel, développé par F. Rémy-Martin au sein du laboratoire<sup>270</sup>, qui permet de déposer les gouttes d'anticorps à des endroits précis, selon un plan défini, de la surface de la puce. Le spotteur permet de guider le cône d'une

micropipette (2,5  $\mu$ L) par l'intermédiaire d'un guide en plexiglas percé d'une matrice de trou 4x4 (Fig, 36). Le positionnement des trous correspond au pattern des spots que l'on désire effectuer, et comprend 16 spots de  $0,55 \pm 0,02$  mm de diamètre. Le cône, disposé dans un trou du spotteur, ne touche pas la surface et reste à une distance de  $0,8 \pm 0,1$  mm de cette dernière, ce qui évite l'introduction des bulles d'air lors de l'éjection de la solution d'anticorps par la micropipette. Le volume déposé de chaque goutte est généralement compris entre 260 et 300 nL pour une concentration recommandée de 200  $\mu$ g/mL en protéines.

**Fig. 36 :** (A) Spotting des anticorps à la surface d'une biopuce à l'aide du spotteur manuel. (B) la pointe de micropipette ne touche pas la surface lors du dépôt de la goutte. (C) Coordonnées de spotting et (D) image d'une puce après spotting de 16 gouttes.

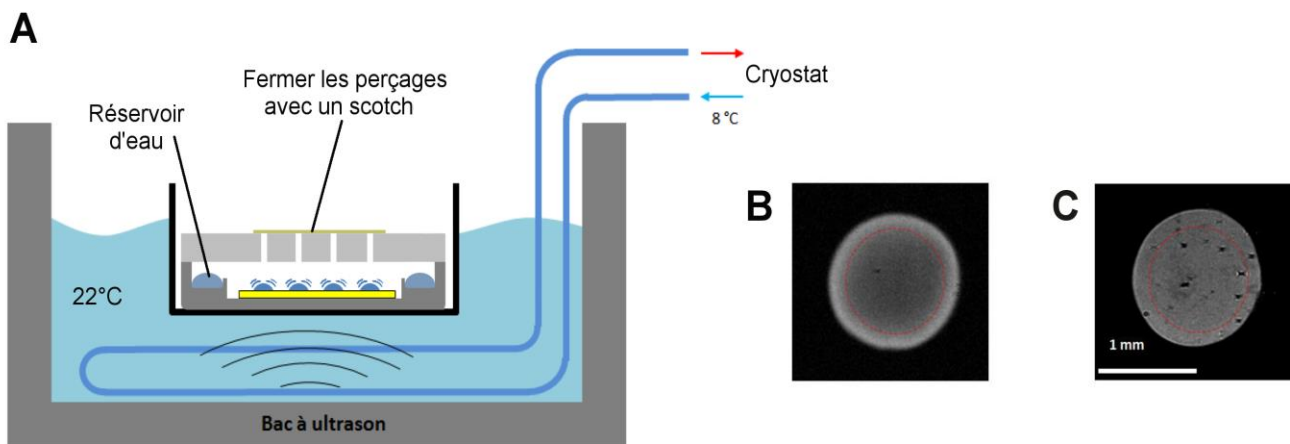


Le spotteur comprend un logement qui permet de bloquer la puce, lors du spotting, à l'aide de deux ressorts amovibles, ce qui offre une plus grande précision et reproductibilité sur la position (X,Y) du plan de dépôt à la surface des puces, ce qui est précieux pour bien localiser les spots à la surface des puces lors du balayage par la microscopie à force atomique. Le logement est aussi équipé d'une chambre hermétique de 2 cm<sup>3</sup> équipée de deux réservoirs, de part et d'autre de la puce, permettant d'y déposer des papiers absorbants humidifiés, ce qui maintient une forte hygrométrie dans l'environnement de la puce et évite le séchage des gouttes d'anticorps lors de l'incubation à la surface pendant 30 minutes à température ambiante, cette durée étant suffisante pour l'immobilisation des anticorps à la surface d'une puce fonctionnalisée par 11-MUOH et 16-MHA dans les concentrations préconisées<sup>323</sup>.

Après la réalisation des différents dépôts, l'ensemble « spotteur avec la puce » est placé dans un bac à ultrasons (Elma) réglé à une fréquence de 37 KHz et à 30% de sa puissance

maximale (Fig. 37-A) au moyen d'un b cher. Cette étape d'activation ultrasonore sert à générer des mouvements fluidiques à l'intérieur des différentes gouttes ce qui permet d'améliorer le taux de greffage et l'homogénéité de la distribution des biorécepteurs à la surface de la puce<sup>270</sup> (Fig. 37- B et C). La puce est incubée dans le bac à ultrasons durant 30 min à température réglée à environ 22 C.

Suite à cette étape, la puce est retirée du bain à ultrasons et est rincée avec un jet d'eau ultrapure dans le but d'éliminer l'excès des solutions des gouttes. Sans séchage, la puce est montée sur le prisme, dans le SPRi-Plex II.



**Fig. 37** : (A) Incubation des spots dans le bac à ultrasons, à 22 C. (B) et (C) montrent deux images de contraste de phase, prise par la caméra CCD de SPRi-Plex II, pour deux spots d'anti-LAG-3 après injection de LAG-3 ; en (B) le greffage de l'anticorps étant déroulé sous activation ultrasonore, alors qu'en (C) sans activation. (Résultats de la thèse de F. Rémy-Martin).

### 3.2.3. Optimisation des conditions de greffage des ligands

Comme indiqué dans la partie portant sur le greffage des anticorps, chaque anticorps est mis en solution dans un tampon, appelé tampon d'immobilisation, à un pH donné, avant d'être spott  ou injecté à la surface de la puce fonctionnalisée. Le tampon d'immobilisation est une solution d'acétate de sodium à 10 mM, préparée dans l'eau ultrapure, dont le pH est ajusté pour chaque biorécepteur à immobiliser.

Cette procédure, appelée préconcentration, sert à concentrer les protéines à immobiliser au voisinage de la surface en optimisant les forces d'attraction électrostatique entre les protéines et les molécules de la SAM. Les tests de préconcentration sont nécessaires pour chaque anticorps. Ces tests consistent à injecter l'anticorps à faible concentration (~ 5-10  g/mL) dans des tampons acétate à différents pH (entre 4 et 6), et pour un court instant (1-2 min), à la surface d'une biopuce fonctionnalisée par une couche mixte de SAM sans activation à l'EDC/Sulfo-NHS. La non-activation de la puce permet alors de suivre l'attraction des ligands à la surface de la puce sans formation des liaisons covalentes avec les groupements carboxyle des molécules 16-MHA, ce qui permet de cribler en une expérience de nombreuses conditions opératoires. Une injection

automatique de détergent (OG à 40 mM) permet la régénération de la surface (retour à la ligne de base) et fiabilise le criblage des solutions pH. Dans quelques cas, l'activation de la couche de SAM par l'EDC/Sulfo-NHS est nécessaire pour faire ces tests comme dans le cas où un anticorps possède un très bas pI et nécessite la présence de sulfo-NHS, possédant un très bas pKa, qui sert à augmenter la charge négative de la surface à un faible pH<sup>280</sup>. Les conditions optimales de pH sont donc déterminées par le suivi de la pente d'interaction ou par le taux de greffage pour un ligand donné. Les injections se font dans un ordre de pH aléatoire et en duplicat.

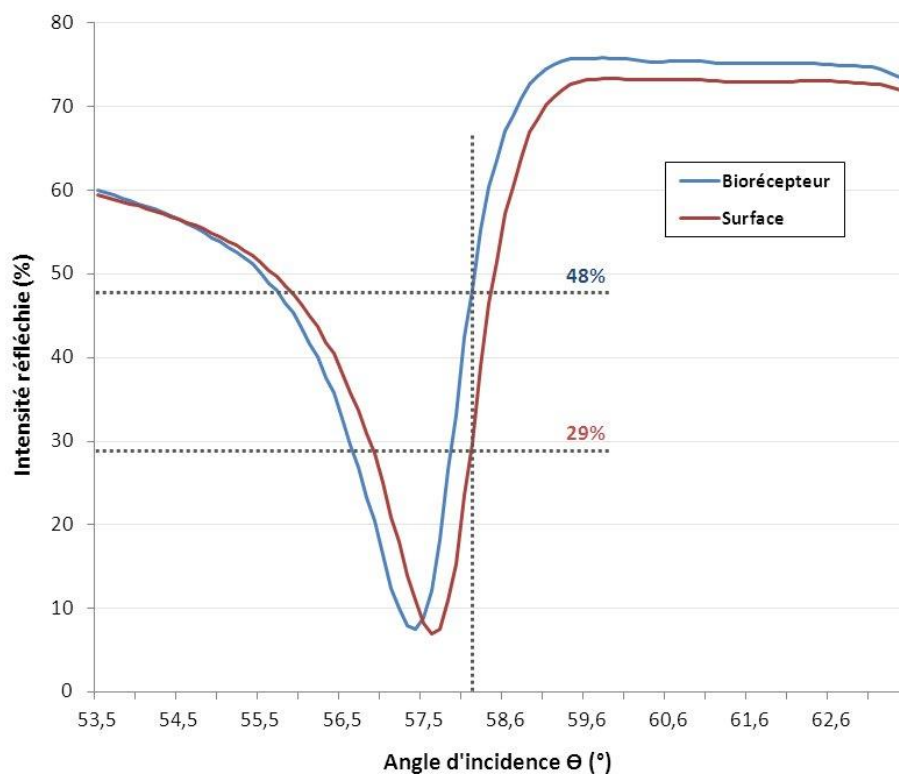
Ces tests ont été réalisés à l'aide de l'appareil BIA3000 puisque ce dernier permet d'utiliser 4 pistes séparément et offre alors une plus grande capacité à cribler un plus grand nombre d'injections. Il faut noter que, quel que soit l'appareil utilisé (BIA3000 ou SPRi-Plex II), dans les conditions optimales de concentration et de pH, une quantité d'anticorps d'environ 2500 pg/mm<sup>2</sup> est immobilisée ce qui correspond à une densité surfacique théorique d'environ 10 000 anticorps/μm<sup>2</sup>.

#### **3.2.4. Blocage et passivation de la surface**

En BIA3000 et en SPRi-Plex-II, le blocage de la surface se fait à l'intérieur de l'instrument par une injection d'une solution d'albumine de sérum de rat (RSA), à 200 μg/mL, suivie d'une injection d'éthanolamine/HCl (1 M, pH 8,5) ; par ces injections, les sites COOH activés mais non couplés au ligand se retrouvent complexés à la RSA, et s'il restait encore des COOH activés libres après cette étape, l'injection d'éthanolamine permet de les passiver en s'y liant. Chaque injection a été réalisée pendant 15 min.

Dans le cas du SPRi-Plex II, les étapes de blocage et passivation de la surface de la biopuce peuvent se faire à l'extérieur de l'instrument par incubation de la surface avec une goutte de RSA (200 μg/mL), suivie d'une incubation avec une goutte d'éthanolamine/HCl (1M, pH 8,5). Cependant, la réalisation de cette étape dans l'instrument permet d'estimer indirectement la quantité de biorécepteurs greffés sur chaque spot par l'évaluation du taux de greffage de la RSA. En effet, l'instrument fournit une courbe plasmon montrant l'intensité de la lumière réfléchie en fonction de l'angle d'incidence pour les différents ROIs. La Fig. 38 montre les courbes de plasmons pour la surface (hors spot) et pour un spot d'anticorps greffés. En se basant sur la partie de la courbe montrant la pente maximale, nous pouvons déterminer la différence entre l'intensité de la lumière réfléchie du spot par rapport à la surface hors spot. Dans cet exemple, la différence est de 48-29 = 19%. Cette valeur est ensuite multipliée par 125 (comme chaque % correspond à 125 pg/mm<sup>2</sup>) pour obtenir de façon indirecte une estimation du taux de greffage des anticorps sur le spot, qui est dans ce cas de 2375 pg/mm<sup>2</sup>.

A ce stade, la puce est prête pour l'injection des analytes sur les différents canaux ou spots.



**Fig. 38:** Courbe de plasmon enregistré dans SPRI-Plex II, avant (rouge) et après greffage d'un ligand (biorécepteur) sur un spot.

### 3.2.5. Capture des analytes

La capture des analytes, dans les deux instruments, se fait par injection de l'échantillon, dilué dans le tampon de course, à la surface de la biopuce avec un débit et un temps d'injection contrôlés.

Afin de travailler dans des conditions de transfert de masse cohérents entre les deux équipements, nous avons tenu compte des caractéristiques microfluidiques respectives des machines et pris en compte les considérations d'écoulement fluide selon les objectifs d'analyses cinétiques ou du piègeage de vésicules. La différence de section de la cellule microfluidique pour BIA3000 et SPRI-Plex II engendre une différence dans la vitesse de flux d'un facteur 20 pour un même débit. Par conséquent, ce facteur a toujours été respecté lorsque nous voulions travailler dans des conditions similaires d'interaction entre les deux instruments. Nous avons ainsi adapté les débits, entre 2 $\mu$ l/min et 200 $\mu$ l/min selon les machines et les objectifs expérimentaux.

### 3.3. Analyse protéomique

Comme indiqué précédemment, l'analyse MS a été réalisée à partir du matériel biologique (ici les VEs capturées spécifiquement à la surface de la puce). En premier temps, une analyse MS

rapide par MALDI-TOF du contenu de chaque échantillon permet de valider l'absence de contaminants de type polymères qui peuvent gêner l'analyse en nanoLC/ESI-Trap qui est processée ensuite. Les analyses et le traitement des données MS ont été réalisés au sein du site dijonnais de la plateforme CLIPP. Les précautions à prendre lors de la combinaison entre la SPR et la MS seront présentées dans la partie «Interfaçage» de ce chapitre.

La première étape de l'analyse MS consiste à générer des peptides analysables par spectrométrie de masse à partir du matériel capturé à la surface. Cette étape est réalisée à l'aide de l'ImagePrep, un robot de préparation capable de nébuliser différents réactifs (phase liquide) sur des surfaces. Une première phase permet de réduire les protéines de manière à les déplier (TCEP 10 mM/ 0,1 M  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$ , Sigma Aldrich) ; une seconde phase de digestion par la trypsine est ensuite réalisée (10 et 40 ng/ $\mu\text{L}$ , Trypsin Gold Mass Spectrometry Grade, Promega), ces 2 étapes étant menées à 37°C. La trypsine permet de digérer les protéines par hydrolyse des liaisons peptidiques qui suivent les lysines et les arginines, sauf dans le cas où ces acides aminés sont suivis par une proline. Les peptides ainsi générés sont élués de la surface à l'aide d'une solution 30% acétonitrile. 0,5  $\mu\text{L}$  de la solution éluée est déposée sur une cible MALDI pour une analyse MS rapide par MALDI-TOF.

Les données générées sont ensuite injectées dans la base de données humaines Uniprot. L'algorithme ayant permis de valider les protéines est Mascot (Matrix Science, Mascot version 22,01 ; Boston, MA, USA). Le calcul du score dans Mascot est basé sur l'algorithme de MOWSE (Molecular Weight SEarch). La probabilité qu'un match entre un peptide expérimental et une séquence protéique théorique soit un événement au hasard (P) est calculée pour chaque protéine contenue dans la base de données. Plus la probabilité est faible (exemple  $10^{-20}$ ), moins c'est un événement au hasard donc plus l'événement a de chance d'être vrai. Le Mascot Score est donné par la formule suivante :  $S_{\text{Mascot}} = -10 \text{ Log} (P)$ . Une probabilité de  $10^{-20}$  devient un score de 200. Le seuil de significativité dépend, entre autres, de la taille de la banque de données. Plus elle est grande, plus le score doit être élevé pour être considéré comme significatif.

D'autres paramètres permettent également de donner une valeur statistique aux données :

- Taux de faux positifs (Protein FDR Confidence) : celui-ci est défini entre 1 et 5 % (donc entre 1 et 5 % de chance que le résultat considéré soit un faux positif).
- Exp. Q-value : probabilité que le résultat soit vrai. Plus la valeur est proche de 0, plus le résultat est significatif.
- Nombre de peptides par protéine.

La combinaison de ces 4 paramètres permet de valider de façon robuste la présence d'une protéine. Une protéine est significativement identifiée avec un nombre de peptides identifiés au moins  $\geq 2$ , une q-value proche de 0, un FDR proche de 1% et un score Mascot  $> 60$ . Les autres résultats ne sont pas forcément faux mais nécessitent une confirmation.

L'analyse MS est combinée à un rapport bioinformatique. Il représente les différentes protéines identifiées, en relation avec les voies de signalisation impliquées ainsi que leurs fonctions physiologiques (STRING). Une analyse protéomique différentielle peut être fournie dans le cas d'échantillons possédant un témoin.

#### **4. Interfaçage : la plateforme NBA**

L'idée principale de notre plateforme NanoBioAnalytique (NBA) est de combiner les trois techniques citées ci-dessus, l'imagerie SPR (SPRi), l'AFM et la spectrométrie de masse, dans le but d'assurer une analyse relativement exhaustive des VEs dans un échantillon complexe (ex. plasma).

La pierre angulaire de la plateforme est la biopuce d'or sur laquelle nous immobilisons sous formes de spots les différents biorécepteurs spécifiques des VEs, ainsi que les contrôles, cette puce représentant le composant interrogeable par ces différentes techniques. En assurant une capture sélective des cibles biologiques selon un pattern modulable de spots, la biopuce assure l'organisation bidimensionnelle d'une information biologique initialement contenue dans un volume. Cette étape est assurée au sein d'un dispositif de détection, l'instrumentation SPRi, en une étape et en temps réel sans requérir un quelconque marquage préalable des cibles. Les taux de capture doivent être proportionnels et directement liés à la concentration des vésicules dans l'échantillon mais aussi à la densité surfacique des antigènes d'intérêts à la surface des vésicules et à l'affinité des ligands pour leurs antigènes ; le paramétrage peut être validé par la mise au point de calibrants internes. Dans ces conditions, l'étape d'analyse SPRi constitue une étape cruciale du chemin analytique de cette plateforme car elle conditionne l'information complémentaire qui sera fournie par les techniques couplées. Ainsi, suite à la capture des VEs en SPRi, la puce est soit analysée en AFM soit en MS. Bien que, théoriquement, une analyse AFM suivie d'une analyse MS sur la même puce est possible, nous avons plutôt choisi de réaliser l'analyse MS séparément afin d'éviter les contaminations qui pourraient être occasionnées pendant le traitement de la puce sous AFM. Cette stratégie est aussi liée à la quantité de matériel biologique qui peut être radicalement opposée entre ces deux techniques, ce qui conduit généralement à une architecture de puce différente adressant en revanche le même échantillon.

##### **3.1. Couplage SPRi-AFM**

###### **3.1.1. Préparation de la surface pour l'analyse AFM**

Lorsque la puce est dédiée à l'analyse AFM, la capture des VEs en SPRi est terminée par une injection de glutaraldéhyde (à 0,5% dans le tampon de course, pendant 10 min), une substance organique utilisée pour la fixation des protéines par réticulation. Le glutaraldéhyde sert à fixer les VEs à la surface de la puce pour éviter la perte du matériel lors du passage de la puce du SPRi à l'AFM et lors de l'étape de lavage à l'eau ultrapure (eau UP) de la surface de la puce.



Si nous souhaitons faire l'analyse AFM en tampon, la puce est sortie de l'instrument (BIA3000 ou SPRi-Plex II) sans vider la cartouche microfluidique, aussi la puce est toujours hydratée en tampon de course avec un risque d'évaporation pouvant engendrer la formation de cristaux de sel, pendant son stockage ou son analyse par AFM, potentiels source d'artefacts. Le tampon de course peut alors être remplacé par de l'eau ultrapure (UP), suite à l'injection de glutaraldéhyde dans l'instrument, et la puce est sortie recouverte par une goutte d'eau UP. La puce est ensuite maintenue dans l'eau UP si l'analyse AFM est appliquée en liquide, ou bien est séchée à température ambiante pour une analyse AFM en air.

La puce ensuite peut être directement analysée par AFM, ou bien préservée, avec une goutte d'eau (à +4°C) qui couvre toute la surface. Si la puce est séchée, le stockage se fait dans une boîte, à température ambiante, à l'abri de la poussière jusqu'à l'analyse AFM. Comme nous allons le voir, le séchage de la puce n'a montré aucun effet dénaturant sur les vésicules capturées et fixées.

### **3.1.1. Analyse AFM**

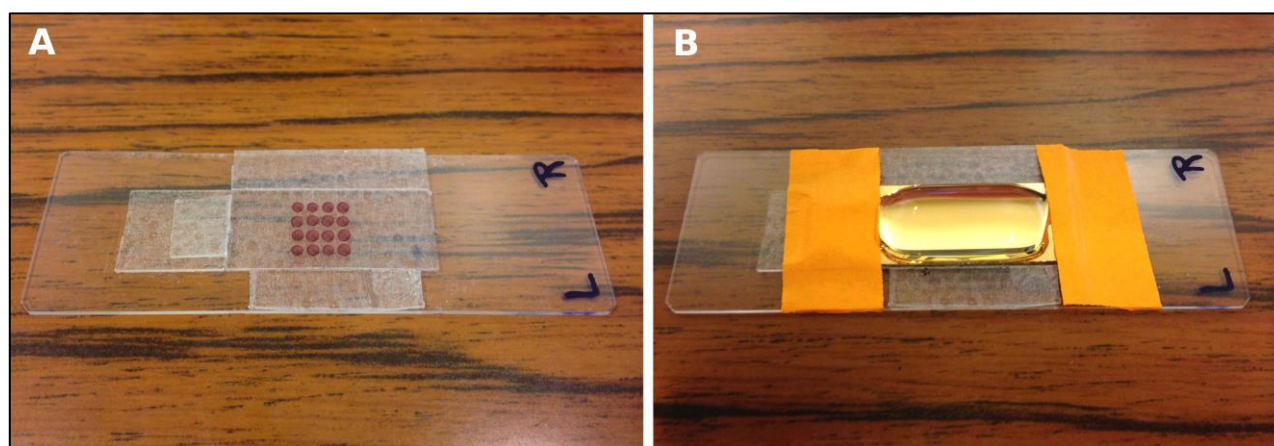
L'analyse AFM a été réalisée soit en air soit en liquide. Dans les deux cas, des cantilevers de type NP-S10 triangulaires (Veeco, Digital instruments), ayant une constante de raideur  $K=0,32$  N/m, ont été utilisés. Toutes les analyses AFM ont été effectuées en mode contact.

D'autre part, pour aider au repérage des zones d'intérêts à la surface des puces SPRi, un masque a été développé pour localiser, avec précision, les différents spots (Fig. 39- A et B). La figure 39-C montre une image optique (grossissement 420 x) d'un spot sur une biopuce après capture des VEs issues des concentrés plaquettaires. La puce a été posée et fixée sur le masque par du scotch (spot « repère » du masque est en arrière-plan). La superposition de la zone de capture avec le spot « repère » du masque est bien validée. Cette image de microscopie optique a été obtenue en utilisant une illumination par dessus l'échantillon. Cette illumination par-dessus l'échantillon est impossible à appliquer lorsque la tête AFM est en place, ce qui impose d'utiliser un éclairage par dessous l'échantillon, ce qui rend difficile la visualisation des particules par microscopie optique.

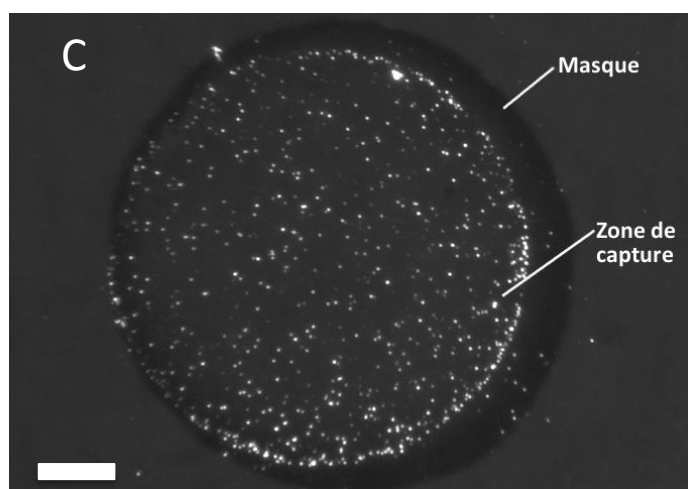
Les puces SPR (compatibles avec le BIA3000) sont analysées par AFM sans besoin d'un masque car les 4 pistes sont facilement identifiables sous microscope (partie « 2.3.1. Capture des CP50 » du chapitre III).

Pour chaque zone d'intérêt (spot ou piste), différentes régions sont scannées afin d'avoir une vue par AFM la plus représentative de la zone d'intérêt. Des images de différentes tailles, de  $100 \times 100 \mu\text{m}^2$  à  $2 \times 2 \mu\text{m}^2$ , sont générées. Les plus grandes zones permettent de fournir une vue globale de la surface, de l'homogénéité de la répartition des vésicules d'intérêts à la surface de la zone de capture, mais aussi de détecter des objets pouvant être rares et dont la proportion pourrait être sous-estimée si uniquement des images de petites dimensions ( $< 10 \times 10 \mu\text{m}^2$ )

étaient effectuées. Les images de petites dimensions permettent d'avoir la résolution suffisante pour mesurer les dimensions (hauteur, diamètre) des vésicules capturées à la surface.



**Fig. 39 :** Masque utilisé pour aider au repérage des spots à la surface de la puce lors de l'analyse AFM : (A) Le masque avec les positions des spots. (B) Une puce collée sur le masque. (C) Image par microscopie optique montrant la superposition de la zone de capture des VEs sur biopuce avec le spot « repère » du masque. Barre d'échelle = 200  $\mu\text{m}$ .

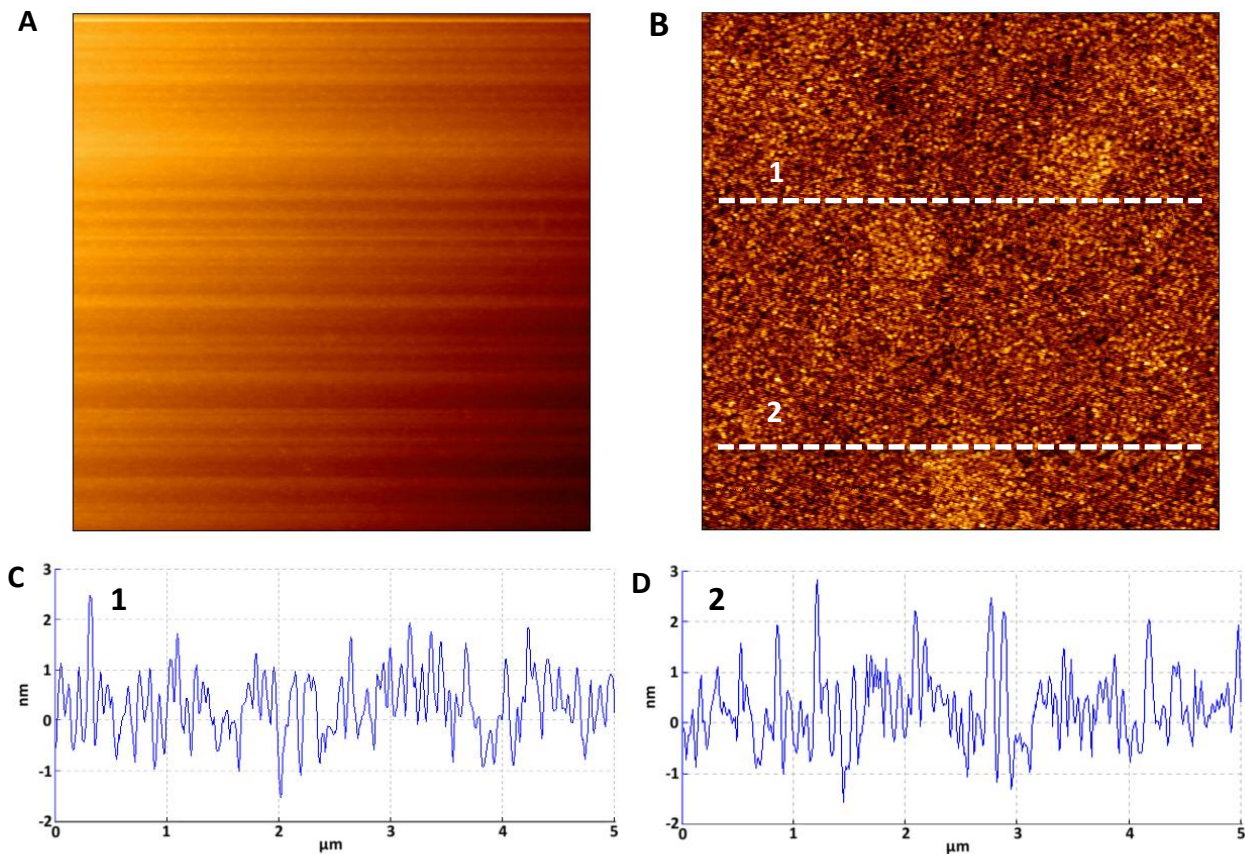


### 3.1.2. Traitement et analyse des images AFM

Le traitement des données AFM a été réalisé à l'aide de 3 logiciels : Data Processing (JPK), Gwyddion et Excel. Ces logiciels nous ont permis de traiter de façon rigoureuse et avec un débit raisonnable les données AFM sur des milliers des vésicules dans un court temps ( $\approx 1\text{h}$ ).

Les images brutes en hauteur de l'AFM sont traitées par le logiciel Data Processing qui permet le traitement basique des images AFM : la soustraction polynômiale de l'arrière-plan et des artefacts causés essentiellement par l'inclinaison de la surface de l'échantillon et par le mouvement parabolique du piézo-électrique. Ce processus est appelé « flattening » ou « Leveling ».

La Figure 40 montre une analyse AFM de la surface d'une puce fonctionnalisée, présentant l'anticorps  $\alpha\text{-LAG-3}$  et bloquée par la RSA. La Fig 40-A présente une image AFM de  $5 \times 5 \mu\text{m}^2$  de la surface avant le traitement par le logiciel JPK Data Processing ; la partie gauche de l'image est plus claire que celle de droite à cause de l'inclinaison de la surface. La même image est présentée en Fig 40-B suite au traitement par le logiciel.



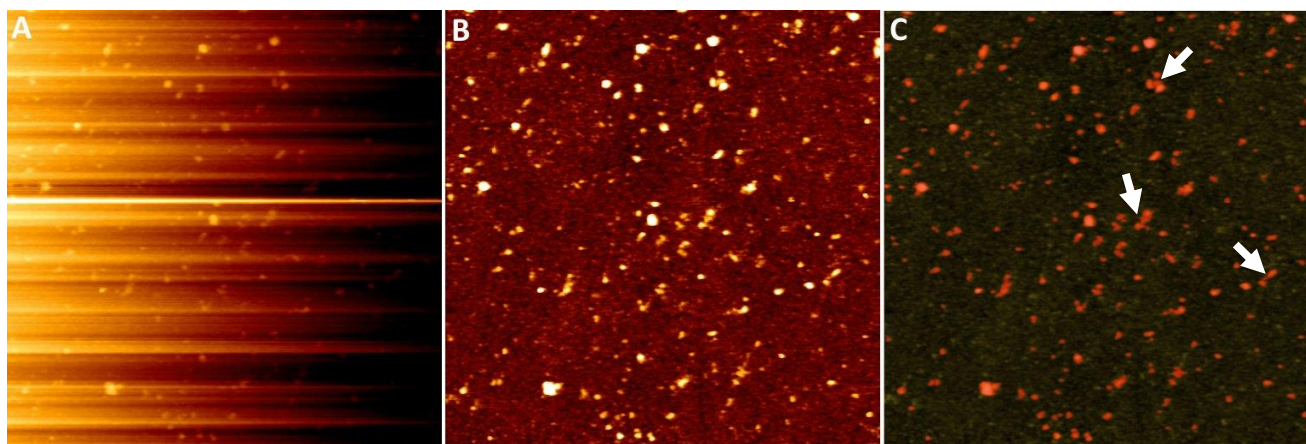
**Fig. 40:** Image AFM ( $5 \times 5 \mu\text{m}^2$ ) de la surface d'une biopuce fonctionnalisée par un anticorps IgG : (A) Image AFM avant traitement par JPK Data Processing et (B) après traitement. (C) et (D) représentent deux sections de profil de la surface, correspondant aux lignes 1 et 2 indiquées dans l'image (B).

Les sections de profils de la surface montrent une rugosité ( $R_q$ ) de  $\approx 0,65 \text{ nm}$ , contre  $0,45$  pour la surface d'or nue (Fig. 40-C et D), et des valeurs de Z max et min entre  $-1,5$  et  $2,5 \text{ nm}$ . Cette analyse met en évidence le type de rugosité de surface d'une puce classique SPR biofonctionnalisée, comme celles qui sont utilisées dans notre projet pour la capture des VEs.

Nous avons optimisé l'utilisation de Gwyddion dans le but d'aider au comptage et à la mesure de taille sur des milliers de VEs. Pour cela, les images AFM corrigées sont ensuite traitées par le logiciel Gwyddion de la façon suivante :

- **Application d'un seuil en hauteur :** Gwyddion permet d'appliquer des algorithmes de seuillage par hauteur afin de marquer les particules présentes sur la surface et les soustraire du bruit de fond correspondant à la surface de la puce d'or présentant des anticorps et des molécules de RSA ayant servi à la passivation de la surface.

Comme nous avons vu dans la Fig.40, une telle surface montre des motifs qui peuvent atteindre  $\approx 2,5 \text{ nm}$  en hauteur. Par conséquent, un seuil en hauteur de  $3 \text{ nm}$  a été appliqué lors de l'analyse des images AFM présentant les particules capturées (ex : Calibrants CP50 et VEs) (Fig. 41).



**Fig. 41** : Traitement des images AFM de vésicules capturées à la surface d'une biopuce présentant des biorécepteurs spécifiques : (A) Image AFM de  $5 \times 5 \mu\text{m}^2$  avant (A) et après (B) traitement par le logiciel JPK Data Processing. (C) L'image après traitement par le logiciel Gwyddion en appliquant un seuil en hauteur de 3 nm. Dans le cas des vésicules en contact (flèches blanches), Gwyddion les considère comme une seule vésicule.

• **Traitement des données** : Gwyddion permet ensuite l'analyse de différentes propriétés de particules telles que leur nombre, leur hauteur, leur diamètre, etc.

Les données provenant de l'analyse de différentes images, par le logiciel Gwyddion, et correspondant à la hauteur et au diamètre de chaque particule sont ensuite transférées sous forme texte vers le logiciel Excel. Nous pouvons alors traiter ces informations, calculer le diamètre effectif de chaque particule (en tenant compte du diamètre et de la hauteur) et tracer des histogrammes représentant les distributions en tailles des particules sur la biopuce.

Il faut préciser que le logiciel Gwyddion ne permet pas de discriminer deux vésicules qui sont proches, ce qui nous oblige ponctuellement à reprendre quelques mesures manuellement pour ne pas compatibiliser ces agrégats (Fig. 41- C).

Cette méthode de traitement d'images permet la mesure du diamètre effectif de milliers de particules en une durée d'environ une heure.

### 3.2. Couplage SPRI-MS

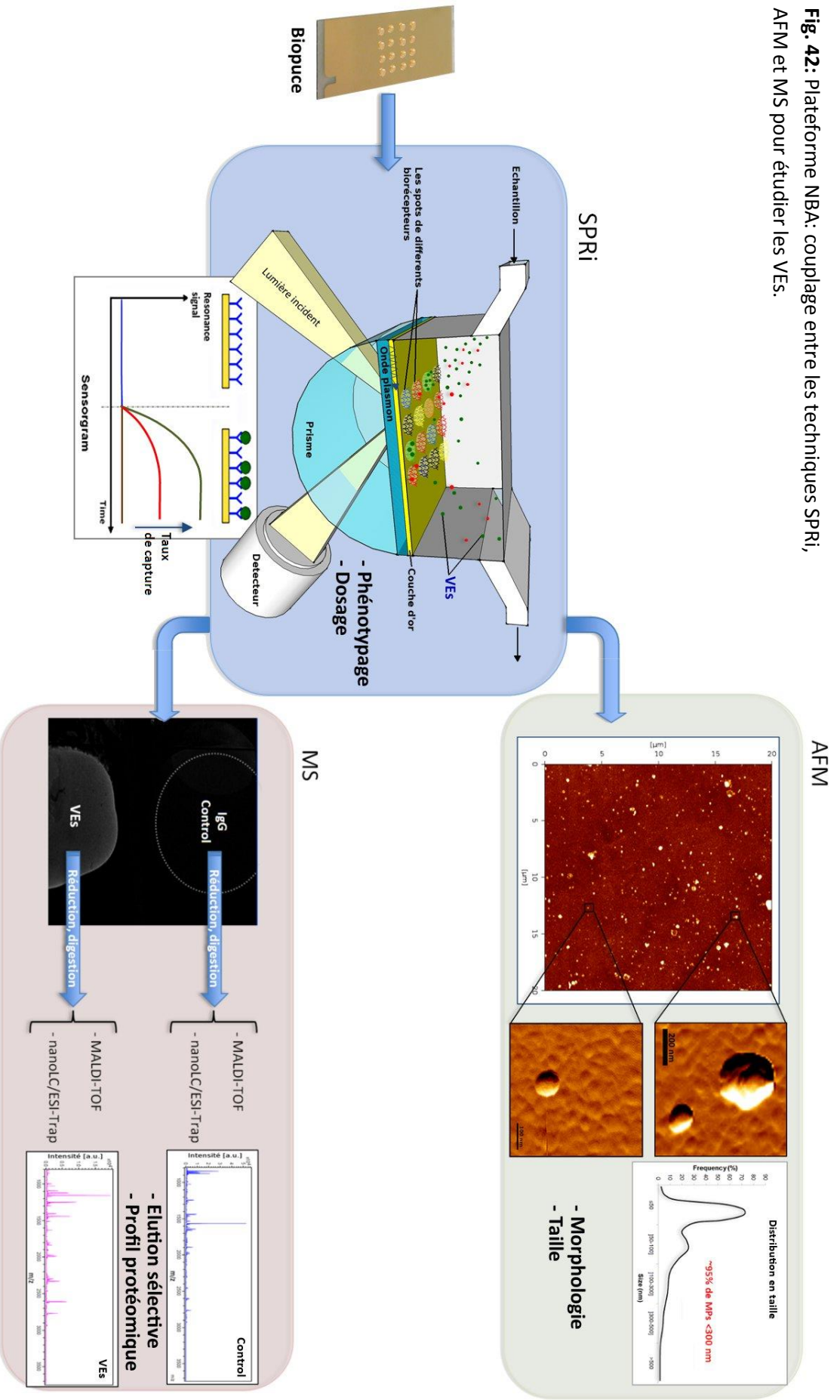
Afin de réaliser une analyse protéomique sélective vis à vis des sous-populations de VEs, la stratégie est de capturer une sous-population de VE via un ligand spécifique à la surface d'une biopuce d'or. Comme la sensibilité de l'analyse protéomique est liée à la quantité de matériel à analyser (ceci sera présenté dans la partie « analyse protéomique de PVEs »), nous réalisons la capture des VEs soit sur des macrospots de ligands (d'environ 6 mm de diamètre, avec 2 macrospots par puce), soit sur une surface entièrement recouverte de ligand d'intérêt, en greffant ce dernier sur la puce, au sein de l'instrument SPRI, à l'aide de la microfluidique. Pour cela, l'instrument SPRI-Plex II est mieux adapté à une telle combinaison à la MS car il offre une zone

exploitable large ( $\approx 1,6 \text{ cm}^2$ ).

Quand la puce est dédiée à une analyse MS, l'utilisation du glutaraldéhyde doit être proscrit, c'est donc une injection d'eau qui est réalisée afin de remplacer le tampon de course sur la surface suite à la capture des VEs. La puce est ensuite sortie de l'instrument et séchée avant d'être stockée dans un tube eppendorf, à l'abri de la poussière, en attente de l'analyse MS qui est menée dans les jours qui suivent l'expérience SPRi.

Ainsi l'analyse MS est réalisée comme indiqué précédemment dans la partie «3.3. Analyse protéomique ».

**Fig. 42:** Plateforme NBA: couplage entre les techniques SPRI, AFM et MS pour étudier les VES.



### III. Mise au point des calibrants

Afin de valider les performances de la plateforme nanobioanalytique en termes de détection, de quantification et de caractérisation des nano- et micro-vésicules en milieu biologique complexe, deux calibrants mimant les propriétés géométriques et physico-chimiques des VEs ont été sélectionnés : (1) des particules virales (VLP pour Virus-Like Particles) ayant une taille moyenne de 50 nm, qui seront nommées CP50 et (2) des billes synthétiques de résine-mélatamine, de 920 nm de diamètre, qui seront nommées CP920, dont la surface est biofonctionnalisée par des protéines. Ces deux calibrants ont été choisis puisqu'ils encadrent la gamme de tailles des VEs (30 - 1000 nm).

#### 1. Matériels et méthodes

##### 1.1. Réactifs et produits chimiques

Le tampon de course est le tampon phosphate salin (PBS) 1X, pH de 7,4, composé de NaCl (137 mM), KCl (2,7 mM), Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (10 mM) et KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (1,08 mM). Nous utilisons aussi un tampon acétate de sodium à 10 mM dont le pH varie selon les ligands à greffer. Les tampons sont préparés en utilisant de l'eau ultrapure (résistance 18 MΩ/cm, Purelab prima from ELGA).

L'Octyl-β-D-Glucopyranoside (OG) et le tampon Tris (2-Amino-2-hydroxymethyl-propane-1,3-diol) proviennent de chez Sigma-Aldrich.

Le dosage protéique est effectué à l'aide d'un kit de dosage par BCA (Acide BiCinchoninique) de chez Sigma-Aldrich et la lecture de l'absorbance à l'aide du spectromètre UV-2450 (Shimadzu).

Les billes magnétiques liées à la protéine G (Dynabeads-Protein G) proviennent de chez ThermoFisher Scientific et les colonnes de chromatographie d'affinité Hitrap Protein G-HP de chez GE Healthcare.

Les billes de résine-mélatamine (MF), modifiées par des groupements carboxyle, proviennent de chez *Microparticles GmbH* (Berlin, Allemagne).

##### 1.2. Ligands et particules de calibrants

###### 1.2.1. Les différents ligands de capture

- Anti-ovalbumine (α-OVA) : un anticorps monoclonal de souris, spécifique de l'albumine d'œuf (ovalbumine ou OVA), fournisseur Sigma-Aldrich (réf. A6075).
- Anti-CD41 (α-CD41) : anticorps monoclonal de souris, spécifique de l'intégrine alpha-IIb (humain), présente essentiellement à la surface des plaquettes et des vésicules plaquettaires<sup>324</sup>. Fournisseur Diaclone SAS (Besançon, France, réf. 853.353.020).
- Anti-LAG-3 (α-LAG-3), (clone A9H12 ou α-CP920) et billes de résine-mélatamine: anticorps

chimérique (60% humain et 40% souris) spécifique de la protéine LAG-3 (Lymphocyte activation gene-3) qui est reconnue comme un biomarqueur potentiel de la tuberculose et du cancer du sein. La protéine LAG-3 est greffée sur les particules synthétiques de résine-mélatamine CP920 qui sont utilisées aussi comme des particules calibrants. LAG-3 et  $\alpha$ -LAG-3 sont fournis par Immutep SA (Chatenay Malabry, France).

- Anti-VLPs (ou  $\alpha$ -CP50) et VLP : anticorps monoclonal de souris spécifique de la protéine VP1 de la capsid des particules virales VLP- souche GII.4 utilisées dans ce projet comme particules calibrants. L'anticorps et les particules virales ont été fournis par le Dr Gaël Belliot du Centre National de Référence (CNR) des virus entériques (Dijon, France).

### 1.2.2. Les particules virales : CP50

Les particules virales (VLPs) sont composées de la protéine de capsid VP1 du norovirus (Génogroup II, génotype 4 « GII.4 »); les norovirus appartiennent à la famille Calciviridae et sont responsables, chez l'homme, de gastroentérites aiguës, d'infections entériques modérées ou asymptomatiques, alors que chez les animaux ils sont plus souvent responsables d'infections pauci- ou asymptomatiques. Le premier norovirus identifié chez l'homme est le norovirus *Norwalk* qui a causé une épidémie de gastroentérites qui s'est déclarée, en 1968, chez des élèves et enseignants d'une école primaire dans l'Ohio aux Etats-Unis<sup>325</sup>.

Les norovirus présentent une grande diversité génétique et antigénique, et sont classés en cinq génogroupes subdivisés en 5 génotypes ; seuls les génogroupes I, II et IV sont impliqués dans les infections humaines<sup>326,327</sup>.

Les norovirus sont des virus à ARN simple brin et possèdent une capsid icosaédrique non enveloppée de 27 à 40 nm. La capsid est constituée de deux protéines, une protéine majeure VP1 et une autre protéine mineure VP2.

La protéine VP1, constituant essentiel des particules virales que nous utilisons comme calibrants, est une protéine de 58-60 kDa. Elle possède plusieurs domaines (Fig. 43) :

- **Le domaine N** : qui constitue la partie N terminale et se situe sur la face interne de la capsid.

- **Le domaine S** : qui est essentiel pour la formation de la capsid et correspond à la région la plus conservée de VP1.

- **Le domaine P** : qui constitue la partie externe de la capsid. Ce domaine est divisé en deux sous-domaines : le sous-domaine P1, qui est plutôt conservé, et le sous-domaine P2, le plus externe, qui correspond à la région hypervariable de la capsid et qui est responsable de l'antigénicité du virus et de ses interactions avec son récepteur cellulaire.

Les particules virales ont été produites en infectant les cellules High-Five de la société Invitrogen<sup>328</sup>. Les VLPs purifiées sont mises en solution dans un tampon TNC (50 mM Tris-HCl

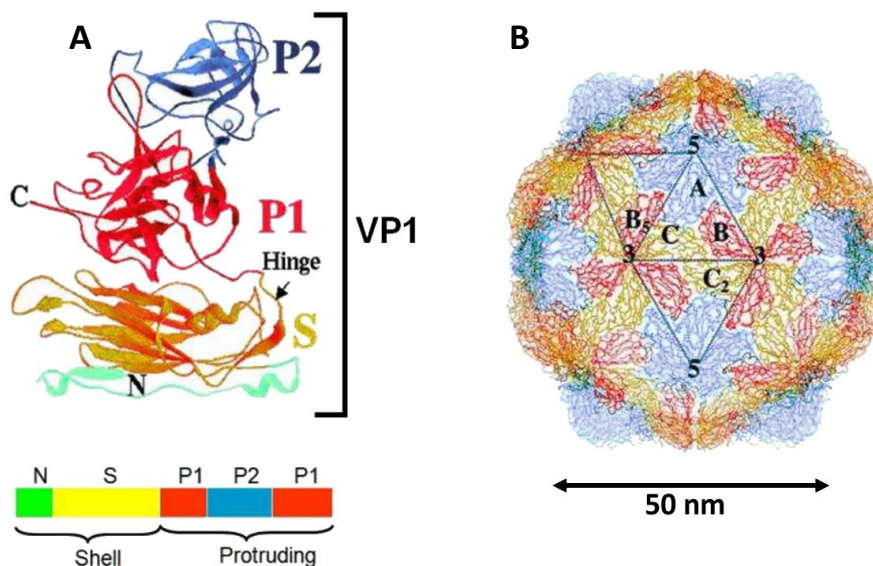


(pH 7,4), 0,15 M NaCl, 10 mM CaCl<sub>2</sub>) avant d'être quantifiées à l'aide d'un kit de dosage par BCA, et diluées à une concentration protéique de 1mg/mL afin d'éviter les phénomènes de précipitation. Les VLPs sont ensuite aliquotées par fraction de 10 µL puis conservées à +4°C pour de courtes périodes ou congelées à -80°C pour de longues durées de stockage.

Les VLPs seront nommées CP50 dans notre projet car elles seront utilisées comme des particules de calibration (CP pour Calibration Particles) de taille ≈50 nm. Ainsi, l'anti-VLPs sera nommé α-CP50.

**Fig. 43 :** Structure et assemblage de la protéine de capsid VP1: (A) la protéine VP1 possède 4 domaines principaux : deux domaines internes (N et S) et deux domaines externes (P1 et P2). (B) Les particules virales, constituées par des protéines VP1, présentent une structure icosaédrique de symétrie T=3.

(Thèse Alexis de Rougemont)



### 1.2.3. Billes de résine-mélatamine : CP920

Des billes de résine-mélatamine (MF) ont été utilisées comme calibrant de grande taille. En effet, ces billes possèdent un diamètre de  $920 \pm 50$  nm, avec une densité de  $1,51 \text{ g/cm}^3$ , et présentent des fonctions carboxyle (-COOH) à leur surface. Les fonctions carboxyle, une fois activées par l'EDC/Sulfo-NHS, constituent des sites de greffage pour les protéines ce qui permet la biofonctionnalisation des billes et leur confère ainsi la propriété d'être capturées à la surface de la biopuce via un anticorps spécifique.

La protéine LAG-3 a été choisie comme modèle pour la biofonctionnalisation des billes MF car cette protéine et son anticorps spécifique A9H12 (α-LAG-3) ont été abondamment étudiés et caractérisés au sein de notre laboratoire.

### 1.3. Analyse TRPS

Des analyses TRPS par Qnano (Izon Science) ont été appliquées pour mesurer la distribution en taille des particules virales.

Les mesures ont été faites en utilisant une membrane présentant un pore de 100 nm (NP100) ayant une gamme de détection de 40 à 320 nm. 30 µL de l'échantillon, ont été appliqués sur la

membrane, avec une concentration dans la gamme de concentration recommandée par les fournisseurs ( $10^5$  à  $10^{12}$  particules/mL).

#### **1.4. Analyse AFM**

Une analyse AFM est réalisée pour étudier la métrologie des particules virales capturées à la surface de la biopuce d'or. Pour cela, la capture des particules à la surface est suivie d'une injection de glutaraldéhyde (0,5%) pendant 10 min avant la récupération de la puce. L'analyse a été appliquée en milieu liquide (en eau ultrapure) et en air.

Des cantilevers de type NP-S10 triangulaire (Veeco, Digital instruments), ont été utilisés en mode contact. Ces cantilevers possèdent une constante de raideur  $K=0,32$  N/m.

#### **1.5. Préparation des VEs plaquettaires et caractérisation par cytométrie en flux**

Des VEs générées à partir de concentrés plaquettaires ont été fournies par l'établissement français du sang (EFS, Bourgogne Franche-Comté, Besançon, France). Ces VEs plaquettaires (PVEs) ont été caractérisées par la cytométrie en flux afin de déterminer leur taille et leur concentration.

