



HAL
open science

Dispositif intégré microfluidique pour la qualification de vésicules extracellulaires : mise au point de calibrants biomimétiques et de biopuces d'immunocapture

Daniel Guneyusu

► **To cite this version:**

Daniel Guneyusu. Dispositif intégré microfluidique pour la qualification de vésicules extracellulaires : mise au point de calibrants biomimétiques et de biopuces d'immunocapture. Autre. Université Bourgogne Franche-Comté, 2022. Français. NNT : 2022UBFCD033 . tel-03851606

HAL Id: tel-03851606

<https://theses.hal.science/tel-03851606>

Submitted on 14 Nov 2022

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.

THÈSE DE DOCTORAT DE L'ÉTABLISSEMENT UNIVERSITÉ BOURGOGNE FRANCHE-COMTÉ

RÉALISÉ À L'UNIVERSITÉ DE FRANCHE-COMTÉ

École doctorale n°37

ED SPIM

Doctorat de sciences pour l'ingénieur

Par

M. Guneyasu Daniel

Dispositif intégré microfluidique pour la qualification de

Vésicules Extracellulaires :

**Mise au point de calibrants biomimétiques et de biopuces
d'immunocapture.**

Thèse soutenue à Besançon, le 21/07/22,

Sous la direction du Dr. Wilfrid Boireau et du Dr. Céline Elie-Caille

Composition du Jury :

M. Lesniewska, Éric	Professeur, UBFC, Institut Carnot de Bourgogne, Dijon	Président
M. Chopineau, Joel	Professeur, Université de Montpellier, Institut Charles Gerhardt, Montpellier	Rapporteur
M. Dejeu, Jérôme	Maitre de Conférences, Université Grenoble Alpes, Gieres	Rapporteur
Mme. Gué, Anne-Marie	Directrice de recherche CNRS, LAAS-CNRS, Toulouse	Examinatrice
M. Boireau, Wilfrid	Directeur de recherche CNRS, Institut Femto-st, Besançon	Directeur de thèse
Mme. Elie-Caille, Céline	Maitre de conférences UBFC, Institut Femto-st, Besançon	Codirectrice de thèse

Remerciements

Je voudrais remercier l'institut FEMTO-ST et son directeur Laurent Larger, ainsi que le département MN2S (Micro Nano Science et Système) de m'avoir permis de travailler dans un cadre agréable, professionnel et riche en rencontres. Le projet de thèse n'aurait pu aboutir sans la qualité de l'institut et son environnement.

Je voudrais remercier tous les membres du jury d'avoir accepté d'évaluer mon travail et de m'avoir permis d'améliorer grandement ce manuscrit par nos échanges et vos recommandations. Je voudrais en particulier remercier le président du jury, M. Éric Lesniewska, pour avoir examiné mon travail et pour les différents échanges pendant et après la soutenance. Je voudrais remercier très chaleureusement M. Jérôme Dejeu pour ses nombreux conseils, recommandations et nos différents échanges lors de la soutenance et du rapport. Mes sincères remerciements également à M. Joël Chopineau pour ses nombreuses recommandations, la qualité de nos échanges pendant la soutenance et ses retours sur le manuscrit. Enfin, je voudrais remercier en particulier Anne-Marie Gué pour l'ensemble de nos échanges, pendant la soutenance, de nos discussions au cours du projet qui ont abouti à la finalisation du projet MADNESS.

Ce travail de thèse n'aurait pas pu avoir lieu sans mes encadrants, Wilfrid Boireau et Céline-Élie Caille, qui m'ont recruté pour ce projet, qui m'ont accompagné durant cette expérience. Merci pour vos conseils, vos formations, nos discussions aux laboratoires, nos voyages à Toulouse et pour la qualité du travail dans le projet MADNESS.

Je souhaite remercier les membres de l'équipe BMD (BioMicroDevices) dans laquelle j'ai eu la chance de rencontrer de nombreuses personnes et avec qui j'ai pu avoir des liens d'amitiés forts : Alain Rouleau, qui a grandement contribué aux projets et avec qui j'ai eu de nombreux moments de partage. Rabah Zeggari avec qui nous avons passé de nombreux moments de discussion sur le projet et sur le monde. Tous les membres du groupe encore présent : Annie Frelet-Barrand pour nos nombreux échanges dans le labo et en dehors. Thérèse Leblois, chef d'équipe toujours là quand on a besoin d'elle. Franck Chollet et Jean François Manceau toujours souriant et de bonnes humeurs. La paire Bruno Wagogne et Christian Pierrealli toujours dans le même bureau depuis des années. Et enfin notre chimiste en chef, Vincent Humblot avec qui j'ai beaucoup échangé.

Je voudrais remercier mes compères thésards Balasubramanian Namasivayam, mon acolyte des EVs ; Julien Dufourmentelle, maître laitier ; Claude Humbert spécialiste en science ; Svenja Hermann, ma voisine de bureau ; Juliana Chawish, la Canadienne ; Fernando Eleazar, notre mexicain, Charles-Louis Azzopardi qui été là bien avant moi et qui fermera sûrement l'institut. Une pensée

spéciale pour les derniers doctorants, Geetika Raizada, bon courage pour la suite et enfin Sylvain Midrouet merci pour tout l'ami et hâte d'être présent à ta soutenance. Une pensée particulière également pour Lyne Pillemont avec qui nous avons partagé le projet MADNESS et avec qui j'ai eu le plaisir de partager ses 4 années.

Je voudrais remercier les nouveaux membres du groupe BMD, qui m'ont accompagné pendant la période de soutenance : Oussama, Phöelan, Thibaut, Florian, Lucie, Océane, Agathe, Pauline, Reinaldo, Sanae et ceux que j'ai oubliés. Les échanges ont été riches et nombreux pendant cette courte période. J'espère que vous serez épanoui dans tous vos projets et je vous souhaite le meilleur.

Je voudrais remercier Franck Lardet Vieudrin, Stéphanie Py et Karine Charrière les collègues de la cafétéria et des pauses avec qui j'ai partagé des moments et des fous rires incroyables.

Une pensée particulière également pour les collègues du département, Jean Baptiste Sanchez, Magalie Barthez, Sarah Benchabane Gaiffe, Olivier Gaiffe, Sylvester, Nicolas Passilly, Frédéric Cherioux, Abdelkrim Khelif, Mahmoud Addouche.

Je voudrais remercier ceux qui sont partis pour de nouvelles aventures avec qui j'ai partagé des moments forts : Audrey Guitton, qui a toujours voulu faire de moi un lapin. Benoit Le Roy de Boiseaumarié, vignoble catégorie hors pair. Amar Chaalane, nouveaux membres Femto-ingeniering. Je n'oublie pas Joël, Déborah, Clarisse, Antony, Laurent Petreni, Aleksandr, Fabien, Mohammad, Emmanuel Attal, Ashraf, Axelle, Aymen, Olivia, Adeline, Emma, Saber, Marion, Ksenia, Emmanuel Dordor et tous ceux avec qui j'ai passé des moments uniques.

Enfin une pensée très forte pour mes amis, ma famille et Louise qui m'ont soutenu tout au long de cette période de ma vie, qui m'ont permis d'arriver au bout de la thèse et à qui je tiens extrêmement fort. Merci pour tout.

Titre : Dispositif intégré microfluidique pour la qualification de Vésicules Extracellulaires : mise au point de calibrants biomimétiques et de biopuces d'immunocapture

Mots clés : EVs, Microsystème d'immunocapture, Nanoparticules biomimétiques, Microscopie quantitative, Microfluidique, SPRi, AFM

Le projet ANR MADNESS a pour objectif de proposer une solution analytique de tri et de qualification de vésicules extracellulaires (EVs) contenues dans un milieu biologique complexe. La thèse a porté sur le développement d'un module d'immunocapture des EVs dénommé module NanoBioAnalytique (module NBA) ainsi que sur la mise en place d'un panel de calibrants internes de nature synthétique (appelés NPs) permettant de certifier les performances. Le module NanoBioAnalytique (ou NBA) est une solution miniaturisée d'immunocapture des EVs qui sera positionnée en aval du module de tri, dans la solution globale MADNESS, il a pour ambition de suppléer les phases d'immunocapture dans des équipements de biodétection comme l'imagerie SPR. Une détermination des paramètres fluidiques a été menée par simulation des écoulements sur Comsol® et vérifiée par des tests microfluidiques (détermination des gammes de pression à appliquer, de la correspondance avec les débits). La fonctionnalité de l'immunocapture a pu être validée au travers de différents modèles biomimétiques microparticulaires (mimant les EVs) : des particules de 140 et 480 nm de diamètre ont été biofonctionnalisées, avec deux protéines standard, la caséine (CAS) et l'ovalbumine (OVA). Les particules résultantes dénommées NP140-CAS / NP140-OVA et NP480-OVA seront utilisées comme calibrants internes lors des processus d'immunocapture. Les protocoles de préparation incluant les caractérisations biochimiques et biophysiques ont été validés et servent à la préparation de modèles de NPs pour l'ensemble de la chaîne préparatoire et analytique de la solution MADNESS. Les paramètres de biodétection en termes de gamme dynamique et de limite de détection ont été déterminés en solution tampon (entre 10^7 et 10^9 particules par ml pour l'ensemble des calibrants). La validation de leur efficacité a été faite en échantillon complexe par mélange des NPs à des EVs plasmatiques. De cette façon, nous avons pu établir l'absence de réactions croisées sur les spots d'immunocapture ainsi que la capacité à pouvoir les utiliser indifféremment dans des milieux soit idéaux (tampon) soit présentant une certaine complexité biologique (plasma). Une dernière étape a pu être franchie dans le projet MADNESS avec une première configuration de couplage entre le dispositif de tri (développé en parallèle au LAAS) et le module NBA. En dépit de conditions expérimentales limites (débit, durée, concentration), le module a montré une bonne efficacité de fonctionnement (sensibilité et spécificité) dans des milieux de complexité croissante contribuant ainsi à une solution MADNESS performante en plasma humain. Les travaux ont été valorisés à travers la présentation de plusieurs communications scientifiques (poster et communication orale) dans des conférences nationales et internationales et la publication d'un article dans une revue à comité de lecture.

Title: Integrated microfluidic device for EVs qualification: development of calibration particles and immuno-biochips

Keywords: EVs, Immunocapture microsystem, Biomimetic nanoparticles, Quantitative microscopy, Microfluidics, AFM, SPRi

The aim of the MADNESS project is to define an analytical solution to sort and qualify extracellular vesicles (EVs), contained in almost all biological fluids. This thesis has focused on the development of a device devoted to the immune-capture of EVs called NBA module and on the development of several internal synthetic calibration particles (called nanoparticles, NPs) which certified the performances of this module.

The NanoBioAnalytical module (NBA module) is a miniaturized way of immunocapture of EVs which will be the last part of the global MADNESS analytical solution. Its ambition is to replace the immunocapture phase in instrumentation of biodetection as SPRi. The fluidic settings were determined by using the Comsol® software to do simulations of flow and to confirm it by microfluidic tests (determination of flow rate in correspondence to the range of applied pressure). The immunocapture part has been validated by using different biomimetics NPs (mimicking EVs): particles of 140 nm and 480 nm in diameter were biofunctionalized with 2 standard proteins: casein (CAS) and ovalbumin (OVA). The resulting NPs called NP140-CAS/NP140-OVA and NP480-OVA were used as internal calibration particles during immunocapture process. The NPs preparation protocols including biochemical and biophysical characterizations have been validated and are used for all preparatory and analytical processes of the global MADNESS solution. The biodetection settings in terms of dynamic range and limit of detection were determined in buffer conditions (between 10^7 to 10^9 particles per ml for all calibration particles). The validation of their immunocapture has been made in complex samples by spiking natural EVs. In this way, we made sure that there is no cross-contamination between immunocapture spots, then making possible to use it indifferently in a controlled buffer medium or in a biological one.

The last part has been reached in the MADNESS project by coupling, in a first configuration, the sorting device (developed by LAAS-CNRS institute) and the NBA module. Despite limited experimental conditions (flow rate, time, NPs concentration), the module shows a good accuracy of functioning (sensitivity and specificity) in more and more complex biological environments contributing to enable using the MADNESS solution in human plasma.

The work has been valued by several scientific communications (poster and oral) in different national and international conferences and the publication of an article in a peer reviewed journal.

Abbreviations

AFM: *Atomic Force Microscopy*

BCA: *BiCinchoninic acid Assay*

BDNF: *Brain Derived Neurotrophic Factor*

CAS: *Casein protein*

DLD: *Deterministic Lateral Displacement*

DLS: *Dynamic Light Scattering*

EDC: *1-Ethyl-3-(3-Dimethylaminopropyl) Carbodiimide*

EGF: *Epidermal Growth Factor*

EV: *Extracellular Vesicles*

FC: *Flow Cytometry*

IDT: *InterDigital Transducers*

ISEV: *International Society for Extracellular Vesicles*

MS: *Mass Spectrometry*

MVB: *MultiVesicular Bodies*

MUOH: *11-mercapto-1-undécanol*

MHA: *Acide 16-mercapto-1-hexadécanoïque*

NBA: *NanoBioAnalytical platform*

NTA: *Nanoparticle Tracking Analysis*

OVA: *Ovalbumin*

OG : *Détergent Octyl- β -D-Glucopyranoside*

PDGF : *Platelet-Derived Growth Factor*

PEG: *PolyEthylene Glycol*

PEO: *Poly (OxyEthylène)*

PPL : *Platelet Pellet Lysates*

RI : *Refractive Index*

RSA: *Rat Serum Albumin*

SAM: *Self Assembled Monolayer*

SEC: *Size Exclusion Chromatography*

SEM: *Scanning Electron Microscopy*

SERS: *Surface Enhanced Raman Spectroscopy*

SPR: *Surface Plasmon Resonance*

SPRi: *Surface Plasmon Resonance imaging*

Sulfo-NHS: *N-Hydroxysulfosuccinimide*

TRPS: *Tunable Resistive Pulse Sensing*

UC : *UltraCentrifugation*

Table des matières

Remerciements	2
Introduction	10
Chapitre 1 : Le tri de vésicules extracellulaires	15
1.1 les vésicules extracellulaires	15
1.2 Méthodes usuelles de tri, d'isolation et de purification des EVs	26
1.2.1 Centrifugation	26
1.2.2 Filtration	27
1.2.3 la chromatographie d'exclusion stérique (SEC)	28
1.2.4 Immunocapture sur colonne ou sur billes	29
1.2.5 Comparaisons des techniques	30
1.3 Systèmes innovants de séparation des EVs	31
1.3.1 Tri par filtration hydrodynamique	40
1.3.2 Tri par ondes acoustiques de surface stationnaire	44
Bilan des techniques innovantes	47
Conclusion	51
Chapitre 2 : Développement de calibrants biomimétiques submicrométriques.	52
2.1 Définition, applications biomédicales et contexte d'utilisation dans nos travaux	55
2.2 Techniques usuelles de caractérisation des particules submicrométriques : combinaison de techniques de caractérisation.	58
2.3 Conception, fabrication et caractérisation des calibrants biomimétiques	67
2.3.2 Biofonctionnalisation des particules.....	70
2.3.3 Protocole de fonctionnalisation des particules en ovalbumine et des particules en caséine ..	72
2.3.4 Caractérisations biophysiques et biochimiques	77
TRPS	77
DOSAGE μ BCA	80
2.4 Caractérisation fonctionnelle d'immunocapture en SPRI	83
2.5 Caractérisation des densités surfaciques par microscopie de fluorescence et par AFM	84
Conclusion	88
Chapitre 3 : module NBA, dispositif microfluidique d'immunocapture	90
3.1 Développement du module NBA.....	92

3.1.1 La plateforme NBA : couplage, biodétection et imagerie AFM.....	92
3.1.2 Conception et réalisation du module NBA	94
3.2 Caractérisation des écoulements et mesure de débit	100
3.3 Performances d'immunocapture en conditions idéales	103
3.3.1 Modèle 1 : NP480-OVA.....	103
3.3.2 Modèle 2 : NP140-OVA.....	113
3.3.3 NP140-CAS.....	121
Injection de NP140-CAS et de NP480-OVA	125
3.4 Performances d'immunocapture en milieu biologique	128
3.4.1 caractérisation du Mix en SPRi	131
3.4.2 Caractérisation du Mix en module NBA.....	135
Conclusion :	139
Chapitre 4 : Couplage des modules de tri et de capture : Comportement de nanoparticules biofonctionnalisées en milieu biologique de complexité croissante.....	141
4.1. Expérience préliminaire d'immunocapture SPRi, à bas débit, en conditions idéales	142
4.1.1 Biodétection SPRi	143
4.1.2 Caractérisation des densités surfaciques	145
4.2 Expérience en module couplés, en conditions idéales	147
4.2.1 Image AFM sur les spots anti-OVA, anti-CAS et anti-CD41	151
4.3 Expérience en module couplés, en milieu plasma.....	153
Conclusion :	159
Conclusion générale	160
Perspectives.....	164
ANNEXE	166
Bibliographies.....	171

Introduction

Les cancers et les maladies cardiovasculaires sont les causes principales de mortalité chez l'Homme¹ avec un fort impact économique et social². La recherche s'investit fortement pour trouver des solutions à travers des systèmes thérapeutiques ainsi que des outils de diagnostics simples avec des résultats fiables et permettant ainsi d'intervenir à un stade plus précoce de la maladie. La recherche a permis d'obtenir des avancées majeures et de trouver des candidats biomarqueurs prometteurs³ qui serviront à la détection rapide de ces maladies : Citons par exemple les cellules tumorales circulantes, certaines protéines solubles⁴⁻⁶ et plus récemment les vésicules extracellulaires⁷ (EVs). Les EVs sont les plus récentes cibles biologiques considérées comme candidats-biomarqueurs. La découverte de ces particules biologiques fut d'une importance capitale, car ce sont des particules clés dans les mécanismes pathologiques de nombreuses maladies, mais leurs utilisations pour des études cliniques nécessitent des techniques hautement sensibles, sélectives et discriminantes en particulier pour la détection de sous-populations informatives. En effet, parmi les EVs, certaines sous-populations spécifiques sont d'un intérêt particulier, pour la détection, mais aussi le suivi de pathologies⁸. La détection de ces sous-populations spécifique est un enjeu biomédical capital, car pouvant potentiellement aider au diagnostic précoce de pathologies.

Pour répondre à cet enjeu, notre groupe a mis en place une méthodologie analytique et instrumentale dénommée « plateforme NanoBioAnalytique » (NBA), qui permet d'immunocapturer sélectivement les sous populations d'EVs puis de les caractériser d'un point de vue métrologique, moléculaire et spectroscopique. Cette méthode est basée sur le couplage entre biodétection (par la technique de résonance des plasmons de surface couplée à l'imagerie (SPRi)), la caractérisation métrologique et morphomécanique (par microscopie à force atomique (AFM)) et la signature protéomique de ces EVs (par spectrométrie de masse⁹). En effet, avec la technique SPRi, nous pouvons immunocapturer, en temps réel et sans marquage, ces nanobiovésicules via des cibles « antigènes » présentes à leurs surfaces à l'aide d'anticorps adéquats greffés sur une puce d'or. La puce d'or en question est ensuite analysée par AFM, pour caractériser d'un point de vue métrologique et morphomécanique les éléments piégés à la surface de chaque emplacement d'anticorps, appelée « spot ». La technique a permis de réaliser l'analyse d'échantillons complexes de vésicules extracellulaires collectés auprès de l'EFS, d'échantillons reçus de nos partenaires internationaux (Suisse, Taiwan) ou dans le cadre de collaborations locales et nationales.

Avant son analyse, il est parfois nécessaire de prétraiter un échantillon biologique contenant des EVs. En effet, à cause de la complexité de l'échantillon biologique, une approche préanalytique peut

être envisagée pour éliminer des composants du milieu pouvant perturber l'analyse des EVs ou pour enrichir en EV l'échantillon d'intérêt. Dans le cadre du projet MADNESS (a generic Microfluidic Approach for Deciphering Nanoscale biovesicles properties, <https://anr.fr/Projet-ANR-17-CE09-0025>), financé par l'ANR, l'objectif réside dans le développement d'une solution microfluidique composée d'un module de tri par la taille des EVs (développé par nos collègues de Toulouse), placé en amont d'un module miniaturisé de capture sous flux des sous-populations d'EVs triées (la partie centrale de cette thèse). Cette solution MADNESS a pour objectif de diviser l'échantillon complexe en fractions définies selon la taille, de récupérer et de caractériser ces fractions. Cette approche permet d'intégrer une étape de prétraitement de l'échantillon qui va limiter les effets matrice ce qui contribuera à un meilleur dosage des EVs par une amélioration du rapport signal/bruit et un gain en sensibilité. Une puce d'or constitue le cœur de notre solution MADNESS, dont la conception, fabrication et fonctionnalisation chimique sont réalisées par notre équipe en salle blanche de la plateforme MIMENTO.

Dans ce projet MADNESS, mon projet de thèse consiste en la réalisation, le dimensionnement et les étapes de modélisation du module de capture miniaturisé (que nous nommerons module NBA, car c'est un module transposé de la plateforme NBA) accompagné par du développement de particules calibrantes. La réalisation en salle blanche comprendra plusieurs étapes dont la création des masques, le développement de la cellule fluidique, la découpe et le packaging. Une fois le système développé, il a été testé et caractérisé en termes d'écoulements fluidiques. En effet, contrairement au système commercial SPRi Horiba®, notre système n'est pas contrôlé en débit, mais en pression à l'aide d'un contrôleur de pression de la compagnie Fluigent® (le contrôleur MFCS). Notre premier travail a donc été de déterminer les correspondances « pression appliquée/débits effectifs obtenus ». Ceci a permis de comparer les résultats d'immunocapture entre les deux techniques de capture, avec une capture sur des puces équivalentes. Afin de valider les étapes d'immunocapture, nous avons développé un jeu de calibrants biomimétiques constitués de particules, biofonctionnalisées par des protéines cibles, couvrant la gamme de taille de celle des EVs (50 nm jusqu'à plusieurs microns). Ces particules ont été qualifiées en taille, en concentration et en taux de couverture protéique. Par la suite, elles ont été injectées dans l'appareil commercial de référence SPRi et dans le module de capture pour être piégées sur une puce d'or via des anticorps spécifiques. Les résultats de cette immunocapture permettront de valider les lots biofonctionnalisés et la comparaison entre les deux techniques va nous permettre de déterminer l'efficacité d'immunocapture de notre module nouvellement développé par rapport à la référence. Ces puces ont été analysées par microscopie de fluorescence et par AFM pour permettre une caractérisation fine des homogénéités de capture à l'échelle des spots et des familles de spots, ainsi qu'une détermination des densités surfaciques en nanoparticules. Nous avons déterminé les

gamme dynamique et les limites de détection pour les différents calibrants dans des conditions idéales. Nous avons également corrélé les réponses en SPRi aux densités surfaciques sur puce pour ces différentes tailles et concentrations de nanoparticules biofonctionnalisées. Nous avons éprouvé notre module de capture en injectant ces particules biofonctionnalisées, mélangées dans diverses proportions, dans des milieux de complexité biologique croissante. Ceci nous a permis de montrer la stabilité physico-chimique des particules fonctionnalisées et de mettre en avant les différences observées lorsque les échantillons étaient injectés dans des milieux plus complexes.

Enfin, nous avons testé la solution globale MADNESS. Cela consiste à connecter le module de tri par filtration hydrodynamique et le module de capture, puis à l'éprouver vis-à-vis d'un mélange de particules calibrants dans différentes conditions. Cette étape a été réalisée dans les 6 derniers mois de la thèse, car plusieurs obstacles de salle blanche ont dû être résolus pour obtenir un dispositif de tri de qualité et qui répond aux cahiers des charges en termes de volume collecté, seuil de coupure (rayon critique) et efficacité de séparation.

J'ai pu réaliser l'ensemble de ce travail à l'institut Femto-ST pendant plus de 3 ans de thèse.

L'ensemble de ces résultats est présenté dans ce manuscrit comme décrit ci-dessous :

Le premier chapitre décrit un état de l'art sur les EVs et les techniques usuelles de prétraitement et de caractérisation utilisées en mettant l'accent sur les difficultés pour isoler, trier et concentrer ces particules à partir d'un milieu complexe. À partir de ce travail d'analyse, nous avons déterminé les besoins préanalytiques et nous présenterons les deux techniques d'isolement que nous avons contribué à développer: un tri de particules selon la taille, par filtration hydrodynamique (développé entièrement au LAAS-CNRS à Toulouse), et un tri de particules selon la taille et la densité, par ondes acoustiques de surface (développé en partenariat avec nos collaborateurs à Besançon pour lequel j'ai participé aux phases de conceptions, de mise en place et de tests expérimentaux).

Le second chapitre est consacré au développement et à la caractérisation de particules de calibration. Le choix des particules et le protocole de biofonctionnalisation de particules de 140 nm, 480 nm et 920 nm de diamètre seront décrits. Le protocole de préparation de ces particules est le fruit de plusieurs mois de développement et d'ajustement méthodologiques, ceci afin de limiter les phénomènes liés à l'agrégation, aux interactions non spécifiques et à l'efficacité de capture. La partie caractérisation des lots de particules à travers la TRPS, un dosage μ BCA, la SPRi, l'AFM et la microscopie serviront de base pour les expériences de capture et de tri. L'ensemble des expériences et validations que j'ai réalisées ont permis d'utiliser ces particules qualifiées par les différents collègues du projet, mais également pour des utilisateurs ayant besoin de caractériser leurs dispositifs (à la fois à Toulouse, à Besançon, et à Dijon).

Le chapitre 3 présente la conception et la fabrication du module microfluidique d'immunocapture (qui sera basé sur une étude de l'écoulement du flux et de l'influence de la géométrie) dénommé module NBA. Après une phase de caractérisation microfluidique correspondant à la vérification de l'étanchéité et à la détermination des débits selon la pression appliquée, les particules de calibration ont pu être injectées, dans des concentrations et proportions variées, notamment pour déterminer la gamme dynamique et la limite de détection. Les injections ont été réalisées selon une complexité croissante d'échantillons biologiques, afin d'évaluer l'effet matrice biologique sur les performances de capture de la solution MADNESS.

Le dernier chapitre correspond à la réalisation de la solution globale MADNESS avec la connexion des modules de tri par filtration hydrodynamique et le module NBA. Nous décrivons les résultats obtenus, après avoir déterminé les conditions de fonctionnement du dispositif de tri et notamment de la résolution de problématiques, tels que l'injection à très faible débit et la méthode de connexion des deux dispositifs. Les résultats présentés sont le fruit d'expériences réalisées en co-injectant les calibrants bifonctionnalisés de tailles différentes additionnés à des solutions biologiques de complexité croissante (jusqu'à l'injection de plasma sanguin).

L'objectif de notre projet est de disposer d'un outil analytique modulable, facile d'utilisation, rapide, transportable et qui puisse être distribué à grande échelle afin de caractériser les sous-populations d'EVs d'intérêt.

La figure introductive présente la chronologie d'avancement des différentes étapes de la thèse et les principales tâches réalisées :

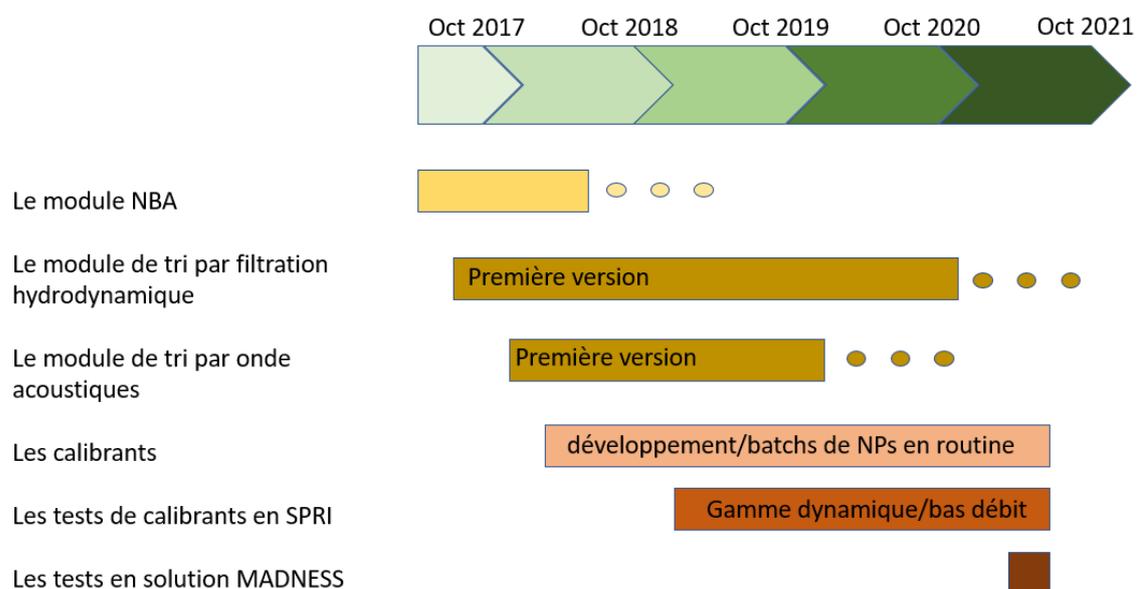


Figure introductive : Les différentes tâches du développement de la solution MADNESS

Chapitre 1 : Le tri de vésicules extracellulaires

1.1 les vésicules extracellulaires

Les vésicules extracellulaires sont des vésicules biologiques qui sont issues de toutes les cellules eucaryotes ou procaryotes¹⁰. Elles ont été considérées comme des débris cellulaires pendant plus d'un demi-siècle. En effet, les premiers signes de leur présence ont été décrits par Chargaff et West en 1947 (EVs plaquettaires)¹¹ puis par Wolf en 1967 (sous le nom : platelet dust)¹². A priori, leurs rôles ne semblaient pas d'une importance majeure lors des premières descriptions. En effet, ces vésicules ont été considérées comme des débris cellulaires pendant plus de 50 ans. Cependant leur importance et leur participation dans de nombreuses pathologies¹³ ont été découverts durant les deux dernières décennies grâce à l'évolution des outils analytiques et des découvertes récentes sur leurs contenus¹⁴ (présence d'ARNm). Ceci a permis de mettre en lumière ces vésicules qui ont un rôle crucial dans les communications cellulaires et dans différents processus patho/physiologiques. Ces vésicules sont libérées dans le milieu extracellulaire, puis circulent à l'aide des biofluides corporels tels que le sang, la salive, les urines, le LCR¹⁵. Les EVs sont analysées à partir des matrices biologiques extrêmement complexes comprenant des protéines solubles, des virus, des lipoprotéines, des cellules... Elles sont majoritairement sphériques et délimitées par une bicouche lipidique. Leur taille minimale est estimée à environ 30 nm et peut aller jusqu'à plusieurs microns pour les plus grandes. La membrane lipidique intègre de très nombreuses protéines transmembranaires (spécifiques pour certaines) de la cellule d'origine. Les EVs contiennent des protéines hydrosolubles, des sucres, des brins d'ADN, des ARN^{7,16} provenant de la cellule à partir de laquelle elles ont été produites et peuvent délivrer ce contenu de façon spécifique à des cellules cibles pour induire une réponse précise.

Une description communément acceptée des EVs est représentée sur la figure 1.1 :

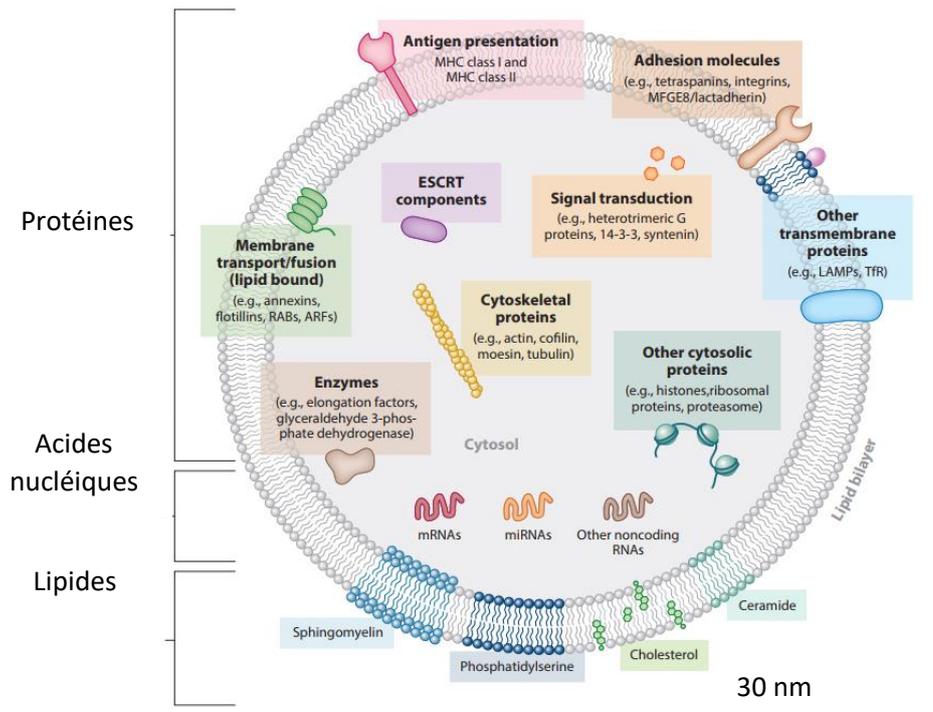


Figure 1.1. Représentation schématique des vésicules extracellulaires¹⁷

Leurs rôles sont d'assurer la communication intercellulaire en transportant leur contenu, qui est protégé par la membrane vésiculaire de toutes les voies de dégradations jusqu'à la délivrance dans la cellule hôte. C'est la découverte d'ARN dans ces vésicules¹⁸ et la compréhension de leurs interventions dans diverses situations physiopathologiques telles que la coagulation, l'inflammation, les cancers, les maladies cardiovasculaires, la maladie d'Alzheimer et l'obésité¹⁷ qui a lancé la voie vers une multitude d'études et d'analyses de ces nano-objets. Comme le montre la figure 1.2, les EVs sont toujours d'actualité avec une quantité de publications qui augmente fortement depuis 20 ans.

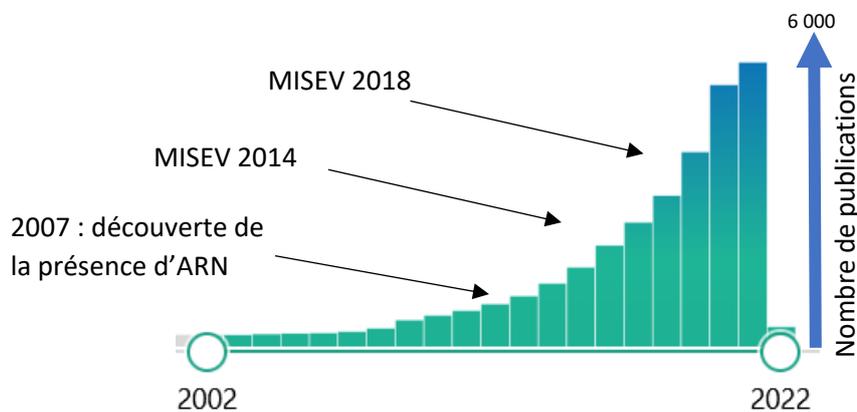


Fig. 1.2. Évolution du nombre de publications contenant le terme « extracellular vesicles » dans le titre (Source Pubmed 2022 : pic à 6484 en 2021).

Leurs utilisations comme potentiels biomarqueurs ou encore dans le cadre de la thérapie génique sont attendues comme une évolution importante. En effet, leurs implications dans différentes pathologies sont désormais avérées¹⁹ et la possibilité que certaines sous-populations de vésicules soient présentes uniquement lorsque le patient est malade²⁰ pourrait être utilisée pour réaliser des diagnostics précoces²¹ et dans le cadre de la médecine de précision. Il est à noter que d'autres applications sont possibles, car elles peuvent également servir de vecteur thérapeutique, en les chargeant d'un principe actif qui agirait avec une grande biodisponibilité²² (par la protection de la bicouche lipidique et l'intégration facilitée). Cette application n'entre pas dans nos activités (caractérisation et détection), mais correspond à une part importante de l'utilisation des EVs.

L'hétérogénéité en propriétés des EVs en termes de forme, de taille, de densité, de biogénèse, d'origine et de contenu intra vésiculaire (cargo) est la caractéristique la plus importante et la plus contraignante. Une cellule peut générer différentes sous-populations d'EVs, utilisant des modes de libération (biogénèse) variés et de contenu d'une très grande richesse moléculaire et macromoléculaire²³. Cette richesse de nature, de composition et de fonction permet une présence très forte dans beaucoup de processus, mais rend encore difficile et délicate leur analyse fine. Leur capacité d'internalisation (par cellular uptake) rend leur demi-vie dans les biofluides très réduite. C'est une information de grand intérêt, mais labile, ce qui accentue les défis analytiques et la possibilité de les valider en tant que biomarqueurs. De plus, il est admis qu'elles vont être stimulées et libérées en fonction des conditions du milieu, de l'état de santé de la personne, du sexe, de la condition physique, de l'âge, de l'environnement²⁴. Ces EVs sont pourtant au cœur de ce que l'on appelle les biopsies dites « liquides »²⁵. Dans cet ensemble complexe, l'enjeu est de pouvoir distinguer les sous-populations d'EVs présentes dans un fluide (étude qualitative et/ou quantitative) et de déterminer les protéines ou les éléments d'intérêts spécifiquement liés à la maladie. Nous pouvons observer dans la figure 1.3 diverses implications des EVs dans le cadre de cancer²⁶ : les EVs interviennent dans la propagation des tumeurs, dans les métastases et notamment à la résistance aux médicaments (les médicaments qui doivent agir sur les cellules cancéreuses vont reconnaître les EVs et non la cellule cible). Il est donc évident qu'il est nécessaire de comprendre et d'analyser les EVs pour pouvoir intervenir dans ces maladies.

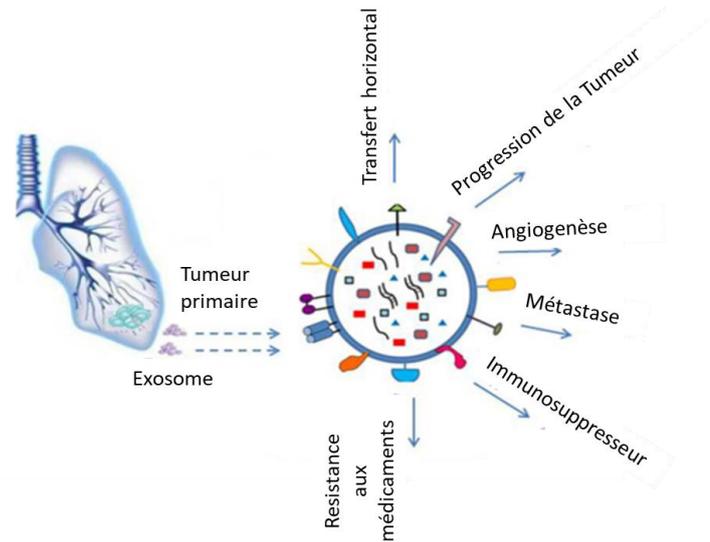


Fig. 1.3. Présentation des différentes possibilités de participations des vésicules extracellulaires dans le contexte du cancer : résistance aux médicaments, métastase, favorisent la progression de la tumeur, et le transfert de matériel génétique²⁶.

La présence des EVs au cœur de la recherche médicale autour des cancers n'est pas anodine : les EVs participent activement à la propagation du cancer en transportant le matériel génétique, favorisent les niches métastatiques, ce qui va contribuer à mettre en place une résistance aux médicaments. Elles vont permettre de transmettre l'information génétique (via l'ARN et l'ADN), propager le cancer et préparer l'environnement de la cellule. Dans le cadre de la maladie d'Alzheimer ou de la maladie de Parkinson, elles participent à la propagation de protéines pathogéniques (protéine tau). Dans chacune de ces maladies, la machinerie des EVs est utilisée de façon à entraîner un dérèglement chez le patient. Il est primordial de tenir compte de ces vésicules dans les mécanismes de la maladie pour mettre en place une approche thérapeutique adéquate. Un autre exemple concernant les EVs qui participent activement dans des situations pathologiques est décrit dans le cas des maladies cardiovasculaires²⁷. Nous ne rentrerons pas dans les détails biologiques, qui sont largement décrits dans la littérature²⁸ et qui dépassent notre simple introduction au domaine. Les EVs sont présentes très tôt dans les maladies décrites^{21,29} (Cancer, la maladie d'Alzheimer, la maladie de Parkinson, les maladies cardiovasculaires, l'obésité) ce qui signifie qu'une détection précoce permettrait d'appliquer des traitements mieux ciblés. Il serait très dommageable de ne pas pouvoir les utiliser pour des raisons de méthodologies et de manque d'étape de prétraitement efficace. Beaucoup de chercheurs travaillent aux développements de nouveaux moyens pour les analyser (suivi thérapeutique personnalisé et tests compagnons) et pouvoir comprendre leur fonctionnement pour pallier les difficultés rencontrées.

Étant donné que les EVs circulent dans les fluides corporels pour atteindre leurs cibles, il est théoriquement possible de réaliser des biopsies liquides pour une détection pertinente. En effet ces biopsies sont moins pénibles que les biopsies chirurgicales classiques, effectuées trop tardivement et invasives³⁰, qui peuvent entraîner des dégâts majeurs chez le patient. Une biopsie liquide (prélèvement de fluides tel que le sang) est une technique qui permettrait dans certaines situations pathologiques de détecter les signes de pathologie à un stade précoce³¹, à partir d'un faible volume d'échantillon (de l'ordre de la centaine de μ l). Cependant, le diagnostic de nombreuses maladies basé sur une biopsie liquide n'est pas réalisable à des stades précoces par manque de marqueurs. Une exploitation des EVs en tant que biomarqueurs ne limiterait plus les médecins à observer les signes cliniques (douleur, destruction d'organes, détérioration avancée de la santé, dérèglement) pour déclencher une intervention. La recherche de protéines d'intérêts et d'ARN présent dans les EVs lors d'une pathologie est devenue un enjeu majeur pour les chercheurs et les médecins³². Pour cela, il faudrait pouvoir distinguer, dans chaque cas pathologique, les sous-populations d'EVs qui sont présentes (étude qualitative et/ou quantitative) ou qui apparaissent, pour déterminer les protéines ou les éléments d'intérêts spécifiquement liés à la maladie qui sont présents dans les EVs. Nous comprenons là, l'intérêt de nombreuses équipes, à développer une technologie novatrice pour les explorer. Mais il y existe de fortes limitations pour atteindre cet objectif : comment isoler, analyser et exploiter les EVs à partir de biofluides complexes³³ en sachant que les EVs font partie des éléments de tailles nanométriques, tels que les virus, les lipoprotéines, les protéines solubles, c'est-à-dire les plus petits éléments de ces solutions. Leur isolement total n'est pas considéré comme réalisable avec les technologies actuelles, les recommandations actuelles tendent à préconiser la mise en place de phases d'enrichissement en EVs tout en préservant leur intégrité. Les équipes de recherche travaillent sur les protéines qui sont présentées à la surface des EVs afin de comprendre leurs modes de fonctionnement et de pouvoir les isoler. Sans preuve nous ne pouvons pas généraliser leurs influences, mais il est imaginable de considérer que leurs rôles sont bien plus vastes et, jusqu'à preuve du contraire, elles pourraient intervenir dans toutes les maladies existantes et nouvelles (exemple avec le covid 19³⁴). Cette vaste participation dans les pathologies, mais également dans les phénomènes physiologiques classiques (croissance, réparation tissulaire³⁵, régénération³⁶) exige de nombreuses études pour permettre une compréhension claire des effets des EVs dans toutes ces conditions. Pour pouvoir dégager des fonctions clés des EVs, il faut pouvoir s'appuyer sur des techniques fiables et performantes en amont des phases analytiques qui soient sensibles et précises pour leur caractérisation. Par divergences de méthodologies, les croisements d'études sont difficilement envisageables.

Pour guider, comprendre et développer une analyse fiable sur les différents rôles des EVs, la communauté internationale spécialisée dans ce domaine, l'« ISEV » (International Society for

Extracellular Vesicles, créé en 2012³⁷), a mis en place une première version de recommandations et de protocoles en 2014 suivie d'une seconde en 2018^{38,39} afin de permettre d'étudier, de caractériser et de manipuler les EVs dans les meilleures conditions qui soient et de façon uniforme quelque soient les laboratoires. La nomenclature a été modifiée plusieurs fois, pour actuellement opter pour une description basée sur les principes de la séparation par centrifugation différentielle et conduisant aux termes petites, moyennes et grandes vésicules extracellulaires. Les deux nomenclatures recommandées seront présentées dans la sous-partie suivante. La première nomenclature a été mise en place dans les premières recommandations et reste malgré tout très présente dans les publications. Elle est basée sur leur biogenèse et sur leurs tailles. Elle classifie 3 grandes sous-populations qui sont présentées dans la partie suivante. Le mode de libération des 3 grandes sous populations initiales (Exosomes, microparticules et corps apoptotique) est décrit dans la figure 1.4 :

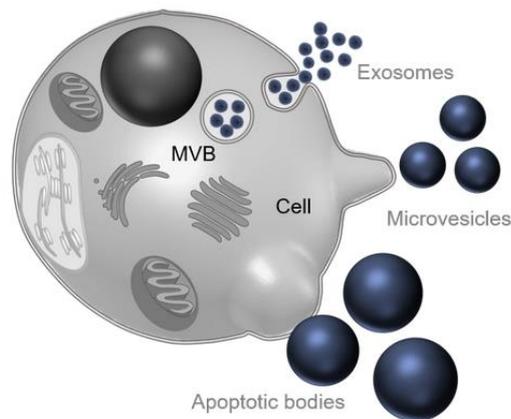


Fig. 1.4. Description des différentes voies de biogenèse des EVs tirés d'une représentation de la société Everzom⁴⁰.

- Les exosomes ont une taille allant de 30 à 150 nm de diamètre. Ce sont les éléments les plus petits et ils sont formés dans les corps multivesiculaires (MVBs) endosomaux puis libérés quand les MVBs fusionnent avec la membrane plasmique. Un ensemble de protéines d'origine endosomale sont présentes sur leurs surfaces ou associé à la membrane des MVBs (CD9, CD63, CD81, ALIX, TSG101, MHC, ESCRT)⁴¹. Leur densité est comprise entre 1,13 et 1,19 g/ml. La définition qui est communément acceptée pour les exosomes est adaptée de celle décrite par Johnston et al⁴² : «des vésicules de 30 à 100 nm qui sont libérées, après culture *in vitro* de réticulocytes, par la fusion entre la membrane plasmique et les MVBs. Les exosomes ont été collectées et isolées après une étape de centrifugation à 100 000g pendant 90 min ». Dans les années 90, d'autres groupes ont montré leurs libérations à partir d'autres cellules. Cette sous-population serait très importante dans le cadre des cancers. Leur mécanisme de libération

n'est pas encore totalement élucidé, mais est communément accepté comme décrit dans la figure 1.4.

- Les microvésicules⁴³ ont une taille allant de 100 nm environ jusqu'à 1µm de diamètre. Elles sont libérées par invagination et bourgeonnement directement au niveau de la membrane plasmique. Ces vésicules sont impliquées dans la coagulation et l'inflammation. Les microvésicules sont généralement collectées après une étape de centrifugation à 10 000-20 000g. Leur densité est comprise entre 1,10 et 1,20 g/ml
- Les corps apoptotiques⁴³ ont une taille allant de quelques centaines de nanomètres à plusieurs microns de diamètre et sont libérés lorsque la cellule entre en apoptose, permettant une sauvegarde partielle ou totale des informations de la cellule. Les corps apoptotiques sont récupérés par une centrifugation à 1 000-2 000 g. Leur densité est comprise entre 1,18 et 1,26 g/ml

Une synthèse des propriétés des différentes sous-populations d'EVs peut être retrouvée dans différentes revues et articles, nous pourrions les résumer dans la Table 1.1 :

	Exosome	Microvésicules	Corps apoptotique
Taille (nm)	~30-150	~100-1 000	~500-5 000
Biogenèse	Exocytose	Bourgeonnement de la membrane plasmique	Libéré après l'apoptose

Tab 1.1 : présentation de différentes propriétés des sous-populations d'EVs⁴⁴ de la première nomenclature.

Cette dénomination en sous-populations, dépendante de la biogenèse et de la taille, a cependant été revue selon le prisme de leur préparation. La communauté ISEV recommande plutôt de classifier de small, medium et large EVs³⁹ sur la base de leurs séparations par centrifugation différentielle et de leurs densités, comme le montre le tableau 1.2 :

	sEV	mEV	lEV
Centrifugation (g)	100 000	10 000	1 000
Densité (g/ml)	1,13-1,19	1,10-1,20	1,16-1,28

Tab 1.2 : présentation de différentes propriétés des sous-populations d'EVs⁴⁴ de la seconde nomenclature.

Les avancées méthodologiques et instrumentales permettent de découvrir de nouveaux objets nanovésiculaires qui ne rentrent dans aucune des deux nomenclatures tel que les exomères⁴⁵ (vésicules sans membranes ayant une taille inférieure à 50 nm). Il s'agit de nouvelle population

découverte grâce à la mise en place de méthodes ayant une meilleure sensibilité pour détecter les populations d'EVs et notamment celle de petites tailles.

Pour pouvoir analyser les EVs, un ensemble de techniques de caractérisation biochimique, de caractérisation en solution et d'analyse microscopique est généralement employé. Les techniques sont choisies sur la base des propriétés connues des EVs, des problématiques à résoudre et de la possibilité des techniques pour y répondre. Pour cela, les techniques analytiques permettant d'analyser les particules de tailles submicrométriques, telles que les liposomes, les virus, les nanoparticules organiques ou inorganiques sont utilisées, ainsi que les techniques de caractérisation les plus performantes :

- La **cytométrie en flux**⁴⁶ est une technique optique permettant une détection rapide des particules. L'échantillon est injecté dans un canal fluide et traverse un faisceau laser. La déviation de ce faisceau laser va être à la fois axiale et orthogonale. L'intensité de ces déviations sera proportionnelle à l'indice de réfraction, la morphologie et la taille de la particule analysée. De plus, l'ajout d'un anticorps fluorescent peut permettre une détection qui soit phénotypique. La limite principale de cette méthode concerne la limite basse de détection en taille qui est de 200 nm pour les appareils les plus récents, sinon de 300 voire 500 nm pour les instruments conventionnels.
- Le **western blot**⁴⁷ permet de détecter et de quantifier les protéines d'un échantillon. Pour cela, les protéines sont injectées dans la membrane polymérique et l'application d'un courant électrique permet de les faire migrer verticalement selon leur taille. Les protéines sont ensuite transférées sur une seconde membrane, généralement en nitrocellulose et incubées avec un anticorps primaire. Dans une dernière phase, elles sont incubées avec un anticorps secondaire pour être révélées par colorimétrie, luminescence ou fluorescence.
- Les tests **ELISA**⁴⁸ sont des tests de dosage immuno-enzymatique permettant également de détecter la présence d'une protéine. Les anticorps spécifiques sont fixés dans un puits afin de réagir avec l'analyte. En parallèle, une seconde solution avec des anticorps secondaires est injectée. Cette seconde solution va venir établir une interaction de type « sandwich ». L'intensité de la réaction permettra de quantifier la présence en EVs dans la solution. Les problématiques sont les mêmes que pour le western blot, à savoir la dépendance aux anticorps et une quantification relative.
- Les dosages protéiques (tel que le dosage **μBCA**)⁴⁹ vont permettre de déterminer la quantité des protéines constituant les EVs. La technique est basée sur une réaction colorimétrique spécifique des protéines et une détection par spectroscopie visible. À titre d'exemple, dans le chapitre 2, nous pourrions déterminer la quantité de protéines qui recouvre les particules que

nous aurons fonctionnalisées grâce à ce dosage protéique. Dans le cadre des EVs, nous pouvons déterminer la quantité de protéine présente en solution. La limite basse de la technique permet de détecter une concentration à 1 µg/ml et peut aller jusqu'à plusieurs mg/ml. Le désavantage majeur de cette technique est l'impossibilité de déterminer l'origine des protéines présentes dans l'échantillon analysé.

- La **NTA**⁵⁰ et la **DLS**⁵¹ sont des techniques optiques basées sur l'analyse des mouvements browniens (d'après la loi de Stokes-Einstein) lors de l'émission d'un faisceau laser qui va interagir avec les particules. Les particules sont animées d'un mouvement propre qui peut être caractérisé lorsqu'il rencontre ce faisceau laser et qu'il le dévie. La détection de cette déviation permet de remonter à la taille des particules. Dans ce contexte, la température et les conditions de viscosité vont exercer une influence importante sur la mesure. La NTA est limitée à une analyse de taille maximale de 1 µm et est très sensible aux petites tailles. La concentration minimale qui peut-être détecter est de l'ordre de 10⁷ particules par ml (part/ml). La DLS est performante dans un milieu homogène, mais beaucoup plus limité dans un milieu hétérogène sous peine de fausser totalement le résultat de l'analyse. La DLS n'est pas quantitative pour le moment.
- La **TRPS**⁵² est une technique basée sur l'effet Coulter permettant de déterminer la taille et la concentration de particules après le passage de celles-ci de façon individuelle au travers d'un nanopore. Ce passage va entraîner une perturbation du courant électrique préétabli, avec une variation d'intensité du courant qui sera proportionnelle à la taille du nano-objet et dont la fréquence (nombre de pics d'intensité) est corrélée à la concentration en NPs. Les limitations de cette technique concernent l'utilisation du nanopore qui conditionne l'analyse à une gamme de taille, ne permettant pas l'analyse d'échantillon polydispersé. Les risques de colmatage sont élevés pour des échantillons biologiques complexes et un nanopore donné ne fournit qu'une vision parcellaire de la gamme de taille des EVs de l'échantillon. La concentration détectable varie avec le nanopore utilisé, mais la valeur la plus faible détectable est de 10⁸ part/ml.
- La **SPR**⁵³ permet de suivre en temps réel, les interactions biomoléculaires se produisant au voisinage de la surface d'une puce d'or biofonctionnée. Cette interprétation se fait au moyen de l'analyse des plasmons de surface qui peuvent être utilisés pour analyser les cinétiques et les niveaux d'interaction entre analyte et ligand greffé sur la puce. Une explication détaillée de la méthode se trouve dans le chapitre 2. La limitation principale de la technique est l'impossibilité de déterminer les formes et la taille des objets capturés en temps réel sans analyses post capture complémentaire (pour un échantillon biologique

conventionnel). La concentration la plus faible détectable avec le système SPRiplex II® que nous utilisons est de 10^6 part/ml.