Le protocole de préparation de ces vésicules plaquettaires (PVEs) et de leur caractérisation par cytométrie en flux sera détaillé en début de chapitre IV lorsque nous présenterons en détail l'application de la plateforme NBA pour étudier des VEs issues de différentes origines.

## **2. Résultats**

### **2.1. Préparation des ligands et optimisation des conditions de greffage**

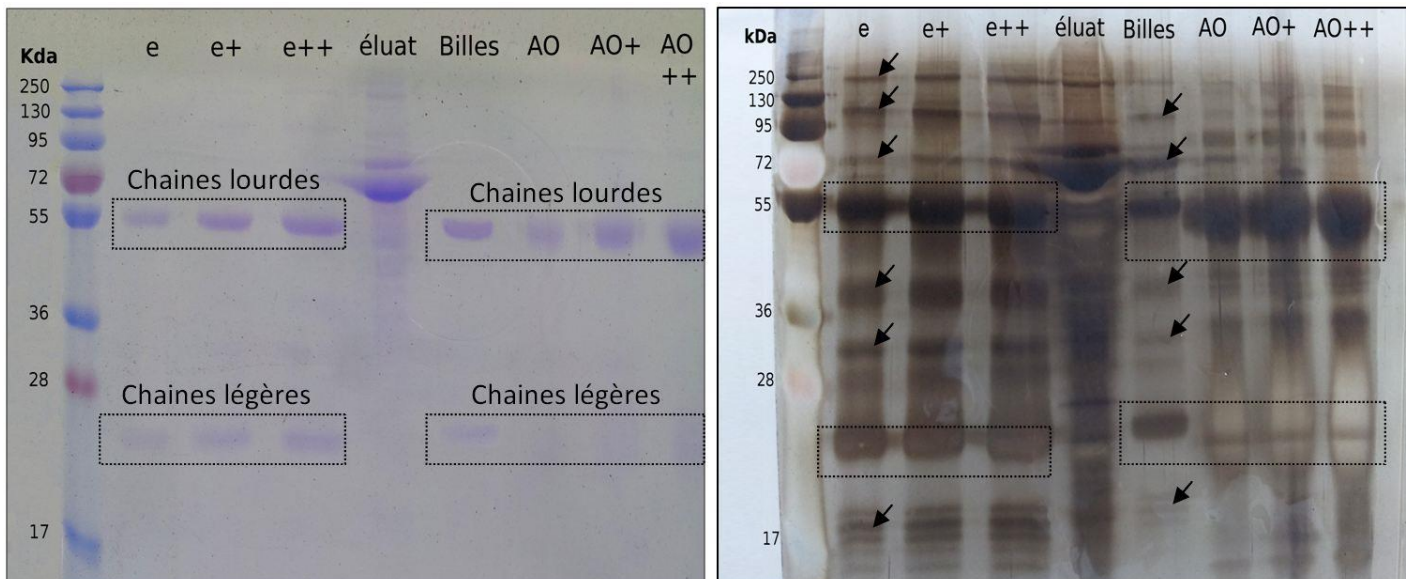
#### **2.1.1. Purification de l' $\alpha$ -CP50 à partir de l'ascite**

La production de l'anticorps  $\alpha$ -CP50 a été effectuée par le biais du liquide d'ascite, par conséquent, la purification de l' $\alpha$ -CP50 à partir de l'ascite est une étape nécessaire afin d'éliminer tous les contaminants protéiques de l'ascite qui pourraient être cogreffés lors de l'immobilisation de l'anticorps à la surface de la biopuce.

Dans notre laboratoire, deux techniques ont été explorées pour la purification de l'anti-CP50: (1) des billes magnétiques liées à la protéine G (Dynabeads-Protein G) et (2) par chromatographie d'affinité sur une colonne de sépharose-protéine G de 500  $\mu$ L (Hitrap Protein G HP) dont les protocoles détaillés sont indiqués dans les annexes 1 et 2 respectivement.

Dans les deux cas, les fractions purifiées ont été dosées par la méthode BCA et testées par électrophorèse sur gel SDS-PAGE pour confirmer la purification de l'anticorps.

Le dosage BCA a donné une concentration de 0,8 mg/mL et de 1 mg/mL en protéines pour les fractions purifiées respectivement par chromatographie sur colonne et par la méthode des billes magnétiques. La séparation des protéines sur gel a été suivie d'une coloration au bleu de



**Fig. 44 :** Electrophorèse sur gel de polyacrylamide de la fraction purifiée de l'  $\alpha$ -CP50 à partir de l'ascite, suivie d'une coloration du gel par le bleu de coomassie (A) et par le nitrate d'argent (B). L'« éluat » désigne la fraction éluée lors du lavage de la colonne suite à la rétention des anticorps par les protéines G. L'éluat représente toutes les protéines de l'ascite sauf les anticorps. La fraction d'anticorps purifiée est représentée par la lettre « e », qui a été déposée sur le gel à différentes concentrations (e, e+, et e++). « Billes » désigne la fraction d'anticorps purifiée à partir des billes magnétiques. « AO » représente une solution d'anti-Ovalbumine commerciale servant de contrôle, à différentes concentrations équivalentes à celles de la fraction « e » (AO, AO+ et AO++). Les flèches dans l'image de droite montrent les bandes correspondant aux contaminants.

coomassie complétée par une coloration au nitrate d'argent (Fig. 44). Les deux méthodes de coloration ont montré deux bandes majeures, à 50 kDa et à 25 kDa, qui correspondent respectivement aux chaînes lourdes et légères des anticorps, pour les fractions purifiées par la chromatographie ainsi que pour celles purifiées par les billes magnétiques (Fig. 44). Cependant, la méthode au nitrate d'argent, étant plus sensible pour le marquage des protéines, a mis en évidence une contamination protéique de la fraction d'anticorps obtenue par chromatographie, supérieure à celle obtenue par billes magnétiques. En comparant le contraste entre les bandes correspondantes à notre anticorps et les bandes contaminantes, nous avons pu estimer une pureté d'environ 85-90% de l'anticorps purifié par chromatographie d'affinité, alors que la pureté atteint environ 95% dans le cas des billes magnétiques.

Ces résultats montrent que la technique de purification par les billes magnétiques-protéine G est plus efficace et plus rapide (~30 min) que la chromatographie sur colonne. Néanmoins, les billes magnétiques présentent un faible rendement de purification par rapport à la colonne de chromatographie : avec 100  $\mu$ L de billes, nous avons récupéré environ 50  $\mu$ g d'anticorps purifié, alors qu'avec la colonne de sépharose-protéine G de 500  $\mu$ L, nous avons obtenu environ 1 mg d' $\alpha$ -CP50 purifié. Par conséquent, nous avons choisi d'utiliser la technique de chromatographie d'affinité pour la purification des  $\alpha$ -CP50.

La solution d'anticorps purifié a été ensuite aliquotée en fractions de 5  $\mu$ L et stockée à -20°C

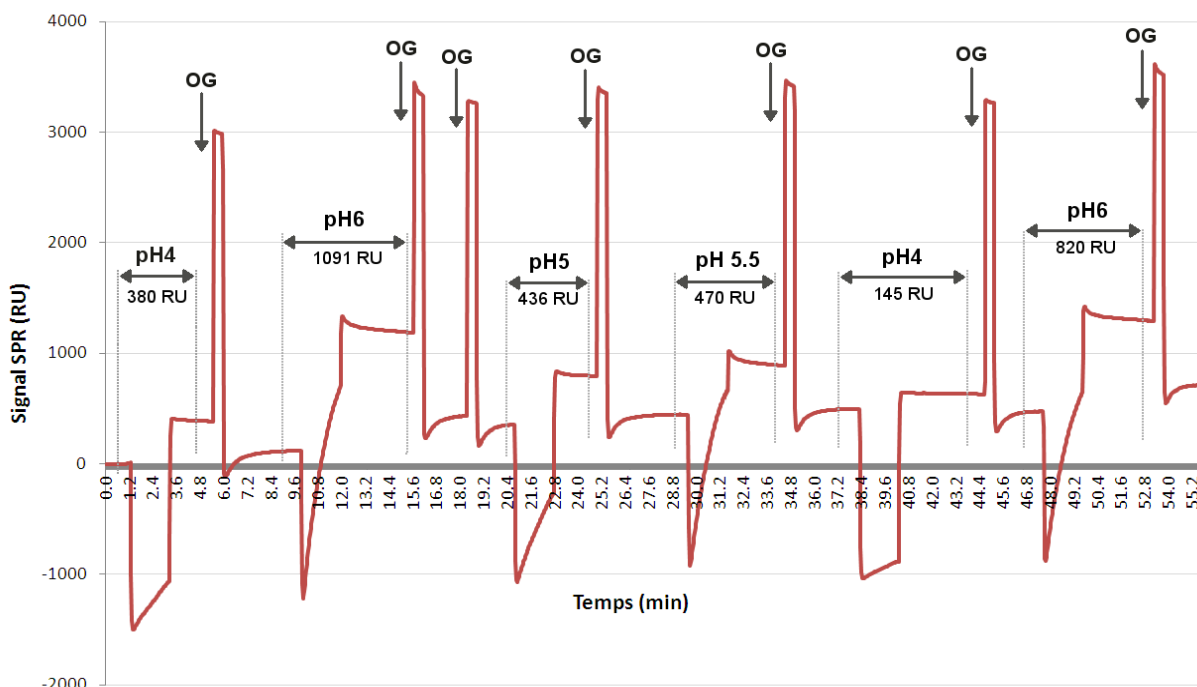
et l'anticorps purifié a été testé pour déterminer son meilleur pH d'immobilisation sur puce.

### 2.1.2. Optimisation des conditions de greffage des ligands

Les biorécepteurs spécifiques des calibrants ainsi que les autres biorécepteurs utilisés dans ce projet ont été soumis à des tests de préconcentration afin de déterminer leur meilleur pH d'immobilisation à la surface de la biopuce fonctionnalisée par une monocouche de thiols (10% 16-MHA et 90% 11-MUOH). Il faut noter que tous les biorécepteurs utilisés dans ce projet sont des anticorps, type IgG, à l'exception de l'annex-V, qui est un ligand qui se lie spécifiquement à la phosphatidylserine en présence d'ions calcium dans le milieu.

La Fig. 45 montre un sensorgramme typique obtenu sur une piste d'un système BIA3000 enregistré lors des injections successives d'un anticorps  $\alpha$ -CD61 à différents pH.

Chaque injection est réalisée à une concentration de 10  $\mu$ g/mL, pendant 2 min, suivie d'une injection de détergent Octyl- $\beta$ -D-Glucopyranoside (OG) à 40 mM, pendant 30 secondes, pour éliminer les anticorps adsorbés à la surface. Nous remarquons qu'à partir de la 2<sup>ème</sup> injection, l'OG ne permet pas d'enlever tous les anticorps adsorbés ce qui peut engendrer des perturbations au cours des injections suivantes. Les injections sont alors répétées sur une autre piste dans un ordre de pH différent. Les résultats montrent que le pH 6 est celui qui permet la meilleure interaction entre l'anticorps et la surface. Les pH optimaux d'immobilisation des anticorps utilisés dans cette partie sont les suivants : pH 4,5 pour  $\alpha$ -VLPs, pH 6 pour  $\alpha$ -LAG-3 et pH 4 pour  $\alpha$ -CD41.



**Fig. 45 :** Sensorgramme montrant des injections successives de l'anticorps  $\alpha$ -CD61 dilué dans un tampon acétate à différents pH. Chaque injection a été réalisée, pendant 2 min, à une concentration de 10  $\mu$ g/mL en anticorps et à un débit de 5  $\mu$ L/min. Les injections d'OG sont réalisées pendant 30 secondes chacune.

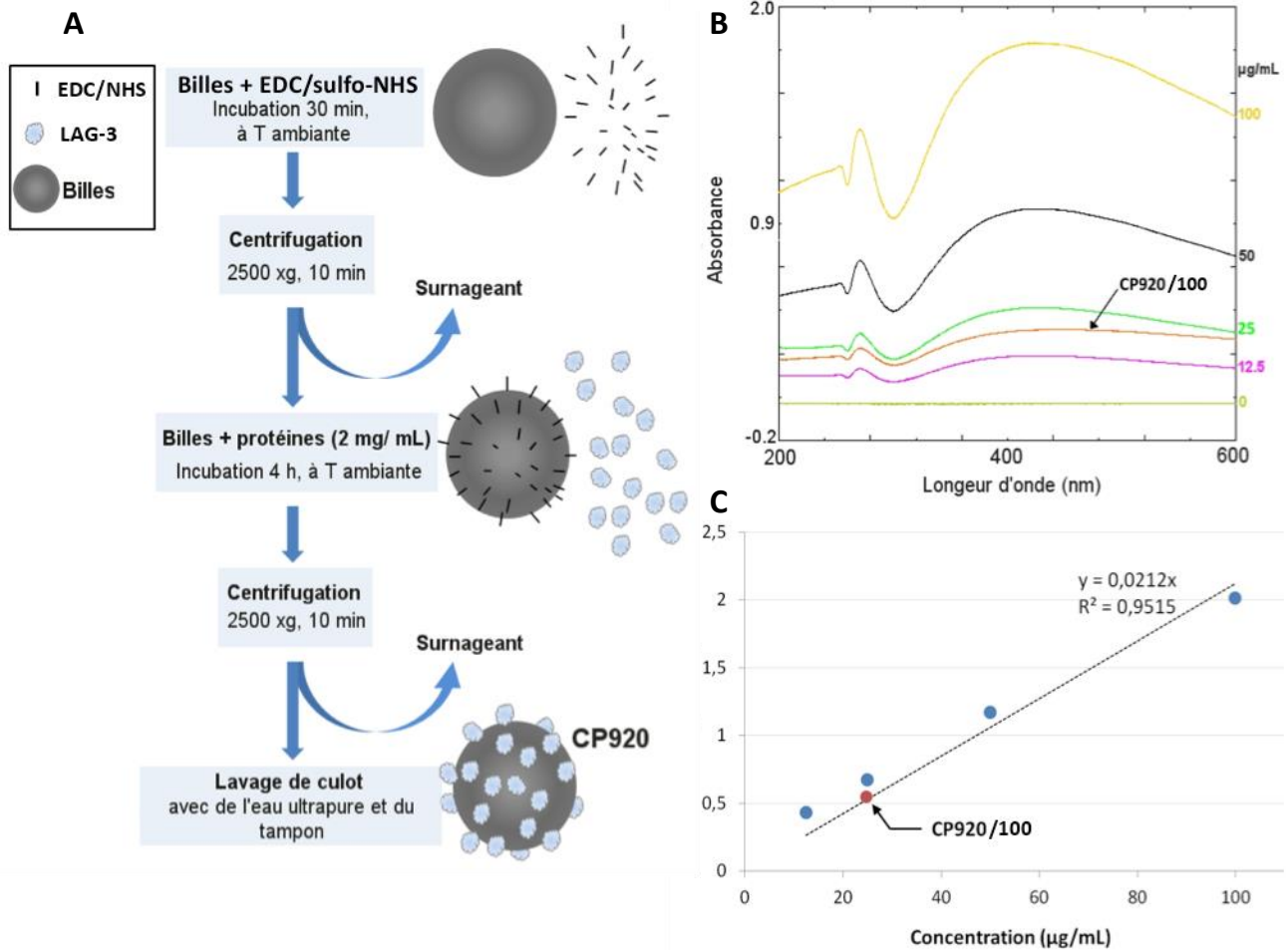
## 2.2. Biofonctionnalisation des billes par LAG-3

Le protocole de fonctionnalisation des billes est similaire à celui du greffage des anticorps à la surface d'une biopuce fonctionnalisée par la monocouche auto-assemblée constituée de 10% 16-MHA et 90% 11-MUOH, car il repose sur une liaison entre le groupement carboxyle activé, présent à la surface de la bille, et les groupements amine primaire  $\text{NH}_2$ , portés par la protéine à greffer (Fig 46).

Ainsi, l'activation des fonctions carboxyle est réalisée en incubant 10 mg de billes avec une solution d'EDC/Sulfo-NHS, à 40 et 100 mM respectivement, dans 500  $\mu\text{L}$  de PBS à pH 7,4. Suite à une incubation pendant 20 min à température ambiante sous agitation, la solution est centrifugée à 2500 g pour isoler les billes. Le culot est resuspendu dans de l'eau ultrapure afin d'éliminer l'excès de réactifs et la solution est centrifugée une deuxième fois à 2500 g. Le culot est ensuite resuspendu avec 500  $\mu\text{L}$  d'une solution de LAG-3 à 2 mg/mL dans du tampon Tris (pH 6). Le mélange est incubé pendant 4 heures à température ambiante sous agitation avec plateau rotatif. Ensuite, une centrifugation à 2500 g est appliquée pour séparer les billes des protéines restant en solution. Le surnageant est éliminé et le culot est resuspendu dans de l'eau avant une deuxième puis une troisième centrifugation à 2500 g, pour éliminer toutes les protéines libres ou uniquement adsorbées à la surface des billes. Cette dernière étape est répétée encore une fois avant que le culot ne soit resuspendu dans un tampon Tris (pH 7,4).

Les billes MF, présentant un maximum d'absorbance à 420 nm, sont quantifiées en mesurant leur spectre d'absorption, entre 300-600 nm, à l'aide d'un spectrophotomètre UV-Visible. Des solutions de billes CP920, ayant des concentrations connues (12,5 à 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de résine-mélatamine), ont été utilisées pour le tracé d'une droite d'étalonnage afin de déterminer la concentration des billes greffées (Fig. 46). De même, et dans le but de confirmer le greffage de LAG-3 à la surface des billes, nous avons dosé la concentration en protéines, par la méthode BCA, dans la solution de CP920, correspondant donc aux billes CP920 après biofonctionnalisation par le LAG-3. La figure 46 montre un dosage des billes suite au greffage de LAG-3 (MF920). La concentration des billes a été déterminée à 2,5 mg/mL de résine-mélatamine; or, comme les valeurs de la densité et de diamètre des billes sont connues, il nous a été possible de convertir cette concentration massique en nombre des billes (Voir annexe 3) ; par conséquent 2,5 mg/mL correspond à  $4,06 \times 10^9$  billes/mL. Le dosage des protéines nous a permis d'estimer un nombre d'environ 15000 molécules de LAG-3 par bille, soit un taux de recouvrement d'environ 50% en estimant la valeur maximale théoriquement possible de  $\approx 30\,000$  protéines LAG-3.

Les billes biofonctionnalisées par du LAG-3 (MF-LAG-3), ainsi appelées CP920, en référence à leur taille, sont stockées à  $+4^\circ\text{C}$  pour une période maximale de 2 mois.



**Fig. 46 :** (A) Protocole de fonctionnalisation des billes MF par les protéines LAG-3. (B) Détermination de la concentration de CP920 par mesure de leur absorbance à 420 nm et (C) droite d'étalonnage reliant la DO 420nm à la concentration en billes.

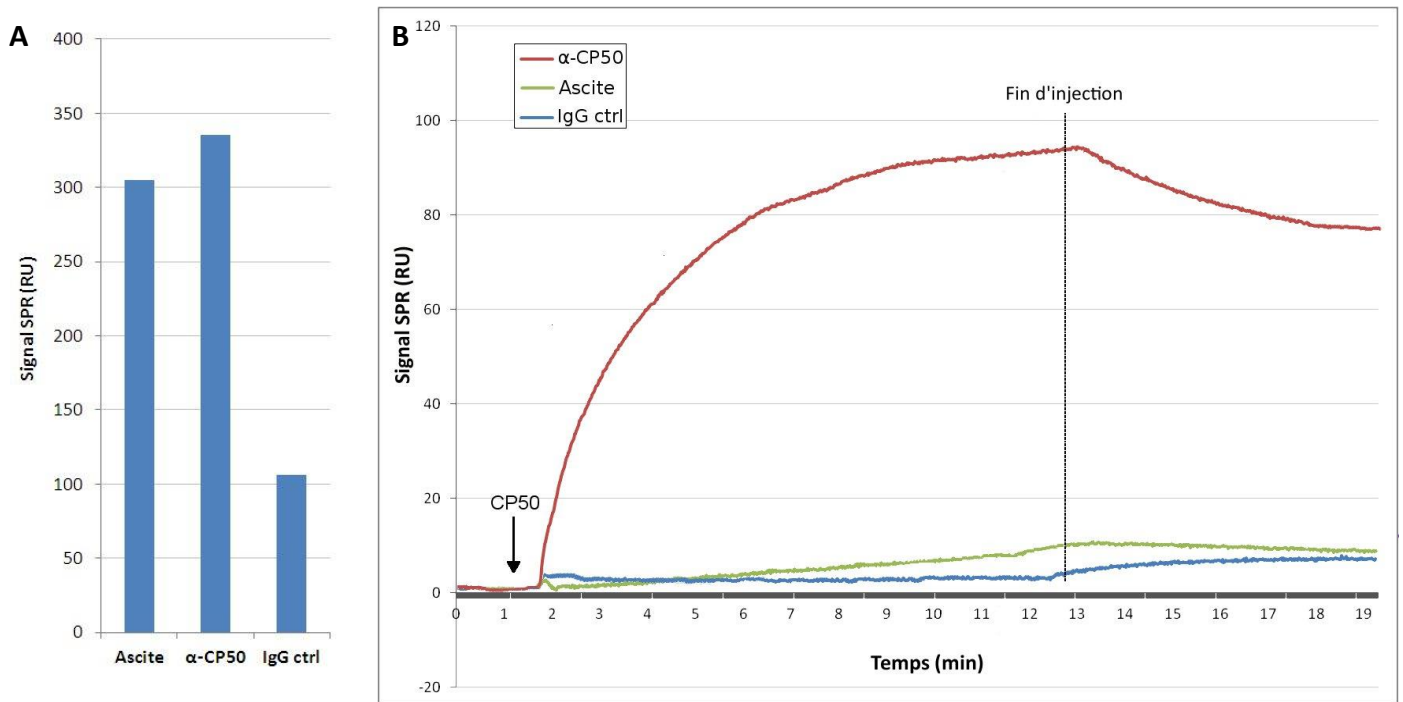
## 2.3. Test de capture des calibrants par leurs anticorps spécifiques

### 2.3.1. Capture des CP50

Des tests d'immuno-capture sur puce des CP50 avec les anticorps  $\alpha$ -CP50 ont été réalisés sur l'appareil BIA3000.

Tout d'abord, nous voulions savoir si la purification de l'anticorps à partir de l'ascite permet un meilleur rendement de greffage, et par conséquent un meilleur taux de capture des CP50. Pour cela, nous avons injecté la solution d'ascite, contenant l' $\alpha$ -CP50, sur la piste 1 (FC1), l'anticorps  $\alpha$ -CP50 purifié par chromatographie sur FC2 et une IgG contrôle ( $\alpha$ -OVA) sur FC3 (Fig. 47-A).

Suite au greffage des différents composants, la surface de la puce a été bloquée et désactivée par injection de RSA et d'éthanolamine respectivement (*voir partie « Préparation de la puce »*). Ensuite, une solution de CP50 à 1 µg/mL, dans du PBS 1x (tampon de course), a été injectée simultanément sur les 3 pistes avec un débit de 20 µL/min, pendant 10 min. L'évolution du signal SPR (RU) en fonction du temps a été enregistrée (Fig. 47-B). Le sensorgramme montre une cinétique d'interaction biomoléculaire sur la piste présentant  $\alpha$ -CP50 purifié avec un niveau



**Fig. 47** : Capture spécifique des CP50 par l'anticorps purifié sur puce bloquée et désactivée: (A) Taux de greffage de l'ascite, de l' $\alpha$ -CP50 purifié et de l'IgG contrôle ( $\alpha$ -OVA) sur les différentes pistes. (B) Sensorgramme montrant la réponse de la puce à l'injection simultanée de CP50 (1  $\mu$ g/mL). Injection de 10 min à 20  $\mu$ L/min.

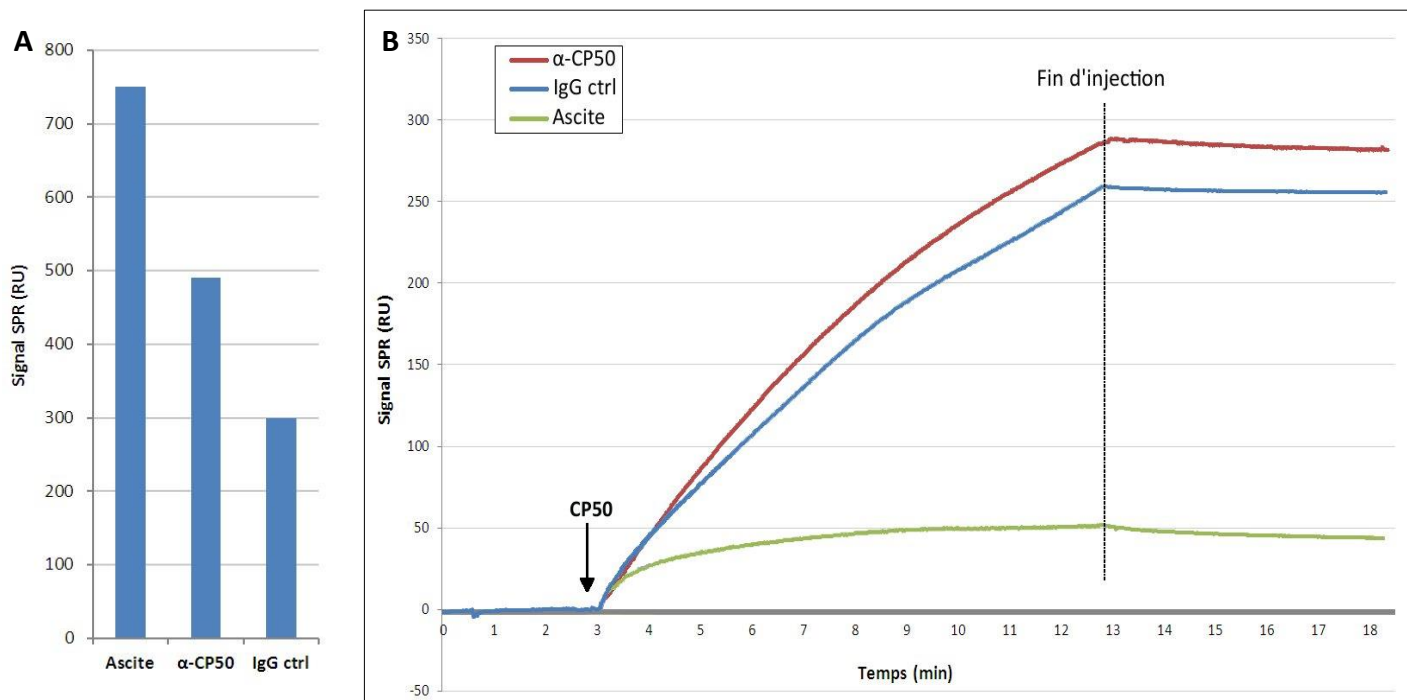
de capture estimé à  $\sim$ 77 RU alors que la réponse sur la piste ayant vu l'ascite est faible est équivalente au contrôle (11 RU et 7 RU respectivement). Le faible taux de capture des CP50 sur la piste « ascite » peut être expliqué par le fait que l'ascite contient, en plus de l' $\alpha$ -CP50, une grande variété de protéines, avec des concentrations élevées, qui peuvent entrer en compétition avec l'anticorps d'intérêt lors du greffage à la surface.

Ces données montrent qu'il est indispensable de purifier l' $\alpha$ -CP50 à partir de l'ascite afin de pouvoir le greffer de manière efficace à la surface de la puce, et que l'interaction entre cet anticorps et les CP50 est spécifique, ouvrant la voie vers l'utilisation de ce modèle comme un calibrant biomimétique.

#### a) Effet de la passivation et du blocage de la surface

Dans le but de vérifier l'effet de l'étape du blocage de la surface par la RSA suite au greffage des anticorps à la surface, nous avons reproduit la même expérience que précédemment, en greffant l'ascite, l' $\alpha$ -CP50 purifié et une IgG contrôle ( $\alpha$ -OVA), chacun sur une piste de la puce (Fig.48-A). Cette fois, le greffage des anticorps n'a pas été suivi de l'étape de blocage de la surface.

Une injection de CP50 (1  $\mu$ g/mL) sur les 3 pistes simultanément a été réalisée. La figure. 48-B montre le sensorgramme enregistré sur les différentes pistes. Un taux de capture élevé ( $\approx$  280 RU) a été enregistré sur la piste de  $\alpha$ -CP50 par rapport à l'expérience précédente (77 RU sur surface passivée). De même un taux de capture de 255 RU et de 43 RU a été enregistré sur la



**Fig. 48** : Capture des CP50 sur puce désactivée et non-bloquée: (A) Taux de greffage de l'ascite, de l' $\alpha$ -CP50 et de l'IgG contrôle ( $\alpha$ -OVA) sur les différentes pistes. (B) Sensorgramme montrant la réponse de la puce à l'injection simultanée de CP50 (1  $\mu$ g/mL). Injection de 10 min à 20  $\mu$ L/min.

piste contrôle et de l'ascite respectivement. Ces taux de capture sont très élevés par rapport à l'expérience précédente, surtout sur le contrôle, et reflète l'importance des interactions non-spécifiques établies entre les CP50 et la surface non-passivée. Ainsi, la cinétique d'interaction, extraite à partir de la pente initiale des courbes, est différente de celle de la courbe de la Fig. 47, et correspond à une cinétique d'interaction englobant à la fois des interactions spécifiques et non-spécifiques.

Le faible taux de capture sur la piste de l'ascite ( $\approx 40$  RU) peut être expliqué par le fait que l'ascite contient de nombreuses protéines contaminantes qui peuvent se fixer à la surface, en bloquant les espaces vides entre les anticorps greffés, ce qui aboutit à la passivation de la surface d'une manière similaire à celle obtenue par les molécules RSA.

Ces résultats montrent l'importance de l'étape de blocage de la surface pour éviter les interactions non-spécifiques entre les analytes (CP50 dans ce cas) et la surface. Par conséquent, toutes les expériences dans ce projet ont été réalisées en bloquant et passivant la surface de la biopuce d'or par la RSA et l'éthanolamine, suite au greffage des ligands.

### **b) Lavage au détergent et régénération de la surface**

Dans le but de déterminer la contribution des interactions non-spécifiques dans le signal de capture des CP50 par leurs anticorps, des injections systématiques d'un détergent, l'Octyl- $\beta$ -D-Glucopyranoside « OG » à 40 mM ont été introduites dans le protocole. Ce détergent a pour effet

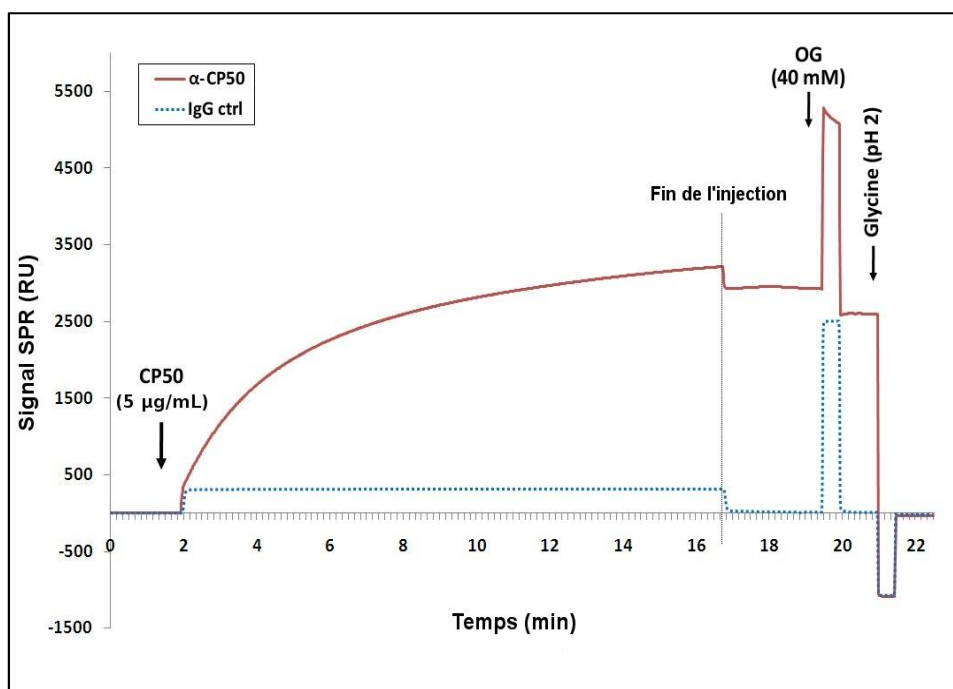


d'éliminer les molécules/CP50 qui se seraient simplement adsorbées à la surface de la puce de manière non-spécifique.

L'injection d'OG, pendant 30 secondes, suite à la capture des CP50 par  $\alpha$ -CP50 a provoqué une baisse du signal SPR (Fig. 49). Les différentes expériences ont montré que l'OG provoque une baisse qui peut aller de 1% à 10% du signal de capture original, suivant le taux de capture : ainsi, généralement plus le taux de capture est important, plus la baisse du signal suite à l'injection d'OG est importante.

D'autre part, l'injection d'une solution de glycine, à pH2, a pour effet de régénérer la surface de la puce en dissociant les interactions spécifiques  $\alpha$ -CP50/CP50 avec une efficacité qui peut atteindre 100% (Fig. 49). Cette réponse permet de prouver la nature de l'interaction mais aussi permet d'envisager la réutilisation de la surface (régénération) sans oublier néanmoins l'effet potentiellement dénaturant de la solution acide de glycine vis-à-vis des anticorps et une baisse de performances de l'immuno-puce.

**Fig. 49 :** Sensorgramme montrant l'effet de l'injection d'un détergent, OG, suite à la capture des CP50 (à 5  $\mu$ g/mL, pendant 15 min) sur une piste présentant l'anticorps spécifique ( $\alpha$ -CP50) purifié et une autre piste présentant une IgG contrôle ( $\alpha$ -OVA). L'injection de l'OG a été suivie par une régénération de la surface avec une injection de glycine (pH 2). Les deux injections ont été réalisées pendant 30 secondes à 100  $\mu$ L/min.



### c) Relation entre le taux de capture à la surface et la concentration des CP50 en solution

Pour établir une relation entre le taux de capture des CP50 à la surface et leur concentration en solution, les CP50 ont été injectées à différentes concentrations sur la surface de la puce présentant l' $\alpha$ -CP50 purifié.

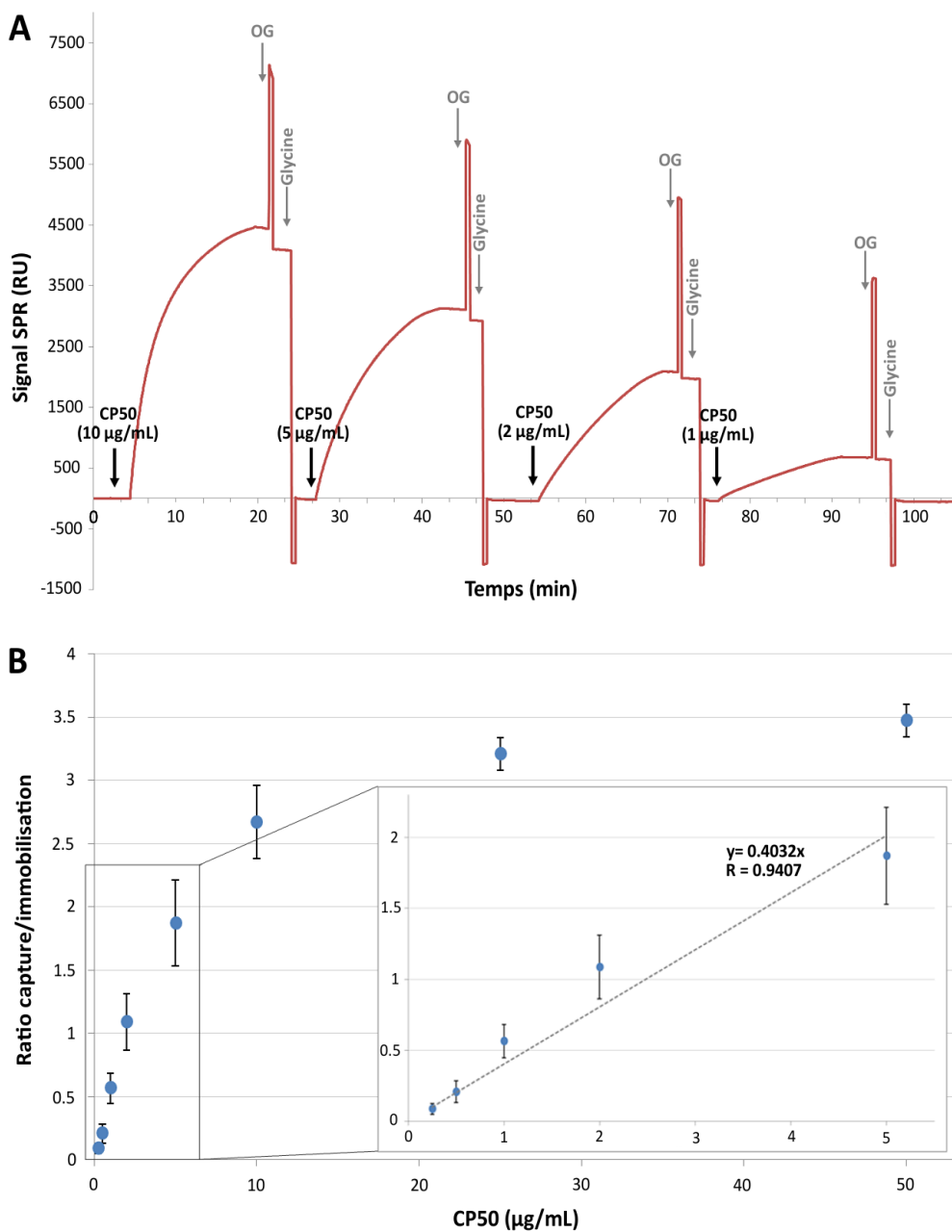
La Fig. 50-A montre des injections successives de CP50, pendant 15 min chacune, à différentes concentrations sur une piste présentant l'anticorps  $\alpha$ -CP50. Chaque injection de CP50 a été suivie d'une injection d'OG et de glycine. Cette dernière sert à régénérer la surface de  $\alpha$ -

CP50 pour que plusieurs injections à différentes concentrations soient testées.

Ensuite, une courbe de calibration, reliant le taux de capture des CP50 à la surface de la puce, extrait du signal SPR et représenté sous forme d'un *ratio Capture/Immobilisation\**, avec la concentration de CP50 en solution, pour une durée d'injection de 15 minutes a été tracée.

*\*Ratio capture/immobilisation : ce ratio est utilisé pour normaliser le taux de capture d'un analyte, ici pour les CP50, en divisant ce dernier par le taux d'immobilisation de son anticorps spécifique à la surface, qui est, comme noté précédemment, d'environ 2500 pg/mm<sup>2</sup> que ce soit en BIA3000 ou en SPRi-Plex II.*

La courbe de calibration montre une relation linéaire ( $R^2=0,94$ ) entre ces 2 paramètres pour une gamme dynamique de concentration de CP50 allant de 0,25 à 5 µg/mL (Fig. 50-B). Au-delà de cette gamme, la courbe atteint un plateau. A 0,25 µg/mL, la plus basse concentration de CP50



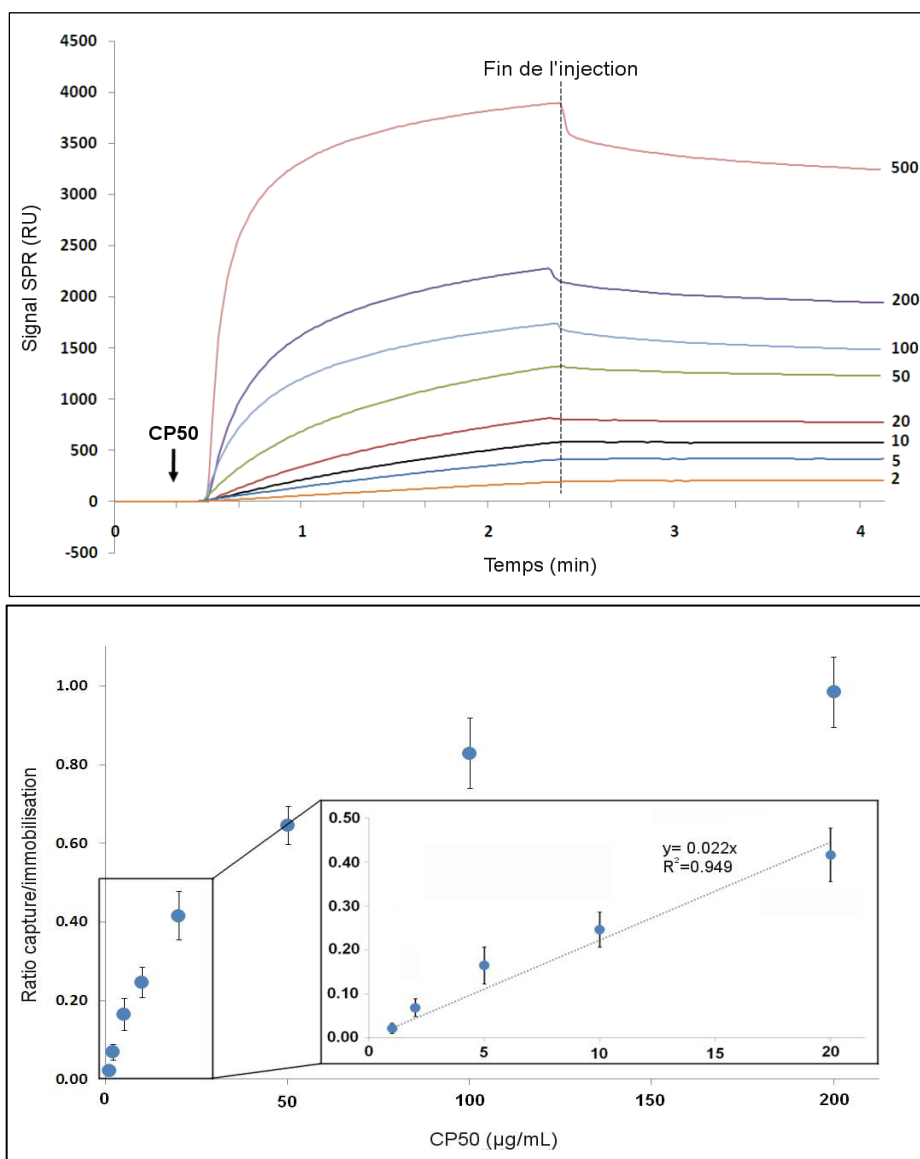
**Fig. 50 :** Gamme dynamique de biodétection de CP50 sur  $\alpha$ -CP50 purifié par injection de 15 minutes : (A) Sensorgramme montrant des injections successives de CP50 à différentes concentrations sur une piste de l'appareil BIA3000 présentant l' $\alpha$ -CP50. Chaque injection est réalisée pendant 15 min, à un débit de 10 µL/min. Chaque injection de CP50 a été suivie d'une injection du détergent OG et d'une régénération de la surface par de la glycine à pH2. Ces deux injections ont été faites pendant 30 secondes à un débit de 100 µL/min. (B) Courbe de calibration montrant l'évolution du taux de capture de CP50 (Ratio capture/immobilisation) en fonction de la concentration de CP50 injectée. Chaque condition a été répétée au moins 3 fois. Les barres d'erreurs montrent la déviation standard (SD).

dans la gamme étudiée, le signal SPR de  $\approx 150$  RU est environ 7 fois supérieur à la limite de détection de l'appareil BIA3000 qui est considérée comme 3 fois le bruit de fond ( $LOD=3*7=21$  RU).

Connaissant les différents paramètres physicochimiques des CP50, tels que leur densité de flottaison ( $\approx 1,31 \text{ g/cm}^3$  <sup>328,329</sup>) et leur taille moyenne ( $\approx 55$  nm de diamètre, mesuré par AFM et présenté dans une prochaine partie), il est possible de déterminer la masse moyenne d'une particule virale, qui est d'environ  $1 \times 10^{-10} \mu\text{g}$  (voir annexe 4), et alors de convertir la concentration massique des CP50 en nombres de particules/mL. Ainsi, la courbe de calibration précédente montre une relation linéaire pour une concentration de  $2,5 \times 10^9 - 5 \times 10^{10}$  CP50/mL (eq. 0,25 – 5  $\mu\text{g/mL}$ ).

Par la suite, nous précisons toujours la concentration massique protéique ainsi que son équivalence en concentration particulaire.

Une deuxième courbe de calibration a aussi été établie pour un temps d'injection de 2 minutes (Fig. 51). Une relation linéaire ( $R^2=0,949$ ) reliant le taux de capture à la concentration de



**Fig. 51 :** Gamme dynamique de biodétection de CP50 sur  $\alpha$ -CP50 purifié injection de 2 minutes : (A) Superposition de différentes courbes de capture de CP50 suite à une injection à différentes concentrations de CP50 (de 2 à 500  $\mu\text{g/mL}$ ) pendant 2 minutes. (B) Courbe de calibration montrant le taux de capture de CP50 (Ratio capture/immobilisation) en fonction de la concentration de CP50 injectée, pour un temps d'injection de 2 min. Chaque condition a été répétée au moins 3 fois. Les barres d'erreurs indiquent la déviation standard (SD).

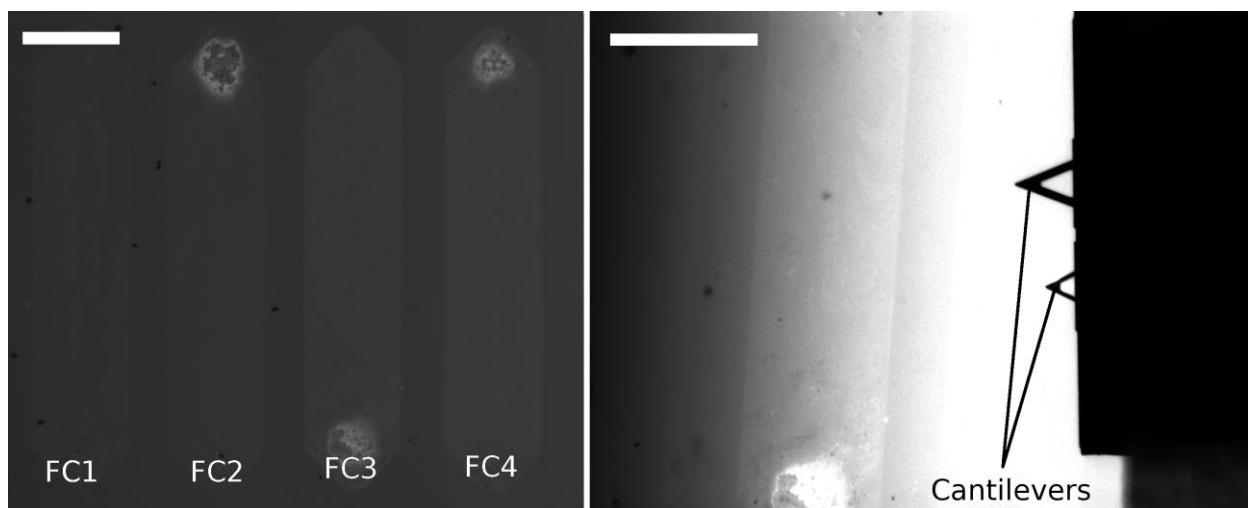
CP50 injectées est obtenue pour une gamme de concentration entre de  $1 \times 10^{10}$  –  $2 \times 10^{11}$  CP50/mL (1 – 20  $\mu\text{g/mL}$ ). Similairement à la courbe de calibration précédente, cette courbe tend à atteindre un plateau au-delà de 20  $\mu\text{g/mL}$ , alors que la limite inférieure de la gamme, 1  $\mu\text{g/mL}$ , donne un taux de capture significatif car 3 fois supérieur à la LOD de l'appareil.

Ces résultats montrent que le taux de capture des CP50 est directement proportionnel à leur concentration dans la solution injectée avec une gamme dynamique de concentration donnée. Cette gamme dynamique est reliée au temps d'injection : plus le temps d'injection est long, plus la gamme dynamique se déplace vers les basses concentrations, ce qui rend la capture des CP50 sensible et adaptable par notre plateforme NBA.

#### d) Analyse métrologique des CP50 capturées à la surface de la puce

Dans le but de mesurer la taille des CP50 capturées via les  $\alpha$ -CP50 à la surface de la puce, les vésicules ont été fixées par une injection de glutaraldéhyde à 0,5%, pendant 10 min.

Sous microscope optique, nous pouvons identifier les 4 pistes ce qui simplifie l'analyse AFM sans nécessité de l'utilisation d'un masque (Fig. 52) comme dans le cas de la puce SPRI-Plex II.

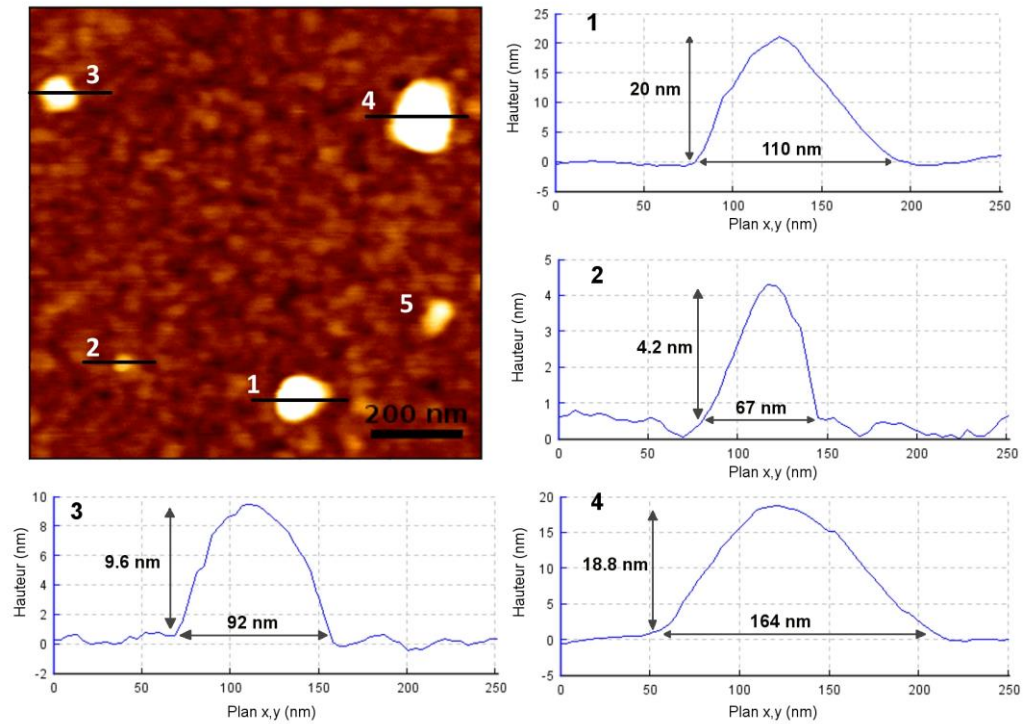


**Fig. 52 :** (A) Image sous microscope de la biopuce et de ses 4 pistes suite à la capture des CP50 en BIA3000. Les 4 pistes ayant vu 190, 890, 1800 et 3160 RU pour FC1, FC2, FC3 et FC4 respectivement. (B) Cantilevers positionnés au dessus de la piste à analyser. Barres d'échelle= 500  $\mu\text{m}$ .

Les pistes sont analysées par AFM, en eau ultrapure, à différents endroits, et les images AFM sont traitées par Gwyddion afin de mesurer les différents paramètres (hauteur, diamètre...) des CP50 capturées à la surface.

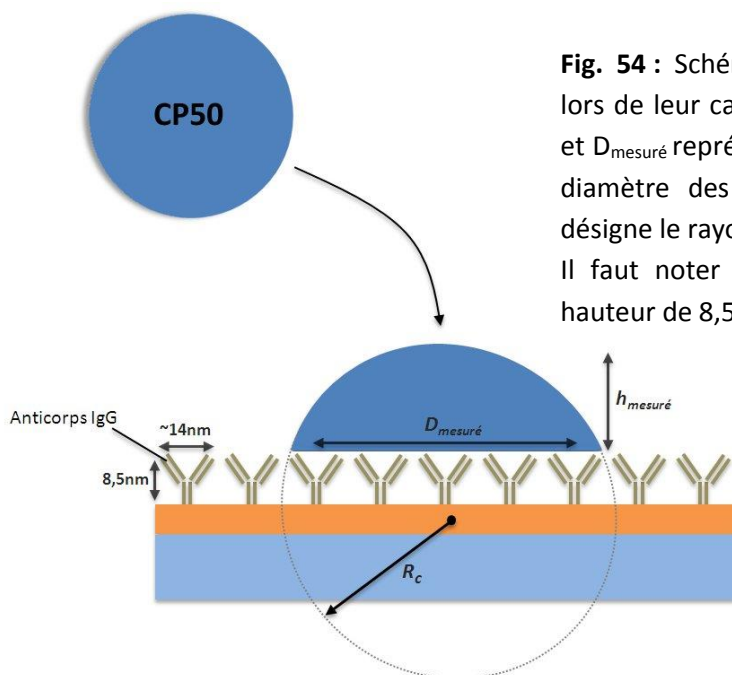
Les CP50 présentent une forme discoïde (lentille), avec un diamètre mesuré qui est, en moyenne, 15 fois plus grand que leur hauteur (Fig. 53). Ceci est dû à la déformabilité des vésicules qui sont souples et qui, en interagissant avec la surface, s'applatissent. Ceci a pu être observé pour des particules virales<sup>330,331</sup> adsorbés sur une surface de mica.

**Fig. 53 :** Analyse AFM des CP50 capturées à la surface de la biopuce: image AFM, en hauteur, montrant 5 CP50 sur la surface ; l'échelle en z est de 10 nm. Les profils de 4 particules sont présentés.



Dans notre cas, le substrat rugueux doit avoir une influence majeure sur la déformation des particules probablement amplifiée par la capture spécifique et l'établissement de multiples interactions entre chaque CP50 et les anticorps (environ 75 anticorps théoriquement impliqués dans la capture de la particule).

En considérant que les CP50 ont une forme sphérique à l'état physiologique, leur volume apparent a été calculé par le biais de la hauteur et du diamètre mesuré de chaque particule, par AFM, et en utilisant la formule suivante :  $V_{lens} = \pi h^2 (3R_c - h)/3$ , avec  $h$  la hauteur mesurée et  $R_c$  le rayon de courbure obtenu par la formule suivante :  $R_c = (h^2 + D^2/4)/2h$ .  $D$  est le diamètre mesuré

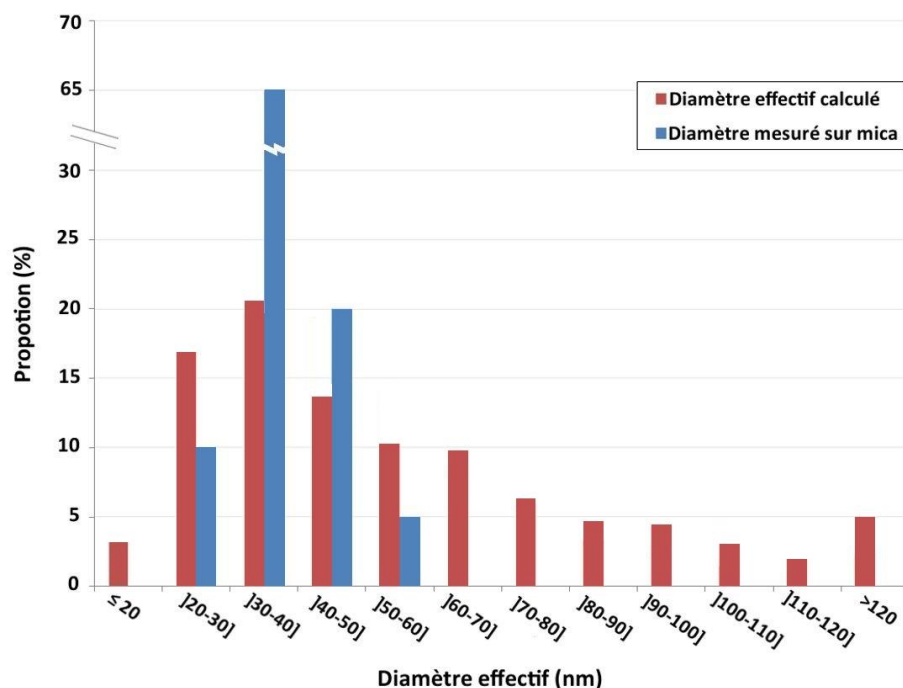


**Fig. 54 :** Schéma illustrant la déformation des CP50 lors de leur capture à la surface de la puce. Le  $h_{mesuré}$  et  $D_{mesuré}$  représentent respectivement la hauteur et le diamètre des particules mesurés par AFM. Le  $R_c$  désigne le rayon de courbure. Il faut noter que les anticorps IgG possèdent une hauteur de 8,5 nm avec une largeur d'environ 14 nm.

du disque. Par la suite, le diamètre effectif peut être obtenu par la formule suivante :  $d_{\text{eff}} = \sqrt[3]{\frac{6V}{\pi}}$  (Fig. 54).

En appliquant ce calcul, nous avons ainsi mesuré le diamètre effectif moyen de 1630 particules capturées sur différentes zones de la surface. Nous en avons déduit que les CP50 présentent un diamètre effectif compris entre 20 et 120 nm (Fig. 55). Le diamètre effectif moyen des CP50 est de  $55 \pm 32$  nm. Ces résultats sur biopuce d'or sont similaires à ceux obtenus sur le même type de particules virales simplement adsorbées sur une surface de mica. Dans cette analyse, les particules présentaient une forme sphérique et le diamètre a été directement mesuré par AFM ; ce dernier est compris entre 20 et 60 nm, avec un maximum à 35 nm<sup>328</sup>. Il faut noter que cette analyse a été faite sur quelques dizaines de VLP alors que nos résultats sur biopuce d'or ont été obtenus suite à la mesure de plusieurs milliers de particules, ce qui explique la plus large gamme de taille obtenue par rapport à l'analyse sur mica. Ainsi, d'autres études ont montré une distribution en taille pour ce type de particules virales très similaire à celle que nous avons obtenue en utilisant la technique AFM et même la microscopie électronique<sup>332,333</sup>.

**Fig. 55 :** Distribution en taille des CP50 mesurées par AFM. Le diamètre effectif calculé à partir de la hauteur et le diamètre mesurés des particules capturées à la surface (rouge), ainsi que le diamètre mesuré pour les CP50 adsorbées sur une surface de mica (bleu).



Ces résultats confirment l'efficacité du calcul appliqué pour remonter au diamètre effectif des vésicules biologiques suite à leur capture sur puce et leur éventuelle déformation.

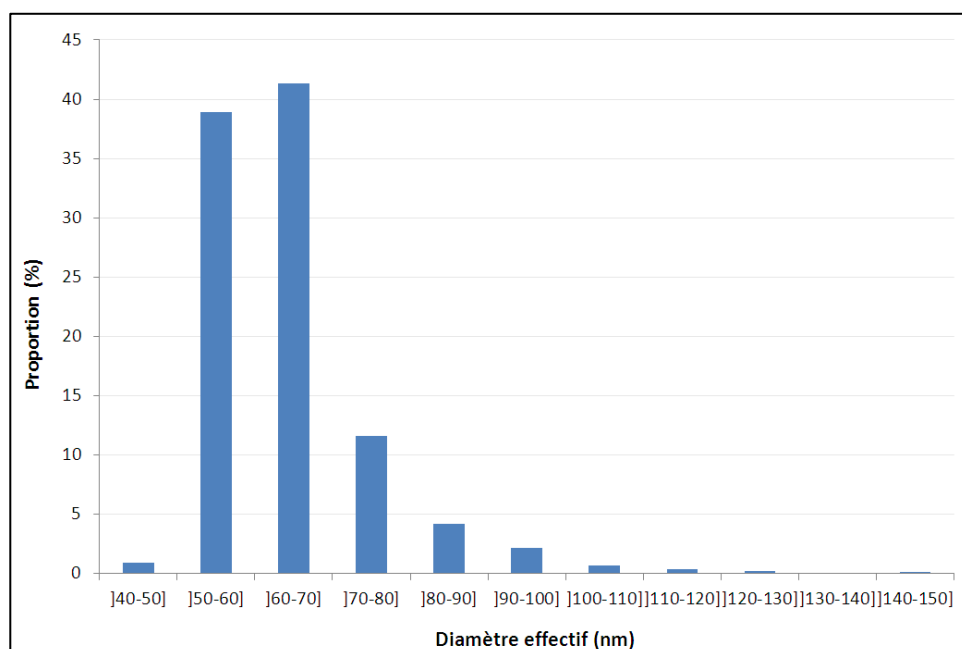
D'autre part, le diamètre effectif a été recalculé après séchage de la puce et un scan, en air, des CP50 capturées. Le scan en air a fourni des images plus résolues avec un contour des particules bien défini par rapport à celui réalisé en eau ultrapure. Les résultats montrent une distribution en taille similaire à celle obtenue lors de l'analyse en liquide (Annexe 5) suggérant que le séchage de la puce n'a pas un effet notable sur la morphologie des CP50, contrairement à d'autres études qui ont montré que le séchage et le scan en air des particules virales et même

des lipoprotéines affecte la structure de ces particules<sup>334,335</sup>. La conservation de structure de nos CP50 est attribuée à la fixation des particules par le glutaraldéhyde.

Afin de démontrer que notre approche sur puce n'induit pas un biais, le diamètre des particules virales (CP50) a aussi été mesuré en solution par la méthode de TRPS (qNano). L'analyse a été faite en utilisant un NP 100 et la mesure est arrêtée suite au passage de 300 particules à travers le pore à cause de problèmes de colmatage qui ont compliqué l'analyse.

Les résultats montrent une distribution en taille des CP50 entre 40-150 nm avec un pic entre 50-70 nm (Fig. 56). A noter qu'un NP100 possède une gamme théorique de détection de 40 à 320 nm, ce qui explique l'absence des vésicules <40 nm qui ont été détectées en AFM. Il est recommandé d'utiliser deux techniques pour fiabiliser les données nanométriques sur particules, les résultats obtenus sont cohérents avec les résultats AFM et tendent donc à montrer qu'à partir de notre surface de biopuce nous sommes capables de remonter à la distribution en taille des particules biologiques de l'échantillon.

**Fig. 56 :** Distribution en taille de CP50 mesurée par qNano (TRPS). Un NP100 a été utilisé. La mesure est réalisée sur 300 CP50.



### 2.3.2. Capture des CP920

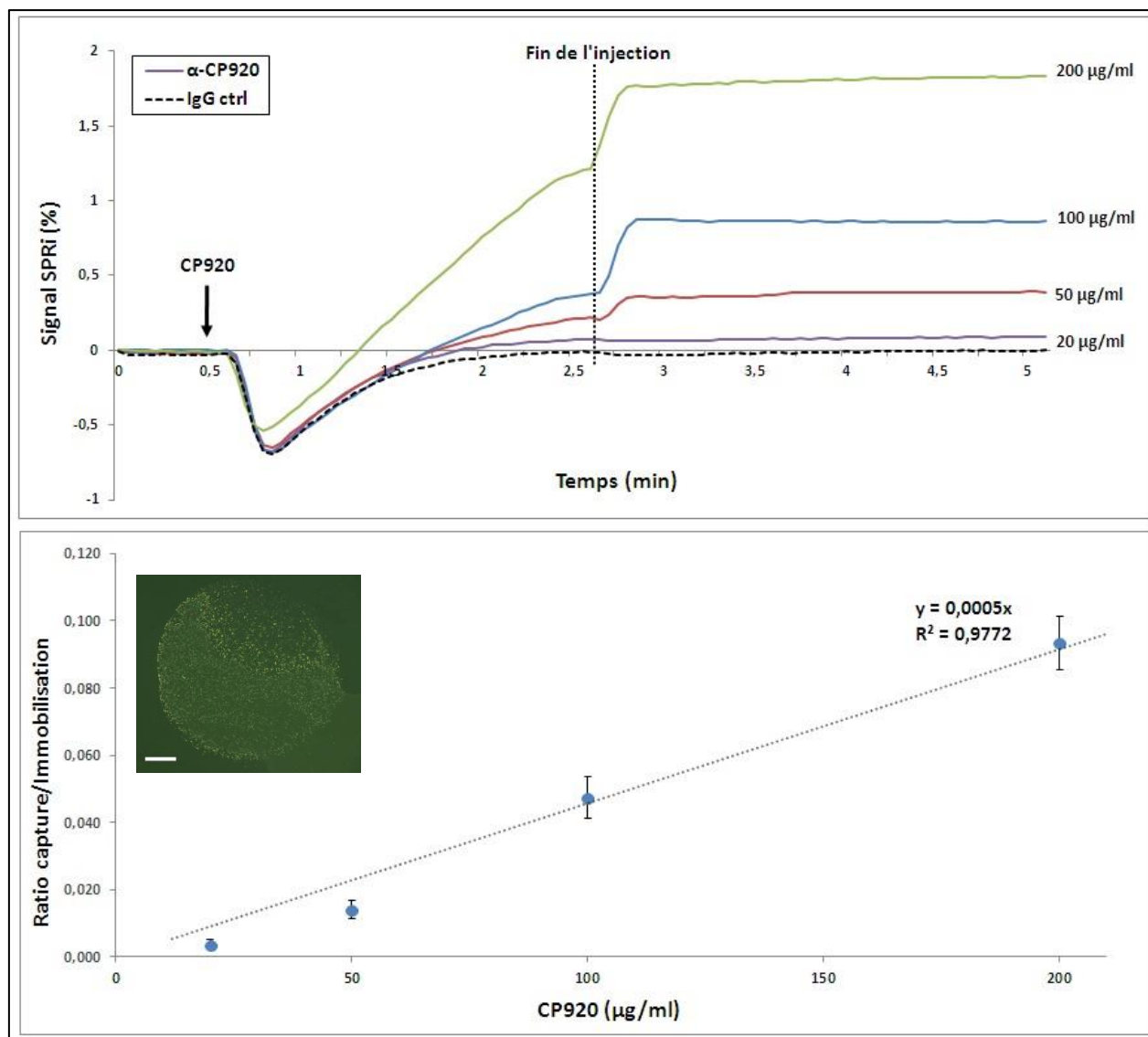
Dans le but de montrer la performance de la plateforme NBA vis à vis de plus gros objets de l'ordre du micromètre, des tests de capture des CP920 par leur anticorps spécifique  $\alpha$ -CP920 ont été réalisés en SPRi-Plex II. En effet, cet appareil possède une microfluidique de plus grande dimension plus adaptée à l'injection d'objets de l'ordre du micron.

Les CP920 ont été injectées à différentes concentrations, pendant 2 minutes, à la surface d'une puce présentant des spots de  $\alpha$ -CP920 et des spots d'IgG contrôles.

La fig. 57 montre une superposition de différentes courbes enregistrées suite à l'injection de CP920 à des concentrations de 20 à 200  $\mu\text{g/mL}$  (équ.  $3,25 \times 10^7$  –  $3,25 \times 10^8$  CP920/mL), ainsi que

la réponse moyenne sur un spot contrôle (spot  $\alpha$ -OVA) suite à l'injection de CP920 à 20  $\mu\text{g/mL}$ . La courbe de calibration (Fig. 57) montre une relation linéaire ( $R^2=0,977$ ) entre le taux de capture (ratio capture/immobilisation) et la concentration injectée de CP920. L'injection des CP920 à  $3,25 \times 10^7$  CP920/mL, concentration de CP920 la plus faible détectable, génère un taux de capture moyen d'environ 0,1% ce qui est significativement supérieur à la LOD de l'appareil SPRi qui est d'environ 0,06 % (3 x bruit de fond).

Il faut noter que, vu la taille micrométrique des CP920, la zone sensible au changement d'indice, ou champ évanescent, qui est d'environ 180-200 nm au-delà de la surface, ne peut



**Fig. 57** : Capture des CP920 par  $\alpha$ -CP920 (A) SPRi sensorgramme montrant une superposition des injections de CP920 à différentes concentrations (20-200  $\mu\text{g/mL}$ ). Chaque injection est réalisée pendant 2 min, à un débit de 20  $\mu\text{L/min}$ . (B) Courbe de calibration montrant l'évolution du taux de capture de CP920 (ratio capture/immobilisation) en fonction de la concentration de CP920 injectée. Chaque condition a été répétée au moins 4 fois. Les barres d'erreur indiquent la déviation standard (SD). L'encart correspond à une image par microscope optique d'un spot  $\alpha$ -CP920 suite à la capture des CP920 à 100  $\mu\text{g/mL}$ . La barre d'échelle correspond à 200  $\mu\text{m}$ .



détecter qu'une partie des billes. Le signal SPR alors obtenu ne correspond qu'à une partie d'environ 1/5 du volume des billes capturées.

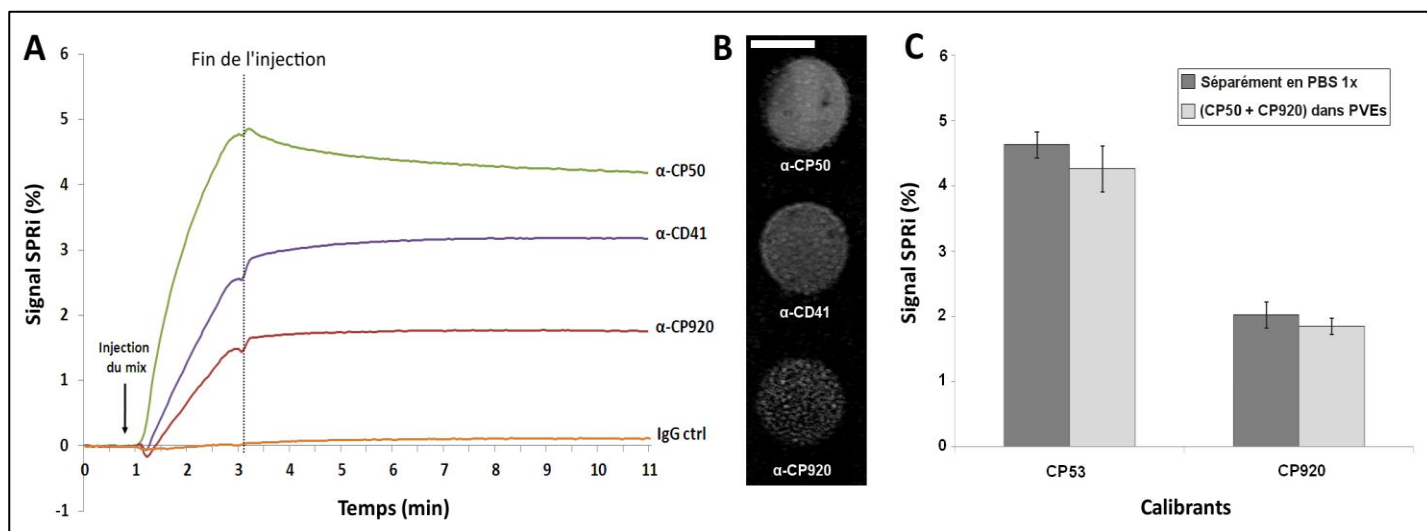
## 2.4. Validation de la capture de calibrants dans un milieu complexe

Les tests de capture précédents montrent une capture spécifique des deux calibrants, CP50 et CP920, par leur anticorps, et dépendante de la concentration des particules dans deux gammes dynamiques :  $10^9$  à  $10^{11}$  et  $10^7$  à  $10^8$  CP/mL respectivement. Ces essais ont préalablement été menés dans un milieu idéal (tampon) et il s'est agi ensuite de tester la capture des calibrants en milieu complexe pour vérifier que la spécificité de capture n'est pas affectée par la complexité du milieu, ceci dans le but de mimer les conditions naturelles des échantillons de VEs.

Pour cela nous avons effectué des tests de capture en injectant les deux calibrants CP50 à  $2 \times 10^{11}$  CP50/mL ( $20 \mu\text{g/mL}$ ) et CP920 à  $3,25 \times 10^8$  CP920/mL ( $200 \mu\text{g/mL}$ ) dilués dans un milieu contenant des VEs plaquettaires (PVEs) (à  $1,5 \times 10^8$  PVEs/mL selon la FC) et considéré comme milieu complexe car il contient des vésicules extracellulaires de différentes tailles ainsi que des protéines solubles potentiellement contaminantes.

La fig. 58 -A présente les résultats suite à l'injection de ce mix à la surface d'une puce présentant différents spots de  $\alpha$ -CP50,  $\alpha$ -CP920 et  $\alpha$ -CD41 (spécifiques des VEs plaquettaires).

Les taux de capture sur les différents types de spots sont ensuite comparés aux taux de capture des calibrants, dans du tampon PBS 1x, dilués à la même concentration (Fig. 58 - C).



**Fig. 58 :** Capture des calibrants dans un milieu complexe contenant des PVEs. (A) Sensorgramme montrant l'injection d'un mix de CP920 ( $3,25 \times 10^8$  CP920/mL), de CP50 ( $2 \times 10^{11}$  CP50/mL) et de PVEs ( $1,5 \times 10^8$  VEs/mL) à la surface d'une biopuce présentant les spots  $\alpha$ -CP50,  $\alpha$ -CP920 et  $\alpha$ -CD41. L'injection a été réalisée pendant 2 min. (B) Image SPRI de contraste de phase des spots suite à l'injection de mix. La barre d'échelle correspond à 1 mm. (C) Taux de capture moyen des calibrants injectés à  $3,25 \times 10^8$  CP920/mL et à  $2 \times 10^{11}$  CP50/mL dans du tampon PBS ou en milieu complexe contenant des PVEs. Au minimum, 3 injections pour chaque condition ont été réalisées.

Les résultats montrent que le taux de capture de chaque calibrant, sur les spots respectifs, sont similaires indépendamment de la complexité de milieu dans lequel ils sont dilués. D'autre part, aucun signal n'a été détecté sur les spots contrôles (IgG ctrl). Ces données confirment l'efficacité et la spécificité de la capture des calibrants à la surface de la puce même dans un milieu complexe.

Cette expérience a été répétée au minimum en triplicate, et aussi en changeant les concentrations des particules calibrants injectées. La capture s'est avérée efficace et spécifique car uniquement dépendante de la concentration des calibrants sans effet de la complexité du milieu.

## **2.5. Corrélation entre le signal SPR et la densité surfacique en particules capturées**

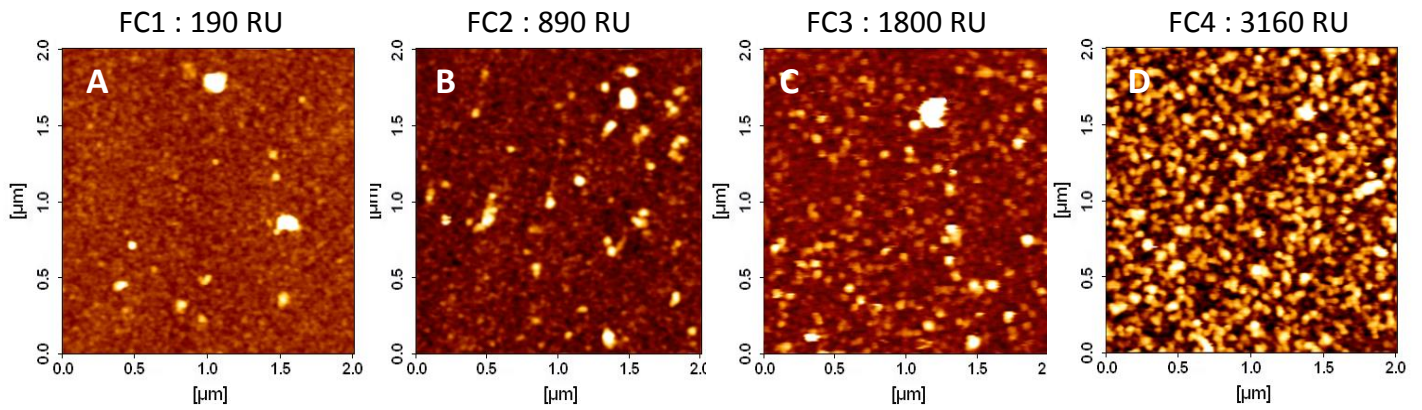
Les techniques de biodétection basées sur la résonance des plasmons de surface utilisées dans ce projet, BIA3000 et SPRi-Plex II, sont des techniques permettant le suivi de la capture des vésicules. Cependant le taux de capture est donné sous forme d'une quantité moyenne de matière/ unité de surface ( $\text{ng}/\text{mm}^2$ ). Nous avons voulu étudier la corrélation entre le signal SPR obtenu suite à la capture des calibrants par la surface et la densité de particules à la surface (nombre de particules/ $\text{mm}^2$ ) déterminée par microscopie. La densité surfacique (nombre de particules/ $\text{mm}^2$ ) a été évaluée par AFM pour les CP50 et microscopie optique pour les CP920.

### **2.5.1. Capture et comptage des CP50**

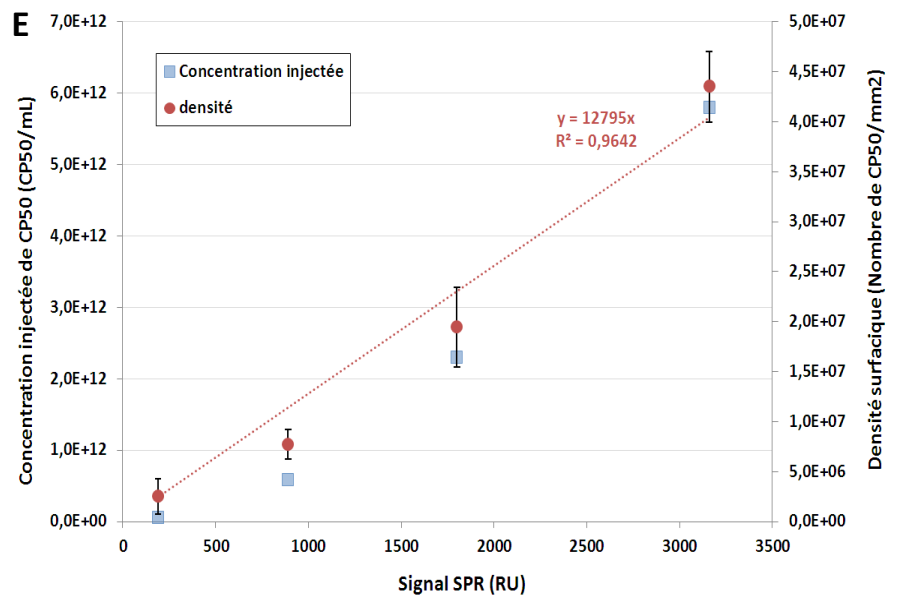
Les CP50 ont été injectées, en BIA3000, à des concentrations différentes sur les 4 pistes d'une puce, donnant des taux de capture de 190, 890, 1800 et 3160 RU respectivement sur FC1, 2, 3 et 4. Différentes zones de chaque piste ont été scannées en AFM dans le but d'avoir une vue représentative de la densité des CP50 à la surface de chaque piste. La Fig. 59 présente des images AFM pour les différents canaux (FC1, 2, 3 et 4).

L'analyse AFM montre que la densité surfacique en particules est directement proportionnelle au signal SPR obtenu en BIA3000. La densité moyenne des CP50 sur le canal 1 est de  $3,08 \pm 1,24 \times 10^6$  CP50/ $\text{mm}^2$  ce qui correspond à 190 RU en taux de capture soit  $190 \text{ pg}/\text{mm}^2$ , (Fig. 59-A). Les densités moyennes de CP50 sur les pistes 2 et 3 sont de  $7,72 \pm 1,78 \times 10^6$  et  $19,45 \pm 4,02 \times 10^6$  CP50/ $\text{mm}^2$  pour des signaux SPR de 890 RU ( $890 \text{ pg}/\text{mm}^2$ ) et 1800 RU (eq.  $1800 \text{ pg}/\text{mm}^2$ ), respectivement (Fig. 59 -B et C). Sur le canal 4, le signal de 3160 RU a été obtenu suite à l'injection de CP50 jusqu'à la saturation de la surface du canal; le scan AFM de ce canal montre une couche dense de CP50 ce qui confirme la saturation de la surface. La densité des particules sur ce canal a été estimée à  $43,5 \pm 3,54 \times 10^6$  CP50/ $\text{mm}^2$  (Fig. 59 -D).

La Fig. 59 - E montre la relation entre la densité de CP50 à la surface (cercle rouge), déterminée par les images AFM, et le signal SPR (RU). La courbe montre une relation linéaire entre ces deux paramètres ( $R^2=0,964$ ). Sur la même courbe, nous présentons la concentration de



**Fig. 59 :** Corrélation capture / concentration / densité surfacique pour les CP50 : A, B, C et D montrent des images AFM des pistes présentant 190, 890, 1800 et 3160 RU sur FC1, FC2, FC3 et FC4 respectivement obtenus après capture des CP50 via l'  $\alpha$ -CP50. Echelle en z de 10 nm. (E) corrélation entre le signal SPR (RU) et la densité surfacique des CP50 (nombre de CP50/mm<sup>2</sup>) (cercles rouges) ; Les carrés bleus correspondent à la concentration de CP50 injectée pour obtenir le signal SPR correspondant.



CP50 en solution (CP50/mL) injectée sur chaque piste pour obtenir le taux de capture donné (carré bleu). Ces résultats montrent que la densité surfacique en particules est liée au taux de capture mesuré en SPR. Cela signifie que la contribution du signal SPR<sub>i</sub> obtenu suite à l'injection des calibrants est essentiellement liée à la capture des CP sur la surface. Le signal SPR est lui-même relié à la concentration des particules dans la solution injectée, ce qui permet d'atteindre la quantification des particules en solution (Des images pour les 4 pistes sont présentées dans l'annexe 6).

D'autre part, nous avons comparé ces résultats expérimentaux avec les données théoriques dont nous disposons sur les CP50. En effet, une CP50 présente une masse de  $\approx 1 \times 10^{-10}$   $\mu$ g (voir annexe 4). Le taux de capture de 190 RU sur le FC1 reflète une quantité de matériel brute capturée de 190 pg/mm<sup>2</sup> qui correspond à une densité théorique de  $1,9 \times 10^6$  CP50/mm<sup>2</sup>. Cette valeur est proche de celle trouvée expérimentalement, par AFM, et qui est de  $3,08 \times 10^6$  CP50/mm<sup>2</sup>. De même, les densités surfaciques théoriques sur FC2 (890 RU), FC3 (1800 RU) et FC4 (3160 RU) sont égales à  $8,9 \times 10^6$ ,  $18 \times 10^6$  et  $31,6 \times 10^6$  CP50/mm<sup>2</sup> respectivement. Ces valeurs sont également proches de celles obtenues expérimentalement par AFM et qui étaient de  $7,72 \times 10^6$ ,  $19,45 \pm 4,02 \times 10^6$  et  $43,5 \times 10^6$  CP50/mm<sup>2</sup> pour FC2, FC3 et FC4 respectivement.

Aussi, notre plateforme NBA répond de façon efficace et cohérente aux nano-objets

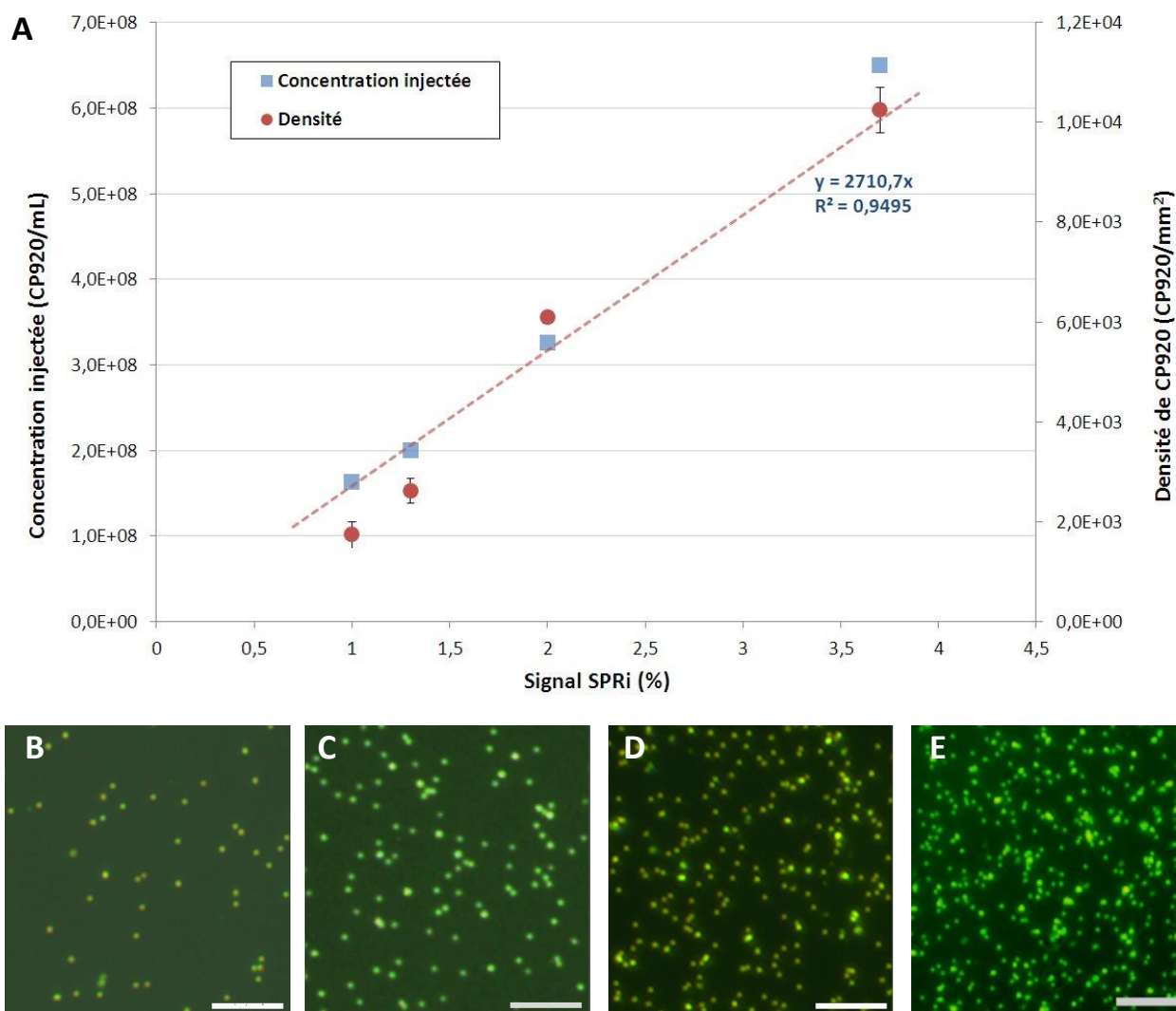
biomimétiques que sont les CP50.

### 2.5.2. Capture et comptage des CP920

De la même façon, afin d'étudier la relation entre le taux de capture obtenu comme signal SPRi (%) et la densité de CP920 à la surface de la biopuce, ces derniers ont été injectés à différentes concentrations sur une puce présentant des spots de leurs anticorps spécifiques  $\alpha$ -CP920.

La densité surfacique en CP920 est proportionnelle au taux de capture avec des valeurs de  $1,74 \times 10^3$  ;  $2,62 \times 10^3$  ;  $6,09 \times 10^3$  et  $1,02 \times 10^4$  CP920/mm<sup>2</sup> pour des taux de capture de 1 ; 1,3 ; 2 et 3,7 % respectivement (Fig. 60).

La corrélation entre les résultats expérimentaux et les données théoriques est plus difficile à montrer ici de par la taille micrométrique des CP920. En effet, le plasmon se propage à un



**Fig. 60 :** Corrélation capture/concentration/densité surfacique pour les CP920 (A). Les carrés bleus correspondent à la concentration de CP920 en solution injectée pour obtenir le signal le signal SPRi correspondant. Chaque injection a été performée pendant 2 minutes. (B), (C), (D), et (E) montrent des images obtenues par microscopie optique des spots  $\alpha$ -CP920 à des taux de capture de 1 ; 1,5 ; 2 et 3,7%. La barre d'échelle correspond à 50  $\mu$ m.

maximum de 200 nm de la surface de la puce et les billes sont environ 5 fois plus grandes que cette profondeur de propagation. Le signal SPRi généré suite à la capture des CP920 ne correspond donc qu'à une partie du matériel capturé. Aussi, la conversion du signal SPRi en quantité de matière ( $1\% = 125 \text{ pg/mm}^2$ ) a été déterminée en utilisant un modèle protéique. Cette conversion n'est donc pas strictement applicable à des vésicules synthétiques telles que les CP920.

### 3. Conclusion

Dans cette partie, nous avons présenté le travail mené pour calibrer notre plateforme NBA à l'aide de deux particules modèles, les CP50 et les CP920, correspondant aux limites inférieure et supérieure de la large gamme de taille des VEs à savoir de  $\approx 50 \text{ nm}$  à  $1 \text{ }\mu\text{m}$ .

Les tests de capture des calibrants par leurs anticorps spécifiques immobilisés à la surface de la biopuce ont montré une grande spécificité de capture avec une gamme dynamique couvrant  $10^7$  à  $10^{12}$  particules/mL, sans que cette capture ne soit affectée par la complexité du milieu dans lequel se trouvent les particules. Cette gamme dynamique de concentrations couvre la gamme de concentrations physiologiques des VEs dans les liquides biologiques<sup>234,252,258,336</sup>. Ainsi, notre méthode de capture des VEs montre une grande adaptabilité vis à vis de la gamme dynamique; cette dernière peut, de plus être modulée, en modifiant les protocoles d'injection.

D'autre part, le couplage de la méthode de capture à la surface d'une biopuce d'or rugueuse avec l'analyse AFM a pu être mis en place. Cette analyse metrologique a pu être réalisée en environnement liquide ou après séchage de la puce.

La densité des particules calibrants à la surface de la puce et le taux de capture de ces derniers par SPR et SPRi ont pu être directement corrélés.

De plus, dans le cas des calibrants nanométriques et biomimétiques, les CP50, nous avons pu vérifier de façon théorique les valeurs de densités obtenues expérimentalement par imagerie, avec à nouveau une très bonne corrélation.

Ces résultats ont fait l'objet d'une publication dans le journal Biosensors and Bioelectronics.

## IV. Validation de la plateforme NBA en échantillons complexes

Cette partie est consacrée à l'étude de différents échantillons biologiques de VEs par la plateforme NBA et à l'évaluation de ses performances dans des milieux biologiques complexes.

Dans un premier temps, nous avons étudié des échantillons de VEs provenant de concentrés plaquettaires (PVEs) : des VEs produites de façon basale par les plaquettes ou suite à leur stimulation par du collagène. Ces échantillons ont été fournis par l'établissement français du sang (EFS, INSERM U1098, Bourgogne Franche-Comté, Besançon, France).

Un deuxième type d'échantillon de VEs d'origine plaquettaire a été ensuite étudié et consiste en des VEs libérées par des concentrés plaquettaires de façon basale ou suite à leur activation par de la thrombine; ces échantillons sont fournis par le professeur T. Burnouf (Université de Médecine de Taipei, Taiwan). Le but de ces investigations est de déterminer la taille des différentes sous-populations de VEs ainsi que d'affiner leur signature phénotypique multiple.

Dans un second temps, nous avons étudié les VEs contenues dans du plasma, ce plasma ayant subi, ou non, une étape de filtration à travers un filtre de 75 nm. Cette investigation a comme but de comparer le contenu en VEs dans le plasma avant et après nanofiltration afin d'aider le partenaire à mieux comprendre l'effet des VEs sur les patients dans le cadre de la transfusion sanguine et d'explorer comment la nanofiltration s'avère efficace pour diminuer le risque de thrombogénicité.

### 1. Matériels et méthodes

#### 1.1. Analyse par cytométrie en flux (FC)

Les échantillons de PVEs fournis par l'EFS ont été caractérisés par les collègues de l'EFS en utilisant un cytomètre en flux (Navios, Beckman Coulter, Villepinte, France). La taille des P-VEs a été évaluée en utilisant des billes de calibrations (Megamix Plus beads) adaptées à la caractérisation de particules dans la fenêtre de taille de 300-900 nm. La concentration des PVEs a été mesurée sur la base des billes de comptage (Cytocount beads) qui sont ajoutées à un volume équivalent dans l'échantillon. La concentration est ensuite calculée grâce à la formule suivante :  $[VEs] = \frac{[Billes\ de\ comptage] * (nombre\ des\ événements\ entre\ 300-900\ nm)}{nombre\ des\ billes\ de\ comptages\ détecté}$ . L'origine plaquettaire des vésicules a été confirmée en utilisant des anticorps fluorescents dirigés contre le CD31 (anti-CD31 conjugué avec Phycoérythrine) et le CD41 (anti-CD31 conjugué avec Phycoérythrine –Cyanine 7), deux protéines hautement exprimées par les plaquettes.

#### 1.2. Analyse TRPS

Des analyses ont été effectuées par TRPS (Qnano, Izon Science) pour mesurer la distribution en taille et la concentration des VEs testées.

Les mesures ont été faites en utilisant deux membranes, une ayant un pore de 100 nm (NP100) et l'autre de 200 nm (NP200), selon le type d'échantillon. 30  $\mu$ L de chaque échantillon ont été déposés sur la membrane. La mesure est jugée suffisamment fiable lorsqu'au moins 500 vésicules sont comptabilisées lors du passage à travers le pore.

### 1.3. Capture des VEs à la surface de la biopuce en SPRi

La capture des VEs dans les différents échantillons a été réalisée en utilisant l'instrument SPRi-Plex II et en utilisant un tampon HEPES comme tampon de course. Ce tampon contient, au contraire du PBS, des ions calcium qui sont nécessaires pour l'interaction du ligand Annex-V (greffé à la surface)/phosphatidylsérine (PS) présent sur le feuillet externe des VEs. Le tampon HEPES est composé d'HEPES (10 mM),  $\text{CaCl}_2$  (5mM) et de NaCl (150 mM). (Voir partie 1.1. au chapitre III pour le reste des réactifs et produits chimiques).

Différents ligands ont été utilisés afin de capturer les VEs à la surface de la puce, chaque ligand est spécifique d'une sous-population donnée de VEs. Les différents ligands sont des anticorps monoclonaux de souris, sauf l'Annex-V, qui est une protéine recombinante.

- **$\alpha$ -CD61** (Abcam; ref: ab33171) : spécifique de l'intégrine- $\beta$ 3 présente sur différents types de cellules telles que les plaquettes<sup>324,337</sup> et les cellules endothéliales ainsi que sur les VEs dérivées de ces cellules.
- **$\alpha$ -CD41** (Diaclone SAS, France ; catalogue N°: 853.353.020) : spécifique de l'intégrine alpha-IIb (humain) présente essentiellement à la surface des plaquettes et des vésicules plaquettaires<sup>324</sup>.
- **$\alpha$ -CD62P** (Abcam; ref: ab54427) : spécifique de la sélectine-P (CD62-P) exprimée essentiellement à la surface des plaquettes activées et des vésicules plaquettaires<sup>156,338</sup>.
- **$\alpha$ -CD9** (Abcam; ref: ab2215) : spécifique de la tétraspanine CD9 exprimée préférentiellement par des petites vésicules d'origines endosomiques (exosomes) mais aussi par des petites VEs qui bourgeonnent directement à partir de la membrane plasmique<sup>265</sup>.
- **$\alpha$ -TF** (Abcam; ref: ab17375) : spécifique du facteur tissulaire (TF ou CD142) qui joue un rôle important dans l'initiation de la coagulation. Le TF est exprimé, entre autre, à la surface des VEs libérées par différents types de cellules tumorales<sup>339</sup>, les monocytes<sup>162</sup> et les cellules endothéliales<sup>19</sup>.
- **Annex-V** (Biovision) : se lie à la PS qui est considérée comme marqueur des vésicules bourgeonnant à partir de la membrane plasmique des cellules suite à un processus de remodelage de cette dernière (cf. partie biogenèse des MPs »).

En plus de ces ligands, des spots d'IgG contrôle sont réalisés dans toutes les expériences de capture. Ces spots correspondent dans la plupart des expériences à l'anticorps  $\alpha$ -LAG-3

(A9H12), qui a été utilisé précédemment pour la capture des calibrants CP920.

Dans toutes les expériences, chaque ligand a été immobilisé à la surface de la puce en duplicat ou triplicat selon le nombre des ligands testés sur la puce. Les résultats de capture des VEs sur chaque ligand correspondent à la réponse moyenne obtenue sur les différents spots d'un ligand donné.

#### **1.4. Analyse AFM des PVEs**

Suite à la capture des VEs, une fixation par du glutaraldéhyde (0,5%) a été appliquée dans l'appareil SPRi, pendant 10 min, avant la récupération de la puce. L'analyse AFM a été menée soit en milieu liquide (tampon Hepes) soit en air. Des leviers AFM de type NP-S10 triangulaire (Veeco, Digital instruments) ont été utilisés en mode contact. Ces leviers possèdent une constante de raideur  $K=0,32$  N/m.

Le diamètre effectif de chaque vésicule a été calculé comme indiqué précédemment (partie « 2.5.1. Capture des CP50 » du chapitre III).

#### **1.5. Analyse protéomique**

L'analyse protéomique des VEs a été réalisée comme indiquée précédemment dans les parties «3.3. Analyses protéomiques» et «4.2. Couplage SPRi-MS» du chapitre II.

Ainsi, la capture des VEs a été réalisée sur l'intégralité de la puce, présentant un tapis de ligand, ceci dans le but de piéger une grande quantité de VEs d'intérêt en vue de l'analyse. Suite à la capture des VEs, une injection d'eau est effectuée dans le SPRi-Plex II afin de remplacer le tampon de course. La puce est ensuite sortie de l'instrument et séchée avant d'être stockée dans un tube eppendorf, à l'abri de la poussière, en attente de l'analyse MS.

## **2. Tests de préconcentration**

Des tests de préconcentrations ont été réalisés pour les différents ligands utilisés dans cette partie selon le protocole présenté précédemment (partie «2.1.2. Optimisation des conditions de greffage des ligands» du chapitre III).

Le tableau 7 montre les pH optimums pour le greffage de chaque ligand à la surface d'une biopuce fonctionnalisée.



**Tableau. 7 :** Les différents biorécepteurs utilisés dans notre projet avec les pH d'immobilisation optimums déterminés par les tests de préconcentrations pour chaque ligand.

Biorécepteurs	pH d'immobilisation
$\alpha$ -VLP	pH 4.5
$\alpha$ -LAG3	pH 6
$\alpha$ -OVA	pH 4.5
$\alpha$ -CD41	pH 4
$\alpha$ -CD61	pH 6
$\alpha$ -CD62P	pH 4
$\alpha$ -TF	pH 4.5
Annexine-V	pH 4.5
$\alpha$ -CD9	pH 6

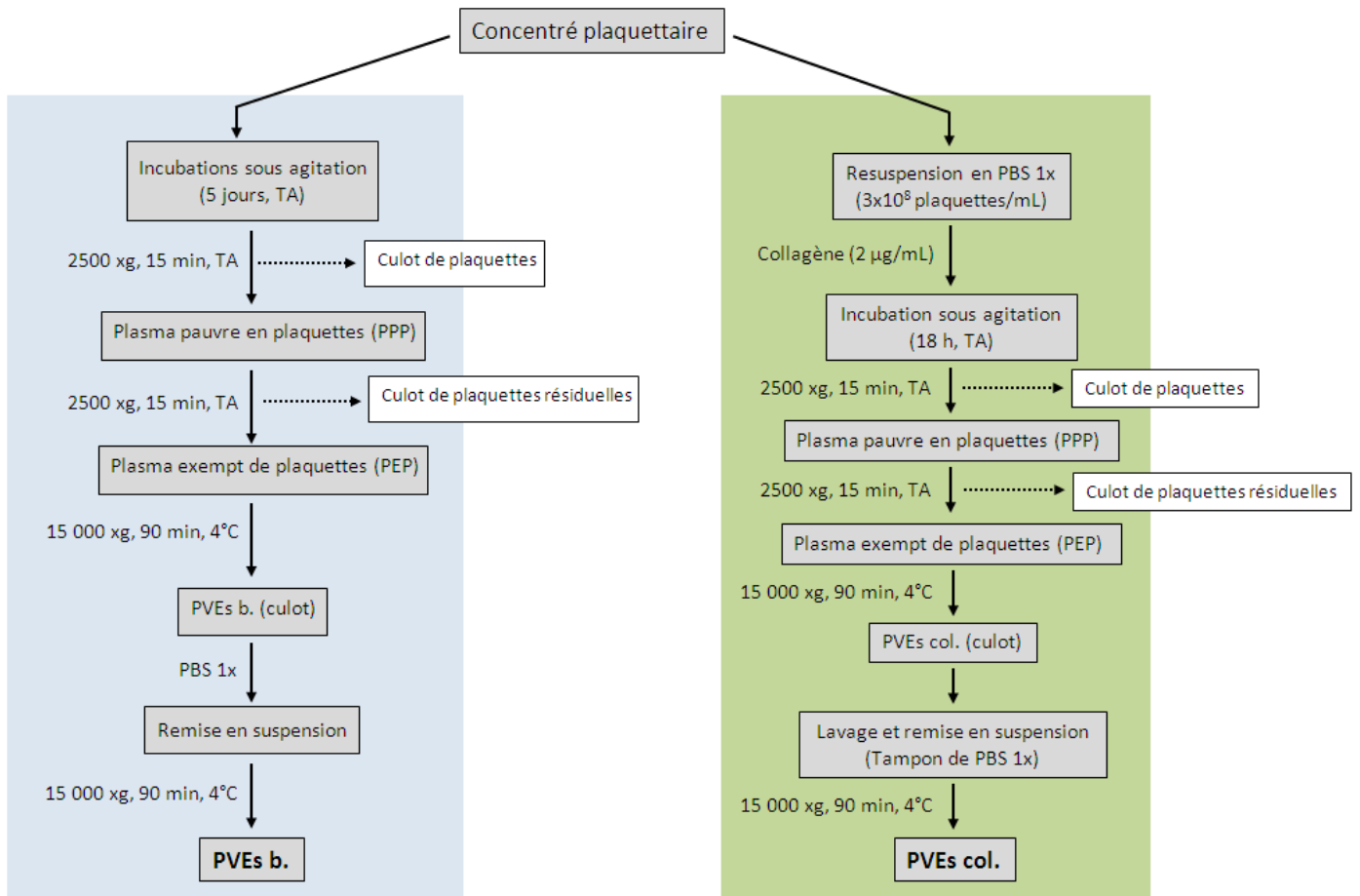
### 3. Etude des VEs plaquettaires

#### 3.1. Etudes différentielles des VEs plaquettaires basales et activées au collagène (EFS)

La collaboration avec l'EFS s'intègre dans un projet qui s'intéresse à explorer le rôle des VEs plaquettaires (PVEs), générées sous différentes conditions, dans la modulation de la réponse inflammatoire. Pour cela, des concentrés plaquettaires ont été obtenus à partir d'individus sains (après consentement éclairé écrit). Les PVEs, issues de plaquettes, ont été préparées de deux manières différentes conduisant à deux types d'échantillons: le 1<sup>er</sup> type correspond à des VEs libérées par les plaquettes à l'état basal, ainsi appelées « PVEs-basales »; le 2<sup>nd</sup> type correspond à des VEs libérées par les plaquettes suite à leur activation par du collagène, appelées « PVEs-col » (Fig. 61).