- Les techniques de microscopie électronique (**SEM, TEM, cryo-TEM**)⁵⁴ permettent de visualiser la surface d'un objet avec une résolution nanométrique. Pour cela, un faisceau d'électrons est envoyé vers la surface et les électrons vont interagir avec la matière. La zone qui est choisie doit être représentative de l'échantillon, afin de limiter le nombre d'images à réaliser. Une fois que les électrons ont interagi avec la surface, différents types de radiations vont avoir lieu et notamment l'émission d'électrons secondaires qui vont être détectés. Dans le cas des particules, il est possible de les caractériser une fois qu'elles sont déposées ou piégées sur un support. Dans ces techniques, il faut travailler sous vide, donc cela entraîne une dégradation de l'échantillon.
- Les techniques de microscopie à sonde locale (**STM, AFM**)^{55,56} correspondent à l'utilisation d'un cantilever (poutre souple terminée par une pointe très fine) qui sonde et/ou scanne la surface d'un échantillon afin de reconstruire la cartographie/la topographie de la surface avec une résolution atomique. Cette méthode fonctionne en air (pression atmosphérique) et aussi en milieu liquide, ce qui est un avantage majeur par rapport à la microscopie électronique. L'AFM rend possible une caractérisation métrologique et morpho-mécanique, dans les 3 dimensions et avec une très bonne résolution, des objets présents en surface d'un substrat.
- La **spectrométrie de masse**⁵⁷ est une méthode de caractérisation de la matière qui repose sur la détermination de la masse moléculaire, et donc de l'identification moléculaire. Les composés sont mis en phase gaz et transformés en ions afin de pouvoir se déplacer à l'aide d'un champ électrique ou magnétique. Ainsi, les composés peuvent être détectés intact ou sous forme de fragments. Le détecteur permet d'obtenir des spectres déterminant des valeurs de masse/charge caractéristiques de chaque espèce présente dans la solution initiale. Dans le cadre des EVs, la spectrométrie de masse est très employée afin de réaliser des expériences de protéomique ou lipidomique. Là encore, la limite principale est de pouvoir déterminer les protéines qui sont d'origine uniquement vésiculaire.

Le tableau 1.3 permet de faire une synthèse des techniques décrites ci-dessus avec notamment la présentation des avantages et des inconvénients de ces techniques.

Méthode	Avantages	Inconvénients
NTA	Détection multiparamétrique des particules de petite taille (taille/phénotype/forme) Détection des particules individuellement	Ne permet pas de discriminer les EVs des autres constituants sans marquages spécifiques des sous-populations d'EVs/ amélioration nécessaire de la calibration/ pas de quantification fiable à cause de l'influence de la calibration
DLS	Détection des particules submicrométriques	Aucune information fiable avec un échantillon hétérogène en taille/pas de quantification
FC	Détection des particules individuellement	Pas d'analyse sous les 300 nm sans équipement extrêmement couteux
TRPS	Quantification et qualification par la taille	Pas de discrimination entre les particules détectées de même taille/ risque de colmatages/ analyse limitée par la taille propre de chaque nanopore
BCA	Détermination de la concentration protéique en solution	Pas de distinction entre les protéines hydrosolubles et celles provenant des EVs à cause de l'influence des étapes de prétraitement
WB	Réalisation de phénotypage	Pas d'anticorps spécifique des sous-populations d'EVs fiable
ELISA	Qualification et de quantification	Pas de distinction des protéines libres de celles provenant des EVs
SPR	Détection sans marquage et en temps réel	Besoin de détection complémentaire pour discriminer les sous-populations d'EVs
TEM/SEM	Détection à très hautes résolutions	Appareil couteux, temps de préparation long
STM/AFM	Détection à très hautes résolutions	Appareil couteux, besoin d'un substrat, Temps d'analyse long
MS	Détermination de la composition protéique et lipidique	Appareil couteux, ne permet pas une discrimination entre les EVs et les autres constituants

Tab 1.3 présentation des caractéristiques des principales techniques (liste non exhaustive) de caractérisation des EVs.

Les résultats issus des techniques de caractérisation sont influencés par toutes les étapes de prétraitement qui présentent un certain nombre de limitations (faible rendement, résolution de séparation limitée, faible sensibilité, colmatage, dilution et dégradation de l'échantillon). Le projet

MADNESS se trouve dans la continuité d'une précédente thèse de notre groupe qui a mis en place une plateforme biophysique⁹ composée des trois techniques que sont la SPRi, l'AFM et la spectrométrie de masse.

Lorsqu'il s'agit d'isoler les différentes sous-populations d'EVs⁸, il est difficile de se trouver exclusivement en présence d'une seule sous-population purifiée: des petites microvésicules coexistent souvent dans les fractions enrichies en exosomes, de grosses microvésicules coexistent aussi souvent avec des corps apoptotiques, et les exosomes contaminent les échantillons de microvésicules. Les EVs sont des particules biologiques dont la plupart des sous-populations ont des tailles qui se chevauchent. Leur analyse discriminante est fortement compromise par la difficulté de les isoler/enrichir. Ce problème peut être généralisé à toutes les nanoparticules se trouvant dans un milieu complexe. En effet avec des tailles inférieures à la limite de détection des microscopes optiques et sous la limite des cytomètres à flux classiques (sous les 200 nm), il n'existe que très peu de techniques pour les visualiser et les détecter. De plus, à cette échelle, l'effet matrice biologique est très important masquant potentiellement les analytes par la présence de tous les autres constituants.

1.2 Méthodes usuelles de tri, d'isolation et de purification des EVs

Les approches les plus employées pour le prétraitement des solutions contenant les EVs utilisent la technique de centrifugation¹⁰. S'en suivent des techniques de filtration sur membrane, de séparation par la taille avec la chromatographie d'exclusion stérique, le développement de kits de précipitations ou encore des méthodes basées sur l'immunocapture⁵⁸.

1.2.1 Centrifugation

L'ultracentrifugation est aujourd'hui la technique la plus utilisée, car les EVs présentent différentes densités. L'ultracentrifugation⁵⁹ permet de séparer les EVs des autres constituants, mais également les sous-populations entre elles, en fonction de la densité et de la vitesse de rotation. En effet, à partir de la vitesse de rotation choisie et la durée de l'expérience, les composés pourront se retrouver dans le culot ou le surnageant, ce qui permettra en théorie, une séparation plus aisée. Dans une première approche, les 3 types de sous-catégories d'EVs ont été séparés. Les vitesses appliquées sont de 2 000g (grandes vésicules/fraction 2K), 10 000g (vésicules de tailles moyennes/fractions 10 K)

et 100 000g (collection des vésicules de petites tailles, encore appelé fraction 100 K)⁵⁸, comme le montre la figure 1.5. La technique de centrifugation sur gradient (sucrose ou iodixanol)⁶⁰ est une méthode séparative alternative entraînant l'élimination de plus de contaminants. Cette technique est longue et l'efficacité n'est pas suffisante (il reste de la co-isolation de lipoprotéines et de protéines solubles). Les rendements et la spécificité sont également assez faibles, car les virus peuvent aussi être co-isolés⁶¹.

Il existe d'autres alternatives à la centrifugation, et notamment l'emploi de kits de précipitation⁶², permettant aux particules de réagir avec des solutions telles que des PEGs (Polyéthylène glycol), pour les piéger. Une solution de lavage élimine les contaminants et en fin d'expérience, les particules d'intérêts sont éluées avec une solution pour laquelle les composés ont une affinité plus grande. La technique est simple et facile d'emploi. Il existe des kits spécifiquement développés pour les EVs (Exoquick®, Exoprep®). Cependant, ces kits ne permettent pas d'enrichir les fractions en EVs et de les garder intacts suffisamment, car l'échantillon peut être dégradé lors de la phase d'éluion. La présence de contaminants est également souvent observée.

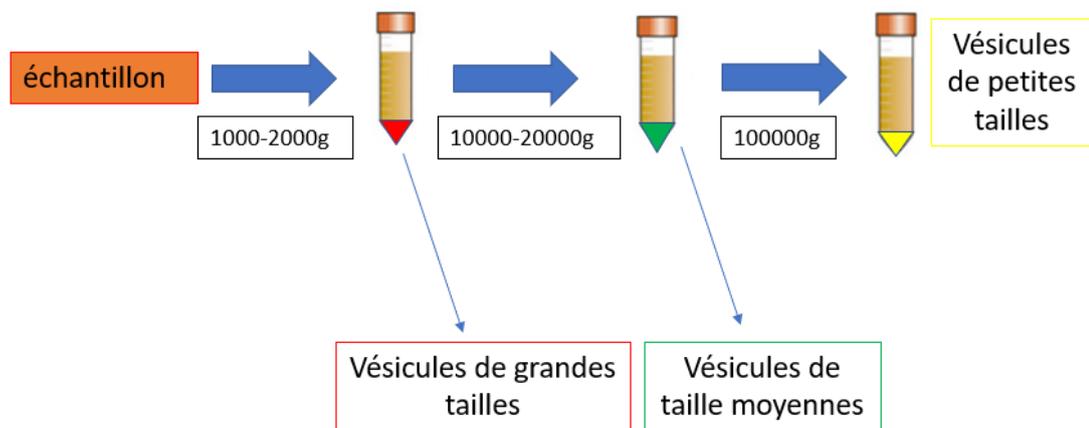


Fig.1.5. Présentation schématique des étapes d'isollements des sous-populations de vésicules extracellulaires par centrifugation différentielle. Les fractions ainsi obtenues sont appelées grandes vésicules (ou fraction 2K), vésicules de tailles moyennes (ou fractions 10 k) et enfin petites vésicules (ou fraction 100K).

1.2.2 Filtration

Des membranes comprenant des pores de tailles connues sont utilisées pour la séparation par filtration⁶², comme le montre la figure 1.6. Le choix de la membrane, les volumes injectés et les débits

vont influencer l'expérience. Cette technique présente plusieurs limites avec les EVs : ne séparer qu'en fonction de la taille ne permet pas un isolement spécifique, car tous les éléments qui se trouvent dans une certaine gamme de taille vont se comporter de la même façon. De plus, les EVs sont connues pour être déformables. Elles peuvent ainsi traverser la membrane alors que leur taille est bien supérieure à celle des pores. Le seul critère de taille n'est pas suffisant pour séparer et enrichir l'échantillon et donc atteindre de hautes valeurs de rendement. Il a été démontré que des lipoprotéines et divers éléments de taille proche de celle des EVs sont généralement co-isolés. La microfiltration ou encore les techniques basées sur le fractionnement par couplage flux fractionnement (FFF, A₄F) sont des alternatives intéressantes.

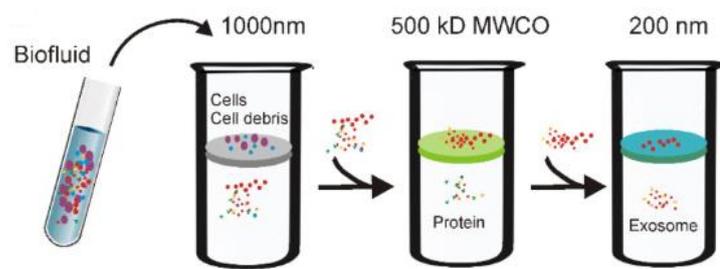


Fig. 1.6. Présentation schématique des étapes d'isolements des sous-populations de vésicules extracellulaires par filtration⁶³

1.2.3 la chromatographie d'exclusion stérique (SEC)

La SEC⁶⁴ (Size Exclusion Chromatography) permet de séparer des particules selon leur taille au sein d'une colonne constituée de billes poreuses, selon le principe de tamisage moléculaire, présenté sur la figure 1.7. Une phase stationnaire composée de billes poreuses à base de polymères va retarder le passage de petits éléments, alors que les éléments dont le volume hydrodynamique est supérieur à celui des pores de ces billes seront exclus. Il n'y a pas d'interaction entre l'échantillon et la phase stationnaire, ce qui signifie que la séparation se fait exclusivement par la taille. Les différentes fractions sont ensuite analysées (spectroscopie UV et visible) afin d'en déterminer le contenu. La technique est employée afin de séparer les EVs des autres constituants tels que les protéines ou les autres constituants macromoléculaires. Selon les conditions d'expériences, les choix de la colonne, du volume de la phase stationnaire ainsi que la nature de la phase mobile auront un impact sur la séparation de l'échantillon à purifier. La technique ne permet pas de discriminer les sous-populations de vésicules.

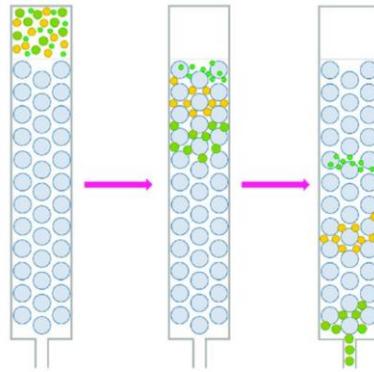


Fig. 1.7. Présentation schématique de la chromatographie d'exclusion stérique⁶⁵ pouvant être appliquée aux EVs : les particules de grandes tailles sortiront en premier et suivront les particules par tailles décroissantes.

1.2.4 Immunocapture sur colonne ou sur billes

Une dernière approche consiste à utiliser un autre type de colonne, basée cette fois-ci sur le principe de l'affinité et reposant sur les interactions biochimiques (récepteurs biologiques ou synthétiques/cibles), comme le montre la figure 1.8. L'échantillon va réagir spécifiquement avec des ligands (anticorps par exemple) greffés sur la phase stationnaire, permettant dans un premier temps de piéger les analytes et sans interagir avec le reste de la solution. Par la suite, une solution d'éluion va permettre de récupérer les analytes et ainsi d'obtenir une fraction qui soit plus pure en échantillon d'intérêt. La technique est sensible au choix de l'anticorps et de la spécificité d'interaction de celui-ci avec l'analyte qu'il faudra isoler.

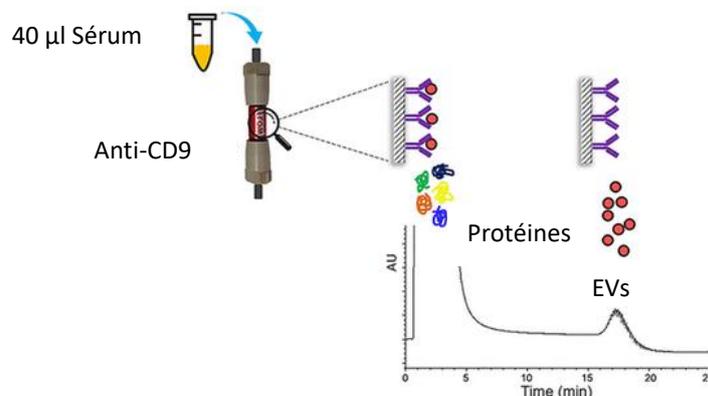


Fig 1.8. Présentation schématique de la chromatographie d'affinité appliquée aux EVs⁶⁶ avec l'élimination des composés non désirés pour l'analyse dans un premier temps, puis collection des EVs avec la solution d'éluion.

1.2.5 Comparaisons des techniques

Certaines équipes ont comparé les techniques citées ci-dessus^{67,68} et ont clairement montré leurs limites en matière de sélectivité, de taux d'enrichissement et de pureté avec des valeurs très faibles pour la plupart des techniques comme le montre le tableau 1.4. Entreprendre des études de fonctionnalité et d'exploration des EVs devient très problématique si la première étape de prétraitement n'est pas satisfaisante. Le tableau 1.4 présente les avantages et les inconvénients des méthodes usuelles.

	Centrifugation différentielle (CD) et sur gradient (CG)	Chromatographie d'exclusion stérique	Chromatographie d'affinité	Filtration
Spécificité	Densité et taille (CD)/densité (CG)	Taille	Marqueur	Taille
Temps	>4h	1h	<1h	<1h
Avantages	CD technique la plus utilisée/ CG permet une séparation plus efficace des EVs que CD	Structure des EVs reste intact	Très spécifique pour une sous population donnée d'EVs	EVs peut être concentrée par filtration
Inconvénients	Contamination, agrégation et fusion peuvent affecter les fonctions des EVs	Possible contamination et dilution des EVs	Ne conviens pas pour de grands volumes/ dégradation de l'échantillon lors de la phase d'élution	Possible dégradation des grosses vésicules et des cellules, possible adhésion des EVs sur le filtre. Nécessité de coupler à d'autres techniques
Rendement/ Récupération	5-65%	40-75%	42-49%	80%
Pureté	+	+	+++	+
Volume	Plusieurs ml	Faible	1,5 ml	1 ml

Tab 1.4 Présentation des différentes caractéristiques des techniques usuelles de prétraitement de l'échantillon issu de la thèse de Sameh Obeid⁹.

1.3 Systèmes innovants de séparation des EVs

Face aux problématiques rencontrées et à la limitation des approches conventionnelles, des méthodes innovantes basées sur des principes de nanostructurations et de microfluidiques ont vu le jour et apparaissent comme une des alternatives très prometteuses.

Nous allons décrire de façon non exhaustive quelques-uns des dispositifs de type microsystème qui permettent de séparer et d'enrichir les EVs en fonction de la taille. Les techniques sont notamment basées sur l'isolement de particules à l'aide de microfiltres, de nanopilliers, de nanofibres, par la modification des propriétés du fluide, l'électrophorèse, le déplacement latéral déterministe, la filtration hydrodynamique et les ondes acoustiques. Il existe de nombreuses techniques permettant de trier les particules submicrométriques telles que les liposomes, les virus, les particules organiques et inorganiques. Une grande partie de ces techniques telles que les extractions liquides/liquide (avec différent solvant organique), les cartouches SPE (solid phase extraction), les cartouches SPME (solid phase microextraction) ou encore les cartouches MIP (molecularly imprinted polymer) ont rencontré de fortes incompatibilités de solvant, de stabilité et de dégradation lorsqu'il s'agit d'échantillon contenant des EVs. Nous présenterons ici, les méthodes de tri par la taille qui sont reconnus par la communauté des EVs (mentionnées dans de nombreuses revues^{30,69-73}) pour avoir une influence sur le prétraitement innovant des échantillons biologiques contenant les EVs. À partir de ces informations, nous présenterons les dispositifs qui ont été développés avec nos partenaires.

Méthode de filtration innovante

Le premier modèle décrit dans cette partie est le dispositif EXOTIC⁷⁴ (Exosome Total Isolation Chip): Il repose sur le principe de la microfiltration : il s'agit de réaliser les expériences de filtration, mais dans des canaux micrométriques. Les EVs sont concentrés entre les différents filtres et les éléments de plus grandes ou de plus petites tailles sont séparés en amont ou en aval de ces filtres. La mise en place d'un réseau de filtres avec des tamis de tailles différentes permet d'isoler les sous-populations d'EVs dans des chambres bien définies et ainsi de collecter différentes fractions. Dans cette approche, l'idée est de limiter les risques de bouchage en injectant un volume faible avec des débits de l'ordre de plusieurs dizaines de $\mu\text{l}/\text{min}$ et des pores de dimensions nanométriques (quelques dizaines de nm). Liu et al. (2017) ont traité un échantillon comprenant des EVs à un débit de $83 \mu\text{l}/\text{min}$ à travers l'ensemble de filtres interconnectés comme le montre la figure 1.9. Chaque filtre présente une porosité particulière, allant de 200 nm jusqu'à 30 nm, avec des pas de l'ordre de quelques dizaines de nm. Chaque zone entre les filtres, appelée chambre de collection, permet la récupération des fractions de tailles connues. Pour un volume de départ de 5 ml, il est possible de récupérer 200 μl de

filtrats. La principale limitation est que les EVs sont des entités déformables et peuvent donc traverser une membrane qui a une taille proche de la sienne. Dans ce contexte, il est judicieux de se poser la question si la différence de 20 nm entre deux filtres, par exemple, est suffisante.

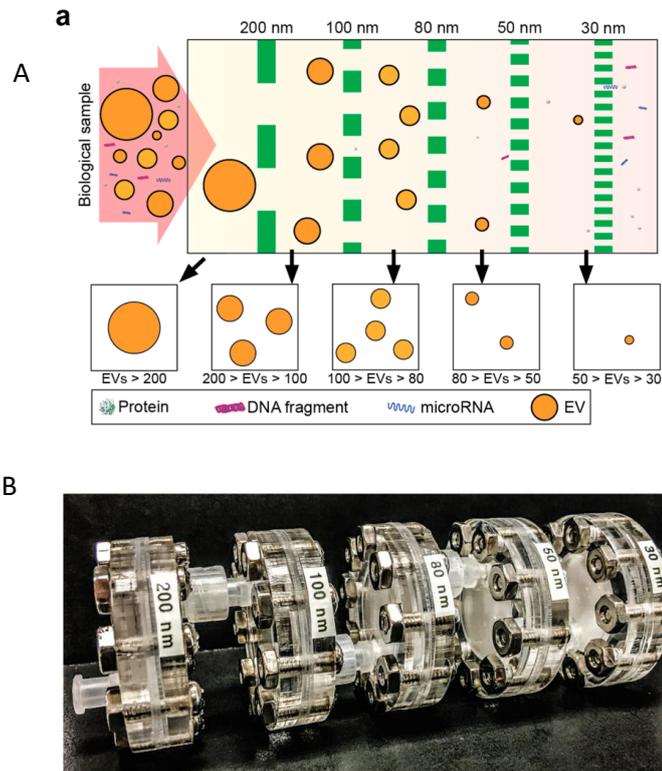


Fig. 1.9. A : schéma de principe du système de filtres en série. « The Exosome Total Isolation Chip » (Liu et al⁷⁴) B°: image réelle du dispositif.

En tenant compte du risque de présence des EVs dans les différents filtres, Liang et al⁷⁵ ont développé une technique basée uniquement sur une double membrane qui est intégrée dans le dispositif microfluidique : une en entrée et l'autre en sortie d'un canal microfluidique. Le filtre en entrée à une taille de 200 nm (empêchant l'entrée des éléments de grandes tailles) et celui en sortie à 30 nm (permet l'élimination uniquement des protéines solubles ainsi que les objets de petites tailles). Ces filtres isolent ainsi tous les éléments qui sont compris dans cette gamme de taille dans une chambre sans distinction intermédiaire. Une solution de 8ml injectée à un débit de 40 μ l/min pendant 3h est nécessaire afin d'obtenir un tri efficace. La fraction d'EVs (165 μ l) collecté est constituée d'éléments de taille comprise entre 30 et 200 nm comme le montre la figure 1.10. Chacun de ces systèmes de filtres améliore la filtration, mais ne résout pas totalement les problèmes de co-isolation et de risque de bouchage.

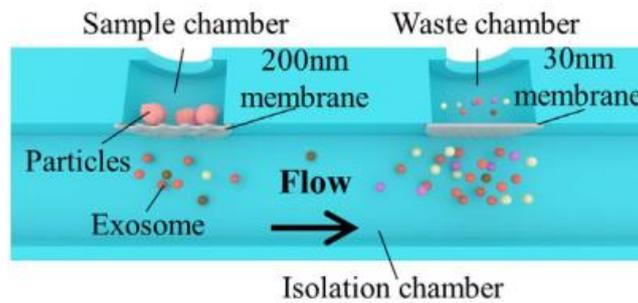


Fig. 1.10. Système de piégeage à l'aide de filtres précis de 200nm et 30 nm de porosité, d'après « An integrated double-filtration microfluidic device for isolation, enrichment and quantification of urinary extracellular vesicles for detection of bladder cancer » (Liang et al⁷⁵).

La filtration électrocinétique est une méthode qui permet de limiter les problèmes de bouchage ou colmatage observés avec les techniques de filtration seules en intégrant une approche électrique. En effet, les EVs ont une charge de surface négative et l'ajout d'un champ électrique peut s'avérer pertinent pour améliorer les conditions de tri. Marczak et al⁷⁶ ont développé un système avec une déplétion en ion contrôlée par un champ électrique transversal et conduisant ainsi les particules chargées dans une direction particulière afin de les isoler. Le système est réalisé dans un gel d'agarose, il ne nécessite que 100 μ l de solution avec un écoulement de l'échantillon à un débit de 2,5 μ l/min. Le système permet d'isoler les particules de 60 à 130 nm. La figure 1.11 présente le schéma de fonctionnement du dispositif. D'autres groupes réalisent un tri d'EVs à partir du principe électrocinétique avec des microarrays : le système ACE chip⁷⁷, à l'aide d'un champ électrique non uniforme, contrôle la trajectoire des particules.

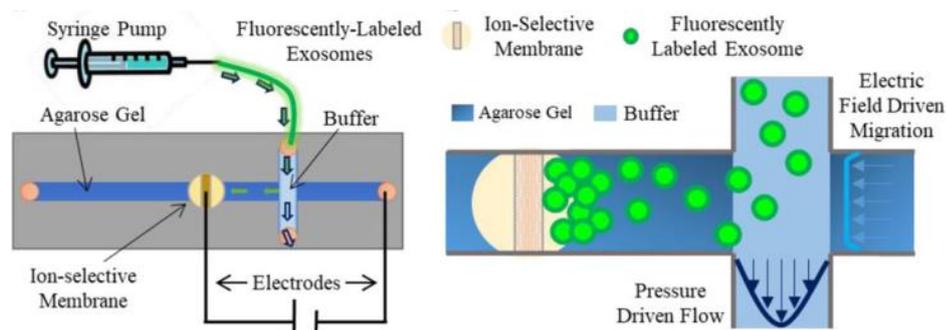


Fig. 1.11. Présentation du dispositif développé par Marczak et al⁷⁶ afin de conduire les EVs dans une sortie préférentielle pour les collecter indépendamment des autres composés.

Une autre approche de filtration repose sur l'utilisation d'une puce microfluidique contenant des micropiliers⁷⁸ fonctionnalisés et des nanofibres transverses qui vont piéger les EVs. Les micropiliers ont été fabriqués en PDMS. Chaque pilier a un diamètre de 2,6 μ m et une hauteur de 22 μ m. Ceci va empêcher les cellules de rentrer dans la « forêt de piliers » espacés de 900 nm et la gravure

des fibres orthogonales, espacées de 30-200 nm va permettre de piéger les EVs et éliminer les protéines solubles inférieures à 30 nm. L'astuce de ce système repose sur le fait que les nanopilliers seront dégradés avec une solution de lavage, permettant ainsi la libération des particules suivies par une immunocapture avec les anticorps anti-CD63. Le système est testé dans un premier temps à un débit de 10 $\mu\text{l}/\text{min}$ pour un volume de 100 μl , avec des liposomes de 80 nm. Dans ce cas présent, les rendements obtenus sont de 60%, supérieurs aux valeurs moyennes obtenues par centrifugation. Puis dans une seconde étape, ce sont des solutions contenant des EVs qui sont injectées. Pour comprendre le fonctionnement du dispositif, la figure 1.12 décrit les micropilliers et le mode de filtrations.

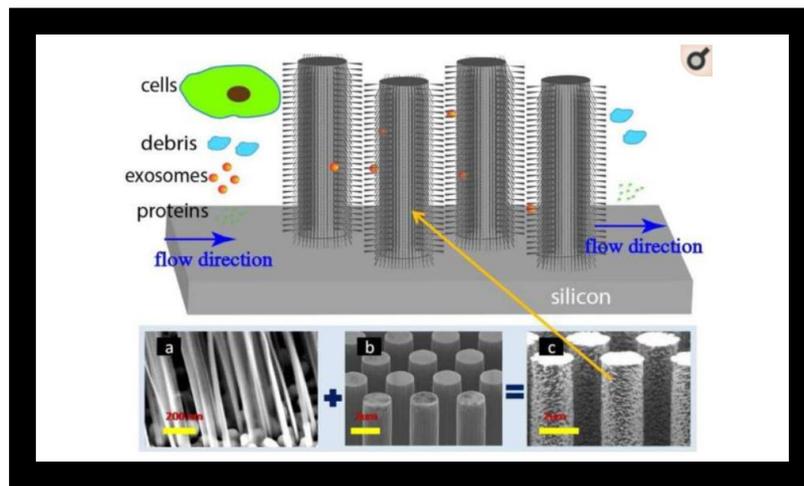


Fig. 1.12. Image issue de « Ciliated micropillars for the microfluidic-based isolation of nanoscale lipid vesicles » (Wang et al⁷⁸) présentant le principe d'isolement d'EVs avec un réseau de nanopilliers (a à c : image des nanofibres et des nanopilliers).

Approche viscoélastique

En microfluidique, la viscosité, entre autres paramètres, prend une part importante dans les forces qui vont influencer le déplacement des particules. Il est possible de modifier la trajectoire d'une particule en changeant les propriétés d'un fluide, par exemple en ajoutant un polymère qui va impacter le déplacement latéral et la diffusion de la particule. La méthode sera réalisée par l'emploi de forces viscoélastiques. Cette technique est une méthode simple et sans marquage. Ceci a été décrit dans l'article de Liu et al⁷⁹: le poly-(oxyethylene) est ajouté à la solution pour modifier la trajectoire des EVs. Dans cette étude, 0,1 % de la solution de PEO est ajouté au tampon, ce qui modifie ses propriétés visco-élastiques et déplace les petites particules, de taille inférieure à 200 nm vers les parois du canal microfluidique alors que les autres (>200 nm) sont maintenues au centre, comme le montre la figure 1.13. De cette façon un seuil de séparation peut être établi aussi dénommé seuil de coupure de l'échantillon (ici 200nm) avec un débit de 3 $\mu\text{l}/\text{min}$ et un volume injecté de 100 μl . Contrairement aux

techniques usuelles décrites ci-dessus, les rendements et la pureté sont supérieurs à 80 %. En dépit de ces performances accrues, les auteurs suggèrent qu'il est nécessaire de coupler cette technique à un module complémentaire (par immunocapture potentiellement) afin d'être davantage discriminant entre les sous-populations de vésicules. Ceci montre que la solution MADNESS proposée est cohérente avec les exigences de la communauté travaillant sur les EVs.

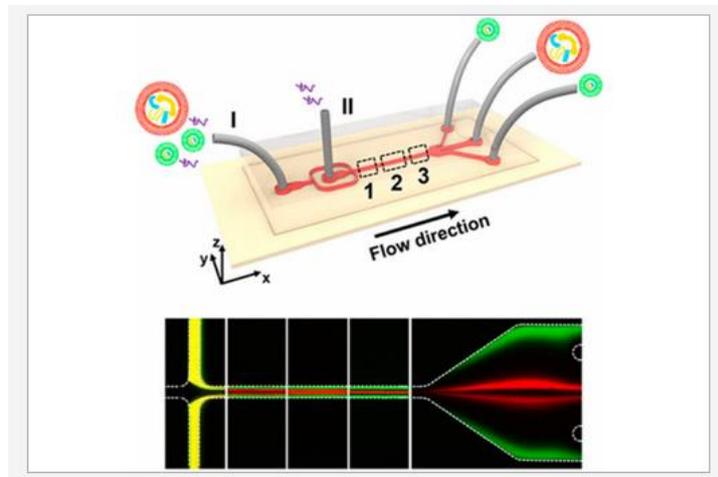


Fig. 1.13. Image issue de « Field-Free Isolation of Exosomes from Extracellular Vesicles by Microfluidic Viscoelastic Flows » (Liu et al⁷⁹) montrant l'influence et la modification de l'écoulement de particules fluorescentes en présence d'un fluide aux propriétés viscoélastiques particulières.

Déplacement déterministe latéral

La technique DLD (deterministic lateral displacement) permet de réaliser une bifurcation asymétrique, en plaçant des obstacles micrométriques (qui sont rectangulaires dans l'exemple ci-après⁸⁰) le long de la trajectoire de l'échantillon. Les particules vont être perturbées à la rencontre de chaque obstacle et vont être forcées de changer la trajectoire d'écoulement selon leur diamètre. Ce déplacement, dans des conditions de vitesse et de pression inchangées, va dépendre des caractéristiques telles que la taille, la densité et la compressibilité de la particule. La forme, le positionnement le long du canal et la quantité d'obstacles ainsi que la géométrie du canal vont induire des déplacements et des fractionnements des particules. En effet, l'espacement entre les obstacles rectangulaires développés par Huang et al a une valeur de 8 μm entre le centre de 2 obstacles (avec un écart de 1,6 μm). La séparation est permise entre des particules de 400 nm et de 1,03 μm de diamètre selon les conditions de débit. Il est possible en ajoutant différentes structures de séparer les analytes avec différents seuils de coupure, c'est-à-dire que les géométries des dispositifs peuvent être modifiées lors de la conception pour s'adapter au seuil de coupure nécessaire pour récolter des fractions de différentes tailles. Le développement de la technique DLD, et notamment la nanoDLD pour les EVs est entrepris pour permettre de réaliser différentes opérations sur les vésicules (sur une même

puce^{81,82}) comme le tri ou l'enrichissement. Les petites particules vont se déplacer selon un mode dit zigzag alors que les grandes particules se déplaceront par choc. Différentes études ont montré l'utilisation de cette technique dans le cadre des EVs^{80,83,84}. Nous présenterons ci-dessous, dans la figure 1.14, un exemple de tri schématisé réalisé par cette méthode.

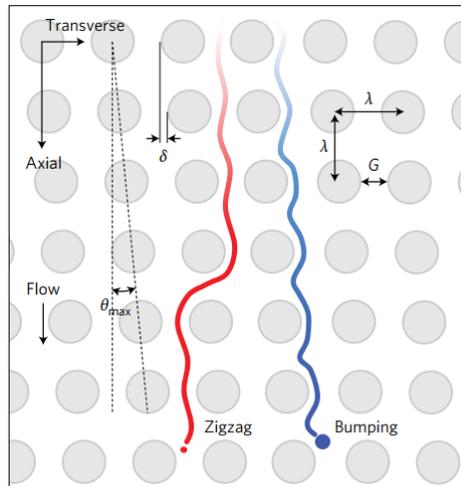


Fig. 1.14. Image issue de «Nanoscale lateral displacement arrays for the separation of exosomes and colloids down to 20 nm⁸⁴ » montrant les variations de déplacement de particules selon la présence ou non d'obstacle. En rouge mouvement d'une particule de petite taille qui va sortir à gauche (mode zigzag) et en bleu grande particule qui va sortir à droite à partir de la même origine (mode choc).

Filtration hydrodynamique

Dans le projet MADNESS, nos partenaires ont réalisé un dispositif de tri passif, sans obstacle, basé sur le principe de la filtration hydrodynamique^{85,86} qui est décrit pour la première fois en 2005 et repose sur un déplacement de particules au niveau de la paroi de la canalisation principale vers une canalisation secondaire selon une séparation par la taille. Le système est composé d'un canal principal relié à plusieurs canaux secondaires. Dans le canal principal, l'échantillon composé de différentes particules va se déplacer avec un écoulement laminaire. Les particules se positionnent de façon homogène dans le canal. Au niveau de la paroi, une particule incompressible aura une distance constante entre le bord du canal et son centre. Au niveau de la jonction entre le canal principal et un canal latéral une fraction du fluide va s'écouler. Le flux étant laminaire, la fraction de fluide qui va être déviée dans la (ou les) canalisation(s) secondaire(s) définit une ligne séparatrice. Les particules dont le rayon sera inférieur à la valeur « Paroi/ligne séparatrice » migreront dans le canal latéral (cette valeur est appelée seuil de coupure ou rayon critique R_c). La figure 1.15 présente un exemple du tri de particules de différentes tailles. Ce tri sera dépendant de la géométrie du canal et des conditions fluidiques.

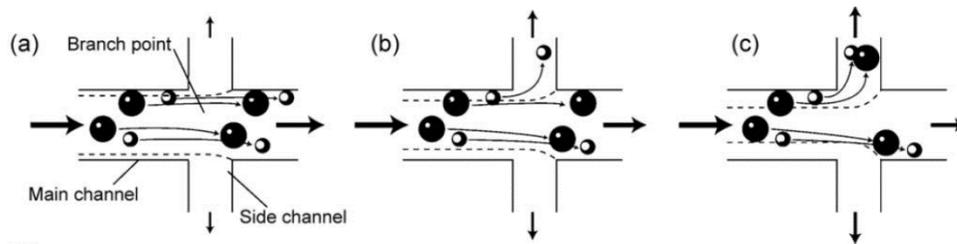


Fig. 1.15. Présentation du principe de la filtration décrit par Yamada et Seki ⁸⁵. Les schémas de A à C présentent l'écoulement du fluide et l'aspiration des particules qui ont un rayon inférieur aux rayons de coupure.

L'objectif de ce système passif est de fractionner l'échantillon et de collecter les particules dans une gamme de taille bien définie. Ce système peut s'opérer pour des cellules, des nanoparticules, des lipoprotéines et des vésicules en ajustant les paramètres dimensionnels des canaux de la puce. La puce microfluidique peut être optimisée en ajoutant différents seuils de coupure sur un même canal principal ou en utilisant différentes puces avec chacune une valeur de coupure différente qui mèneront à différentes sorties. Chacune de ces sorties collectera les particules dans une gamme de taille connue et maîtrisée, induisant la séparation de sous-populations en plus de l'élimination des composés de taille supérieure. À notre connaissance, cette technique n'a pas été envisagée dans le cadre des EVs et nous présenterons dans la prochaine sous partie les dispositifs réalisés par nos partenaires à Toulouse.

Onde acoustique de surface

Une autre technique passive qui ne dégrade pas les particules est le tri par l'application des ondes acoustiques de surface. Cette approche acousto-fluidique repose sur le principe suivant : un échantillon complexe en particules hétérogènes est injecté dans un canal microfluidique en écoulement laminaire. La perturbation des particules permet leur tri. Afin de les perturber, des transducteurs interdigités (IDTs) sont ajoutés de part et d'autre du canal comme le montre la figure 1.16. La présence de ces IDTs sur un matériau piézoélectrique (niobate de lithium par exemple) permet de transformer un signal électrique en ondes acoustiques de surface.

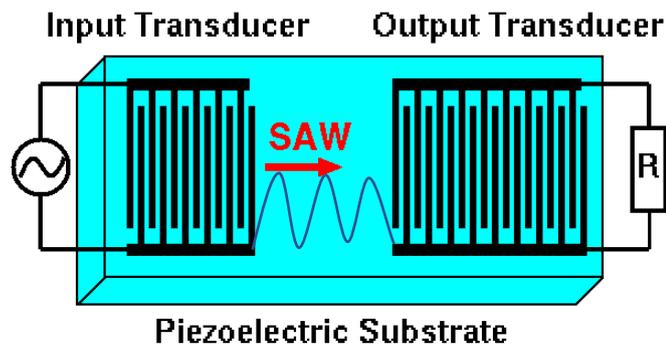


Fig. 1.16. Schéma d'un transducteur interdigital (IDT) permettant de transformer un courant électrique en ondes acoustiques de surface à l'aide d'un matériau piézoélectrique.

L'influence de ces ondes va déplacer latéralement certaines particules selon la longueur d'onde appliquée, qui est définie par les espacements entre les électrodes des IDTs. Les particules seront séparées selon leur contraste acoustique : les particules de tailles, densités et compressibilités importantes seront piégées au sein des ventres générés par les ondes alors que les éléments de densités plus faibles se retrouveront au sein des nœuds^{87 88} de l'onde se propageant transversalement dans le canal.

Lee et al⁸⁸ ont été les premiers à réaliser un dispositif viable et montrant des performances de tri entre EVs. Wu et al⁸⁹ ont développé un système avec deux d'IDTs en série afin d'éliminer les contaminants de grandes tailles avec le premier (les grandes particules sont guidées vers la sortie) puis de permettre la séparation entre les sous-populations d'EVs avec les fractions qui sont restées dans le canal. Il est également possible de définir une géométrie particulière en positionnant les IDTs de manière décalée par rapport au canal microfluidique et ainsi obtenir un tri plus efficace en couplant le système avec des propriétés viscoélastiques différentes⁹⁰. L'équipe de Taller et al⁹¹ a développé un système microfluidique basé sur des ondes acoustiques couplées à une colonne échangeuse d'ions et la diélectrophorèse afin de lyser et isoler les EVs puis permettre l'analyse des miRNA. Toutes ces techniques utilisent des ondes acoustiques et ont montré des résultats de séparation et de taux de rendement supérieurs à de techniques comme la centrifugation (voir tableau 1.6, p48). Une équipe de notre département de recherche au sein de l'institut a également développé un dispositif de tri acoustique, auquel j'ai participé, en particulier lors des expériences de tri de nanoparticules. Cette partie sera présentée à la page 44 dans la section présentant ce dispositif de tri par onde acoustique dont le schéma de principe est illustré en figure 1.17.

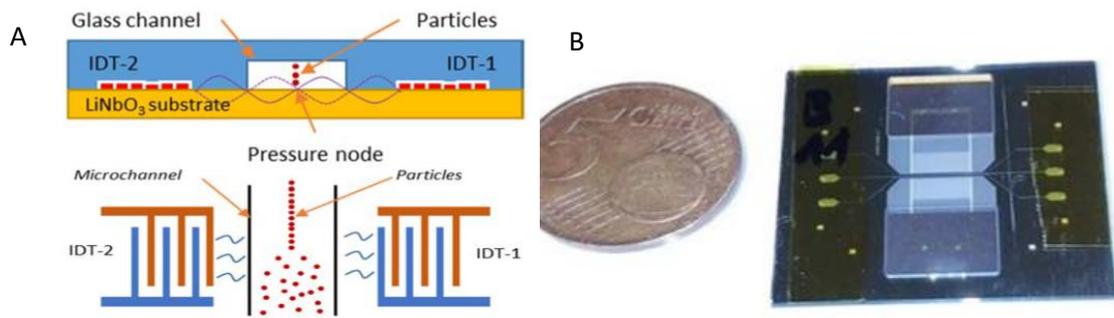


Fig. 1.17. Image issue de «tunable Separation of Nanoparticles in a Continuous Flow Using Standing Surface Acoustic Wave» (Chaalane et al ⁹²) montrant le principe du tri de particules par onde acoustique de surface (A) et une photo du dispositif (B)

Une approche basée uniquement sur un seul principe physique n'est pas suffisante, car la séparation ne permet pas d'obtenir une fraction qui ne contient que les analytes recherchés. En effet, si la taille seule est le paramètre de tri, des particules de différentes origines et de différentes familles vont être co-isolées. Pour limiter ce problème, il faut complexifier la méthode de prétraitement et il est nécessaire de coupler plusieurs méthodes afin de fiabiliser la séparation des nanoparticules d'intérêts avec les autres composés de la matrice biologique. C'est pourquoi dans notre projet, nous avons réalisé deux dispositifs de tri, l'un basé sur la filtration hydrodynamique et l'autre sur les ondes acoustiques. L'objectif final est de coupler ces dispositifs de tri à notre module NBA afin de trier et d'immunocapturer les EVs issues de différents échantillons biologiques.

1.3.1 Tri par filtration hydrodynamique

La première partie du projet MADNESS consiste à mettre en place une étape de prétraitement de l'échantillon par tri de particules selon leurs tailles ce qui permettrait de fiabiliser les analyses de notre plateforme miniaturisée en limitant les effets matrices et en piégeant des particules qui sont dans une solution moins complexe que lorsqu'ils sont extraits du corps humain. Ce type de puce a été mise en place avec nos collaborateurs du LAAS-CNRS (Toulouse), dans le cadre des travaux réalisés par *Lyne Pillemont*⁹³. Le dispositif est conçu en PDMS avec plusieurs modèles (allant de 1 à 100 canaux latéraux). Ce dispositif est passif, il est conçu avec les technologies de la salle blanche du LAAS et est basé sur la filtration hydrodynamique⁹⁴ que nous avons évoquée dans la section précédente à la page 36. Brièvement, il s'agit d'un dispositif avec une canalisation principale et des canalisations secondaires qui auront des dimensions et une géométrie particulière qui permettra le passage uniquement de particules dont le rayon est inférieur à une valeur critique (R_c = rayon critique). Ce dispositif va nous permettre de récupérer un échantillon dans lequel les cellules et toutes les particules ayant une valeur supérieure aux rayons critiques vont rester dans le canal principal. Les solutions récupérées comprendront une fraction avec des particules dont la taille se situe dans une certaine gamme (de quelques nm à la valeur R_c). Plusieurs dispositifs ont été développés, basés sur des simulations numériques. La réalisation des dispositifs n'a pu être réussie que par le déblocage des verrous de fabrication en salle blanche (le collage de plusieurs couches sans détérioration, la réalisation des entrées et sorties manuellement). Des étapes de réflexions sur l'intérêt de l'augmentation du nombre de canaux latéraux ont eu lieu, ce qui a permis d'augmenter le volume qui sera récupéré dans la voie secondaire. Le choix des dimensions des canaux latéraux a conduit à la modification du rayon critique. Les dimensions sont très petites dans les voies secondaires, ce qui induit des débits faibles. Au cours de cette partie du projet MADNESS, l'objectif est d'optimiser aux maximums le nombre de voies secondaires et la géométrie pour permettre un tri efficace et des conditions de travail adaptées aux objectifs de l'interconnexion avec le module NBA. Comme on peut le voir sur la figure 1.18, le système réalisé a été complexifié (l'un avec 10 canalisations secondaires et le second avec 100 canalisations latérales). Les caractéristiques du dispositif final qui contient 100 canaux latéraux, celui que nous avons utilisé pour le couplage du chapitre 4, sont également présentées dans le tableau en figure 1.18.

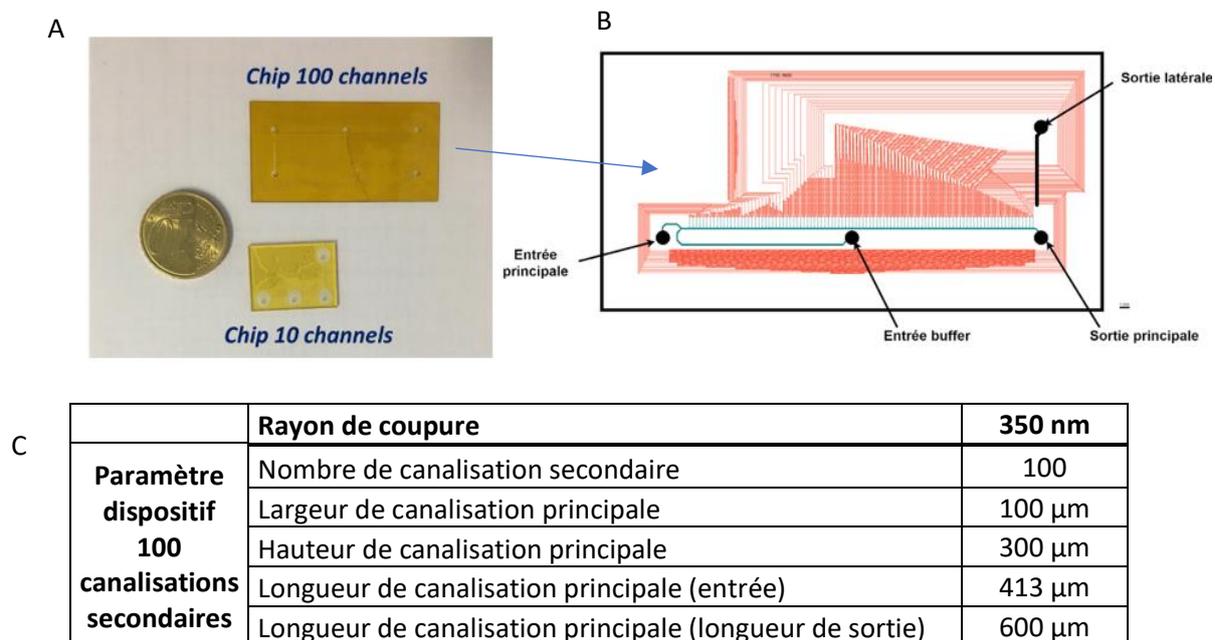


Fig. 1.18. A° puces de tri par filtration hydrodynamique comprenant 2 modèles de canalisations latérales (avec 10 ou 100 canaux latéraux). B° présentation du masque du dispositif de tri avec 100 canaux. C : Tableau présentant les caractéristiques du dispositif à 100 canaux latéraux. Figure issue de la thèse de Lyne Pillemont⁹³.

Les dispositifs de tri peuvent avoir des géométries modulables afin d'atteindre le seuil de coupure souhaité. La quantité de canaux latéraux peut être modifiée et optimisée afin d'augmenter le rendement de fractionnement et obtenir ainsi un volume suffisant en sortie pour des analyses et des caractérisations biochimiques et biophysiques. Pour permettre de visualiser le tri en temps réel, à l'aide de la fluorescence, la puce est enfermée dans un support avec une fenêtre d'ouverture. L'écoulement est réalisé grâce à un contrôleur en pression commercialisé par la société Fluigent®. La figure 1.19 présente le banc expérimental permettant la réalisation d'une expérience de tri.

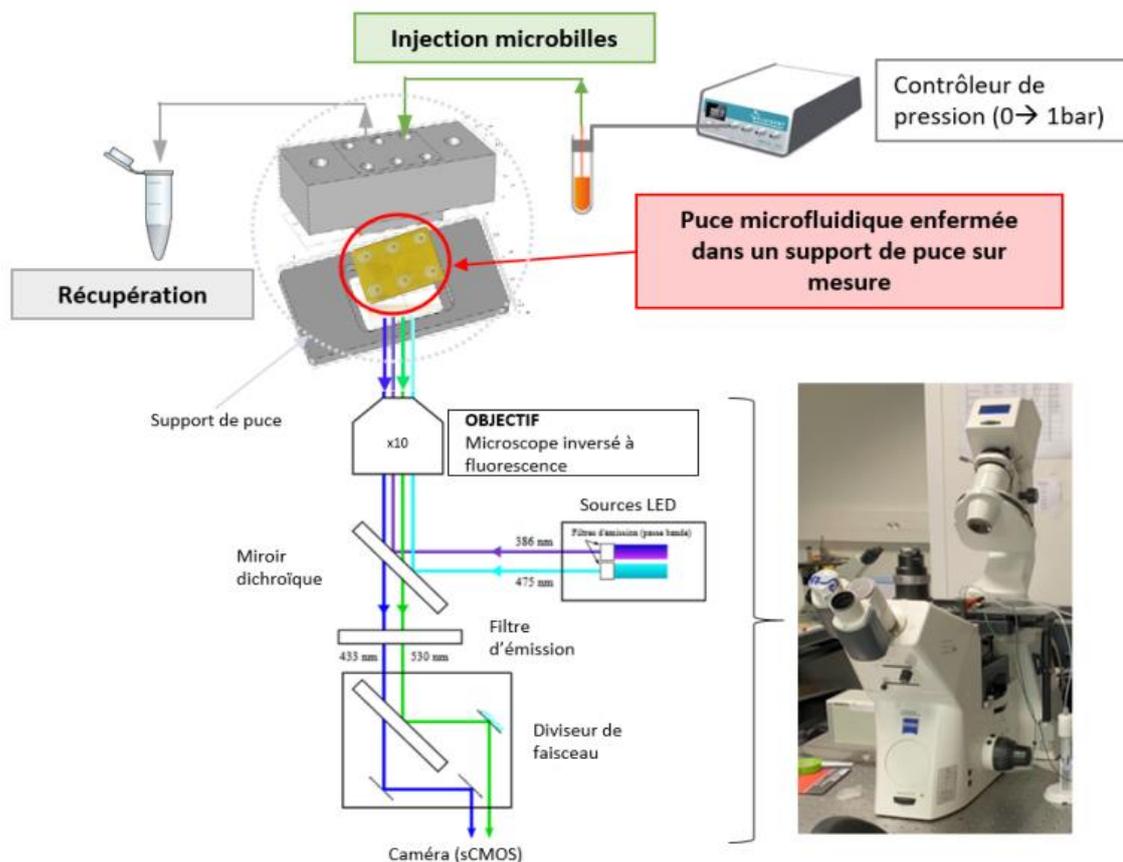


Fig. 1.19. Banc expérimental permettant de réaliser et de suivre l'expérience de tri (image issue de la thèse de L.Pillemont⁹³)

Pour valider le tri, nos partenaires ont eu besoin d'utiliser un modèle simple, qui puisse être suivi et contenant des particules dont les tailles se situent autour de la valeur de rayon critique (rayon critique de 350 nm, soit un diamètre de 700nm). Nous avons décidé d'utiliser un jeu de particules calibrant de différentes dimensions (480 et 920 nm de diamètre) comme première expérience concrète de tri (les caractéristiques de ces particules seront présentées dans le chapitre 2). Ces dernières ont été injectées initialement dans le dispositif comprenant 10 canaux latéraux et ayant une géométrie garantissant un seuil de coupure avec un rayon critique de 350 nm (soit un diamètre de 700 nm). La pression de départ est de 1 bar et doit être constante pour ne pas modifier les débits et donc les conditions de tri. L'échantillon est injecté à 10^8 particules/ml. Les résultats sont observés en temps réel par microscopie à fluorescence et montrent clairement que seules les particules ayant une taille inférieure à cette valeur de seuil de coupure, les particules de 480 nm, sont capables d'entrer dans les canaux latéraux au niveau de la jonction (figure 1.20).