Dans les deux cas, afin d'éliminer les plaquettes et d'isoler les PVEs, les concentrés plaquettaires sont centrifugés 2 fois à 2500 g pendant 15 min, à température ambiante. Le surnageant est collecté et dilué avec 1,5 à 2 fois son volume dans du PBS 1X, pH 7,2 (Invitrogen, Cergy Pontoise, France) avant une centrifugation à 15000 g pendant 90 min, à 4°C pour culoter les VEs (Fig. 61). Le culot est resuspendu dans du PBS 1X avant une deuxième centrifugation avec les mêmes paramètres. Les PVEs sont ensuite stockées dans du PBS 1X à 4°C jusqu'au jour de l'expérience, dans un délai maximum d'un mois.

Les collègues à l'EFS ont déjà étudié le rôle de ces PVEs dans la modulation de la réponse inflammatoire par les cellules dendritiques plasmacytoïdes (PDC) suite à l'incubation de ces



**Fig. 61** : Protocole de préparation des vésicules plaquettaires basales (PVEs B.) et activées au collagène (PVEs col.) à l'EFS. "TA" désigne Température Ambiante.

dernières avec les PVEs. Ils en ont déduit que les PVEs-basales induisent la répression de la réponse inflammatoire chez les PDC alors que les PVEs-col induisent une réponse inflammatoire chez les PDC en activant la transcription des gènes codant pour des cytokines inflammatoires (Thèse Adam Ceroi, 2016).

La caractérisation physique et phénotypique des PVEs à l'EFS est réalisée exclusivement par la cytométrie en flux qui explore le contenu en vésicules d'un échantillon dans la fenêtre 300 - 900 nm. Pour cette raison, nous avons exploité la plateforme NBA pour caractériser les PVEs basales et activées au collagène dans les dimensions inférieures à 300 nm.

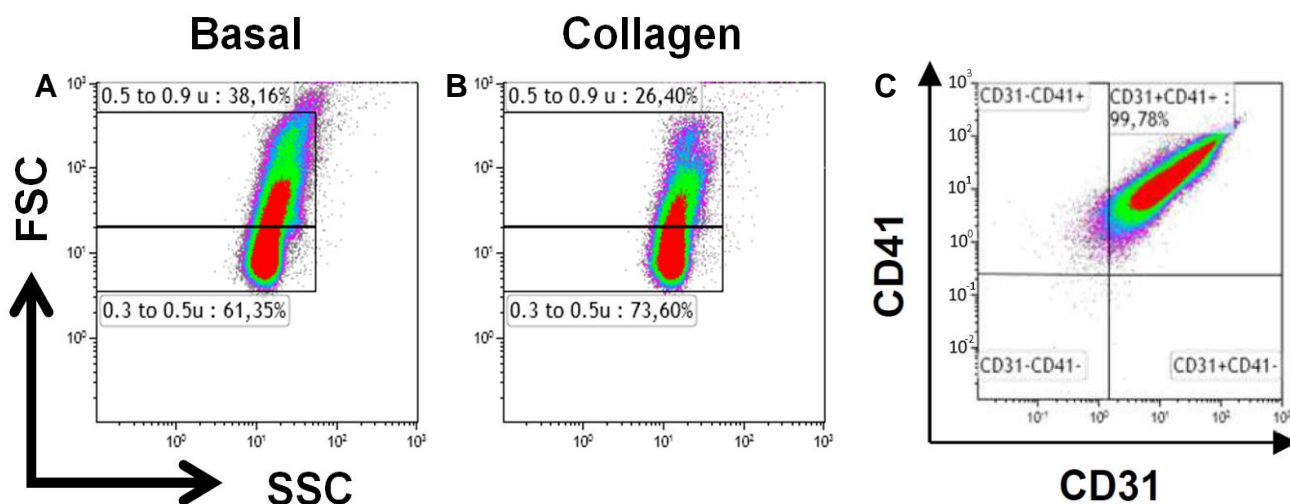
### 3.1.1. Analyse des PVEs par la cytométrie en flux (FC)

L'analyse des PVEs-basales et des PVEs-col par la FC est présentée dans la figure 62. Les nuages de points représentent les événements détectés par la cytométrie en flux suite à la calibration de l'instrument par les billes Mégamix. L'échelle de couleur désigne la concentration des événements (du plus concentré « en rouge » au moins concentré « en violet »).

La proportion des vésicules entre 500-900 nm est plus importante dans l'échantillon des PVEs-basales que dans l'échantillon PVEs-col avec 38 et 26 % respectivement, alors que la

proportion de vésicules dans la gamme de 300-500 nm est de 61 et 73% pour P-VEs basales et activées respectivement. Ainsi, les résultats de FC mettent en évidence une augmentation des concentrations de « petites » vésicules (300-500 nm) dans le cas de PVEs-col.

De plus, la Figure 62 – C montre les résultats du double marquage d'un échantillon de P-VEs-basales avec des ligands fluorescents ; la majorité des vésicules (99,8%) dans l'échantillon testé est double positive pour CD31 et CD41, ce qui confirme l'origine plaquettaire des vésicules. La concentration en vésicules de chaque échantillon a été aussi déterminée comme indiqué ci-dessus (partie « 1.1. Analyse par cytométrie en flux (FC) » de ce chapitre) et a permis d'obtenir des concentrations comprises entre  $1 \times 10^9$  et  $5 \times 10^{10}$  PVEs/mL suivant les lots.



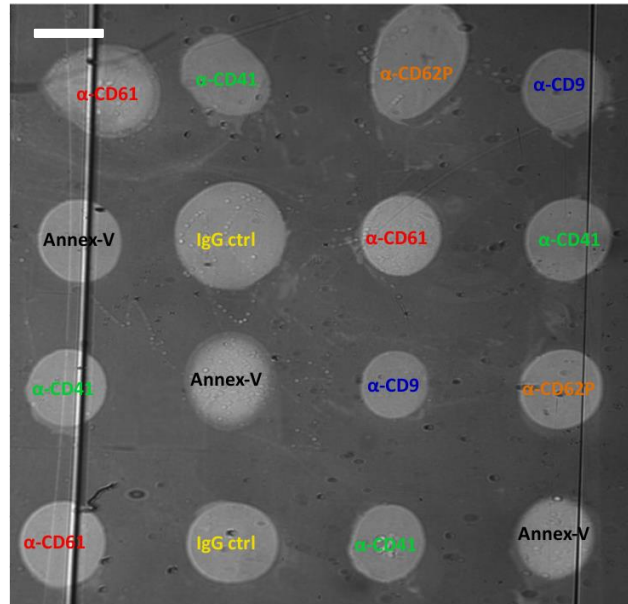
**Fig. 62 :** Analyse FC des P-VEs: la détection des P-VEs basales (A) et activées (B) dans la fenêtre de taille entre 300-900 nm établie par les billes de calibration Mégamix. (C) Caractérisation des vésicules par un double marquage révélant l'expression des antigènes CD41 et CD31.

### 3.1.2. Immunocapture des PVEs sur puce

Nous avons réalisé des tests de capture de PVEs basales et activées au collagène sur des puces multiplexées présentant les ligands:  $\alpha$ -CD61,  $\alpha$ -CD41,  $\alpha$ -CD62-P,  $\alpha$ -CD9, Annex-V et IgG contrôle, selon une matrice de spots 4x4 (Fig.63).

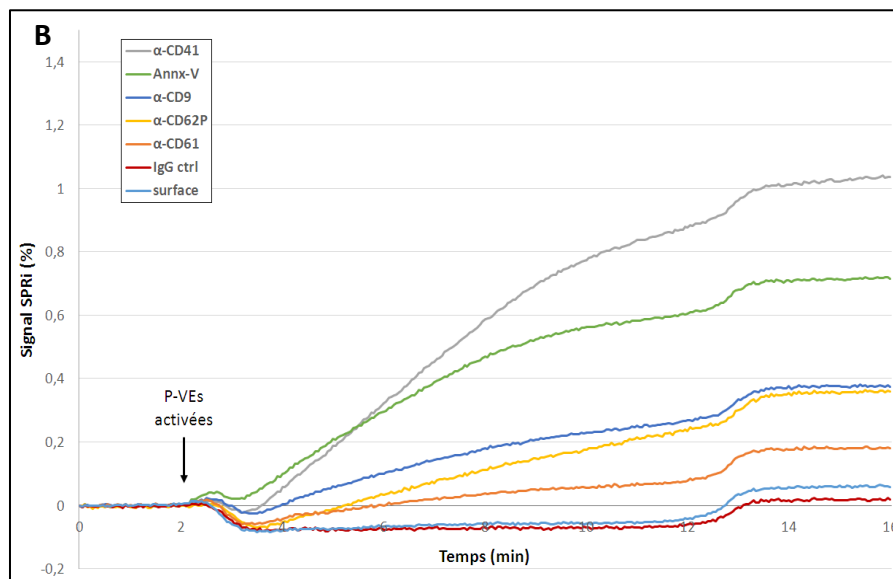
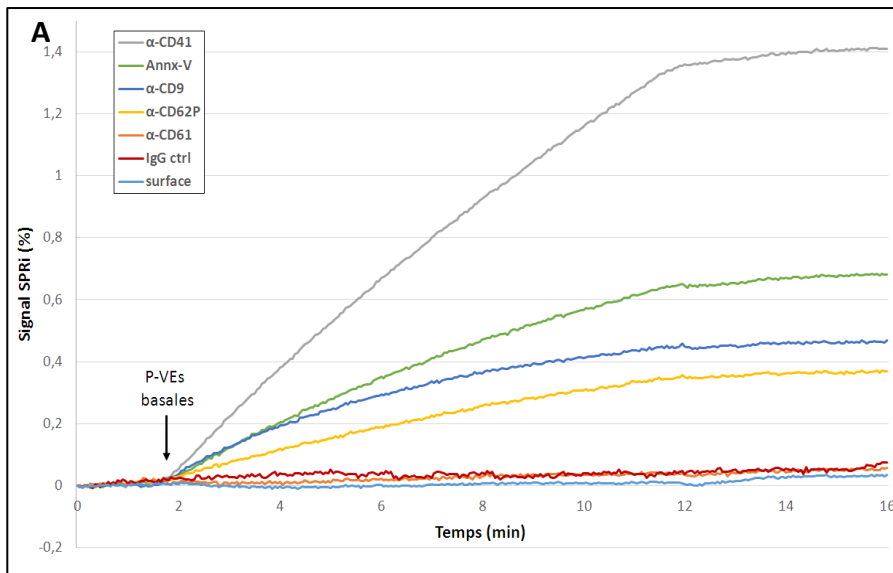
Chaque échantillon a été injecté, pendant 10 min, à  $3 \times 10^7$  PVEs/mL après dilution des solutions mères de PVEs-basales et PVEs-col, dont les concentrations, déterminées par la FC, étaient respectivement de  $2,1 \times 10^{10}$  et  $6,8 \times 10^9$  PVEs/mL. La figure 64 montre les sensorgrammes enregistrés pendant l'injection de deux échantillons. Dans les deux cas, des taux de capture identiques sur les spots de même ligand ont été obtenus, attestant d'une bonne reproductibilité inter-spots. Si les niveaux de capture diffèrent entre les 2 types d'échantillon, en revanche, les réponses SPRi par ligand suivent le même ordre :  $\alpha$ -CD41 > Annex-V >  $\alpha$ -CD9 >  $\alpha$ -CD62P >  $\alpha$ -CD61. Le signal optimal est obtenu sur les spots  $\alpha$ -CD41 ce qui est attendu car cet antigène est un marqueur des plaquettes et des vésicules plaquettaires.

**Fig. 63:** Image de contraste SPRI de la surface de la puce présentant 16 spots de différents ligands greffés en duplicate ou triplicate selon le ligand. Barre d'échelle de 1 mm.

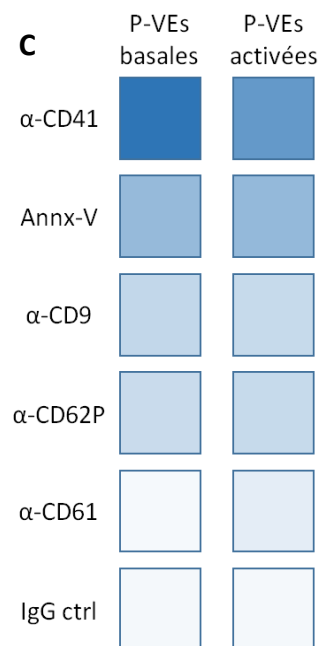


Le taux de capture sur les spots  $\alpha$ -CD41 est significativement plus important dans l'échantillon de PVEs-basales (1,41%) que pour les PVEs-col (1,03%). En intégrant les données sur deux lots injectés à la même concentration ( $3 \times 10^7$  PVEs/mL), nous observons une capture spécifique et reproductible de  $1,5 \pm 0,4$  pour PVEs-basales et  $0,98 \pm 0,2\%$  pour PVEs-col. La figure 64 permet de montrer que les taux de capture sur les autres ligands sont similaires dans les 2 cas. Les analyses différentielles (basales vs activées) sur deux lots ont été menées en duplicat. Les tests de capture ont été réalisés en duplicat pour les PVEs-basales, alors que la reproductibilité de la capture n'a pas pu être vérifiée pour les PVEs-col de par la rareté de l'échantillon pour cette expérience.

A partir de ces observations, nous pouvons conclure que la majorité des PVEs dans les deux cas expriment essentiellement le CD41. Le faible taux de capture sur  $\alpha$ -CD61 semble assez surprenant car le CD61 est présent, sous forme d'un complexe avec le CD41, à la surface des plaquettes et des VEs plaquettaires. Nous verrons par la suite que l'anticorps  $\alpha$ -CD61 a été testé avec succès pour capturer des VEs dans d'autres types d'échantillon, ce faible taux de capture pourrait s'expliquer par une altération soit dans l'expression soit dans la structure de cette protéine. D'autre part, le taux de capture sur  $\alpha$ -CD62P, spécifique de la protéine CD62P qui est considérée comme un marqueur d'activation des plaquettes, est similaire dans les deux échantillons. Ceci peut être interprété de deux façons : soit par une faible efficacité du protocole d'activation des plaquettes, soit par une activation qui a eu lieu de manière passive, durant la phase d'incubation, chez les plaquettes utilisées pour générer les PVEs-basales. Concernant les réponses enregistrées sur les spots  $\alpha$ -CD9, nous constatons un niveau significatif et équivalent pour les deux échantillons et qui est plus faible par rapport aux réponses sur  $\alpha$ -CD41 et Annex-V. Ceci peut être expliqué par le fait que le CD9 est considéré comme étant marqueur des exosomes et des petites VEs, et les PVEs dans les deux échantillons ont été isolées par centrifugation (15 000 g), vitesse qui ne serait pas suffisante pour culoter les exosomes qui



**Fig 64:** Capture des PVEs basales et activées au collagène à la surface des puces présentant différents ligands: (A) injection des P-VEs basales et (B) injection des P-VEs activées au collagène. Chaque injection est réalisée pendant 10 min à 20  $\mu$ L/min. (C) une représentation en échelle colorimétrique montrant les niveaux de capture des VEs par les différents ligands.



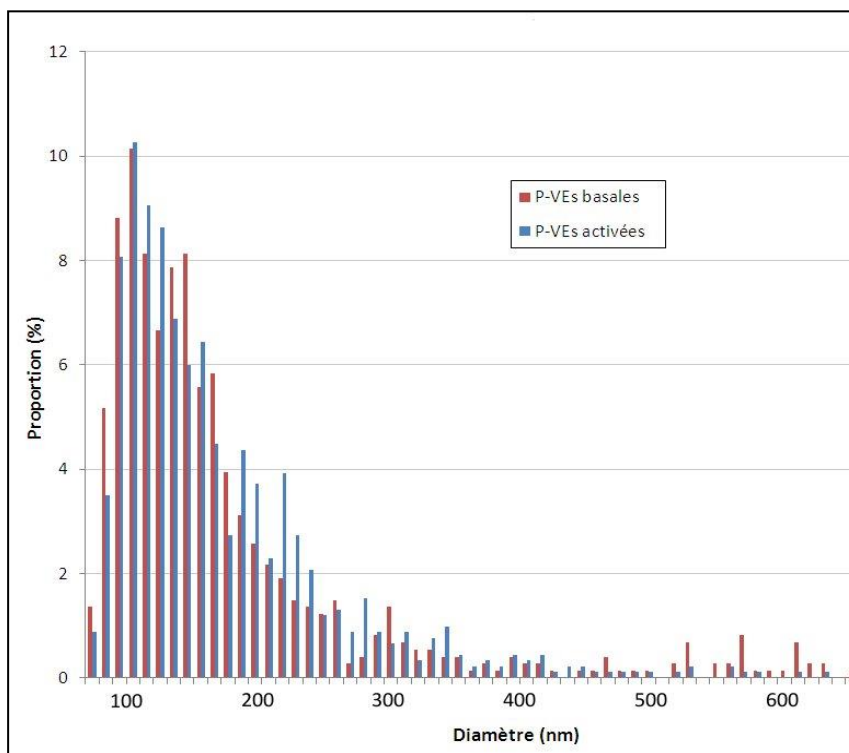
sédimentent préférentiellement par ultracentrifugation (100 000 à 200 000 g).

La fig. 64-C montre une échelle colorimétrique qui représente le niveau de capture moyen par chaque ligand. Les taux de capture sur la surface et sur les spots d'IgG contrôle sont faibles voire nuls, ce qui démontre que les interactions des vésicules avec les différents ligands sont bien spécifiques et que l'architecture chimique et biochimique de la puce est efficace en milieu biologique complexe.

### 3.1.3. Analyse TRPS des PVEs

Les mesures Qnano de PVEs-basales et PVEs-col ont été faites en utilisant un NP200. 30  $\mu$ L de chaque échantillon ont été appliqués à une dilution de 1/100 en tampon PBS 1X.

La figure 65 montre la distribution en taille des PVEs dans les deux échantillons sur une large gamme de taille entre 100-600 nm, et que la majorité de ces vésicules ( $\approx$  90%) ont un diamètre <



**Fig. 65 :** Analyse Qnano des P-VEs basales et activées. Un histogramme montrant la distribution en taille des P-VEs basales et activées entre 85-640 nm. Les mesures ont été effectuées en utilisant un NP200.

300 nm. Ainsi, les PVEs-col sont légèrement plus grandes que celles de l'échantillon basal dans la gamme de taille 100-300 nm, alors que dans la gamme de taille de 400-600 nm, nous pouvons remarquer une plus grande proportion de PVEs-basales par rapport aux activées.

Le Qnano a permis de déterminer la concentration des vésicules dans chaque échantillon. Nous obtenons  $3,67 \times 10^{12}$  et  $1,28 \times 10^{11}$  VEs/mL pour les PVEs-basales et PVEs-col respectivement.

En comparant ces valeurs avec celles déterminées par la cytométrie en flux, nous remarquons que la concentration des P-VEs déterminée par Qnano est plus élevée d'environ deux ordres de grandeur que celle déterminée par FC pour les P-VEs basales ( $3,67 \times 10^{12}$  contre  $2,09 \times 10^{10}$  VEs/mL, respectivement) et pour les P-VEs activées ( $1,28 \times 10^{11}$  contre  $6,84 \times 10^9$ , respectivement). Ces résultats confirment que la grande majorité des vésicules est <300 nm.

### 3.1.4. Nanométrie des PVEs

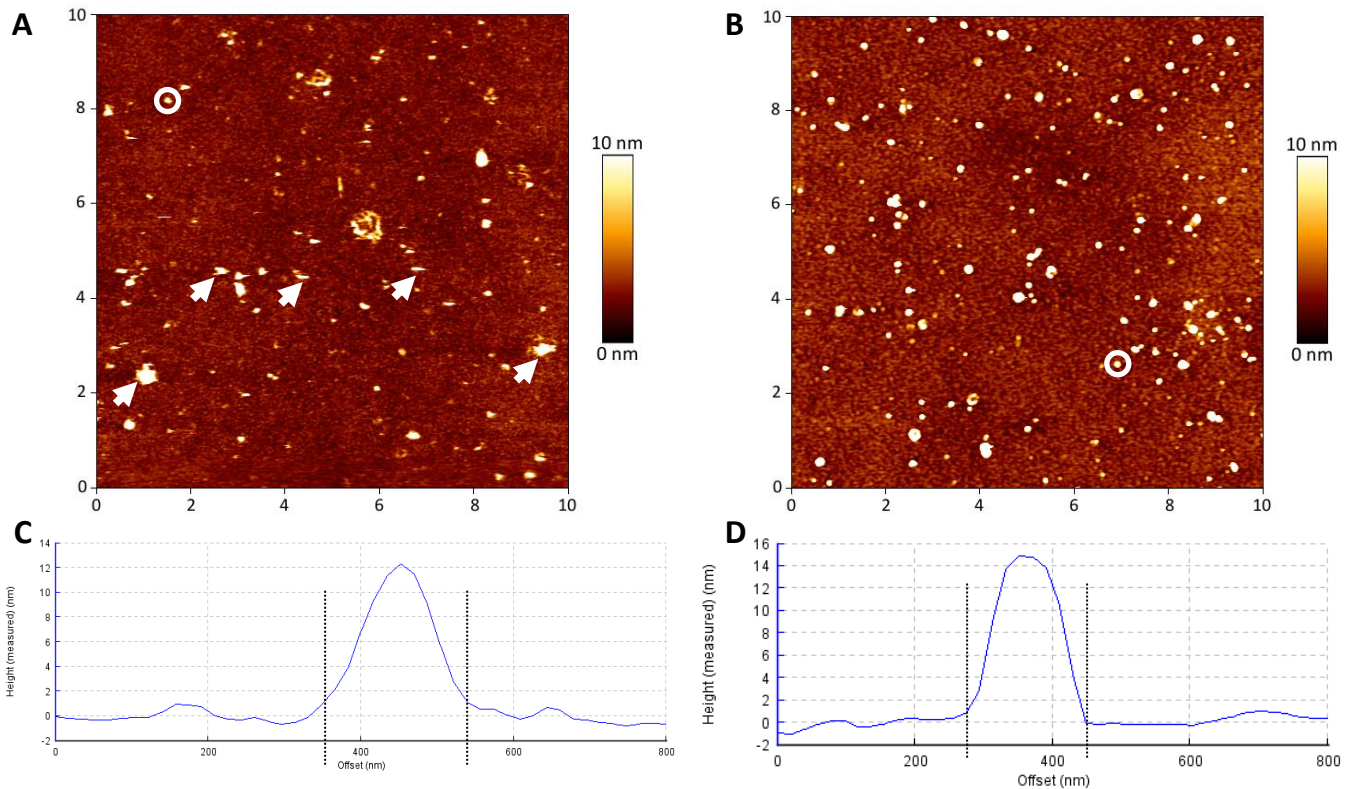
#### 3.1.4.1. Analyse AFM des PVEs en « milieu liquide » et « en air »

Tout d'abord, l'objectif était d'explorer si la condition environnementale dans laquelle l'analyse AFM est menée affectait la morphologie des VEs. Une analyse AFM a été alors réalisée pour étudier la métrologie des PVEs-col capturées à la surface d'une puce via l' $\alpha$ -CD41. L'analyse AFM est menée tout d'abord en milieu liquide (tampon Hepes) avant de passer à l'analyse en air après séchage de la surface de la puce à température ambiante.

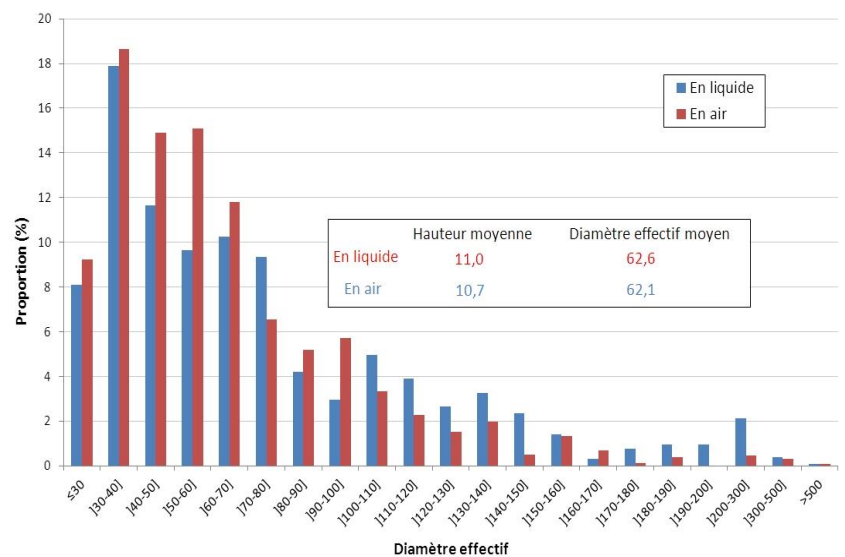
L'analyse en liquide, en mode contact ou tapping, montre le plus souvent des vésicules avec

des contours mal définis (Fig. 66- A et C), ce qui gêne la mesure des diamètres de ces objets. Par contre, après séchage et analyse AFM en air, les vésicules sont apparues avec des bords bien définis (Fig. 66 B & D). Il est à noter que les 2 images AFM de la fig.66 ne correspondent pas au même endroit de la surface de la puce analysée.

Dans les deux conditions, les VEs sont apparues sous la forme de disques aplatis (cf partie « Analyse métrologique des CP50 capturées à la surface de la puce » du chapitre III). Nous avons pu remarquer également la présence d'agglomérats de vésicules (Fig. 67) que nous avons discriminé des gros objets.



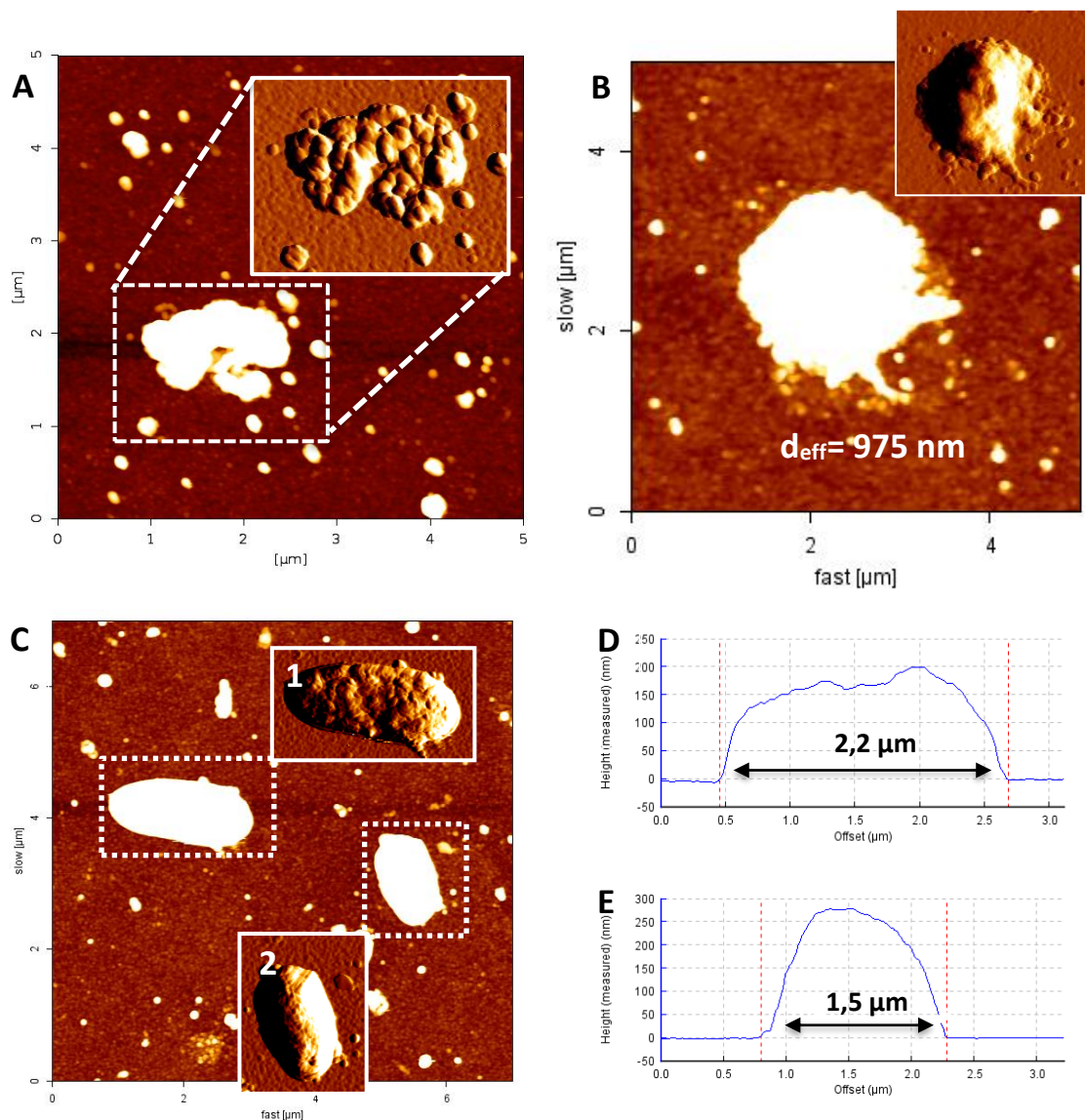
**Fig. 66 :** Analyse AFM des VEs en milieu liquide et en air. PVEs-col capturées à la surface d'une puce, via  $\alpha$ -CD41, et fixées au glutaraldéhyde en tampon Hepes (A) et en air (B). Les flèches en (A) montrent des vésicules aux contours mal définis. En (C) et (D), des sections de profils pour deux vésicules imagées dans les 2 conditions (cercle blanc en (A) et cercle blanc en (B)), respectivement. (E) La distribution en taille des PVEs-col en liquide (bleu) et en air (rouge). Ces résultats sont obtenus sur la base de 741 et 1046 vésicules mesurées en liquide et en air respectivement.



L'analyse métrologique a été réalisée pour 741 et 1046 VEs en liquide et en air respectivement. Cette analyse montre que la majorité des vésicules ( $\approx 80\%$ ) présente un diamètre en dessous de 100 nm et les plus petites vésicules possèdent un diamètre effectif d'environ 20 nm. La hauteur moyenne des PVEs est similaire en liquide ou en air, avec des valeurs de 11,0 et de 10,7 nm respectivement (Fig. 66).

Le diamètre apparent moyen mesuré en AFM est de 180,2 nm en liquide et de 177,9 nm en air. Le diamètre effectif, calculé à partir de la hauteur et du diamètre apparent est alors de 62,6 et de 62,1 nm en milieu liquide et en air respectivement.

Ces résultats démontrent la capacité de l'AFM à mesurer précisément, en air et en liquide, les dimensions sur puce des vésicules capturées. Après avoir vérifié que le passage en air ne



**Fig. 67 :** Analyse AFM, en air, des PVEs capturées à la surface d'une puce via  $\alpha$ -CD41 et fixées au glutaraldéhyde : (A) Agglomérats des petites vésicules. L'encart montre un zoom en image de déflexion. (B) un gros objet qui a un diamètre effectif ( $d_{\text{eff}}$ ) de  $\approx 1 \mu\text{m}$ . (C) Image AFM montrant deux grosses vésicules allongées. (D) et (E), deux sections de profils pour les vésicules 1 et 2 imagées en (C). Echelle en z de 10 nm pour les différentes images AFM.



modifiait pas la morphologie des VEs, la facilité de l'analyse AFM en air et la meilleure résolution des images, nous ont incités à privilégier cette approche.

Ces résultats sont cohérents avec ceux de Sebaihi et al.<sup>340</sup> qui ont étudié la métrologie des VEs générées par des globules rouges après capture sur une surface plane de mica fonctionnalisée par des anticorps spécifiques de ces vésicules ( $\alpha$ -CD235a). Leurs résultats montrent que la taille des vésicules (hauteur et diamètre mesurés) est identique qu'elles aient été imagées en milieu liquide (tampon PBS) ou en air. Les auteurs ont décrit des valeurs d'environ 30 nm pour la hauteur et de 90-100 nm pour le diamètre apparent des VEs. En comparant nos valeurs à celles ci, nous constatons que, dans notre cas, les vésicules sont plus étalées à la surface de la biopuce avec une hauteur moyenne plus faible ( $\approx$  11 nm) et un diamètre apparent plus élevé ( $\approx$  180 nm). Ceci peut être dû à la fixation des vésicules par le glutaraldéhyde ou même à la nature de la surface de capture utilisée. De plus, ces auteurs ont déduit de leur étude sur les VEs érythrocytaires un diamètre effectif moyen d'environ 54 nm qui est proche du notre, d'environ 62 nm, concernant les VEs plaquettaires. Il est à noter que dans notre analyse AFM nous avons utilisé les mêmes formules que celles décrites par ces auteurs pour calculer les diamètres effectifs des vésicules en tenant compte de leur forme sphérique à l'état physiologique.

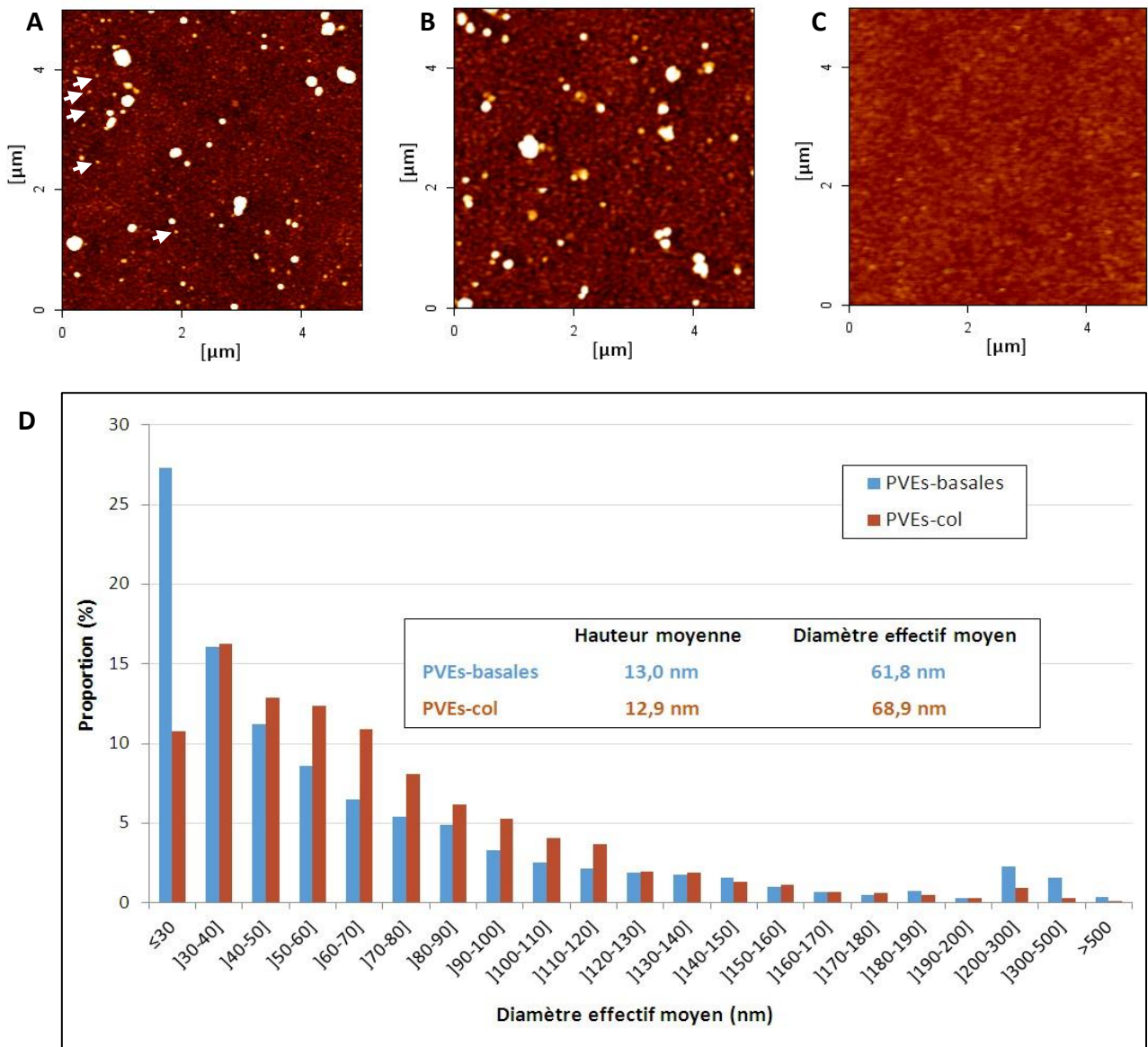
#### **3.1.4.2. Comparaison de la distribution en taille des PVEs-basales et activées au collagène**

Afin de comparer les distributions en taille des PVEs-basales et PVEs-col, une analyse AFM a été menée sur des puces, présentant l'anticorps  $\alpha$ -CD41 ainsi qu'un IgG contrôle. L'analyse AFM a été réalisée, en air, pour deux différents lots de chaque type d'échantillon.

La figure 68 montre des images AFM, de  $5 \times 5 \mu\text{m}^2$ , de PVEs-basales (Fig. 68-A) et de PVEs-col (Fig. 68-B) capturées sur les spots  $\alpha$ -CD41. Une image AFM du spot contrôle de l'une des puces est aussi présentée dans la figure 68-C. La distribution en taille de PVEs-basales et PVEs-col issues des échantillons de deux lots est donnée sous forme d'un histogramme dans la figure 68-D. L'étude porte sur un total de 2630 PVEs-basales (1161 et 1469 du lot 1 et lot 2 respectivement) et 2139 PVEs-col (1096 et 1043 du lot 1 et lot 2 respectivement) mesurées.

Les résultats montrent que plus de 80% des vésicules, dans les deux échantillons, sont  $\leq 100\text{nm}$ . Comme dans l'analyse précédente, les plus petites vésicules mesurées possèdent un diamètre effectif d'environ 20 nm. D'autre part, les PVEs-col présentent une distribution en taille légèrement plus grande que celle des PVEs-basales (Fig. 68-D). Les images AFM montrent une abondance des petites vésicules, marquées par des flèches, chez les PVEs-basales (Fig. 68 –A), alors que ces petites vésicules sont beaucoup moins abondantes chez les P-VEs activées (Fig. 68 –B). Plus d'images AFM sont présentées dans l'annexe 7.

D'autre part, la proportion des vésicules dans la fenêtre de taille 200-1000 nm est plus importante chez les PVEs-basales (1,9%) par rapport aux PVEs-col (0,42%). En bilan, le



**Fig. 68** : Analyse AFM des P-VEs basales et activées au collagène: Images AFM de 5x5  $\mu\text{m}^2$ , des P-VEs basales (A) et activées (B) capturées sur les spots  $\alpha$ -CD41 versus un spot d'IgG contrôle (C). L'échelle en z est de 10 m. (D) Distribution en taille des PVEs CD41+ basales et activées.

diamètre effectif moyen est de 61,8 nm pour les PVEs-basales et de 68,9 nm pour les PVEs-col.

Ces résultats montrent que la cytométrie en flux, avec sa limite de détection de 300 nm, ne permet d'étudier qu'une très faible proportion de VEs dans un échantillon (quelques %). L'analyse Qnano de cet échantillon, en utilisant un NP200, a permis d'étudier les vésicules dans la gamme de taille de 100-600 nm et qui, selon l'analyse AFM, ne représente que  $\approx 20\%$  du nombre de vésicules total dans les 2 échantillons. Par conséquent, la concentration déterminée par cette technique est sous-estimée. Par contre, les résultats de l'analyse Qnano sont cohérents avec ceux de l'AFM en montrant que la majorité des PVEs, basales ou activées, présente une taille < 200 nm et aussi en montrant que la proportion des PVEs-basales > 400 nm est 3 à 4 fois supérieure à celle des PVEs-col.

### 3.1.5. Conclusion sur l'étude de PVEs-basales et PVEs-col par SPRi/AFM

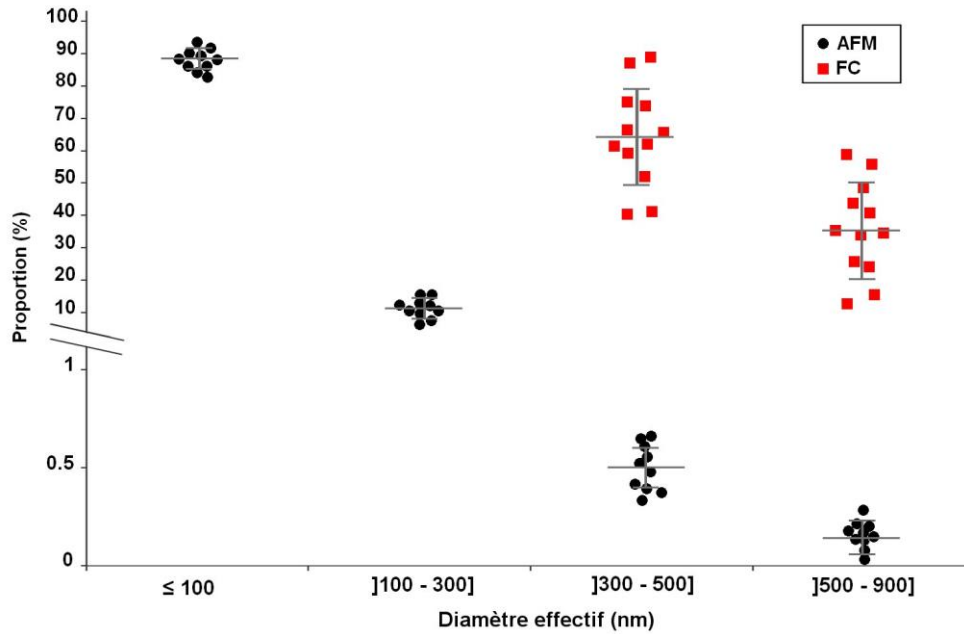
Dans cette partie, nous avons montré l'analyse réalisée pour étudier deux types de vésicules plaquettaires : les PVEs-basales et les PVEs-col.

Ces deux échantillons ont été tout d'abord analysés par la cytométrie en flux (FC). Le cytomètre a permis de déterminer le phénotype des vésicules et de confirmer l'origine plaquettaire des VEs en utilisant deux anticorps fluorescents dirigés contre CD41 et CD31 qui sont considérés comme des marqueurs plaquettaires. La FC a permis aussi de déterminer la distribution en taille et la concentration des vésicules de dimension supérieure à 300 nm.

Au sein de notre laboratoire, nous avons utilisé l'appareil Qnano, qui utilise le principe de TRPS, pour caractériser les PVEs dans les 2 échantillons. En utilisant un NP100, l'analyse a été très compliquée à cause des problèmes de colmatage du pore. Le NP200 a permis de détecter les vésicules entre 100 et 600 nm. Les résultats montrent que la très grande majorité des vésicules dans les deux échantillons a un diamètre inférieur à 300 nm. Ceci se traduit par une différence notable de concentration vésiculaire entre le Qnano et la FC (de deux ordres de grandeurs) montrant que cette dernière technique ne détecte qu'une minime fraction des vésicules dans l'échantillon.

Dans un deuxième temps, nous avons appliqué la plateforme NBA pour étudier ces deux échantillons, et plus précisément la SPRi et l'AFM. La capture des PVEs à la surface est spécifique et reproductible avec un signal non spécifique négligeable. Dans une approche multiplexe (puces à 16 spots), nous n'avons pas détecté de différences significatives dans l'expression des cibles d'intérêt par les VEs dans les deux échantillons. Ceci peut être du soit à une non reproductibilité de l'étape d'activation des plaquettes par le collagène, soit à une activation passive des plaquettes utilisées pour générer les PVEs-basales, durant la phase d'incubation.

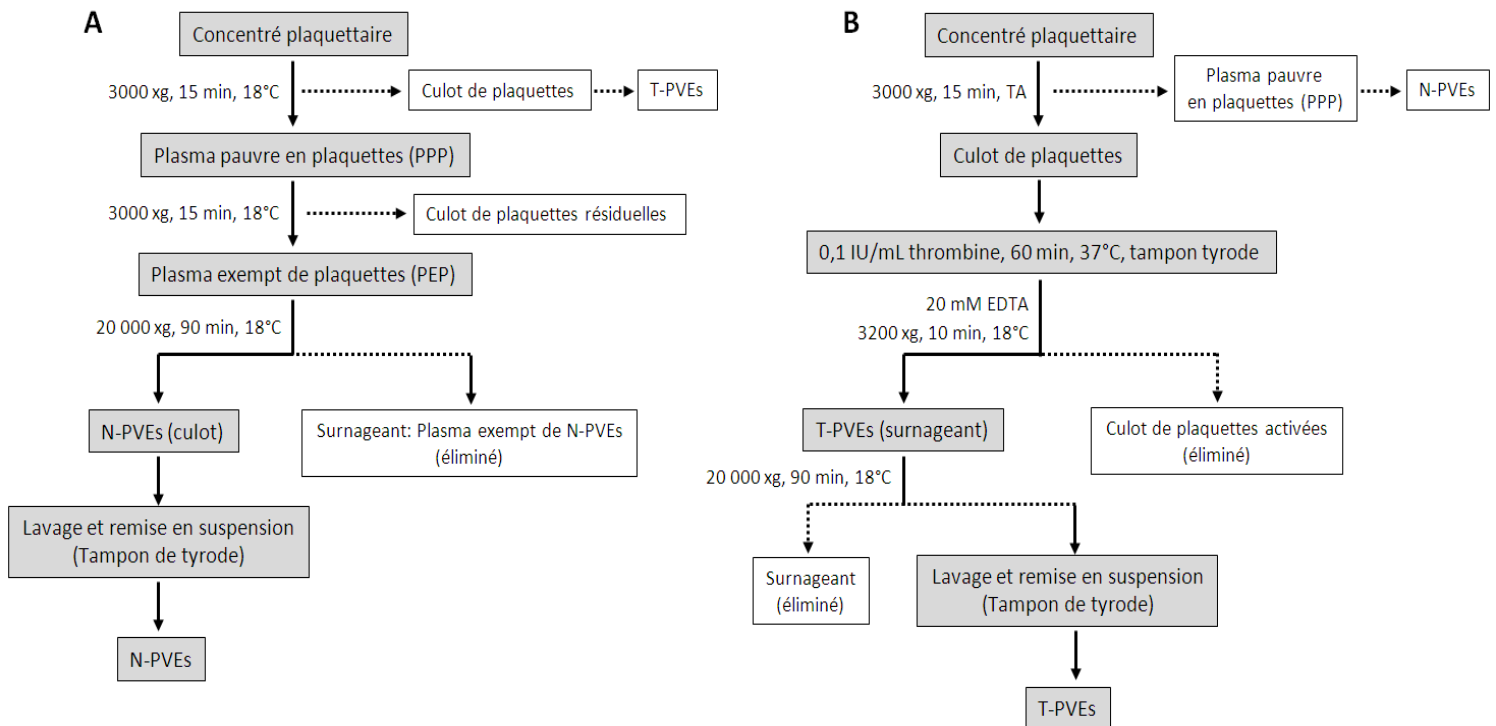
L'analyse AFM a été réalisée en duplicat pour les deux types d'échantillons en mesurant des milliers de PVEs-CD41+. L'analyse montre que les PVEs-basales sont plus petites que les PVEs-col avec des diamètres effectifs de 61,8 et 68,9 nm respectivement. De plus, la majorité des vésicules ( $\approx 80\%$ ) sont en dessous de 100 nm, et une petite fraction ( $< 2\%$ ) est supérieure à 300 nm (la LOD de la FC). Néanmoins, notre approche NBA et la cytométrie sont des approches très complémentaires avec un overlap dans les zones de 300-1000 nm. Nous avons ainsi pu mettre en évidence que le ratio de vésicules (300-500)/(500-1000) est similaire entre ces deux techniques comme le montre la figure suivante (Fig.69).



**Fig. 69** : Distribution en taille des VEs déterminée par AFM (cercles noirs) et par cytométrie en flux FC (carrés rouges) pour un même échantillon de PVEs basales, mettant en évidence des ratios identiques (300–500)/(500–1000) nm pour les deux techniques.

### 3.2. Etude différentielle des P-VEs basales et des P-VEs activées à la thrombine

Un deuxième type de VEs a été fourni par le professeur T. Burnouf: (i) des VEs produites à partir de plaquettes au repos (concentrés plaquettaire), appelées N-PVEs, et (ii) des VEs



**Fig. 70** : Protocole de préparation des P-VEs basales (N-PVEs) et des PVEs activées à la thrombine (T-PVEs), développé par notre collaborateur T. Burnouf.

produites à partir de plaquettes stimulées par de la thrombine, une enzyme capable de transformer le fibrinogène en fibrine, appelées T-PVEs (Fig. 70). Notre collègue s'intéresse à l'amélioration de la qualité de la transfusion sanguine. Le but est d'explorer le rôle des VEs plaquettaires, présentes dans le plasma et les produits sanguins, dans différents processus physiologiques tels que la coagulation.