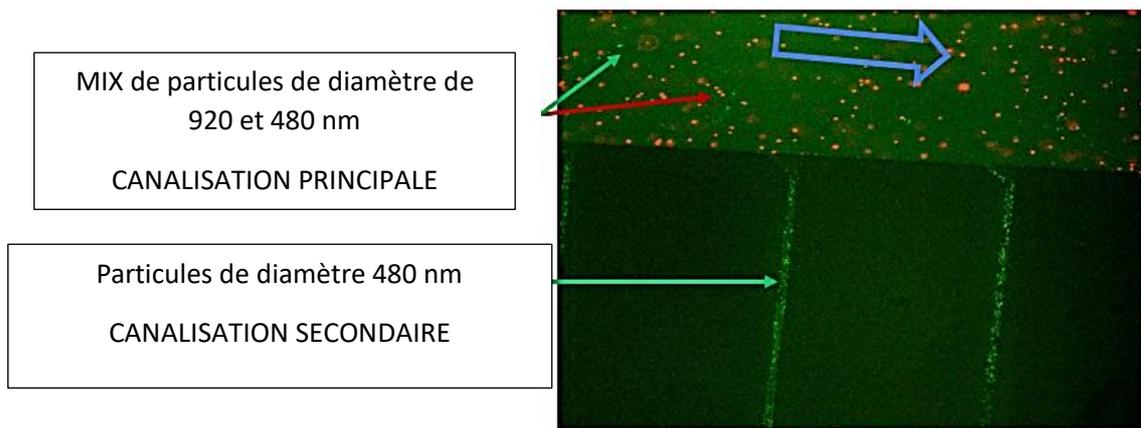


Fig. 1.20. Image de microscopie présentant le tri de particules de 480 et 920 nm dans le dispositif de tri avec 10 canaux latéraux dont les caractéristiques sont présentées dans le tableau 1.5.

L'image de la figure 1.20 montre que le tri de particules, en respectant le seuil de coupure, peut être effectué avec des particules submicrométriques ayant des tailles se situant au-dessus et en dessous de la valeur seuil (RC=350 nm, diamètre 700 nm). Le tri est réalisé en optimisant les conditions de pression aux différentes entrées, en lien avec le débit. Le choix de la géométrie des canaux, défini par simulation numérique, permettra de modifier la valeur de coupure. Au cours de ces travaux¹, Lyne Pillemont a modifié les dimensions du canal principal et des canaux secondaires afin que la puce de petite dimension puisse contenir tous les canaux et que la filtration soit améliorée au maximum⁹³. Le tableau 1.5 montre l'évolution des dimensions des canaux selon le nombre de canalisations latérales. Chaque canal latéral se succède le long de la canalisation principale. La canalisation L1 est la première et la plus éloignée de la sortie (donc celle qui aura la longueur la plus grande) alors que la dernière, la L100 sera la plus courte, car la plus proche de la sortie latérale. Les optimisations ont également permis d'augmenter les débits (atteignant 0,037 $\mu\text{l/s}$ pour la dernière version) ce qui permet de collecter 35 μl d'échantillon fractionné en 15 minutes en théorie contre 3h40 min pour les premières versions du dispositif.

¹ <http://www.theses.fr/2021TOU30168>

RC=350 nm	1 canalisation secondaire	10 canalisations secondaires	100 canalisations secondaires
Canalisation principale	100*300 μm	100*300 μm	100*110 μm
Canalisation secondaire	Section 10*100 μm (L1=4,72 cm)	Section 10*100 μm (L1=30,20 cm/ L10=4,72 cm)	Section 10*5 μm (L1= 7,59 cm/ L100=0,12 cm)
Débit théorique (pression de 1 bar)	0,00256 $\mu\text{l/s}$	0,023 $\mu\text{l/s}$	0,037 $\mu\text{l/s}$
Temps pour récupérer 35μl	3h40	20 min	15 min

Tab. 1.5. Présentation des dimensions des canaux latéraux dans différents cas (w : largeur, h : hauteur, L : longueur).

Cette première preuve de concept montre l'efficacité du tri pour des tailles de particules submicrométriques. Pour la suite des expériences, d'autres puces ont été fabriquées en salle blanche pour avoir un seuil de coupure adapté à nos particules calibrantes d'intérêts, décrites dans le chapitre 2, dont l'objectif est de diminuer les temps d'expériences et pour collecter un volume d'échantillon qui soit suffisamment important pour être injecté dans le module NBA. Les prochains modèles de dispositifs de tri montreront à la fois l'optimisation du dispositif et également les moyens mis en place pour la connexion du dispositif de tri avec le module d'immunocapture développé durant ma thèse. La caractérisation du tri a été réalisée en TRPS par suivi de la concentration entre la solution injectée et les concentrations des différentes fractions collectées.

Le dispositif mis en place est simple d'utilisation, à usage unique, permettant de fractionner un échantillon et pouvant être facilement couplé à un dispositif complémentaire, comme dans notre cas, pour permettre de réaliser le piégeage de particules d'intérêts parmi celles qui ont été triées, pour permettre un criblage important.

1.3.2 Tri par ondes acoustiques de surface stationnaire

En complément du dispositif de tri par filtration hydrodynamique, nous avons réalisé une étape de prétraitement basée sur une autre approche. Parmi tous les dispositifs existants et décrits dans la littérature, le tri de particules par onde acoustique stationnaire de surface a montré son intérêt dans différentes études comme nous l'avons présenté dans les méthodes innovantes (méthode passive, efficacité de séparation)⁸⁷⁻⁸⁹.

Nous avons développé et optimisé un dispositif microfluidique utilisant les ondes acoustiques stationnaires de surface, pour lequel j'ai participé aux développements (simulation et salle blanche) et participé à toutes les expériences. Ce travail n'a pu aboutir que grâce à nos collaborateurs Amar Chaalane, Rabah Zeggari, Abdelkrim Khelif et Mahmoud Addouche que j'ai accompagnés tout au long du projet. Ce dispositif utilise des ondes de surface d'une fréquence de 40 MHz, choisie sur la base de simulations réalisées par nos collègues et corrélées par la littérature. Les dimensions du canal microfluidique sont de $40\mu\text{m} \times 40\mu\text{m} \times 10\text{mm}$ (largeur, hauteur, longueur). Le système est composé de trois entrées et de trois sorties (une des entrées permet d'injecter l'échantillon et les deux autres permettent d'injecter le tampon de course), les différentes sorties récoltent chacune des fractions triées : soit une fraction comprenant les particules à récupérer soit le reste de la solution. La figure 1.21 présente le schéma du dispositif ainsi que le dispositif développé.

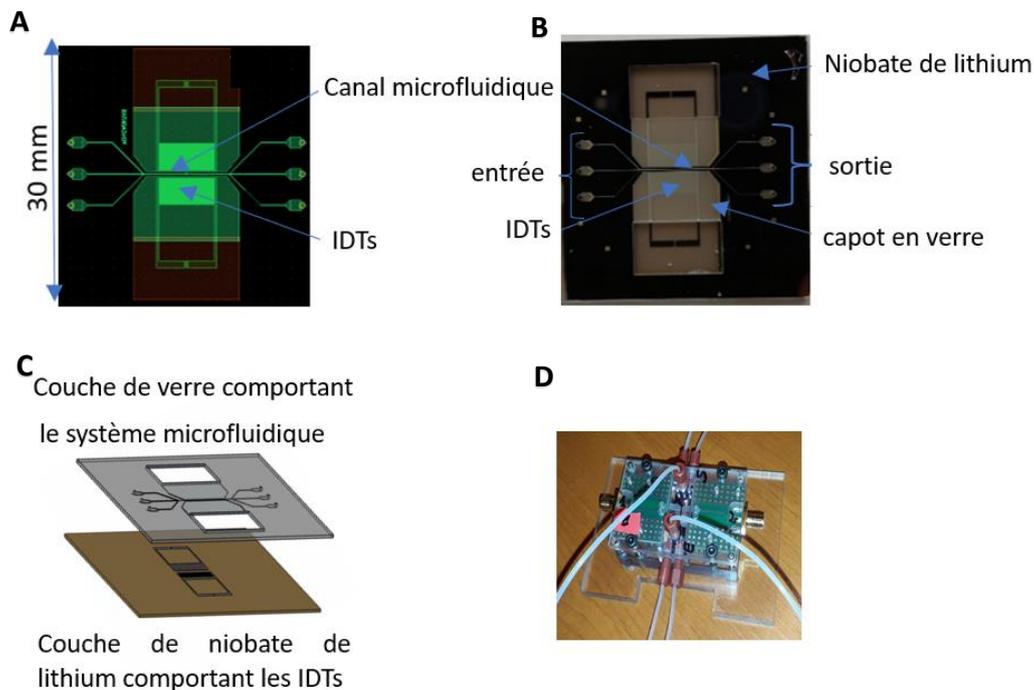


Fig. 1.21. Présentation du masque du dispositif en A° mais également une image réelle de la puce avant packaging en B°, présentation schématique du collage entre la couche de verre et celle de lithium de niobate en C° et image réelle après packaging du dispositif en D°.

La première étape, après la fabrication, est la caractérisation du dispositif en analysant le signal électrique correspondant au passage de l'onde traversant orthogonalement le canal, comme le montre la figure 1.22 autour de la valeur de 40MHz (valeur utilisée pour le dispositif) dans différentes conditions (en présence ou non de liquide).

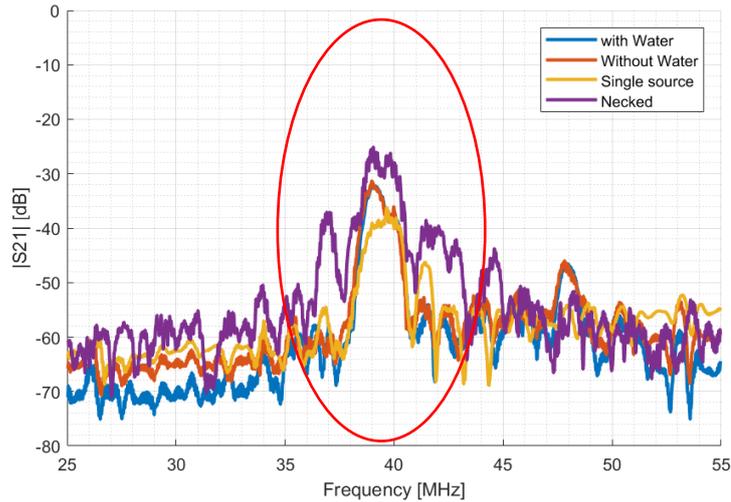


Fig. 1. 22. Caractérisations électriques du dispositif acoustique selon différentes conditions (en présence ou absence de liquide, puce avec ou sans son support). L'analyse se fait autour de la valeur de 40 MHz.

Après la validation des paramètres électriques, la seconde étape consiste à injecter un tampon de course (PBS 1X) afin de déterminer les conditions d'écoulements fluidiques adéquates (pression d'entrée, étanchéité fluidique, amortissement et/ou perturbation de propagation de l'onde). Les premiers résultats nous ont montré que notre gamme de pression en entrée se situe entre 5 et 20 mbar. Ces expériences ont pu être réalisées à l'aide du banc expérimental présenté en figure 1.23.

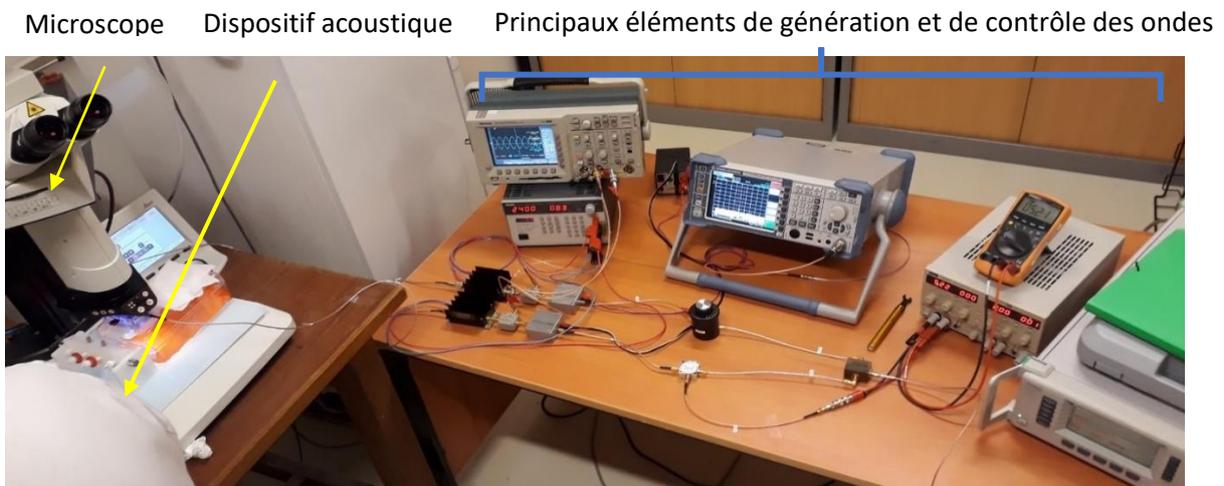


Fig. 1.23. Présentation du banc expérimental permettant l'observation et la réalisation de tri de particules par onde acoustique de surface.

Afin d'évaluer l'influence des ondes acoustiques sur les particules, notre première expérience a consisté à injecter des particules fluorescentes de 480 nm de diamètre et de les détecter avec un

microscope à fluorescence AXIO de la compagnie ZEISS pour déterminer les paramètres acoustiques (phase, puissance) adaptés aux expériences de tri. La figure 1.24 présente les premiers résultats qui permettent d'influencer la trajectoire de ces particules et de les guider vers les différentes sorties.

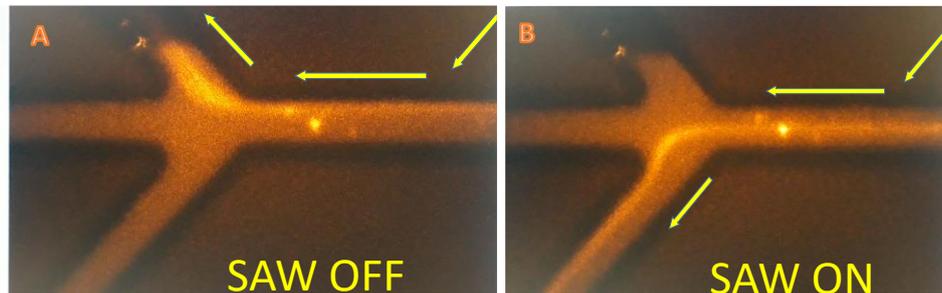


Fig. 1.24. Présentation d'une expérience de déviation des particules de 480 nm vers une sortie sans utilisation des ondes acoustiques à 40 MHz en A° ou avec les ondes acoustiques en B° (avec différents paramètres de puissance).

À partir de ces résultats, nous démontrons l'impact des ondes acoustiques stationnaires sur des particules de 480 nm de diamètre et la capacité du dispositif à collecter ces particules précisément dans l'une des sorties.

Bilan des techniques innovantes

Sur la base de la recherche bibliographique de méthodes innovantes de tri par la taille, nous avons pu mettre en évidence les techniques les plus performantes dans le cadre du prétraitement d'échantillons complexe comprenant les EVs. L'objectif de ce travail est de pouvoir réaliser un dispositif de tri qui soit innovant et qui répond aux cahiers des charges des besoins analytiques des EVs : éliminer le plus de contaminants (cellules, larges vésicules) et permettre de réaliser des étapes d'immunocapture avec un échantillon qui soit simplifié. Les techniques utilisées pour séparer l'échantillon selon la taille reposent sur les principes de microfiltration simples, microfiltrations couplées à un champ électrique ou avec des nanopilliers, les effets viscoélastiques, le déplacement latéral déterministe, les ondes acoustiques et la filtration hydrodynamique. Comme nous avons pu le voir dans les deux dernières parties, nous avons développé (avec nos partenaires) des dispositifs qui sont basés sur la filtration hydrodynamique et les ondes acoustiques de surface. Le tableau 1.6 récapitule les propriétés de chacun de ces dispositifs innovants :

Nom (réf)	Principe d'isolation	Débit en $\mu\text{l}/\text{min}$	Volume récupéré après tri en μl	Rendement	Principale action	Limitations	Taille des particules triée (nm)
Liu et al, 2017 (74)	Microfiltration	83	10-100	90%	Filtre en série pour la séparation en sous-population (30 à 200 nm)	Bouchage/ séparation uniquement par taille	30 à 100
Liang et al, 2017 (75)	Microfiltration	40	8 000	74%	Séparation par la taille (30 à 200 nm)	Bouchage/ séparation uniquement par taille	30 à 200
Ibsen et al, 2017 (77)	Microfiltration couplée à un champ électrique	2	30	NA	Séparation par taille et propriété champs électriques	Manque de spécificité	50 à 150
Wang et al, 2013 (78)	Microfiltration avec des réseaux de micropilier de taille fixe	10	100	60%	Séparation par la taille	Présence de nombreux contaminants	80 à 120
Santana et al, 2014 (80)	DLD avec des obstacles	NA	NA	NA	Isolation selon la taille	Uniquement séparation par taille /présence d'obstacle	30-200
Liu et al, 2017 (79)	Séparation viscoélastique en présence de PEO (0,1%)	3	100	93%	Séparation par taille sous les 200 nm	Manque de spécificité, besoin de coupler à d'autres techniques	<200
Lee et al, 2015 (88)	Tri de particule en exploitant les ondes acoustiques de surface	15	10	80%	Méthode passive, séparation par taille, densité et biocompatible	Lithographie complexe	<200
Filtration hydrodynamique (LAAS)	Tri passif selon le seuil de coupure	2	35 (15 min)	Proche de 100%	Méthode passive, séparation par taille, densité et biocompatible	Volume collecté en sortie faible	Modulable selon la géométrie (objectif final 100 nm)
Tri par onde acoustique de surface (FEMTO-ST)	Tri de particule en exploitant les ondes acoustiques de surface	2 à 20	NA	A déterminer	Méthode passive, séparation par taille, densité et biocompatible	Lithographie complexe	Modulable selon les paramètres appliqués

Tab. 1.6. Bilan des caractéristiques des méthodes de séparation de particules (NA non communiqué).

Les avancées de ces dispositifs sont très importantes :

- Les débits permettent de réaliser des expériences rapides (en moins d'une heure)
- Le tri entre sous-populations d'EVs est un objectif réalisable
- Les technologies permettent d'observer des rendements de tri importants par rapport aux méthodes usuelles (proche de 100 %, rendement déterminé par calcul du rapport entre la concentration finale et la concentration initiale)
- Les volumes d'échantillons sont faibles (quelques μl de solution initiale à diluer), mais suffisants pour réaliser les expériences sans perdre le matériel biologique précieux

Toutes ces techniques montrent des avancées significatives. Néanmoins, il est important de préciser le besoin de coupler ces étapes de prétraitement avec un module complémentaire de piégeage pour mettre en avant les caractéristiques des particules triées et de retrouver des informations utiles sur les EVs, notamment la possibilité de détecter des sous-populations informatives de pathologies. En effet, basés sur les recommandations de la société ISEV, plusieurs dispositifs intégrés couplant plusieurs opérations ont été développés. Jeong et al⁹⁵ ont couplé le tri magnétique avec une détection électrochimique, Karabacak et al⁹⁶ ont couplé deux méthodes de séparations basées sur la DLD et la magnétophorèse. Enfin, Taller et al⁹¹ ont développé un dispositif de tri par onde acoustique couplé à une lyse permettant de caractériser le cargo moléculaire comme le montre la figure 1.25 :

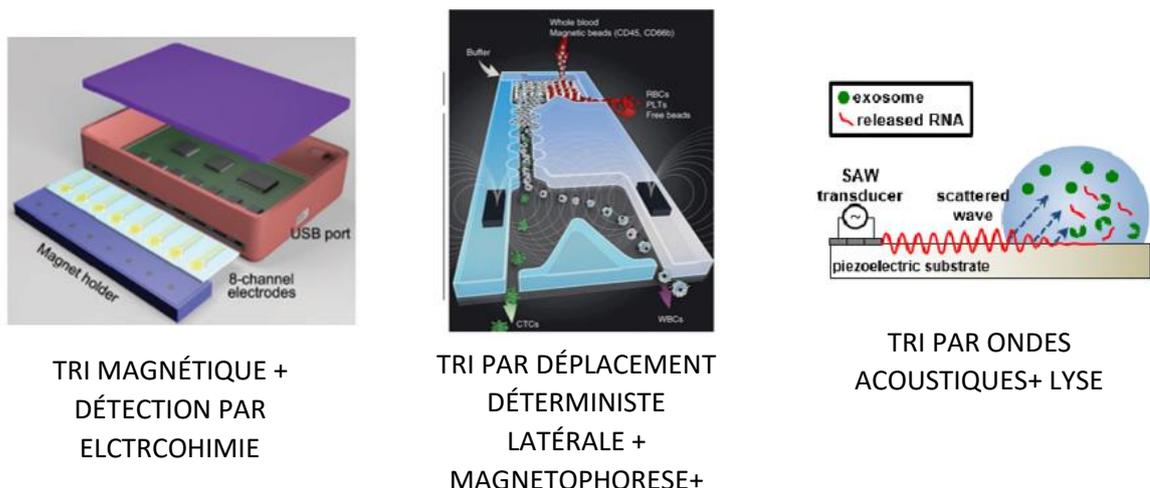


Fig. 1.25. Présentation des approches innovantes couplant plusieurs opérations dans un même dispositif intégré. En A° couplage entre le tri magnétique et la détection par électrochimie. En B° couplage entre la DLD et la magnétophorèse et en C° couplage entre les ondes acoustiques et la lyse.

Sur la base de ces recommandations, dans le cadre du projet MADNESS, nous avons couplé le dispositif basé sur la filtration hydrodynamique et un module d'immunocapture (solution MADNESS du chapitre 4), comme le montre la figure 1.26 :

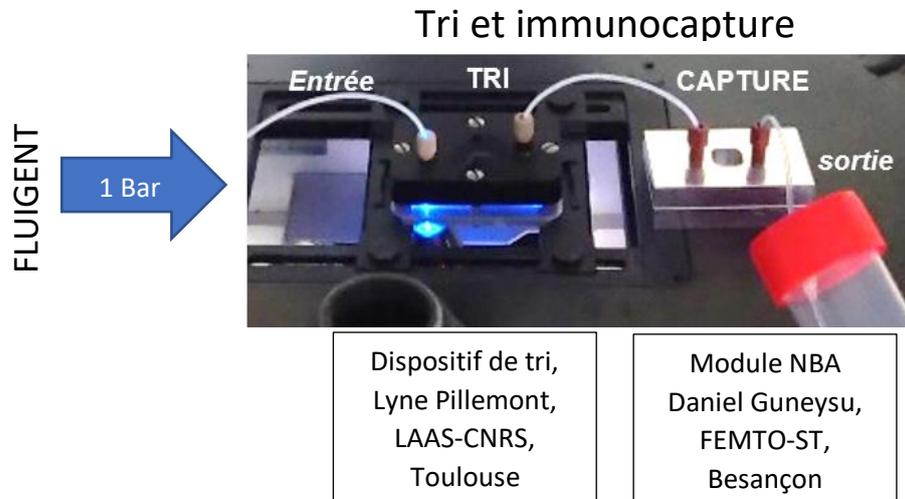


Fig. 1.26. Présentation de l'approche microfluidique couplant une étape de tri par taille et un module d'immunocapture (<https://anr.fr/Projet-ANR-17-CE09-0025>)

Conclusion.

Des techniques de caractérisation telles que la cytométrie en flux, la NTA, l'AFM, la SPRI, la microscopie électronique ont été utilisées pour caractériser les EVs, qui sont de potentiels futurs biomarqueurs de nombreuses pathologies. Chacune de ces techniques est malheureusement influencée par l'échantillon de départ et le mode d'isolement des EVs. Il n'existe pas de technique idéale pour isoler les EVs, à la fois avec une forte sensibilité et une forte sélectivité. L'ultracentrifugation, les techniques de filtration, la technique de chromatographie d'exclusion stérique et les techniques de chromatographie d'affinité ont été utilisées et toutes ont présenté des limitations importantes. Des techniques innovantes de séparation ont été mises en place pour pallier les méthodes existantes. Ces techniques ingénieuses, telles que le tri acoustique, la filtration, la DLD et la filtration hydrodynamique ont montré des performances réelles. Pour valider les méthodes, il faut qu'elles soient confrontées à tout un ensemble d'échantillons, et que ces techniques soient reproductibles entre les laboratoires.

Avec nos partenaires, nous avons développé deux dispositifs de tri de particules qui répondent aux exigences de séparation et d'enrichissement des échantillons en EVs. Un tri par filtration hydrodynamique (projet MADNESS réalisé à Toulouse, dans le cadre de la thèse de Lyne Pillemon⁹³) et un tri par ondes acoustiques de surface (réalisé à Besançon avec l'aide de nos collègues)⁹². Nous avons montré que le tri de particules était efficace pour le tri par filtration hydrodynamique, avec des particules synthétiques biofonctionnalisées que nous décrirons dans le chapitre 2, et nous avons pu montrer une preuve de concept de tri par acoustofluidique. En effet, le dispositif de tri par onde acoustique est capable de modifier la trajectoire d'une particule de 480 nm vers une sortie déterminée en modifiant les paramètres de l'onde acoustique. Le dispositif de tri par filtration hydrodynamique est lui capable de trier des particules de 920 nm et de 480 nm, en permettant la collection en sortie latérale d'une fraction contenant exclusivement les particules de 480 nm. Ces techniques séparatives sont basées sur des paramètres physiques telles que la dimension, le volume hydrodynamique ... ce qui n'est pas suffisante pour la caractérisation des particules recherchées. Le couplage à un module de piégeage sélectif pourra grandement augmenter la spécificité. Pour prouver que le tri et l'immunocapture sont efficaces, plusieurs modèles de particules biofonctionnalisées ont été développés dans le cadre de cette thèse et ont servi à la fois de calibrant et de modèle biomimétique (Chapitre II) pour valider tous les dispositifs du projet.

Chapitre 2 : Développement de calibrants biomimétiques submicrométriques.

Dans la plupart des processus analytiques, l'utilisation de contrôles et/ou de calibrants internes est nécessaire afin de certifier l'exactitude et la précision des mesures⁹⁷. Dans ce travail, consistant à développer un module d'immunocapture dépourvu d'éléments de transduction permettant des mesures en temps réel, il apparaît nécessaire de développer des calibrants mimant les vésicules extracellulaires. Nous avons utilisé différents jeux de particules synthétiques et procédé à leurs bio-fonctionnalisations.

En effet, les particules submicrométriques ont pris une place importante dans les applications biomédicales, notamment dans le rôle de système de délivrance du médicament, de diagnostic, dans des processus d'immunocapture et d'imagerie médicale⁹⁸. Notre travail portera sur l'utilisation de ces particules dans les microsystèmes et le domaine médical. En effet, pour qualifier les performances de notre module de capture, en termes de gamme dynamique, de limite de détection, et de spécificité de capture, il nous faut mettre en place un modèle. Pour cela, les candidats idéaux sont des particules qui ont des tailles inférieures aux micromètres : leurs dimensions submicrométriques ainsi que leurs propriétés (réactivité, modification de surface, charge) permettent la création de matériaux inédits pour les manier dans des applications nouvelles. De plus ces particules, synthétiques présentant des formes et des tailles qui sont maîtrisées, se trouvent dans la gamme des tailles des particules biologiques visées dans notre étude.

La communauté scientifique travaillant dans le domaine des EVs ne dispose pas de nombreux modèles de substitution, même si beaucoup de groupes travaillent sur le développement de ce type de modèle (nous pouvons par exemple citer les travaux d'An Hendrix⁹⁹ qui développent des EVs recombinants, qui sont totalement maîtrisés et qui sont co-injectés dans la solution d'intérêt pour servir de matériel de référence, figure 2.1). Pour la mise au point de méthodes préanalytiques et analytiques, ceci engendre des limites et des difficultés pour la validation de méthodes génériques tant le matériel biologique initial peut varier d'une étude à une autre. La mise en place de projet majeur (METVES II)¹⁰⁰ qui vise en partie à mettre en place le modèle idéal et à le diffuser est déjà en cours d'élaboration. Mais le choix et la validation finale du/des modèles ne se fera qu'après une étude complète et extrêmement longue.

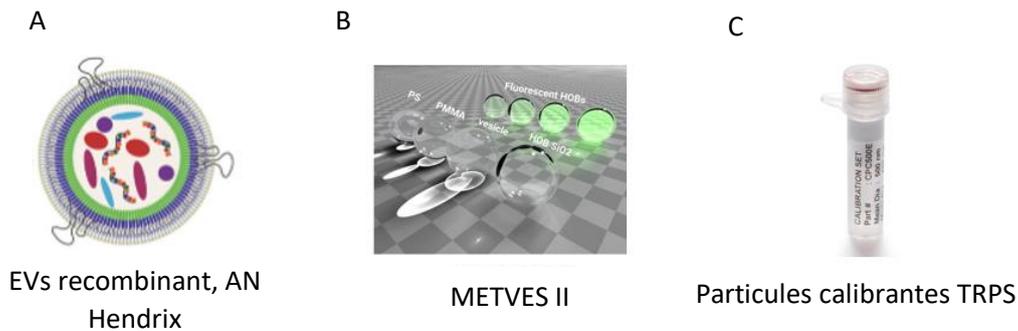


Fig. 2.1. Présentations des différents modèles de substitutions en cours d'élaboration. En A° EVs recombinant, en B° particules synthétiques du projet METVES II et en C° calibrant TRPS.

Cette absence de matériel de référence dans le domaine des EVs nous a poussés à développer nos propres calibrants qui seront additionnés à l'échantillon biologique et piégés sur la biopuce selon des procédés de bioreconnaissances équivalents aux EVs. Ces calibrants serviront de substituts/modèles de première approche pour déterminer les conditions de fonctionnement du dispositif de capture puis comme calibrants internes de la mesure. Les paramètres physico-biochimiques de ces particules ainsi que leur dosage permettront d'évaluer avec précision les performances analytiques d'immuno-capture du module par rapport aux gold standard de notre laboratoire (la technique SPRI). La simplicité des modèles conjuguée à leurs stabilités en solution permettra, lors des phases de développement, de limiter le caractère « variabilité du vivant » des EVs. Dans notre projet, nous réaliserons la bio-ingénierie de plusieurs particules de diamètres allant de 140 à 920 nm, grâce à leur bio-fonctionnalisation par des protéines modèles (ovalbumine - ou OVA et caséine - ou CAS) afin de permettre leurs immunocaptures par les anticorps (anti-OVA et anti-CAS). Il faut rappeler que dans des travaux précédents du groupe⁹ ont été développés des calibrants de type particules virales de 50 nm et des particules synthétiques de 920 nm biofonctionnalisées. Ici, nous avons utilisé des particules dont la taille se trouve entre ces deux valeurs, qui sont fonctionnalisables grâce à la présence de fonctions chimiques terminales libres et qui ont une disponibilité importante.

Afin de caractériser ces particules qui ont des tailles inférieures aux microns, un ensemble de techniques sensibles, résolutive et à la pointe de la technologie sont actuellement disponibles. Nous décrivons dans ce chapitre, les techniques qui seront utilisées dans nos expériences de qualification de ces particules.

La partie principale de ce chapitre concernera la présentation des données issues de la biofonctionnalisation des particules :

- Le protocole de fonctionnalisation détaillé, les problématiques rencontrées, son évolution ainsi que l'accent sur les étapes clés

- La caractérisation en taille et en concentration des différents lots de particules biofonctionnalisées (par TRPS et dosage protéique),
- Les expériences d'immunocapture sur biopuce pour déterminer les interactions avec les anticorps permettant la capture avec les protéines de surface (par SPRI), en notant qu'il s'agit de l'étape clé pour déterminer si le lot de particules est validé
- Une caractérisation fine des objets capturés à l'aide de techniques microscopiques, dont l'AFM.

L'ensemble des informations nous a permis de mettre en place nos particules que nous nommerons NPXXX-YYY (X correspondant à la taille des objets et Y à l'abréviation de la protéine greffée en surface de la particule).

À travers ces étapes de fonctionnalisation et de caractérisations, nous ambitionnons d'alimenter le projet MADNESS en particules calibrantes hautement qualifiées et prêtes à l'emploi pour valider les étapes de tri et de détection.

2.1 Définition, applications biomédicales et contexte d'utilisation dans nos travaux

Les particules submicrométriques ont des tailles inférieures au micromètre avec des propriétés différentes à ces échelles par rapport à des matériaux de même composition de dimension supérieure ($>\mu\text{m}$). En effet, l'utilisation de matériaux de dimensions sub-micrométriques contrairement à ceux macrométriques, permet d'augmenter le ratio surface/volume¹⁰¹⁻¹⁰⁴, pour la même quantité d'atomes, les échanges avec le milieu ont une place plus importante à travers des interactions plus nombreuses entre la surface des particules et le milieu environnant (le fait d'avoir un grand bloc volumique cache la majeure partie des atomes). Ceci permet d'augmenter les fonctions et les champs applicatifs, notamment dans le domaine biomédical¹⁰⁵. Par exemple, prenons le cas de l'or, nous savons que c'est un métal, peu réactif en comparaison des autres métaux, mais les nanoparticules d'or ont la capacité de réagir différemment d'un point de vue chimique dans les solutions colloïdales¹⁰⁶.

Leurs propriétés sont inhérentes à leurs **tailles**, leurs **formes**, leurs **charges** et le choix de la **fonctionnalisation** de leurs surfaces¹⁰⁷⁻¹⁰⁹. En effet, leurs tailles submicrométriques leur permettent de passer plusieurs barrières naturelles (la membrane plasmique, nucléaire ou encore la barrière hématoencéphalique)¹¹⁰. Leurs formes peuvent également être déterminantes pour le franchissement de ces barrières et influencer ainsi les cinétiques d'internalisations¹¹¹. Les charges de surface jouent un rôle clé dans les mécanismes d'interactions entre les nano-objets et le « vivant » et contribuent à moduler leur furtivité ou leur fonction au sein des cellules, des tissus et des organismes. Enfin, il est possible de fonctionnaliser ces particules en utilisant des groupements chimiques constitutifs des matériaux ou de procéder à des étapes de fonctionnalisation (utilisation des SAMs, modification biochimique...)^{112,113}. Cet apport de nouvelles propriétés et fonctions¹¹⁴ ouvre la voie à des étapes de biofonctionnalisation par diverses macromolécules biologiques (récepteurs protéiques, enzyme, anticorps) qui permettront de former des couplages et des liaisons à façon vis-à-vis d'une cible.

Dans le choix d'alternative aux EVs, pour mettre en place une méthode analytique, nous avons listé plusieurs propriétés clés que devra posséder le matériau substitutif des EVs. Ces propriétés sont présentées dans la figure 2.2 La particule submicrométrique idéale mimant les EVs posséderait l'ensemble de ces propriétés ou caractéristiques.

Nous tacherons dans ce chapitre, de développer un modèle regroupant un maximum de ces caractéristiques :

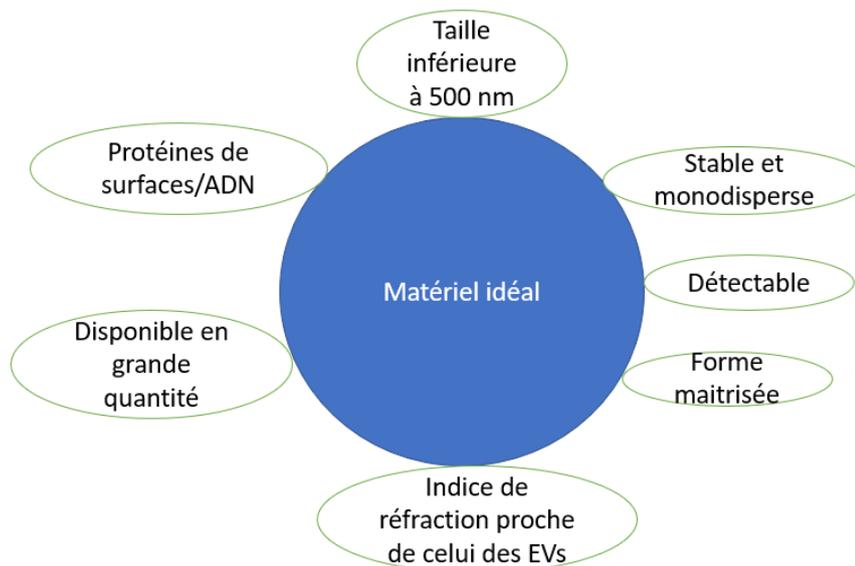


Fig. 2.2. Schéma basé sur une figure de « *Biological reference materials for extracellular vesicle studies* » montrant le Cahier des charges d'un calibrant idéal pour les EVs¹¹⁵

Dans cette démarche de conception et de fabrication de nouvelles particules calibrantes, il s'agira néanmoins d'être vigilant sur des problèmes de stabilité tels que les états d'agglomération/d'agrégation, la sédimentation durant le stockage ou en condition d'utilisation pouvant engendrer des erreurs de quantification¹¹⁶. Il faudra également s'assurer du maintien des fonctions biologiques et du caractère biomimétique dans le temps¹¹⁷. Ces propriétés et leur durabilité pourront être modulées par le contrôle de différents paramètres comme le pH, la force ionique, la charge de surface¹¹⁷.

Il est aussi important de maîtriser la réactivité de ces particules entre elles et de prévenir des agrégats ou agglomérats. Il est crucial de limiter, ou maîtriser, par exemple, leur interaction avec le milieu biologique dans lequel elles évoluent. Ainsi des étapes de passivation de la surface à l'aide de molécules et de macromolécules (protéines, polymères tels que les PEGs)¹¹⁸ limitent les interactions non spécifiques sans bloquer les fonctions désirées. Le domaine de la nanomédecine rencontre un essor considérable depuis deux décennies en particulier grâce aux apports majeurs des nanoparticules dans différents domaines. La figure 2.3 récapitule les applications les plus communes pour l'utilisation des particules :

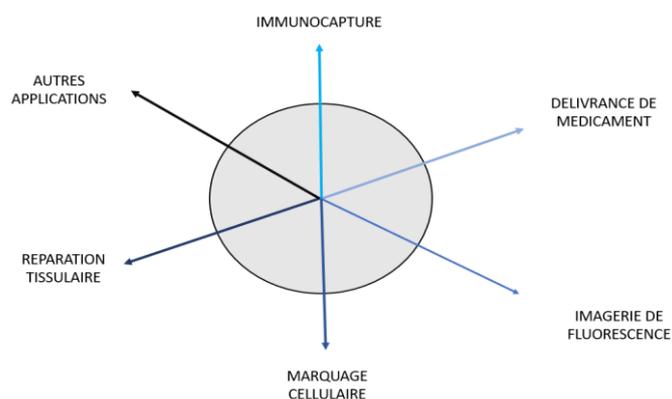


Fig. 2.3. Présentation de différentes applications des particules submicrométriques et nanométriques

La **délivrance de médicament**¹¹⁹⁻¹²¹ nécessite une vectorisation qui peut être assurée ou favorisée par les nanoparticules. Celles-ci peuvent favoriser l'efficacité de ciblage et d'adressage de principes actifs. Les avantages majeurs de cette technique sont la limitation des effets secondaires, en comparaison avec les modes d'administration classique, ainsi que l'accroissement de leurs efficacités (de nombreux systèmes de délivrance sont dans des phases d'essais cliniques ou sont commercialisés/ex : Abraxane, doxil¹²²).

Le **marquage cellulaire**¹²³ (et subcellulaire) est une technique qui fait appel aux nanoparticules en favorisant l'observation, à partir d'une interaction spécifique avec les cellules, les éléments d'intérêt ou les organites associés. Des informations biochimiques sont ainsi obtenues ainsi que la compréhension de mécanismes réactionnels. Cela permet d'associer des techniques d'imagerie in situ, mais également d'envisager le piégeage d'entités cellulaires dans une optique de tri/**séparation**¹²⁴. Sur le même modèle, des tests d'**immunoassays**¹²⁵ sont réalisés grâce aux particules. De cette manière, un couplage à de l'imagerie optique/fluorescente ou de l'imagerie par résonance magnétique permet de **visualiser** des éléments impossibles à détecter autrement.

Dans le champ des microsystèmes, la notion de **capteur** est importante, car elle se réfère à de nouvelles méthodes analytiques. Les nanoparticules peuvent à la fois contribuer à une amélioration des techniques de transduction¹²⁶⁻¹²⁸ mais également en contribuant à des révélations de faibles signaux par amplification du signal dans des approches de type sandwich¹²⁹.

Dans le milieu biomédical, et notamment en chirurgie, les particules sont des outils informatifs et thérapeutiques puissants, par exemple dans le cadre de l'**hyperthermie**¹³⁰ : les particules sont faites d'un matériau, qui peuvent à la fois cibler une tumeur et libérer de la chaleur ce qui va permettre de les éliminer. Il est également possible de les utiliser dans le cadre de la **réparation tissulaire**¹³¹ en les manipulant comme bloc de base pour la réparation d'un tissu qui serait détruit et dans l'incapacité de se régénérer seul. La **magnétofection**¹³² consiste à utiliser de la magnétisation pour des modifications

génétiques, dans le cadre de recherche en amont. D'autres applications sont en cours de développement, comme dans notre cas (développement de matériaux de référence¹¹⁵ en tant que modèle de base) et seront utilisés dans un futur proche.

Au cours du travail de thèse, nous devons adresser simultanément deux problématiques principales pour atteindre nos objectifs :

- Concevoir un calibrant synthétique (ou identifier une ressource biologique) qui puisse servir de matériel de référence des EVs et d'approvisionnement facilité,
- Sélectionner un échantillon biologique servant de modèle (qui nous servira de preuve de concept pour valider notre dispositif).

En effet, récemment des projets de standardisations et de recherche de modèles de références ont été développés permettant de travailler sur la standardisation des expériences d'analyses des EVs (METVES II)¹⁰⁰. Le manque de standardisation et de matériaux de référence entraîne une mauvaise interprétation des résultats d'analyse des EVs (les causes sont l'hétérogénéité en propriétés des EVs, le manque de données fiables concernant leurs propriétés, la variabilité d'un échantillon biologique selon l'état physiopathologique du patient, les paramètres inadaptés des appareils pour ce type d'échantillon)¹³³.

La calibration par les nanoparticules est également un enjeu majeur car elle permettra de fiabiliser les résultats d'immunocapture du module NBA en apportant un outil de référence qui servira de base pour l'interprétation des résultats¹³⁴⁻¹³⁶.

2.2 Techniques usuelles de caractérisation des particules submicrométriques : combinaison de techniques de caractérisation.

Dans le premier chapitre, nous avons décrit certaines méthodes de caractérisation des EVs, qui sont également utilisées dans le cadre des liposomes et des particules organiques/inorganiques (chapitre 1 page 22). Basés à la fois sur les appareils disponibles dans notre plateforme et sur les objectifs analytiques, nous avons mis en place un banc expérimental de caractérisation comme décrit dans la figure 2.4 et comprenant les techniques suivantes :

- La TRPS pour estimer la taille et la concentration des particules
- Le dosage protéique μ BCA pour déterminer la quantité de protéines greffées sur la surface des particules.

- La SPRi pour vérifier les propriétés de biorecognition par immunocapture des calibrants et évaluer les paramètres cinétiques (association et dissociation) selon la concentration, le débit....
- L'AFM pour la quantification des particules par unité de surface et leur caractérisation morphologique.

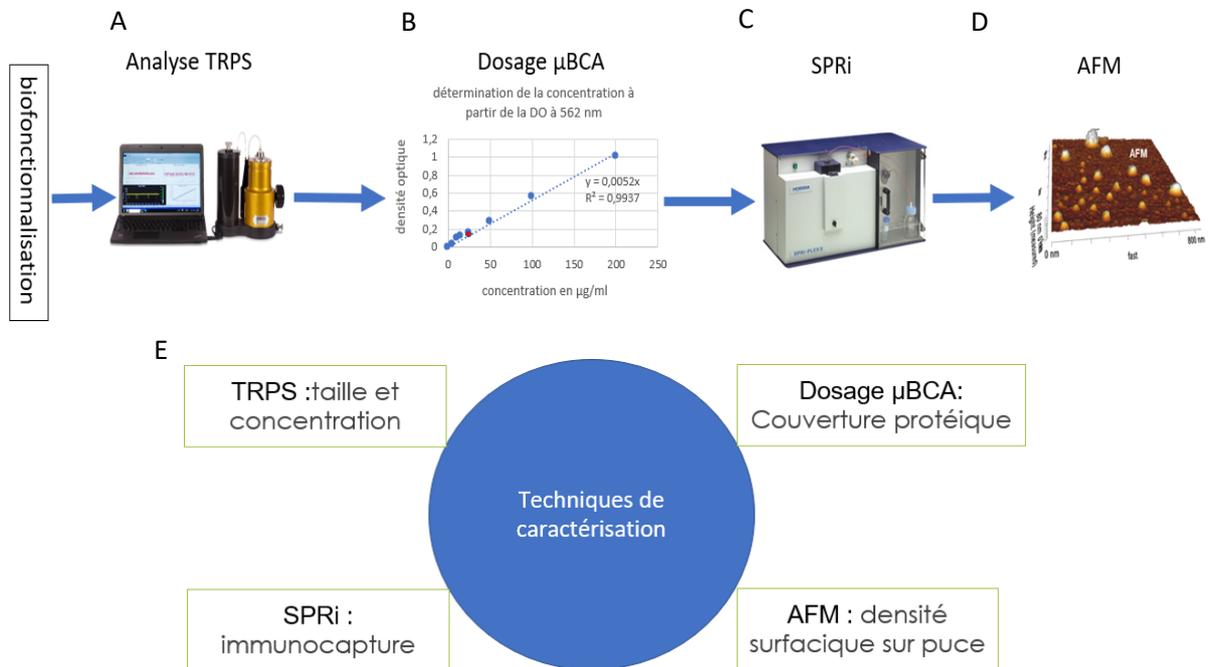


Fig. 2.4. Présentation des techniques employées dans le cadre de la thèse pour caractériser les particules : en A° la TRPS (IZON®)¹³⁷, en B° un dosage μ BCA (Thermo®), en C° le SPRi (Horiba®), en D° le système JPK nanowizard III (JPK/Bruker®) et en E° paramètres déterminés selon la technique de caractérisation.

Les différentes étapes de caractérisation utilisées dans le cadre du développement de nos calibrant sont décrits plus en détail dans la section suivante.

TRPS

La première étape consiste à réaliser une analyse en taille et en concentration des particules, après la biofonctionnalisation, par **TRPS**. L'appareil, figure 2.5 A, est composé de plusieurs éléments, à savoir une chambre d'injection de l'échantillon, une jauge pour appliquer la pression et un nanopore qui est une membrane polymérique avec un nanopore de taille variable au centre (paramètre de stretch) qui va être positionné sur la partie supérieure de la cellule analytique de l'appareil. Une fois que la membrane est fixée sur la cellule, figure 2.5 B, deux compartiments sont créés : la partie supérieure et la partie inférieure. La communication entre les deux parties se fait au travers du

nanopore par lequel les solutions s'écoulent sous une pression appliquée. Une solution tampon conductrice va être injectée au-dessus et en dessous de cette membrane. Lors de la première phase de conditionnement, la circulation du tampon de course va permettre d'établir un équilibre électrique (nous pourrions modifier ce paramètre en modifiant le voltage) : après cela, nous pouvons remplacer la solution tampon au-dessus de la membrane par la solution d'intérêt (en appliquant les bons paramètres de tension et le stretch) et appliquer une pression pour faire circuler la solution à travers le pore. Chaque passage de particules va entraîner une perturbation du signal du courant qui sera proportionnel à la taille (amplitude) et à la concentration (fréquence) des particules qui vont traverser. L'expérience se déroule jusqu'à ce que 500 particules soient comptabilisées sous condition de stabilité de la ligne de base. Les données brutes sont enregistrées dans le logiciel et l'expérience est reproduite dans les conditions similaires avec l'échantillon de calibrants. L'analyse des données brutes, en fin d'expérience, en comparaison avec celle du calibrant vont définir les résultats et permettre de déterminer la concentration, la taille moyenne et le mode pendant ce passage, représentatif de la solution injectée.

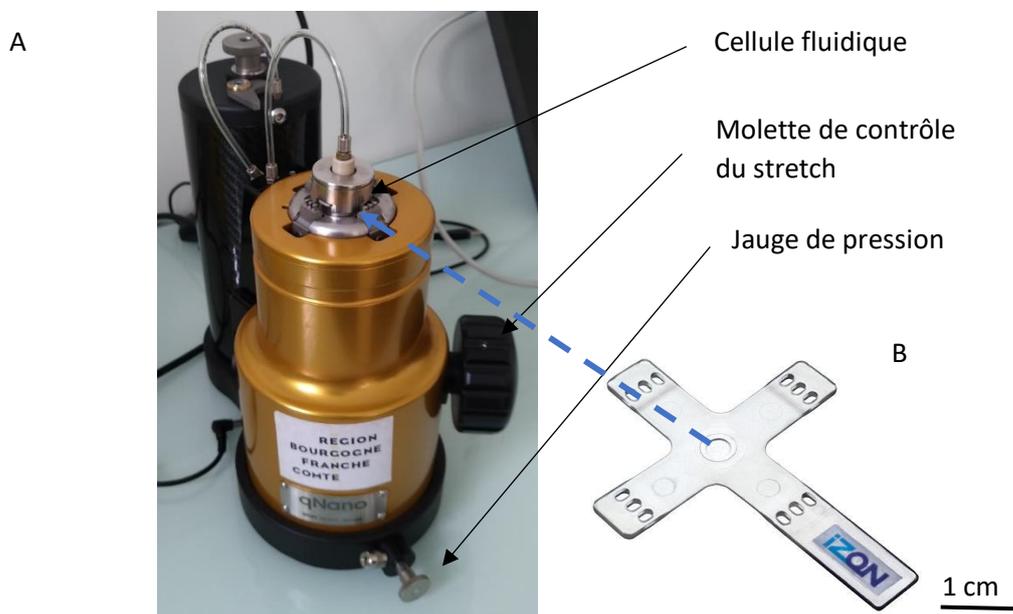


Fig. 2.5. En A° photo de la TRPS avec la présentation des différents éléments et en B° présentation d'un nanopore, pièce principale permettant la réalisation de l'expérience.

Dosage μ BCA

Une fois que la concentration en particules et la taille sont déterminées, un **dosage protéique par μ BCA** (BiCinchoninic acid Assay) va conduire à la détermination de la concentration en protéine des nanoparticules biofonctionnalisées. Il s'agit d'un dosage protéique BCA avec un temps d'incubation plus long pour permettre d'augmenter la sensibilité de la méthode. Le dosage est basé sur la réaction

des protéines de l'échantillon avec l'acide bichromique qui entraîne une réduction du Cuivre II en Cuivre I produisant un changement de couleur observable à 562 nm (les protéines vont réagir avec le Cuivre $^{2+}$ ce qui va libérer un ion Cu^+ réagissant avec le BCA entraînant un changement de couleur détectable). La réponse obtenue est quantitative et proportionnelle à la concentration en protéine dans la solution. La technique de μ BCA qui consiste à chauffer le mélange à 60°C pendant une heure permet d'améliorer la limite de détection (environ 1 μ g/ml de protéine détectable).

À ce stade, la première phase de qualification dite préanalytique est terminée : la combinaison de la TRPS et du dosage μ BCA va entraîner la vérification de la taille, de la concentration en NPs et de la quantité de protéine greffée en surface des NPs.

Il faut ensuite déterminer,

- Si les particules sont fonctionnelles et peuvent être immunocapturées ? Réagissent-elles spécifiquement avec les anticorps permettant de les capturer à l'aide des protéines qu'elles ont en surface ?
- Si des interactions non spécifiques se produisent ?

Pour cela, les étapes d'immunocapture et d'imagerie vont être employées. Il faut comprendre que les réactions d'immunocapture seront les étapes déterminantes pour valider un lot de particules. Une immunocapture qui ne serait pas spécifique et dans la gamme de valeur attendue rejeterait le lot. La phase suivante est décrite comme suit :

SPRi

la technique **SPRi**¹³⁸ est une technique optique permettant la détection de particules sans marquages par immunocapture. Il s'agit de l'une des techniques de la plateforme NBA¹³⁹. La technique a été de nombreuses fois décrite dans les thèses des doctorants du laboratoire^{9,138}. Brièvement, La SPRi est une méthode de transduction optique qui permet de suivre les plasmons de surface qui sont générés sur une fine couche métallique à l'interface avec un milieu diélectrique. Observé pour la première fois par le physicien Wood¹⁴⁰, Fano¹⁴¹ a démontré en 1941 que les observations de Wood correspondaient à des ondes de surface. À partir de ce phénomène physique, une technique d'étude des interactions biomoléculaires a été développée à l'université de Linköping (Suède) dans les années 1980¹⁴² pour analyser les interactions biomoléculaires comme les interactions protéines/ADN. Cette expérience est réalisée sans marquage et en temps réel¹⁴³. Plusieurs configurations optiques permettent de réaliser l'expérience, dans notre cas, la configuration de Kretschmann est utilisée. Un faisceau de lumière dans le rouge (faisceau laser à 810 nm) est émis selon un certain angle d'incidence et traverse un prisme jusqu'à atteindre la surface de la puce (recouverte d'une fine couche d'or). Cette

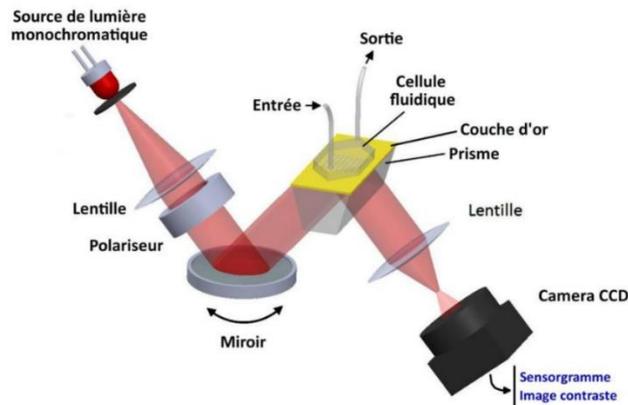
illumination va exciter les électrons de la surface qui vont se mettre en résonance avec l'onde évanescente qui sera créée, d'où l'appellation de la résonance des plasmons de surface. Cette onde sera sensible aux modifications d'indice de réfraction à l'interface entre la puce et la solution. Elle permet de détecter de façon optimale les changements se déroulant au niveau de la surface de la puce d'or et jusqu'à une hauteur pouvant atteindre 150 à 200 nm. La détection du faisceau réfléchi va permettre de déterminer les perturbations de surface. Pour les études biologiques en SPRi, un système fluidique a été placé sur la surface de la puce, qui est elle-même biochimiquement modifiée, pour pouvoir réaliser des injections séquentielles de solution d'intérêt.