L'équipe du Professeur T. Burnouf a procédé à un certain nombre de caractérisations métrologique et fonctionnelle sur ces PVEs au travers d'instrumentations et des méthodes conventionnelles.

D'une part, ils ont en effet caractérisé différents lots de chaque type d'échantillon par la technique DLS et NTA; les résultats sont présentés dans les annexes 8 et 9 respectivement. L'analyse DLS a montré une taille moyenne de N-PVEs qui est inférieure à celle des T-PVEs, avec  $273\pm 11$  et  $415\pm 100$  nm respectivement. L'analyse NTA montre une distribution en taille des PVEs entre 100 et 600 nm. Plusieurs pics ont été obtenus pour chaque échantillon, mais généralement un pic majoritaire correspondant à un diamètre d'environ 150 nm a été observé pour les différents échantillons analysés. L'analyse NTA a montré une très légère augmentation en taille de T-PVEs par rapport à N-PVEs ( $239\pm 29$  et  $226\pm 4$  nm respectivement). De plus, les concentrations des différents échantillons, déterminées par la NTA, sont entre  $1\times 10^{11}$  et  $6\times 10^{12}$  vésicules/mL; la concentration moyenne des 4 lots de N-PVEs analysés ( $1,98\times 10^{12}$  vésicules/mL) est plus importante que celle de T-PVEs ( $2,09\times 10^{11}$  vésicules/mL).

D'autre part, les deux types d'échantillons, N et T-PVEs, ont été incubés *in vitro* séparément avec des cellules monocytaires (THP1). Les résultats montrent que les T-PVEs, à la différence des N-PVEs, induisent une agrégation des cellules monocytaires. De plus, les deux échantillons ont induit la stimulation de la libération des VEs, exprimant le facteur tissulaire (TF) par les cellules monocytaires.

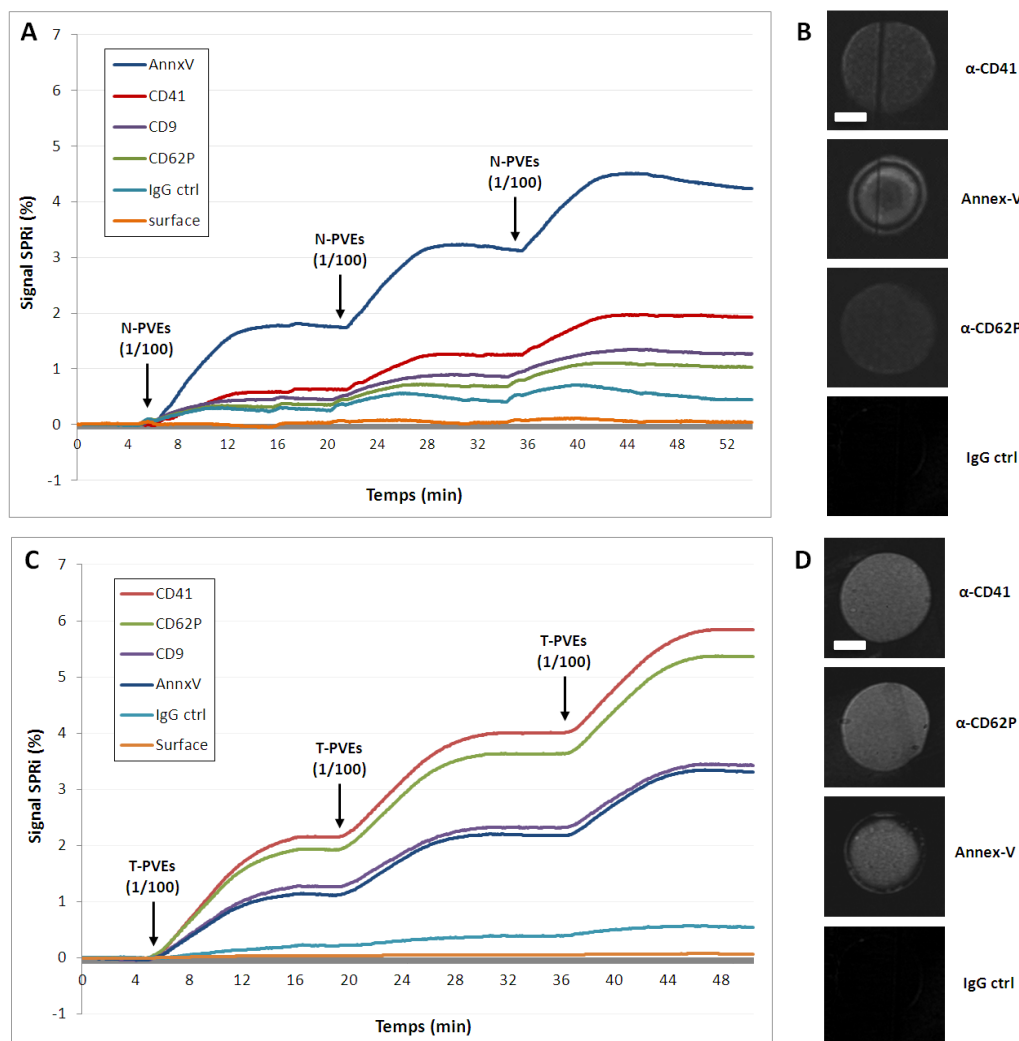
Sur la base des observations faites par nos collaborateurs, nous avons convenu ensemble de caractériser ces PVEs, par notre plateforme NBA, pour déterminer les différentes sous-populations de vésicules présentes dans chaque échantillon ainsi que leur distribution en taille.

Nous avons tout d'abord effectué un dosage protéique, par la méthode BCA, de ces 2 échantillons; la concentration en protéines de l'échantillon N-PVEs est supérieure à l'échantillon T-PVEs, avec 6,62 et de 2,42 mg/mL respectivement. Cette différence en concentration protéique peut provenir du fait que l'échantillon N-PVEs contient des protéines plasmatiques qui sédimentent avec les N-PVEs lors de la dernière étape de centrifugation à 20 000 g. De plus, l'échantillon de T-PVEs, étant préparé à partir de plaquettes qui ont été isolées à partir de concentrés plaquettaires, pourraient être moins contaminé par ces protéines.

### **3.2.1. Immunocapture des VEs plaquettaires sur puce**

Deux expériences de capture ont été réalisées pour chaque type d'échantillon (N et T-PVEs)

en utilisant des puces multiplexées à 16 spots de ligands déposés en duplicat ou triplicat selon le ligand. A chaque fois, 3 injections de PVEs successives ont été réalisées à la même dilution (1/100) pendant 10 min chacune. La figure 71 présente les sensorgrammes enregistrés lors des injections. Il faut noter que les deux échantillons utilisés pour l'immuno-capture n'ont pas été caractérisés par d'autres techniques et le nombre de vésicules dans chaque échantillon est inconnu.

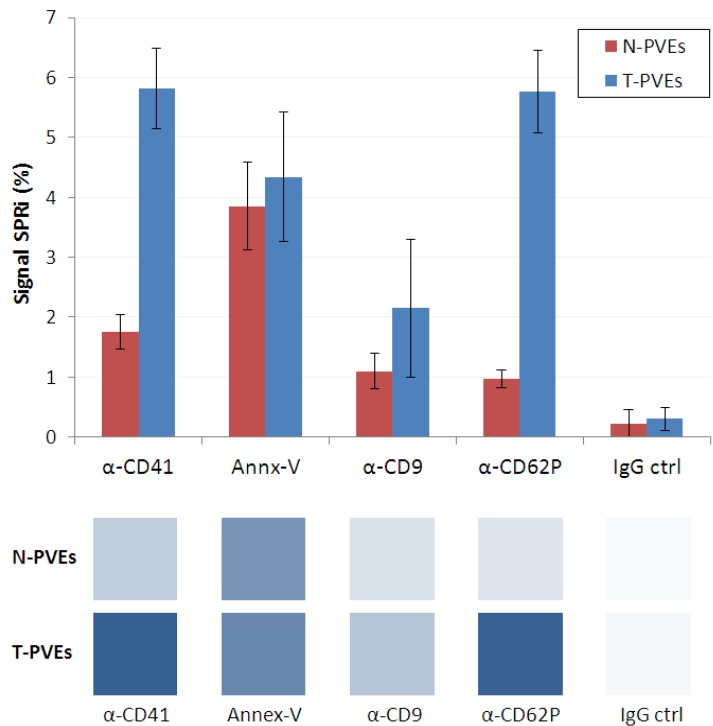


**Fig. 71** : Capture des P-VEs sur biopuce: (A) trois injections successives des N-PVEs, à une dilution au 100<sup>ème</sup>. (B) Images de contraste SPRi de différents spots prise à la fin de la capture des P-VEs basales. (C) trois injections successives de T-PVEs diluées au 100<sup>ème</sup>. (D) Images de contraste SPRi des spots prise à la fin des injections. Chaque injection a été réalisée avec un débit de 20  $\mu$ L/min, pendant 10 min. Barres d'échelle de 500  $\mu$ m.

La résultats d'immuno-capture montrent que le taux de capture des PVEs, dans les 2 cas, est reproductible pour chaque injection ce qui suggère une non-saturation de la surface d'immuno-capture au fur et à mesure des injections. De plus, sur les spots contrôles (spots d'IgG et ROI sur surface) le signal est très faible voire nul dans les 2 cas, ce qui atteste d'une bonne spécificité de capture.

La Fig. 72 présente un histogramme montrant les valeurs moyennes des taux de capture sur chaque spot de ligand obtenues à partir d'analyses en duplicat réalisées pour chaque échantillon.

**Fig. 72 :** Bilan des expériences de capture des N et T-PVEs : (A) Taux de capture moyen des VEs sur les différents ligands, obtenus à partir de deux expériences réalisées pour chaque échantillon, suite à 3 injections successives des vésicules, à une dilution au 1/100 et pendant 10 min chacune. Les différentes injections sont réalisées à 20  $\mu\text{L}/\text{min}$ . les barres d'erreurs désignent l'écart type des taux de capture sur les différents spots d'un ligand donné. (B) Représentation par échelle colorimétrique des taux de capture de VEs sur les différents ligands.



Le taux de capture moyen sur les spots Annex-V est similaire, pour les deux échantillons, avec  $3,85 \pm 0,73$  et  $4,34 \pm 1,07\%$  pour N et T-PVEs respectivement. Les taux de capture de T-PVEs sur  $\alpha\text{-CD41}$  et  $\alpha\text{-CD62P}$  sont 3,3 et 6 fois supérieurs à ceux de N-PVEs, respectivement. Il faut préciser que le CD62P est un marqueur de l'activation des plaquettes, nos résultats semblent donc confirmer l'activation effective des plaquettes, activation qui est à l'origine de la production des T-PVEs.

D'autre part, le signal d'immunocapture sur le spot  $\alpha\text{-CD9}$  dans l'échantillon de T-PVEs est environ deux fois plus important que chez les N-PVEs (Fig 72).

En se basant sur les résultats obtenus à partir des deux tests de capture réalisés pour chaque échantillon, nous constatons que la capture est reproductible sur chaque ligand lorsque les échantillons sont injectés à la même concentration. Aussi, les taux de capture supérieurs de T-PVEs, par rapport aux N-PVEs, sur  $\alpha\text{-CD41}$ ,  $\alpha\text{-CD62P}$  et  $\alpha\text{-CD9}$ , mais par sur Annex-V, pourrait refléter soit une plus grande concentration en vésicules exprimant ces marqueurs dans l'échantillon, soit une densité plus importante de ces marqueurs à la surface des T-PVEs.

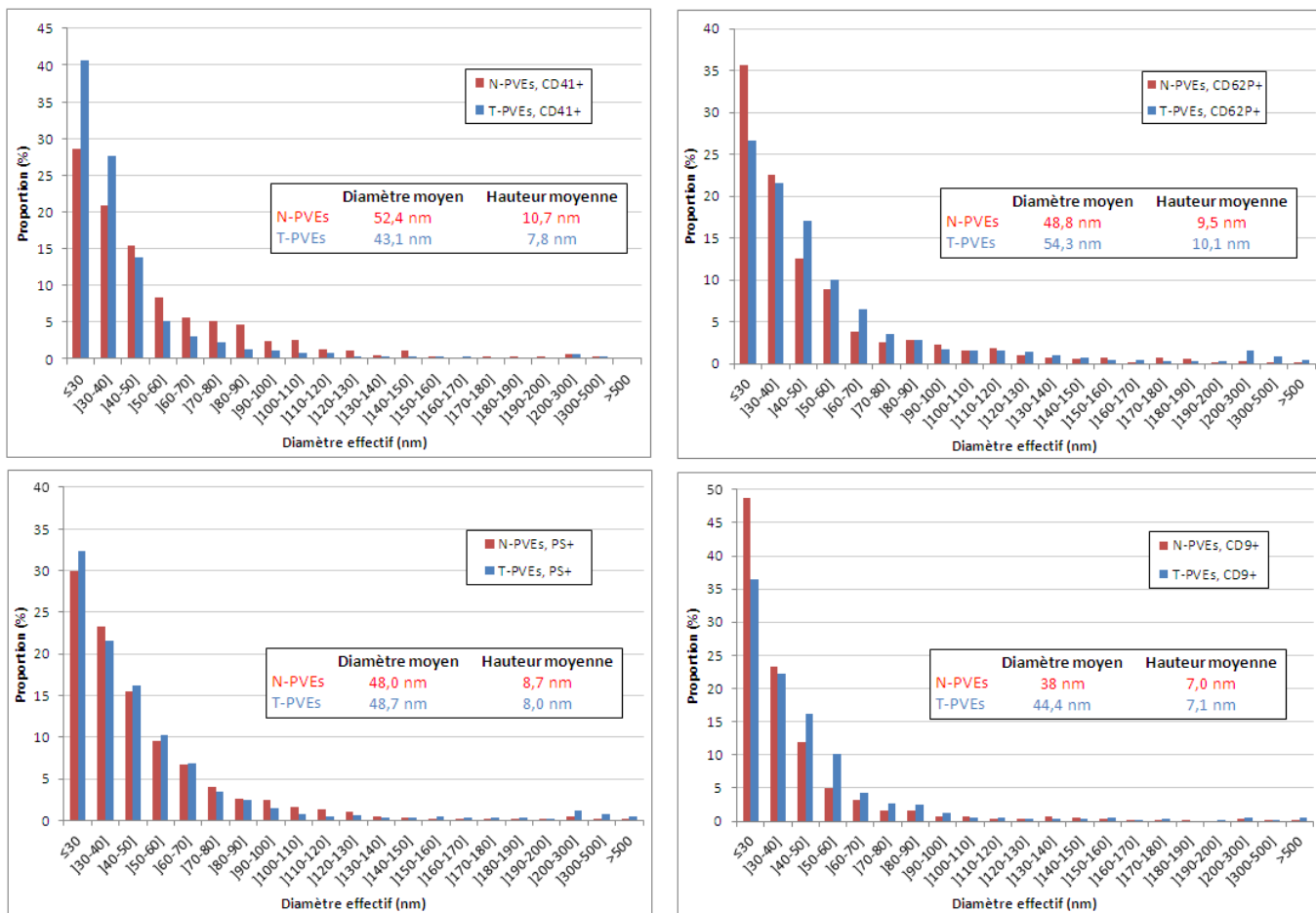
### 3.2.2. Nanométrie des PVEs

Pour comparer la taille des différentes sous-populations de PVEs dans les deux échantillons, une analyse AFM a été engagée sur les différents spots de biorécepteurs présents à la surface de deux puces ayant vu soit les N soit les T-PVEs. L'analyse AFM a été réalisée en air, et au moins 1000 vésicules ont été mesurées pour chaque ligand.

Les résultats montrent une distribution en taille des vésicules différente entre les deux, avec une distribution qui est ligand-dépendante. Comme dans le cas du premier projet avec l'EFS, la

majorité des vésicules (>80%) présente une taille  $\leq 100$  nm (Fig. 73).

- Les PVEs CD41+ sont plus petites dans l'échantillon activé avec un diamètre effectif moyen de 43,1 nm contre 52,4 nm pour l'échantillon basal ; ainsi la hauteur moyenne est de 7,8 nm et 10,7 nm pour T et N-PVEs respectivement.
- Les vésicules CD62P+ montrent une taille moyenne plus petite dans l'échantillon de N-PVEs (48 nm) par rapport à T-PVEs (54,3 nm).
- Les VEs CD9+ montrent une taille plus petite dans l'échantillon de N-PVEs (38 nm) par rapport à T-PVEs (44,4 nm). La taille des PVEs-CD9+, dans les deux échantillons, est la plus petite comparée aux autres sous-populations de vésicules. Ceci est logique si l'on part du principe que les vésicules CD9+ correspondent essentiellement à des exosomes et des petites VEs.
- Les PVEs-PS+ ont une distribution en taille et un diamètre moyen très similaires dans les deux échantillons.



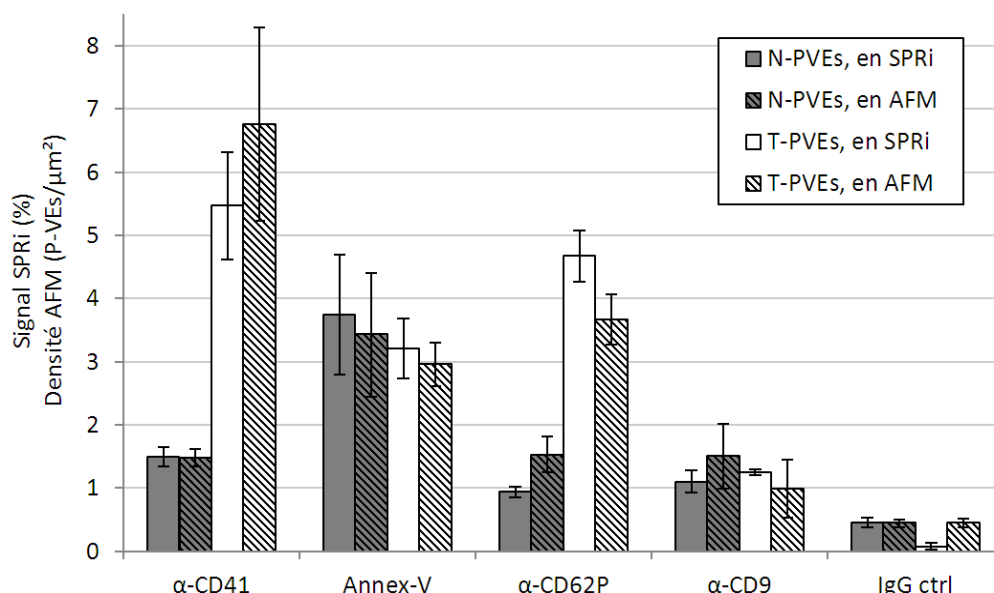
**Fig. 73 :** Analyse AFM des T et N-PVEs: les différents spots sur 2 puces, ayant vu soit l'échantillon de N-PVEs soit l'échantillon de T-PVES, ont été scannés en air. Les histogrammes montrent la distribution en taille (diamètre effectif calculé) de différentes sous-populations de vésicules dans les 2 échantillons. En insert, un tableau montrant le diamètre effectif moyen ainsi que la hauteur moyenne mesurée des vésicules.



D'autre part, nous avons étudié la relation entre le taux de capture des vésicules (signal SPRi %) sur chaque spot de ligand avec la densité surfacique de vésicules (nombre de vésicules/mm<sup>2</sup>) sur différents spots de biorécepteurs, par AFM. La synthèse des résultats est présentée en fig. 74 et montre une bonne corrélation entre ces deux paramètres pour les différents ligands.

Les spots  $\alpha$ -CD41, scannés par AFM, ayant vu un taux de capture de 1,5 %, dans le cas de N-PVEs, et de 5,5 %, dans le cas de T-PVEs, montrent des densités de 1,5 et de 6,8 PVEs/ $\mu$ m<sup>2</sup> respectivement. De même, la densité des N-PVEs sur les spots Annex-V était de 3,4 VEs/ $\mu$ m<sup>2</sup> pour un taux de capture de 3,7%, et de 2,9 VEs/ $\mu$ m<sup>2</sup> pour un taux de capture de 3,3% de T-PVEs; ainsi, une bonne corrélation de ces deux paramètres a été observée sur les spot  $\alpha$ -CD9 et  $\alpha$ -CD62P. Une faible densité (0,06 - 0,4 VEs/ $\mu$ m<sup>2</sup>) de VEs a été observée sur les spots d'IgG contrôle pour les deux échantillons. Ces résultats valident que le signal SPRi obtenu suite à l'injection des vésicules sur la biopuce est bien généré par la capture de vésicules et non pas à la capture de contaminants tels que des composées protéiques ou autres.

**Fig. 74** : Relation entre la densité des VEs à la surface (nb. PVEs/ $\mu$ m<sup>2</sup>) et le taux de capture (%) par les différents ligands. Les barres d'erreurs pour le signal SPRi désignent l'écart-type entre les taux de capture sur les différents spot d'un ligand donné, et l'écart-type entre la densité des VEs sur différentes zones scannées d'un ligand donné.



### 3.2.3. Conclusion sur l'étude de N- et T-PVEs par SPRi/AFM

Dans cette partie nous avons appliqué la plateforme NBA pour étudier deux types de VEs plaquettaires : des VEs isolées à partir de concentrés plaquettaires au repos (N-PVEs), et des VEs générées par des concentrés plaquettaires suite à leur stimulation par la thrombine (T-PVEs).

Dans un premier temps, nous avons étudié le phénotype des PVEs par injection de chaque échantillon, à la même dilution, à la surface d'une puce présentant différents spots de ligands. Le taux de capture des PVEs sur les différents ligands était différent entre les deux échantillons avec une augmentation du taux capture des PVEs sur les spots  $\alpha$ -CD62P, pour l'échantillon de T-

PMPs, ce qui est un indicateur de l'activation des plaquettes.

Nous avons pu montrer également que la capture était reproductible, pour les deux échantillons, sur les différents ligands à travers 2 expériences réalisées pour chaque échantillon, dans le cadre d'expériences réalisées en duplicat ou triplicat.

L'analyse AFM, des différentes sous-populations de PVEs, montre que la majorité des vésicules (>80%) sont en dessous de 100 nm. La taille moyenne des vésicules change entre les différentes sous-populations de PVEs pour un échantillon donné mais aussi entre les 2 types d'échantillon. Il faut noter que ces résultats ont été obtenus suite à l'analyse d'un lot pour chaque type d'échantillon, il sera nécessaire de valider ces données avec une analyse sur d'autres lots pour chaque type d'échantillon afin de consolider cette étude.

D'autre part, en comparant le diamètre effectif moyen des VEs-CD41+ dans les échantillons de T et N-PVEs (Taiwan) avec celui de PVEs dans les échantillons fournis par l'EFS, nous pouvons remarquer que la taille des vésicules dans les échantillons de l'EFS est plus grande que celle des PVEs dans les échantillons de Taiwan, avec  $\approx 65$  nm contre  $\approx 47$  nm pour les deux types d'échantillon respectivement. Cette différence peut être due à l'abondance ( $\approx 58\%$ ) des petites vésicules (<40nm) dans les échantillons de N et T-PVEs, alors que les PVEs dans cette fenêtre de taille représente une proportion de  $\approx 35\%$  dans les échantillons fournis par l'EFS. La plus grande proportion de VEs de petite taille dans les échantillons de N et T-PVEs peut être expliquée par le fait que les PVEs de ces échantillons sont isolées suite à une centrifugation à 20 000 g (pendant 90 min); par contre les PVEs fournis par l'EFS sont isolées par une centrifugation à une plus faible accélération de 15 000 g (pendant 90 min). Cette faible augmentation de la vitesse de centrifugation peut expliquer l'augmentation de la proportion des petites vésicules dans les échantillons de N et T-PVEs. Il faut donc aussi garder à l'esprit la différence dans les protocoles pré-analytiques (préparation des PVEs) entre les deux projets collaboratifs, pouvant expliquer ces différences en taille de PVEs.

Une corrélation positive est obtenue entre le taux de capture, mesuré par SPRi, sur chaque ligand, et la densité de vésicules à la surface de chaque spot de ligand, déterminé par l'analyse AFM. Cette corrélation confirme que le signal de capture obtenu en SPRi est essentiellement dû à la capture des VEs à la surface.

#### **3.2.4. Analyse protéomique de VEs plaquettaires**

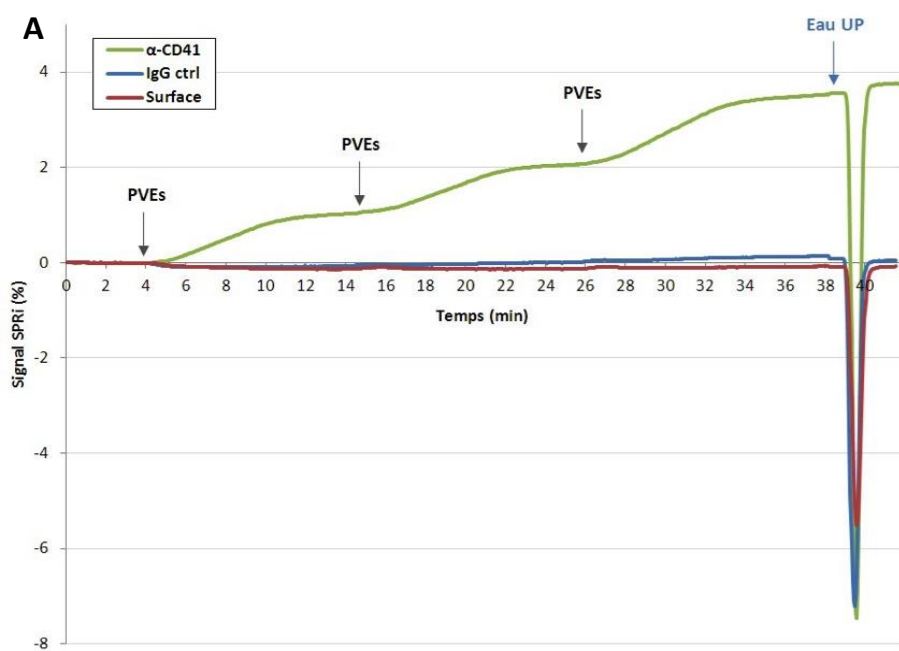
Au cours de ce projet, différentes analyses protéomiques (MS) ont été réalisées pour étudier la composition en protéines des différents types de VEs plaquettaires, que ce soit celles fournies par l'EFS (PVEs-basales et PVEs-col) ou celles fournies par le prof. T. Burnouf (N-PVEs et T-PVEs). Dans cette partie nous décrivons de manière globale les analyses protéomiques des vésicules capturées à la surface d'une puce ainsi que les paramètres que nous avons optimisés

pour améliorer cette analyse. Dans un deuxième temps nous présenterons de manière détaillée les résultats obtenus sur les échantillons N et T-PVEs.

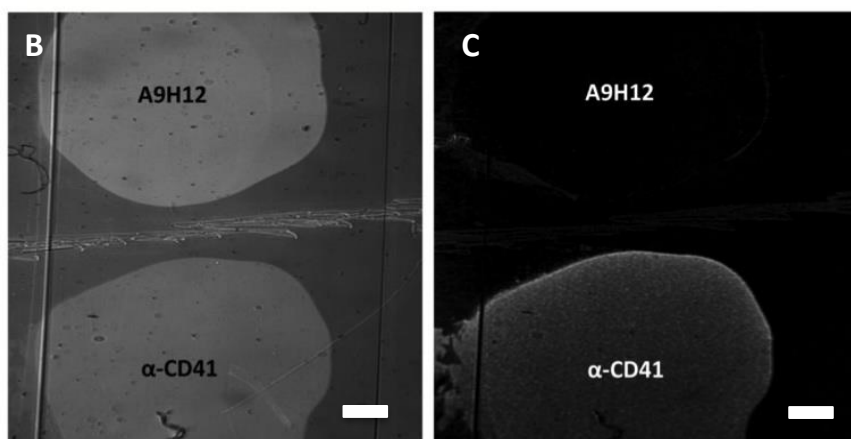
### 3.2.4.1. Conditionnement de la puce en vue de l'analyse MS

Comme indiqué dans la partie « 4.2. Couplage SPRi-MS » du chapitre II, il est recommandé de ne pas utiliser le glutaraldéhyde qui engendre des liaisons inter-moléculaires (par cross-linking) et biaise les spectres MS. A l'issue des processus d'immunocapture, nous procédons à un lavage de la surface avec de l'eau ultrapure (eau UP) afin de remplacer le tampon de course et d'éviter la formation des cristaux de sels à la surface de la puce lors du séchage en dehors de l'instrument SPRi-Plex. Nous avons alors évalué l'effet de l'injection d'eau UP, dans l'instrument, sur le taux de capture des VEs à la surface.

La Fig. 75 montre une injection d'eau UP suite à la capture des PVEs (basales, de l'EFS) sur une surface présentant deux macrospots: un spot correspond à l' $\alpha$ -CD41 et l'autre à une IgG contrôle. L'injection d'eau UP n'a pas engendré de diminution du signal (signe d'une dégradation



**Fig. 75 :** Effet de l'eau sur la capture des VEs : (A) 3 injections successives, de 10 min, de P-VEs basales à la surface d'une biopuce présentant deux macrospots : un correspond à l' $\alpha$ -CD41 et l'autre à une IgG contrôle (A9H12). Une injection d'eau ultrapure (UP) a été réalisée suite à la capture des VEs. Les échantillons de P-VEs ont été injectés à une concentration de  $3 \times 10^7$  VEs/mL, selon l'analyse par cytométrie en flux, et à un débit de 20  $\mu$ L/min. Les injections d'eau ont été réalisées à 50  $\mu$ L/min. (B) Image de la surface de la biopuce montrant les 2 macrospots. (C) Image de contraste SPRi montrant la surface de la puce après capture des PVEs. Barres d'échelles de 1 mm.

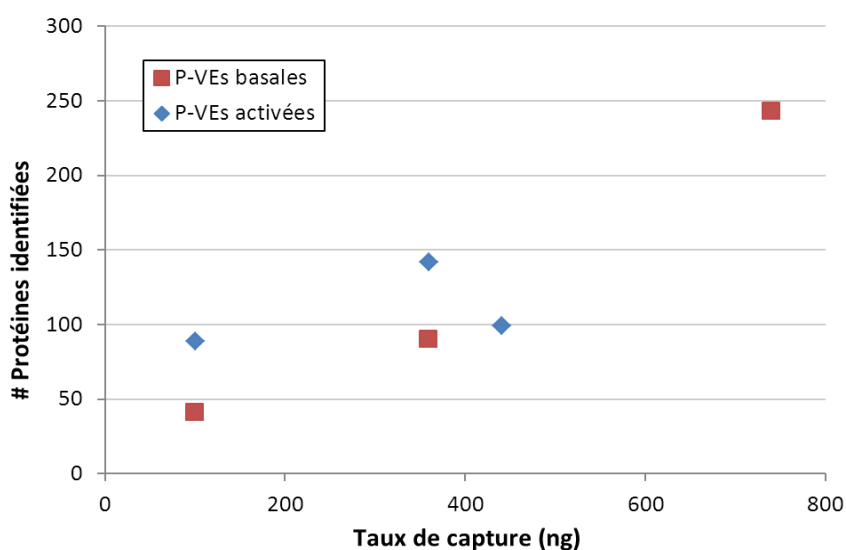


de l'intégrité des structures vésiculaires ou d'un processus de dissociation). La légère augmentation du signal ( $\approx +0,2\%$ , soit 5% du signal maximal d'immunocapture des PVEs) sur l' $\alpha$ -CD41 peut être due à un petit effet de l'eau sur la morphologie des VEs capturées.

### 3.2.4.2. Impact de la quantité de PVEs capturées sur les résultats MS

Suite à l'analyse de différentes puces présentant différents taux de capture de PVEs, nous avons exploré le lien entre le taux de matériel total capturé à la surface avec le nombre de protéines identifiées par l'analyse MS. La fig. 76 montre une corrélation entre la quantité totale de matériel à la surface (ng), calculée à partir du signal SPRi, et le nombre de protéines identifiées par MS. De plus, nous pouvons remarquer que, pour une même quantité de matériel à la surface, les échantillons de PVEs-activées révèlent une plus grande richesse en protéines par rapport aux échantillons de PVEs basales.

Grace à ces résultats, nous avons choisi de réaliser les tests de capture sur un tapis de ligand qui couvre toute la surface de la biopuce. Cette stratégie va nous permettre d'accroître la quantité de PVEs à la surface de la puce et ainsi la quantité de chaque protéine constitutive des VEs ou transportée par celles-ci. Ceci dans le but de rendre les identifications encore plus fiables (score mascot) et d'accroître le nombre de protéines par l'abaissement du seuil de sensibilité de l'analyse MS.



**Fig. 76 :** Corrélation entre le nombre de protéines identifiées par l'analyse MS et le taux de capture (protéines, en ng), estimé à partir du signal SPRi. Les différents points correspondent à différentes analyses MS faites pour des P-VEs basales et activées capturées sur puce via des anticorps  $\alpha$ -CD41.

### 3.2.4.3. Analyse protéomique différentielle de N et T-PVEs

Le but de cette analyse est d'explorer les profils protéomiques de N et T-PVEs pour mieux comprendre la différence en biogenèse et en activité physiologique de ces deux types de vésicules.

Chaque échantillon a été injecté à la surface d'une puce présentant un tapis d'anticorps  $\alpha$ -

CD41. Ce dernier a été choisi pour capturer exclusivement les vésicules plaquettaires dans chaque échantillon. De plus, afin de pouvoir ultérieurement comparer les résultats de manière significative, nous avons voulu avoir le même taux de capture à la surface des puces pour les deux échantillons. Nous avons obtenu un taux de capture de 5%, pour les deux échantillons, qui correspond approximativement à une quantité totale de matériel d'environ 100 ng à la surface de chaque puce.

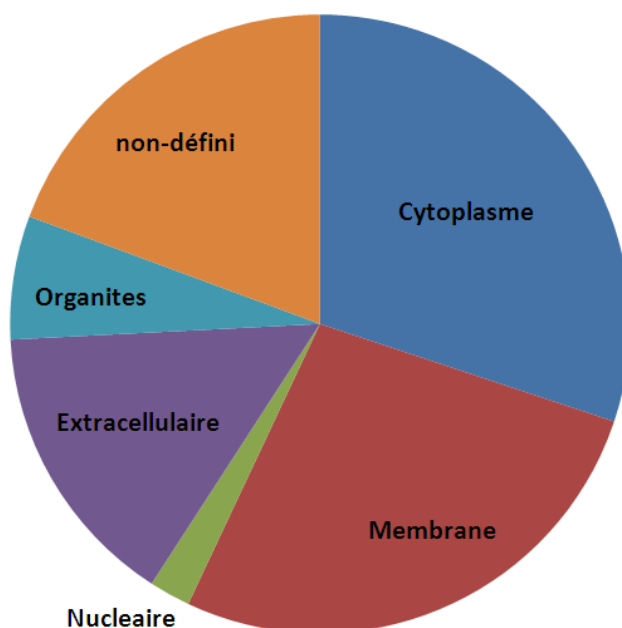
Deux autres puces ont été préparées en appliquant sur chacune un tapis d'IgG contrôle (A9H12). Sur une des puces, nous avons injecté les N-PVEs basales, et sur l'autre des T-PVEs. Ces deux puces servent de contrôle négatif pour l'analyse MS.

L'analyse MS des deux échantillons a abouti à l'identification de 90 protéines pour les T-PVEs, dont 47 sont identifiées avec au moins deux peptides. Par contre, seulement 47 protéines ont été identifiées chez les N-PVEs, dont 26 avec aux moins deux peptides (Annexe 10). Ces données montrent que l'échantillon de T-PVEs semble être plus riche en protéines que celui de N-PVEs. Il est à noter que la majorité des protéines identifiées sont communes avec celles identifiées chez des PVEs fournies au sein du projet avec l'EFS (PVEs-basales et PVEs-col).

L'analyse MS des puces contrôle n'a révélé aucune protéine sauf des peptides correspondant aux anticorps IgG contrôle greffés à la surface, attestant encore une fois de la spécificité de capture sur nos biopuces.

Parmi les protéines identifiées, d'un point de vue analyse différentielle, 50 protéines ont été identifiées exclusivement chez les T-PVEs, alors que 7 protéines ont été identifiées exclusivement chez les N-PVEs. D'autre part, la majorité des protéines identifiées sont des protéines cytoplasmiques (30%) et membranaires (27%) (Fig. 77), mais aussi des protéines d'origines nucléaires, endoplasmiques (réticulum endoplasmique, mitochondrie, etc.) et extracellulaires (espace extracellulaire et secrétées).

Parmi les protéines membranaires identifiées nous trouvons différentes intégrines tels que l'intégrine alpha 2b (CD41) et l'intégrine  $\beta$ 3 (CD61) qui sont exprimées par les plaquettes et alors retrouvées chez les vésicules extracellulaires libérées par ces cellules. Ces deux intégrines sont identifiées plus abondamment chez les T-PVEs activées par rapport aux PVEs basales; en tenant compte de ces



**Fig. 77** : Protéines identifiées des PVEs capturées sur puce  $\alpha$ -CD41, selon leur localisation subcellulaire.

données et du fait que les puces analysées en MS présentaient la même quantité de matière capturées (90 ng) qu'il s'agisse de l'échantillon de PVEs basales ou activées, nous pouvons émettre l'hypothèse que les T-PVEs expriment plus abondamment ces deux intégrines (CD41/CD61) à leur surface par rapport aux N-PVEs. Cette observation confirme les résultats précédents de la capture de ces échantillons qui a montré un taux de capture 3 fois plus important des T-PVEs sur les spots de  $\alpha$ -CD41 par rapport aux N-PVEs ( $\approx$  6% et 2%, respectivement) (Partie « 3.2.1. Immunocapture des PVEs » de ce chapitre).

Deux autres intégrines ont été identifiées chez les T-PVEs exclusivement : l'intégrine alpha-6 (CD49) et l'intégrine beta-1 (CD29). Ces deux intégrines sont décrites dans la littérature pour être exprimées à la surface des plaquettes, et elles participent à différents processus biologiques tels que l'adhésion intercellulaire et l'adhésion des cellules aux matrices extracellulaires. Il est à noter que l'identification de ces deux intégrines exclusivement chez les T-PVEs n'empêche pas le fait qu'elles soient aussi exprimées chez les PVEs basales mais en moindre quantité. Ces observations doivent être confirmées par d'autres analyses MS pour ces deux échantillons mais en augmentant la quantité des vésicules sur la puce. Des telles identifications sont prometteuses et devraient permettre de déterminer de nouvelles signatures protéiques des différents types de VEs.

D'autre part, différentes protéines identifiées sont reliées au cytosquelette et à son organisation ; parmi ces protéines nous trouvons la filamine-A, taline-A, la tubulin-1, gelsoline et actine ; ces différentes protéines ont été identifiées soit exclusivement chez les T-PVEs activées soit de manière plus fréquente chez ces dernières. Ceci démontre l'engagement du cytosquelette dans le processus de la biogenèse d'au moins une partie de VEs libérées par les plaquettes, avec un tel processus qui serait particulièrement sollicité dans la formation de VEs lors de l'activation plaquettaire.

La protéine HSP70 (Heat-shock protein-70KDa) a été identifiée exclusivement chez les T-PVEs. Cette même protéine a été aussi identifiée spécifiquement chez un lot de PVEs activées au collagène (projet EFS). La HSP70 est une protéine qui intervient dans la réponse cellulaire au stress.

Différentes autres protéines reliées à l'activation des plaquettes ont été identifiées exclusivement chez les T-PVEs activées, telle que la protéine VASP (Vasodilator-stimulated phosphoprotein isoform 1) et la tétraspanine CD9 (qui marque l'activation des plaquettes et qui serait un indicateur de la production d'exosomes).

Les protéines qui sont identifiées exclusivement dans l'échantillon de N-PVEs ou plus abondamment dans ce dernier sont des protéines extracellulaires plasmatiques qui sont probablement des contaminants telle que le fibrinogène-alpha, un facteur de coagulation, qui a été détecté environ 20 fois plus dans l'échantillon basale par rapport aux PVEs activées. Ceci va dans le sens des résultats du dosage protéique de ces deux échantillons qui a montré que

l'échantillon basal était plus concentré en protéines par rapport à l'échantillon activé. Ceci renforce l'hypothèse de la présence de protéines plasmatiques contaminantes dans ces échantillons de N-PVEs.

#### **3.2.4.4. Exploitation des données protéomiques par le logiciel STRING**

Au delà de l'identification des protéines, les résultats de protéomique peuvent être exploités à travers d'analyses biostatistiques. Des études préliminaires ont été menées avec l'aide du logiciel STRING permettant de mettre en évidence certaines voies de signalisation spécifiques aux deux échantillons PVEs-basales et activées. Une représentation schématique en « clusters » est donnée en Fig. 78.

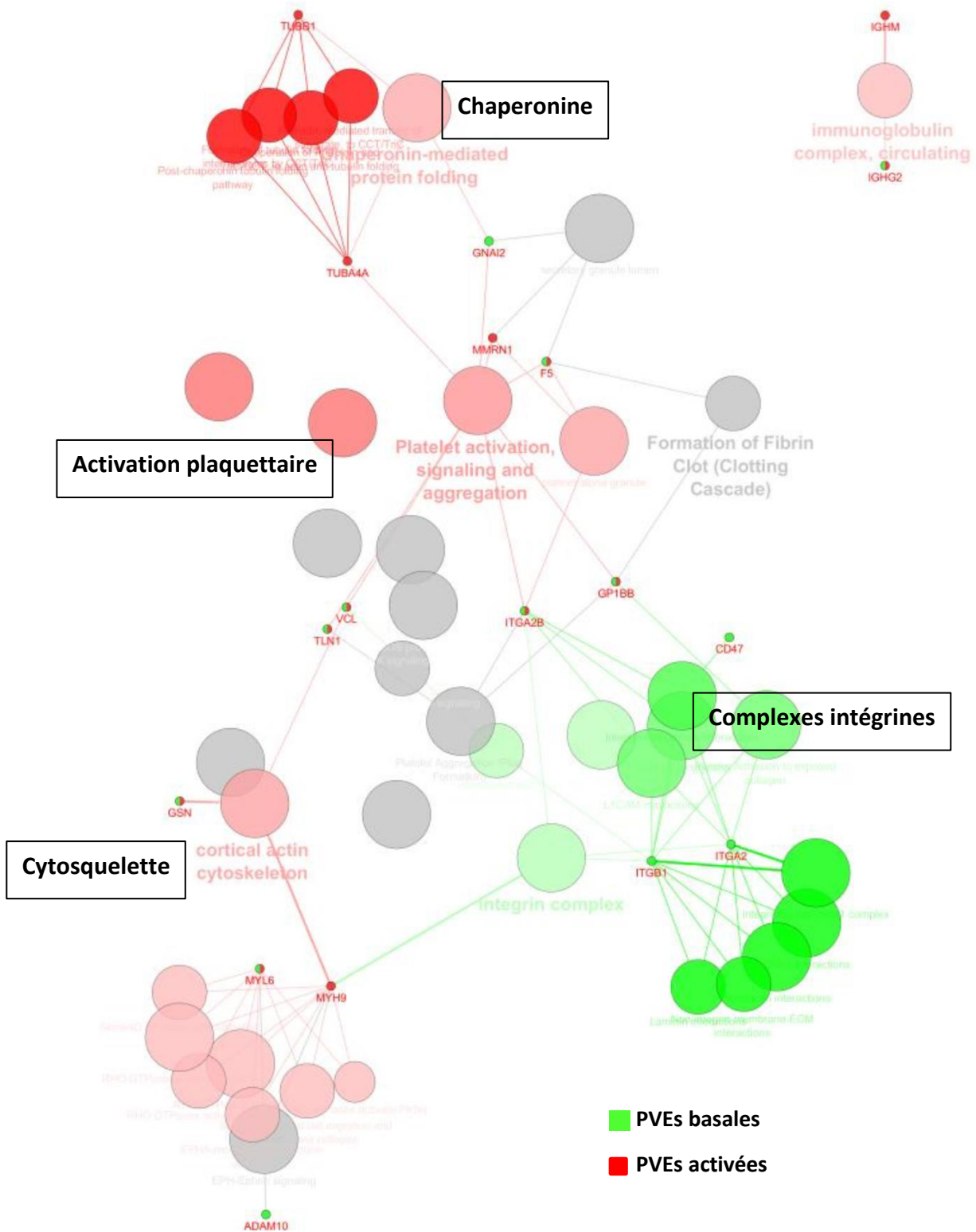
#### **3.2.4.5. Conclusion sur l'étude protéomique de PVEs**

Les résultats des différentes analyses protéomiques, accomplies dans les derniers mois de la thèse, sont préliminaires mais très encourageants, et montrent la faisabilité d'une analyse différentielle pertinente entre les échantillons de N-PVEs et T-PVEs.

Ces analyses nécessitent d'être affinées et reproduites, afin de confirmer les données obtenues. Ainsi, une augmentation du taux de capture des échantillons à la surface de la puce va aboutir probablement à augmenter de manière significative le nombre de protéines identifiées par MS. Le signal de capture maximal que nous avons obtenu pour les VEs en SPRi était d'environ 40%; cela correspond à une quantité totale de matériel à la surface d'environ 800 ng de protéines. Or, l'analyse MS pour les N et T-PVEs a été réalisée pour une quantité < 100 ng pour chaque échantillon. Nous pouvons donc espérer des résultats d'identification plus importants et plus robustes. Bien que les quantités capturées soient modestes au regard des analyses protéomiques classiques (<1µg vs >10µg), la spécificité des échantillons analysés, grâce à la sélectivité des ligands, offre un degré de pureté assurant une identification efficace des protéines majoritaires des sous-populations de VEs.

D'autre part, les analyses MS ont été réalisées avec des protocoles relativement conventionnels d'hydrolyse/élution/ionisation adaptés aux protéines hydrosolubles. Il se trouve que les collègues de la plateforme CLIPP développent actuellement d'autres stratégies d'élution de matériels de la surface afin d'optimiser l'extraction des protéines membranaires et ainsi améliorer encore la sensibilité et l'exhaustivité de l'analyse MS des VEs en accédant à un pool de protéines supérieur.

L'avantage de cette stratégie, couplant le SPRi avec l'analyse MS, consiste en une analyse protéomique sélective d'une sous-population donnée de vésicules extracellulaires, cette sélectivité étant indispensable pour mieux caractériser les différentes sous-populations de vésicules extracellulaires et mieux comprendre leur implication dans les différents processus physiopathologiques.



**Fig. 78 :** Analyse biostatistique des données MS: un "cluster" typique d'une analyse biostatistiques des données protéomiques pour des échantillons de PVEs basales et PVEs activées montrant les voies de signalisation dans lesquelles sont impliquées les proteines identifiées dans l'échantillon basal (petit cercle vert), celles identifiées dans l'échantillon activé (petit cercle rouge) et celles communes entre les deux échantillons (petit cercle à moitié vert et moitié rouge). Les gros cercles correspondent aux voies de signalisation et aux activités biologiques des proteines de l'échantillon basal (gros cercle vert), celles de l'échantillon activé (gros cercle rouge) et celles communes entre les 2 (gros cercle gris).



#### **4. Etude des VEs plasmatiques**

Le potentiel de la plateforme NBA, en particulier dans sa dimension multiplex, a été évalué dans le cadre de l'étude des VEs dans un milieu biologique complexe, le plasma. Cette étude s'inscrit dans le cadre d'un projet collaboratif, dont le but est d'améliorer la qualité de la transfusion sanguine et plus précisément de déterminer l'effet des VEs plasmatiques sur les patients transfusés.

Deux types d'échantillons ont été fournis par le Pr. T. Burnouf. Ces échantillons, collectés par plasmaphérèse à partir de donneurs sains, consistent en du plasma ayant subi ou non une procédure de filtration. Le protocole repose sur deux étapes de filtration : une première filtration au travers d'une membrane de 1000 nm (Sepacell RZ-1000N or PLX-5, Asahi Kasei Medical, Tokyo, Japan), suivi d'une deuxième filtration (nanofiltration) sur une membrane possédant des pores de 75 nm (Planova 75N, Asahi Kasei Medical)<sup>341</sup>. Les échantillons sont ensuite congelés à -80°C jusqu'au jour de l'analyse. Le plasma filtré est nommé plasma-NF.

Les collègues de Taiwan ont caractérisé ces deux types d'échantillons à travers des tests fonctionnels pour déterminer l'activité des VEs plasmatiques (ex : test d'activité procoagulante). Les résultats des tests fonctionnels seront présentés dans la partie conclusion (4.5.) et mis en perspective avec les résultats obtenus sur la plateforme NBA. Le but de cette étude est de contribuer à la caractérisation du contenu en VEs dans les deux échantillons, plasma nanofiltré ou non, d'un point de vue phénotypique (en SPRi, MS) et métrologique (AFM).

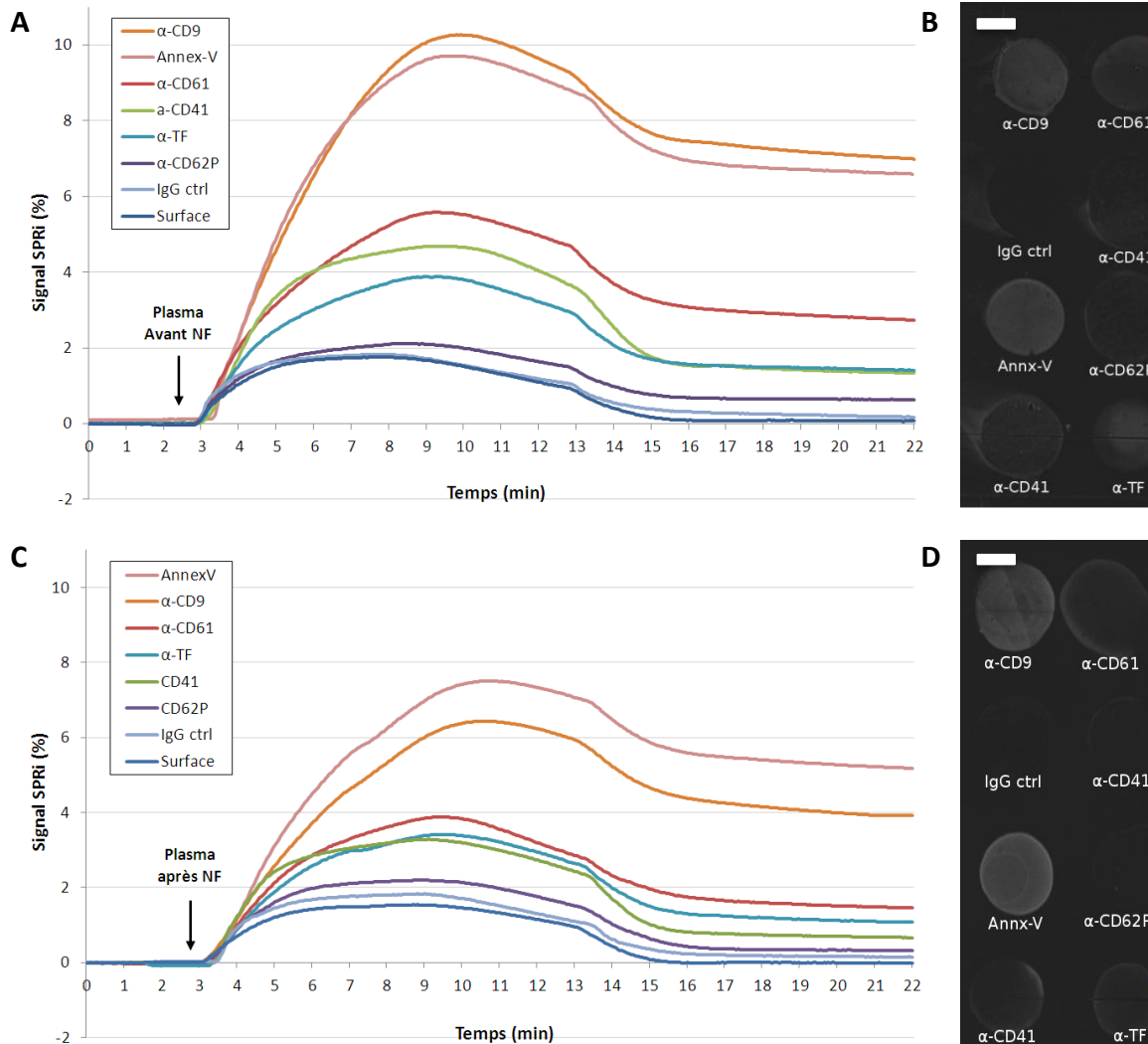
Les 2 échantillons sont alors étudiés par la plateforme NBA en procédant comme pour les échantillons précédents : (i) une capture des VEs plasmatiques par injections des deux échantillons (plasma brut ou nanofiltré) sur des puces présentant 16 spots de différents ligands suivie (ii) d'une analyse AFM spots par spots.