Le système fluidique est composé d'une pompe, d'une boucle d'injection et de la cellule fluidique. L'ensemble permet de contrôler les écoulements et de suivre la réaction d'immunocapture. Une caméra CCD va mesurer l'intensité de la lumière réfléchie afin d'obtenir les courbes plasmons (déterminées pour chaque angle d'incidence et dépendant de la lumière réfléchie par la couche d'or) sur des positions précises dites ROI (region of interest) qui seront définis par l'expérimentateur à l'aide du logiciel Spri-View®. La capture d'analytes sur des positions particulières va entraîner des modifications d'indice de réfraction qui seront représentées par des variations sur les sensorgrammes et sur les images différentielles avec pour but d'obtenir des informations phénotypiques et de déterminer la composition surfacique des éléments piégés. Généralement, le signal obtenu augmente lors de la phase de capture, puis se stabilise à l'état d'équilibre lorsque les événements d'association et de dissociation se compensent.

La biopuce fabriquée dans nos locaux est insérée dans l'appareil, après positionnement sur le prisme et permettra de réaliser la capture et le suivi plasmonique. L'analyse SPRi permettra d'évaluer les paramètres cinétiques d'interaction et la spécificité des immunocaptures en comparant un niveau de bruit sur la surface de la puce et sur les spots contrôles, avec des spots comprenant des anticorps présents pour un piégeage spécifique.

La configuration du SPRi (en l'occurrence le SPRiplex II® utilisé pour l'étude) est présentée sur la figure 2.6 avec un détail complet du chemin optique et une image présentant l'appareil.

A



B

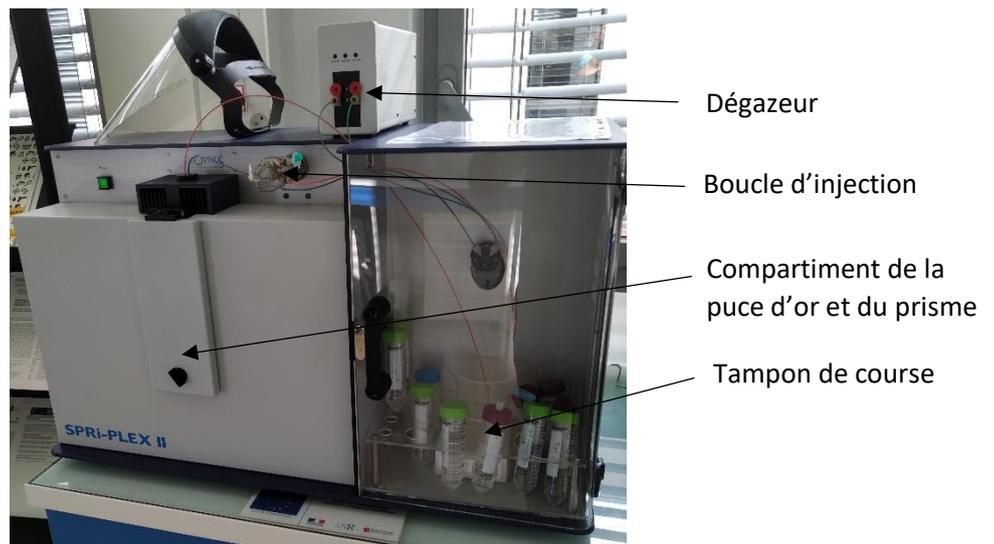


Fig. 2.6. Présentation de la SPRI, en A° schéma du parcours optique du laser de la source aux détecteurs en passant par la cellule fluidique (d'après la thèse de S. Obeid¹³⁹). En B° image descriptive de l'appareil.

En fin d'expérience, une étape de fixation de la surface sera réalisée à l'aide de l'injection directe de glutaraldéhyde (à 0,5%), substance organique permettant la fixation des protéines par réticulation. La puce est collectée pour des analyses complémentaires en microscopie à fluorescence (observation de la fluorescence des particules présentes avec une localisation de cette fluorescence et détermination de son intensité, possibilité future de réaliser des marquages secondaires). L'étape finale est la détermination par **AFM**⁵⁶ de la densité surfacique en NPs capturées sur les spots.

AFM

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. L'AFM est une technique qui a été développée en 1986 par Binnig et Gerber¹⁴⁴. Le principe consiste à utiliser une sonde qui est une

poutre souple très fine (avec un rayon de courbure \approx quelques nm), terminée par une pointe extrêmement fine située à l'extrémité d'un microlevier flexible (de 100-300 μm de longueur), appelé cantilever. Elle permet de scanner une surface point par point en mesurant les forces qui s'exercent entre les atomes de la pointe et ceux de la surface qui vont entraîner une déflexion de la pointe qui sera détectée à l'aide d'un laser. Cela sera réalisé à l'aide d'un système optique qui va focaliser le faisceau laser sur la phase arrière de la pointe et les mouvements de la pointe vont être détectés par des photodiodes à l'aide du laser. Ces variations en x et y seront directement liées à la variation de la topographie (rugosité, structuration, ...), permettant une reconstruction de la surface sur la zone en cours d'analyse. Un actionneur piézoélectrique permet de maîtriser le déplacement de l'échantillon ou du cantilever dans les 3 directions. La pointe du cantilever, qui va agir comme un ressort, sera sensible aux variations de force. Il existe plusieurs modes expérimentaux :

- Un mode contact ou les forces de répulsions (Forces de Born-Pauli) seront prédominants. La pointe reste en contact permanent avec la surface (à une distance inférieure à 2 Å). Dans ce cas, il faut travailler sur des échantillons déformables ou souples. 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)). Des phénomènes de friction, dus à l'adhérence entre la pointe et la surface peuvent l'endommager. La boucle de rétrocontrôle permet d'ajuster la distance entre la pointe et la surface, car si la hauteur était constante alors la nature des objets sur la surface pourrait endommager la pointe et altérer les conditions d'analyse.
- Un mode dynamique composé de deux sous modes. Le premier est le *Tapping*, ou mode contact intermittent, lorsque la pointe oscille à la fréquence de résonance du cantilever grâce au scanner piézoélectrique permettant un contact temporaire. 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 (forces de Born-Pauli) agissent sur la vibration du cantilever. Il est conseillé pour les échantillons souples et déformables. Le second sous-mode est le mode *non-contact*, qui consiste à faire vibrer le cantilever autour de la surface, mais sans contact avec cette dernière (la distance est supérieure à 0,3 nm entre la pointe et la surface). Ce sont les forces attractives à longue distance qui interviennent entre la pointe et la surface. Ce mode est le moins adapté aux échantillons biologiques.

Au cours de la thèse, nous utiliserons le système Nanowizard III de la société JPK (Bruker®) en mode QI (mode oscillant quantitatif) qui est optimisé pour la biologie. Les surfaces peuvent être sondées en milieu liquide et en air. Le système possède une grande résolution de l'ordre du pN et du nm respectivement pour les forces et les distances mesurées.

Les cantilevers, présentés sur la figure 2.7, utilisés sont les PNP-TR-Au en nitrure, composé de deux leviers avec une constante de raideur de 0,08N/m pour la grande pointe et 0,32N/m pour la petite. Ces cantilevers sont adaptés à l'analyse d'EVs en conditions air ou liquide.

La figure 2.8 présente le système AFM qui est utilisé dans nos locaux pour réaliser les expériences de caractérisations.

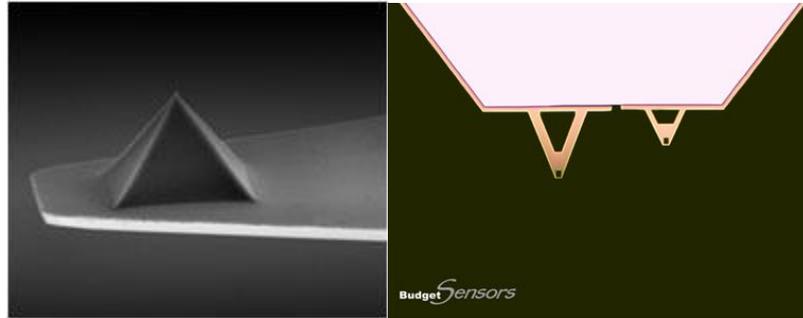
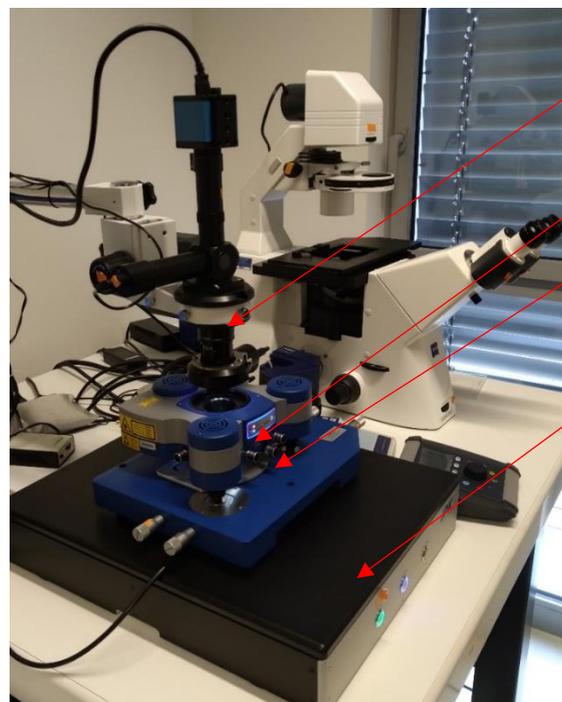


Fig. 2.7. Présentation des pointes PNP TR AU utilisés dans l'analyse des EVs et de nos particules calibrants¹⁴⁵.



Microscope permettant le positionnement du laser et de l'échantillon

Tête AFM

Emplacement de la puce et de la pointe

Table anti-vibration

Fig. 2.8. AFM, Nanowizard III, JPK, monté en stand alone et qui peut être couplé au microscope inversé de fluorescence.

Pour permettre une analyse complète et un dénombrement statistiquement valable, à partir de l'ensemble des images AFM réalisées sur les biopuces d'intérêt, une méthodologie a été mise en place pour traiter les images comme décrites dans les figures 2.9 et 2.10:

- La première étape consiste à « corriger » mathématiquement les effets d’ombrage sur l’image. Cette opération est réalisée avec le logiciel JPK data processing®.

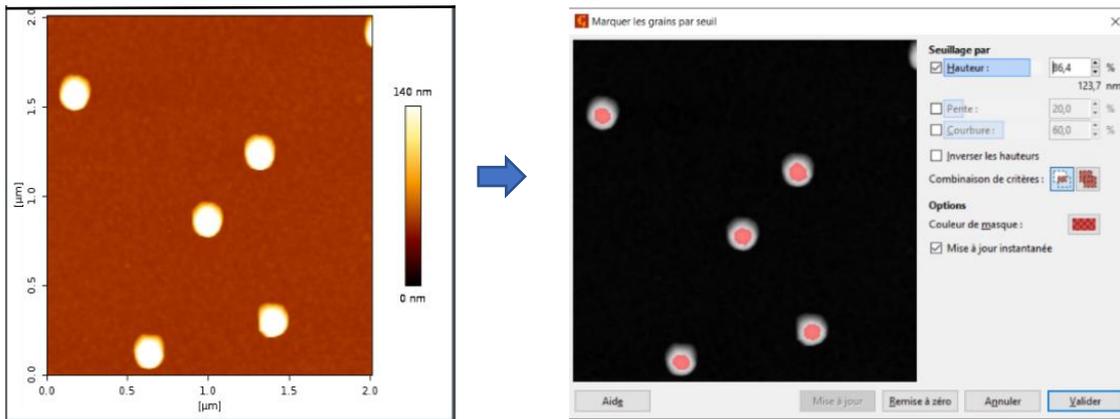


Fig. 2.9. Correction de l’effet d’ombrage de l’image à l’aide du logiciel JPK data processing®, ici sur une image de particules de 140 nm et choix des valeurs de seuils haut et bas sur l’image à l’aide du logiciel Gwyddion®.

- La seconde étape consiste à ouvrir l’image avec le logiciel Gwyddion®. Deux valeurs de seuil sont à choisir, afin de comptabiliser avec fiabilité les objets visualisés sur l’image (figure 2.9).
- Puis l’onglet grain et l’option résumée permettront de déterminer le nombre d’objets par unité de surface (figure 2.10)

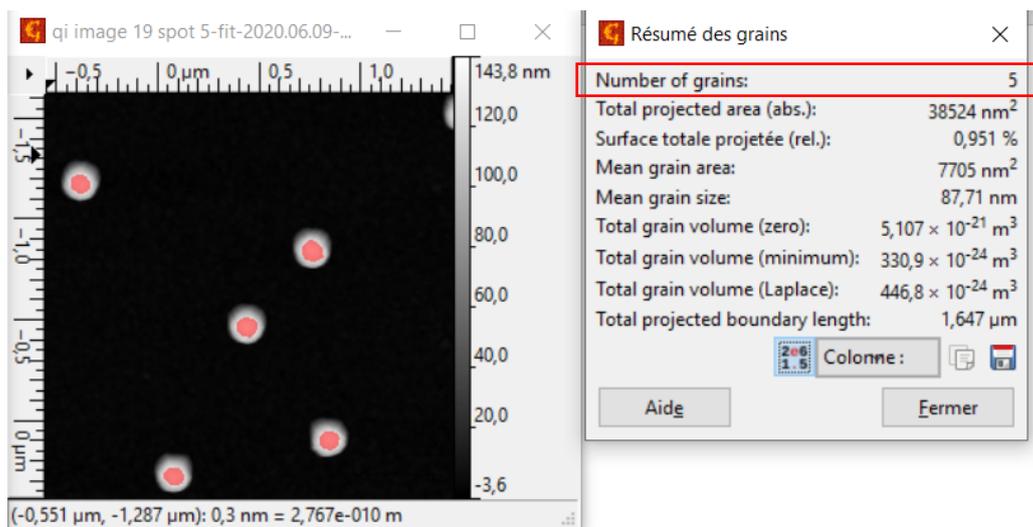


Fig. 2.10. Détermination du nombre d’objets/surface sur l’image à l’aide du logiciel Gwyddion® appliqué sur des particules de 140 nm ; 5 objets sont comptabilisés sur l’image.

Il est possible de déterminer le diamètre effectif des particules, leur volume et hauteur. Dans le cadre de notre méthode de dénombrement, nous avons déterminé qu’il fallait atteindre 300 particules dénombrées et environ une quinzaine de surfaces cumulées à analyser pour avoir une valeur

statistique qui soit représentative du spot intégral. Dans notre approche, les dénombrements sont donnés en particules par mm² pour être représentatifs de la surface.

Les expériences de caractérisation se dérouleront donc suivant la méthode décrite en figure 2.11. Nous avons pu mettre en place une combinaison de techniques analytiques qui apporte des informations complémentaires sur la qualification des différents lots de particules et leur comportement sur immunopuces en vue d'une investigation ultérieure de leur potentiel d'agents calibrants en présence d'EVs dans un échantillon biologique.

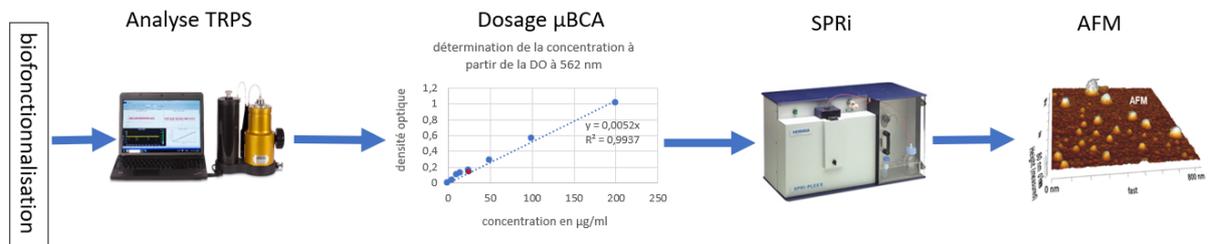


Fig. 2.11. Présentations des différentes étapes de caractérisations analytiques des NPs biofonctionnalisées : Les particules sont analysées en taille et en concentration par la TRPS. Le dosage µBCA va permettre de déterminer la quantité de protéines greffées sur la surface des particules. La SPRI va conduire au piégeage spécifique des particules avant leur analyse morpho-mécanique et de dénombrement par AFM.

La prochaine section correspond à la présentation des lots de particules : en commençant par les décrire, puis montrer la fonctionnalisation en passant par la caractérisation pour terminer sur l'injection des solutions à diverses concentrations dans les deux systèmes d'immunocapture, que sont la SPRI et le module NBA.

2.3 Conception, fabrication et caractérisation des calibrants biomimétiques

Nous avons sélectionné plusieurs particules de tailles comprises entre 100 et 1000 nm, afin de couvrir la gamme de taille des EVs (en effet 90% des EVs ont des tailles inférieures à 500 nm de diamètre). Ces particules possèdent des fonctions carboxyliques en surface. Les trois candidats choisis, fournis par la société microparticles® GMBH¹⁴⁶, sont les particules suivantes :

- Particules de silice, de diamètre 143 nm (CV de 5%) avec un indice de réfraction de 1,42 non fluorescentes, dénommées NP140,
- Particules de mélamine, de diamètre 480 nm (CV de 5%) avec un indice de réfraction de 1,68 fluorescentes dans le vert (506/529 nm), dénommées NP480
- Particules de mélamine, de diamètre 920 nm (CV de 5%) avec un indice de réfraction de 1,68 fluorescentes dans le rouge (636/686 nm), dénommées NP920.

Pour déterminer les concentrations théoriques en solution, la procédure est basée sur un ensemble de calculs qui sont décrits ci-dessous :

Pour les particules de 480nm, les données fournies en concentration sont de 2,5% W/V, soit 25 mg/ml (pour les NP480 et NP920) ou 5% W/V pour les NP140.

Une sphère de diamètre 480 nm a un volume de **$5,787 \cdot 10^7 \text{ nm}^3$** ,

La masse volumique des billes est de **$1,51 \text{ g/cm}^3$** , soit **$1,51 \cdot 10^{-21} \text{ g/nm}^3$** , nous pouvons ainsi déterminer la masse d'une bille de 480 nm : $8,739 \cdot 10^{-8} \mu\text{g}$.

Sachant que les lots sont caractérisés à 25 mg/ml, la quantité de NP 480 par ml correspond théoriquement à **$2,86 \cdot 10^{11}$** part/ml.

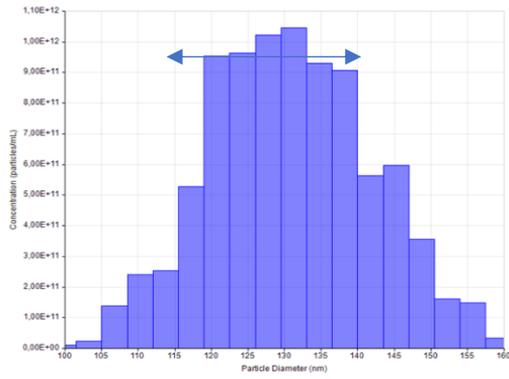
De la même façon, la quantité de NP920 (25 mg/ml) par ml correspond théoriquement à **$4 \cdot 10^{10}$** part/ml.

Pour les NP140 (5% W/V, soit 50 mg/ml), la masse volumique est de $1,85 \text{ g/cm}^3$ ce qui conduit à une estimation théorique de **$1,9 \cdot 10^{13}$** part/ml.

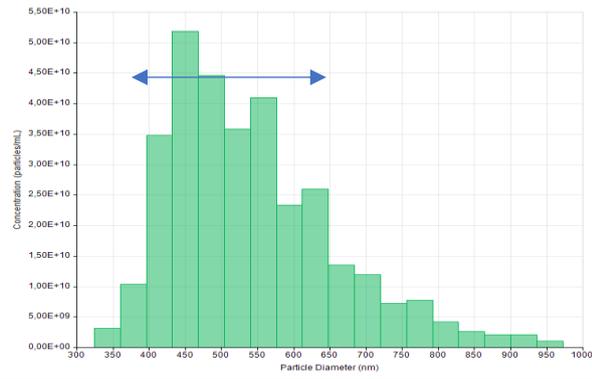
Des caractérisations par TRPS ont été effectuées afin de s'assurer de la bonne conformité des lots de NPs en distribution de taille et en concentration.

Chacune des solutions est analysée par TRPS pour vérifier la taille et la concentration des particules, comme le montre la figure 2.12 :

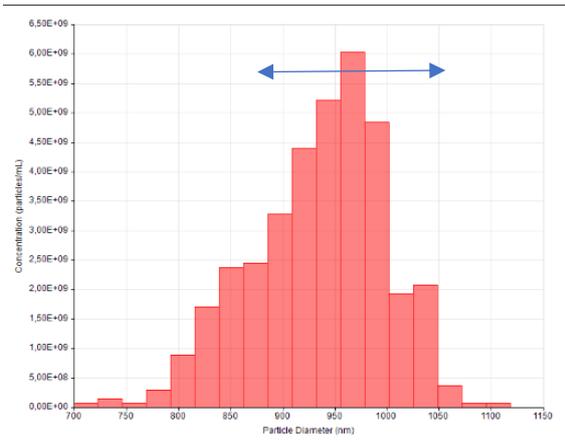
A



B



C



	NP140	NP480	NP920
Taille moyenne TRPS (nm)	131±13	543±50	916±90
Concentration TRPS (part/ml)	$9 \cdot 10^{12} \pm 0,9$	$3,2 \cdot 10^{11} \pm 0,3$	$3,8 \cdot 10^{10} \pm 0,4$
Concentration théorique (part/ml)	$2 \cdot 10^{13}$	$2,85 \cdot 10^{11}$	$4 \cdot 10^{10}$

Fig. 2.12. Détection des particules par TRPS. En A° les particules de 140 nm sont analysées avec un NP 200 (stretch 45,05 mm, voltage 0,58 V), en B° les particules de 480 nm sont détectées avec un NP 400 (stretch 47,02 mm voltage 0,32 V), en C° les particules de 920 nm sont analysées avec un nanopore NP 400 (stretch 47,02 mm voltage 0,32 V). En D° tableau récapitulatif des données TRPS et des données théoriques. La flèche bleue représente 90% de la population.

Nous pouvons observer de ces analyses que les valeurs obtenues de taille moyenne et de concentrations sont dans la gamme de celles attendues. Les résultats en termes de taille et de concentrations sont conformes :

- Pour les particules de 140 nm, une concentration moyenne de $9 \cdot 10^{12}$ part/ml est déterminée. La moyenne du diamètre des objets est estimée à 131 nm +/- 13.
- Pour les particules de 480 nm, une concentration moyenne de $3 \cdot 10^{11}$ part/ml est déterminée. La moyenne du diamètre des objets est estimée à 543 nm +/- 50. Cette valeur a été obtenue dans des conditions non idéales avec des perturbations que nous attribuons à la présence d'agrégats et la présence d'éléments issus du tampon, expliquant l'écart avec la valeur attendue.

- Pour les particules de 920 nm, une concentration moyenne de $3,8 \cdot 10^{10}$ part/ml est déterminée. La moyenne du diamètre des objets est estimée à 916 nm +/- 90.

2.3.2 Biofonctionnalisation des particules

Les particules choisies présentent en surface des fonctions COOH qui peuvent être activées chimiquement par des réactifs de type « 1-ethyl-3-[3-diméthylaminopropyl] carbodiimide hydrochloride » ou EDC et « N-Hydroxysulfosuccinimide » ou sulfo-NHS, qui permettront de créer des liaisons amides entre les fonctions carboxyliques de la particule et les groupements amines primaires des protéines. Les représentations chimiques des protéines sont décrites dans la figure 2.13.

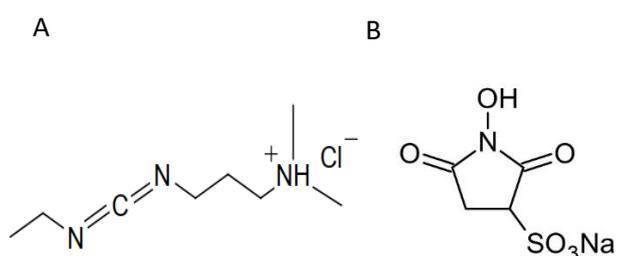


Fig. 2.13. Composés organiques utilisés pour l'activation chimique des groupements carboxyliques présents au sein des NPs. En A° la molécule d'EDC et en B° la molécule de sulfo-NHS.

Le protocole de base de cette réaction est décrit de façon abondante dans la littérature et la figure 2.14 regroupe l'ensemble des voies réactionnelles conduisant à une liaison amide :

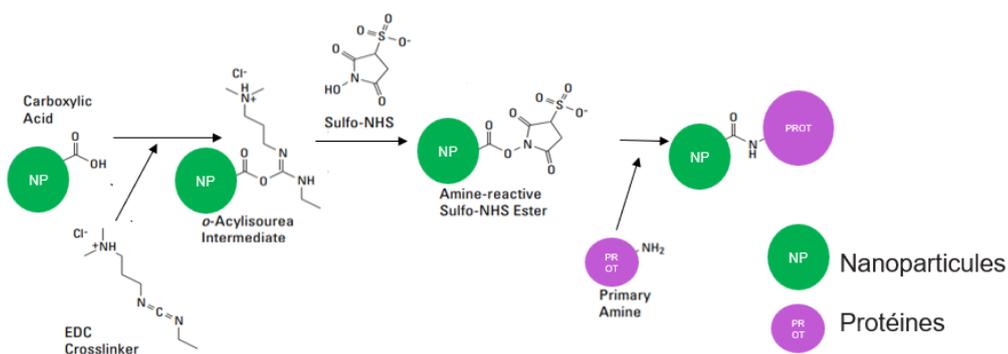


Fig. 2.14. Présentation des réactions chimiques permettant le greffage de protéine sur les particules synthétiques. Chemin réactionnel de la fonctionnalisation des NPs, adapté de crosslink reagent handbook, Thermo Fischer ¹⁴⁷ et du protocole usuel de biofonctionnalisation ¹⁴⁸ avec l'EDC/sulfo-NHS.

Dans le cadre de notre projet, nous avons fait le choix de fonctionnaliser les NPs avec des macromolécules de type protéines, nous avons sélectionné l'ovalbumine et la caséine pour différentes raisons présentées ci-dessous :

- L'ovalbumine¹⁴⁹ (PM : 45kDa, appelés OVA), qui est une glycoprotéine présente dans le blanc d'œuf, dont la structure est décrite dans la figure 2.15.

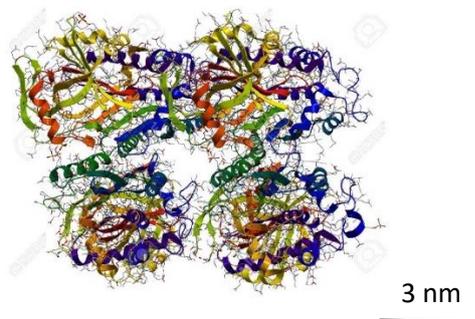


Fig. 2.15. Représentations en 3D en feuillet et en hélice de la structure de la protéine ovalbumine¹³⁸.

Il s'agit d'un modèle (OVA/anticorps anti-OVA) qui est classiquement utilisé au laboratoire et dont la disponibilité est grande. Les cinétiques d'interactions entre anticorps et antigènes ont déjà été étudiées (avec une valeur de constante de dissociation de $K_d=10^{-9}$ M). L'anticorps permettant de capturer l'ovalbumine est un anticorps monoclonal anti-OVA de la société Sigma-Aldrich (réf. A6075) avec 20 résidus lysine¹⁵⁰. À partir de ce couple, nous avons pu mettre en place notre protocole de fonctionnalisation.

- La caséine (PM :23kDa, appelés CAS) qui est la protéine principale du lait^{151,152} est présentée dans la figure 2.16.

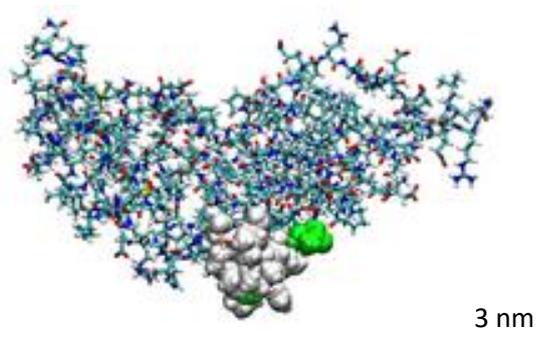


Fig. 2.16. Représentations 3D en bâton et sphère de la structure de la protéine caséine¹⁴⁰.

La seconde protéine a été choisie pour fonctionnaliser avec une seconde espèce nos calibrants, en tenant compte du besoin d'un second couple pour injecter deux particules différentes en même temps et recouvertes avec des protéines pour lequel il n'y a pas de cross contamination entre

l'ovalbumine et la seconde protéine. Ce modèle a été sélectionné pour de premières étapes de fonctionnalisation et a été validé sur la base des résultats d'immunocapture que nous présenterons dans le chapitre 3. L'anticorps permettant de capturer les particules recouvertes de caséine et un anticorps monoclonal anti-CAS de la société antibodies online® (ref : ABIN 1118451) avec 11 résidus lysine¹⁵³.

Les particules de 920 nm, fluorescentes dans le rouge, ne seront pas fonctionnalisées et serviront à mimer les contaminants de tailles supérieures aux rayons critiques présents dans les différents échantillons biologiques.

2.3.3 Protocole de fonctionnalisation des particules en ovalbumine et des particules en caséine

Dans cette partie, nous allons présenter la fonctionnalisation des différentes particules. Le protocole ci-dessous a été élaboré^{148,154} après plusieurs modifications des paramètres principaux, jusqu'à atteindre une immunocapture avec des réponses spécifiques fortes et des réponses sur les contrôles très faibles. Le protocole de la table 2.1 est le protocole initial, issu de la thèse de S.Obeid¹³⁹, à partir duquel nous sommes partis pour arriver aux protocoles de la table 2.2 que nous avons utilisés. Il est le fruit de plusieurs optimisations qui seront également présentées.

Étape	Nom	Durée	Description	Traitement réalisé avant l'étape suivante
A	Mise en tampon	10 min	100 μ l de solution de NP 480 (soit $3 \cdot 10^{10}$ part/ml)	Vortex et centrifugation à 2500 g pendant 10 min
B	Activation des fonctions COOH	20 min sur plateau rotatif	Ajout de 1 ml de la solution d'EDC/ sulfo-NHS en PBS (200mM/50 mM, pour limiter les risques d'agrégats)	Centrifugation à 2500 g pendant 10 min
C	Greffage de la protéine	4h sur plateau rotatif	Ajout de la protéine OVA (2 mg/ml, en tampon PBS), à $3 \cdot 10^{10}$ nanoparticules/ml pour les NP 480	3 centrifugations à 2500 g, 10 min
D	Resuspension et stockage	2 mois maximum	Reprise du culot (Resuspension à la micropipette) en tampon TRIS, pH 7,4	Stockage à 4°C

Tab 2.1. Présentation du protocole initial de fonctionnalisation

À la suite de ce premier protocole, plusieurs étapes ont eu besoin d'être optimisées au cours de la thèse :

- Réduction de la quantité de réactifs EDC (de 200 mM à 5 mM), lors de la première étape, conforme à l'activation usuelle de nos puces. Cette étape a été modifiée sur la base de l'observation de nombreux agrégats et a conduit à une étude bibliographique plus importante montrant qu'une réduction drastique de la quantité d'EDC pouvait résoudre ce problème¹⁴⁸.
- Adaptation de la quantité de protéine à la surface des particules pour permettre un greffage et un taux de recouvrement optimal. Plusieurs tests ont été réalisés jusqu'à trouver la valeur qui conduit à la réduction de nombreux agrégats de NPs et un taux de recouvrement idéal (les tests ont été réalisés avec un excédent de protéine par rapport aux nombres de sites COOH (120 μ mol/g pour les NP480 et 30 μ mol/g pour les NP140) disponibles de 5 fois, 10 fois, 20 fois et 40 fois plus de protéine).
- Rajout d'EDC à l'étape de la passivation en RSA, car nous avons observé de nombreuses interactions non spécifiques. Nous avons supposé que la passivation ne se faisait pas

convenablement et nous avons observé une amélioration en rajoutant de l'EDC à cette étape¹⁴⁸, avec une interaction non spécifique proche de zéro, lorsque nous réactivons les fonctions libres. L'EDC permet de réactiver les fonctions libres COOH, car l'activation des intermédiaires a une demi-vie de 4-5h.

- Étape de passivation à l'éthanolamine pour bloquer les fonctions carboxyliques libres.
- Il est également important de noter qu'avant chaque utilisation, les NPs subissent une étape de bain ultrason (30 %, 37KHz et pendant 1 h).
- Une étape importante a également été réalisée pour permettre une bonne solubilisation de la caséine qui selon les conditions de pH et de solvant devient micellaire. Pour cela, nous avons réalisé une solution à haute concentration à pH 8 et nous avons solubiliser en présence d'éthanolamine (0,01%) avec un chauffage léger (50°C) et sous agitation.

Nous pouvons observer une amélioration de la fonctionnalisation sur la figure 2.17 :

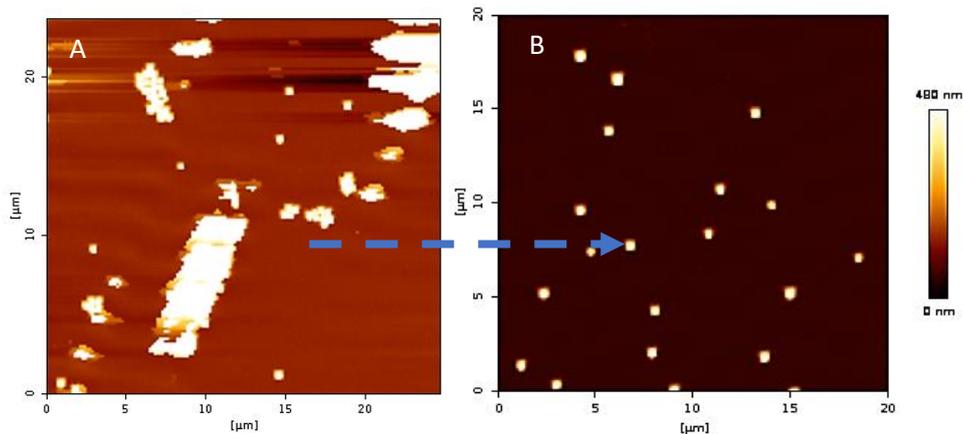


Fig. 2.17. Présentations de deux images AFM de la puce après injections des NP480-OVA, en A° image avec le protocole initial et en B° avec le protocole optimisé, limitant les effets d'agréations.

Tout cela a conduit au protocole suivant (tableau 2.2) :

Étape	Nom	Durée	Description	Traitement successif en fin d'étape
A	Mise en tampon	10 min	100 µl de solution de NP480 (soit $3 \cdot 10^{10}$ part/ml) ou 50 µl pour les NP140 (soit 10^{12} part/ml)	Vortex et centrifugation à 2500 g pendant 7 min
B	Activation des fonctions COOH	30 min sur plateau rotatif	Ajout de 1 ml de la solution d'EDC/ sulfo-NHS en PBS (5mM/50 mM, pour limiter les risques d'agrégats)	Centrifugation à 2500 g pendant 7 min
C	Greffage de la protéine	2 h 30 sur plateau rotatif	Ajout de la protéine OVA (5 mg/ml, en tampon MES 0.5 M, pH 6), à $3 \cdot 10^{10}$ nanoparticules/ml pour les NP 480 et de la CAS (5 mg/ml, en tampon MES 0.5 M, pH>6) pour les NP 140 CAS à $7 \cdot 10^{11}$ part/ml	Prélèvement de 150 µl pour la caractérisation en µBCA, suivie par 1 centrifugation à 2500 g, 7 min
D	Passivation à la RSA	30 min sur plateau rotatif	Ajout de 998 µl de RSA (1 mg/ml) pH4,5 (ou pH 6 dans le cas des NP140-CAS) et ajout de 2µl d'EDC (Cf 5mM)	Centrifugation à 2500 g pendant 7 min
E	Passivation à l'éthanolamine	30 min sous agitation	Ajout de 1 ml d'éthanolamine (1 X)	2 centrifugations à 2500 g pendant 7 min
F	Resuspension et stockage	Plusieurs mois	Reprise du culot (Resuspension à la micropipette) en tampon TRIS, pH 8.8, Vf=100 µl	Stockage à 4°C

Tab 2.2. Présentation du protocole de fonctionnalisation optimal

Le protocole avec l'amélioration des différentes étapes est représenté sur la figure 2.18 :

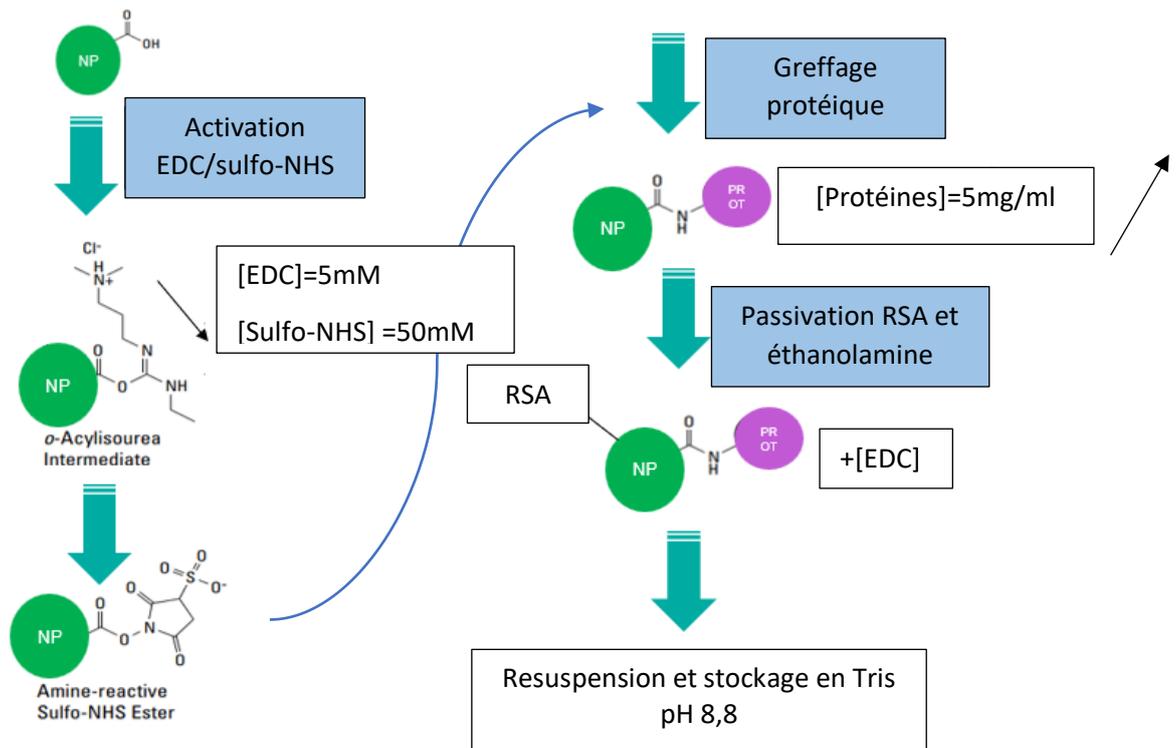


Fig2.18. Présentation du protocole de biofonctionnalisation optimisé avec les modifications clés (Activation/ greffage et passivation).

Une fois qu'un lot de particules biofonctionnalisées est produit, il subit la double caractérisation TRPS/ μ BCA. L'ensemble des résultats de fonctionnalisations seront présentés dans le tableau de l'annexe 2.1. L'illustration des tests est réalisée dans la partie suivante sur le lot n° 16. Il est important de prendre en considération le temps nécessaire pour réaliser une fonctionnalisation et une caractérisation complète avant utilisation du lot :

La fonctionnalisation dure 1 journée complète

La caractérisation par TRPS et par dosage protéique prend une seconde journée

L'immunocapture par SPRi dure une demi-journée

La caractérisation par AFM prend 1 journée ou deux selon le nombre de spots.

La fonctionnalisation, la caractérisation et le traitement des données prennent donc une semaine complète de travail. La préparation des 17 lots a été effectuée sur une durée de plus de 5 mois (si l'on considère les phases d'optimisation, de réflexion et les différentes problématiques à résoudre).

Nous pouvons réaliser une comparaison entre les lots fonctionnalisés initiaux et les lots optimisés que nous allons utiliser, comme présentés dans le tableau 2.3:

	Lot initial	Lot optimisé
Particules	140-OVA/480-OVA	140-CAS/480-OVA
Immunocapture = rapport signal/bruit pour différentes concentrations	Moyen	Fort
Interaction non spécifique	Forte (à minimum 0,6% pour les faibles concentrations)	Faible (proche de 0)
Agrégat	Fort même à faible concentration	Faible même à forte concentration
Stabilité dans le temps	2 mois maximum	4 mois
Adsorption non désirée sur la paroi des dispositifs	Forte	Faible

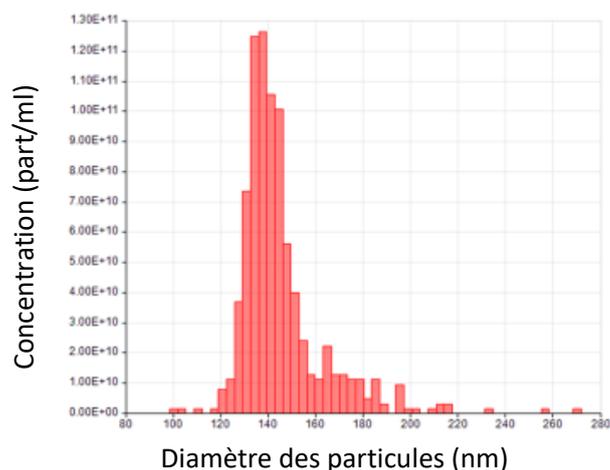
Tab 2.3. Comparaison des caractéristiques des différents lots de NPs fonctionnalisés avec l'optimisation du protocole de biofonctionnalisation.

2.3.4 Caractérisations biophysiques et biochimiques

TRPS

Nous procédons à une double caractérisation systématique des lots de NPs bio-fonctionnalisés comme étape ultime de qualification et de stockage en vue de l'approvisionnement du programme MADNESS. Pour cela, nous réalisons des étapes de TRPS, qui peuvent être rapides (2 heures), ou longues (plusieurs heures), si le nanopore utilisé rencontre des problèmes de colmatage et de dégradation de performances. La figure 2.19 présente les résultats TRPS des NP140-CAS du lot 16.

*NP 140-CAS



	Particules 143 nm nus	Particules 143 nm fonctionnalisées
Taille TRPS moyenne (nm)	131 ± 13	145 ± 15
Concentration TRPS (part/ml)	9*10 ¹² ± 0,9	8,5*10 ¹¹ ± 0,9
Concentration théorique attendue (part/ml)	2*10 ¹³	1*10 ¹²

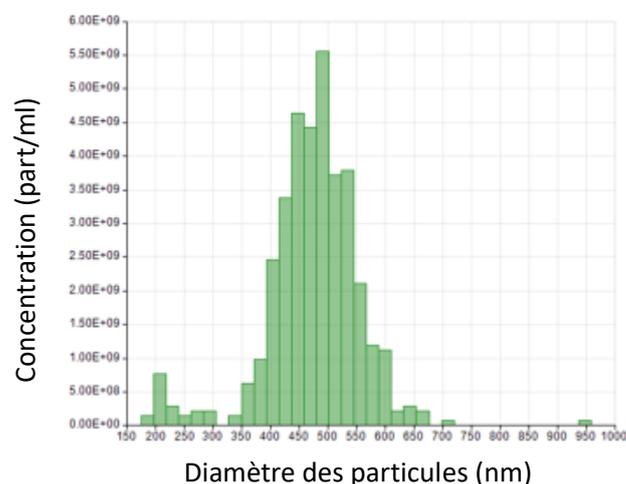
Fig. 2.19. Histogramme et tableau récapitulatif des données TRPS théoriques et empiriques des NPs 140-CAS fonctionnalisées (lot 16) avec un nanopore 200 (stretch 46.2 mm ; voltage 0.38 V). Toutes les expériences ont respecté les consignes de qualités, comme décrites par la société IZON®.

La valeur moyenne en taille (145±15 nm) et la valeur de concentration (8,5*10¹¹±0,9 part/ml) sont très proches des valeurs théoriques. En comparant les données théoriques et les données obtenues avec les différentes fonctionnalisations précédentes, nous obtenons des résultats conformes en termes de taille (mode 138 nm) et en concentration (8.53*10¹¹ contre 10¹² part/ml attendus d’après la valeur théorique et le facteur de dilution). Les protéines greffées en surface ont des tailles trop petites pour être détectables par la TRPS.

Les écarts de taille en termes de valeur moyenne et de mode sont conformes aux valeurs attendues en tenant compte de l’erreur sur les analyses TRPS qui peuvent atteindre 10 % pour la taille.

*NP 480-OVA

La figure 2.20 présente les résultats TRPS des NP480-OVA du lot 16



	Particules 480 nm nus	Particules 480 nm fonctionnalisées
Taille moyenne TRPS (nm)	543 ± 50	473 ± 50
Concentration TRPS (part/ml)	3,2*10 ¹¹ ± 0,4	3,7*10 ¹⁰ ± 0,4
Concentration théorique (part/ml)	3,5*10 ¹¹	3,5*10 ¹⁰

Fig. 2.20. Histogramme et tableau récapitulatif des données TRPS théoriques et empiriques des NPs 480-OVA fonctionnalisées (lot 16). Nanopore 300 (stretch 47 mm ; voltage 0.3V). Toutes les expériences ont respecté les consignes de qualités, comme décrites par la société IZON.

En comparant les données théoriques et les données obtenues avec les différentes fonctionnalisations précédentes, nous obtenons des résultats conformes en termes de taille (Valeur moyenne à 473±50 nm et un mode à 491 nm) et en concentration (3.7*10¹⁰±0,4 contre 3*10¹⁰ part/ml attendus d'après les valeurs théoriques). Les résultats obtenus sur ces particules fonctionnalisées sont dans la gamme de valeur attendue et l'écart entre la valeur de moyenne et le mode est très faible. Etant donné la difficulté de mesurer les particules nues, le greffage des protéines ne peut être observé avec cette méthode, car la variation de taille se situerait dans l'erreur standard.

Les différents résultats obtenus au cours de nos investigations ont montré que la fonctionnalisation améliore grandement les analyses par TRPS : en permettant de limiter les agrégats et en augmentant la stabilité en solution, le passage de particules individualisées au travers du nanopore est simplifié. Nous avons réalisé les expériences de TRPS pour 7 lots fonctionnels.

DOSAGE μ BCA

Pour cette partie, il est important de noter que la fluorescence des particules, notamment celle des particules de 480 nm (avec une fluorescence à 506/529 nm) perturbe l'analyse : en effet, les longueurs d'onde d'absorbance des particules sont proches de la longueur d'onde d'analyse (qui est de 562 nm), ce qui entraîne une valeur faussée de l'absorbance lue lors de l'analyse par spectroscopie.

Pour ne pas subir ce problème, nous avons modifié le protocole en éliminant les particules avant la lecture spectroscopique de la DO : les particules de 480 nm ont été filtrées pour que la DO lue corresponde uniquement à la réaction des protéines présentes en solution avec l'acide bicinchonin et ne soit pas influencée par la présence des particules de 480 nm. La lecture de la DO se fait donc sur le surnageant après incubation.

L'expérience se déroule de la manière suivante :

- Centrifugations (7 min à 2500g) pour éliminer les potentielles protéines libres restantes en solution
- Réaction entre l'échantillon et les réactifs du dosage
- Chauffage à 60°C
- Refroidissement dans la glace
- Filtration à 0,22 μ m pour éliminer les NP480-OVA.
- Analyse par spectroscopie visible.

Les différents dosages ont permis de déterminer la quantité de protéines par particules. La synthèse de ces résultats est présentée dans l'annexe 2.1.

Pour comprendre ce résultat, voici un exemple d'expérience réalisée pour le lot 16, dans la figure 2.21 présentant des résultats de dosage μ BCA avec une gamme étalon en BSA et les valeurs de DO pour les solutions qui permettent la détermination de la concentration protéique :

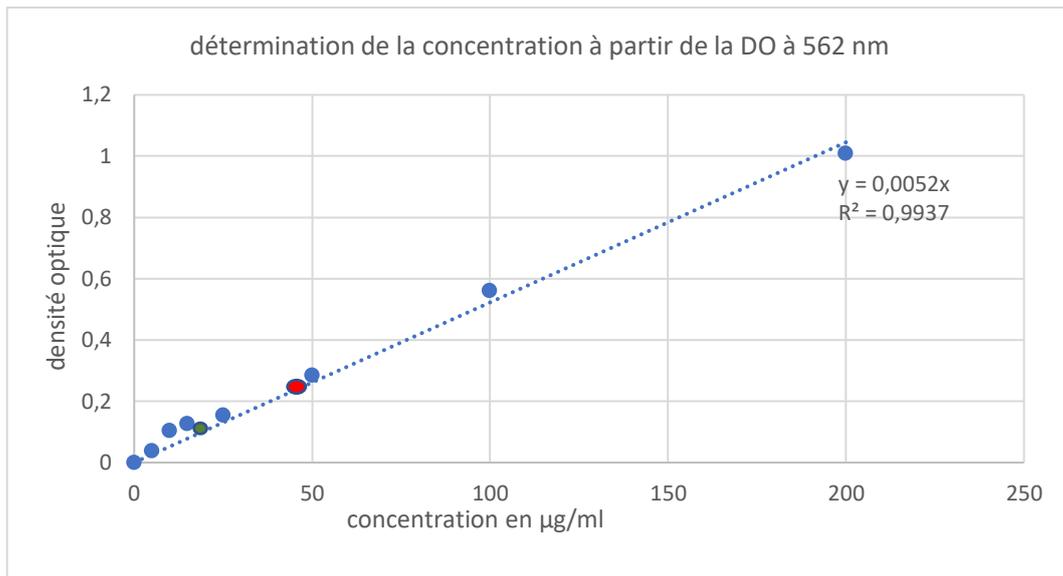


Fig. 2.21. Dosages protéiques des NPs selon la méthode μ BCA. La courbe d'étalonnage est basée sur l'utilisation de la protéine BSA. Le point rouge correspond à une valeur déterminée pour les NP480-OVA et le point vert à une valeur de concentration pour les NP140-CAS.

À partir de l'établissement de la courbe de calibration et de la détermination des valeurs pour les différentes solutions, nous pouvons déterminer une concentration protéique, dont les valeurs sont présentées dans le tableau 2.4 :

Type de NPs	Lot	Facteur de dilution	DO	Concentration ($\mu\text{g/ml}$)
140	16	2	0,32	128
	16	5	0,122	122
480	16	2	0,14	56

Tab. 2.4. Valeur de DO permettant de déterminer la concentration pour les différents échantillons.

Les informations obtenues au cours de cette expérience, couplée à celles obtenues en TRPS (nombre de particules par ml), nous permettent d'estimer le nombre de protéines par nanoparticules dans le tableau 2.5:

	Nombre de protéines par nanoparticule	Valeur de recouvrement protéique maximum*
NP140-CAS	3700	4200
NP480-OVA	17000	40000

Tab. 2.5. Détermination du nombre de protéines par lot de particules.

* pour obtenir cette valeur, il faut calculer la surface d'une particule et diviser la valeur par la surface occupée par une protéine. Ensemble des résultats présents en annexe 2.1.

Comme nous le verrons dans la partie suivante, les caractérisations obtenues montrent des données qui sont suffisantes pour définir des conditions d'utilisation :

- Concentration d'injection
- Taux de recouvrement protéique

Les bilans des résultats des différentes analyses TRPS et des dosages μ BCA sont représentés dans l'annexe 2.1 pour tous les lots biofonctionnalisés durant la thèse.

Les réponses obtenues sur l'ensemble des lots optimisés sont de :

- 3 000 \pm 750 protéines par NP140-CAS
- 20 500 \pm 6500 protéines par NP480-OVA

Nous constatons qu'il y a des variations dans le recouvrement en protéines des particules (une amélioration importante est observée avec le protocole final). Néanmoins, il est important de noter que la caractérisation par dosage μ BCA n'est pas déterminante seule. Il faut réaliser les expériences d'immunocapture pour vérifier que tous les lots présentent une interaction spécifique très forte et une interaction non spécifique faible, ce qui permettra de valider l'utilisation des lots de particules. C'est l'étape d'immunocapture qui est garante de la qualité du lot et non les étapes de pré qualification.

Remarque : Pour chaque lot, nous avons 100 μ l de particules de 480 nm à $4 \cdot 10^{10}$ part/ml et 50 μ l de particules de 140 nm à $8,5 \cdot 10^{11}$ part/ml. Les particules sont stockées plusieurs mois à 4°C (plusieurs mois de validités sans détérioration de stabilité). Avant chaque utilisation, il est fortement recommandé d'incuber la solution de NPs pendant 1 heure dans un bain ultrason (30%/37KHz) pour aider à la resuspension des particules. 17 fonctionnalisations réalisées, dont 7 optimisées.

2.4 Caractérisation fonctionnelle d'immunocapture en SPRi

Afin de vérifier que les NPs d'intérêt sont fonctionnelles, c'est-à-dire reconnues spécifiquement par les anticorps, les particules sont injectées dans le système commercial SPRi (SPRiPlex II®) avec le même substrat que nos expériences usuelles (la puce d'or), pour être dans les conditions d'immunocapture de nos expériences. Le protocole d'immunocapture réalisé est présenté dans l'annexe 2.2.