##### **4.1. Immunocapture des VEs plasmatiques**

Les échantillons de plasma brut et de plasma-NF ont été injectés chacun, dilués au 1/50 dans du tampon Hepes, sur une puce présentant 16 spots de différents ligands (en duplicat ou triplicat) :  $\alpha$ -CD41,  $\alpha$ -CD61,  $\alpha$ -CD62P,  $\alpha$ -CD9,  $\alpha$ -TF, Annex-V et une IgG contrôle (A9H12).

La figure 79 montre les sensorgrammes enregistrés lors de l'injection des deux échantillons. Les résultats d'immunocapture montrent que :

- Le taux de capture global des VEs est plus important dans le cas du plasma brut. Une baisse de signal d'environ 22% est obtenue après nanofiltration pour le taux de capture des VEs sur les spots Annex-V. De même, une baisse de taux de capture de 40 à 70 % a été observée pour les autres ligands. Ces résultats montrent alors que le processus de filtration à 75 nm du plasma aboutit à une diminution significative, mais pas une élimination totale, des vésicules dans le plasma filtré.



**Fig. 79** : Capture des VEs plasmatiques: Injection du plasma brut (A) et nanofiltré (C), sur filtre de 75 nm, sur des puces présentant 16 spots de différents ligands. Injection de 10 min à 20  $\mu\text{L}/\text{min}$  des échantillons dilués au 1/50. En (B) et (D) images de contraste prises à la fin des injections du plasma avant et après NF respectivement. Barres d'échelle = 50  $\mu\text{m}$ .

- Les taux de capture sur les spots de  $\alpha\text{-CD9}$  et Annex-V sont les spots ayant le plus capturé, dans les 2 cas, suivi dans l'ordre décroissant de capture par le signal sur  $\alpha\text{-CD61}$ ,  $\alpha\text{-CD41}$ ,  $\alpha\text{-TF}$  et  $\alpha\text{-CD62P}$ .

- Le plus grand taux de capture sur  $\alpha\text{-CD61}$  que sur  $\alpha\text{-CD41}$ , pour les deux échantillons, peut s'expliquer par le fait que le CD41 est exprimé exclusivement à la surface des VEs plaquettaires alors que le CD61 est présent à la surface des VEs plaquettaires et endothéliales.

- Le faible taux de capture sur  $\alpha\text{-CD41}$  par rapport à l'annex-V (ratio  $\approx 0,13$ ) à  $\alpha\text{-CD9}$  (ratio  $\approx 0,14$ ) est en accord avec les observations faites par certains auteurs, montrant que les VEs plaquettaires dans le plasma ne représentent qu'environ 30% de la totalité des vésicules plasmatiques<sup>163</sup>.

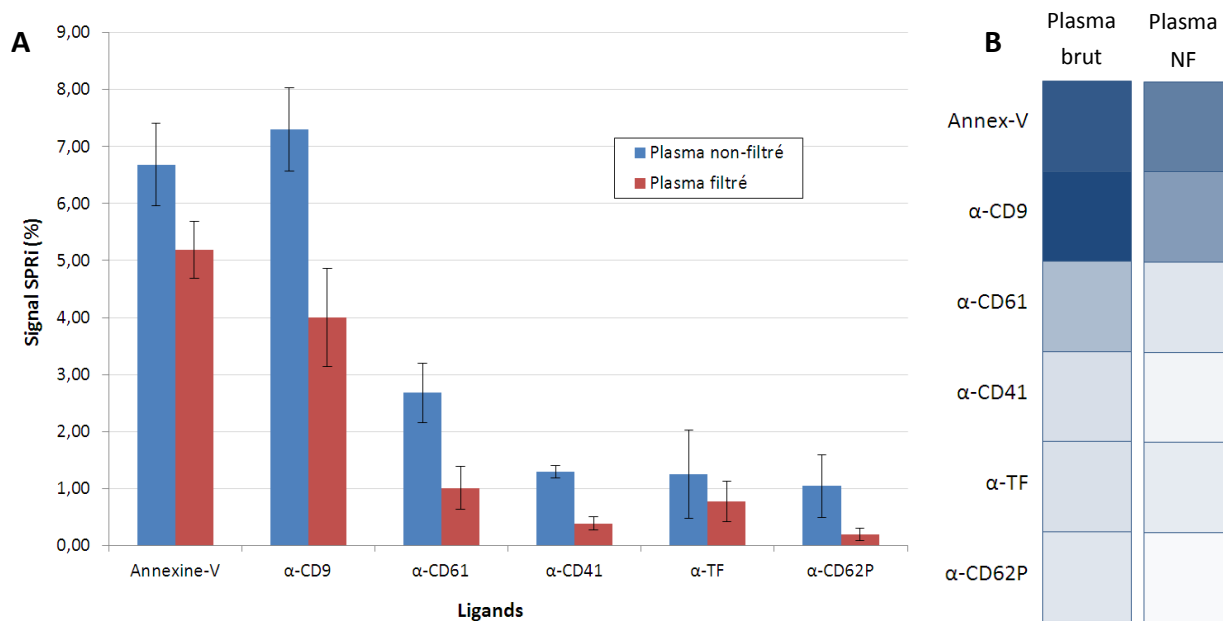
- Le taux de capture de VEs sur  $\alpha\text{-TF}$  est aussi faible. Ces observations sont compatibles avec d'autres études dans la littérature qui mettent en évidence un faible nombre de vésicules exprimant le TF dans le plasma des patients sains<sup>162,342,343</sup>.

- Le taux le plus faible de capture concerne l' $\alpha\text{-CD62P}$ , ce qui est en accord avec la

littérature<sup>343</sup>. En effet, ce marqueur protéique indique un phénomène d'activation des plaquettes, phénomène qui n'est pas attendu au sein d'un échantillon issu d'un donneur sain.

- Malgré la complexité du milieu (plasma simplement dilué), les interactions non-spécifiques sur les spots d'IgG contrôles et en dehors des spots (surface) sont très faibles et négligeables.

La reproductibilité est attestée au travers de trois différentes expériences de capture pour chaque échantillon en appliquant les mêmes conditions d'injections (dilution, temps d'injection, débit). L'histogramme présenté dans la fig. 80 met en évidence la faible variabilité de réponse de capture des VEs plasmatiques sur les différents cibles.

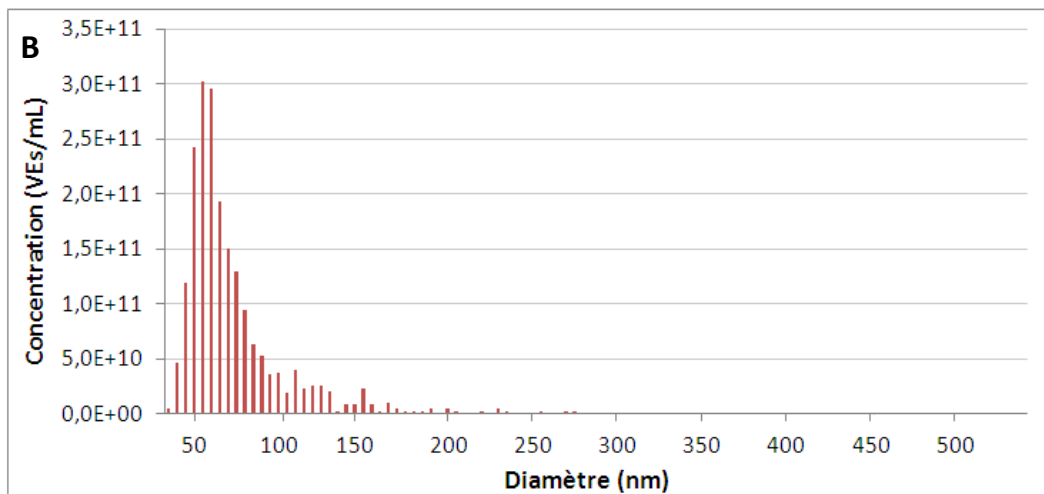
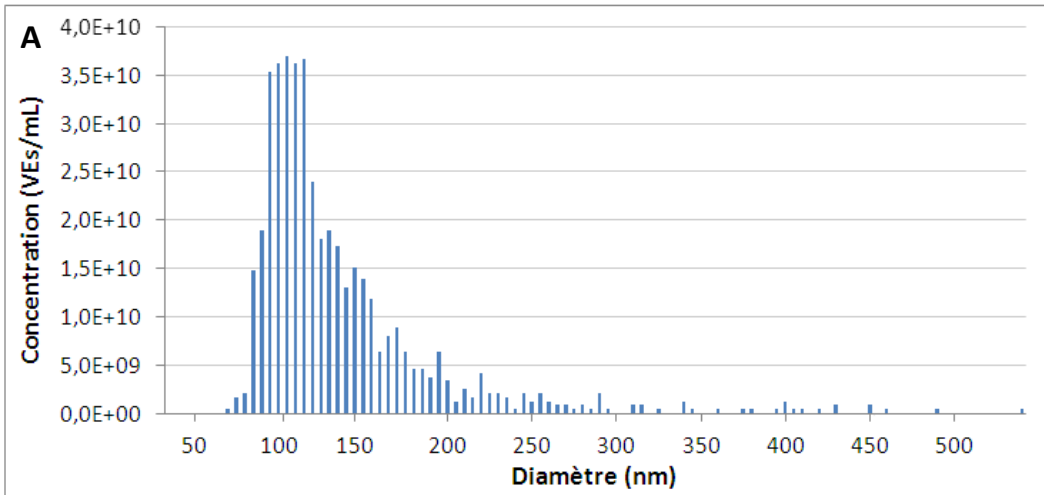


**Fig. 80 :** Capture des VEs plasmatiques: (A) Taux de capture moyens sur les différents spots de ligands. Moyennes sur 3 expériences pour chaque échantillon. Les barres d'erreurs désignent l'écart type entre les taux de capture pour un ligand donné. (B) Taux de capture moyen en échelle colorimétrique sur chaque ligand pour le plasma avant et après NF.

#### 4.2. Analyse TRPS des VEs plasmatiques

Les échantillons de plasma brut et de plasma-NF ont été dilués au 100<sup>ème</sup>, en tampon PBS 1X, afin d'être étudiés par la technologie Qnano. Le plasma brut a été analysé dans un premier temps en utilisant un pore de 100 nm (NP100). L'analyse a échoué en raison de colmatage répétitif du pore certainement par les grosses vésicules présentes dans l'échantillon. Par conséquent, le NP100 a été remplacé par un NP200. Au contraire, l'analyse du plasma filtré a été réalisée avec un NP100, et aucun problème de colmatage n'a été rencontré, ce qui atteste de l'élimination d'un pool de particules de grosses tailles par la nanofiltration.

Les résultats de cette analyse sont présentés en fig. 81. Les VEs dans le plasma avant filtration montrent une distribution en taille comprise entre 80 et 500 nm, avec environ 90% des



**Fig 81 :** Analyse Qnano des VEs dans le plasma avant (A) et après nanofiltration (B). Histogrammes de la distribution en taille des vésicules extracellulaires dans le plasma avant et après NF, respectivement.

Un NP200 a été utilisé pour le plasma non filtré et un NP100 pour le plasma filtré

vésicules en dessous de 200 nm et un pic à 110nm. Il est à noter que le NP200 permet la mesure des vésicules entre 85-640 nm, ce qui explique l'absence des vésicules détectées en dessous de 80 nm. La concentration totale des vésicules dans cette fenêtre de taille a été déterminée à  $4,4 \times 10^{11}$  vésicules/mL.

D'autre part, l'analyse du plasma filtré avec le NP100 montre une distribution en taille des vésicules entre 40-300 nm, avec un pic à 60 nm. Ainsi, 74% des vésicules ont une taille inférieure à 70 nm. Il est à noter que le NP100 permet une détection théorique des vésicules entre 50-330 nm. La concentration des vésicules dans le plasma filtré est déterminée dans cette fenêtre de taille à  $2,0 \times 10^{12}$  vésicules/mL.

De plus, la présence des vésicules au-dessus de 75 nm ( $\approx 33\%$ ) dans le plasma filtré (NF) peut être une conséquence soit de l'agrégation des petites vésicules suite à la nanofiltration du plasma, ou soit du passage de vésicules  $> 75$  nm mais qui se déforment pour passer la membrane de filtration.

Ainsi, après la nanofiltration du plasma, persisteraient des vésicules à hauteur de  $10^{12}$  vésicules/mL et de taille moyenne  $\approx 68$  nm. Il faut noter que, la membrane utilisée étant différente (NP100 vs NP200), cela induit un biais dans la quantification des VEs, notamment dans le cas

des VEs de plasma brut dont la concentration est sous-estimée par cette mesure sur NP200.

### 4.3. Nanométrie des VEs plasmatiques

L'analyse AFM a été menée sur deux puces, présentant différents spots de ligands, et sur lesquelles ont été injectés du plasma brut ou du plasma-NF.

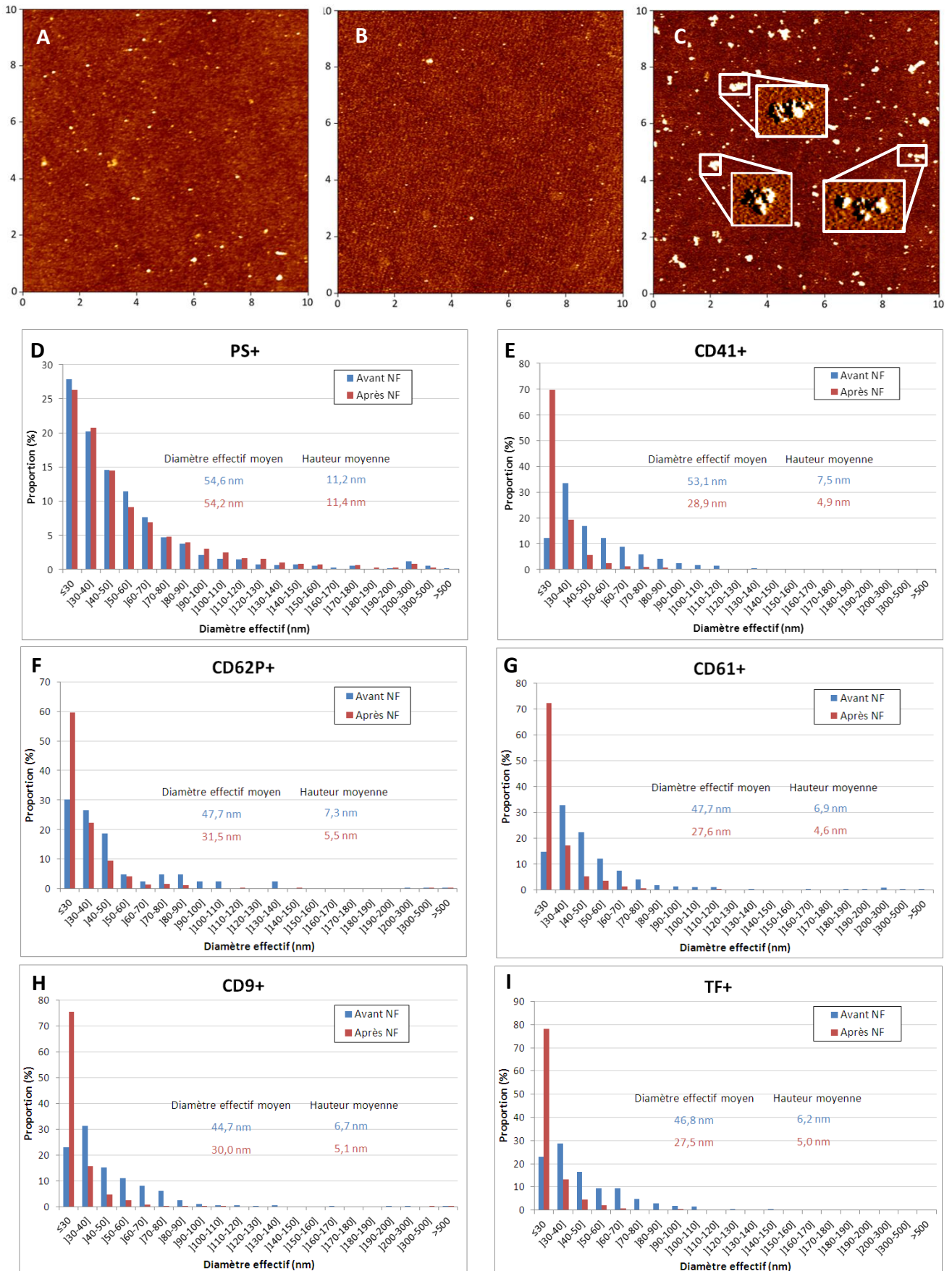
La figure 82 montre les résultats de l'analyse AFM en air des différentes sous-populations de VEs plasmatiques dans les 2 échantillons. La distribution en taille pour chaque sous-population est basée sur la mesure d'au moins un millier de VEs. L'analyse a permis de montrer que les différentes sous-populations de vésicules, immunocapturées sur les différents spots, sont plus petites dans l'échantillon de plasma-NF par rapport au plasma brut, à l'exception de celles capturées sur l'annex-V (Fig. 82) :

Par exemple, la proportion de VEs-CD41+ ayant une taille en dessous de 70 nm est de 98% dans l'échantillon de plasma-NF, alors qu'elle ne représente que 83% dans l'échantillon de plasma brut. En Fig.82- A et B sont présentées deux images AFM des VEs-CD41+, issues de l'échantillon de plasma brut et plasma-NF respectivement. Plus d'images AFM sont présentées dans l'annexe 11.

Notre approche nanométrique permet en effet de discriminer entre des agrégats de vésicules et des grosses vésicules. Ainsi, sur les spots Annex-V, nos images mettent en évidence l'abondance des agrégats de vésicules (Fig. 82– C). Ce phénomène peut être dû à l'exposition de la phosphatidylsérine (PS), par cette sous-population de vésicules, qui forme un site de liaison pour différents facteurs de coagulation, ce qui pourrait induire l'agrégation des VEs<sup>344</sup>.

Ces résultats montrent que la filtration du plasma avec un nanofiltre de 75 nm permet une élimination partielle des vésicules. De plus, les gros objets (>75 nm) présents dans les différentes sous-populations de VEs du plasma-NF, et surtout chez les VEs-PS+, correspondent principalement à des agrégats des petites vésicules. Ce qui explique la détection de VEs >75 nm dans le plasma-NF par Qnano.

A nouveau, ces résultats mettent en évidence une bonne corrélation entre le taux de capture des VEs sur les différents spots de ligands et la densité surfacique des VEs à la surface de la biopuce.

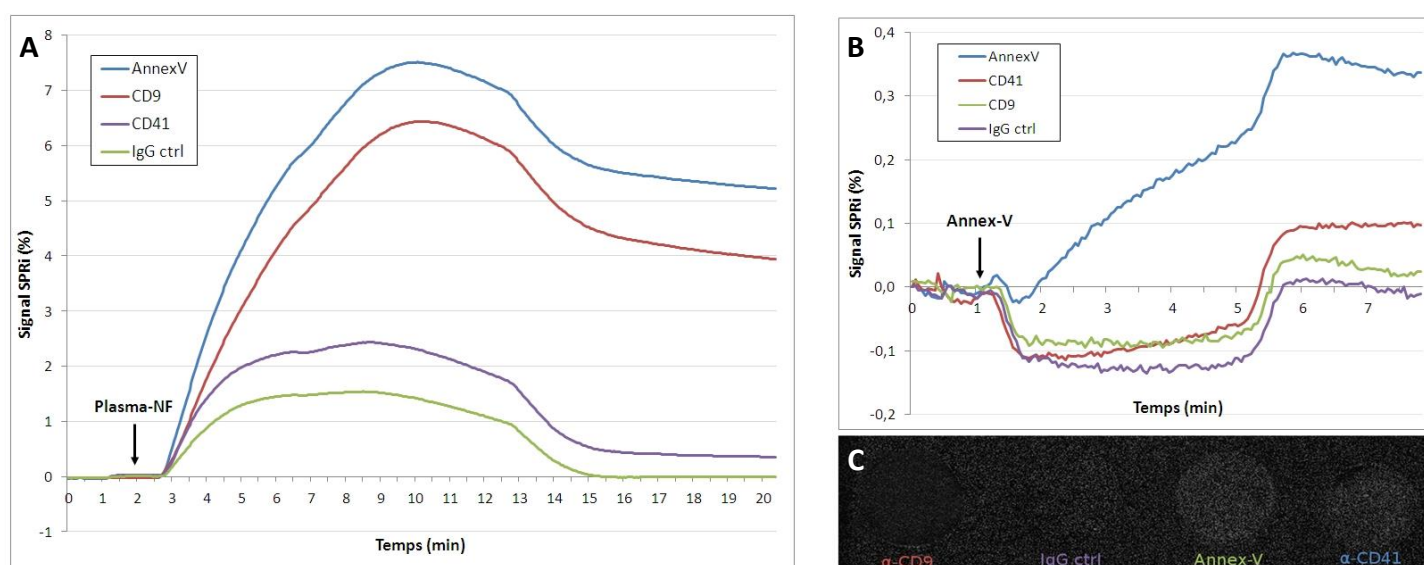


**Fig. 82** : Analyse AFM des VEs plasmatiques: Images AFM, 10x10  $\mu\text{m}^2$ , des VEs-CD41+ dans le plasma brut (A) et dans le plasma filtré (B). En (C), une image AFM d'un spot Annex-V montre l'abondance d'agrégats formés par les VEs-PS+ de l'échantillon filtré. L'échelle en z de toutes les images est de 10 nm. (D) à (I) montrent la distribution en tailles des VEs-PS+, CD41+ (capturées par l' $\alpha$ -CD41), respectivement, dans l'échantillon du plasma avant (bleu) et après (rouge) nanofiltration.

#### 4.4. Phénotypage des VEs capturées sur puce

La technique SPR permet d'envisager un criblage des cibles biologiques, nous avons donc testé la possibilité de faire un phénotypage des vésicules capturées à la surface de la puce par injection de ligands secondaires spécifiques dirigés vers de potentiels ligands d'intérêt présentés par les VEs. L'avantage de cette stratégie est la possibilité de faire un phénotypage sans avoir recours à des anticorps secondaires marqués (fluorescent) comme c'est le cas dans les tests ELISA.

Un échantillon de plasma filtré a été injecté tout d'abord à la surface d'une puce présentant 16 spots de différents ligands spécifiques (Annex-V,  $\alpha$ -CD41,  $\alpha$ -CD9) ainsi que des spots d'IgG contrôles (A9H12) (Fig.83-A). Après capture des vésicules à la surface, de l'Annex-V a été injectée sur la puce pendant 4 minutes.



**Fig. 83 :** Phénotypage des vésicules plasmatiques capturées à la surface : (A) Injection du plasma-NF, dilué au 1/50, à la surface de la biopuce. Injection de 10 min à 20  $\mu$ L/min. Après capture des VEs plasmatiques, une injection du ligand Annex-V (20  $\mu$ g/mL) à la surface de la puce est réalisée pendant 4 min à 50  $\mu$ L/min (B). (C) Image de contraste prise par le SPRi à la fin de l'injection de l'Annex-V.

Bien que la variation du signal SPRi observée est très faible sur les différents spots (Fig. 83-B), nous pouvons remarquer une différence de comportement entre les spots. En effet, lors de cette injection « secondaire », le taux de capture du ligand Annex-V est le plus important ( $\approx 0,34\%$ ) sur les spots d'Annex-V présentant des VEs-PS+. La capture de l'Annex-V sur les spots  $\alpha$ -CD41 et  $\alpha$ -CD9 est plus faible, avec 0,1 et 0,02 % respectivement. Le signal enregistré sur les spots d'IgG contrôles est négligeable. Le faible taux d'interaction de l'Annex-V sur les spots  $\alpha$ -CD41 par rapport aux spots Annex-V est expliqué par la plus grande capture des VEs sur les spots d'Annex-V ( $\approx 5\%$ ) par rapport à ceux d' $\alpha$ -CD41 (0,4%) lors de l'injection du plasma-NF. Par contre, les spots  $\alpha$ -CD9, qui ont eu un taux de capture de VEs à peine plus faible ( $\approx 4\%$ ) que

celle sur l'Annex-V ( $\approx 5\%$ ), montrent une interaction de l'Annex-V négligeable et inférieure à celle observée sur les spots  $\alpha$ -CD41. Ceci peut s'expliquer par une faible densité de phosphatidylsérine exposée par les membranes lipidiques des VEs-CD9+.

Ces résultats montrent que, en plus des vésicules capturées sur les spots Annex-V, qui ont servi de modèle dans cette expérience de « révélation secondaire », les vésicules CD41+ expriment, au moins pour une partie d'entre elles, la PS qui est considérée comme marqueur des VEs qui bourgeonnent à partir de la membrane plasmique des cellules. Au contraire, les vésicules CD9+ n'exprimeraient pas, ou peu, la PS, ce qui est cohérent avec le processus de génèse de ces vésicules. En effet, les exosomes sont formés et libérés à partir des compartiments cellulaires internes (endosomes), ce qui expliquerait l'absence de PS dans leur contenu membranaire.

Ces tests de criblage doivent être confirmés, mais néanmoins ils donnent des résultats très prometteurs puisqu'ils permettraient de révéler la coexistence de plusieurs ligands à la surface des VEs et contribuer au phénotypage multiple des VEs.

#### **4.5. Conclusion sur l'étude des VEs plasmatiques par la plateforme NBA**

Dans ce chapitre, nous avons présenté les analyses qui ont été faites pour étudier les VEs directement dans deux échantillons de plasma : du plasma brut et du plasma qui a subi une étape de nanofiltration. Cette étude vise à explorer l'impact de la nanofiltration du plasma sur la diminution du risque de thrombogénicité lors de la transfusion sanguine. Notre intervention avait pour objectif de comparer le contenu en VEs dans ces deux échantillons au niveau phénotypique, métrologique (taille, morphologie) et quantitatif.

Les tests d'immunocapture proposent une capture spécifique des différentes sous-populations de VEs plasmatiques avec un signal non-spécifique négligeable. Ceci montre une très bonne performance de l'architecture de la biopuce vis à vis des milieux complexes. Aussi, le taux capture des VEs, par les différents ligands, a été plus faible dans l'échantillon du plasma-NF par rapport au plasma brut. Ceci est cohérent avec une élimination au moins partielle des vésicules du plasma lors de la nanofiltration.

Les différences de taux de capture des différentes sous-populations de VEs plasmatiques à la surface sont logiques et cohérentes avec les données de la littérature.

Nos collègues de Taiwan ont d'autre part mené différents tests fonctionnels pour mesurer l'activité des VEs plasmatiques dans les échantillons de plasma brut et plasma nanofiltré :

- Des tests de dosage de l'activité procoagulante des MP-PS+ ont été réalisés en utilisant un kit commercial (prothrombinase Zymuphen MP-activity assay, Hyphen BioMed, Neuville-sur-Oise, France). Ces tests sont basés sur la capture des VEs-PS+ à la surface d'une plaque multipuits avant d'ajouter des réactifs qui interagissent avec la phosphatidylsérine, exprimée par les VEs,



pour mesurer leur activité procoagulante. Les résultats montrent une absence d'activité procoagulante dans l'échantillon de plasma-NF, alors que cette activité est présente dans l'échantillon de plasma brut ainsi que dans l'échantillon de plasma ayant subi une seule filtration sur une membrane de 1000 nm. Cependant, notre plateforme NBA a mis en évidence la présence des VEs-PS+ dans les deux échantillons de plasma, mais avec une différence dans la taille de ces VEs, qui est essentiellement <75 nm dans le plasma NF alors que des plus grosses VEs sont présentes dans le plasma brut. Les hypothèses possibles pour expliquer l'absence de l'activité procoagulante dans le plasma NF malgré la présence des VEs-PS+ sont (i) l'absence partielle ou totale d'activité des petites vésicules PS+, (ii) un différentiel de capture entre les petites vésicules PS+ et les grandes VEs-PS+ dans les puits du kit.

- Un deuxième type de tests fonctionnels a été appliqué pour mesurer l'activité du facteur tissulaire (TF), qui joue un rôle important dans l'initiation de la coagulation, exprimé par les VEs dans les échantillons de plasma total et de plasma-NF. Ces tests sont réalisés en utilisant un kit commercial Zymuphen MP-TF assay (Hyphen BioMed). Ce test est basé sur l'immunocapture des VE-TF+ à la surface d'une plaque à multipuits, via un anticorps spécifique, et la capture est suivie par l'ajout des réactifs qui interagissent avec les TF exprimés par les VEs capturées. Les résultats montrent une activité faible de VEs-TF+ dans le plasma alors que cette activité est absente dans l'échantillon de plasma-NF et même dans l'échantillon de plasma ayant subi une filtration sur une membrane de 1000 nm.

Les tests d'immunocapture que nous avons réalisés ont montré la présence de VEs-TF+ mais de manière faible et équivalente dans les deux échantillons de plasma par rapport aux autres sous-populations de VEs plasmatiques. Ces résultats, comme il a été déjà montré, sont cohérents avec d'autres études qui ont aussi montré la présence de ce type de VEs dans le plasma.

La faible voire l'absence d'activité TF dans le plasma, malgré la présence des VEs-TF+, pourrait s'expliquer par différents états conformationnels du TF associés à une fonctionnalité du TF<sup>162</sup>.

Nos analyses AFM des VEs plasmatiques ont montré que la grande majorité des VEs dans l'échantillon de plasma-NF est inférieure à 75 nm, ce qui confirme l'élimination des plus grosses vésicules (>75 nm) par nanofiltration. La taille de différentes sous-populations de VEs plasmatiques est proche de la taille déterminée pour les VEs plaquettaires dans la première partie de ce chapitre.

## 5. Conclusion

Dans cette partie, nous avons présenté les résultats de l'étude engagée sur la plateforme NBA pour la caractérisation des VEs, en termes de sous-populations en taille et phénotypiques, dans différents types d'échantillons biologiques relativement complexes et s'inscrivant dans des

études fonctionnelles et les problématiques de nos collaborateurs.

Tout d'abord, la plateforme NBA a été appliquée pour caractériser des vésicules générées par des plaquettes sous différentes conditions. Les tests d'immunocapture en SPRi ont permis de réaliser un criblage phénotypique pour les vésicules dans chaque échantillon sans marquage. Des niveaux de capture différentiels pouvant être corrélés à d'éventuels niveaux d'expression variables de différents marqueurs ont été obtenus. La capture des vésicules à la surface de la biopuce est bien efficace, dans l'ensemble des échantillons de complexité croissante (solutions de VEs plaquettaires ou plasmiques). Nous montrons que le taux de capture est directement corrélé à la concentration en vésicules injectées.

La possibilité de réaliser un phénotypage des VEs capturées à la surface en utilisant un ligand secondaire offre encore une plus grande exploitation de notre plateforme. Ce phénotypage permet en effet d'affiner l'étude phénotypique des VEs capturées à la surface de la biopuce mais aussi d'accéder à une étude cinétique entre les VEs capturées et de potentiels partenaires biologiques.

L'analyse AFM couplée au SPRi a permis dans un premier temps de mesurer la taille de différentes sous-populations de vésicules extracellulaires dans les différents échantillons. L'AFM a permis de visualiser les vésicules sur toute leur gamme de taille. Cette analyse métrologique a pu être adaptée à l'investigation des différents spots à la surface de la biopuce avec la capacité de fournir une vue globale et représentative de la zone étudiée en basant l'analyse sur des milliers de vésicules individuelles. Ces études ont montré la capacité de cette plateforme à détecter sélectivement, et simultanément, les différentes sous-populations de vésicules qui se trouvent dans un échantillon donné.

L'analyse AFM montre que la taille des VEs dans les différents échantillons (plaquettaires et plasmiques) est essentiellement située en dessous de 300 nm, ce qui est en accord avec plusieurs études publiées. Aatonen et al. (2014) ont montré, en utilisant la technique de NTA et la microscopie électronique (ME), que la majorité ( $\geq 70\%$ ) des vésicules, libérées par des plaquettes sous différentes conditions, sont d'une taille inférieure à 300 nm<sup>192</sup>. Dragovic et al.<sup>234</sup> ont mesuré la taille des vésicules extracellulaires libérées par des cellules placentaires en utilisant la combinaison instrumentale. La ME montre une distribution en taille de 20 à 600 nm avec une population majoritaire de VEs à  $\approx 120$  nm. Le NTA a donné une distribution en taille similaire à celle de la ME, avec une taille qui va de 40 jusqu'à 600 nm et un maximum autour de 250 nm.

Une autre équipe a utilisé l'AFM en milieu liquide pour mesurer la taille des VEs plasmiques capturées sur une surface de mica modifiée par le greffage d'anti-CD41. Leurs résultats montrent que la majorité des vésicules possèdent un diamètre effectif calculé entre 30 et 90 nm<sup>216</sup>.

L'analyse AFM permet aussi de déterminer la morphologie et l'organisation des vésicules. Ceci permet notamment de différencier les gros objets des agglomérats de petites vésicules, ce qui n'est pas possible de faire en utilisant d'autres techniques comme la cytométrie en flux, le

NTA et le Qnano. De plus, l'AFM permet de corrélérer le signal SPRi de capture sur les différents spots avec la densité surfacique des VEs capturées.

Le couplage SPRi-MS présente l'avantage d'investiguer, sélectivement le profil protéomique de différentes sous-populations de vésicules capturées à la surface d'un biopuce via un ligand spécifique. Ce couplage a mis en évidence un profil protéomique différentiel pour des VEs plaquettaires générées sous différentes conditions ce qui permet de mieux comprendre la différence phénotypique et fonctionnelle de différents types de VEs. Ces résultats préliminaires sont prometteurs et nous incitent fortement à poursuivre les investigations protéomiques voire lipidomique sur les VEs.

Une partie de ces résultats fait l'objet d'une publication en cours de rédaction.

## V. Conclusion et perspectives

Les vésicules extracellulaires (VEs) sont des nanovésicules (30 à 1000 nm) qui jouent un rôle majeur dans différents processus physiopathologiques. L'intérêt croissant d'investigation de ces entités biologiques se heurte à un manque de standardisation dans les approches analytiques et préanalytiques, ce qui fait que les résultats obtenus par les différentes équipes de recherches peuvent être contradictoires, ce qui nuit aux conclusions sur le rôle et l'utilisation de ces vésicules pour le diagnostic ou le suivi thérapeutique.

A l'heure actuelle, un consensus visant à coupler des techniques complémentaires apparaît comme crucial pour disposer enfin d'une caractérisation fine et complète des VEs. Dans ce contexte nous avons développé une plateforme NanoBioAnalytique (NBA) combinant 3 techniques d'analyse : la résonance des plasmons de surface (SPR), la microscopie à force atomique (AFM) et la spectrométrie de masse (MS). Cette plateforme repose sur l'utilisation d'une biopuce d'or multiplexée qui constitue la pierre angulaire de notre approche.

Dans un premier temps, la plateforme NBA a été calibrée à l'aide de deux particules modèles qui couvrent le domaine de taille des VEs, les CP50 et les CP920. Les tests de capture des calibrants par leurs anticorps spécifiques immobilisés à la surface de la biopuce ont montré une grande spécificité de capture avec une gamme dynamique couvrant  $10^7$  à  $10^{12}$  particules/mL, sans que cette capture ne soit affectée par la complexité du milieu dans lequel se trouvent les particules. Ainsi, notre méthode de biodétection de micro- et nanoparticules est performante dans une large gamme dynamique, cette dernière pouvant de plus être modulée, en modifiant les protocoles d'injection.

Le couplage de la méthode de capture des particules à la surface de la biopuce avec l'analyse par microscopie a pu être mis en place. Les résultats sur la mesure de la taille des CP50 par AFM sont cohérents avec ceux obtenus par l'analyse TRPS en solution, validant ainsi les résultats d'AFM. D'autre part, la densité surfacique des particules calibrants (CP50 et CP920) à la surface de la puce et le taux de capture de ces derniers (par SPR et SPRi) ont pu être directement corrélés.

Dans un deuxième temps, la plateforme NBA a été éprouvée vis à vis de VEs biologiques contenues dans différents types d'échantillons fournis par nos collaborateurs. Les tests d'immunocapture en SPRi ont permis de réaliser un criblage phénotypique pour les vésicules dans chaque échantillon sans marquage. Des taux de capture différentiels de divers marqueurs ont été établis pour différents échantillons. La capture des vésicules à la surface de la biopuce a été efficace dans les différentes situations, dans des échantillons de complexité croissante, des VEs plaquettaires à celles contenues dans le plasma. Il se trouve que le taux de capture est (i) directement corrélé à la concentration en vésicules injectées et (2) reproductible lorsque les vésicules sont injectées dans les mêmes conditions et à la même concentration.

L'AFM a permis de visualiser les vésicules sur toute leur gamme de taille contrairement à la plupart des autres techniques qui possèdent des limites de détection empêchant la détection de toutes les vésicules dans un échantillon. Ainsi, la distribution en taille de différentes sous-populations de VEs a été évaluée. L'analyse AFM a été aussi adaptée à l'investigation des différents spots à la surface de la biopuce avec la capacité de scanner différentes zones de chaque spot, pour avoir une vue la plus complète possible et représentative de la zone étudiée, et aussi de mesurer la taille de milliers des vésicules individuelles. Ces études ont montré la capacité de cette plateforme à détecter sélectivement, simultanément et sans marquage les différentes sous-populations de vésicules qui se trouvent dans un échantillon donné.

Les études protéomiques engagées pour investiguer le profil protéomique de différentes sous-populations de vésicules capturées à la surface d'une biopuce sont très prometteuses. Cette stratégie offre un fort potentiel d'analyse et nous avons pu obtenir des signatures protéomiques différentielles des PVEs générées sous différentes conditions. Ces études seront poursuivies afin d'établir le protéome et les sous-protéomes de chaque types de VEs.

Les multiples potentiels de la plateforme NBA font de cette approche une méthode analytique très prometteuse et compétitive pour l'étude de VEs dans des échantillons biologiques complexes. Actuellement, la plateforme NBA est engagée dans plusieurs projets de recherche, déjà initiés ou non, afin de caractériser des VEs dans différents types d'échantillons (ex. surnageant de culture de cellules cancéreuses), ainsi que dans le cadre d'études cliniques pour caractériser le contenu en VEs dans différents types d'échantillons biologiques pour la qualification de cohortes de patients souffrant de thrombose ou de maladies inflammatoires.

Une des perspectives de ce projet est d'améliorer le phénotypage des vésicules dans un échantillon. Ceci peut être réalisé par injection des ligands secondaires suite à la capture des VEs à la surface de la biopuce. Des résultats préliminaires mais prometteurs de cette approche ont été présentés dans la partie « phénotypage des vésicules capturées sur puce » et nécessitent des optimisations méthodologiques et instrumentales pour améliorer la spécificité, la sensibilité et l'interprétation de ces interactions.

La plateforme NBA est constituée de modules instrumentaux qui peuvent être imbriqués avec d'autres approches pré-analytiques et analytiques pour s'adapter à la nature de l'échantillon et aux besoins de qualification. Par exemple, le couplage de la plateforme NBA avec la technique de chromatographie d'exclusion des VEs permettrait de caractériser les différentes sous-populations en taille coexistantes dans un échantillon. L'interfaçage de modules préanalytiques en amont de la plateforme NBA permettrait d'une part de contribuer à l'optimisation de ces étapes (qualification, tri, séparation, fractionnement...) mais également à une meilleure investigation des vésicules préparées. Dans ce contexte, la plateforme NBA est en mesure de fournir une vision, sans limitation de taille, d'un échantillon biologique. A titre d'exemple, l'étude de l'impact de la filtration sur le contenu en VEs plasmatiques par notre approche NBA met en lumière la

persistance de VEs après traitement de l'échantillon. Ceci amène potentiellement à ce que les collaborateurs repensent les hypothèses déduites de leurs études fonctionnelles et intègrent ces nouvelles données pour une meilleure compréhension des mécanismes biologiques étudiés.

Ainsi, un de nos objectifs est d'atteindre le dosage absolu des VEs dans un échantillon à travers le taux de capture à la surface de la puce obtenu en SPRi. Dans un premier temps, Ceci pourrait être réalisé à travers le couplage de la plateforme NBA avec des techniques permettant le dosage d'une sous-population de VEs donnée, telle que le NTA en mode fluorescence, et d'établir une relation entre la concentration de cette sous-population dans l'échantillon et son taux de capture à la surface. Il faut toujours noter que le taux de capture ne dépend pas que de la concentration de VEs dans l'échantillon mais aussi du taux d'expression du marqueur d'intérêt à la surface des vésicules.

D'autre part, des analyses multiomiques (protéomiques, lipidomiques, génomiques, etc..) sur de telles particules constituent un véritable challenge. L'obtention de signatures biomoléculaires spécifiques des différentes sous-populations de vésicules sont d'un intérêt majeur pour le diagnostic et la mise en place de tests compagnons de suivi thérapeutique.

A plus long terme, notre but serait de diffuser la plateforme NBA, au sein de la communauté scientifique du domaine des VEs, comme une solution analytique globale et versatile qui permettra une caractérisation approfondie des VEs dans divers milieux biologiques.

# Annexes

## ❖ Annexe 1 :

### **Purification des anticorps à partir d'ascite par des billes magnétiques-protéine G.**

#### **1. Matériels:**

- Billes magnétiques-protéine G (Dynabeads)
- Tampon: PBS 1X, PH=7.4
- Tampon d'éluion: Glycine (100mM, PH=2.5)
- Tampon de neutralisation: Tris buffer (2M, PH=7.5)
- Un support magnétique
- Un vortex

#### **2. Protocoles:**

##### **- Lavage des billes magnétiques**

1. 100 µL de la solution de billes magnétiques sont déposés dans un tube eppendorf de 1,5 mL.
2. Le tube est ensuite incubé sur le support magnétique pour 30 secondes.
3. Le surnageant est éliminé sans toucher les billes qui se trouvent adsorbées vers la paroi du tube du côté de l'aimant.
4. On enlève le tube du support magnétique, on rajoute 500 µL du tampon PBS 1x, et on resuspend les billes dans le tampon à l'aide d'un vortex jusqu'à que toutes les billes soient détachées de la paroi du tube.

##### **- Purification des anticorps**

5. On dépose le tube sur le support magnétique pour 30 secondes.
6. On répète les étapes 3, 4 et 5.
7. On élimine le surnageant, on enlève le tube du support magnétique et on rajoute 100 µL de notre échantillon d'ascite, dilué 4 fois dans du PBS.
8. Le tube est ensuite vortexé, afin de resuspendre les billes magnétiques dans notre échantillon, avant d'être incubé sur un agitateur, à température ambiante, pendant 10 min.
9. Le tube est remis sur le support magnétique.
10. Le surnageant, correspondant aux molécules non-liées à la protéine G présente sur les billes, est enlevé et conservé dans un tube pour être analysé par électrophorèse sur gel.
11. On enlève le tube de support et on resuspend les billes dans 200 µL du tampon PBS avant de remettre le tube sur le support.
12. Le surnageant est éliminé et les billes sont resuspendues dans du tampon PBS. Le tube est ensuite remis sur le support magnétique et le surnageant est éliminé. C'est l'étape de lavage des billes qui lient l'anticorps, qui sera répétée deux fois.

13. Cette fois ci, et après élimination du surnageant, le tube est enlevé du support et les billes sont resuspendues avec 50  $\mu\text{L}$  du tampon d'éluion. La solution est incubée sur un agitateur pendant 5 min.
14. On remet le tube sur le support magnétique, on enlève le surnageant (éluat), qui contient l'anticorps élué, et on le transfert dans un tube contenant 10  $\mu\text{L}$  du tampon de neutralisation, qui sert à remonter le pH du tampon d'éluion acide à un pH 7,4.
15. Le surnageant et l'éluat sont ensuite analysés par électrophorèse sur gel pour confirmer la présence d'anticorps purifié dans l'éluat. De même, un dosage protéique (BCA) sert à déterminer la concentration en anticorps purifiés dans l'éluat.
16. L'anticorps purifié est ensuite aliquoté (des fractions de 5  $\mu\text{L}$ ) et stocké à  $-20^{\circ}\text{C}$  pour long terme.



## ❖ Annexe 2 :

### **Purification des anticorps à partir d'ascite par chromatographie sur colonne de sépharose-protéine G.**

#### **1. Matériels:**

- Colonne de Gel-protéine G (V=500µl) [Hitrap Protéin G-HP, instruction 71-7083-00 AH].
- Une pompe péristaltique
- Tampon de neutralisation : Tris-HCl (2M, pH 7,5)
- Tampon de liaison : PBS 1x, pH 7,4
- Tampon d'éluion: Glycine-HCl (10 mM, pH 2.5)
- Ethanol 20%

#### **2. Protocoles:**

- **Préparation de l'échantillon:**

1. On dilue l'échantillon d'ascite à 1/6 - 1/8 avec du PBS (~300µl d'ascites dans 2 ml PBS).
2. Deux filtrations successives de l'échantillon d'ascite :
  - Filtrage par un profiltre de 2µm. (optionnel)
  - Filtrage par un centri-tube avec un filtre de 0.45µm (5000g pour 5 mn).

- **Purification:**

1. Préparation du tube de collection par addition de 200 µl de Tris-HCl (2 M, pH 7,5) pour chaque ml de la fraction d'anticorps a collecté.
2. Remplir la pompe avec le tampon de liaison. Retirez le bouchon et connecter la colonne à le tube de la pompe (goutte à goutte pour éviter l'introduction d'air dans la colonne).
3. Retirez la fin sécable à la sortie de la colonne.
4. Laver la colonne avec 10 volumes de colonne (5ml) de tampon de liaison à 0,5ml/mn.
5. Appliquer l'échantillon, à l'aide d'une seringue avec une vitesse de 0.2ml/mn.
6. Laver avec de 5 à 10 volumes de colonne (~2.5 ml) de tampon de liaison ou jusqu'à ce qu'aucun matériau n'apparaît dans l'effluent.
7. Eluer avec 2-5 volumes de colonne (1,25 ml) de tampon d'éluion. D'autres volumes peuvent être nécessaires si l'interaction est difficile à briser.

*(Rmq : la collection se fait dans le tube où nous avons mis le tampon de neutralisation Tris-HCl).*

- **Stockage:**

Avant le stockage, c'est mieux de laver la colonne avec cinq volumes de colonne de 20% d'éthanol pour empêcher la croissance microbienne. Conserver la colonne dans 20% d'éthanol à +4 et +8 °C.

### ❖ Annexe 3:

#### **- Les dimensions des billes de mélamine-résine (CP920)**

La densité des MF920 est de  $1,51 \text{ g/cm}^3$  (microparticles GmbH).

Le diamètre moyen des CP920 est de 920 nm.

A partir du diamètre moyen, on peut calculer le volume moyen des CP920, ayant une forme sphérique, qui est égal à  $407513386.67 \text{ nm}^3$ .

A partir de la densité des VLPs et de leur volume moyen, on peut trouver la masse d'une seule bille qui sera égale à  $6,1566 \times 10^{-7} \text{ } \mu\text{g}$ .

Cela signifie qu'une solution de MF920 à  $25 \text{ } \mu\text{g/mL}$  contient  $\approx 40,6 \times 10^{10}$  CP920/mL.

Cette conversion a été validée par une analyse par cytométrie en flux des MF920 en utilisant des billes mégamix, ayant une taille et une concentration connue, comme des calibrants.

#### ❖ Annexe 4 :

##### **- Les dimensions de VLP GII.4 (CP50)**

La densité des VLPs GII.4 constituées de la protéine VP1 est de  $1,31 \text{ g/cm}^3$ <sup>328,345</sup>.

Le diamètre moyen de ces VLPs comme mesuré par AFM est d'environ 55 nm.

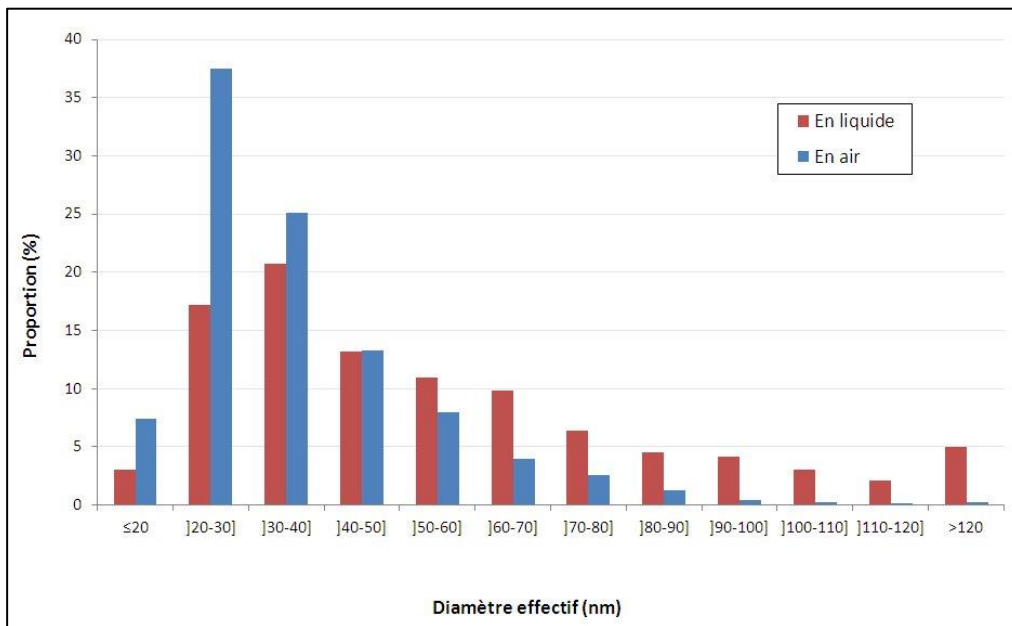
A partir du diamètre moyen, on peut calculer le volume moyen des VLPs, ayant une forme sphérique, qui est égal à  $87069,6 \text{ nm}^3$ .