Nous présenterons ici dans chaque cas, un exemple de résultat d'une immunocapture de qualité, représentative des expériences réalisées durant le projet. Nous entendons par qualité une interaction spécifique forte et une interaction non spécifique faible (avec un rapport entre les deux de 3 minimum). La figure 2.22 présente les résultats d'immunocapture des NP140-CAS.

Immunocapture des NP140-CAS (lot 16) :

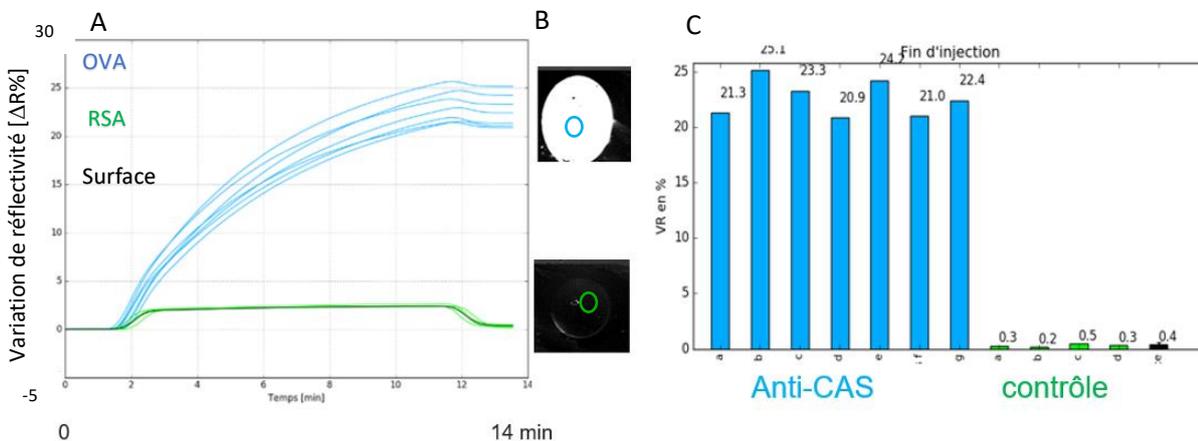


Fig. 2.22. Expériences d'immunocapture des NP140-CAS ($7 \cdot 10^9$ particules/ml) par SPRi à $20 \mu\text{l}/\text{min}$ A° sensorgramme de l'immunocapture (variation de réflectivité en fonction du temps, sur 7 spots anti-CAS et 4 spots RSA contrôles) en B° image de contraste après capture et en C° histogramme des taux de capture par spot.

À travers cette expérience, nous démontrons :

- La spécificité de capture, avec des signaux forts sur les spots anti-CAS (tous les signaux sont supérieurs à $20 \Delta R \%$). La valeur de $\Delta R \%$ représente la variation de réflectivité, il s'agit de la réponse obtenue en SPRi lors de l'immunocapture.
- L'efficacité de la passivation par le faible signal sur les autres spots (inférieur à $0,5 \Delta R \%$).
- L'homogénéité de la réponse au sein d'un spot d'immunocapture et surtout la reproductibilité entre les spots anti-CAS.

La figure 2.23 présente les résultats d'immunocapture des NP480-OVA.

Immuncapture des NP480-OVA (lot 16) :

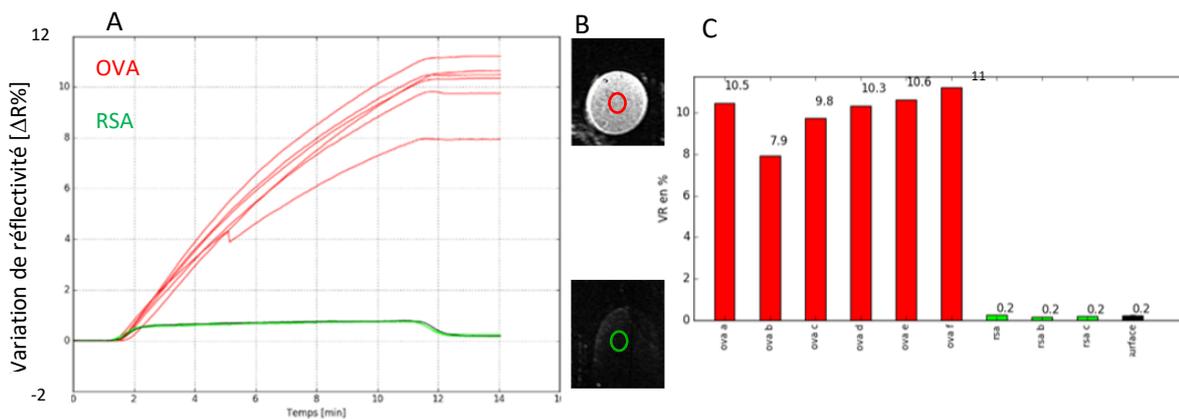


Fig. 2.23. Expériences d'immunocapture des NP480-OVA ($5 \cdot 10^8$ particules/ml) dans l'appareil SPRI à $20 \mu\text{l}/\text{min}$. A° sensorgramme de l'immunocapture (variation de réflectivité en fonction du temps sur 6 spots anti-OVA et 3 spots contrôles) en B° image de contraste après capture et en C° histogramme des taux de capture par spot.

À travers cette expérience, nous démontrons :

- La spécificité de capture, avec des signaux forts sur les spots anti-OVA ($10 \pm 1 \Delta R \%$).
- L'efficacité de la passivation par le faible signal sur l'ensemble des spots contrôles (inférieur à $0,2\Delta R \%$).
- L'homogénéité de la réponse au sein d'un spot d'immunocapture.

2.5 Caractérisation des densités surfaciques par microscopie de fluorescence et par AFM

La spécificité de fonctionnalisation est également vérifiée pour les particules de 480 nm en microscopie à fluorescence : pour cela, en fin d'expérience de piégeage sur puces, les puces sont observées sous microscope, avec un filtre FITC pour les NP480-OVA ($\lambda_{\text{exc}} 506 \text{ nm} / \lambda_{\text{em}} 530 \text{ nm}$) avec un grossissement 5X ou 10X afin de déterminer si la fluorescence est spécifique des spots anti-OVA ou si elle est présente ailleurs sur la puce. Une image caractéristique est présentée sur la figure 2.24.

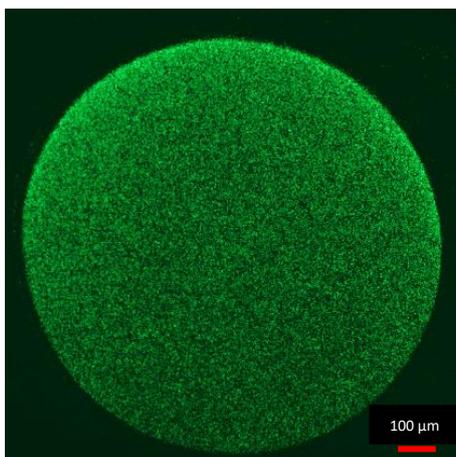


Fig. 2.24. Analyse par fluorescence (FITC), permettant de détecter les particules de 480 nm (λ_{exc} 506 nm/ λ_{em} 530 nm) d'un spot anti-OVA après immunocapture des NP480-OVA sur puce d'or avec un objectif de 10X.

Cette image de fluorescence permet de confirmer les analyses SPRI, à savoir :

- Une localisation spécifique des NP480-OVA sur les spots d'immunocapture (anti-OVA)
- Une adsorption non spécifique négligeable hors spot
- Une répartition homogène des NPs immunocapturées sur l'intégralité de la surface du spot.

Une ultime caractérisation consiste à analyser par AFM la surface des différents spots, pour déterminer la quantité de NPs par unité de surface (dénombrement selon la méthode précédemment décrite). La figure 2.25 présente une caractérisation rigoureuse et résolutive des différents NPs immunocapturées en complément des images par fluorescence.

Les profils, les formes et les tailles mesurés par AFM confirment les données fournies/spécifications des NPs utilisées.

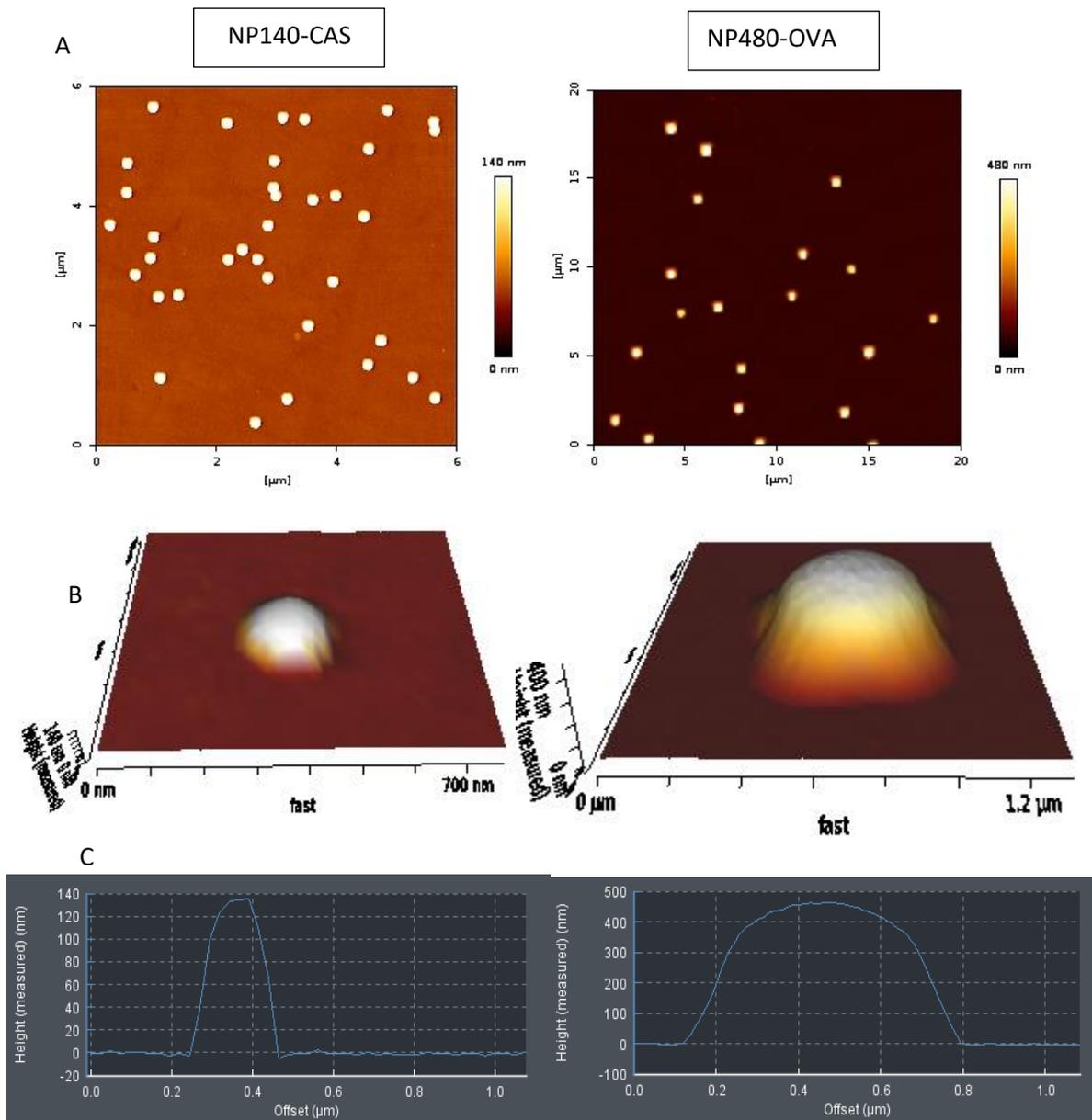


Fig. 2.25. Caractérisations de la densité surfacique par AFM sur les images de hauteurs (A), de la forme (B) et des profils (C) par des mesures métrologiques en mode QI pour les NP140-CAS et pour les NP480-OVA, piégées sur spot anti-CAS et anti-OVA respectivement.

L'ensemble des particules qui ont été développées dans cette partie a été utilisé pour nos expériences d'immunocapture, par nos collègues à Besançon (l'équipe ayant développé le dispositif acoustique, Claude Humbert dans le cadre de la validation d'un dispositif de mesure de masse) et par nos collègues du LAAS pour permettre de réaliser les expériences de tri et de capture. Avant l'utilisation des particules fonctionnalisées, des billes non fonctionnalisées avaient été utilisées pour réaliser les expériences de tri, mais lors de l'utilisation de nos particules, les constats positifs suivants ont été faits, signe de l'intérêt d'une biofonctionnalisation et de la qualité de nos lots :

- Les particules adhèrent moins aux surfaces que les particules non fonctionnalisées, ce qui permet de réutiliser les dispositifs de tri sans altération des résultats (en sachant que cela représente plusieurs semaines de fabrication pour le dispositif acoustique et plusieurs jours pour le dispositif de tri par filtration hydrodynamique).
- Les agrégats ne sont que des événements rares, ce qui permet de réaliser un tri avec des données fiables et non faussées par la présence d'agrégats.
- Les particules sont stables sur de longues périodes (jusqu'à 4 mois) avec des lots de grand volume (100µl, à fortes concentrations), ce qui permet de réaliser des expériences de mise au point, de validation et de reproductibilité de qualité.
- Préparation, qualification et fourniture de lots certifiés en 1 semaine.

Conclusion

Dans le cadre du développement de notre solution globale MADNESS, nous avons identifié le besoin de développement de particules modèles mimant les EVs, dans leur dimension, mais aussi dans leur capacité à être immunocapturées sur une biopuce. Le module NBA ne présente pas d'élément de transduction, mais simplement une biopuce d'or multiplexe biofonctionnalisée par différents anticorps. Nous avons donc développé des particules biofonctionnalisées ou calibrants, possédant des caractéristiques communes avec les EVs telles que la taille, la forme et la présence de protéines de surfaces permettant leur immunocapture sur une surface d'intérêt, afin de les utiliser comme indicateur à posteriori d'une procédure performante d'immunocapture des cibles biologiques au sein du module.

Nous avons choisi des particules submicrométriques qui couvrent la gamme de taille des EVs (140/480/920 nm) et qui viennent compléter les nanoparticules précédemment développées au laboratoire. Les particules ont été biofonctionnalisées avec la caséine ou l'ovalbumine. Le protocole de biofonctionnalisation initial a été optimisé (17 lots ont été préparés au cours de la thèse) pour atteindre des taux de couverture protéiques élevés et reproductibles sur les différentes NPs : soit $20\,500 \pm 6\,500$ OVA par NP480 et $3\,000 \pm 700$ CAS par NP 140. Plusieurs paramètres ont été améliorés, que ce soit la limitation des agrégats, l'amélioration de la passivation à la surface des NPs, la qualification (optimisation de la TRPS et du dosage) ou encore la stabilité dans le temps. La fonctionnalisation et la caractérisation des différents lots demandent une semaine complète de travail, en incluant les caractérisations morphomécaniques par AFM.

Pour ce faire, nous avons pu mettre en place notre propre stratégie de caractérisation basée sur les méthodes suivantes : TRPS, dosage protéique, SPRi et AFM. Nous avons ainsi pu estimer les proportions protéines/NPs, afin de qualifier nos lots et vérifier la reproductibilité de ceux-ci. Par biodétection, en SPRi sur puce multiplexe, nous avons pu vérifier que les NP140-CAS et NP480-OVA pouvaient être immunocapturées de façon sélective, reproductible et stable. Cette étape d'immunocapture est l'étape clé pour permettre de valider les différents lots. L'analyse par microscopie de fluorescence a confirmé la sélectivité de capture des NP480-OVA sur spots anti-OVA, sans réactions croisées avec les autres spots d'anticorps, les anti-CAS, présents sur la puce. Ces analyses par fluorescence ont également pu mettre en évidence que la capture était uniforme et homogène à l'échelle d'un spot (d'environ $2,25\text{ mm}^2$), et aussi reproductible sur l'ensemble des spots anti-OVA. De plus, ces images indiquent une fluorescence uniforme, signe à priori de l'absence d'agrégats particuliers, en solution ou sur la puce. Les observations par AFM confirment la distribution

en taille des différentes NPs piégées sur leurs immunoarrays, et permettent d'estimer les densités surfaciques des NPs sur leurs spots respectifs ainsi que sur les spots contrôle.

L'ensemble de ces informations nous a permis de fournir des nanoparticules calibrantes, biofonctionnalisées et qualifiées, de qualité que nous avons distribuée à l'échelle du groupe (dispositif acoustique, dispositif de tri par filtration hydrodynamique et projets annexes dans le groupe) et à nos partenaires. Ceci a conduit à une amélioration significative des expériences avec une reproductibilité plus grande, la limitation des interactions non spécifiques et la protection des dispositifs vis-à-vis de l'adsorption non réversible des nanoparticules dans les microcanaux. .

Chapitre 3 : module NBA, dispositif microfluidique d'immunocapture

Ce chapitre sera consacré à la présentation du module de piégeage des vésicules extracellulaires par immunocapture appelée module NBA : Il correspond à une miniaturisation de l'immunocapture de la plateforme NanoBioAnalytique développée au sein du laboratoire depuis 2017 (Thèses Obeid 2017 et Namasivayam 2021)^{155,156}. Ce travail a été le cœur de mes deux premières années de thèse, tout en étant accompagné en parallèle par le développement des particules calibrantes. Pour comprendre le travail réalisé, il faut revenir sur l'historique du groupe :

La plateforme NBA est composée d'une biopuce à résonance des plasmons de surface (SPR) qui constitue la pierre angulaire de la plateforme analytique. Insérée dans l'instrumentation d'imagerie SPR (SPRi), l'étape d'immunocapture des cibles biologiques (ici EVs) est réalisée en temps réel et sans marquage. Cette étape est suivie d'une étape de fixation au glutaraldéhyde (par réticulations des protéines) en vue de son stockage et de sa caractérisation *in situ* par différentes techniques microscopiques, en particulier l'AFM¹⁵⁷.

L'étape de miniaturisation va conduire à ajouter le module de tri (dans le cadre du projet ANR, il s'agit du dispositif de tri par filtration hydrodynamique), qui permettra une immunocapture de particule dans un échantillon complexe traité, qui sera déplété en particule de grandes tailles non désirées pour l'analyse. La figure 3.1 présente schématiquement les deux voies expérimentales de la plateforme, la voie classique utilisée (voie A) et celle qui a été développée dans ce projet (voie B).

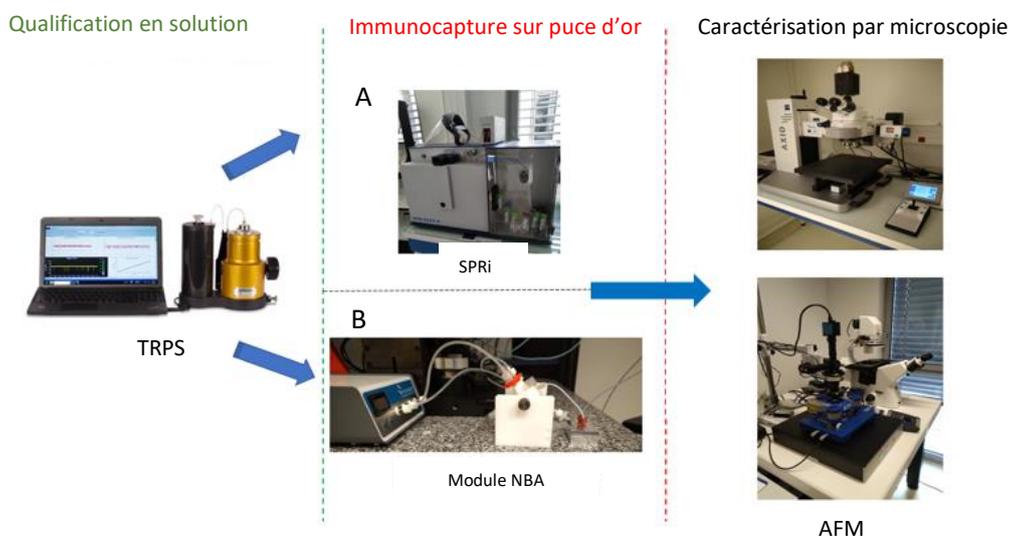


Fig. 3.1. Présentation de l'approche analytique de la plateforme NBA (voie supérieure, A) et de l'alternative développée au sein du projet MADNESS (voie B) se basant sur un « module d'immunocapture NBA ».

Ce module a pour objectif de reproduire les conditions de piégeage des EVs rencontrées au sein de l'instrumentation SPRi tout en proposant une simplification des protocoles expérimentaux (actionnement des fluides, ergonomie), une miniaturisation de l'instrumentation (banc expérimental minimal), économe en volume d'échantillon, accélérant la procédure analytique et potentiellement couplée à un module de tri disposé en amont. Les résultats attendus doivent être la mise en évidence de populations EVs spécifiquement immunocapturées grâce à un jeu de macro-spots (macro-arrays) présentant des anticorps de capture (spécifiques des calibrants, des EVs) et contrôles (anticorps non pertinents). En complément de ces analyses, une quantification par AFM sera réalisée afin d'obtenir des données permettant de caractériser l'échantillon. La pertinence de cette approche sera confrontée avec une procédure standard via la plateforme NBA. La validation de cette phase du projet permettra le couplage du module de tri (développé au LAAS) avec le module NBA. Ceci fera l'objet d'un travail exploratoire présenté en chapitre 4.

Le cahier des charges imposé dans le cadre du programme MADNESS peut être résumé ainsi :

- Développement et validation d'un dispositif d'immunocapture mimant la SPRi,
- Conception et réalisation d'une biopuce adaptée à ce nouveau dispositif,
- Validation d'un banc fluide pour le contrôle des écoulements et des séquences d'injections,
- Caractère modulaire du dispositif facilitant l'ergonomie,
- Versatilité et portabilité facilitant les tests inter laboratoires.

Au cours de ce chapitre seront présentées les étapes de conception, de réalisation et de caractérisations du dispositif. Une attention particulière sera portée sur l'étude comparative des performances en système SPRi et en module, cela à partir d'un jeu de particules biofonctionnalisées (dont les développements ont fait l'objet du chapitre 2 de la thèse) à savoir les NP140-OVA, NP480-OVA et les NP140-CAS.

La validation du fonctionnement optimal du module avec des particules calibrées permettra en fin de chapitre d'aborder la question des capacités du dispositif à investiguer un milieu complexe, dans notre cas des lysats plaquettaires appelés PPLs. L'objectif étant de vérifier la spécificité de l'immunocapture en milieu complexe et d'évaluer les paramètres influençant le rapport signal/bruit pour nos calibrants.

3.1 Développement du module NBA

3.1.1 La plateforme NBA : couplage, biodétection et imagerie AFM

Le développement du module NBA d'immunocapture nécessite de comprendre le fonctionnement de l'étape d'immunodétection au sein de la plateforme NBA :

La biopuce d'or à propriétés plasmonique conçue et réalisée au sein de la centrale de technologie MIMENTO de l'institut FEMTO-ST est un premier élément clé. Cette biopuce sera le support analytique des caractérisations au travers de la plateforme NBA. Son protocole de fabrication a été décrit dans la thèse de F. Rémy-Martin (2012)¹³⁸ qui s'est déroulée au sein du laboratoire FEMTO-ST et en partenariat avec la société HORIBA Scientific®. Après le dépôt d'or sur lame de verre, l'étape de fonctionnalisation chimique est réalisée en environnement contrôlé au sein de la biobox de la plateforme CLIPP (Salle blanche de la plateforme MIMENTO). Brièvement, une solution d'un mélange composé de 11-MUOH (11-mercapto-1-undécanol) et de 16 MHA (Acide 16-mercapto-1-hexadécanoïque) est préparée (en ratio molaire de 90/10). Après la réalisation du mélange dans un bain ultrason (ELMA®, puissance de 90 W à une fréquence de 50/60 Hz), la puce d'or est plongée dans la solution toute la nuit puis lavée à l'éthanol et à l'eau ultrapure avant d'être séchée. Cette étape permet de former une monocouche moléculaire autoassemblée (Self Assembled Monolayer ou SAM) qui sera activée chimiquement avec les réactifs EDC/sulfo-NHS (respectivement 50 et 200 mmol/L) pendant 30 min puis lavée/séchée (pour éliminer l'excédent de solutions). La puce sera ensuite modifiée avec le greffage des anticorps sur sa surface pour l'expérience de piégeage. La figure 3.2 présente une image de la puce d'or (avec l'indication de la zone principale d'interactions) accompagnée par une image de simulation des écoulements à 100 µl/min.

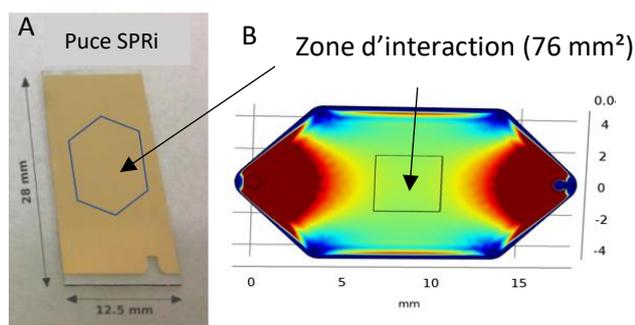


Fig. 3.2. Schéma représentatif des dimensions de la puce d'or : en A° surface de la puce d'or avec la zone fluidique délimitée par le joint représenté ici en bleu, en B° présentation d'une image de simulation avec le logiciel Comsol® de l'injection de tampon dans la cellule fluidique à 100µl/min.

Une fois la surface de la puce d'or activée chimiquement par l'EDC/sulfo-NHS, les anticorps sont déposés/spottés pour établir des liaisons amide entre leurs fonctions amines primaires et la surface chimique active à travers les fonctions carboxyliques activées (ester) présentes sur la surface de la puce. Grâce à un spotter manuel décrit en figure 3.3, une matrice de gouttelettes de 200 à 300 nL est constituée permettant un « patterning » de la surface selon un schéma incluant les anticorps d'intérêt en duplicat ou triplicat et des ligands contrôles.

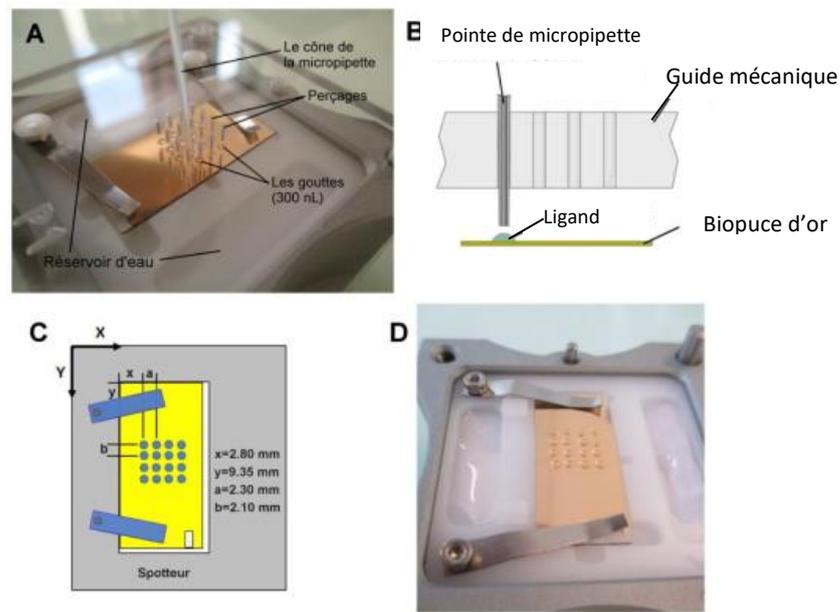


Fig. 3.3. Présentation de la méthode de greffage d'anticorps sur la surface de la puce d'or : A° image présentant le masque et le spotter, B° schéma représentant la méthode de dépôt, C° cartographie du positionnement des spots, D° puce d'or représentée avec les gouttes d'anticorps en surface¹⁵⁵.

Une étape d'incubation en bain ultrason est réalisée permettant le greffage des anticorps en monocouche de haute densité (de l'ordre de 10-30 femtomoles/mm²). À l'issue du lavage de la surface, un pattern de spot est créé et la phase finale de préparation de la puce est généralement conduite au sein de l'instrumentation SPRI. Il s'agit d'une phase de passivation de la surface par injection d'une solution protéique utilisée comme agent bloquant dans le but de limiter de futures interactions non spécifiques. Cette injection sera suivie par celle d'éthanolamine pour désactiver des fonctions carboxyliques activées encore disponibles pour le greffage. La biopuce est alors prête à l'emploi pour l'étude d'un échantillon en configuration multiplex. À l'issue du processus d'injection de l'échantillon, le signal d'immunocapture peut être mesuré et une analyse par spot ou globale par famille de ligands peut être effectuée. Dans la perspective d'une analyse ultérieure par microscopie, la procédure inclut une étape de fixation du matériel par un agent pontant (glutaraldéhyde, annexe 3 .1)¹⁵⁸ au sein du

SPRi. Puis la puce est extraite du SPRi pour être analysée en air, après séchage, par microscopie à force atomique (AFM).

Cette combinaison instrumentale permet de quantifier par immunocapture les EVs dans un échantillon biologique complexe (ce qui constitue une première sélection selon le phénotype) et d'y adjoindre une caractérisation morpho-mécanique des EVs permettant l'établissement de leur distribution en taille.

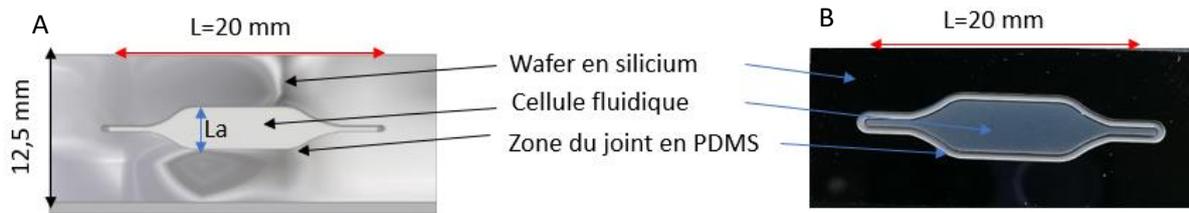
Dans notre dispositif miniaturisé, nous voulons garder la configuration de biopuce et le modèle d'immunocapture, nous avons choisi de construire notre dispositif autour de la puce d'or que nous conserverons identique pour cette première version du projet :

Les dimensions de la puce d'or, qui ont été présentées dans la figure 3.2 sont de 28 mm de longueur, 12,5 mm de largeur et 500 μm d'épaisseur. La surface concernée par les écoulements fluidiques dans l'appareil SPRi suit une géométrie de type hexagonale et présente une surface totale de 300 mm^2 . La zone d'interaction est limitée par l'appareil à une surface de 76 mm^2 . La hauteur de la chambre fluidique étant de 75 μm , le volume de la cellule fluidique est donc de 15 mm^3 soit 15 μl (la zone est définie à l'aide d'un joint qui délimite le contour de la cellule fluidique). Une prise en compte de ces paramètres et une simulation différentielle des écoulements permettront de définir une géométrie finale au sein du module conduisant à une homologie de fonctionnement avec le SPRi.

3.1.2 Conception et réalisation du module NBA

Design du module NBA

La chambre fluidique que nous avons réalisée est matérialisée par la juxtaposition d'une puce d'or et d'un capot en silicium, dans lequel la cellule fluidique sera gravée selon les caractéristiques présentées en figure 3.4. Une gravure supplémentaire, plus profonde, délimite la périphérie de la chambre (figure. 3.4 B) par l'insertion d'un joint en polymère dont l'épaisseur assure l'étanchéité et la hauteur de la chambre après assemblage des trois parties. Les ouvertures au niveau de la cellule fluidique vont permettre une circulation de liquide.



	Module NBA	SPRi
Longueur (mm)	20	20
Largegr (mm)	4	9,5
Hauteur (μm)	75	80

Fig. 3.4. Présentation de la cellule fluidique du module NBA. En A° schéma représentatif de la cellule fluidique, en B° image réelle après fabrication en salle blanche et en C° tableau récapitulatif des différentes dimensions des chambres fluidiques.

Pour réaliser les cellules fluidiques, les masques lithographiques ont été dessinés par CAO par moi-même. Les masques sont réalisés selon les schémas CAO présentés dans la figure 3.5 :

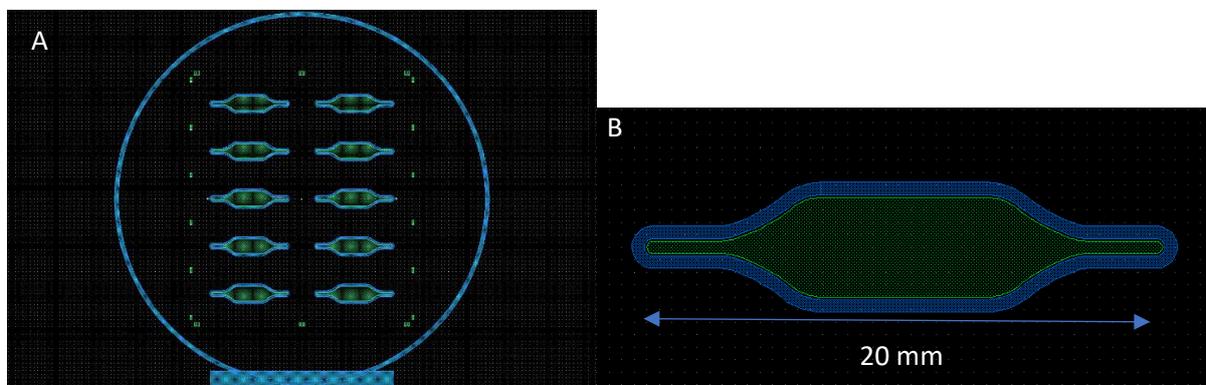


Fig. 3.5. Représentation des masques développés pour la fabrication des cellules fluidiques qui sont adaptés à un wafer en silicium de 4 pouces. Sur chacune des images est représenté en vert la partie gravure concernant la cellule fluidique et en bleu la zone de gravure correspondant à l'emplacement du joint en PDMS. En A° sont représenté l'ensemble des cellules sur un wafer de 4 pouces (10 cm) alors qu'en B° est représenté une cellule individuelle. Les figures ont été réalisées avec Layout Editor® et Inventor®.

Le processus collectif de microfabrication conduisant à la production de 10 cellules par wafer est présenté en Annexe 3.2 et peut-être décrit brièvement de la manière suivante :

- CAO (conception assistée par ordinateur) des masques
- Développement des masques pour la cellule, les ouvertures fluidiques et le joint
- Dépôt de résine sur les wafers en silicium 4 pouces

- Gravure plasma en DRIE pour la cellule, puis pour les ouvertures et la position des joints
- Étape de nettoyage
- Découpe de chaque cellule à la scie

Le joint en PDMS (Polydiméthylsiloxane), délimitant la cellule fluïdique, est fabriqué de manière collective par spin coating et moulage sur un wafer usiné selon les caractéristiques dimensionnelles du périmètre de la cellule fluïdique, comme présenté sur la figure 3.6 :

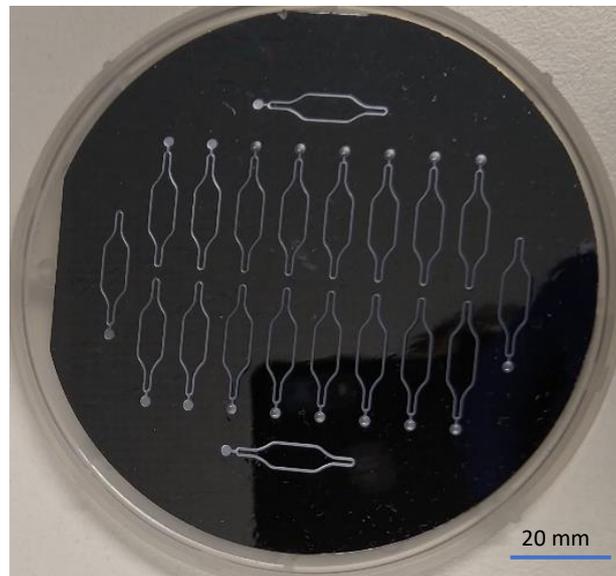


Fig. 3.6. Image des joints en PDMS réticulé sur le masque spécialement conçu pour être inséré à l'emplacement prévu sur la cellule fluïdique.

Une fois le PDMS réticulé, les joints sont découpés au scalpel sous microscope un à un et logés dans le sillon gravé qui délimite le périmètre de la cellule fluïdique (zone bleue de la figure 3.5). Après conception et fabrication des éléments, un packaging du module et de l'élément biopuce est effectué. Une description transversale est montrée sur la figure. 3.7 :

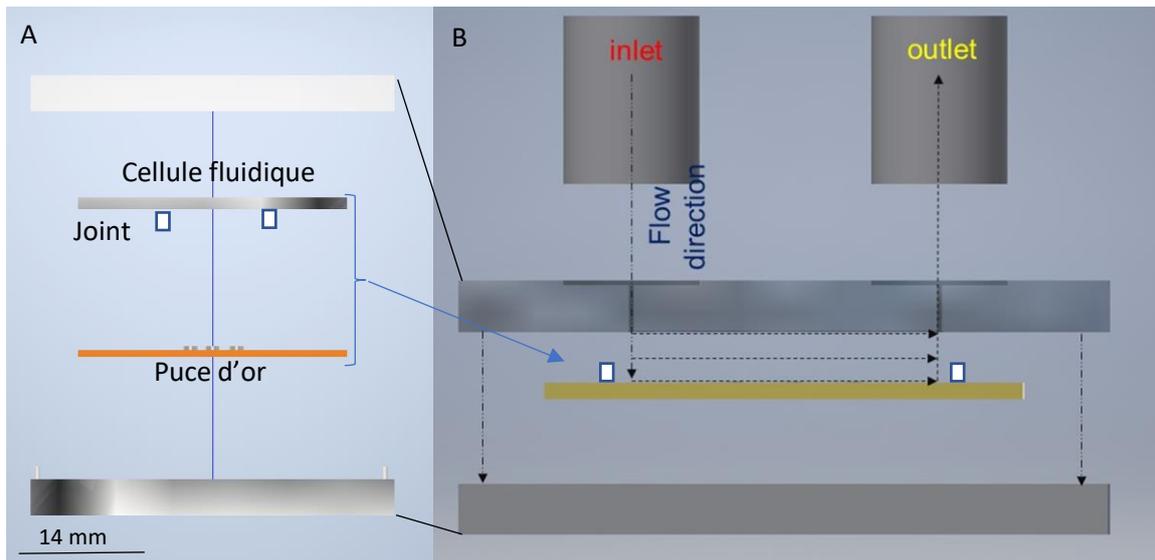


Fig. 3.7. Représentation schématique du dispositif et principe d'écoulement de la solution dans le dispositif. En A° image de synthèse en perspective éclatée du dispositif, en B° image incorporant les flux d'écoulements.

L'assemblage des éléments est assuré par un système de serrage reposant sur un jeu de vis (4 vis placées aux quatre coins du rectangle que représente le capot). Le système de serrage assure mécaniquement la hauteur de la cellule fluïdique. La mise en place se fera par un support permettant de placer les puces (cellule fluïdique et puce d'or) puis le capot. La représentation de la préparation de la puce peut être observée sur la figure 3.8 :

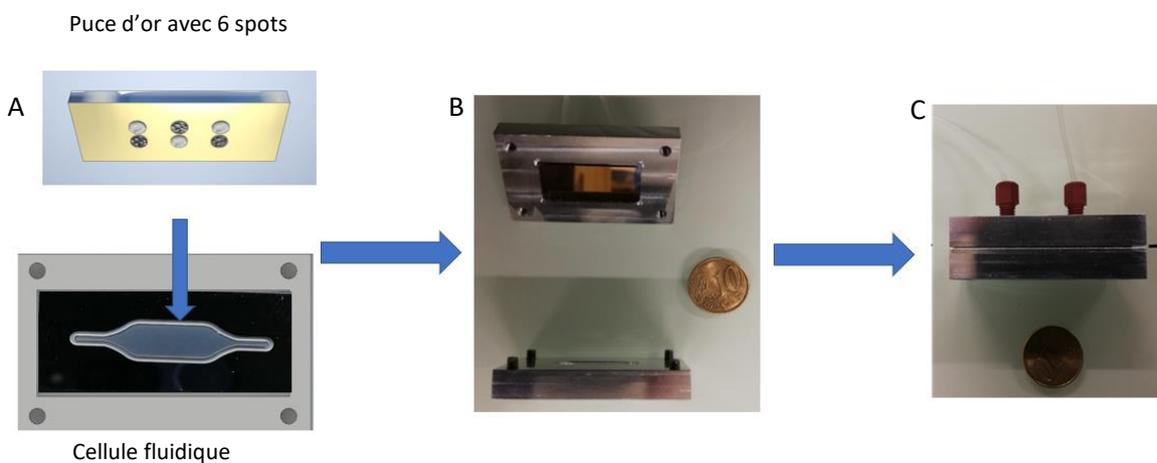


Fig. 3.8. Préparation du dispositif pour réaliser les expériences d'injection des solutions contenant les particules qui seront immunocapturées : en A° placement de la puce d'or en parfaite correspondance avec la cellule fluïdique, en B° fermeture du système avec les 4 vis adéquates et en C° système clos pour l'injection des solutions.

Une fois le module prêt, nous connectons le dispositif avec les tubulures adaptées selon le schéma de la figure 3.9, afin de permettre la circulation des solutions injectées dans le module NBA, en sachant que la commande fluide sera assurée par un contrôleur en pression (Fluigent®) permettant les écoulements à des pressions maîtrisées :

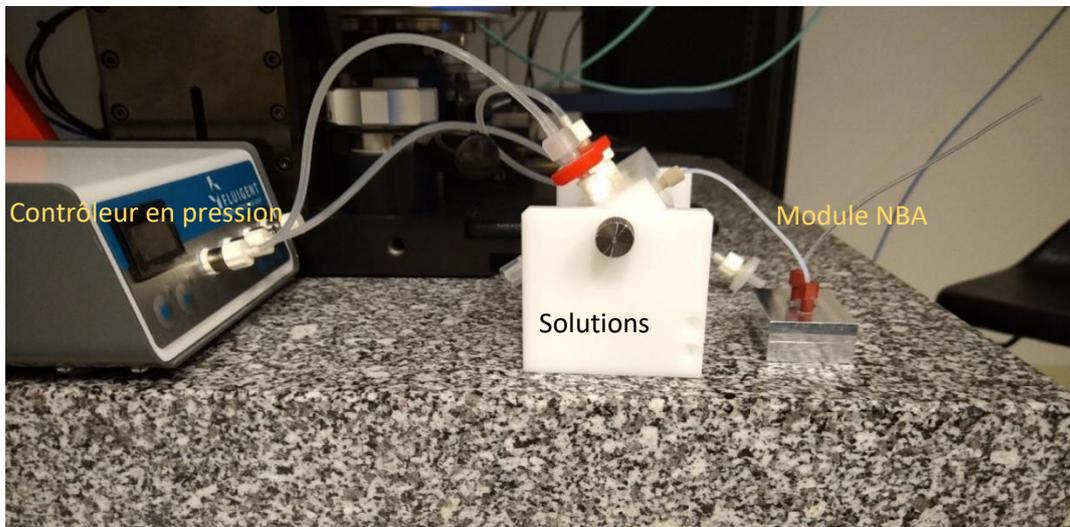


Fig. 3.9. Photographie du banc expérimental lors d'une expérience d'immunocapture ou de mise en flux du module NBA.

En fin d'expérience, le dispositif est déconnecté, déverrouillé et la puce d'or est collectée. Des analyses complémentaires seront réalisées (notamment par AFM).

Pour réaliser les expériences d'immunocapture, des simulations ont été réalisées en amont afin de démontrer que l'immunocapture sur module NBA, par injection en pression, reproduit les expériences d'immunocapture sur SPRI avec un contrôleur en débit.

Simulation des écoulements dans les cellules fluidiques SPRI versus module NBA

Une analyse à l'aide du logiciel COMSOL® des paramètres fluidiques au sein de la cellule fluide de l'instrumentation SPRI est représentée en figure 3.10, ainsi que celle du module NBA. L'objectif de la simulation est de déterminer les variations de taux de cisaillement en fonction des pressions/débits appliqués pour une géométrie qui a été fixée parmi plusieurs pour être dans des conditions cinétiques d'interaction voisines de celles du système SPRI :

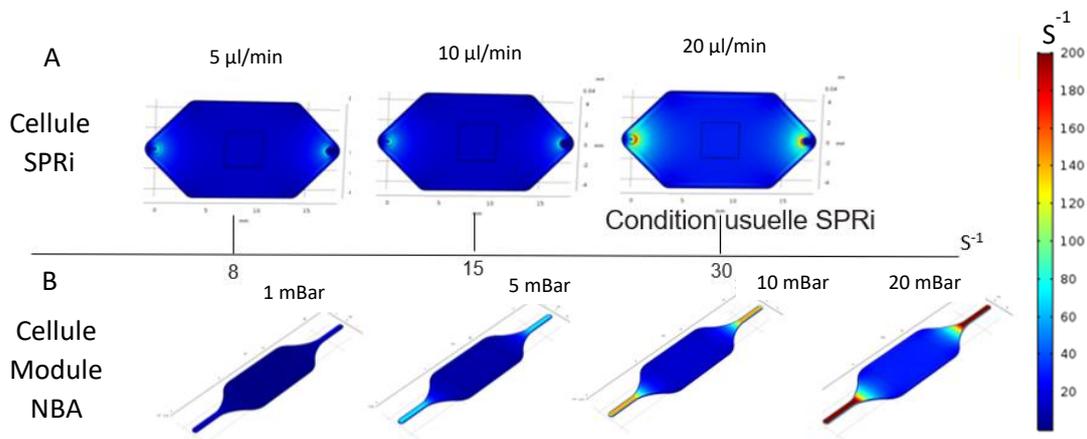


Fig. 3.10. Évolution des taux de cisaillement (s^{-1}) en module SPRi (A) et NBA (B) selon le débit/pression appliqué. La zone centrale correspond à la zone d'interaction principale où les anticorps seront greffés. Ces données ont été obtenues avec l'aide du Dr Aleksandr Oseev.

Il est important de constater qu'à des valeurs faibles de débit/pression les écarts de taux de cisaillement sont faibles entre les deux systèmes alors qu'ils peuvent être plus importants pour des valeurs qui sont proches de 100 $\mu\text{l}/\text{min}$ (ou 50 mbar en pression). Ceci est intéressant pour notre étude, car cela montre que notre gamme de débit/pression de travail ne doit pas excéder ces valeurs, pour ne pas atteindre des conditions fluidiques qui soient trop différentes entre les deux modèles, pour ainsi permettre une comparaison entre les deux systèmes. Nous travaillerons avec des valeurs de 20 $\mu\text{l}/\text{min}$ en SPRi et de 8 mbar avec le module NBA, comme nous le verrons dans le tableau 3.2.

Il est important de noter que la géométrie est guidée sur la base des contraintes suivantes :

- Afin de permettre un couplage entre la sortie latérale de faibles dimensions du dispositif de tri et l'entrée de notre module NBA, nous avons réalisé une zone d'entrée de faible dimension pour permettre l'introduction des échantillons sans perte de fluide (limitation du volume mort).
- La forme de la cellule est arrondie sur certaines portions pour limiter l'apparition et le piégeage de bulle d'air.
- Pour limiter la perte/l'utilisation de volume important, les dimensions de la cellule fluide du module sont réduites ne nécessitant plus qu'un volume de 4 μl pour remplir la cellule. Nous pouvons également noter que cela permet de limiter l'hétérogénéité d'interaction entre les analytes et les anticorps en confinant les écoulements dans une zone de plus faible dimension.
- Les écoulements sont laminaires (nombre de Reynolds) et les résistances des deux dispositifs sont calculées de telle sorte que la résistance soit plus faible dans le module NBA que dans le module de tri (facteur 100 entre les deux valeurs)¹⁵⁹ pour permettre la circulation de fluide entre les deux modules.

L'approche Comsol®, au travers des simulations d'écoulement en fonction des pressions imposées dans une chambre fluide à géométrie modulable, nous permet de contribuer à la définition des paramètres dimensionnels les plus en phase avec le projet tout en permettant une représentation des taux de cisaillement (cartographie). Ainsi nous pouvons utiliser les données générées pour mimer des conditions d'écoulement fluide quasi équivalentes pour les deux systèmes tout en tentant de réduire d'éventuelles perturbations inhérentes au système commercial. Les principales caractéristiques des deux dispositifs sont présentées dans le tableau 3.1 :

Paramètres de la cellule fluide.	SPRi	Module NBA
Largeur (mm)	9,5	4
Hauteur (mm)	0,08	0,075
Section (mm²)	76	40
Taux de cisaillement* (s⁻¹)	32,9	88,9
Volume (μl)	15	4
Vitesse écoulement (mm/s)	0,4	0,8

Tab. 3.1. Comparaison des caractéristiques des différents systèmes après avoir choisi les paramètres géométriques adéquats. * pour un débit de 20μl/min, soit une pression de 8 mBar

Nous avons ainsi pu développer notre module NBA, après plusieurs mois de réflexion et de fabrication qu'il faut désormais évaluer à travers différentes expériences qui seront décrites dans les parties suivantes. L'écart entre les taux de cisaillement calculés est considéré comme suffisamment faible permettant de conserver le mode d'interaction sans modification de l'étape de capture.

3.2 Caractérisation des écoulements et mesure de débit

La première étape de la caractérisation de notre dispositif a été de déterminer les débits obtenus dans notre module selon la pression appliquée. Pour déterminer ces valeurs, deux expériences distinctes ont été réalisées. Le protocole mis en place est le suivant :

- Insertion d'une puce d'or dans le système et fermeture
- Amorçage du système par injection d'une solution d'eau ou de tampon PBS à forte pression
- Injection à T=0 de la solution avec une pression de consigne
- Arrêt et collection à T=2min
- Pesée du contenant avec la solution
- Répétition (triplicat)
- Changement de pression

Les résultats obtenus sont les suivants, avec une gamme large dans un premier temps puis une gamme plus resserrée dans la zone de débit qui correspond aux expériences SPRI. Les résultats sont présentés dans le tableau 3.2 ainsi que dans la figure 3.11.

Pression en mbar	Débit en $\mu\text{l}/\text{min}$	Écart type
5	6	0,5
8	20	1,7
10	35	2,8
15	73,3	6
20	110,9	8,9
25	137,6	11
30	186,5	15
35	236,3	19
40	255,8	21

Tab. 3.2. Déterminations des débits de sortie en fonction des pressions appliquées sur le contrôleur en pression.

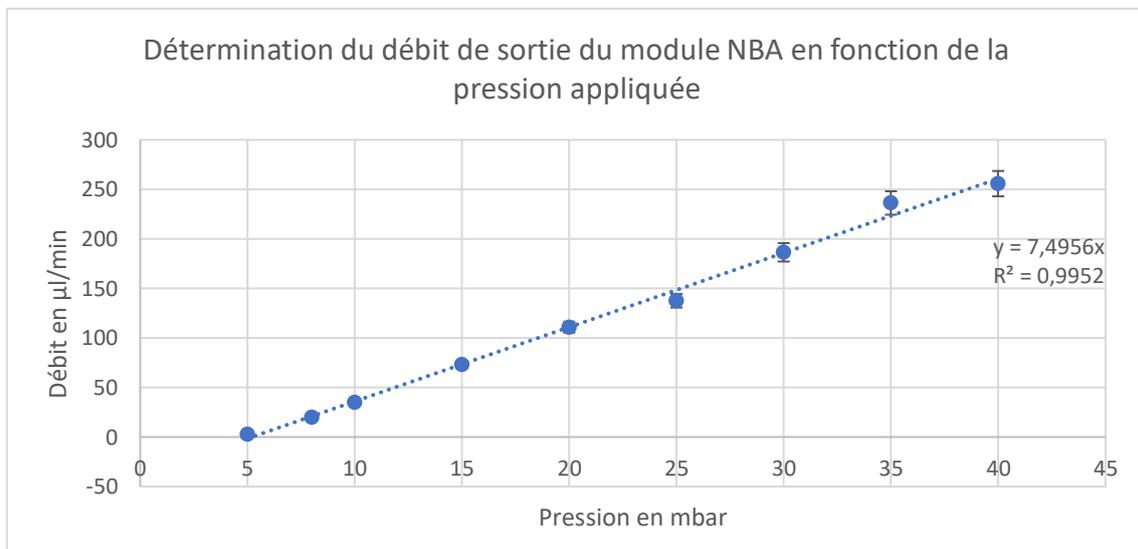


Fig. 3.11. Détermination du débit ($\mu\text{l}/\text{min}$) en sortie du module NBA sur une plage réduite de pression appliquée entre 5 et 40 mbar.

À partir des résultats obtenus sur la figure 3.11, nous pouvons constater une linéarité entre la pression appliquée et le débit obtenu en sortie, le système d'injection en pression ne permet que l'injection de 1,5 ml de solution, entraînant des expériences trop courtes pour les forts débits, la gamme de débit testé est bornée entre 5 et 40 mbar. Le système est dans sa configuration complète, c'est à dire équipé d'une puce d'or pour éviter les fuites et nous pouvons constater que les résultats

sont reproductibles après réalisation de plusieurs expériences sur plusieurs montages et la détermination d'un écart type faible.

À partir de ces informations sur les débits et les taux de cisaillement (Tableau 3.1, figure 3.10 et tableau 3.2), nous pouvons établir un protocole d'injection des solutions qui est basé sur le protocole expérimental en SPRi et qui est extrapolé pour le module NBA. La gamme de travail dans le cadre de notre étude portera sur une zone de pression allant de 0 à 20 mbar. Ce protocole est présenté dans l'annexe 3.3 montrant notamment les équivalences entre le protocole SPRi (avec des injections en $\mu\text{l}/\text{min}$) et celui en module NBA (avec des injections en pression).

3.3 Performances d'immunocapture en conditions idéales

Les expériences pour tester les performances du module NBA sont mises en place afin de permettre une comparaison entre les résultats d'immunocapture en système SPRi et celui du nouveau modèle, en injectant les particules calibrantes précédemment fonctionnalisées. Il s'agit ici d'immunocapter les particules dans le SPRi et dans le module NBA puis de réaliser des étapes de qualification et de quantification afin de déterminer les conditions d'utilisation des particules et leur réactivité dans les deux modèles. Pour déterminer si les réponses de capture permettent d'utiliser le module NBA dans des conditions fiables, la quantification qui consiste en un dénombrement du nombre de particules par mm^2 par AFM est effectuée par la méthode décrite dans le chapitre 2, dont les principales étapes sont résumées ci-dessous :

- a) La surface des différents spots est scannée dans le but de détecter au moins 300 particules et environ 15 images (nécessaire pour avoir suffisamment d'objets et avoir une surface scannée significativement représentative de la surface du spot).
- b) Une fois les images collectées, elles sont traitées sous Gwyddion® en exploitant entre autres un seuil de coupure à une hauteur permettant de compter le nombre de particules sur les images, même en cas de présence d'agrégats (en se plaçant à proximité du sommet des particules pour les distinguer).

Les particules biofonctionnalisées NP480-OVA et NP140-OVA vont servir à évaluer les gammes dynamiques d'immunocapture ainsi que les limites de détection des deux particules. Cet ensemble d'expérience permettra de valider le dispositif avant de complexifier le jeu de calibrant disponible.

3.3.1 Modèle 1 : NP480-OVA

*SPRi

Dans le SPRi, les NP480-OVA sont injectées à différentes concentrations allant de $5 \cdot 10^6$ à $5 \cdot 10^8$ part/ml, basées sur des gammes usuelles d'injections¹³⁸. La figure 3.12 présente une des réponses d'immunocapture pour une concentration de $5 \cdot 10^8$ particules/ml.

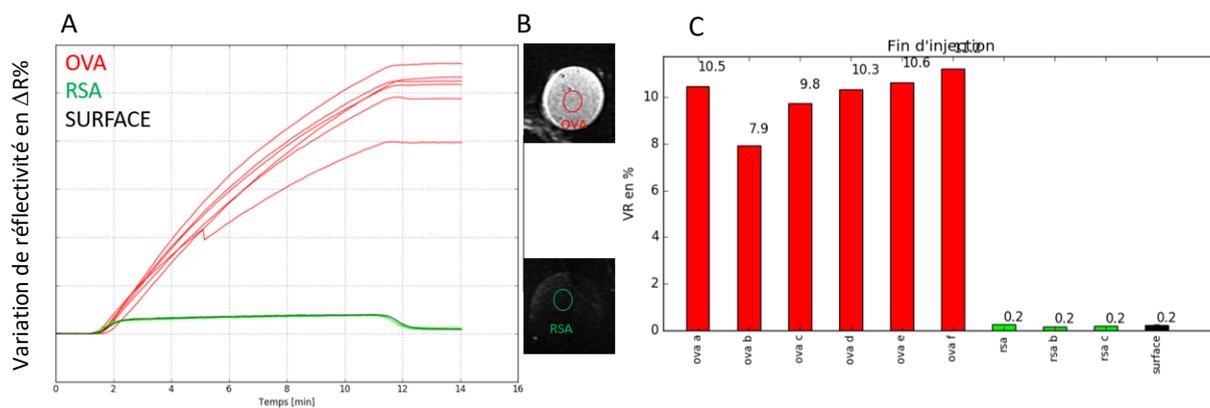


Fig. 3.12. Expérience d'immunocapture des NP480-OVA (à $5 \cdot 10^8$ particules/ml) dans l'appareil SPRi, en A° sensorgramme de l'immunocapture (variation de réflectivité en fonction du temps pour 6 spots anti-OVA et 3 spots contrôles) pour une injection de 10 min à $20 \mu\text{l}/\text{min}$, en B° image de contraste après capture et en C° histogramme des taux de capture spot par spot.

Dans cette expérience, le taux de capture moyen SPRi est $10.05 \pm 1,12 \Delta R\%$ contre $0,2 \pm 0 \Delta R\%$ pour les autres spots (surface et spot RSA) qui correspondent aux contrôles. Les particules NP480-OVA réagissent fortement et spécifiquement sur les spots anti-OVA. En effet, les faibles réponses en SPRi ainsi que les images en microscopie à fluorescence nous montrent que la présence de particules sur les spots contrôles est un événement rare.

Le bilan des résultats d'immunocapture SPRi sur la gamme $5 \cdot 10^6 - 5 \cdot 10^8$ particules/ml est présenté en figure 3.13 :

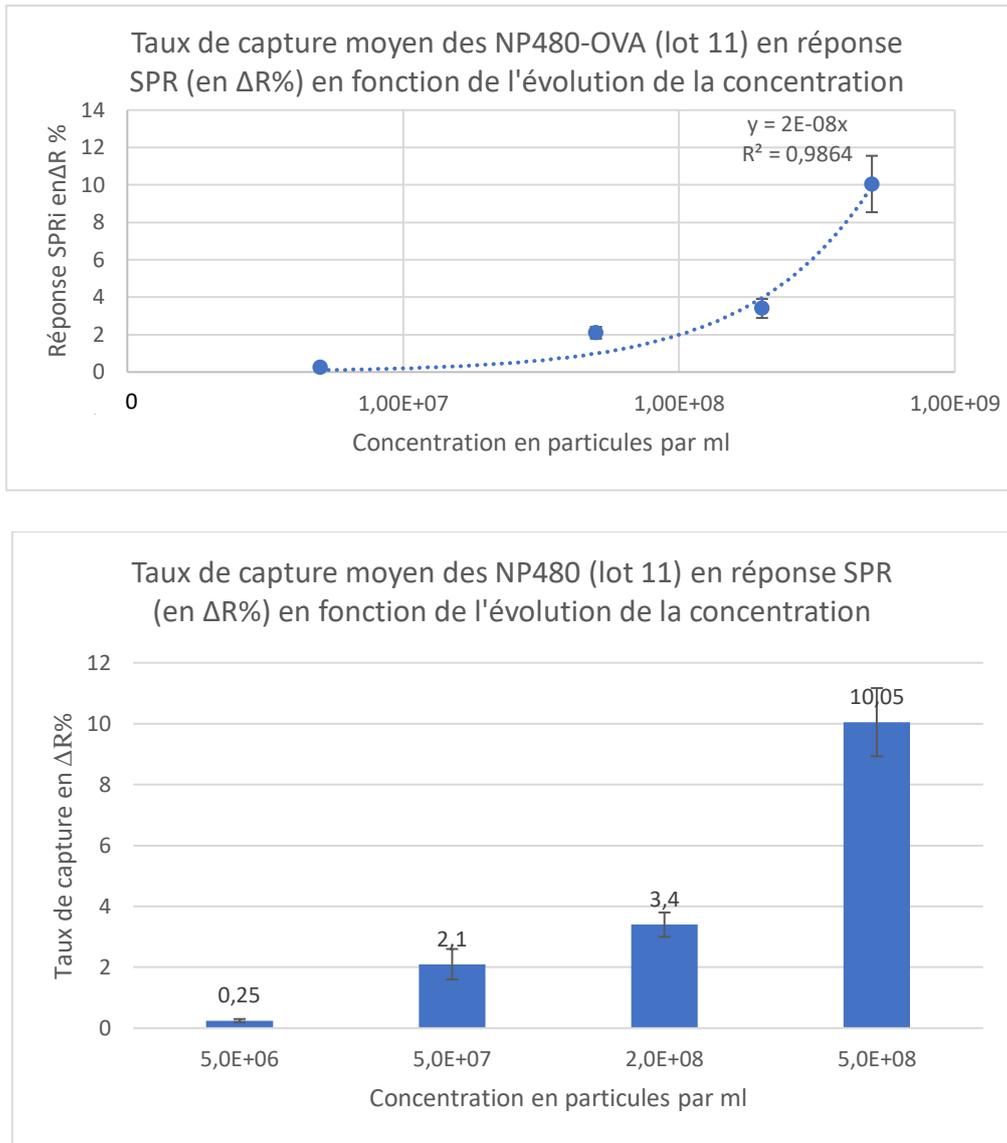


Fig.3.13. Évolution du signal SPR lors de l'injection des NP480-OVA en fonction des variations de concentration présentée à la fois sous forme graphique et sous forme d'histogramme.

Nous pouvons observer que l'évolution des signaux SPR augmente en fonction de la concentration et que cette évolution peut aller au-delà de la valeur de $5 \cdot 10^8$ part/ml qui a été choisie sur la base de résultat précédent (en effet 10 $\Delta R\%$ de variation de réflectivité en SPRi de capture ne correspond pas à un maximum de capture, car nous pouvons réaliser des captures allant jusqu'à 20 $\Delta R\%$). Nous considérons qu'un taux de capture de 10 $\Delta R\%$ est une valeur de travail forte pour détecter et réaliser des analyses post-traitement. En effet, normalement nous considérons que 1 $\Delta R\%$ de capture correspond à une valeur suffisante pour effectuer le traitement de nos puces par AFM.

Les données d'immuno-capture, sur les spots anti-OVA et sur les spots contrôles, nous montrent que l'immuno-capture des NP480-OVA est spécifique. Cette gamme va permettre de

déterminer la valeur de capture de façon prédictive pour les expériences suivantes avec les mêmes particules en SPRI.

La réponse plasmonique ne peut être convertie directement pour ce type de particules en quantité de matière par unité de surface ni en densité de particules par unité de surface, aussi nous avons engagé des analyses de microscopies pour qualifier les spots d'immuncapture et consolider les valeurs expérimentales. La microscopie permet de confirmer la localisation des particules fluorescentes (une corrélation entre le niveau de gris et la concentration est réalisée) et de montrer l'absence de ces particules sur le reste de la surface.

La fluorescence permet de déterminer la localisation des particules fluorescentes dans un premier temps, et dans un second temps l'évolution des valeurs de niveau de gris permet de montrer l'évolution de l'intensité avec l'augmentation de la concentration. Les résultats d'imagerie en fluorescence sont présentés sur la figure 3.14.

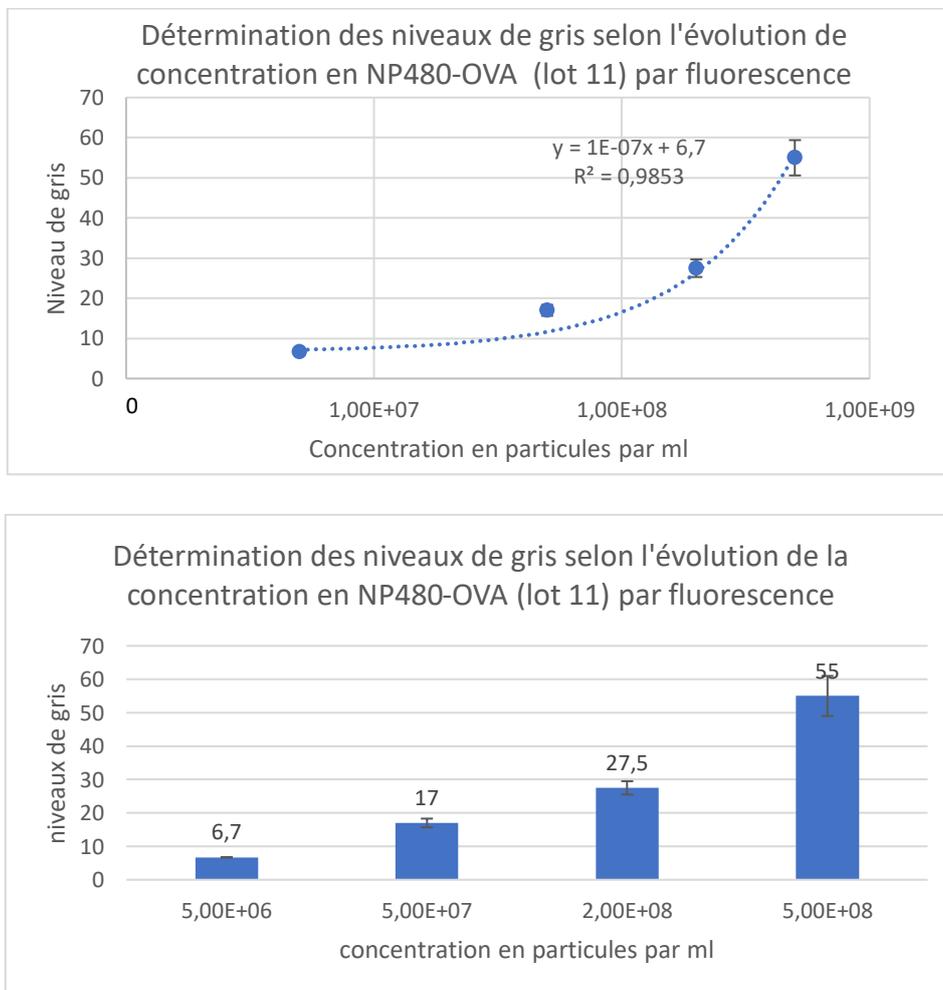


Fig. 3.14. Évolution des niveaux de gris en microscopie à fluorescence selon les variations de concentrations présentées à la fois sous forme graphique et sous forme d'histogramme.

Les images par fluorescence (figure. 3.15) montrent qu'il y a une augmentation de l'intensité de fluorescence avec l'évolution de la concentration permettant une prédiction et un suivi in situ par microscopie de la capture des NP480-OVA pour une première phase d'analyse rapide avant l'analyse plus poussée en AFM. La valeur de 5.10^6 part/ml correspond à la valeur la plus faible détectable (confirmation par SPRI). Il est à noter que d'après nos résultats, nous pouvons utiliser la fluorescence à partir de 10^7 part/ml. Nous voulons mettre en place une analyse et une lecture rapide en fluorescence pour vérifier la cohérence des résultats obtenus, avant d'entamer des étapes longues de post-traitement. En effet, pour prévenir la phase de couplage entre le module de tri et le module de capture, nous savons que nous n'aurons pas d'AFM lors de nos campagnes de couplage à Toulouse pour analyser les puces d'or, mais nous aurons accès à la même technologie de microscopie à fluorescence. Les images en fluorescence et la présence des NP480-OVA dans l'échantillon nous permettent de vérifier en fin d'expérience la bonne réalisation de l'immunocapture et d'apporter les modifications de protocoles le jour même en cas d'incohérence.

Une investigation de la surface sur une sélection de spots par AFM a permis d'effectuer un dénombrement des particules par unité de surface et de proposer une densité appelée ici « Taux de capture » selon la méthodologie développée. La figure 3.15 montre un échantillonnage représentatif des spots d'immunocapture obtenus sur la gamme de concentration $5 \cdot 10^6$ - $5 \cdot 10^8$ particules/ml.

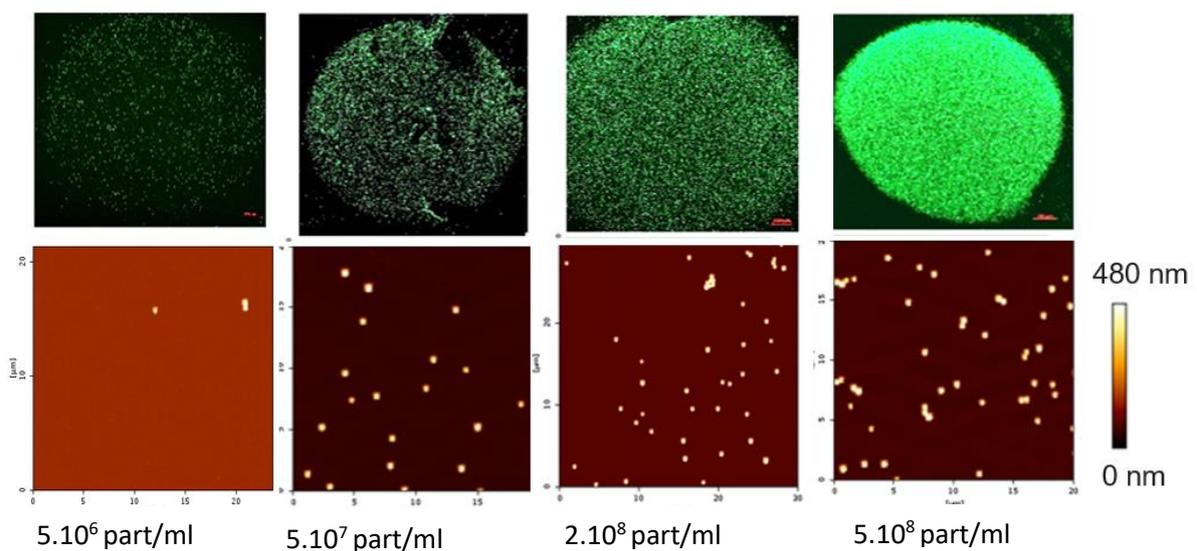


Fig. 3.15. Présentation des images de fluorescence en A° sur un spot par puce d'or accompagné par les images AFM en B° en mode Qi permettant par la suite de dénombrer le nombre de particules par unité de surface en fonction de l'évolution de la concentration. Z scale = 480 nm.

Sur ces images, nous pouvons observer par microscopie à fluorescence et par AFM, l'augmentation de la quantité de particules fluorescentes capturée sur la zone des spots anti-OVA avec

l'augmentation de la concentration. En parallèle, les images de contrôles nous montrent l'absence de ces particules sur la surface.

La figure 3.16 présente les taux de capture de particule NP480-OVA déterminés en AFM pour les puces issues d'une expérience en SPRI.

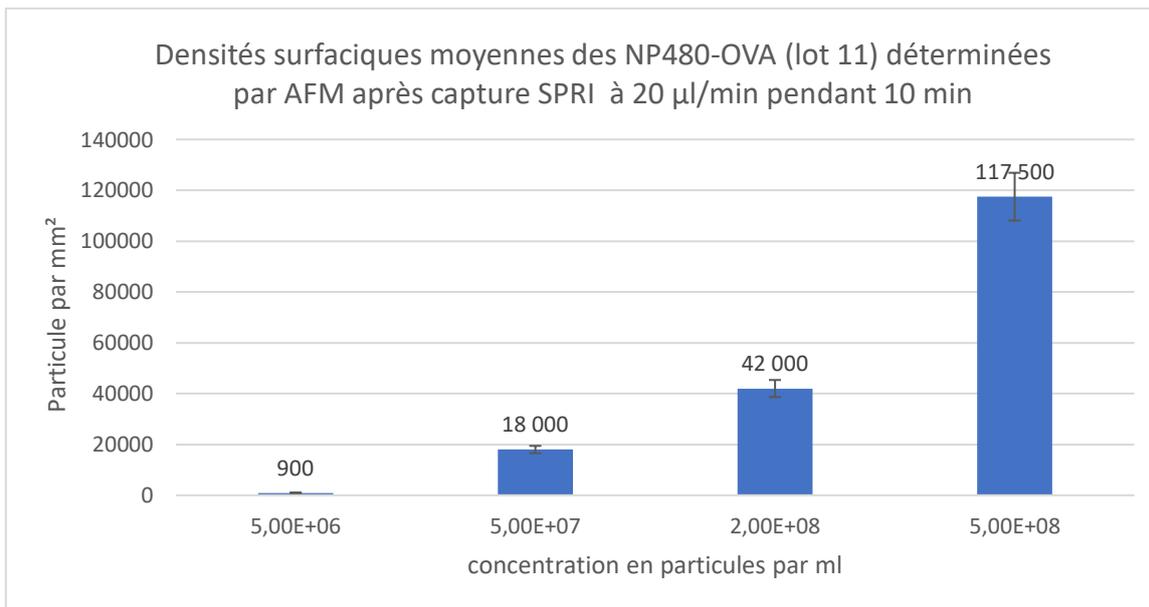
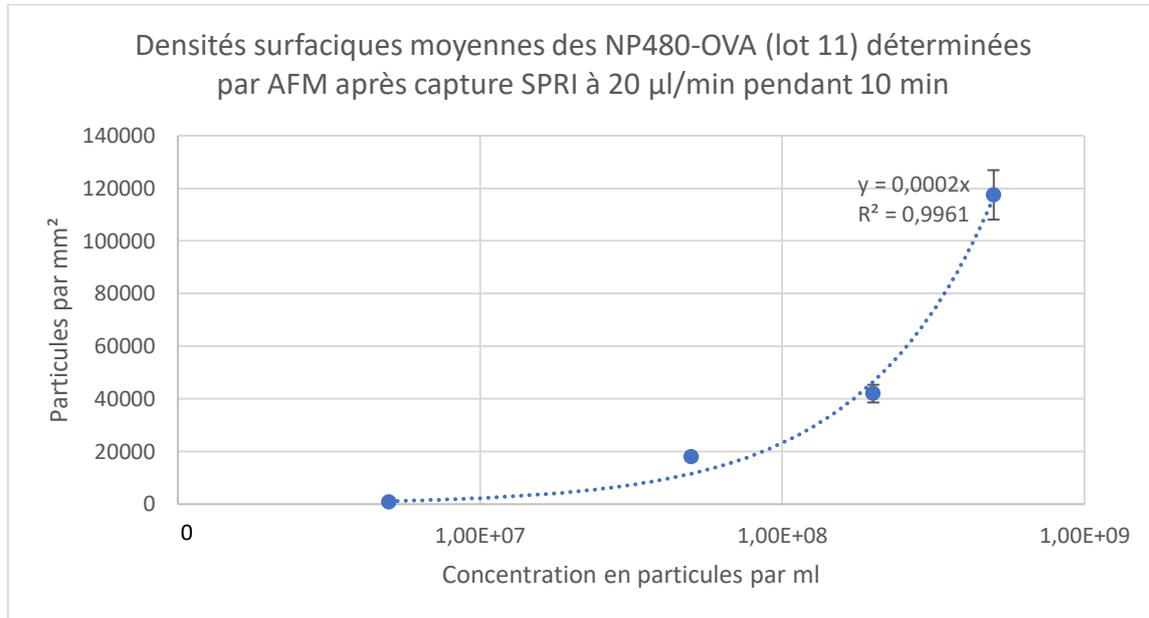


Fig. 3.16. Étude de la gamme dynamique de capture des NP480-OVA des taux de capture (AFM) obtenue selon la variation de concentration d'injection en SPRI présenté à la fois sous forme graphique et sous forme d'histogramme. N=15, >300 particules comptées

Les analyses montrent une augmentation entre le nombre de particules comptées par unité de surface et l'évolution de la concentration. Nous pouvons donc conclure que les NP480-OVA peuvent

être utilisés pour des concentrations allant de 10^7 part/ml à plus de $5 \cdot 10^8$ part/ml. La gamme dynamique est démontrée sur l'intégralité de la plage en concentrations, mais pour des raisons de confort de dénombrement et de nano caractérisation des particules, nous préconisons de travailler à $5 \cdot 10^8$. En effet, la valeur de $5 \cdot 10^8$ part/ml ne correspond pas à la saturation, que ce soit en AFM ou en SPRi, mais il s'agit d'une concentration où la quantité de particules immunocapturée est très forte.

À partir de l'ensemble de ces données, nous pouvons corréliser le signal SPRi avec le taux de capture en AFM pour déterminer que $1\Delta R\%$ de taux de capture de NP480-OVA correspond en moyenne à $8\,174 \pm 2\,030$ particules/mm² (valeur moyenne sur la base des différents résultats obtenus $n = 12$, en excluant la valeur la plus grande).

*Module NBA

La procédure expérimentale de validation de l'étape d'immunocapture en module NBA sera effectuée pour 3 concentrations différentes et en triplicat (dans la gamme déterminée) selon le protocole décrit en annexe 3.2. Dans le cadre du module, la puce d'or est préparée de la même manière que les étapes de préparation en SPRi, mais la puce ne contient que 6 spots : 3 des spots correspondent aux spots anti-OVA et les 3 autres aux spots contrôles (figure 3.17).

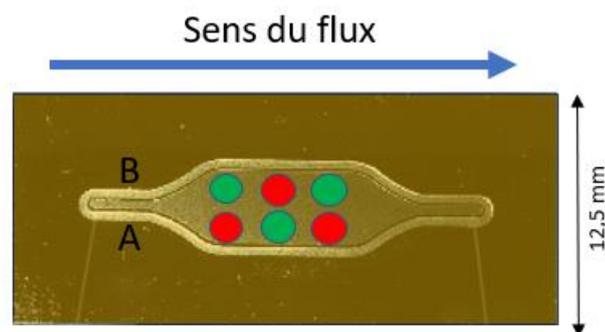


Fig. 3.17 présentations du pattern de greffage des anticorps sur la puce d'or, avec en rouge les spots anti-OVA et en vert les spots contrôles.

Les concentrations utilisées couvrent une fenêtre de 10^7 à 10^9 part/ml en cohérence avec la gamme dynamique établie en SPRi (limite basse à $5 \cdot 10^6$ part/ml en SPRi, mais avec une valeur de taux de capture trop faible et limite haute supérieurs à $5 \cdot 10^8$ part/ml) permettant ainsi de comparer et d'évaluer les réponses obtenues.

L'AFM et la microscopie de fluorescence constitueront les seuls moyens de caractérisation des spots d'interaction par immunoaffinité sur le module NBA. Les images des spots contrôles sont également vérifiées et permettent de mettre en évidence que la présence des particules de 480 nm

sont des événements rares. Les résultats obtenus par AFM et par microscopie à fluorescence sont présentés dans la figure 3.18:

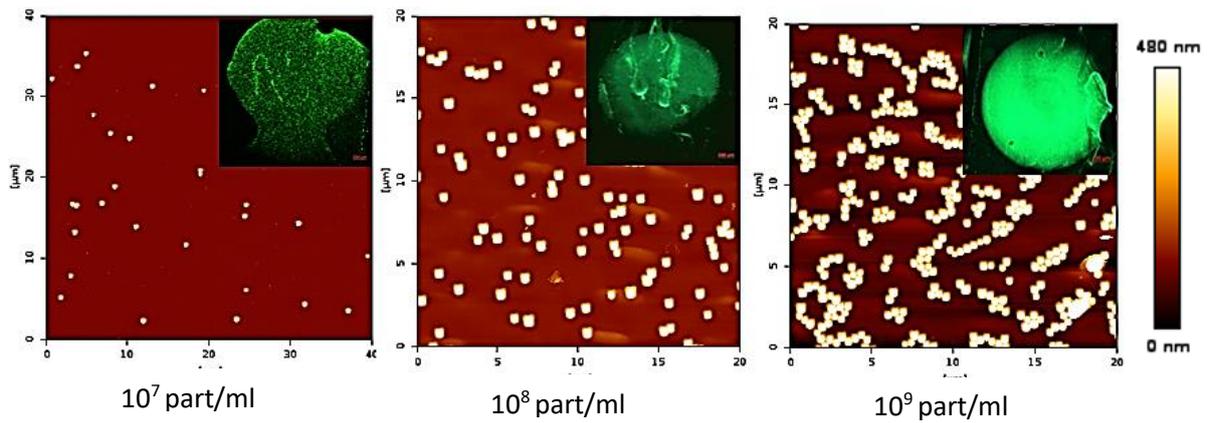


Fig. 3.18. Présentation des images par microscopie et par AFM en mode QI permettant le dénombrement des NP480-OVA sur les spots anti-OVA en fonction de la variation de la concentration. Z scale =480 nm

Nous pouvons observer l'augmentation du nombre de particules avec l'augmentation de la concentration. Les analyses pour les spots contrôles ont également été réalisées et ont montré que la présence des NP480-OVA sur ces spots n'était que des événements rares. Les images permettent d'observer l'augmentation de l'intensité de fluorescence et du taux de capture avec l'augmentation de la concentration. La figure 3.19 nous montre cette évolution.

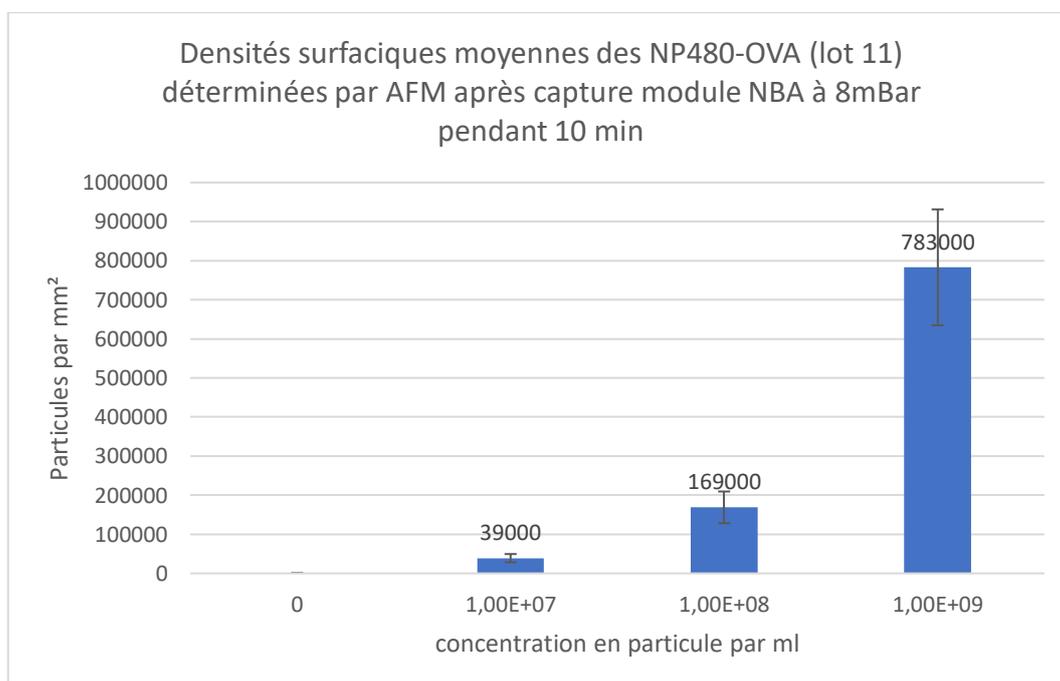
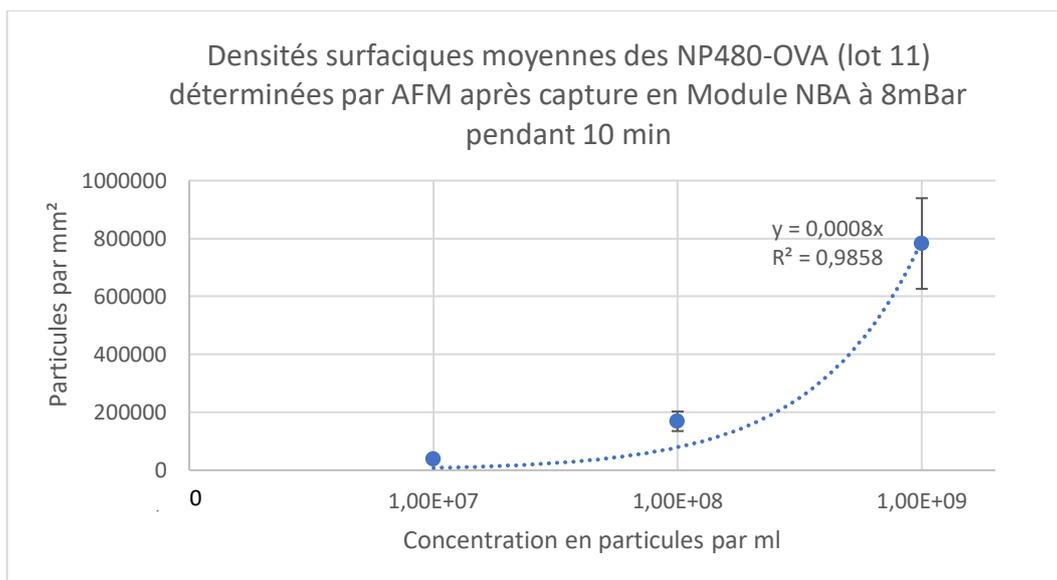


Fig. 3.19. Évolution du nombre de NP480-OVA par mm^2 en fonction des concentrations injectées présenté à la fois sous forme graphique et sous forme d'historgramme. $N=15$, >300 particules comptées.

Comme pour les expériences en SP*Ri*, les analyses montrent une augmentation entre le nombre de particules compté par unité de surface et la concentration. Nous observons en module NBA, un plus grand taux de capture que sur le SP*Ri*. Les taux de captures sur spot contrôles sont très faibles : nous montrons que notre module, avec les NP480-OVA répond aux critères de performances attendues, à savoir au minimum de conserver les performances du SP*Ri* et dans ce cas un taux de

capture supérieur. En effet, l'idée du projet est surtout de ne pas dégrader la qualité de l'immunocapture.

Nous pouvons, à partir de ces données, comparer les réponses de taux de capture obtenues dans les deux systèmes en termes de nombre de particules par mm². Les résultats sont présentés dans la figure 3.20 :

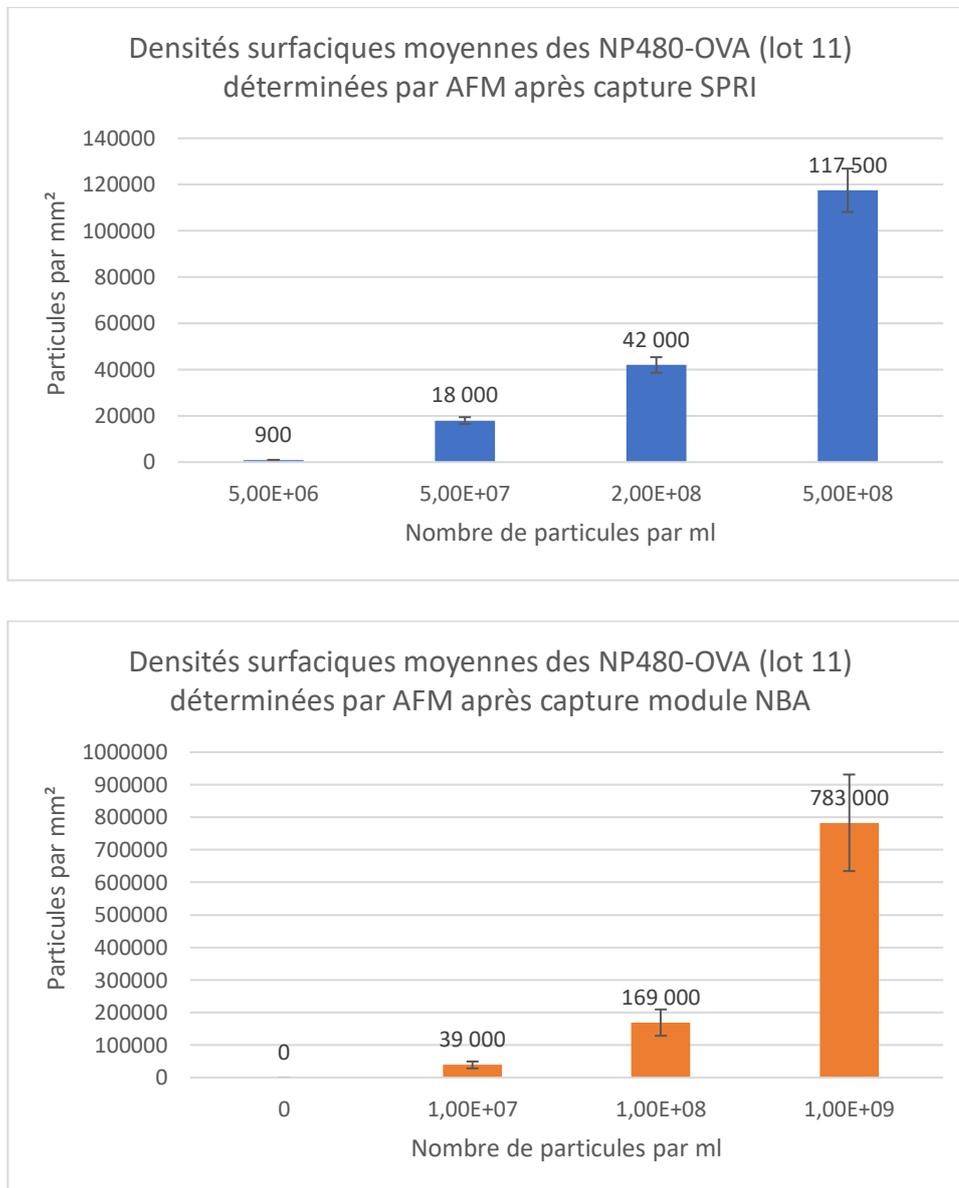


Fig 3.20 histogrammes regroupant les taux de capture SPRI et module NBA permettant une comparaison des données entre le SPRI (en bleu) et celles capturées par module NBA (en orange) pour les NP480-OVA. N=15, >300 particules comptées.

Nous pouvons noter que, dans cette configuration, les taux de capture sont plus élevés dans notre module NBA qu'en SPRI (environ 4 fois plus en AFM). Pour comprendre ce résultat, nous pouvons émettre certaines hypothèses sur un niveau de performance accru reposant sur le :

- Design du module NBA : la cellule fluïdique est de dimension plus faible avec moins de spots présents (densité d'anticorps identiques) et une zone d'interaction différente
- Mode d'injection différent : l'injection par pression est différente par rapport à la pompe du système SPRI, l'influence n'a pas été directement étudiée, mais pourrait jouer un rôle
- Confinement de la solution dans une zone de plus faible dimension : la zone d'interaction est plus concentrée et peut induire des variations de comportement de capture
- Les variations de taux de cisaillement lié à des variations de géométrie (hauteur) peuvent également avoir un impact sur les taux de capture.

3.3.2 Modèle 2 : NP140-OVA

*SPRI

Le second modèle, les NP140-OVA, sont injectées à différentes concentrations allant de $7 \cdot 10^7$ à $7 \cdot 10^9$ part/ml. Pour représenter et comprendre les résultats obtenus, nous présenterons sur la figure 3.21 un exemple d'immunocapture :

- Immunocapture NP140-OVA dilué par 350 ($2,5 \cdot 10^9$ part/ml).

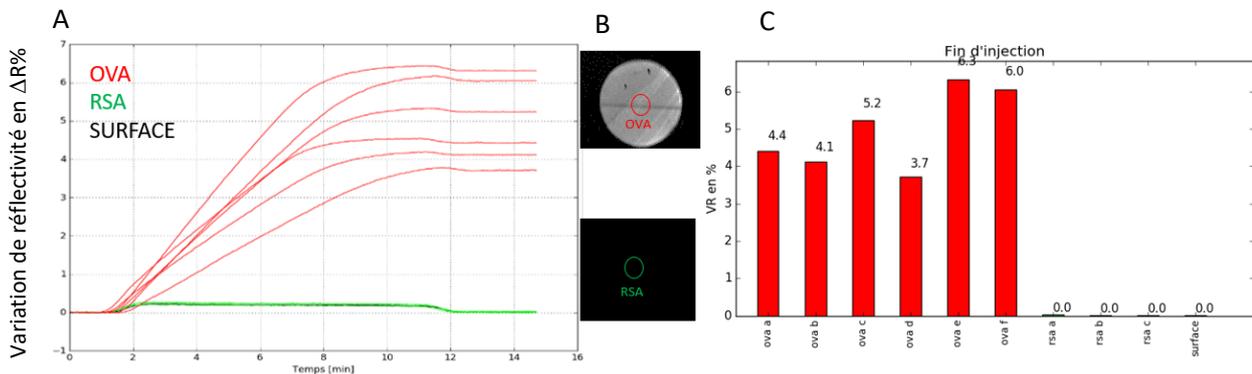


Fig. 3.21. Expérience d'immunocapture des NP140-OVA ($2,5 \cdot 10^9$ particules/ml) dans l'appareil SPRI. A° sensorgramme de l'immunocapture (variation de réflectivité en fonction du temps pour 6 spots anti-OVA et 3 spots contrôles) avec une injection de 10 min à $20 \mu\text{l}/\text{min}$, en B° image de contraste après capture et en C° histogramme des taux de capture par spot.

En l'absence de fluorescence pour ces particules, il n'y a pas d'image de microscopie à fluorescence. Les taux de capture sur les spots anti-OVA sont en moyenne de $5 \pm 0,9 \Delta R\%$ contre $0 \Delta R\%$

pour les spots contrôles. Les expériences ont été réalisées dans diverses conditions et les valeurs de capture pour les autres concentrations sont présentées sur la figure 3.22 :

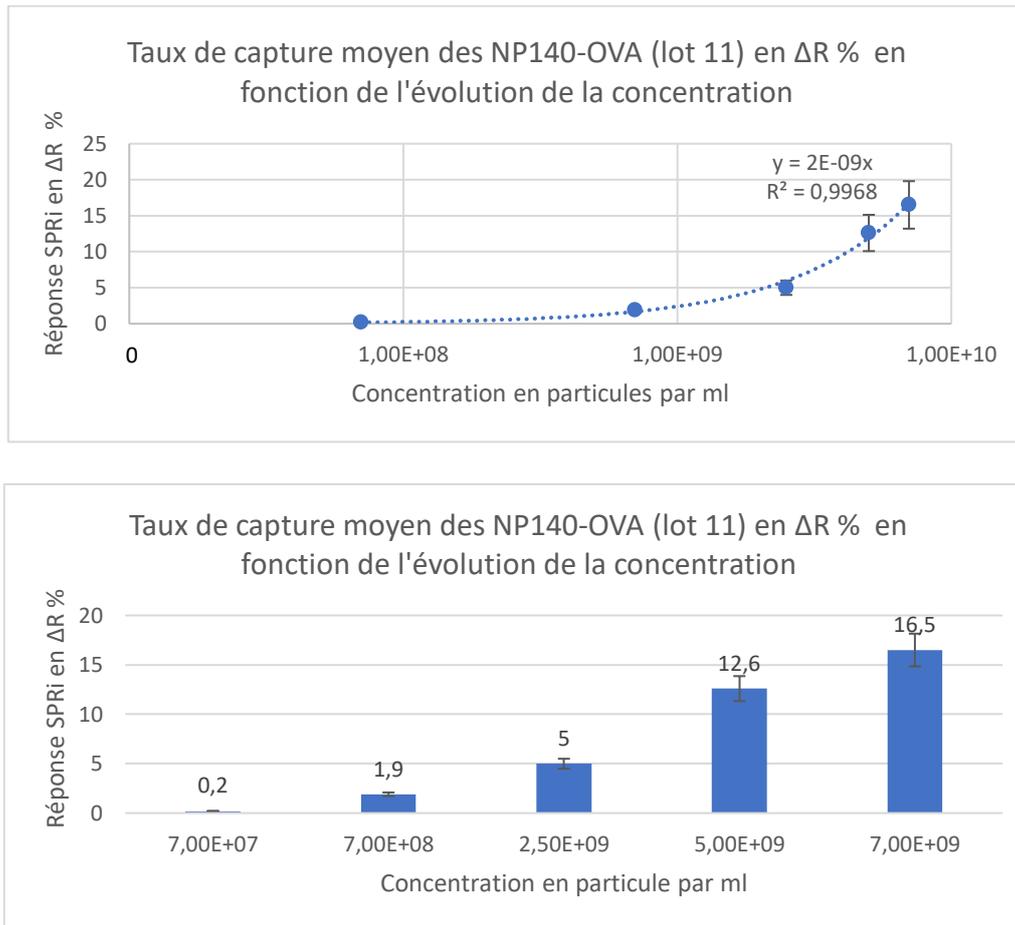


Fig. 3.22. Gamme dynamique de capture des NP140-OVA : Réponse SPRI en fonction de la concentration présentée à la fois sous forme graphique et sous forme d'histogramme.

Les analyses montrent une augmentation entre le nombre de particules compté par réponse SPRI et la concentration. Nous pouvons donc conclure que les NP140-OVA peuvent être utilisés pour des concentrations allant de $7 \cdot 10^7$ part/ml à plus de $7 \cdot 10^9$ part/ml. Nous estimons que les limites basses de détections correspondent à des valeurs de 0,20 ΔR% de capture.

Les surfaces des puces sont par la suite analysées par AFM (les particules de 140 nm ne sont pas fluorescentes) pour déterminer les taux de capture comme le montre la figure 3.23:

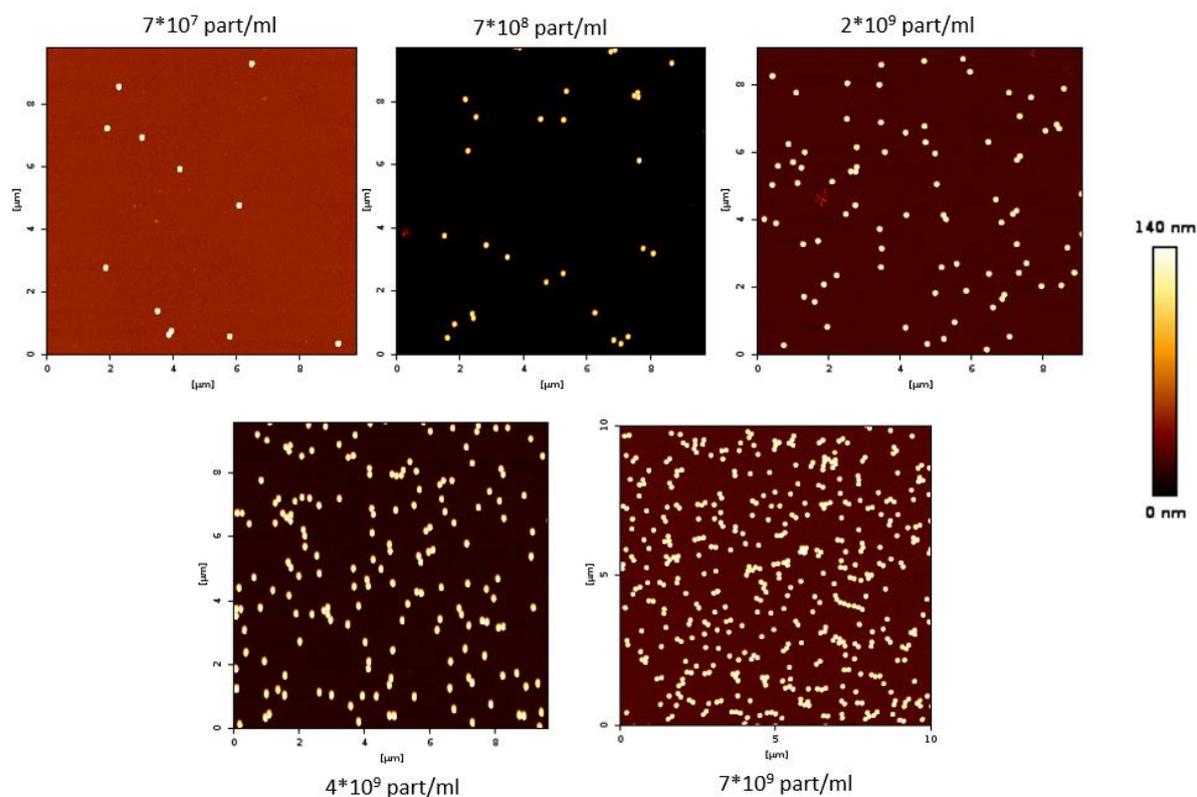


Fig. 3.23. Résultat d'immunocapture des NP140-OVA sur les spots anti-OVA en fonction de la variation de la concentration, déterminé par AFM en mode Qi. Z scale=140 nm

Le nombre de particules augmente sur les images en fonction de l'augmentation de la concentration, alors que les analyses pour les spots contrôles ont également été réalisées et ont montré que la présence des NP140-OVA sur ces spots n'était que des événements rares. Les résultats sont représentés sur la figure 3.24 :

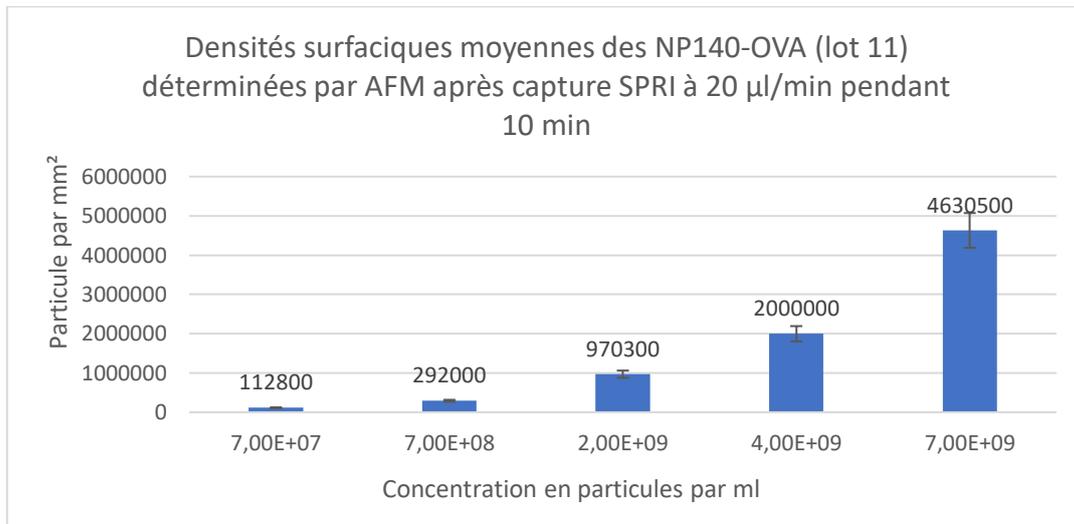
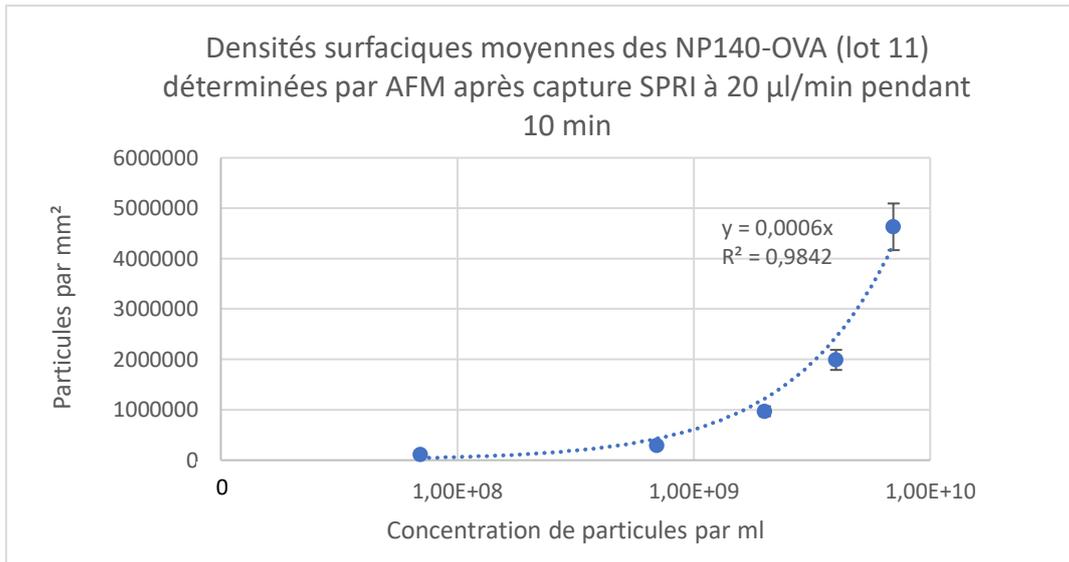


Fig. 3.24. Évolution du nombre de NP140-OVA par mm² en fonction des concentrations injectées en SPRI présenté à la fois sous forme graphique et sous forme d'histogramme. N=15, >300 particules comptées.

La figure. 3.24 montre une augmentation des taux de capture en particules par mm² en fonction de la variation de la concentration sur une gamme allant de 7*10⁷ à 7*10⁹ part/ml.

En analysant les différentes données obtenues, on peut déterminer que 1 ΔR % (réponse SPRI) de capture correspond en moyenne à 195 000 ± 40 000 particules/mm² (n= 15).

Nous pouvons également déterminer la limite de détection et les valeurs hautes de concentration de notre gamme dynamique (la valeur de 5*10⁷ part/ml correspond à la limite basse de captures lorsque l'on compare les données SPRI avec les taux de capture déterminés par AFM).

Pour les NP140-OVA, les nombres de particules par unité de surface comptées par AFM (en appliquant le même mode de comptage décrit dans le chapitre 2, p 66) sont plus forts que dans le cas des NP480-OVA, pour un même couple antigène anticorps (OVA/anti-OVA) et des signaux SPRi plus faibles. En effet, l'indice de réfraction des particules est différent (1,68 pour les 480 nm contre 1,42 pour les 140 nm), or les plasmons sont sensibles à l'indice de réfraction, donc le signal ne représentera pas le même nombre de particules selon que ce soient les particules de 140 nm ou celles de 480 nm qui sont capturées. Le plasmon, à partir duquel le sensorgramme est obtenu, ne peut détecter les particules que jusqu'à 150 nm de hauteur de la surface de la puce d'or (diminution forte du signal après cette valeur), donc il va totalement détecter les petites particules (140 nm) et uniquement une partie des grandes particules (480 nm). Tout ce qui se trouve au-delà de cette limite de 150 nm n'est que faiblement détecté. Une particule de 140 nm est complètement détectée (son volume étant de $v = \frac{4}{3} * \pi * R^3 = 1\,400\,000 \text{ nm}^3$) alors que seule une fraction volumique de la particule de 480 nm est détectée (environ 1/3 de la particule est détecté, soit un volume d'environ 19 000 000 nm³ détectables). De ce fait, lorsqu'une particule de 480 nm est capturée le volume qu'elle occupe correspond à environ une vingtaine de particules de 140 nm pour une même réponse SPRi, nous aurons un dénombrement par nombre de particules en AFM qui sera plus important pour les NP140-OVA que pour les NP480-OVA pour le même signal en SPRi. Les signaux sont cohérents avec le dénombrement en tenant compte des aspects cités ci-dessus.

De plus, le taux de recouvrement des protéines sur la surface est également différent, ce qui peut expliquer que les interactions ne soient pas réalisées de la même manière, car dépendant de l'interaction entre les anticorps et les protéines de surface. La fonctionnalisation peut être réalisée plus facilement avec une surface plus faible nécessitant moins de protéine pour recouvrir la totalité de la surface, permettant potentiellement de réaliser une meilleure fonctionnalisation.