A partir de la densité des VLPs et de leur volume moyen, on peut trouver la masse d'une particule virale qui sera d'environ  $1 \times 10^{-10} \text{ } \mu\text{g}$ .

Cela signifie que chaque solution de VLPs à  $1 \text{ } \mu\text{g/mL}$  contient environ  $1 \times 10^{10}$  VLPs/mL.

## ❖ Annexe 5 :

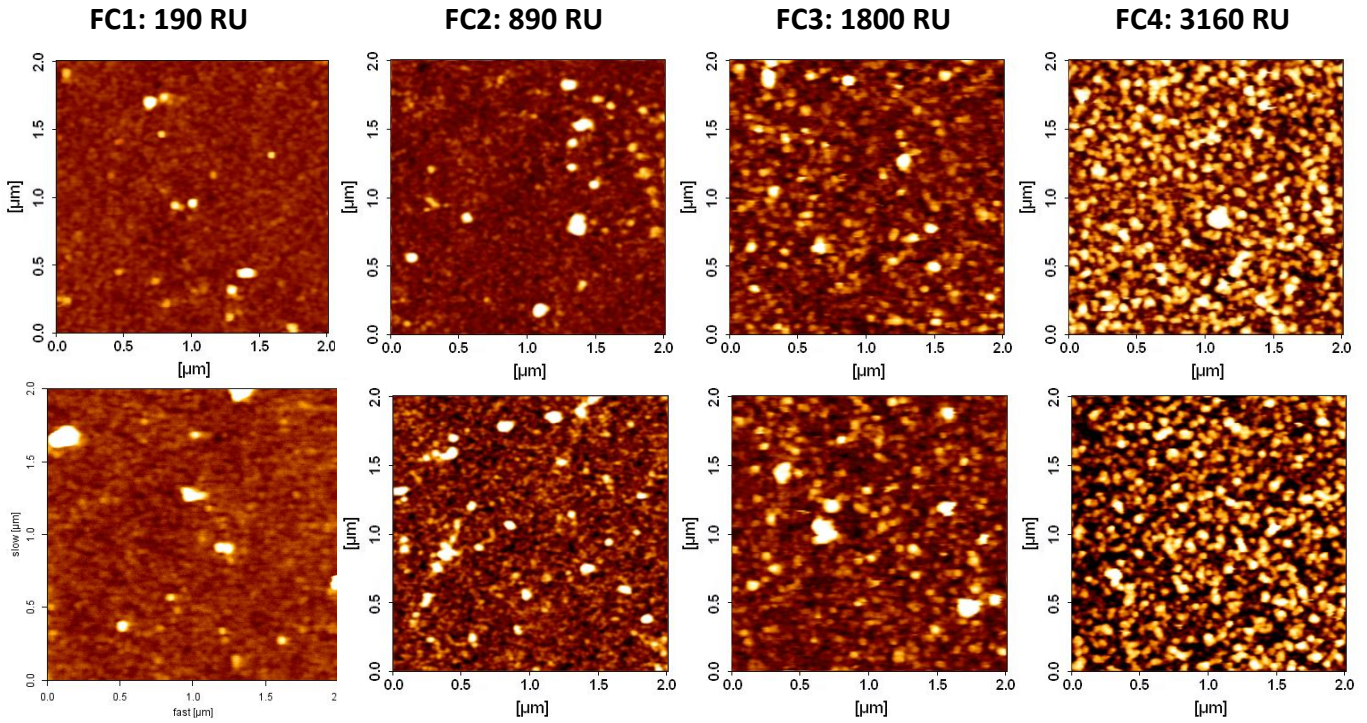
### Analyse AFM des CP50 (VLPs) en liquide et en air



La distribution en taille des VLPs. Le diamètre désigne le diamètre effectif calculé des VLP capturés lorsqu'ils ont été scannés par AFM en liquide –eau ultrapure- (rouge) ou après séchage de la puce (en air). Le nombre des VLPs scannés en liquide était de 1153 contre 3639 en air.

❖ Annexe 6 :

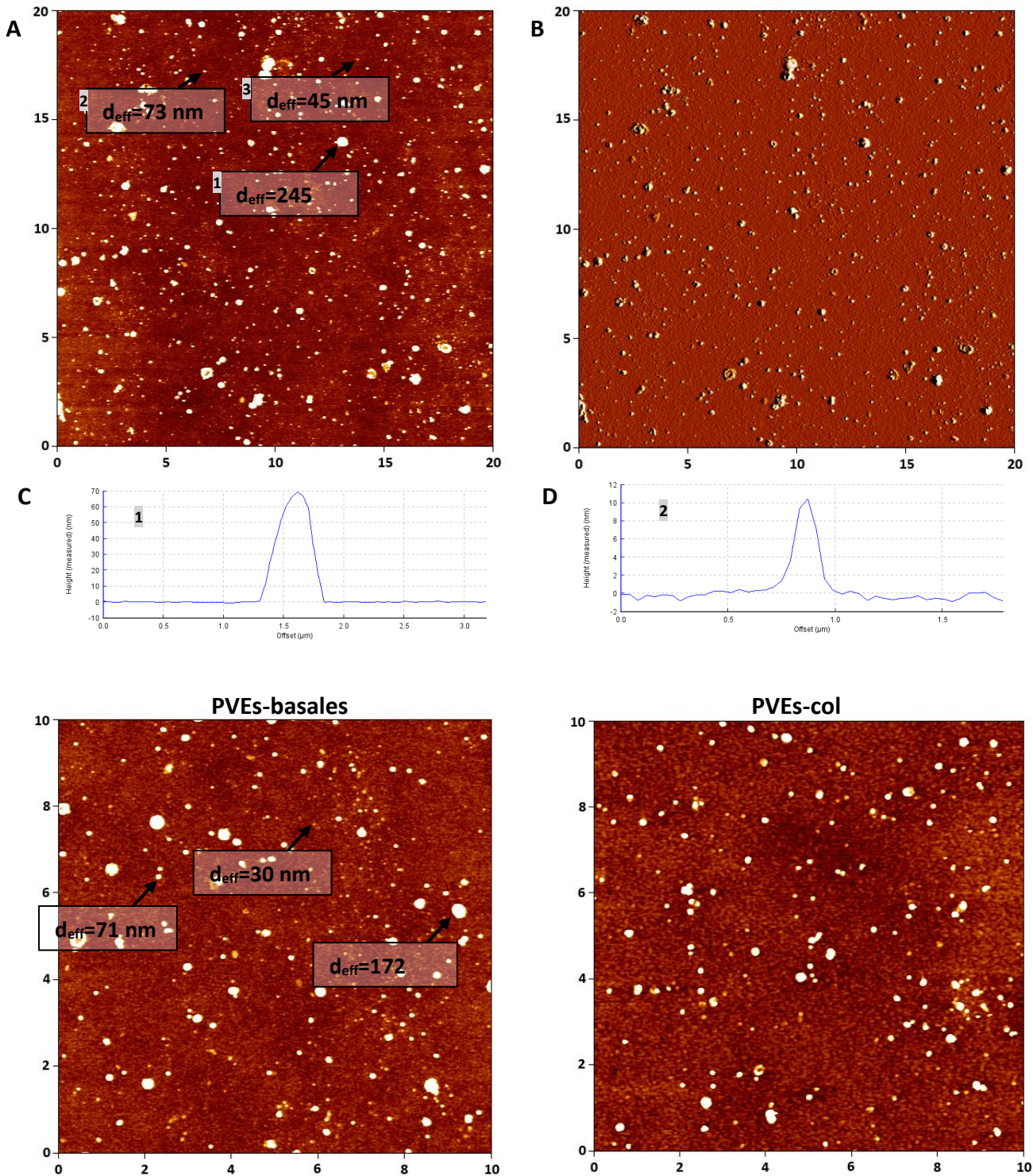
Images AFM de 4 pistes présentant différents taux de capture de CP50 sur la surface



Des images AFM de pistes présentant 190, 890, 1800 et 3600 RU sur FC1, FC2, FC3 et FC4 respectivement obtenues après capture des CP50 via  $\alpha$ -CP50. Echelle en Z de 10 nm.

❖ **Annexe 7:**

**Analyse de PVEs-basales et PVEs-col**



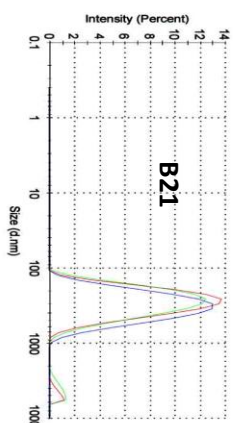
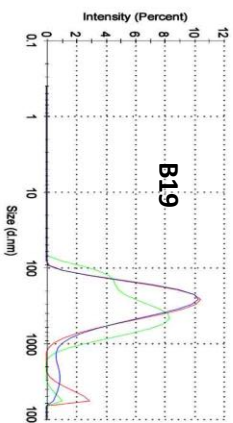
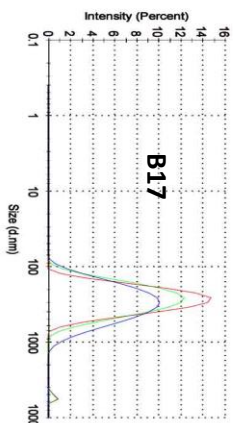
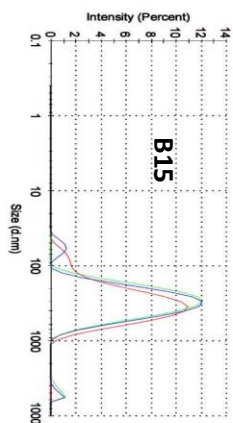
Analyse AFM, en air, des PVEs capturées à la surface d'une puce via  $\alpha$ -CD41 et fixées au glutaraldéhyde : (A) et (B) montrent des images AFM de PVEs-vasales, de  $20 \times 20 \mu\text{m}^2$ , de la même zone, en hauteur et en déflexion respectivement. «  $d_{\text{eff}}$  » pour le diamètre effectif calculé. En (C) et (D), deux sections de profils pour les vésicules 1 et 2, imagées en (A). (E) et (F) Images AFM, de  $20 \times 20 \mu\text{m}^2$ , de PVEs-basales et PVEs-col respectivement. Echelle en z de 10 nm pour toutes les images AFM. Nous constatons que les vésicules dans la gamme de taille de 30-40 nm sont plus abondantes dans l'échantillon de PVEs basales.

❖ **Annexe 8 :**

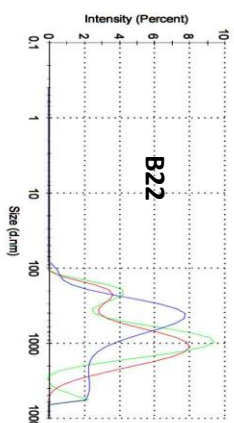
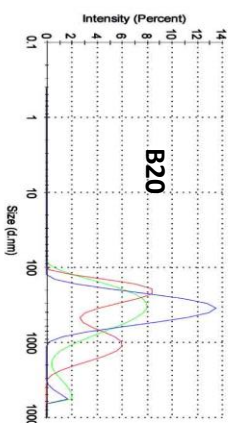
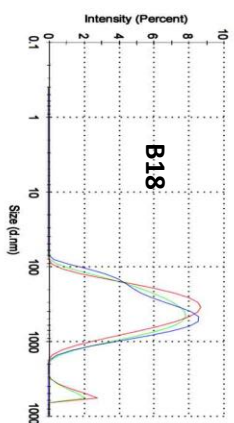
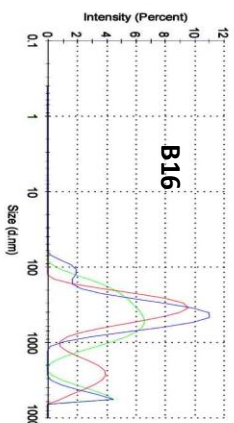
**Analyse DLS des N et T-PVEs**

Analyse DLS des N et T-PVEs: Différents lots de N-PVEs (B15,B17, B19 et B21) et de T-PVEs (B16, B18, B20 et B22). L'analyse a été réalisée en triplicate pour chaque lot. Les données d'analyse sur les différents lots montrent une taille moyenne de N-PVEs et T-PVEs de 273nm ±11 et 415±100 respectivement.

**N-PVES**



**T-PVES**



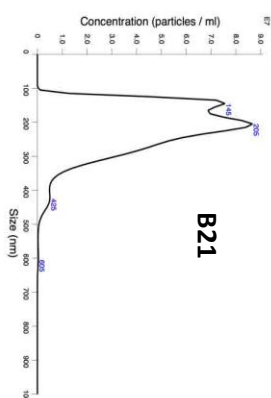
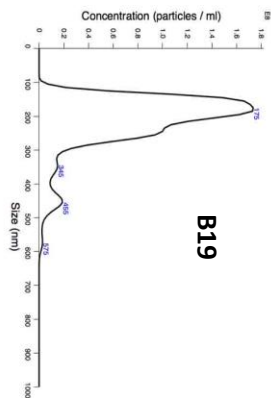
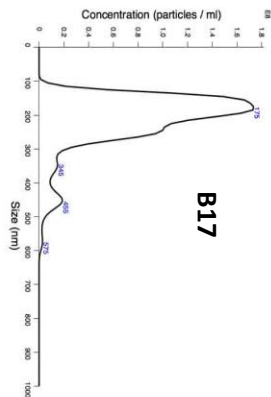
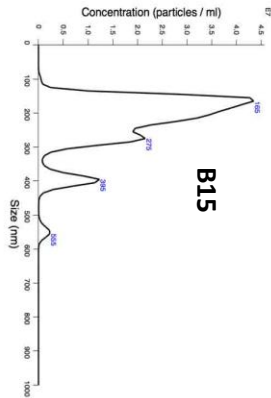
Échantillons	N-PVES				T-PVES			
	B15	B17	B19	B21	B16	B18	B20	B22
Moyenne (nm)	265	262	281	284	421	347	338	554

❖ **Annexe 9 :**

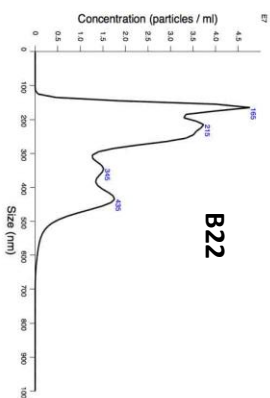
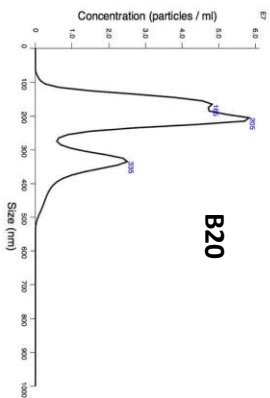
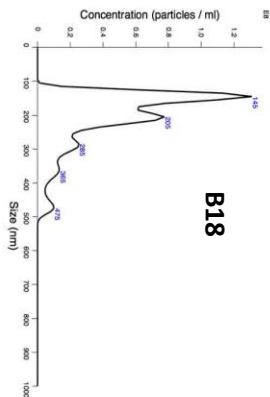
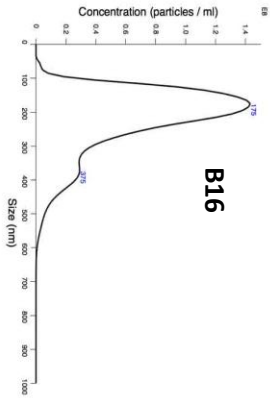
**Analyse NTA des N et T-PVEs**

Analyse NTA des N et T-PVEs: différents lots de N-PVEs (B15, B17, B19 et B21) et de T-PVEs (B16, B18, B20 et B22). Les différents échantillons montrent un pic majeur à  $\approx 150$  nm.

**N-PVEs**



**T-PVEs**



Échantillons	N-PVEs				T-PVEs			
	B15	B17	B19	B21	B16	B18	B20	B22
Moyenne (nm)	230.7	222.4	227.7	221.5	227.7	214.7	231.6	280.8
Concentration (particles/mL)	5.48E+11	4.70E+11	2.45E+11	6.65E+12	2.45E+11	6.40E+11	3.79E+11	1.61E+11



## ❖ Annexe 10 :

### Analyse protéomique de N- et T-PVEs

Liste des protéines identifiées par l'analyse MS des N et T-VEs : les protéines en rouge sont celles identifiées exclusivement ou plus abondamment chez les T-PVEs.

Protein FDR Confidence	Accession	Description	N-PVEs			T-PVEs		
			Score N Mascot	Coverage N Mascot	# Peptides N Mascot	Score T Mascot	Coverage T Mascot	# Peptides T Mascot
High	P21333	Filamin-A	243	7	13	1414	15	30
High	Q9Y490	Talin-1	130	2	5	1140	14	29
High	P63261	Actin	212	16	6	766	31	12
High	P08514	Integrin alpha-IIb	124	3	3	602	14	12
High	L7UUZ7	Integrin beta	116	3	2	597	11	9
High	H6VRG1	Keratin 1	265	9	7	260	11	8
High	A8K2W3	cDNA FLJ78516	0	2	1	242	23	9
High	P78385	Keratin, type II cuticular Hb3	257	13	10	208	9	7
High	P78386	Keratin, type II cuticular Hb5	196	11	8	207	11	7
High	A0A087X2I6	Keratin, type I cuticular Ha3-II	191	14	7	194	14	7
High	P04406	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	61	7	2	183	15	6
High	V9HWK2	Epididymis luminal protein 114	15	1	1	171	7	8
High	O76009	Keratin, type I cuticular Ha3-I	217	17	9	154	15	7
High	P13224-2	Isoform 2 of Platelet glycoprotein Ib beta chain	54	3	1	152	11	5
High	E7EX29	14-3-3 protein zeta/delta (Fragment)	0	3	1	141	11	3
High	Q5TCU8	Tropomyosin beta chain	0	3	1	37	3	1
High	Q8TCG4	TPMsk1 (Fragment)	0	7	1	37	5	1
High	O94986	Centrosomal protein of 152 kDa	0	1	1	16	1	1
Low	A8K2P7	cDNA FLJ77652	0	7	1	15	7	1
High	Q562R1	Beta-actin-like protein 2	16	5	1	94	12	3

Medium	H7C4T5	Muscleblind-like protein	24	2	1	22	2	1
High	Q8NF17	FLJ00385 protein (Fragment)	29	2	1	29	2	1
Medium	A2KBC1	Anti-(ED-B) scFV (Fragment)	46	4	1	68	4	1
Medium	L0R5A1	Alternative protein CSF2RB	46	7	1	39	7	1
High	Q701L7	Type II hair keratin 2	48	2	1	55	3	2
High	P02533	Keratin, type I cytoskeletal 14	51	6	3	80	5	4
High	P27105	Erythrocyte band 7 integral membrane protein	74	7	2	129	11	3
High	B7Z6Z4	Myosin light polypeptide 6	78	5	1	73	9	2
High	P35527	Keratin, type I cytoskeletal 9	88	8	6	58	4	3
High	A0A024R9Q1	<b>Thrombospondin 1, isoform CRA_a</b>	94	3	3	22	3	2
High	B4DPP6	cDNA FLJ54371, highly similar to Serum albumin	97	6	3	33	3	2
High	A0A075B6Z2	Protein TRAJ56 (Fragment)	99	38	1	93	38	1
High	A0A024R1T2	Keratin, hair, acidic, 5, isoform CRA_a	113	9	5	125	7	4
High	A0A024R1N1	Myosin, heavy polypeptide 9, non-muscle, isoform CRA	115	2	4	117	3	6
High	O76011	Keratin, type I cuticular Ha4	131	10	5	122	8	4
High	P01616	Ig kappa chain V-II region MIL	133	12	1	136	12	1
High	P13645	Keratin, type I cytoskeletal 10	139	9	5	112	10	7
High	P35908	Keratin, type II cytoskeletal 2 epidermal	198	8	4	135	5	3
High	P02671	Fibrinogen alpha chain	1170	29	25	18	2	1
High	D1MGQ2	Alpha-2 globin chain		0		140	17	2
High	A0A024R5Z9	Pyruvate kinase		0		130	6	3
High	P68366	Tubulin alpha-4A chain		0		120	9	4
High	F5H5D3	Tubulin alpha-1C chain		0		119	8	4
High	C8C504	Beta-globin		0		112	31	4
High	P14770	Platelet glycoprotein IX		0		105	7	1
High	Q9H4B7	Tubulin beta-1 chain		0		93	8	3
High	A0A024RB87	RAP1B, member of RAS oncogene family, isoform CRA_a		0		74	14	2

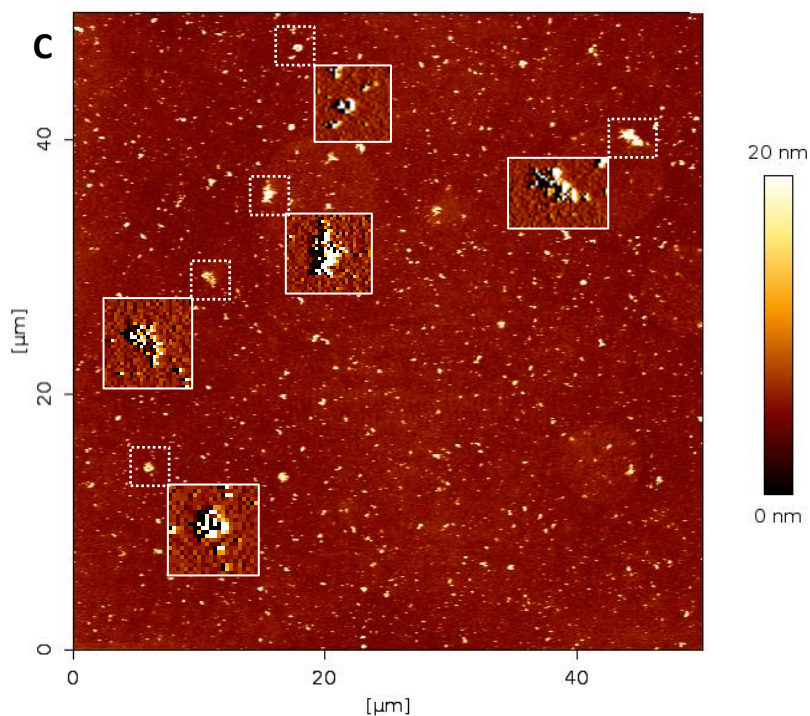
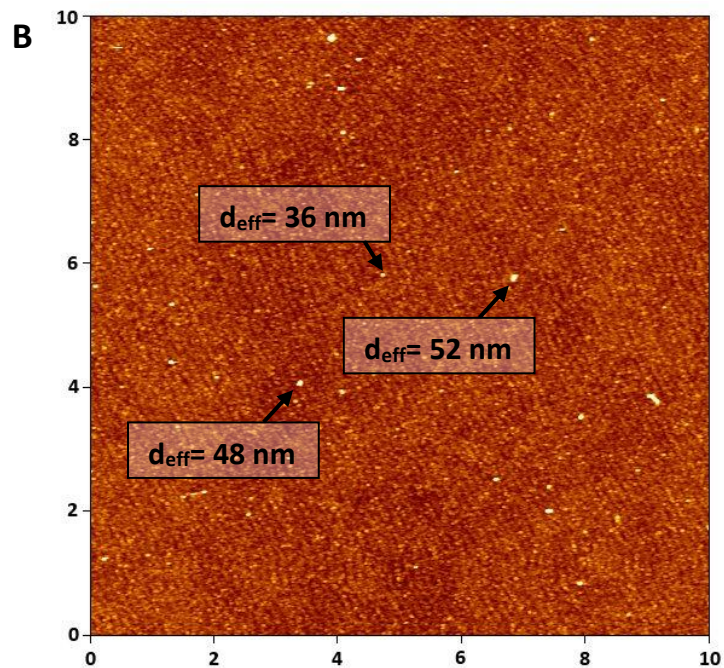
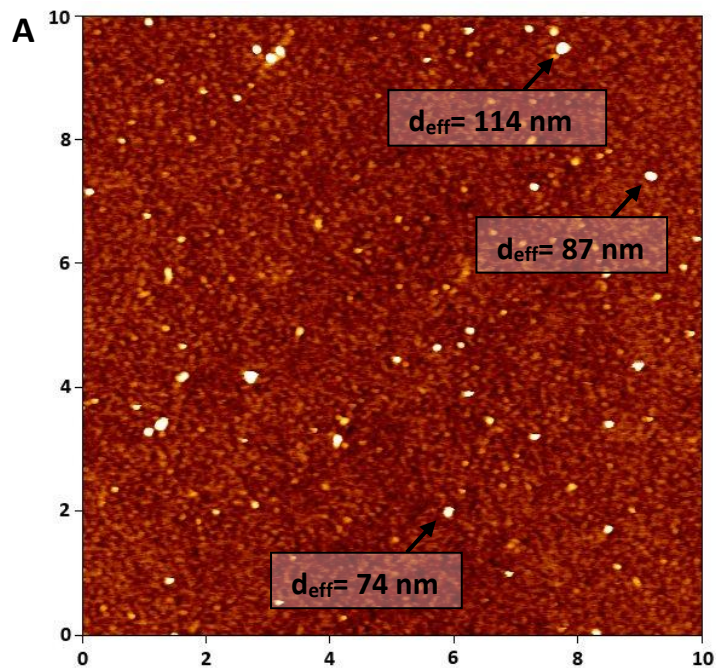
High	Q53GZ6	Heat shock 70kDa protein 8 isoform 1 variant (Fragment)		0		69	6	3
High	Q86UX7	Fermitin family homolog 3		0		64	4	2
High	P21291	Cysteine and glycine-rich protein 1		0		63	8	1
High	G8JLH6	Tetraspanin (Fragment)		0		62	4	1
High	I3L3D5	Profilin-1 (Fragment)		0		59	8	1
High	P06396-2	Isoform 2 of Gelsolin		0		57	5	4
High	J3KPS3	Fructose-bisphosphate aldolase		0		56	9	3
High	P27824-2	Isoform 2 of Calnexin		0		49	1	1
High	P37802-2	Isoform 2 of Transgelin-2		0		49	5	1
High	B3KW54	cDNA FLJ42166 fis, clone THYMU2019210, highly similar to HLA class I histocompatibility antigen, B-40 alpha chain		0		48	7	2
High	A0A0B4J269	Tubulin beta-3 chain		0		47	2	1
High	P26038	Moesin		0		45	2	1
High	A2IRN0	Raichu404X		0		45	5	2
High	V9HW26	ATP synthase subunit alpha		0		43	4	2
High	J3QRS3	Myosin regulatory light chain 12A		0		43	6	1
High	B4DMN1	cDNA FLJ61136, highly similar to Ras-related protein Rab-11A		0		40	4	1
Medium	B4DR52	Histone H2B		0		40	5	1
High	B7Z5J8	cDNA FLJ56136, highly similar to Solute carrier family 2, facilitated glucosetransporter member 14		0		39	2	2
High	Q59EU3	Dematin variant (Fragment)		0		38	2	1
High	A0A087X188	Bridging integrator 2		0		38	6	2
High	M1VPF4	Tyrosine-protein kinase receptor		0		37	3	2
High	Q5U077	L-lactate dehydrogenase		0		35	3	1
High	Q9NX76	CKLF-like MARVEL transmembrane domain-		0		34	5	1

		containing protein 6						
Medium	P12931-2	Isoform 2 of Proto-oncogene tyrosine-protein kinase Src		0		34	1	1
High	P55060	Exportin-2		0		34	1	1
High	Q92619	Minor histocompatibility protein HA-1		0		33	1	1
High	P23229	Integrin alpha-6		0		32	2	2
High	AOA024QYW3	Proteolipid protein 2 (Colonic epithelium-enriched), isoform CRA_a		0		32	9	1
High	B4DNE1	cDNA FLJ52708, highly similar to Basigin		0		32	2	1
High	B2RDI5	cDNA, FLJ96627, highly similar to Homo sapiens calpain 1, (mu/l) large subunit (CAPN1), mRNA		0		31	1	1
High	P56385	ATP synthase subunit e, mitochondrial		0		30	14	1
High	AOA075B738	Platelet endothelial cell adhesion molecule		0		29	1	1
High	P05556	Integrin beta-1		0		28	3	2
High	Q15833-3	Isoform 3 of Syntaxin-binding protein 2		0		27	3	1
High	Q6NUK7	Non-specific protein-tyrosine kinase (Fragment)		0		24	2	1
High	P53801	Pituitary tumor-transforming gene 1 protein-interacting protein		0		22	7	1
Medium	Q71SF7	Endocrine transmitter regulatory protein		0		19	1	1
High	AOA024R0V4	Vasodilator-stimulated phosphoprotein, isoform CRA_a		0		18	3	1
Low	A0AVT1	Ubiquitin-like modifier-activating enzyme 6		0		17	1	1
Low	Q7Z4K8-3	Isoform 3 of Tripartite motif-containing protein 46		0		16	2	1
High	AOA024R5U5	ADAM metallopeptidase domain 10, isoform CRA_b		0		15	2	1

High	Q15942	Zyxin		0		14	3	1
High	V9HVV1	Epididymis secretory sperm binding protein Li 78p	454	23	10		0	
High	C9JC84	Fibrinogen gamma chain	369	13	5		0	
High	P10720	Platelet factor 4 variant	44	9	1		0	
High	P02747	Complement C1q subcomponent subunit C	40	9	2		0	
High	P02649	Apolipoprotein E	34	3	1		0	
High	P02751-15	Isoform 15 of Fibronectin	23	1	2		0	
Low	P50221	Homeobox protein MOX-1	17	4	1		0	
High	Q6UXS9	Inactive caspase-12	15	6	1	0	6	1

## ❖ Annexe 11 :

### Analyse AFM des VEs plasmatiques



Analyse AFM des VEs plasmatiques : (A) et (B) Images AFM des spots  $\alpha$ -CD61 ayant vu soit le plasma brut soit le plasma nanofiltré. Ces images confirment l'élimination des plus grosses vésicules ( $> 75 \text{ nm}$ ) par l'étape de nanofiltration. «  $d_{\text{eff}}$  » correspond au diamètre effectif calculé. (C) Image AFM d'un spot Annex-V ayant vu le plasma filtré. Des images de déflexion sont présentées pour quelques agglomérats de vésicules. Cette image montre que les objets  $> 75 \text{ nm}$  dans le plasma filtré correspondent à des agglomérats de vésicules.



# Références:

1. Soler, N., Marguet, E., Verbavatz, J.-M. & Forterre, P. Virus-like vesicles and extracellular DNA produced by hyperthermophilic archaea of the order Thermococcales. *Res. Microbiol.* **159**, 390–399 (2008).
2. Lee, E.-Y. *et al.* Gram-positive bacteria produce membrane vesicles: proteomics-based characterization of Staphylococcus aureus-derived membrane vesicles. *Proteomics* **9**, 5425–5436 (2009).
3. Knox, K. W., Vesik, M. & Work, E. Relation Between Excreted Lipopolysaccharide Complexes and Surface Structures of a Lysine-Limited Culture of Escherichia coli. *J. Bacteriol.* **92**, 1206–1217 (1966).
4. Chargaff, E. & West, R. The Biological Significance of the Thromboplastic Protein of Blood. *J. Biol. Chem.* **166**, 189–197 (1946).
5. Regente, M. *et al.* Vesicular fractions of sunflower apoplastic fluids are associated with potential exosome marker proteins. *FEBS Lett.* **583**, 3363–3366 (2009).
6. Albuquerque, P. C. *et al.* Vesicular transport in Histoplasma capsulatum: an effective mechanism for trans-cell wall transfer of proteins and lipids in ascomycetes. *Cell. Microbiol.* **10**, 1695–1710 (2008).
7. Lötvall, J. *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* **3**, (2014).
8. O'Brien, J. R. The platelet-like activity of serum. *Br. J. Haematol.* **1**, 223–228 (1955).
9. Hougie, C. The activation of platelets by plasma. *Rev. Belge Pathol. Médecine Expérimentale* **24**, 141–148 (1955).
10. Wolf, P. The Nature and Significance of Platelet Products in Human Plasma. *Br. J. Haematol.* **13**, 269–288 (1967).
11. Anderson, H. C. Vesicles associated with calcification in the matrix of epiphyseal cartilage. *J. Cell Biol.* **41**, 59–72 (1969).
12. Webber, A. J. & Johnson, S. A. Platelet participation in blood coagulation aspects of hemostasis. *Am. J. Pathol.* **60**, 19–42 (1970).
13. Crawford, N. The presence of contractile proteins in platelet microparticles isolated from human and animal platelet-free plasma. *Br. J. Haematol.* **21**, 53–69 (1971).
14. Stegmayr, B. & Ronquist, G. Promotive effect on human sperm progressive motility by prostasomes. *Urol. Res.* **10**, 253–257 (1982).



15. Dvorak, H. F. *et al.* Procoagulant activity associated with plasma membrane vesicles shed by cultured tumor cells. *Cancer Res.* **43**, 4434–4442 (1983).
16. Satta, N. *et al.* Monocyte vesiculation is a possible mechanism for dissemination of membrane-associated procoagulant activities and adhesion molecules after stimulation by lipopolysaccharide. *J. Immunol.* **153**, 3245–3255 (1994).
17. Raposo, G. *et al.* B lymphocytes secrete antigen-presenting vesicles. *J. Exp. Med.* **183**, 1161–1172 (1996).
18. Zitvogel, L. *et al.* Eradication of established murine tumors using a novel cell-free vaccine: dendritic cell derived exosomes. *Nat. Med.* **4**, 594–600 (1998).
19. Combes, V. *et al.* In vitro generation of endothelial microparticles and possible prothrombotic activity in patients with lupus anticoagulant. *J. Clin. Invest.* **104**, 93–102 (1999).
20. Yuana, Y., Sturk, A. & Nieuwland, R. Extracellular vesicles in physiological and pathological conditions. *Blood Rev.* **27**, 31–39 (2013).
21. Batool, S., Abbasian, N., Burton, J. O. & Stover, C. Microparticles and their Roles in Inflammation: A Review. *Open Immunol. J.* **6**, (2013).
22. Tamagawa-Mineoka, R., Katoh, N. & Kishimoto, S. Platelet activation in patients with psoriasis: Increased plasma levels of platelet-derived microparticles and soluble P-selectin. *J. Am. Acad. Dermatol.* **62**, 621–626 (2010).
23. Minagar, A. *et al.* Elevated plasma endothelial microparticles in multiple sclerosis. *Neurology* **56**, 1319–1324 (2001).
24. Knijff-Dutmer, E. a. J., Koerts, J., Nieuwland, R., Kalsbeek-Batenburg, E. M. & van de Laar, M. a. F. J. Elevated levels of platelet microparticles are associated with disease activity in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* **46**, 1498–1503 (2002).
25. Castaman, G., Yu-Feng, L., Battistin, E. & Rodeghiero, F. Characterization of a novel bleeding disorder with isolated prolonged bleeding time and deficiency of platelet microvesicle generation. *Br. J. Haematol.* **96**, 458–463 (1997).
26. Zwaal, R. F. A., Comfurius, P. & Bevers, E. M. Scott syndrome, a bleeding disorder caused by defective scrambling of membrane phospholipids. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Mol. Cell Biol. Lipids* **1636**, 119–128 (2004).
27. Sinauridze, E. I. *et al.* Platelet microparticle membranes have 50- to 100-fold higher specific procoagulant activity than activated platelets. *Thromb. Haemost.* **97**, 425–434 (2007).
28. Lacroix, R., Dubois, C., Leroyer, A. S., Sabatier, F. & Dignat-George, F. Revisited role of microparticles in arterial and venous thrombosis. *J. Thromb. Haemost.* **11**, 24–35 (2013).
29. Falanga, A., Tartari, C. J. & Marchetti, M. Microparticles in tumor progression. *Thromb. Res.*

30. Italiano, J. E., Mairuhu, A. T. A. & Flaumenhaft, R. Clinical relevance of microparticles from platelets and megakaryocytes. *Curr. Opin. Hematol.* **17**, 578–584 (2010).
31. Kim, H. K., Song, K. S., Chung, J.-H., Lee, K. R. & Lee, S.-N. Platelet microparticles induce angiogenesis in vitro. *Br. J. Haematol.* **124**, 376–384 (2004).
32. Toth, B. *et al.* Platelet-derived microparticles and coagulation activation in breast cancer patients. *Thromb. Haemost.* **100**, 663–669 (2008).
33. Davila, M., Amirkhosravi, A., Coll, E., Liza, R. D. & Francis, J. Tissue Factor-Bearing Microparticles Derived from Tumor Cells: Impact on Coagulation Activation. *Blood* **108**, 1757–1757 (2006).
34. Baj-Krzyworzeka, M. *et al.* Tumour-derived microvesicles carry several surface determinants and mRNA of tumour cells and transfer some of these determinants to monocytes. *Cancer Immunol. Immunother. CII* **55**, 808–818 (2006).
35. Skog, J. *et al.* Glioblastoma microvesicles transport RNA and proteins that promote tumour growth and provide diagnostic biomarkers. *Nat. Cell Biol.* **10**, 1470–1476 (2008).
36. Kim, C. W. *et al.* Extracellular membrane vesicles from tumor cells promote angiogenesis via sphingomyelin. *Cancer Res.* **62**, 6312–6317 (2002).
37. Al-Nedawi, K. *et al.* Intercellular transfer of the oncogenic receptor EGFRVIII by microvesicles derived from tumour cells. *Nat. Cell Biol.* **10**, 619–624 (2008).
38. Bergsmedh, A. *et al.* Horizontal transfer of oncogenes by uptake of apoptotic bodies. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **98**, 6407–6411 (2001).
39. Huber, V. *et al.* Human colorectal cancer cells induce T-cell death through release of proapoptotic microvesicles: role in immune escape. *Gastroenterology* **128**, 1796–1804 (2005).
40. Wieckowski, E. U. *et al.* Tumor-derived microvesicles promote regulatory T cell expansion and induce apoptosis in tumor-reactive activated CD8+ T lymphocytes. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* **183**, 3720–3730 (2009).
41. Valenti, R. *et al.* Human tumor-released microvesicles promote the differentiation of myeloid cells with transforming growth factor-beta-mediated suppressive activity on T lymphocytes. *Cancer Res.* **66**, 9290–9298 (2006).
42. Rozmyslowicz, T. *et al.* Platelet- and megakaryocyte-derived microparticles transfer CXCR4 receptor to CXCR4-null cells and make them susceptible to infection by X4-HIV. *AIDS Lond. Engl.* **17**, 33–42 (2003).
43. Mastronardi, M. L. *et al.* Circulating microparticles from septic shock patients exert differential tissue expression of enzymes related to inflammation and oxidative stress. *Crit. Care*

*Med.* **39**, 1739–1748 (2011).

44. Pegtel, D. M. *et al.* Functional delivery of viral miRNAs via exosomes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **107**, 6328–6333 (2010).

45. Oehmcke, S. *et al.* Stimulation of blood mononuclear cells with bacterial virulence factors leads to the release of pro-coagulant and pro-inflammatory microparticles. *Cell. Microbiol.* **14**, 107–119 (2012).

46. Abid Hussein, M. N., Böing, A. N., Sturk, A., Hau, C. M. & Nieuwland, R. Inhibition of microparticle release triggers endothelial cell apoptosis and detachment. *Thromb. Haemost.* **98**, 1096–1107 (2007).

47. Safaei, R. *et al.* Abnormal lysosomal trafficking and enhanced exosomal export of cisplatin in drug-resistant human ovarian carcinoma cells. *Mol. Cancer Ther.* **4**, 1595–1604 (2005).

48. Shedden, K., Xie, X. T., Chandaroy, P., Chang, Y. T. & Rosania, G. R. Expulsion of small molecules in vesicles shed by cancer cells: association with gene expression and chemosensitivity profiles. *Cancer Res.* **63**, 4331–4337 (2003).

49. Liu, H., Ding, L., Zhang, Y. & Ni, S. Circulating endothelial microparticles involved in lung function decline in a rat exposed in cigarette smoke maybe from apoptotic pulmonary capillary endothelial cells. *J. Thorac. Dis.* **6**, 649–655 (2014).

50. Toth, B. *et al.* Microparticles and Exosomes: Impact on Normal and Complicated Pregnancy. *Am. J. Reprod. Immunol.* **58**, 389–402 (2007).

51. Shetty, S., Patil, R. & Ghosh, K. Role of microparticles in recurrent miscarriages and other adverse pregnancies: a review. *Eur. J. Obstet. Gynecol. Reprod. Biol.* **169**, 123–129 (2013).

52. Wahl, P. *et al.* Effects of high intensity training and high volume training on endothelial microparticles and angiogenic growth factors. *PLoS One* **9**, e96024 (2014).

53. Chen, Y.-W., Chen, Y.-C. & Wang, J.-S. Absolute hypoxic exercise training enhances in vitro thrombin generation by increasing procoagulant platelet-derived microparticles under high shear stress in sedentary men. *Clin. Sci. Lond. Engl.* **124**, 639–649 (2013).

54. Preston, R. A. *et al.* Effects of Severe Hypertension on Endothelial and Platelet Microparticles. *Hypertension* **41**, 211–217 (2003).

55. Mallat, Z. *et al.* Elevated Levels of Shed Membrane Microparticles With Procoagulant Potential in the Peripheral Circulating Blood of Patients With Acute Coronary Syndromes. *Circulation* **101**, 841–843 (2000).

56. Bernal-Mizrachi, L. *et al.* High levels of circulating endothelial microparticles in patients with acute coronary syndromes. *Am. Heart J.* **145**, 962–970 (2003).

57. Leroyer, A. S. *et al.* Cellular Origins and Thrombogenic Activity of Microparticles Isolated

From Human Atherosclerotic Plaques. *J. Am. Coll. Cardiol.* **49**, 772–777 (2007).

58. Ramacciotti, E. *et al.* Leukocyte- and platelet-derived microparticles correlate with thrombus weight and tissue factor activity in an experimental mouse model of venous thrombosis. *Thromb. Haemost.* **101**, 748–754 (2009).

59. Chirinos, J. A. *et al.* Elevation of Endothelial Microparticles, Platelets, and Leukocyte Activation in Patients With Venous Thromboembolism. *J. Am. Coll. Cardiol.* **45**, 1467–1471 (2005).

60. Jimenez, J. J. *et al.* Endothelial microparticles released in thrombotic thrombocytopenic purpura express von willebrand factor and markers of endothelial activation. *NWIPB OpenIR [C@1329422]*, (2003).

61. Kelton, J. G., Warkentin, T. E., Hayward, C. P., Murphy, W. G. & Moore, J. C. Calpain activity in patients with thrombotic thrombocytopenic purpura is associated with platelet microparticles. *Blood* **80**, 2246–2251 (1992).

62. Kim, H. K. *et al.* Elevated levels of circulating platelet microparticles, VEGF, IL-6 and RANTES in patients with gastric cancer: possible role of a metastasis predictor. *Eur. J. Cancer* **39**, 184–191 (2003).

63. Kanazawa, S. *et al.* Monocyte-derived microparticles may be a sign of vascular complication in patients with lung cancer. *Lung Cancer* **39**, 145–149 (2003).

64. Martínez-Lorenzo, M. J. *et al.* The human melanoma cell line MelJuSo secretes bioactive FasL and APO2L/TRAIL on the surface of microvesicles. Possible contribution to tumor counterattack. *Exp. Cell Res.* **295**, 315–329 (2004).

65. Frleta, D. *et al.* HIV-1 infection-induced apoptotic microparticles inhibit human DCs via CD44. *J. Clin. Invest.* **122**, 4685–4697 (2012).

66. Faille, D. *et al.* Platelet microparticles: a new player in malaria parasite cytoadherence to human brain endothelium. *FASEB J. Off. Publ. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.* **23**, 3449–3458 (2009).

67. Turturici, G., Tinnirello, R., Sconzo, G. & Geraci, F. Extracellular membrane vesicles as a mechanism of cell-to-cell communication: advantages and disadvantages. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* **306**, C621–633 (2014).

68. Raposo, G. & Stoorvogel, W. Extracellular vesicles: Exosomes, microvesicles, and friends. *J. Cell Biol.* **200**, 373–383 (2013).

69. Diehl, P. *et al.* Microparticles: major transport vehicles for distinct microRNAs in circulation. *Cardiovasc. Res.* **93**, 633–644 (2012).

70. Cantaluppi, V. *et al.* Microvesicles derived from endothelial progenitor cells protect the kidney from ischemia-reperfusion injury by microRNA-dependent reprogramming of resident renal cells. *Kidney Int.* **82**, 412–427 (2012).

71. Janowska-Wieczorek, A. *et al.* Platelet-derived microparticles bind to hematopoietic stem/progenitor cells and enhance their engraftment. *Blood* **98**, 3143–3149 (2001).
72. Clayton, A. *et al.* Human tumor-derived exosomes down-modulate NKG2D expression. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* **180**, 7249–7258 (2008).
73. Hwang, I., Shen, X. & Sprent, J. Direct stimulation of naive T cells by membrane vesicles from antigen-presenting cells: distinct roles for CD54 and B7 molecules. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **100**, 6670–6675 (2003).
74. Manly, D. A. *et al.* Increased microparticle tissue factor activity in cancer patients with Venous Thromboembolism. *Thromb. Res.* **125**, 511–512 (2010).
75. Sidhu, S. S., Mengistab, A. T., Tauscher, A. N., LaVail, J. & Basbaum, C. The microvesicle as a vehicle for EMMPRIN in tumor–stromal interactions. *Oncogene* **23**, 956–963 (2004).
76. Taraboletti, G. *et al.* Shedding of the matrix metalloproteinases MMP-2, MMP-9, and MT1-MMP as membrane vesicle-associated components by endothelial cells. *Am. J. Pathol.* **160**, 673–680 (2002).
77. Ayers, L. *et al.* Dynamic microvesicle release and clearance within the cardiovascular system: triggers and mechanisms. *Clin. Sci.* **129**, 915–931 (2015).
78. Di Vizio, D. *et al.* Oncosome formation in prostate cancer: association with a region of frequent chromosomal deletion in metastatic disease. *Cancer Res.* **69**, 5601–5609 (2009).
79. Aalberts, M., Stout, T. A. E. & Stoorvogel, W. Prostrasomes: extracellular vesicles from the prostate. *Reprod. Camb. Engl.* **147**, R1-14 (2014).
80. Anderson, H. C. Matrix vesicles and calcification. *Curr. Rheumatol. Rep.* **5**, 222–226 (2003).
81. Karlsson, M. *et al.* ‘Tolerosomes’ are produced by intestinal epithelial cells. *Eur. J. Immunol.* **31**, 2892–2900 (2001).
82. Christian, J. L. Argosomes. *Sci. STKE Signal Transduct. Knowl. Environ.* **2002**, (2002).
83. Gould, S. J. & Raposo, G. As we wait: coping with an imperfect nomenclature for extracellular vesicles. *J. Extracell. Vesicles* **2**, (2013).
84. Colombo, M., Raposo, G. & Théry, C. Biogenesis, secretion, and intercellular interactions of exosomes and other extracellular vesicles. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* **30**, 255–289 (2014).
85. Akers, J. C., Gonda, D., Kim, R., Carter, B. S. & Chen, C. C. Biogenesis of extracellular vesicles (EV): exosomes, microvesicles, retrovirus-like vesicles, and apoptotic bodies. *J. Neurooncol.* **113**, 1–11 (2013).
86. J. Simpson, R. & Mathivanan, S. Extracellular Microvesicles: The Need for Internationally Recognised Nomenclature and Stringent Purification Criteria. *J. Proteomics Bioinform.* **05**, (2012).

87. Mathivanan, S., Fahner, C. J., Reid, G. E. & Simpson, R. J. ExoCarta 2012: database of exosomal proteins, RNA and lipids. *Nucleic Acids Res.* **40**, D1241-1244 (2012).
88. Kalra, H. *et al.* Vesiclepedia: A Compendium for Extracellular Vesicles with Continuous Community Annotation. *PLOS Biol* **10**, e1001450 (2012).
89. Kim, D.-K. *et al.* EVpedia: an integrated database of high-throughput data for systemic analyses of extracellular vesicles. *J. Extracell. Vesicles* **2**, (2013).
90. Trams, E. G., Lauter, C. J., Salem, N. & Heine, U. Exfoliation of membrane ecto-enzymes in the form of micro-vesicles. *Biochim. Biophys. Acta* **645**, 63–70 (1981).
91. Johnstone, R. M., Adam, M., Hammond, J. R., Orr, L. & Turbide, C. Vesicle formation during reticulocyte maturation. Association of plasma membrane activities with released vesicles (exosomes). *J. Biol. Chem.* **262**, 9412–9420 (1987).
92. Théry, C., Zitvogel, L. & Amigorena, S. Exosomes: composition, biogenesis and function. *Nat. Rev. Immunol.* **2**, 569–579 (2002).
93. Mathivanan, S., Ji, H. & Simpson, R. J. Exosomes: Extracellular organelles important in intercellular communication. *J. Proteomics* **73**, 1907–1920 (2010).
94. György, B. *et al.* Membrane vesicles, current state-of-the-art: emerging role of extracellular vesicles. *Cell. Mol. Life Sci.* **68**, 2667–2688 (2011).
95. Pol, E. van der, Böing, A. N., Harrison, P., Sturk, A. & Nieuwland, R. Classification, Functions, and Clinical Relevance of Extracellular Vesicles. *Pharmacol. Rev.* **64**, 676–705 (2012).
96. Valadi, H. *et al.* Exosome-mediated transfer of mRNAs and microRNAs is a novel mechanism of genetic exchange between cells. *Nat. Cell Biol.* **9**, 654–659 (2007).
97. Peters, P. J. *et al.* Molecules relevant for T cell-target cell interaction are present in cytolytic granules of human T lymphocytes. *Eur. J. Immunol.* **19**, 1469–1475 (1989).
98. Blanchard, N. *et al.* TCR activation of human T cells induces the production of exosomes bearing the TCR/CD3/zeta complex. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* **168**, 3235–3241 (2002).
99. Saunderson, S. C. *et al.* Induction of exosome release in primary B cells stimulated via CD40 and the IL-4 receptor. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* **180**, 8146–8152 (2008).
100. Muntasell, A., Berger, A. C. & Roche, P. A. T cell-induced secretion of MHC class II–peptide complexes on B cell exosomes. *EMBO J.* **26**, 4263–4272 (2007).
101. Bhatnagar, S., Shinagawa, K., Castellino, F. J. & Schorey, J. S. Exosomes released from macrophages infected with intracellular pathogens stimulate a proinflammatory response in vitro and in vivo. *Blood* **110**, 3234–3244 (2007).
102. Savina, A., Fader, C. M., Damiani, M. T. & Colombo, M. I. Rab11 Promotes Docking and Fusion of Multivesicular Bodies in a Calcium-Dependent Manner. *Traffic* **6**, 131–143 (2005).