*module NBA

Pour cette expérience en module, le protocole utilisé est toujours celui de l'annexe 3.3 avec le greffage de 6 spots comme décrit précédemment (sur la figure 3.17). Les puces sont collectées après l'étape de désactivation de la surface et analysées directement par AFM sur chaque spot.

Les images obtenues par AFM pour les spots anti-OVA sont présentées dans la figure 3.25 :

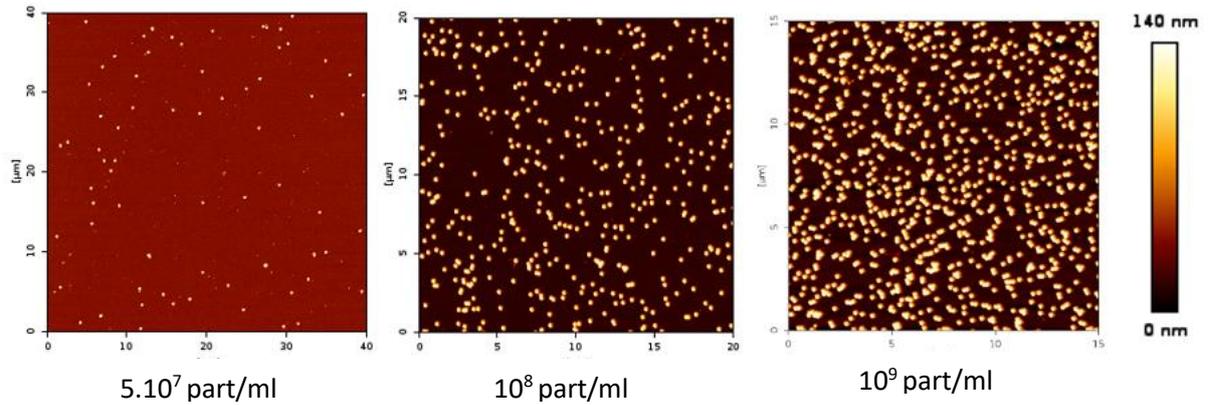


Fig. 3.25. Image AFM des particules de NP140-OVA capturées sur les spots anti-OVA en fonction de la variation de la concentration par AFM en mode Qi. Z scale=140 nm

Sur les images de la figure 3.25, l'augmentation du nombre de particules avec l'augmentation de la concentration est vérifiée. Les analyses pour les spots contrôles ont également été réalisés et ont montré que la présence des NP140-OVA sur ces spots n'était que des événements rares. La quantification des différents spots est présentée sur la figure 3.26:

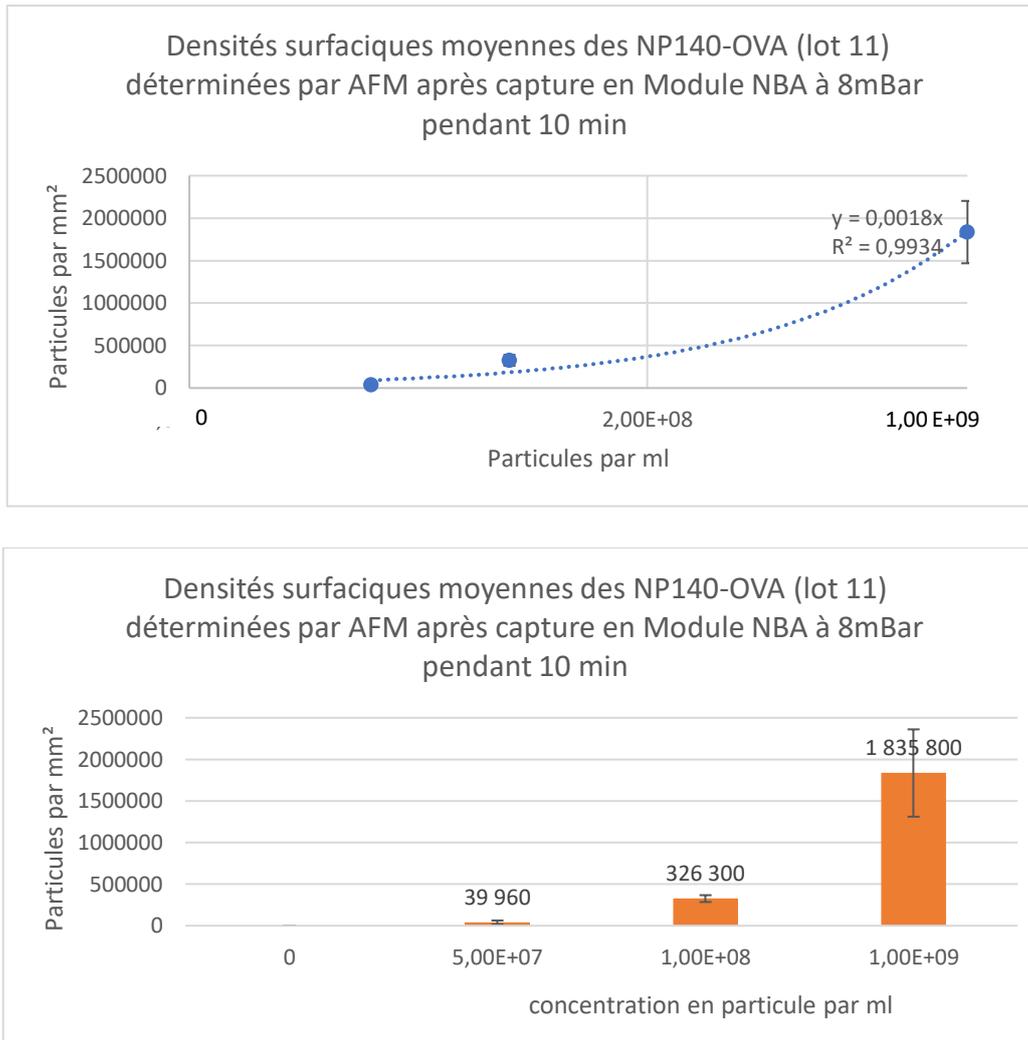


Fig. 3.26. Évolution du nombre de NP140-OVA par mm² en fonction des concentrations injectées dans le module NBA présenté à la fois sous forme graphique et sous forme d'historgramme. N=15, >300 particules comptées.

Sur la base de cette gamme dynamique à 3 points en module NBA, nous pouvons déterminer que les taux de capture dans des conditions adéquates sont supérieurs aux valeurs de taux de capture en SP*R*i. Nous pouvons revendiquer que les valeurs de capture sur le module NBA sont plus grandes que pour le SP*R*i, comme le montre la figure 3.27 :

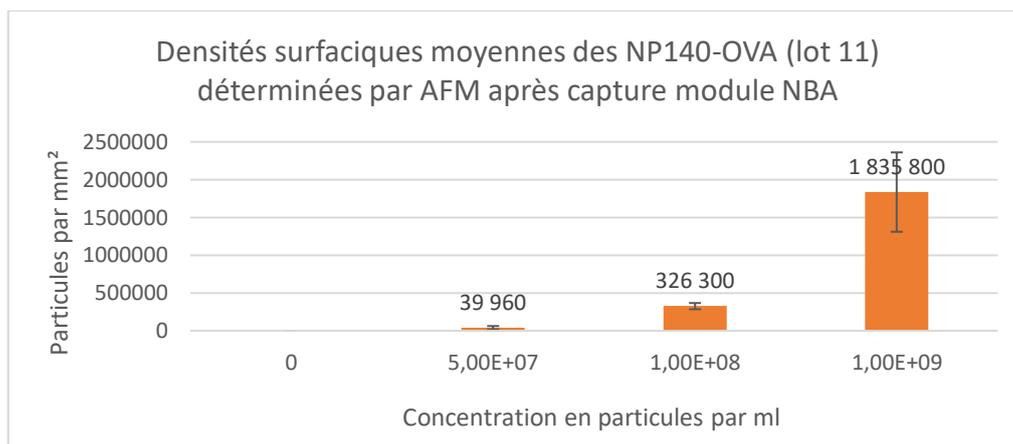
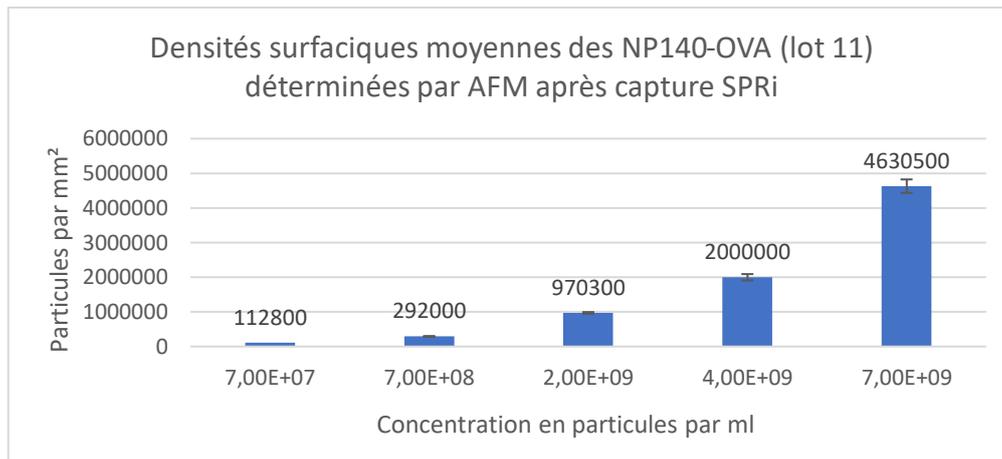


Fig 3.27 comparative des taux de capture entre les NP140-OVA capturés par SPRi (en bleu) et celles capturées par module NBA (en orange). N=15, >300 particules comptées.

Sur cette figure, nous pouvons affirmer :

- Qu'il existe une gamme dynamique entre le taux de capture déterminé par AFM et la concentration injectée,
- Une limite de détection suffisante pour permettre des injections à faibles concentrations (environ $5 \cdot 10^7$ part/ml)
- Des réponses spécifiques à travers des valeurs négligeables sur les spots contrôles.

Nous avons pu montrer que le module NBA était performant dans le cadre d'expérience d'immunocapture avec des particules biofonctionnalisées par nos soins, en comparaison avec les données d'immunocapture de l'appareil de référence SPRi. Nous observons donc que les particules de 140 nm et 480 nm fonctionnalisées convenablement présentent une gamme dynamique entre 10^7 et 10^9 part/ml.

L'objectif final du projet est la combinaison du module NBA avec le dispositif de tri. Les données d'immunocapture pour les deux modèles de calibrants (NP140-OVA et NP480-OVA) montrent une

immunocapture efficace (qui n'est pas limitée par l'encombrement stérique, en effet nous pouvons estimer à partir des données AFM et par image J que le taux d'occupation surfacique est de 10% pour les NP140-OVA et de 18% pour les NP480-OVA aux plus fortes concentrations) avec des interactions non spécifiques faibles. Dans le cadre des futures expériences d'injections, nous avons besoin d'un autre calibrant avec une protéine de surface différente, pour immunocapter en même temps les particules de 140 nm (non fluorescentes) et de 480 nm (fluorescentes). Ceci va nous permettre d'injecter les deux particules calibrantes en même temps et de les immunocapter sur deux types de spots différents, afin d'augmenter le contrôle qualité de nos expériences. Ces expériences nous serviront également à réaliser des injections avec des échantillons dont la complexité se rapproche de celles des EVs. Pour le second calibrant, nous avons choisi de tester le modèle à 140 nm et de le fonctionnaliser avec la protéine caséine. La validation de celui-ci entraînant la sélection de son complémentaire, à savoir les NP480-OVA (si les résultats n'avaient pas été concluants, nous aurions réalisé l'expérience avec le second ou recherché une nouvelle protéine). Le but étant de trouver une particule complémentaire avec une protéine de surface différente, nous n'avons besoin que de données SPRi pour montrer que la capture était forte avec des interactions non spécifiques et une contamination croisée qui soit faible.

3.3.3 NP140-CAS

Pour ces nouvelles particules, nous avons également testé différentes concentrations d'injections. Nous présentons les résultats d'une des expériences d'immunocapture en SPRi. Les résultats, avec une concentration d'injection de $7 \cdot 10^8$ part/ml, sont présentés dans la figure 3.28:

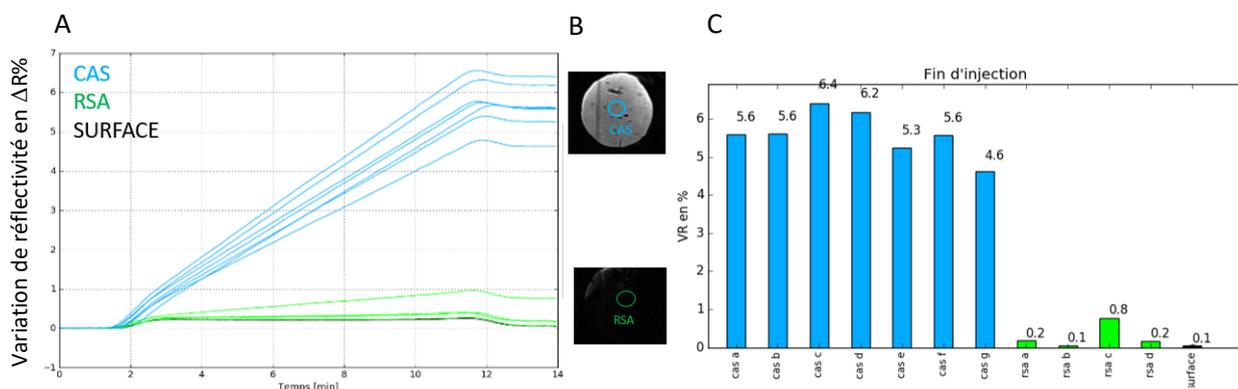


Fig. 3.28. Expérience d'immunocapture des NP140-CAS ($7 \cdot 10^8$ particules/ml) dans l'appareil SPRi. En A° sensorgramme de l'immunocapture (variation de réflectivité en fonction du temps pour 7 spots anti-CAS et 4 spots contrôles) injection pendant 10 min à $20 \mu\text{l}/\text{min}$, en B° image de contraste après capture et en C° histogramme des taux de capture par spot.

Il est important de constater que les résultats sont homogènes en termes de réponse, les interactions non spécifiques sont faibles et les valeurs de capture spécifique sont supérieures en termes d'immunocapture par rapport aux valeurs des NP140-OVA.

À partir de ces expériences, nous avons pu déterminer la gamme dynamique en SPRi selon les variations de concentration d'injection comme le montre la figure 3.29 :

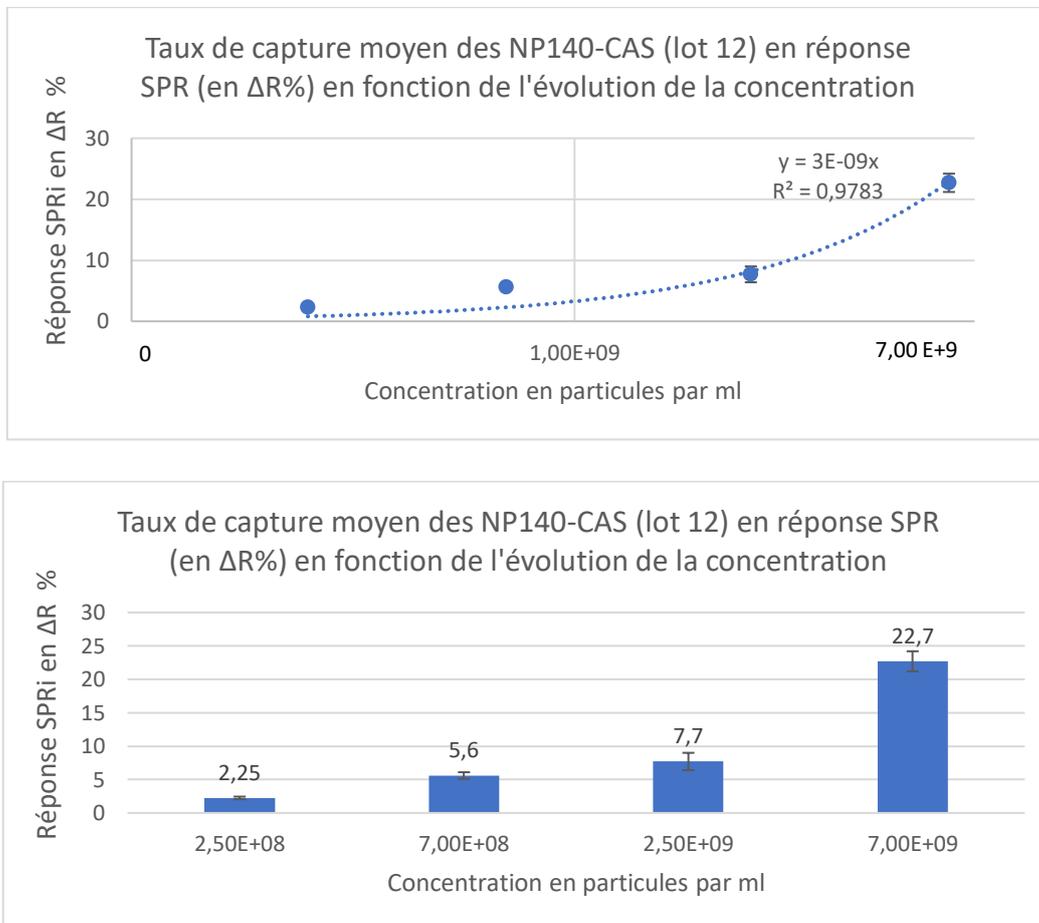


Fig. 3.29. Taux de capture en pourcentage selon la concentration déterminé par SPRi après injection à différentes concentrations présentées à la fois sous forme graphique et sous forme d'histogramme.

Nous constatons une capture de particules en signaux SPRi, qui augmente avec les variations de concentration. Les premiers résultats nous montrent que les particules sont robustes, en milieu tampon pour être utilisé en tant que second calibrant (signaux forts sur les spots anti-CAS, très faibles interactions non spécifiques et la contamination croisée est faibles sur les spots anti-OVA).

Les puces sont analysées par AFM pour dénombrer le nombre de particules par unités de surface. Les résultats sont présentés sur la figure 3.30 :

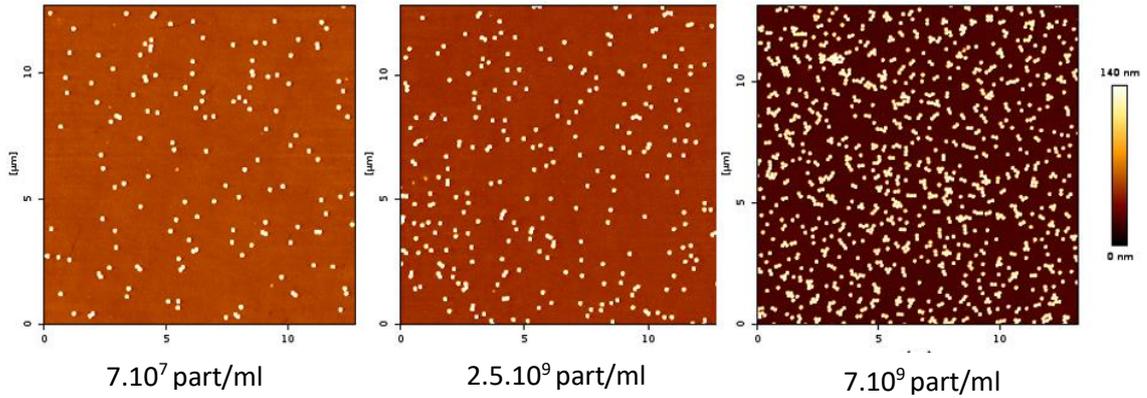


Fig. 3.30. Images AFM des NP140-CAS après immunocapture en SPRi pour des concentrations allant de $2,5 \cdot 10^8$ à $7 \cdot 10^9$ part/ml. Z scale = 140 nm

Les analyses montrent une augmentation entre le nombre de particules compté par unité de surface et l'augmentation de la concentration. La gamme dynamique se situe, comme pour les NP140-OVA, entre $5 \cdot 10^7$ part/ml et $7 \cdot 10^9$ part/ml. En effet, pour une valeur de $2,5 \cdot 10^8$ part/ml, nous obtenons 2,5% de capture ce qui est encore loin des limites basses de capture (nous estimons que les limites basses de détections correspondent à des valeurs de 0,20 $\Delta R\%$ de capture). Les résultats de dénombrement sont présentés sur la figure 3.31 :

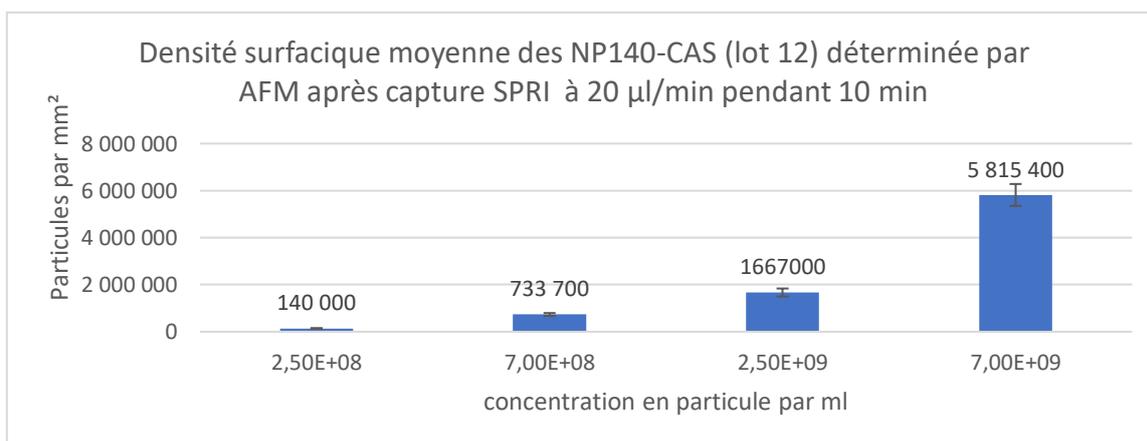
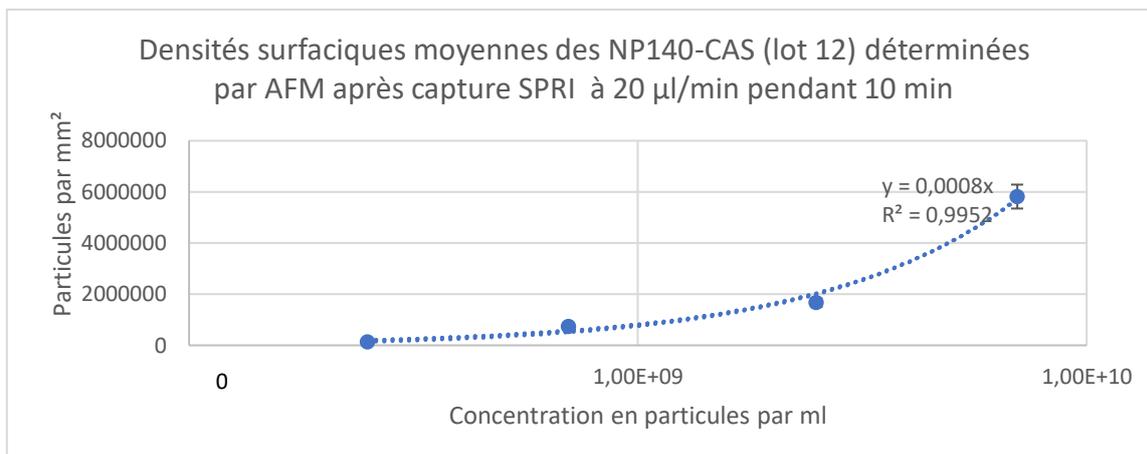


Fig. 3.31. Étude de la gamme dynamique de capture des NP140-CAS des taux de capture obtenue selon la variation de concentration en SPRI présenté à la fois sous forme graphique et sous forme d'histogramme. N=15, >300 particules comptées

Pour les NP140-CAS, nous pouvons estimer que **1 ΔR% de capture correspond à 167 000 ± 47 000 particules/mm²**.

Le tableau 3.3 synthétise les quantités de particules capturées pour 1 ΔR % d'immunocapture en SPRI pour les différentes particules biofonctionnalisées :

NP	Nombre de particules capturées par mm ² pour 1 ΔR% de capture	Écart type	Gamme dynamique (part/ml)	Réactivité (rapport signal sur bruit)
140-OVA	194857	42890	7*10 ⁷ à 7*10 ⁹	+++
480-OVA	8175	2031	5*10 ⁶ à 10 ⁹	+++
140-CAS*	166480	46810	2,5*10 ⁸ à 7*10 ⁹	+++

Tab 3.3 : présentation du nombre de particules immunocapturée par mm² en moyenne pour 1% de capture.

*Pour les NP140-CAS, la gamme dynamique est basée sur les différents résultats expérimentaux, mais nous constatons que nous pouvons descendre plus bas en concentration (jusqu'à $5 \cdot 10^7$ part/ml, en extrapolant avec les autres modèles), car la valeur de capture de $2,5\Delta R\%$ est encore grande.

Les principales informations obtenues sont les suivantes :

- Les réponses augmentent en SPRI en termes de capture en fonction de l'augmentation des concentrations avec des interactions spécifiques fortes, des interactions non spécifiques faibles et des contaminations croisées faibles également.
- La détermination des taux de capture en AFM augmente avec l'augmentation de la concentration
- La présence d'agrégats est fortement réduite
- Les particules se répartissent de façon homogène sur les spots

Les résultats avec les NP140-CAS nous ont permis de valider l'immunocapture des NP140-CAS sur puce d'or (spécificité forte, interaction non spécifique faible) en nous affranchissant des expériences sur module NBA (gain de temps et de matériel), car le module NBA a été validé avec les particules NP140-OVA et NP480-OVA, en termes de performances avec la méthode SPRI. Le but de la fonctionnalisation en caséine est de permettre la co-injection de deux particules de tailles et de caractéristiques différentes dans nos échantillons, pour la calibration et l'étape de contrôle qualité lors de nos expériences d'immunocapture.

Les expériences suivantes de ce chapitre concernent les variations du comportement d'immunocapture du couple de particules (NP140-CAS/NP480-OVA) injectées ensemble dans une matrice simple dans un premier temps, puis dans une matrice biologique complexe.

Pour cela, nous avons dans un premier temps injecté le couple de NPs dans une solution tampon, pour déterminer d'éventuelles variations de comportement d'immunocapture en comparaison avec les résultats de leurs injections seuls. La validation de cette étape est un prérequis pour une complexification des échantillons.

Injection de NP140-CAS et de NP480-OVA

Dans notre étude, nous allons déterminer les taux de capture des NP140-CAS et des NP480-OVA injectées ensemble en milieu tampon, dans les conditions de concentrations qui sont dans la gamme dynamique, mais à une concentration minimum et suffisante afin de limiter qu'elles s'influencent entre elles, éviter la perturbation du milieu biologique et qui soit également adapté aux concentrations qui

devront être injectées dans le module de tri (d'après les analyses de nos collègues de Toulouse, une trop forte concentration en particules solides dans le module de tri conduirait à une forte perturbation du tri par des phénomènes de gêne stérique). Les concentrations choisies sont les suivantes :

- [140-CAS] = $2,5 \cdot 10^8$ part/ml
- [480-OVA] = $5 \cdot 10^7$ part/ml

À titre d'exemple, les résultats de l'une des immunocaptures en SPRi sont présentés dans la figure 3.32 (une des expériences du duplicata) :

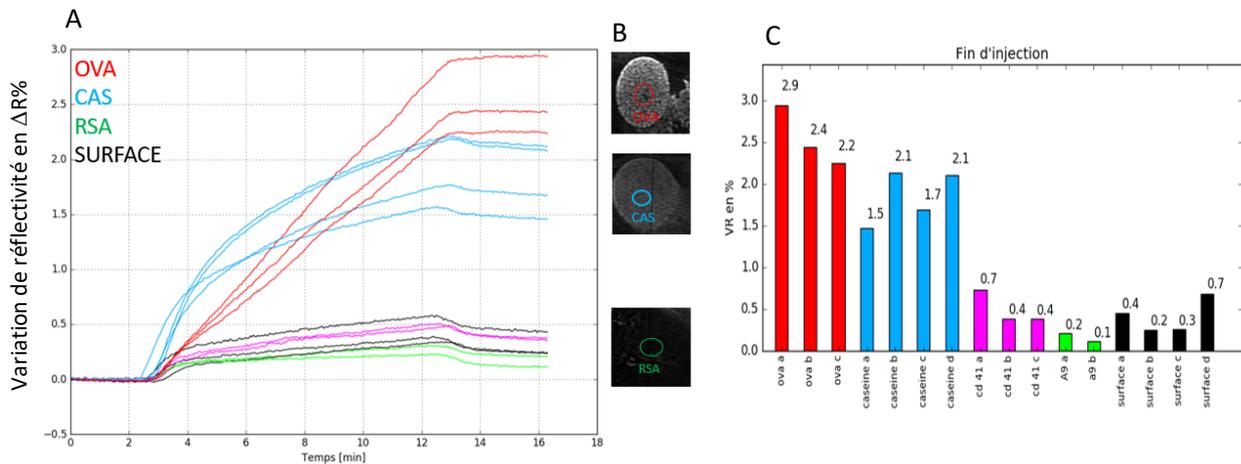


Fig. 3.32. Expérience d'immunocapture de l'injection du mix comprenant les NP 140-CAS/NP 480-OVA ($2,5 \cdot 10^8$ part/ml pour les NP140-CAS et $5 \cdot 10^7$ part/ml pour les NP480-OVA) dans l'appareil SPRi. A° sensorgramme de l'immunocapture (variation de réflectivité en fonction du temps pour 3 spots anti-OVA, 3 spots anti-CAS et 3 spots contrôles) pour une injection de 10 min à $20 \mu\text{l}/\text{min}$, en B° image de contraste après capture et en C° histogramme des taux de capture par spot.

Les valeurs de capture en SPRi de deux expériences sont récapitulées dans la figure 3.33 :

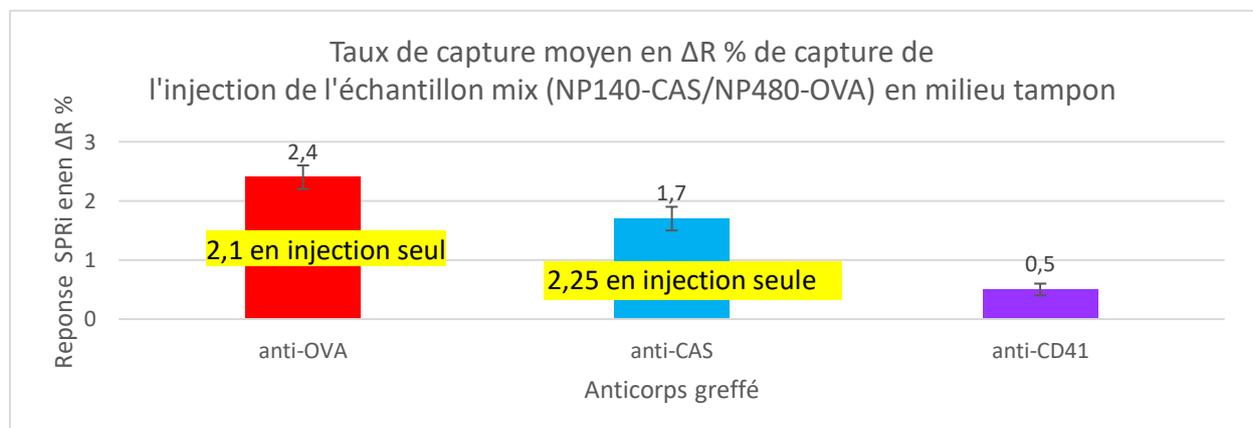


Fig. 3.33. Taux de capture obtenue en SPRi pour la solution injectée en milieu tampon.

Les valeurs obtenues en SPRi sont conformes aux valeurs attendues : une valeur de $2,1 \pm 0,5 \Delta R \%$ est attendue pour les NP480-OVA (la valeur obtenue est de $2,4 \pm 0,3 \Delta R \%$ en moyenne), les valeurs se trouvent donc dans la même gamme. Pour les NP140-CAS, une valeur de $2,25 \pm 0,2 \Delta R \%$ est attendue or nous sommes un peu en dessous avec $1,7 \pm 0,2 \Delta R \%$ de capture.

Dans cette étude, nous pouvons également constater un signal de $0,5 \pm 0,1 \Delta R \%$ sur les spots anti-CD41, signe qu'il y a une très faible capture potentielle sur ces spots des NPs en comparaison avec les spots contrôles. En effet, les spots contrôles (Surface, IgG A9) sont de l'ordre de 0,2%, ce qui montre des interactions non spécifiques très faibles.

Les différents spots sont analysés par AFM et les résultats de densités surfaciques en particules/mm² (à savoir qu'un spot mesure 1,5 mm de diamètre) sont représentés dans le tableau 3.4:

NP	Particules par mm ²	ÉCART-TYPE
140-CAS	103 000	7500
480-OVA	11 900	2400

Tab. 3.4. Valeurs de taux de capture obtenues par AFM pour les 3 expériences de capture en SPRi ($n=15$, >600 particules comptées).

Les valeurs obtenues montrent des différences légères lorsque l'on compare les valeurs avec les expériences d'injections de particules uniques (les NP140-CAS et les NP480-OVA seules et non mélangées). Ces différences peuvent être imputées à la complexification de l'échantillon.

En effet, nous avons obtenu précédemment $140\,000 \pm 15\,000$ particules pour les NP140-CAS contre $103\,000 \pm 7500$ dans ce cas. Pour les autres particules, nous avons $18\,000 \pm 1\,400$ NP480-OVA contre $11\,900 \pm 2\,400$ ici. Nous pouvons donc noter que les valeurs sont du même ordre de grandeur.

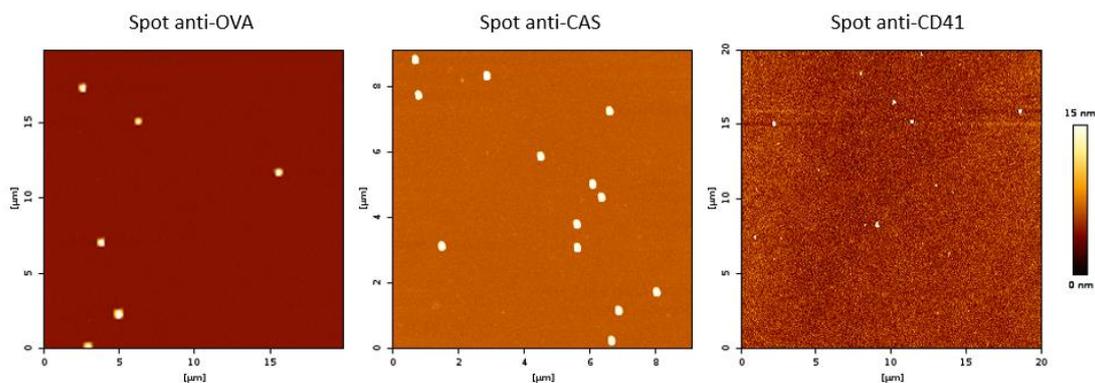


Fig. 3.34. Dénombrement des NPs dans l'échantillon injecté en SPRi sur les spots anti-OVA, anti-CAS et anti-CD41 en AFM en mode Qi. Z scale anti-OVA=480 nm, 140 nm sur anti-CAS et 15 nm sur anti-CD41.

À travers le traitement de données et les analyses des images, nous pouvons déterminer sur chaque image les particules présentes, leurs nombres, leurs tailles et leurs formes. Nous observons en figure 3.34, que les spots anti-OVA ont immunocapturé les NP480-OVA et que les spots anti-CAS n'ont capturé que des NP140-CAS. Sur l'ensemble des investigations, nous n'avons pas mis en évidence (ou de façon ultra minoritaire) de contaminations croisées, ce qui est illustré sur la figure 3.34. Ceci montre bien que le mélange des particules conserve la spécificité de capture. Par ailleurs, sur les autres spots contrôles, et notamment le spot anti-CD41, la présence de ces particules ne correspond qu'à des événements rares. Il existe des variations dans les taux de capture, mais qui sont acceptables en vue des écarts types. Ces expériences nous permettent de valider la co-injection en milieu simple des NP140-CAS et des NP480-OVA, en sachant que la spécificité de capture est préservée et que les interactions non spécifiques ont légèrement augmenté : la prochaine étape consiste à reproduire l'expérience dans un milieu plus complexe.

3.4 Performances d'immunocapture en milieu biologique

Si dans un premier temps les particules de types NPs ont permis de valider la transition « interactions sur biopuces en SPRi vers le module NBA », nous allons les utiliser comme calibrants internes afin de certifier la bonne exécution des étapes d'immunocapture d'EVs au sein du module. En effet, à travers les expériences réalisées jusqu'à présent, nous avons des informations sur les réponses attendues pour différentes concentrations. Si nous observons des écarts par rapport à ces valeurs, nous pourrions en déduire des perturbations au cours de l'expérience. Pour ce faire nous devons déjà nous assurer que 1) l'immunocapture des NPs n'est pas limitée au sein d'un échantillon biologique et 2) les NPs n'interfèrent pas dans le processus d'immunocapture des EVs.

L'objectif est de déterminer le comportement global d'immunocapture, évaluer la spécificité de capture et les risques de réactions croisées sur spots afin de valider les modèles de NPs biofonctionnalisés pour de futures expériences de la solution MADNESS en milieux complexes. En effet, l'objectif final de la solution MADNESS est d'isoler et immunocapturer des EVs à partir de milieux complexes, ce qui nous pousse à réaliser des expériences d'immunocapture en milieu biologique complexe.

L'échantillon choisi pour être incorporé en présence des particules sera l'échantillon appelé « PPL » (lysats de plasma plaquettaire) fourni par le professeur T. Burnouf (TMU, Taiwan) dans le cadre d'une collaboration avec le groupe BMD (Institut femto-st).

La solution de PPL est obtenue à partir d'un concentré plaquettaire, qui va subir des étapes de centrifugations, de lavage, de lyse (par des étapes de congélation et de décongélation) et de concentration. Ensuite, cet échantillon est qualifié par des étapes de prétraitement à Taipei puis conservé à -80°C avant envoi en France. Les PPLs seront analysées par la plateforme NBA pour obtenir une information sur le dosage et le phénotypage des vésicules extracellulaires. Cet échantillon est enrichi en facteur de croissance (BDNF, PDGF-AB, EGF, VEGF et TGF- β)¹⁵⁶. Les PPLs présentent un taux de recouvrement en phosphatidylsérine important qui permet la capture par l'annexine V. L'objectif de nos partenaires est de déterminer les différentes sous-populations d'EVs présentes dans l'échantillon et les différents marqueurs de surface pour l'utilisation thérapeutique de l'échantillon. Un schéma des étapes de préparation de cet échantillon est représenté dans la figure 3.35.

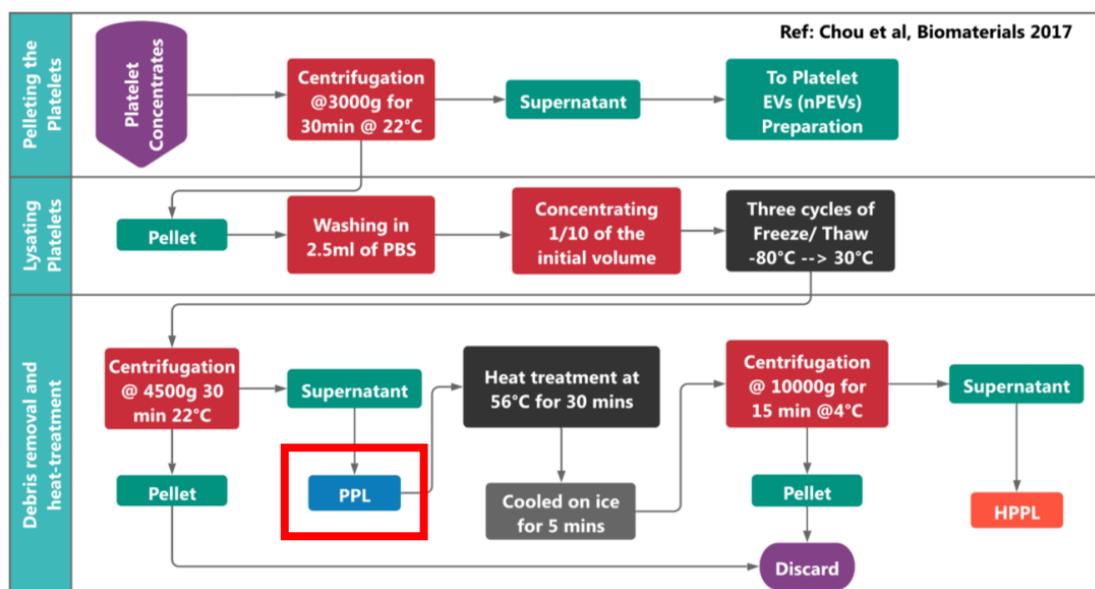


Fig. 3.35. Présentation schématique de la collection de l'échantillon biologique (PPLs), à partir d'un concentré plaquettaire. (Thèse Balasubramanian N.)¹⁵⁶. L'échantillon de PPL est représenté dans l'encadré rouge.

Ces échantillons ont été particulièrement investigués au cours des travaux de thèse de Balasubramaniam Namasivayam¹⁵⁶ (2021) au sein du laboratoire. La taille moyenne des EVs présents dans l'échantillon est estimée entre 150 et 200 nm. Les résultats d'immunocapture des microparticules plaquettaires sur une puce « multiplex » de la plateforme NanoBioAnalytique montrent des résultats significatifs de détection spécifique des vésicules au travers d'un panel de différents ligands. Ces ligands sont des anticorps dirigés contre plusieurs tetraspanines (CD62p, CD41, CD61, CD81 et CD9), contre le facteur tissulaire, également l'Annexine V, et des anticorps contrôle de même type « IgG » (figure 3.36).

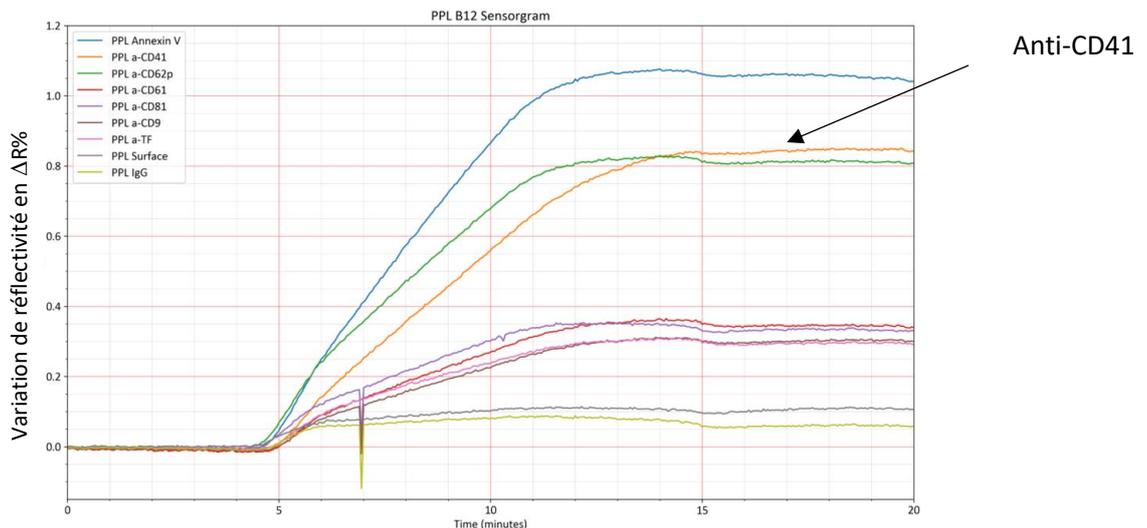


Fig. 3.36. Sensorgramme représentant la variation de réflectivité (en $\% \Delta R$) en fonction du temps d'un échantillon de microparticules plaquettaires (10^9 EVs/ml) préparé à partir d'un lysat de plasma plaquettaire (PPLs) réagissant sur une biopuce présentant un panel de ligands (anti-CD41, anti-CD62P, anti-CD61, anti-CD81, anti-CD9, anti-TF) et de contrôles (anti-IgGA9, surface).

Dans notre étude, nous utiliserons uniquement l'anticorps anti-CD41, dirigé contre une protéine de la famille des intégrines, le CD41 ou GP IIb, une glycoprotéine de la membrane plaquettaire participant à l'agrégation des plaquettes¹⁶⁰. L'anti-CD41 fournit la plus forte réponse d'immunocapture au sein du panel d'anticorps sélectionné dans notre cas et pour une concentration en vésicules extracellulaires de 10^9 EVs/ml (courbe orange de la figure 3.36, la courbe bleue correspond au signal d'interaction vis-à-vis de l'Annexine, une protéine interagissant spécifiquement avec la phosphatidylsérine en présence de Ca^{2+} , mais que nous n'utiliserons pas par manque de spécificité).

Les différents échantillons de PPLs disponibles et stockés au laboratoire peuvent varier en composition, en concentration et en qualité notamment au cours du temps, mais ce choix de modèle biologique doit permettre d'atteindre, dans les conditions expérimentales standard au laboratoire*, des signaux de réponses de l'ordre de $1\Delta R\%$ de variation de réflectivité.

* Après les étapes classiques de préparation de la puce d'or (décrit dans l'annexe 3.3), les solutions sont décongelées, puis diluées pour obtenir la concentration adéquate. L'injection se déroule à un débit de $20 \mu\text{l}/\text{min}$ pendant 10 min, puis la surface de la puce est fixée aux glutaraldéhydes pour être analysée en AFM.

3.4.1 caractérisation du Mix en SPRi

L'une des expériences d'injection des particules dans le milieu biologique (dilué 1000 fois), dans les conditions décrites ci-dessous, nous donne les résultats de la figure 3.37 :

- [140-CAS] = $2,5 \cdot 10^8$ part/ml
- [480-OVA] = $5 \cdot 10^7$ part/ml
- [PPL] = $9 \cdot 10^8$ part/ml

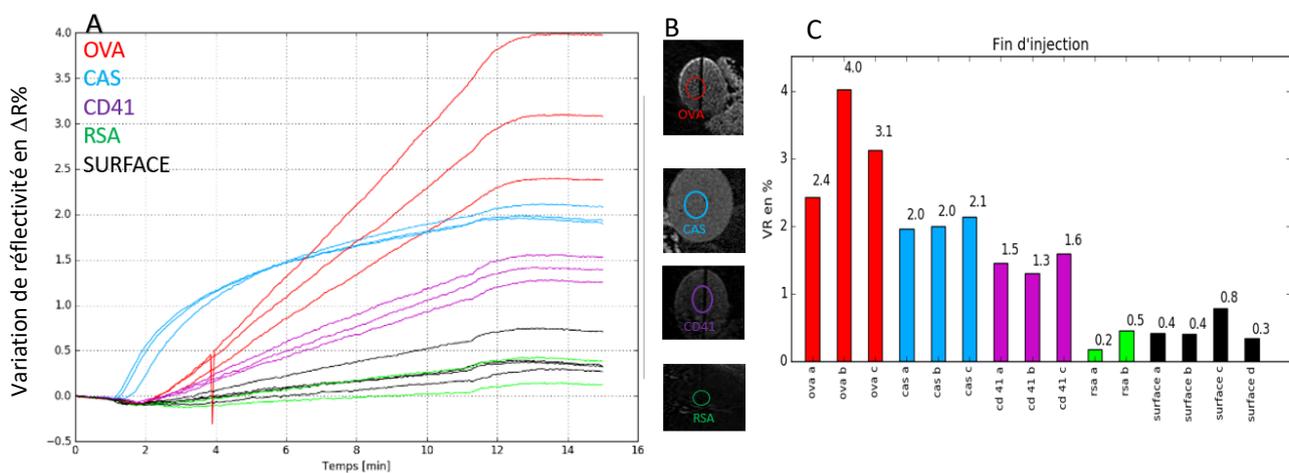


Fig. 3.37. Expérience d'immunocapture de l'injection du mix comprenant les NP140-CAS/NP480-OVA/PPL. A° sensorgramme de l'immunocapture (variation de réflectivité en fonction du temps pour 3 spots anti-OVA, 3 spots anti-CAS, 3 spots anti-CD41 et les spots contrôles) pour une injection de 10 min à 20 μ l/min, en B° image de contraste après capture et en C° histogramme des taux de capture par spot.

La figure 3.37 regroupe les principaux résultats de l'injection du mix à savoir la réponse spécifique des 2 familles de ligands anti-NPs sur les spots spécifiques relativement aux spots contrôles de type « RSA ». Ainsi :

- les spots anti-CAS (correspondant aux spots des anticorps anti-CAS) donnent une valeur de réponse SPRi moyenne de $2 \pm 0,05 \Delta R\%$,
- les spots anti-OVA (correspondant aux spots des anticorps anti-OVA) donnent une valeur de réponse SPRi moyenne de $3,2 \pm 0,65 \Delta R\%$,
- Les autres spots contrôles (correspondant aux spots anti-RSA) donne une réponse SPRi moyenne de $0,3 \pm 0,1 \Delta R\%$.

- L'expérience permet aussi d'évaluer la réponse SPRi de l'échantillon biologique qui est de $1.4 \pm 0,12$ $\Delta R\%$ pour les spots anti-CD41.

Les résultats du tableau 3.5 correspondent à deux expériences d'immunocapture. L'ensemble des réponses du MIX en milieu complexe par rapport aux expériences avec des solutions pures de calibrants a conduit aux résultats synthétisés du tableau 3.5.

Spots anticorps	Milieu	Signal SPRi $\Delta R\%$	Écart type
OVA	MIX en PPL	2,9	0,4
	NP480 en tampon	2,4	0,2
CAS	MIX en PPL	1,8	0,3
	NP140 en tampon	1,7	0,2
CD41	MIX en PPL	1,4	0,2
	PPL	1	0,2

Tab. 3.5. Comparaison des taux de capture obtenue en SPRi pour la solution mix selon l'injection en milieu tampon ou en milieu PPL (présentation de la synthèse du duplicat de résultats).

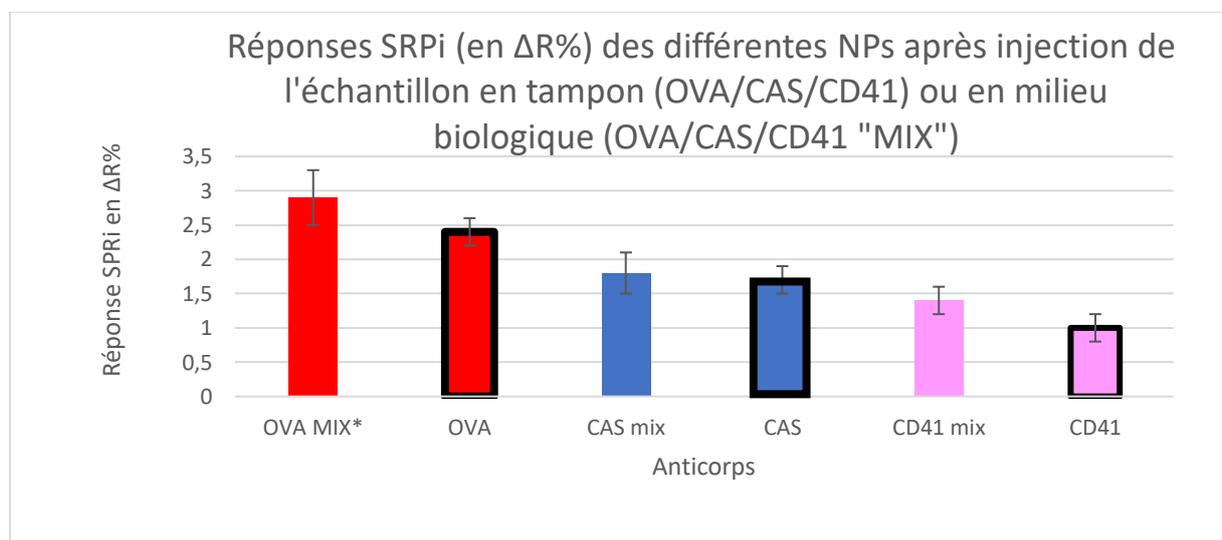


Fig. 3.38. Histogramme représentant les valeurs de signaux obtenues en SPRi sur les différents spots anti-NPs et sur le spot anti-CD41 après injection de l'échantillon mix en milieu biologique (Mix) ou en milieu tampon (valeur encadrée en noir). *Un spot anti-OVA présent dans une zone de traînée, c'est-à-dire une zone où un autre anticorps s'est également propagé (plus loin que sa zone initiale), a été enlevé de l'étude.

À la lumière des résultats de SPRi du tableau 3.5 et de la figure 3.38, nous n'observons pas d'écart significatif de réponse pour les calibrants immergés dans un milieu complexe vis-à-vis des expériences en milieu idéal en mix.

L'échantillon biologique ne semble pas interférer dans les réponses d'immunocaptures des NPs, c'est-à-dire soit en recouvrant les NPs d'une « protéine corona » soit en s'adsorbant de manière spécifique sur les spots d'immunocaptures.

Nous pouvons considérer à cette étape que le système est robuste (sur la base des expériences en SPRI), car les variations de taux de capture en présence d'une matrice biologique complexe sont équivalentes à ceux mesurés en milieux idéaux. Les capacités d'immunocapture sur puce d'or sont préservées en milieu complexe ainsi que l'intégrité des nanoparticules biofonctionnalisées.