103. Harding, C., Heuser, J. & Stahl, P. Receptor-mediated endocytosis of transferrin and recycling of the transferrin receptor in rat reticulocytes. *J. Cell Biol.* **97**, 329–339 (1983).
104. Pan, B. T., Teng, K., Wu, C., Adam, M. & Johnstone, R. M. Electron microscopic evidence for externalization of the transferrin receptor in vesicular form in sheep reticulocytes. *J. Cell Biol.* **101**, 942–948 (1985).
105. Johnstone, R. M. Revisiting the road to the discovery of exosomes. *Blood Cells. Mol. Dis.* **34**, 214–219 (2005).
106. Bebawy, M. *et al.* Cell-Derived Microparticles: New Targets in the Therapeutic Management of Disease. *J. Pharm. Pharm. Sci.* **16**, 238–253 (2013).
107. Théry, C., Ostrowski, M. & Segura, E. Membrane vesicles as conveyors of immune responses. *Nat. Rev. Immunol.* **9**, 581–593 (2009).
108. Baietti, M. F. *et al.* Syndecan-syntenin-ALIX regulates the biogenesis of exosomes. *Nat. Cell Biol.* **14**, 677–685 (2012).
109. Gruenberg, J. & Stenmark, H. The biogenesis of multivesicular endosomes. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **5**, 317–323 (2004).
110. Nabhan, J. F., Hu, R., Oh, R. S., Cohen, S. N. & Lu, Q. Formation and release of arrestin domain-containing protein 1-mediated microvesicles (ARMMs) at plasma membrane by recruitment of TSG101 protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **109**, 4146–4151 (2012).
111. Raiborg, C. & Stenmark, H. The ESCRT machinery in endosomal sorting of ubiquitylated membrane proteins. *Nature* **458**, 445–452 (2009).
112. Bobrie, A., Colombo, M., Raposo, G. & Théry, C. Exosome Secretion: Molecular Mechanisms and Roles in Immune Responses. *Traffic* **12**, 1659–1668 (2011).
113. Trajkovic, K. *et al.* Ceramide triggers budding of exosome vesicles into multivesicular endosomes. *Science* **319**, 1244–1247 (2008).
114. Booth, A. M. *et al.* Exosomes and HIV Gag bud from endosome-like domains of the T cell plasma membrane. *J. Cell Biol.* **172**, 923–935 (2006).
115. Lenassi, M. *et al.* HIV Nef is secreted in exosomes and triggers apoptosis in bystander CD4+ T cells. *Traffic Cph. Den.* **11**, 110–122 (2010).
116. Piper, R. C. & Katzmann, D. J. Biogenesis and Function of Multivesicular Bodies. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* **23**, 519–547 (2007).
117. Beinert, T., Münzing, S., Possinger, K. & Krombach, F. Increased expression of the tetraspanins CD53 and CD63 on apoptotic human neutrophils. *J. Leukoc. Biol.* **67**, 369–373 (2000).
118. Mahmudi-Azer, S., Downey, G. P. & Moqbel, R. Translocation of the tetraspanin CD63 in association with human eosinophil mediator release. *Blood* **99**, 4039–4047 (2002).

119. Lydic, T. A. *et al.* Rapid and comprehensive 'shotgun' lipidome profiling of colorectal cancer cell derived exosomes. *Methods* **87**, 83–95 (2015).
120. Kalra, H., Drummen, G. P. C. & Mathivanan, S. Focus on Extracellular Vesicles: Introducing the Next Small Big Thing. *Int. J. Mol. Sci.* **17**, 170 (2016).
121. Laulagnier, K. *et al.* Mast cell- and dendritic cell-derived exosomes display a specific lipid composition and an unusual membrane organization. *Biochem. J.* **380**, 161–171 (2004).
122. Wubbolts, R. *et al.* Proteomic and Biochemical Analyses of Human B Cell-derived Exosomes POTENTIAL IMPLICATIONS FOR THEIR FUNCTION AND MULTIVESICULAR BODY FORMATION. *J. Biol. Chem.* **278**, 10963–10972 (2003).
123. Brouwers, J. F. *et al.* Distinct lipid compositions of two types of human prostasomes. *PROTEOMICS* **13**, 1660–1666 (2013).
124. Heijnen, H. F. G., Schiel, A. E., Fijnheer, R., Geuze, H. J. & Sixma, J. J. Activated Platelets Release Two Types of Membrane Vesicles: Microvesicles by Surface Shedding and Exosomes Derived From Exocytosis of Multivesicular Bodies and  $\alpha$ -Granules. *Blood* **94**, 3791–3799 (1999).
125. Keerthikumar, S. *et al.* Proteogenomic analysis reveals exosomes are more oncogenic than ectosomes. *Oncotarget* **6**, 15375–15396 (2015).
126. Hemler, M. E. Tetraspanin proteins mediate cellular penetration, invasion, and fusion events and define a novel type of membrane microdomain. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* **19**, 397–422 (2003).
127. Conde-Vancells, J. *et al.* Characterization and comprehensive proteome profiling of exosomes secreted by hepatocytes. *J. Proteome Res.* **7**, 5157–5166 (2008).
128. Mathivanan, S. *et al.* Proteomics analysis of A33 immunoaffinity-purified exosomes released from the human colon tumor cell line LIM1215 reveals a tissue-specific protein signature. *Mol. Cell. Proteomics MCP* **9**, 197–208 (2010).
129. Batista, B. S., Eng, W. S., Pilobello, K. T., Hendricks-Muñoz, K. D. & Mahal, L. K. Identification of a Conserved Glycan Signature for Microvesicles. *J. Proteome Res.* **10**, 4624–4633 (2011).
130. Minciacchi, V. R., Freeman, M. R. & Di Vizio, D. Extracellular vesicles in cancer: exosomes, microvesicles and the emerging role of large oncosomes. *Semin. Cell Dev. Biol.* **40**, 41–51 (2015).
131. Yoshioka, Y. *et al.* Comparative marker analysis of extracellular vesicles in different human cancer types. *J. Extracell. Vesicles* **2**, (2013).
132. Guescini, M., Genedani, S., Stocchi, V. & Agnati, L. F. Astrocytes and Glioblastoma cells release exosomes carrying mtDNA. *J. Neural Transm. Vienna Austria 1996* **117**, 1–4 (2010).
133. Cocucci, E., Racchetti, G. & Meldolesi, J. Shedding microvesicles: artefacts no more. *Trends Cell Biol.* **19**, 43–51 (2009).
134. Xu, R., Greening, D. W., Rai, A., Ji, H. & Simpson, R. J. Highly-purified exosomes and shed



- microvesicles isolated from the human colon cancer cell line LIM1863 by sequential centrifugal ultrafiltration are biochemically and functionally distinct. *Methods* **87**, 11–25 (2015).
135. Meckes, D. G. & Raab-Traub, N. Microvesicles and Viral Infection<sup>▽</sup>. *J. Virol.* **85**, 12844–12854 (2011).
136. VanWijk, M. J., VanBavel, E., Sturk, A. & Nieuwland, R. Microparticles in cardiovascular diseases. *Cardiovasc. Res.* **59**, 277–287 (2003).
137. Bevers, E. M., Comfurius, P. & Zwaal, R. F. A. Changes in membrane phospholipid distribution during platelet activation. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Biomembr.* **736**, 57–66 (1983).
138. Bevers, E. M., Comfurius, P., Van Rijn, J. L. M. L. & Hemker, H. C. Generation of Prothrombin-Converting Activity and the Exposure of Phosphatidylserine at the Outer Surface of Platelets. *Eur. J. Biochem.* **122**, 429–436 (1982).
139. Fadok, V. A. *et al.* Different populations of macrophages use either the vitronectin receptor or the phosphatidylserine receptor to recognize and remove apoptotic cells. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* **149**, 4029–4035 (1992).
140. Schroit, A. J., Madsen, J. W. & Tanaka, Y. In vivo recognition and clearance of red blood cells containing phosphatidylserine in their plasma membranes. *J. Biol. Chem.* **260**, 5131–5138 (1985).
141. Gonzalez, L. J. *et al.* The influence of membrane physical properties on microvesicle release in human erythrocytes. *PMC Biophys.* **2**, 7 (2009).
142. Hargett, L. A. & Bauer, N. N. On the origin of microparticles: From ‘platelet dust’ to mediators of intercellular communication. *Pulm. Circ.* **3**, 329–340 (2013).
143. Manno, S., Takakuwa, Y. & Mohandas, N. Identification of a functional role for lipid asymmetry in biological membranes: Phosphatidylserine-skeletal protein interactions modulate membrane stability. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **99**, 1943–1948 (2002).
144. Zwaal, R. F. A. & Schroit, A. J. Pathophysiologic Implications of Membrane Phospholipid Asymmetry in Blood Cells. *Blood* **89**, 1121–1132 (1997).
145. Yano, Y. *et al.* The effects of calpeptin (a calpain specific inhibitor) on agonist induced microparticle formation from the platelet plasma membrane. *Thromb. Res.* **71**, 385–396 (1993).
146. Nolan, S., Dixon, R., Norman, K., Hellewell, P. & Ridger, V. Nitric oxide regulates neutrophil migration through microparticle formation. *Am. J. Pathol.* **172**, 265–273 (2008).
147. Cauwenberghs, S. *et al.* Shedding of procoagulant microparticles from unstimulated platelets by integrin-mediated destabilization of actin cytoskeleton. *FEBS Lett.* **580**, 5313–5320 (2006).
148. Sapet, C. *et al.* Thrombin-induced endothelial microparticle generation: identification of a novel pathway involving ROCK-II activation by caspase-2. *Blood* **108**, 1868–1876 (2006).

149. van den Akker, J. *et al.* Transglutaminase 2 is secreted from smooth muscle cells by transamidation-dependent microparticle formation. *Amino Acids* **42**, 961–973 (2012).
150. Jimenez, J. J. *et al.* Endothelial cells release phenotypically and quantitatively distinct microparticles in activation and apoptosis. *Thromb. Res.* **109**, 175–180 (2003).
151. Peterson, D. B. *et al.* Comparative proteomic analysis of PAI-1 and TNF-alpha-derived endothelial microparticles. *Proteomics* **8**, 2430–2446 (2008).
152. Bernimoulin, M. *et al.* Differential stimulation of monocytic cells results in distinct populations of microparticles. *J. Thromb. Haemost. JTH* **7**, 1019–1028 (2009).
153. van der Zee, P. M. *et al.* P-selectin- and CD63-exposing platelet microparticles reflect platelet activation in peripheral arterial disease and myocardial infarction. *Clin. Chem.* **52**, 657–664 (2006).
154. Sims, P. J., Faioni, E. M., Wiedmer, T. & Shattil, S. J. Complement proteins C5b-9 cause release of membrane vesicles from the platelet surface that are enriched in the membrane receptor for coagulation factor Va and express prothrombinase activity. *J. Biol. Chem.* **263**, 18205–18212 (1988).
155. Shet, A. S. Sickle blood contains tissue factor-positive microparticles derived from endothelial cells and monocytes. *Blood* **102**, 2678–2683 (2003).
156. Thomas, G. M. *et al.* Cancer cell-derived microparticles bearing P-selectin glycoprotein ligand 1 accelerate thrombus formation in vivo. *J. Exp. Med.* **206**, 1913–1927 (2009).
157. Pluskota, E. *et al.* Expression, activation, and function of integrin  $\alpha$ M $\beta$ 2 (Mac-1) on neutrophil-derived microparticles. *Blood* **112**, 2327–2335 (2008).
158. Biró, É. *et al.* The phospholipid composition and cholesterol content of platelet-derived microparticles: a comparison with platelet membrane fractions. *J. Thromb. Haemost.* **3**, 2754–2763 (2005).
159. Weerheim, A. M., Kolb, A. M., Sturk, A. & Nieuwland, R. Phospholipid Composition of Cell-Derived Microparticles Determined by One-Dimensional High-Performance Thin-Layer Chromatography. *Anal. Biochem.* **302**, 191–198 (2002).
160. Salzer, U. *et al.* Vesicles generated during storage of red cells are rich in the lipid raft marker stomatin. *Transfusion (Paris)* **48**, 451–462 (2008).
161. Salzer, U., Hinterdorfer, P., Hunger, U., Borken, C. & Prohaska, R. Ca(++)-dependent vesicle release from erythrocytes involves stomatin-specific lipid rafts, synexin (annexin VII), and sorcin. *Blood* **99**, 2569–2577 (2002).
162. Del Conde, I., Shrimpton, C. N., Thiagarajan, P. & López, J. A. Tissue-factor-bearing microvesicles arise from lipid rafts and fuse with activated platelets to initiate coagulation. *Blood* **106**, 1604–1611 (2005).

163. Arraud, N. *et al.* Extracellular vesicles from blood plasma: determination of their morphology, size, phenotype and concentration. *J. Thromb. Haemost. JTH* **12**, 614–627 (2014).
164. Yuan, A. *et al.* Transfer of MicroRNAs by Embryonic Stem Cell Microvesicles. *PLoS ONE* **4**, e4722 (2009).
165. Chen, T. S. *et al.* Mesenchymal stem cell secretes microparticles enriched in pre-microRNAs. *Nucleic Acids Res.* **38**, 215–224 (2010).
166. Reich, C. F. & Pisetsky, D. S. The content of DNA and RNA in microparticles released by Jurkat and HL-60 cells undergoing in vitro apoptosis. *Exp. Cell Res.* **315**, 760–768 (2009).
167. Elmore, S. Apoptosis: A Review of Programmed Cell Death. *Toxicol. Pathol.* **35**, 495–516 (2007).
168. Sebbagh, M. *et al.* Caspase-3-mediated cleavage of ROCK I induces MLC phosphorylation and apoptotic membrane blebbing. *Nat. Cell Biol.* **3**, 346–352 (2001).
169. Coleman, M. L. *et al.* Membrane blebbing during apoptosis results from caspase-mediated activation of ROCK I. *Nat. Cell Biol.* **3**, 339–345 (2001).
170. Mallat, Z. *et al.* Shed Membrane Microparticles With Procoagulant Potential in Human Atherosclerotic Plaques. *Circulation* **99**, 348–353 (1999).
171. Martínez, M. C. & Freyssinet, J.-M. Deciphering the plasma membrane hallmarks of apoptotic cells: Phosphatidylserine transverse redistribution and calcium entry. *BMC Cell Biol.* **2**, 20 (2001).
172. Lleo, A. *et al.* Shotgun proteomics: Identification of unique protein profiles of apoptotic bodies from biliary epithelial cells. *Hepatology* **60**, 1314–1323 (2014).
173. Atkin-Smith, G. K. *et al.* A novel mechanism of generating extracellular vesicles during apoptosis via a beads-on-a-string membrane structure. *Nat. Commun.* **6**, 7439 (2015).
174. Huber, J. *et al.* Oxidized membrane vesicles and blebs from apoptotic cells contain biologically active oxidized phospholipids that induce monocyte-endothelial interactions. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **22**, 101–107 (2002).
175. Kagan, V. E. *et al.* A role for oxidative stress in apoptosis: oxidation and externalization of phosphatidylserine is required for macrophage clearance of cells undergoing Fas-mediated apoptosis. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* **169**, 487–499 (2002).
176. Erwig, L.-P. & Henson, P. M. Clearance of apoptotic cells by phagocytes. *Cell Death Differ.* **15**, 243–250 (2007).
177. Meesmann, H. M. *et al.* Decrease of sialic acid residues as an eat-me signal on the surface of apoptotic lymphocytes. *J. Cell Sci.* **123**, 3347–3356 (2010).
178. Samos, J., García-Olmo, D. C., Picazo, M. G., Rubio-Vitaller, A. & García-Olmo, D. Circulating

- nucleic acids in plasma/serum and tumor progression: are apoptotic bodies involved? An experimental study in a rat cancer model. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **1075**, 165–173 (2006).
179. Yuana, Y., Levels, J., Grootemaat, A., Sturk, A. & Nieuwland, R. Co-isolation of extracellular vesicles and high-density lipoproteins using density gradient ultracentrifugation. *J. Extracell. Vesicles* **3**, (2014).
180. Rood, I. M. *et al.* Comparison of three methods for isolation of urinary microvesicles to identify biomarkers of nephrotic syndrome. *Kidney Int.* **78**, 810–816 (2010).
181. Gardiner, C. *et al.* Techniques used for the isolation and characterization of extracellular vesicles: results of a worldwide survey. *J. Extracell. Vesicles* **5**, (2016).
182. Witwer, K. W. *et al.* Standardization of sample collection, isolation and analysis methods in extracellular vesicle research. *J. Extracell. Vesicles* **2**, (2013).
183. Yuana, Y., Bertina, R. M. & Osanto, S. Pre-analytical and analytical issues in the analysis of blood microparticles. *Thromb. Haemost.* (2010). doi:10.1160/TH10-09-0595
184. Lacroix, R. *et al.* Impact of pre-analytical parameters on the measurement of circulating microparticles: towards standardization of protocol. *J. Thromb. Haemost.* **10**, 437–446 (2012).
185. Aras, O. *et al.* Induction of microparticle- and cell-associated intravascular tissue factor in human endotoxemia. *Blood* **103**, 4545–4553 (2004).
186. Robert, S. *et al.* Standardization of platelet-derived microparticle counting using calibrated beads and a Cytomics FC500 routine flow cytometer: a first step towards multicenter studies? *J. Thromb. Haemost.* **7**, 190–197 (2009).
187. Thaler, J. *et al.* Circulating procoagulant microparticles in cancer patients. *Ann. Hematol.* **90**, 447–453 (2011).
188. van Ierssel, S. H. *et al.* Flow cytometric detection of endothelial microparticles (EMP): effects of centrifugation and storage alter with the phenotype studied. *Thromb. Res.* **125**, 332–339 (2010).
189. Horstman, L. L., Jy, W., Jimenez, J. J., Bidot, C. & Ahn, Y. S. New horizons in the analysis of circulating cell-derived microparticles. *Keio J. Med.* **53**, 210–230 (2004).
190. Théry, C., Amigorena, S., Raposo, G. & Clayton, A. Isolation and characterization of exosomes from cell culture supernatants and biological fluids. *Curr. Protoc. Cell Biol. Editor. Board Juan Bonifacino Al Chapter 3*, Unit 3.22 (2006).
191. SZATANEK, R., BARAN, J., SIEDLAR, M. & BAJ-KRZYWORZEKA, M. Isolation of extracellular vesicles: Determining the correct approach (Review). *Int. J. Mol. Med.* **36**, 11–17 (2015).
192. Aatonen, M. T. *et al.* Isolation and characterization of platelet-derived extracellular vesicles. *J. Extracell. Vesicles* **3**, (2014).
193. György, B. *et al.* Detection and isolation of cell-derived microparticles are compromised by

- protein complexes resulting from shared biophysical parameters. *Blood* **117**, e39–e48 (2011).
194. Sódar, B. W. *et al.* Low-density lipoprotein mimics blood plasma-derived exosomes and microvesicles during isolation and detection. *Sci. Rep.* **6**, 24316 (2016).
195. Nordin, J. Z. *et al.* Ultrafiltration with size-exclusion liquid chromatography for high yield isolation of extracellular vesicles preserving intact biophysical and functional properties. *Nanomedicine Nanotechnol. Biol. Med.* **11**, 879–883 (2015).
196. Linares, R., Tan, S., Gounou, C., Arraud, N. & Brisson, A. R. High-speed centrifugation induces aggregation of extracellular vesicles. *J. Extracell. Vesicles* **4**, (2015).
197. Tauro, B. J. *et al.* Comparison of ultracentrifugation, density gradient separation, and immunoaffinity capture methods for isolating human colon cancer cell line LIM1863-derived exosomes. *Methods* **56**, 293–304 (2012).
198. Momen-Heravi, F. *et al.* Current methods for the isolation of extracellular vesicles. doi:10.1515/hsz-2013-0141
199. Merchant, M. L. *et al.* Microfiltration isolation of human urinary exosomes for characterization by MS. *Proteomics Clin. Appl.* **4**, 84–96 (2010).
200. Cheruvanky, A. *et al.* Rapid isolation of urinary exosomal biomarkers using a nanomembrane ultrafiltration concentrator. *Am. J. Physiol. Renal Physiol.* **292**, F1657-1661 (2007).
201. Lamparski, H. G. *et al.* Production and characterization of clinical grade exosomes derived from dendritic cells. *J. Immunol. Methods* **270**, 211–226 (2002).
202. Lobb, R. J. *et al.* Optimized exosome isolation protocol for cell culture supernatant and human plasma. *J. Extracell. Vesicles* **4**, (2015).
203. Davies, R. T. *et al.* Microfluidic filtration system to isolate extracellular vesicles from blood. *Lab. Chip* **12**, 5202–5210 (2012).
204. Liga, A., Vliegenthart, A. D. B., Oosthuyzen, W., Dear, J. W. & Kersaudy-Kerhoas, M. Exosome isolation: a microfluidic road-map. *Lab Chip* **15**, 2388–2394 (2015).
205. Wang, Z. *et al.* Ciliated micropillars for the microfluidic-based isolation of nanoscale lipid vesicles. *Lab. Chip* **13**, 2879–2882 (2013).
206. Woo, H.-K. *et al.* Exodisc for Rapid, Size-Selective, and Efficient Isolation and Analysis of Nanoscale Extracellular Vesicles from Biological Samples. *ACS Nano* **11**, 1360–1370 (2017).
207. Dean, W. L., Lee, M. J., Cummins, T. D., Schultz, D. J. & Powell, D. W. Proteomic and functional characterisation of platelet microparticle size classes. *Thromb. Haemost.* **102**, 711–718 (2009).
208. Jy, W., Horstman, L. L. & Ahn, Y. S. Microparticle size and its relation to composition, functional activity, and clinical significance. *Semin. Thromb. Hemost.* **36**, 876–880 (2010).

209. Böing, A. N. *et al.* Single-step isolation of extracellular vesicles by size-exclusion chromatography. *J. Extracell. Vesicles* **3**, (2014).
210. Lozano-Ramos, I. *et al.* Size-exclusion chromatography-based enrichment of extracellular vesicles from urine samples. *J. Extracell. Vesicles* **4**, (2015).
211. Ko, J., Carpenter, E. & Issadore, D. Detection and isolation of circulating exosomes and microvesicles for cancer monitoring and diagnostics using micro-/nano-based devices. *The Analyst* **141**, 450–460 (2016).
212. Yoo, C. E. *et al.* A direct extraction method for microRNAs from exosomes captured by immunoaffinity beads. *Anal. Biochem.* **431**, 96–98 (2012).
213. Nakai, W. *et al.* A novel affinity-based method for the isolation of highly purified extracellular vesicles. *Sci. Rep.* **6**, 33935 (2016).
214. Chen, C. *et al.* Microfluidic isolation and transcriptome analysis of serum microvesicles. *Lab. Chip* **10**, 505–511 (2010).
215. Kanwar, S. S., Dunlay, C. J., Simeone, D. M. & Nagrath, S. Microfluidic device (ExoChip) for on-chip isolation, quantification and characterization of circulating exosomes. *Lab. Chip* **14**, 1891–1900 (2014).
216. Ashcroft, B. A. *et al.* Determination of the size distribution of blood microparticles directly in plasma using atomic force microscopy and microfluidics. *Biomed. Microdevices* **14**, 641–649 (2012).
217. Yamada, T., Inoshima, Y., Matsuda, T. & Ishiguro, N. Comparison of Methods for Isolating Exosomes from Bovine Milk. *J. Vet. Med. Sci.* **74**, 1523–1525 (2012).
218. Alvarez, M. L., Khosroheidari, M., Kanchi Ravi, R. & DiStefano, J. K. Comparison of protein, microRNA, and mRNA yields using different methods of urinary exosome isolation for the discovery of kidney disease biomarkers. *Kidney Int.* **82**, 1024–1032 (2012).
219. Taylor, D. D., Zacharias, W. & Gercel-Taylor, C. Exosome isolation for proteomic analyses and RNA profiling. *Methods Mol. Biol. Clifton NJ* **728**, 235–246 (2011).
220. Lacroix, R. *et al.* Standardization of platelet-derived microparticle enumeration by flow cytometry with calibrated beads: results of the International Society on Thrombosis and Haemostasis SSC Collaborative workshop. *J. Thromb. Haemost.* **8**, 2571–2574 (2010).
221. Van Der POL, E., Van GEMERT, M. J. C., Sturk, A., Nieuwland, R. & Van LEEUWEN, T. G. Single vs. swarm detection of microparticles and exosomes by flow cytometry. *J. Thromb. Haemost.* **10**, 919–930 (2012).
222. van der Pol, E. *et al.* Optical and non-optical methods for detection and characterization of microparticles and exosomes. *J. Thromb. Haemost.* (2010). doi:10.1111/j.1538-7836.2010.04074.x
223. Nolte-'t Hoen, E. N. M. *et al.* Quantitative and qualitative flow cytometric analysis of

- nanosized cell-derived membrane vesicles. *Nanomedicine Nanotechnol. Biol. Med.* **8**, 712–720 (2012).
224. van der Vlist, E. J., Nolte-'t Hoen, E. N. M., Stoorvogel, W., Arkesteijn, G. J. A. & Wauben, M. H. M. Fluorescent labeling of nano-sized vesicles released by cells and subsequent quantitative and qualitative analysis by high-resolution flow cytometry. *Nat. Protoc.* **7**, 1311–1326 (2012).
225. Groot Kormelink, T. *et al.* Prerequisites for the analysis and sorting of extracellular vesicle subpopulations by high-resolution flow cytometry. *Cytom. Part J. Int. Soc. Anal. Cytol.* **89**, 135–147 (2016).
226. Shao, H. *et al.* Protein typing of circulating microvesicles allows real-time monitoring of glioblastoma therapy. *Nat. Med.* **18**, 1835–1840 (2012).
227. van der Pol, E., Coumans, F., Varga, Z., Krumrey, M. & Nieuwland, R. Innovation in detection of microparticles and exosomes. *J. Thromb. Haemost.* **11**, 36–45 (2013).
228. Revenfeld, A. L. S. *et al.* Diagnostic and Prognostic Potential of Extracellular Vesicles in Peripheral Blood. *Clin. Ther.* **36**, 830–846 (2014).
229. Gercel-Taylor, C., Atay, S., Tullis, R. H., Kesimer, M. & Taylor, D. D. Nanoparticle analysis of circulating cell-derived vesicles in ovarian cancer patients. *Anal. Biochem.* **428**, 44–53 (2012).
230. Berne, B. J. & Pecora, R. *Dynamic Light Scattering: With Applications to Chemistry, Biology, and Physics.* (Dover Publications, 2000).
231. Lawrie, A. S., Albanyan, A., Cardigan, R. A., Mackie, I. J. & Harrison, P. Microparticle sizing by dynamic light scattering in fresh-frozen plasma. *Vox Sang.* **96**, 206–212 (2009).
232. Ko, J., Carpenter, E. & Issadore, D. Detection and isolation of circulating exosomes and microvesicles for cancer monitoring and diagnostics using micro-/nano-based devices. *The Analyst* **141**, 450–460 (2016).
233. Soo, C. Y. *et al.* Nanoparticle tracking analysis monitors microvesicle and exosome secretion from immune cells. *Immunology* **136**, 192–197 (2012).
234. Dragovic, R. A. *et al.* Sizing and phenotyping of cellular vesicles using Nanoparticle Tracking Analysis. *Nanomed.* **7**, 780–788 (2011).
235. Ito, T., Sun, L., Bevan, M. A. & Crooks, R. M. Comparison of Nanoparticle Size and Electrophoretic Mobility Measurements Using a Carbon-Nanotube-Based Coulter Counter, Dynamic Light Scattering, Transmission Electron Microscopy, and Phase Analysis Light Scattering. *Langmuir* **20**, 6940–6945 (2004).
236. Coumans, F. A. W. *et al.* Reproducible extracellular vesicle size and concentration determination with tunable resistive pulse sensing. *J. Extracell. Vesicles* **3**, (2014).
237. Varga, Z. *et al.* Towards traceable size determination of extracellular vesicles. *J. Extracell.*

*Vesicles* **3**, (2014).

238. Tatischeff, I., Larquet, E., Falcón-Pérez, J. M., Turpin, P.-Y. & Kruglik, S. G. Fast characterisation of cell-derived extracellular vesicles by nanoparticles tracking analysis, cryo-electron microscopy, and Raman tweezers microspectroscopy. *J. Extracell. Vesicles* **1**, (2012).

239. Baron, M., Boulanger, C. M., Staels, B. & Tailleux, A. Cell-derived microparticles in atherosclerosis: biomarkers and targets for pharmacological modulation? *J. Cell. Mol. Med.* doi:10.1111/j.1582-4934.2011.01486.x

240. Habib, A. *et al.* Elevated levels of circulating procoagulant microparticles in patients with  $\beta$ -thalassemia intermedia. *Haematologica* **93**, 941–942 (2008).

241. Ay, C., Freyssinet, J.-M., Sailer, T., Vormittag, R. & Pabinger, I. Circulating procoagulant microparticles in patients with venous thromboembolism. *Thromb. Res.* **123**, 724–726 (2009).

242. Steppich, B. A. *et al.* Plasma TF activity predicts cardiovascular mortality in patients with acute myocardial infarction. *Thromb. J.* **7**, 11 (2009).

243. Ueba, T. *et al.* Level, distribution and correlates of platelet-derived microparticles in healthy individuals with special reference to the metabolic syndrome. *Thromb. Haemost.* (2008). doi:10.1160/TH07-11-0668

244. Nomura, S. *et al.* Assessment of an ELISA kit for platelet-derived microparticles by joint research at many institutes in Japan. *J. Atheroscler. Thromb.* **16**, 878–887 (2009).

245. Jørgensen, M. *et al.* Extracellular Vesicle (EV) Array: microarray capturing of exosomes and other extracellular vesicles for multiplexed phenotyping. *J. Extracell. Vesicles* **2**, (2013).

246. Stratton, D. *et al.* Label-free real-time acoustic sensing of microvesicle release from prostate cancer (PC3) cells using a Quartz Crystal Microbalance. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **453**, 619–624 (2014).

247. Stratton, D., Moore, C., Antwi-Baffour, S., Lange, S. & Inal, J. Microvesicles released constitutively from prostate cancer cells differ biochemically and functionally to stimulated microvesicles released through sublytic C5b-9. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **460**, 589–595 (2015).

248. Lausted, C., Hu, Z., Hood, L. & Campbell, C. T. SPR imaging for high throughput, label-free interaction analysis. *Comb. Chem. High Throughput Screen.* **12**, 741–751 (2009).

249. Zhu, L. *et al.* Label-free quantitative detection of tumor-derived exosomes through surface plasmon resonance imaging. *Anal. Chem.* **86**, 8857–8864 (2014).

250. Im, H. *et al.* Label-free detection and molecular profiling of exosomes with a nano-plasmonic sensor. *Nat. Biotechnol.* **32**, 490–495 (2014).

251. Grasso, L. *et al.* Molecular screening of cancer-derived exosomes by surface plasmon



- resonance spectroscopy. *Anal. Bioanal. Chem.* **407**, 5425–5432 (2015).
252. Maiolo, D. *et al.* Colorimetric Nanoplasmonic Assay To Determine Purity and Titratable Extracellular Vesicles. *Anal. Chem.* **87**, 4168–4176 (2015).
253. Mobarrez, F. *et al.* Microparticles and microscopic structures in three fractions of fresh cerebrospinal fluid in schizophrenia: Case report of twins. *Schizophr. Res.* **143**, 192–197 (2013).
254. Doeuvre, L., Plawinski, L., Goux, D., Vivien, D. & Anglés-Cano, E. Plasmin on adherent cells: from microvesiculation to apoptosis. *Biochem. J.* **432**, 365–373 (2010).
255. Yuana, Y. *et al.* Cryo-electron microscopy of extracellular vesicles in fresh plasma. *J. Extracell. Vesicles* **2**, (2013).
256. Pisitkun, T., Shen, R.-F. & Knepper, M. A. Identification and proteomic profiling of exosomes in human urine. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **101**, 13368–13373 (2004).
257. Siedlecki, C. A., Wen Wang, I., Higashi, J. M., Kottke-Marchant, K. & Marchant, R. E. Platelet-derived microparticles on synthetic surfaces observed by atomic force microscopy and fluorescence microscopy. *Biomaterials* **20**, 1521–1529 (1999).
258. Yuana, Y. *et al.* Atomic force microscopy: a novel approach to the detection of nanosized blood microparticles. *J. Thromb. Haemost.* (2009). doi:10.1111/j.1538-7836.2009.03654.x
259. Obeid, S. *et al.* Development of a NanoBioAnalytical platform for «on-chip» qualification and quantification of platelet-derived microparticles. *Biosens. Bioelectron.* doi:10.1016/j.bios.2016.08.100
260. Leong, H. S., Podor, T. J., Manocha, B. & Lewis, J. D. Validation of flow cytometric detection of platelet microparticles and liposomes by atomic force microscopy. *J. Thromb. Haemost.* (2011). doi:10.1111/j.1538-7836.2011.04528.x
261. Jin, M., Drwal, G., Bourgeois, T., Saltz, J. & Wu, H. M. Distinct proteome features of plasma microparticles. *PROTEOMICS* **5**, 1940–1952 (2005).
262. Smalley, D. M., Root, K. E., Cho, H., Ross, M. M. & Ley, K. Proteomic discovery of 21 proteins expressed in human plasma-derived but not platelet-derived microparticles. *Thromb. Haemost.* **97**, 67–80 (2007).
263. Losito, I. *et al.* Phospholipidomics of Human Blood Microparticles. *Anal. Chem.* **85**, 6405–6413 (2013).
264. Osteikoetxea, X. *et al.* Improved Characterization of EV Preparations Based on Protein to Lipid Ratio and Lipid Properties. *PLoS ONE* **10**, (2015).
265. Kowal, J. *et al.* Proteomic comparison defines novel markers to characterize heterogeneous populations of extracellular vesicle subtypes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **113**, E968-977 (2016).
266. Kreimer, S. *et al.* Mass-Spectrometry-Based Molecular Characterization of Extracellular

Vesicles: Lipidomics and Proteomics. *J. Proteome Res.* **14**, 2367–2384 (2015).

267. Llorente, A. *et al.* Molecular lipidomics of exosomes released by PC-3 prostate cancer cells. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Mol. Cell Biol. Lipids* **1831**, 1302–1309 (2013).

268. Gajos, K. *et al.* Immobilization and detection of platelet-derived extracellular vesicles on functionalized silicon substrate: cytometric and spectrometric approach. *Anal. Bioanal. Chem.* 1–11 (2016). doi:10.1007/s00216-016-0036-5

269. Momen-Heravi, F. *et al.* Alternative Methods for Characterization of Extracellular Vesicles. *Front. Physiol.* **3**, (2012).

270. Rémy-Martin, F. *Développement d'une plateforme pour l'analyse sur puce d'un biomarqueur par couplage des technologies de résonance des plasmons de surface et de spectrométrie de masse.* (Besançon, 2013).

271. Kausaite-Minkstiniene, A., Ramanaviciene, A., Kirlyte, J. & Ramanavicius, A. Comparative Study of Random and Oriented Antibody Immobilization Techniques on the Binding Capacity of Immunosensor. *Anal. Chem.* **82**, 6401–6408 (2010).

272. Ulman, A. Formation and Structure of Self-Assembled Monolayers. *Chem. Rev.* **96**, 1533–1554 (1996).

273. Briand, E., Salmain, M., Compère, C. & Pradier, C.-M. Immobilization of Protein A on SAMs for the elaboration of immunosensors. *Colloids Surf. B Biointerfaces* **53**, 215–224 (2006).

274. Dubois, L. H. & Nuzzo, R. G. Synthesis, Structure, and Properties of Model Organic Surfaces. *Annu. Rev. Phys. Chem.* **43**, 437–463 (1992).

275. Frasconi, M., Mazzei, F. & Ferri, T. Protein immobilization at gold–thiol surfaces and potential for biosensing. *Anal. Bioanal. Chem.* **398**, 1545–1564 (2010).

276. Love, J. C., Estroff, L. A., Kriebel, J. K., Nuzzo, R. G. & Whitesides, G. M. Self-Assembled Monolayers of Thiolates on Metals as a Form of Nanotechnology. *Chem. Rev.* **105**, 1103–1170 (2005).

277. Frederix, F. *et al.* Enhanced Performance of an Affinity Biosensor Interface Based on Mixed Self-Assembled Monolayers of Thiols on Gold. *Langmuir* **19**, 4351–4357 (2003).

278. Huang, L. *et al.* Prostate-specific antigen immunosensing based on mixed self-assembled monolayers, camel antibodies and colloidal gold enhanced sandwich assays. *Biosens. Bioelectron.* **21**, 483–490 (2005).

279. Sehgal, D. & Vijay, I. K. A method for the high efficiency of water-soluble carbodiimide-mediated amidation. *Anal. Biochem.* **218**, 87–91 (1994).

280. Pei, Z. *et al.* Optimizing immobilization on two-dimensional carboxyl surface: pH dependence of antibody orientation and antigen binding capacity. *Anal. Biochem.* **398**, 161–168

(2010).

281. Jeyachandran, Y. L., Mielczarski, J. A., Mielczarski, E. & Rai, B. Efficiency of blocking of non-specific interaction of different proteins by BSA adsorbed on hydrophobic and hydrophilic surfaces. *J. Colloid Interface Sci.* **341**, 136–142 (2010).
282. Remy-Martin, F. *et al.* Surface plasmon resonance imaging in arrays coupled with mass spectrometry (SUPRA-MS): proof of concept of on-chip characterization of a potential breast cancer marker in human plasma. *Anal. Bioanal. Chem.* **404**, 423–432 (2012).
283. Wood, R. W. On a Remarkable Case of Uneven Distribution of Light in a Diffraction Grating Spectrum. *Proc. Phys. Soc. Lond.* **18**, 269 (1902).
284. Fano, U. The Theory of Anomalous Diffraction Gratings and of Quasi-Stationary Waves on Metallic Surfaces (Sommerfeld's Waves). *JOSA* **31**, 213–222 (1941).
285. Otto, A. Excitation of nonradiative surface plasma waves in silver by the method of frustrated total reflection. *Z. Phys.* **216**, 398–410 (1968).
286. Kretschmann, E. & Raether, H. Radiative decay of nonradiative surface plasmons excited by light. *Z Naturforsch A* **23**, 2135 (1968).
287. Liedberg, B., Nylander, C. & Lunström, I. Surface plasmon resonance for gas detection and biosensing. *Sens. Actuators* **4**, 299–304 (1983).
288. Liedberg, B., Lundström, I. & Stenberg, E. Principles of biosensing with an extended coupling matrix and surface plasmon resonance. *Sens. Actuators B Chem.* **11**, 63–72 (1993).
289. Homola, J., Yee, S. S. & Gauglitz, G. Surface plasmon resonance sensors: review. *Sens. Actuators B Chem.* **54**, 3–15 (1999).
290. Homola, J., Koudela, I. & Yee, S. S. SPR Sensors Based on Diffraction Gratings and Prism Couples Sensitivity Comparison. *Scribd* (1999). Available at: <https://www.scribd.com/document/82616148/SPR-Sensors-Based-on-Diffraction-Gratings-and-Prism-Couples-Sensitivity-Comparison>. (Accessed: 4th October 2016)
291. Stenberg, E., Persson, B., Roos, H. & Urbaniczky, C. Quantitative determination of surface concentration of protein with surface plasmon resonance using radiolabeled proteins. *J. Colloid Interface Sci.* **143**, 513–526 (1991).
292. Maillart, E. IMAGERIE PAR RESONANCE DES PLASMONS DE SURFACE POUR L'ANALYSE SIMULTANEE DE MULTIPLES INTERACTIONS BIOMOLECULAIRES EN TEMPS REEL. (Université Paris Sud - Paris XI, 2004).
293. Schmalz, G. Über Glätte und Ebenheit as physikalisches und physiologisches Problem. *Zeitschri Verbandes Dtsch. Ingenieure* (1929). doi:73:144–161
294. Young, R., Ward, J. & Scire, F. The Topografiner: An Instrument for Measuring Surface

Microtopography. *Rev. Sci. Instrum.* **43**, 999–1011 (1972).

295. Binnig, G. & Rohrer, H. Scanning tunneling microscopy\char22{}from birth to adolescence. *Rev. Mod. Phys.* **59**, 615–625 (1987).

296. Binnig, G., Rohrer, H., Gerber, C. & Weibel, E. Surface Studies by Scanning Tunneling Microscopy. *Phys. Rev. Lett.* **49**, 57–61 (1982).

297. Binnig, G., Rohrer, H., Gerber, C. & Weibel, E. 7 \ifmmode\times\else\texttimes\fi{} 7 Reconstruction on Si(111) Resolved in Real Space. *Phys. Rev. Lett.* **50**, 120–123 (1983).

298. Giessibl, F. J. AFM's path to atomic resolution. *Mater. Today* **8**, 32–41 (2005).

299. Binnig, G., Quate, C. F. & Gerber, C. Atomic Force Microscope. *Phys. Rev. Lett.* **56**, 930–933 (1986).

300. Binnig, G., Gerber, C., Stoll, E., Albrecht, T. R. & Quate, C. F. Atomic Resolution with Atomic Force Microscope. *EPL Europhys. Lett.* **3**, 1281 (1987).

301. Rugar, D., Mamin, H. J. & Guethner, P. Improved fiber-optic interferometer for atomic force microscopy. *Appl. Phys. Lett.* **55**, 2588–2590 (1989).

302. Giessibl, F. J. & Trafas, B. M. Piezoresistive cantilevers utilized for scanning tunneling and scanning force microscope in ultrahigh vacuum. *Rev. Sci. Instrum.* **65**, 1923–1929 (1994).

303. Meyer, G. & Amer, N. M. Novel optical approach to atomic force microscopy. *Appl. Phys. Lett.* **53**, 1045–1047 (1988).

304. Higgins, M. J. *et al.* Frequency modulation atomic force microscopy: a dynamic measurement technique for biological systems. *Nanotechnology* **16**, S85 (2005).

305. Giessibl, F. J. Atomic resolution of the silicon (111)-(7x7) surface by atomic force microscopy. *Science* **267**, 68–71 (1995).

306. Hofer, W. A., Foster, A. S. & Shluger, A. L. Theories of scanning probe microscopes at the atomic scale. *Rev. Mod. Phys.* **75**, 1287–1331 (2003).

307. Cazaux, S. *et al.* Synchronizing atomic force microscopy force mode and fluorescence microscopy in real time for immune cell stimulation and activation studies. *Ultramicroscopy* doi:10.1016/j.ultramic.2015.10.014

308. Krieg, M. *et al.* Tensile forces govern germ-layer organization in zebrafish. *Nat. Cell Biol.* **10**, 429–436 (2008).

309. Fenn, J. B., Mann, M., Meng, C. K., Wong, S. F. & Whitehouse, C. M. Electrospray ionization for mass spectrometry of large biomolecules. *Science* **246**, 64–71 (1989).

310. Tanaka, K. *et al.* Protein and polymer analyses up to m/z 100 000 by laser ionization time-of-flight mass spectrometry. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **2**, 151–153 (1988).

311. Karas, M. & Hillenkamp, F. Laser desorption ionization of proteins with molecular masses exceeding 10,000 daltons. *Anal. Chem.* **60**, 2299–2301 (1988).
312. Yamashita, M. & Fenn, J. B. Electrospray ion source. Another variation on the free-jet theme. *J. Phys. Chem.* **88**, 4451–4459 (1984).
313. Karas, M., Bachmann, D., Bahr, U. & Hillenkamp, F. Matrix-assisted ultraviolet laser desorption of non-volatile compounds. *Int. J. Mass Spectrom. Ion Process.* **78**, 53–68 (1987).
314. Tessitore, A. *et al.* Serum Biomarkers Identification by Mass Spectrometry in High-Mortality Tumors. *Int. J. Proteomics* **2013**, e125858 (2013).
315. Kebarle, P. & Verkerk, U. H. Electrospray: From ions in solution to ions in the gas phase, what we know now. *Mass Spectrom. Rev.* **28**, 898–917 (2009).
316. Bruins, A. P. Mechanistic aspects of electrospray ionization. *J. Chromatogr. A* **794**, 345–357 (1998).
317. Kingdon, K. H. A Method for the Neutralization of Electron Space Charge by Positive Ionization at Very Low Gas Pressures. *Phys. Rev.* **21**, 408–418 (1923).
318. Makarov, A. Electrostatic Axially Harmonic Orbital Trapping: A High-Performance Technique of Mass Analysis. *Anal. Chem.* **72**, 1156–1162 (2000).
319. Hunt, D. F., Yates, J. R., Shabanowitz, J., Winston, S. & Hauer, C. R. Protein sequencing by tandem mass spectrometry. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **83**, 6233–6237 (1986).
320. Spengler, B. & Cotter, R. J. Ultraviolet laser desorption/ionization mass spectrometry of proteins above 100,000 daltons by pulsed ion extraction time-of-flight analysis. *Anal. Chem.* **62**, 793–796 (1990).
321. Stigter, E. C. A., de Jong, G. J. & van Bennekom, W. P. Coupling surface-plasmon resonance and mass spectrometry to quantify and to identify ligands. *TrAC Trends Anal. Chem.* **45**, 107–120 (2013).
322. Willey, T. M. *et al.* Rapid degradation of alkanethiol-based self-assembled monolayers on gold in ambient laboratory conditions. *Surf.Sci.* **576**, 188 (2005).
323. Boireau, W., Rouleau, A., Lucchi, G. & Ducoroy, P. Revisited BIA-MS combination: Entire ‘on-a-chip’ processing leading to the proteins identification at low femtomole to sub-femtomole levels. *Biosens. Bioelectron.* **24**, 1121–1127 (2009).
324. Pook, M. *et al.* Platelets store laminins 411/421 and 511/521 in compartments distinct from  $\alpha$ - or dense granules and secrete these proteins via microvesicles. *J. Thromb. Haemost.* **12**, 519–527 (2014).
325. Kapikian, A. Z. The discovery of the 27-nm Norwalk virus: an historic perspective. *J. Infect. Dis.* **181 Suppl 2**, S295-302 (2000).

326. Zheng, D.-P. *et al.* Norovirus classification and proposed strain nomenclature. *Virology* **346**, 312–323 (2006).
327. Hansman, G. S. *et al.* Genetic Diversity of Norovirus and Sapovirus in Hospitalized Infants with Sporadic Cases of Acute Gastroenteritis in Chiang Mai, Thailand. *J. Clin. Microbiol.* **42**, 1305–1307 (2004).
328. de Rougemont, A. *et al.* Qualitative and Quantitative Analysis of the Binding of GII.4 Norovirus Variants onto Human Blood Group Antigens<sup>v</sup>. *J. Virol.* **85**, 4057–4070 (2011).
329. Belliot, G. *et al.* Characterization of Capsid Genes, Expressed in the Baculovirus System, of Three New Genetically Distinct Strains of ‘Norwalk-Like Viruses’. *J. Clin. Microbiol.* **39**, 4288–4295 (2001).
330. Kanno, T. *et al.* Size distribution measurement of vesicles by atomic force microscopy. *Anal. Biochem.* **309**, 196–199 (2002).
331. Oropesa, R., Ramos, J. R., Falcón, V. & Felipe, A. Characterization of virus-like particles by atomic force microscopy in ambient conditions. *Adv. Nat. Sci. Nanosci. Nanotechnol.* **4**, 025007 (2013).
332. Shoemaker, G. K. *et al.* Norwalk Virus Assembly and Stability Monitored by Mass Spectrometry. *Mol. Cell. Proteomics* **9**, 1742–1751 (2010).
333. Prasad, B. V., Rothnagel, R., Jiang, X. & Estes, M. K. Three-dimensional structure of baculovirus-expressed Norwalk virus capsids. *J. Virol.* **68**, 5117–5125 (1994).
334. Gan, C., Ao, M., Liu, Z. & Chen, Y. Imaging and force measurement of LDL and HDL by AFM in air and liquid. *FEBS Open Bio* **5**, 276–282 (2015).
335. Jaafar, M. *et al.* Structural insights into magnetic clusters grown inside virus capsids. *ACS Appl. Mater. Interfaces* **6**, 20936–20942 (2014).
336. Chandler, W. L. Microparticle counts in platelet-rich and platelet-free plasma, effect of centrifugation and sample-processing protocols. *Blood Coagul. Fibrinolysis Int. J. Haemost. Thromb.* **24**, 125–132 (2013).
337. Perez-Pujol, S., Marker, P. H. & Key, N. S. Platelet microparticles are heterogeneous and highly dependent on the activation mechanism: Studies using a new digital flow cytometer. *Cytometry A* **71A**, 38–45 (2007).
338. Abid Hussein, M. N. *et al.* Antigenic characterization of endothelial cell-derived microparticles and their detection *ex vivo*. *J. Thromb. Haemost.* **1**, 2434–2443 (2003).
339. Ettelaie, C. *et al.* Analysis of the potential of cancer cell lines to release tissue factor-containing microvesicles: correlation with tissue factor and PAR2 expression. *Thromb. J.* **14**, (2016).
340. Sebaihi, N., Boeck, B. D., Yuana, Y., Nieuwland, R. & Pétry, J. Dimensional characterization of

extracellular vesicles using atomic force microscopy. *Meas. Sci. Technol.* **28**, 034006 (2017).

341. Chou, M.-L., Lin, L.-T., Devos, D. & Burnouf, T. Nanofiltration to remove microparticles and decrease the thrombogenicity of plasma: in vitro feasibility assessment. *Transfusion (Paris)* **55**, 2433–2444 (2015).

342. Khan, E. *et al.* A low balance between microparticles expressing tissue factor pathway inhibitor and tissue factor is associated with thrombosis in Behçet's Syndrome. *Sci. Rep.* **6**, 38104 (2016).

343. Trappenburg, M. C. *et al.* Elevated procoagulant microparticles expressing endothelial and platelet markers in essential thrombocythemia. *Haematologica* **94**, 911–918 (2009).

344. Barteneva, N. S. *et al.* Circulating microparticles: square the circle. *BMC Cell Biol.* **14**, 23 (2013).

345. Rougemont, A. D. Rôle des antigènes tissulaires de groupes sanguins humains A, B, H et Lewis dans l'évolution des Norovirus GII.4. (Université de Bourgogne, 2011).