Les résultats ont été analysés par AFM pour vérifier la reproductibilité des taux de capture. La figure 3.39 présente une sélection des images AFM sur les spots d'intérêts :

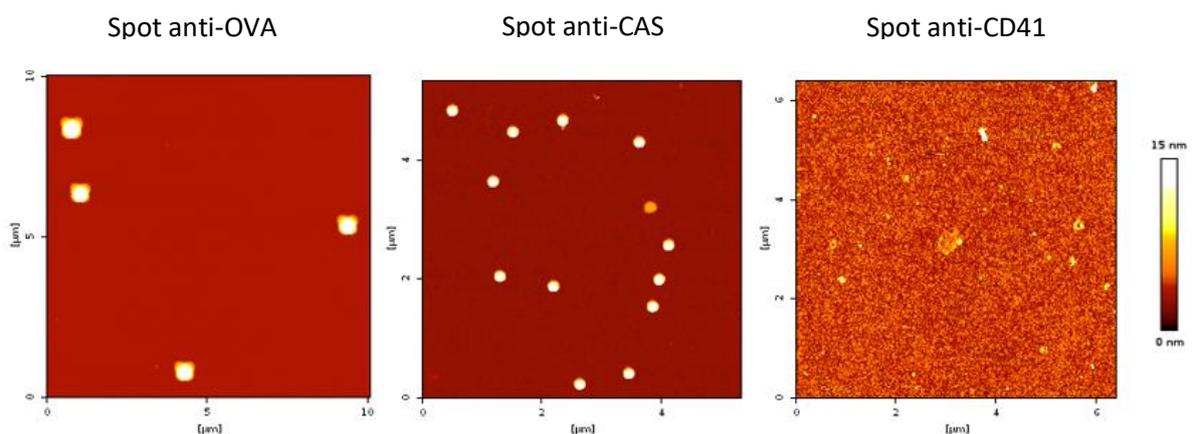


Fig. 3.39. Image AFM en mode Qi présentant la capture des NPs dans l'échantillon injecté en SPRI sur les spots anti-OVA, anti-CAS et anti-CD41 en AFM en mode Qi. Z scale anti-OVA=480 nm, 140 nm sur anti-CAS et 15 nm sur anti-CD41.

Nous pouvons observer sur la base de ces spots, la spécificité de capture des NP480-OVA sur les spots anti-OVA, des NP140-CAS sur les spots anti-CAS et la présence de particules plutôt de types vésiculaires ne correspondant pas aux calibrants sur les spots anti-CD41. Les différents résultats d'immunocapture en SPRI sont présentés dans le tableau 3.6 :

NP	SPRi n1 (Particules/mm ²)	SPRi n2 (Particules/mm ²)	SPRi n3 (Particules/mm ²)
140-CAS	120 000	130000	123 000
ÉCART TYPE	27 000	25 000	19 000
480-OVA	13 800	15 500	23 000
ÉCART TYPE	3000	4500	5600

Tab. 3.6. Valeurs de taux de capture obtenues par AFM pour les 3 expériences de capture en SPRi.

Les réponses montrent une reproductibilité de l'expérience avec des écarts types équivalents (n=3). Les résultats sont également présentés dans la figure 3.40 en comparaison avec les valeurs en milieu tampon :

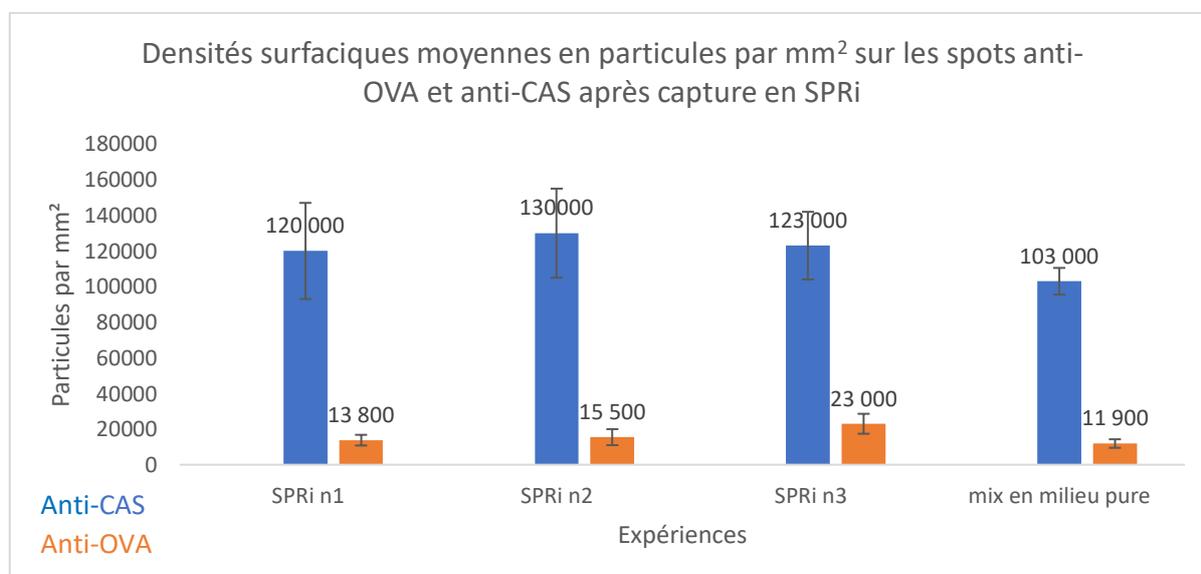


Fig. 3.40. Taux de capture déterminé en AFM après immunocapture de l'échantillon contenant les NP140-CAS/NP480-OVA/PPLs, réalisé 3 fois en SPRi.

La figure 3.40 montre l'évolution des taux de capture en SPRi entre les 3 expériences en milieu complexe et l'expérience de référence en milieu pure. Les valeurs de taux de capture montrent à travers les différentes expériences des réponses cohérentes, signe de la reproductibilité des réponses sur un échantillon que l'on peut considérer comme d'une complexité proche des échantillons biologiques (concentration en vésicules estimée à $9 \cdot 10^8$ part/ml).

Les différentes expériences ont également montré que les réponses sur les spots anti-CD41 sont de l'ordre de grandeur des spots contrôles pour les différents NPs et les objets ayant réagi sur ces spots

sont de nature biologique/vésiculaire en se basant sur les données AFM et que les images présentes une très faible contamination avec les NPs.

3.4.2 Caractérisation du Mix en module NBA

Un triplicat d'expériences a été réalisé en module NBA en suivant le protocole usuel. Les taux de captures (obtenue par AFM) sont présentés en tableaux 3.7, pour les NP140-CAS et les NP480-OVA, accompagnés par les images de référence en figure 3.41:

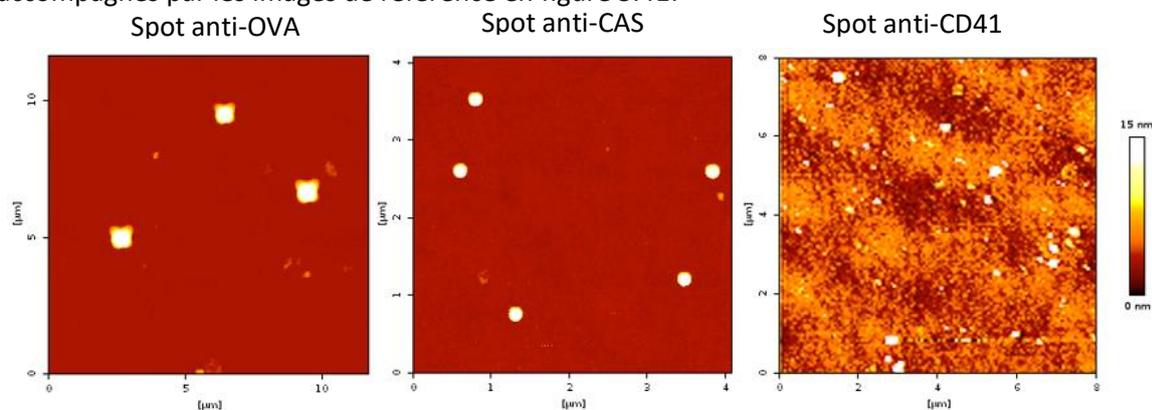


Fig. 3.41. Image AFM en mode Qi présentant la capture des NPs dans l'échantillon injecté en module NBA sur les spots anti-OVA, anti-CAS et anti-CD41 en AFM en mode Qi. Les analyses pour les spots contrôles ont également été réalisés et ont montré que la présence des NP140-OVA sur ces spots n'était que des événements rares. Z scale anti-OVA=480 nm, 140 nm sur anti-CAS et 15 nm sur anti-CD41.

NP	Module NBA n1 (particules/mm ²)	Module NBA n2 (Particules/mm ²)	Module NBA n3 (Particules/mm ²)
140-CAS	100000	120000	110000
480-OVA	14000	18000	15000
ÉCART TYPE 140-CAS	13000	20000	21000
ÉCART TYPE 480 OVA	4000	4200	4700

Tab. 3.7. Valeurs de taux de capture obtenues par AFM pour les 3 expériences de capture en module NBA.

La figure 3.42 permet de comparer les valeurs du milieu complexe en module NBA avec celle du milieu pur en SPRI.

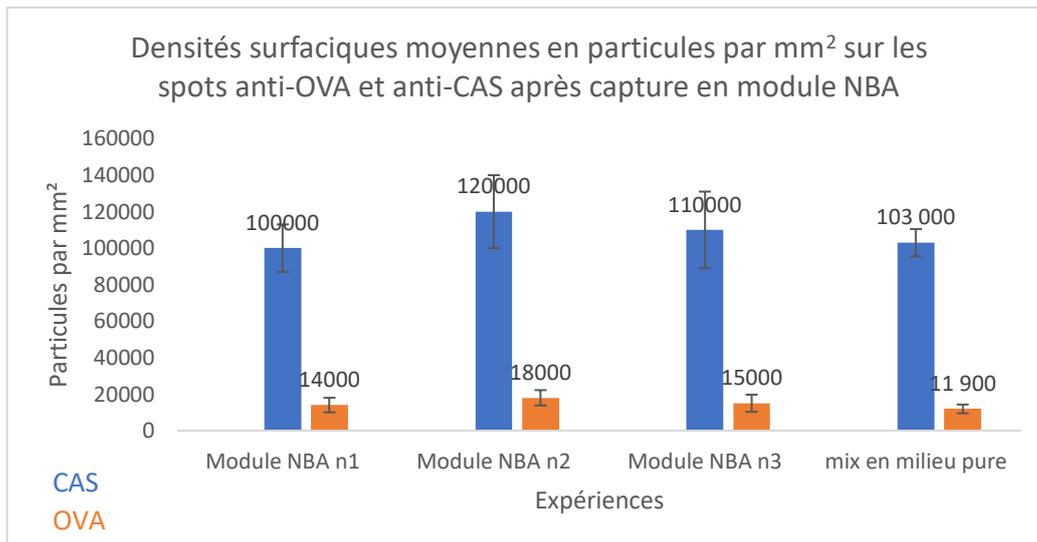


Fig. 3.42. Taux de capture déterminé en AFM après immunocapture de l'échantillon comprenant les NP140-CAS/NP480-OVA/PPLs, réalisé 3 fois en module NBA.

Comme pour les résultats en SPRi, les valeurs de capture en module NBA présentent des écarts de réponse qui sont très faibles entre les différentes expériences, montrant que la capture des NPs dans l'échantillon complexe est reproductible. La figure 3.43 présente une comparaison de ces réponses entre le module NBA, le SPRi et en milieu pur en SPRi pour les deux types de particules.

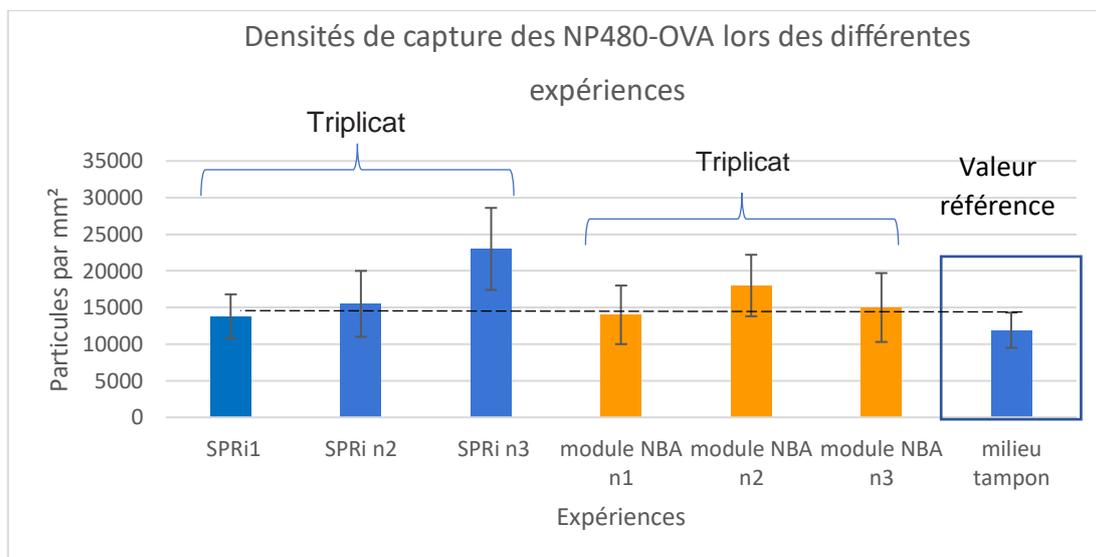
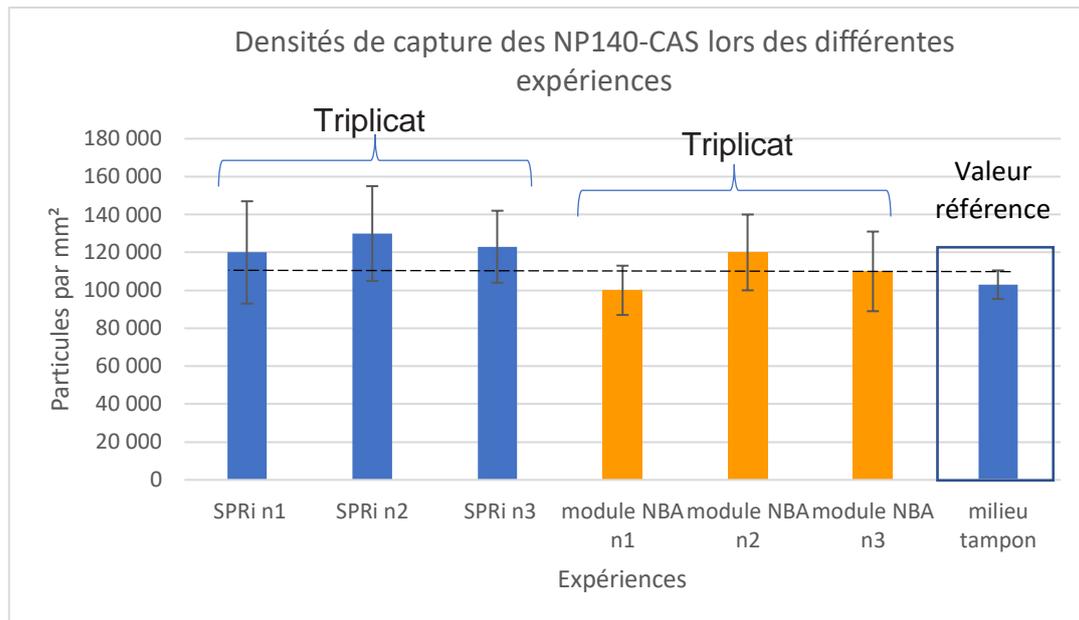


Fig. 3.43. Taux de capture déterminé en AFM après immunocapture de l'échantillon contenant les NP140-CAS/NP480-OVA/PPLs en SPRI ($n=3$) et en module NBA ($n=3$). Les valeurs références d'immunocapture en SPRI du mix de NP140/NP480 en milieu tampon sont encadrées dans chaque cas.

Les résultats sur l'ensemble des expériences montrent une capture qui est significativement la même entre le SPRI et le module NBA sur les différents spots pour l'échantillon mix en milieu complexe.

Les modes de fonctionnement en SPRI et en module NBA en milieux complexes semblent converger comme indiqué par les expériences en triplikat.

Par ailleurs, il est intéressant de représenter la réponse spécifique obtenue en SPRI du mix de NPs en milieu tampon pour démontrer que la réponse en milieu complexe (SPRI et module) est celle attendue.

Ces résultats démontrent l'efficacité et la robustesse à la fois du module NBA (notamment de la puce d'or) et de nos particules calibrantes dans différents milieux. Notre méthode est prête à être confrontée à l'injection d'échantillon de type EVs.

Conclusion :

Dans le cadre du couplage du module de tri avec la plateforme instrumentale NBA, notre objectif était de développer un module d'immunocapture dans un bloc miniaturisé, appelé module NBA, qui reprend les caractéristiques et performances de l'instrumentation SPRi de cette plateforme analytique. Le module NBA est une cellule fluide hermétique conçue dans un wafer en silicium intégrant une puce d'or siège des expériences d'immunocapture afin de réaliser les expériences de capture avec une instrumentation simplifiée ainsi que les protocoles d'immunocapture. La réalisation du dispositif d'immunocapture comprend les étapes de simulations numériques, la conception, la réalisation en salle blanche, la mise en place du packaging. Cette phase de développement s'est accompagnée également d'une réflexion plus globale en amont avec l'équipe du LAAS partenaire du projet sur les modalités d'interconnexion entre le dispositif de tri et notre module NBA.

Nous avons présenté les étapes de caractérisation fluide (fonctionnement optimal entre 5 et 20 mbar), accompagnée de la description du banc expérimental mis en œuvre pour permettre de valider le dispositif. Cette validation consiste à utiliser les NP140-OVA et NP480-OVA, particules biomimétiques fonctionnalisées décrites dans le chapitre 2, sur les deux modèles d'immunocapture sur puce (SPRi et module NBA) permettant de :

- Déterminer la gamme dynamique (entre 10^7 et 10^9 part/ml pour les NP140-OVA et NP480-OVA)
- Comparer les résultats obtenus pour l'immunocapture entre les 2 systèmes
- Réaliser une analyse fine des spots, en termes de dénombrement, sur lesquelles les particules ont été capturées par AFM

Une fois la validation des deux modèles réalisés, nous avons enrichi le jeu de calibrants par la mise au point d'un troisième calibrant, les NP140-CAS. Le but est de pouvoir co-injecter deux particules de dimension distinctes et présentant deux biofonctionnalisations différentes dans un milieu tampon afin d'évaluer les capacités d'immunocapture différentielles et relatives sur biopuces. Cette caractérisation en mix validée nous a permis d'augmenter la complexité par la confrontation avec un échantillon biologique de vésicules extracellulaires. Cet échantillon appelé PPLs est composé d'EVs plaquettaires utilisés à $9 \cdot 10^8$ part/ml et présente des ratio EVs/NP140 de 4/1 et EVs/NP480 de 20/1. Une première investigation a été effectuée au sein de l'instrumentation SPRi en termes de preuve de concept pour montrer que l'immunocapture des nanoparticules calibrantes entre la solution tampon et la solution biologique est identique. Cette solution contenant les calibrants biomimétiques en milieu biologique

est ensuite injectée dans le module NBA, pour valider par détection AFM la reproductibilité des taux de captures avec la SPRi.

Cette dernière étape a permis de valider totalement le nouveau dispositif, nous permettant la préparation à la prochaine phase consistant à réaliser des injections de particules à travers le banc expérimental complet, de la solution MADNESS.

Chapitre 4 : Couplage des modules de tri et de capture : Comportement de nanoparticules biofonctionnalisées en milieu biologique de complexité croissante

Dans notre approche d'immunocapture, nous avons montré que les injections d'échantillons de NPs dans le système SPRi et dans le module NBA ont été validées dans des milieux de complexités croissantes, nous permettant de nous rapprocher fortement de l'échantillon biologique finale comprenant les EVs.

En parallèle de ces travaux, nos collègues de Toulouse ont mis en place le dispositif de tri de particules, basé sur la filtration hydrodynamique décrite dans le chapitre 1 et présentant un rayon critique de coupure de 350 nm (diamètre de 700 nm). Le dispositif est composé d'un canal principal dans lequel va s'écouler l'échantillon. Perpendiculairement à ce canal principal, un réseau de canaux secondaires de dimensions plus faibles permet le passage de particules ayant une taille inférieure à celle du rayon critique. Ce dispositif comprend 100 canalisations latérales⁹³.

L'objectif principal de ce chapitre est de présenter le couplage de ces deux dispositifs en conservant les performances individuelles de chacun (tri pour le premier et immunocapture pour le second). Avant de tester les deux modules couplés, nous avons réalisé des expériences préliminaires d'immunocapture en SPRi en appliquant des conditions fluidiques similaires à celle en sortie du dispositif de tri. En effet, le dispositif de tri et le banc expérimental actuel ne permettent pas d'obtenir un débit en sortie du dispositif qui soit supérieur à 1,5 μ l/min. À très bas débit (environ 1 μ l/min), nous verrons que des étapes de lavage sont nécessaires pour limiter les interactions non spécifiques, car à ces faibles débits il existe des différences de comportement en comparaison avec les expériences d'injection réalisées dans des gammes classiques de débit (à 20 μ l/min). Les points importants pour la réussite du couplage concernent la limitation de la perte de volume, le guidage de l'échantillon du premier dispositif jusqu'au second et la réalisation des expériences dans un temps acceptable en conservant les performances de chacune des parties.

Nous avons ainsi testé l'injection des particules dans des conditions de complexité biologique croissante, afin d'évaluer la plage de performance et de fonctionnement limite de la solution MADNESS. Pour cela, nous avons réalisé des essais sur un mélange de NP140-CAS/NP480-OVA/ NP920 en tampon PBS/Tween (0,1%), et le même mélange de NPs dilué dans du plasma sanguin.

4.1. Expérience préliminaire d'immunocapture SPRI, à bas débit, en conditions idéales

Avant de coupler les deux dispositifs, nous avons effectué des expériences de capture à faible débit d'injection. Le module de tri développé par nos partenaires présente les paramètres suivants : (i) pression d'entrée d'échantillon de 1 bar, (ii) débit en sortie des voies secondaires de l'ordre de $1,25\mu\text{l}/\text{min}$ et (iii) production de $20\ \mu\text{l}$ de solution triée (c'est cette solution qui sera guidée jusqu'au module NBA lors du couplage) à partir de 15 ml d'échantillon injectés, et ce en 20 min. Ces conditions de fonctionnement du dispositif de tri constituent donc les « conditions d'entrée » du module de capture quand les deux dispositifs sont connectés.

Notre première approche a donc été de réaliser des expériences d'immunocapture à faible débit avec le SPRI, à $1\mu\text{l}/\text{min}$, afin d'appréhender le comportement des NPs (NP480-OVA et NP140-CAS), dans ces conditions de flux. La réalisation de ces tests de couplage n'a pu se faire que lors d'une unique campagne expérimentale, sans possibilité de reproduire d'autres campagnes par manque de temps (les expériences complémentaires seront réalisables dans un projet futur). Le faible débit d'injection entraîne un faible volume de collection, ce qui se caractérise par un temps expérimental plus long (près d'une heure) pour avoir suffisant d'échantillon pour réaliser l'immunocapture. En effet, les expériences de validation du module NBA ont été réalisées dans des conditions expérimentales habituelles ($20\ \mu\text{l}/\text{min}$ pendant 10 min) que nous ne pourrions reproduire lors du couplage si nous voulons conserver les performances de tri et si nous ne voulons pas changer le banc fonctionnel initialement mis en place. L'expérience est schématisée sur la figure 4.1:

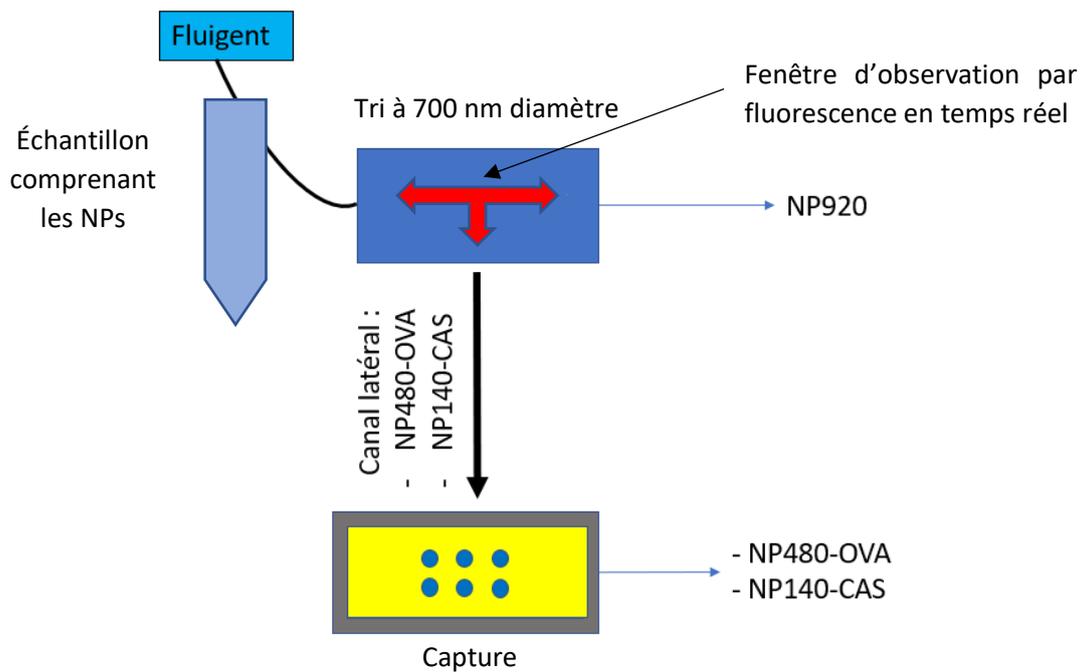


Fig.4.1 Schéma représentant le couplage tri + immunocapture constituant la solution MADNESS.

Pour réussir ce couplage, sans modifier chacune des deux expériences, il faut partir d'une solution simple, à savoir un couplage simple avec un capillaire (ici de 10 cm de long et avec un diamètre interne de 0,5 mm). À partir des résultats de ces expériences, il sera possible dans une prochaine approche d'affiner techniquement ce couplage par :

- l'ajout d'une chambre de collection dans les canaux latéraux ou entre les deux modules,
- la mise en place d'une boucle d'injection,
- l'intégration des deux dispositifs.

4.1.1 Biodétection SPRi

Nous avons injecté de façon séquentielle à $1\mu\text{l}/\text{min}$ et pendant 20min, une solution de NP480-OVA à $3 \cdot 10^7$ particules/ml, suivi d'un flush et des lavages. Nous avons choisi cette concentration, car nous devons réaliser les expériences avec une concentration faible adaptée aux dispositifs de tri (à cette étape nous pensons utiliser cette concentration pour les injections), mais qui soit cohérente avec les résultats du chapitre 3. Puis nous avons procédé à l'injection de NP140-CAS à $2 \cdot 10^8$ particules/ml, suivi également d'un flush et un lavage, également dans des conditions qui soit cohérentes avec les résultats obtenus dans le chapitre précédent et les différents résultats de tri. L'expérience a été réalisée également en inversant l'ordre des injections conduisant aux mêmes résultats. Les étapes de

lavage sont le fruit d'expériences préliminaires de SPRi en vue de retirer un maximum d'interactions non spécifiques qui sont apparues sur la surface et les spots contrôles à ces très faibles débits. Les résultats de l'une de ces injections sont présentés sur la figure 4.2 :

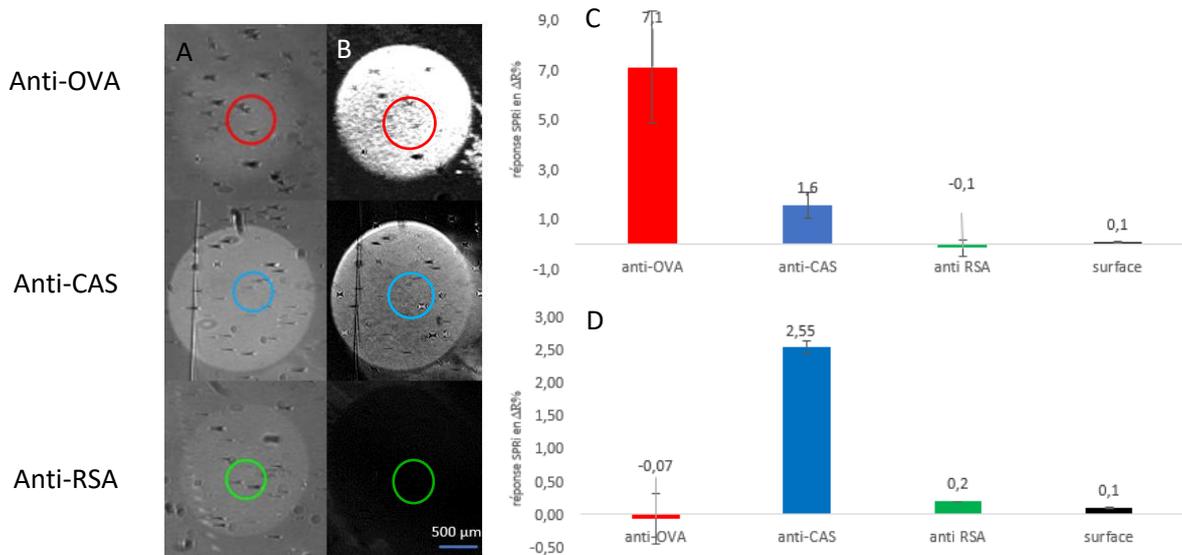


Fig. 4.2. Expérience d'immunocapture SPRi à bas débit, par injections séquentielles de NPs ($1\mu\text{l}/\text{min}$ durant 20 min). Les NP480-OVA sont injectées à $3 \cdot 10^7$ part/ml suivies par des flushs/lavages en eau, les NP140-CAS sont injectés à $2 \cdot 10^8$ part/ml suivies par des flushs/lavages en eau. En A° images SPRi de la biochip après greffage des anticorps, en B° images SPRi de la puce après capture des NP480-OVA puis des NP140-CAS, en C° niveaux de capture après injection des NP480-OVA puis rinçage, et en D° niveaux d'injection après injection des NP140-CAS puis rinçage.

Après l'injection des NP480-OVA, à $3 \cdot 10^7$ part/ml, puis des étapes de lavage, un taux de capture SPRi de $7,1 \Delta R \%$ $\pm 2,25$ est obtenu sur les spots anti-OVA (sans les lavages, la réponse SPRi est supérieure à $10\Delta R \%$). Nous noterons également une adsorption non spécifique sur les spots anti-CAS, qu'il faudra éliminer par amélioration de la procédure de lavage (nous l'avons grandement améliorée, mais il reste $1,6\Delta R \%$).

Après injection des NP140-CAS à $2 \cdot 10^8$ part/ml, puis procédure de lavage, un taux de capture $2,55 \Delta R \%$ $\pm 0,1$ est obtenu sur les spots anti-CAS.

Nous constatons que, pour les NP480-OVA, les niveaux de capture sont au moins 3 fois supérieurs à ceux obtenus à un débit de $20 \mu\text{l}/\text{min}$. Pour les NP140-CAS, nous obtenons des niveaux de capture équivalents, à bas ou haut débit.

Pour comprendre les résultats obtenus, il faut mentionner plusieurs informations importantes concernant l'obtention des résultats en SPRi et leurs interprétations :

Les différences de comportement d'immunocapture à bas débit par rapport aux débits usuels d'environ 20 $\mu\text{l}/\text{min}$ résident dans la capacité des particules à diffuser du volume de la solution vers la surface de la puce de façon plus importante au niveau de la couche limite de diffusion. Dans ce cas, une augmentation du transfert de masse est engendrée par un faible débit. Le débit faible conduit les particules à avancer lentement et créer ainsi un front de concentration qui se traduit par la création d'un gradient de concentration en Z, vers la surface dans la cellule fluide, ce qui induit probablement un dépôt de matière et donc un signal plus important que lors des expériences précédentes à plus haut débit¹⁶¹ au niveau de la surface de la puce. De plus, des considérations cinétiques d'interactions biomoléculaires peuvent contribuer à amplifier ce phénomène : À 1 $\mu\text{l}/\text{min}$, nous sommes à la limite basse du débit en SPRI et dans ces conditions la constante de dissociation sera faible alors que la constante d'association ne changera pas¹⁶² : c'est ainsi que les phénomènes de capture spécifique et non spécifique sont augmentés. Il va y avoir une portion de dépôt de matière qui va augmenter. Pour lutter contre cette « adsorption » de matière (surtout des NP480-OVA) et visualiser uniquement les interactions spécifiques, il faut induire une modification des étapes de lavages.

Lorsque la surface est suffisamment nettoyée (élimination des particules qui sont uniquement adsorbées sur la surface), observation réalisée par suivi des plasmons, la puce est scannée par AFM afin d'estimer la densité de particules capturées en surface des différents spots.

4.1.2 Caractérisation des densités surfaciques

Afin de permettre une analyse rigoureuse, représentative des événements de piégeage sur les différentes zones d'intérêt (anticorps) de la puce, une méthodologie d'acquisition d'images AFM (cf chapitre 2 / méthodologie AFM) a été mise en place au cours des 2 thèses précédentes (Obeid S., 2017 ; Namasivayam B., 2021)^{155,156}.

Les spots anti-OVA, anti-CAS et RSA sont scannés, 15 images par famille de spots sont enregistrées afin d'avoir une vue d'ensemble des différentes familles de spots. La figure 4.3 présente les images caractéristiques obtenues :

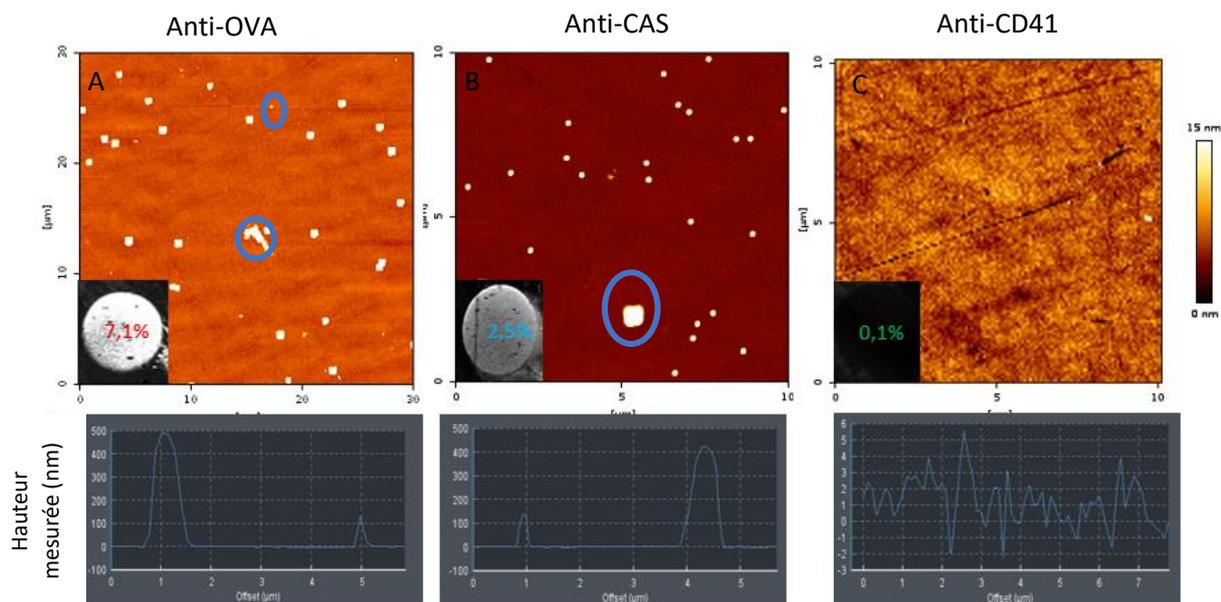


Fig. 4.3. Images AFM en mode Qi des spots anti-OVA (A), anti-CAS (B) et RSA (C) après injection séquentielle de NPs. Images représentatives de quinze images réalisées, par famille de spots. En encarts, les images SPRi respectives des différents spots. Les cercles bleus représentent des co-immunocapture. Z scale anti-OVA=480 nm, 140 nm sur anti-CAS et 15 nm sur anti-CD41. N=2.

Après scan et analyse des images réalisées sur les spots, nous observons que :

- Sur les spots anti-OVA, une densité de NP480-OVA de l'ordre de $41\,750 \pm 11\,000$ NP480/mm² est observée. Il y a aussi co-présence non spécifique sur ces spots anti-OVA de NP140-CAS avec une densité d'environ $16\,000 \pm 1500$ particules/mm².
- Sur les spots anti-CAS, une densité de NP140-CAS de l'ordre de $437\,500 \pm 45\,000$ NP140/mm², avec une co-présence non spécifique de NP480-OVA d'environ 4000 ± 250 particules/mm²
- Sur les contrôles négatifs RSA, il ne met en évidence que de très rares objets, le contrôle négatif est donc encore valable. Il y a donc une légère réaction croisée entre les spots anti-CAS et anti-OVA, lorsque le débit est faible.

Pour comprendre ces résultats, nous allons reprendre les informations obtenues dans le chapitre précédent. Nous savons, d'après notre étude sur nos gammes dynamiques, que $1\Delta R$ % de réponse SPRi en NP480-OVA représente environ $8174 \pm 2\,030$ particules/mm² et que $1\Delta R$ % de réponse SPRi en NP140-CAS correspond à environ $166\,000 \pm 46\,000$ particules/mm².

Dans le cas présent, $7\Delta R$ % de réponse SPRi pour les NP480-OVA devrait correspondre à environ $57\,200 \pm 16\,000$ particules/mm² (or nous obtenons $41\,750 \pm 11\,000$ particules/mm²), cela signifie que nous sommes dans la fourchette basse des estimations attendues, car pour ce nombre de

particules/mm², la réponse attendue serait plutôt de 5 ΔR % de réponse SPRI. Pour les NP140-CAS, 2,5ΔR % de réponse SPRI correspond à environ 415 000 ± 115 000 particules/mm² (or nous obtenons 437 500 +/- 45 000/mm²), ce qui nous situe dans la bonne gamme de valeur. Donc nous avons moins de particules NP480-OVA que prévu. Nous pensons qu'une partie des particules qui sont présente sont uniquement adsorbées, à cause des débits faibles et qu'elles sont éliminées lors du lavage de la puce (lors des lavages nous avons éliminé 3ΔR % de réponse SPRI sur les spots anti-OVA).

Pour les NP140-CAS nous sommes dans la gamme attendue, ce qui prouve que, même à bas débit, ce modèle de calibrant est robuste. Nous pouvons déduire de ces observations que les phases de lavages ont un impact plus important sur les spots anti-OVA, alors que les spots anti-CAS sont plus résistants à ces phases de lavages.

Nous devons également mettre l'accent sur le temps d'expérience. À travers l'ensemble des résultats obtenus en SPRI à bas débit, nous avons constaté qu'il faut compter 40 minutes minimum à partir de l'injection de l'échantillon pour que celui-ci passe sur la biopuce d'immunocapture. D'autre part, nous savons que les faibles débits favorisent les interactions non spécifiques. Il est alors nécessaire de laver les surfaces pour retirer ces interactions non spécifiques sans dégrader le matériel piégé spécifiquement, surtout lorsqu'il s'agira de vésicules extracellulaires. Nous avons pu déterminer expérimentalement qu'un lavage de 3 x 30 secondes en eau et le changement de débit à 20 μl/min, permet de retirer la majorité des contributions non spécifiques (lors de la campagne de connexion, ce lavage se fera par une voie latérale ou par une connexion directe du module NBA avec le contrôleur en pression). Cette étape semble cruciale pour la suite des expériences.

4.2 Expérience en module couplés, en conditions idéales

Pour mener ces expériences de couplage, les dispositifs de tri et de capture, préalablement caractérisés indépendamment, sont couplés comme nous l'avons conçu dans la figure 4.1 (page 143). Ce couplage est obtenu à partir d'une connexion directe à l'aide d'une tubulure de 10 cm et de 0,5mm de diamètre interne entre la sortie latérale du dispositif de tri et l'entrée du module de capture. La figure 4.4 présente une photographie du couplage MADNESS :

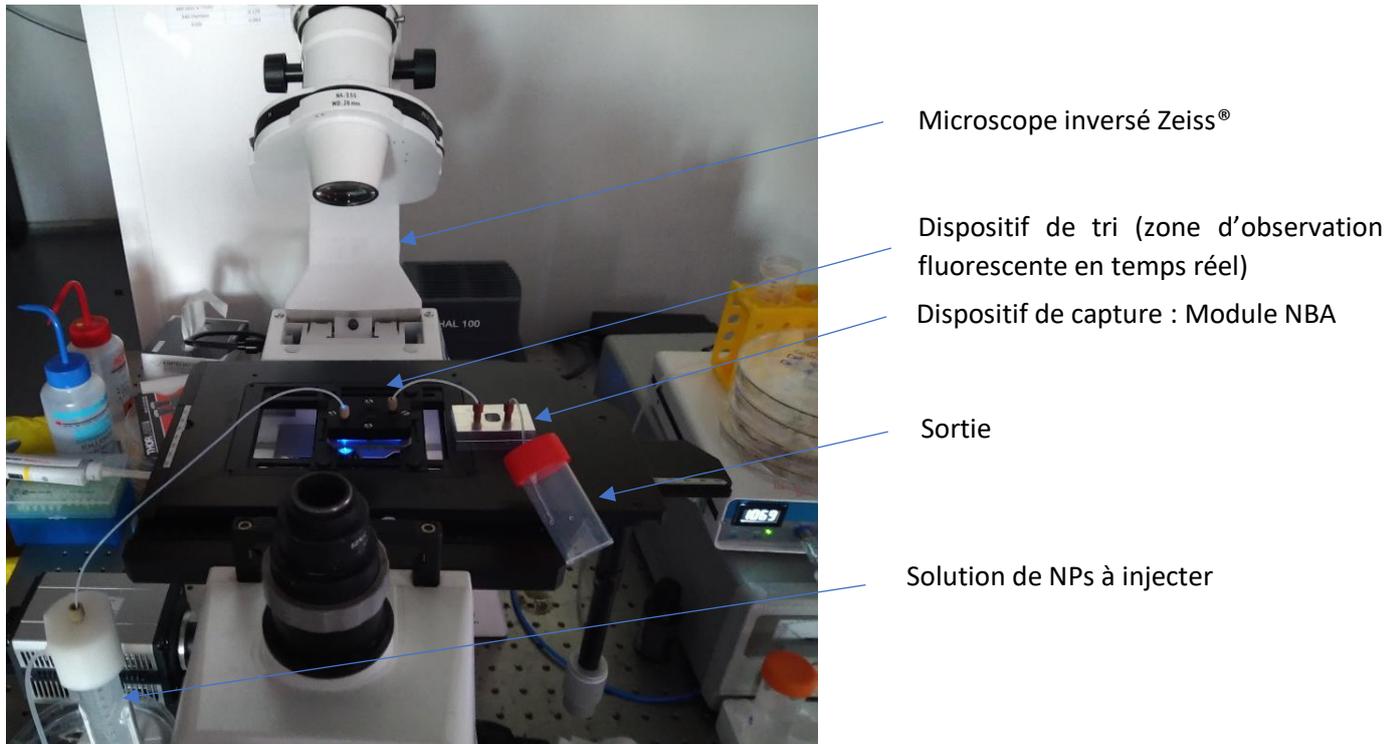


Fig. 4.4. Banc expérimental de connexion directe des modules de tri et de capture de nanoparticules.

Dans cette expérience, avec ce seuil de coupure (rayon de coupure de 350 nm, soit 700 nm de diamètre), on s'attend au tri des NPs ayant une taille inférieure à 700 nm, donc à la séparation suivie du piégeage sur puce des NP480-OVA (sur les spots anti-OVA) et des NP140-CAS (sur les spots anti-CAS). Les NP480 sont fluorescentes dans le vert (λ_{exc} 506 nm/ λ_{em} 530 nm), les NP920 fluorescentes dans le rouge (λ_{exc} 636/ λ_{em} 686 nm) et les NP140 étant non fluorescentes. Avec les deux types de particules fluorescentes, nous pouvons suivre, en temps réel sous microscope, le bon fonctionnement du tri des particules. De plus, la microscopie à fluorescence réalisée sur les puces d'or immédiatement en fin d'expérience va nous permettre d'obtenir des résultats préliminaires sur le bon déroulement des expériences d'immunocapture :

- Les résultats théoriques attendus doivent mettre en évidence sur la biopuce un signal fort de fluorescence verte sur les spots anti-OVA,
- Une absence de signal de fluorescence rouge qui témoignerait de la non-présence de NP920 sur la puce,
- Ainsi qu'une absence ou une réponse très faible de fluorescence verte sur les spots anti-CAS et anti-CD41.

Le substrat de capture correspond à la même puce d'or que celle qui est représentée dans le chapitre 3 en figure 3.2. Après spotting (le protocole est celui décrit dans l'annexe 3.3, avec uniquement le greffage de 6 spots sur la puce, comme le montre la figure 4.5), la puce d'or présentant les différents spots est insérée dans le module, pour procéder aux dernières étapes de passivation (RSA et éthanolamine), puis mise sous flux. Dans les expériences réalisées en couplage, nous avons pour objectif de complexifier le milieu avec des échantillons biologiques constitués entre autres d'EVs plasmatiques. C'est ce qui nous a poussés à remplacer ici, le spot contrôle RSA par le spot anti-CD41, spécifique des protéines membranaires plaquettaires. Nous avons déjà vérifié à travers nos expériences de gamme dynamique et d'injection en milieu complexe que les NPs n'interagissent que très peu sur les spots anti-CD41.

L'échantillon constitué d'un mix de 50 ml de NP920 à 10^7 part/ml (particules dites « contaminante »), NP480-OVA et NP140-CAS à $5 \cdot 10^7$ part/ml respectivement dilués dans un tampon PBS/tween 0.1%, est injecté dans le module de tri (la concentration initialement prévue était de 10^8 part/ml et elle a dû être diminuée pour rester dans une gamme acceptable par rapport à l'échantillon biologique et limiter la perturbation du tri).

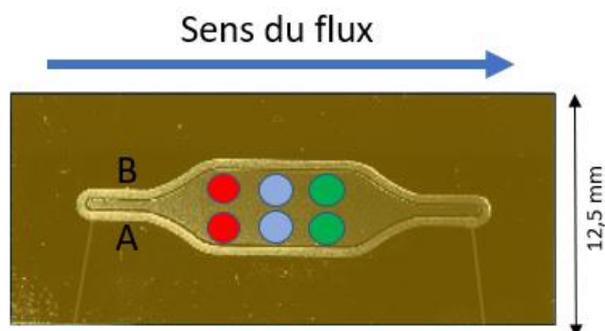


Fig. 4.5. Image de la puce d'or avec une représentation des spots qui sont greffés sur la surface. En rouge : spots anti-OVA ; en bleu : spots anti-CAS ; en vert : spots anti-CD41. Un duplicat est réalisé dans ces expériences (ligne A ou B).

Connexion des modules : les deux dispositifs sont connectés avec des tubulures en PEEK de diamètre interne égal à 0,5 mm. Les volumes morts dans les tubulures correspondent à 20 μ l. Avant la connexion, les dispositifs subissent différentes étapes de lavages notamment avec du PBS-Tween (0,1%), des étapes de passivation à la RSA et de désactivation à l'éthanolamine. Le débit en sortie du module de capture, connecté au module de tri, est stable et est compris entre 1 à 1,5 μ l/min. La méthodologie d'injection d'échantillon est la suivante : injection de 50 ml d'échantillon (durant 45 min), puis injection de tampon durant 15 min (afin de s'assurer que l'ensemble des particules de l'échantillon soit collecté en sortie des canaux secondaires, à cause du volume mort) ; les deux

dispositifs sont déconnectés afin de réaliser les étapes de lavage de la puce au sein du module de capture et à 20 $\mu\text{l}/\text{min}$ pendant 3*30 secs avant que la surface de la puce soit traitée au glutaraldéhyde. Nous pouvons ensuite réaliser des observations par microscopie de fluorescence et AFM.

Le suivi par fluorescence en temps réel dans le dispositif de tri met en effet en évidence l'absence de NP920 dans les canaux secondaires, l'absence de bouchage du système, et un débit de circulation des NP480 OVA stable⁹³.

Les images de la figure 4.6 correspondent à l'analyse des puces d'or en fin d'expérience.

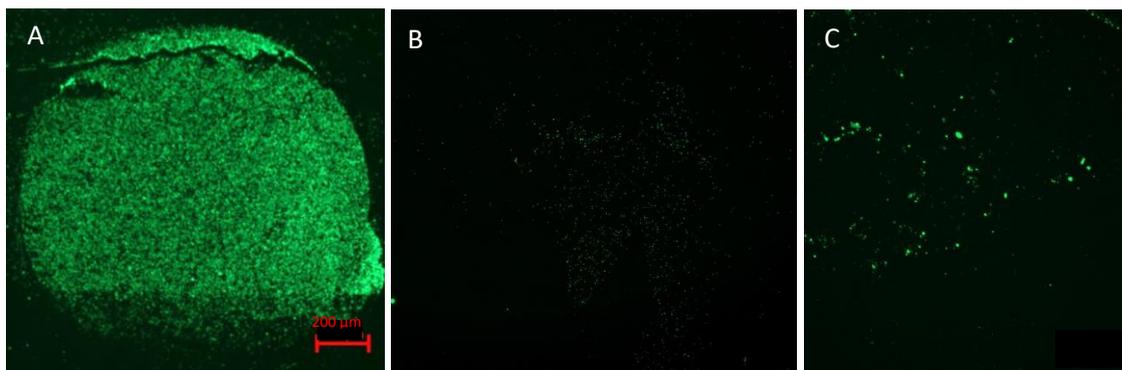


Fig. 4.6. Caractérisation par microscopie de fluorescence de la biopuce, après injection d'un mix de NP140-CAS/NP480-OVA/NP920 à 1 $\mu\text{l}/\text{min}$ durant 45 min. Spot anti-OVA en A°, spot anti-CAS en B° et spot anti-CD-41 en C°. Les paramètres de fluorescence sont les suivants : pour les NP480 les longueurs d'émission et d'absorption sont λ_{exc} 506 nm/ λ_{em} 530 nm et pour les NP920 : λ_{exc} 636/ λ_{em} 686 nm. La fluorescence a été vérifiée aux deux longueurs d'onde en conservant les mêmes paramètres de puissance (95%) et de filtre pour toutes les images.

Les résultats de microscopie de fluorescence mettent en évidence une fluorescence importante dans le vert sur les spots anti-OVA et très faible sur les autres spots (avec une réponse plus forte sur spots anti-CD41, assez hétérogène notamment sur certains points, que sur spots anti-CAS). Ces résultats de fluorescence indiquent donc une bonne efficacité et spécificité de capture des NP480-OVA sur les spots anti-OVA et une faible interaction non spécifique de ces NP480-OVA sur les autres spots. La même puce est analysée par AFM, afin de mettre en évidence les NP140-CAS qui ne sont pas fluorescentes et d'estimer la densité surfacique sur la puce de toutes les particules.

4.2.1 Image AFM sur les spots anti-OVA, anti-CAS et anti-CD41

Les spots sont analysés par AFM en mode Qi et les résultats sont présentés sur la figure 4.7 :

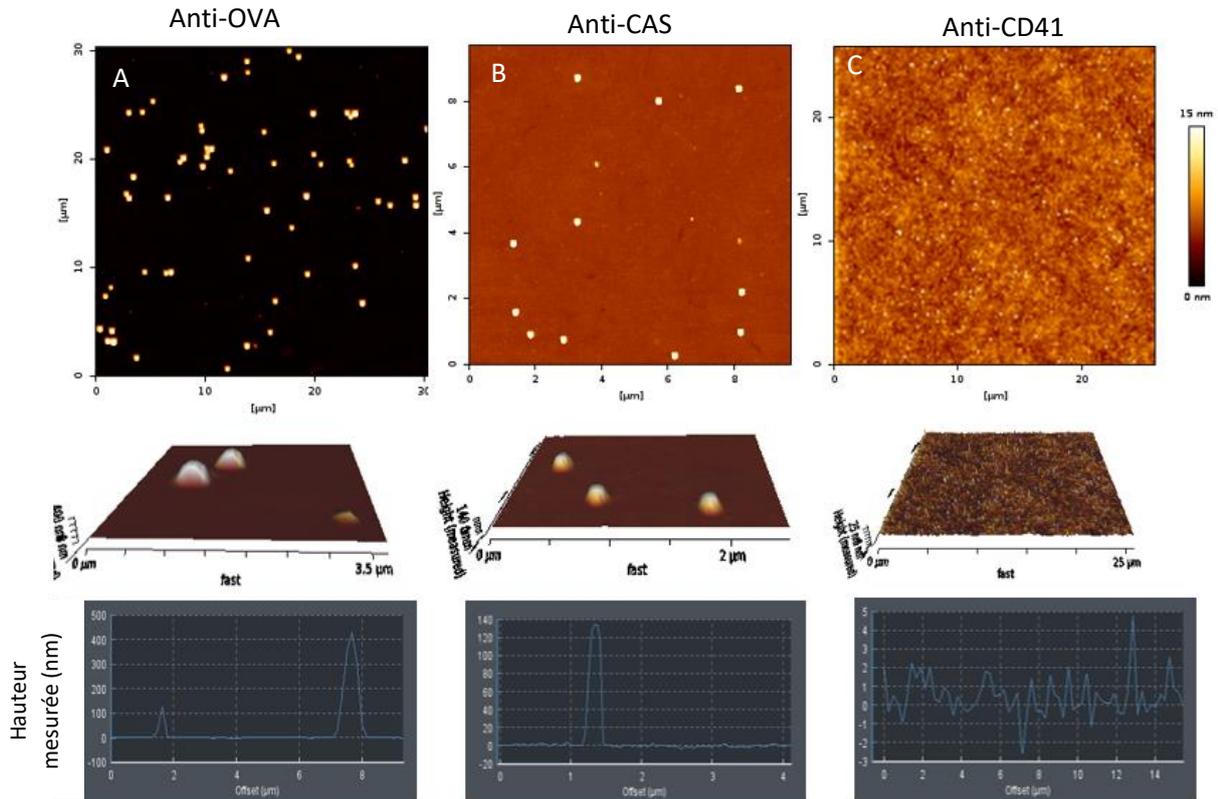


Fig. 4.7. Analyse AFM en mode Qi des spots anti-OVA, anti-CAS et anti-CD41. En A° Spot anti-OVA : image puis représentation 3D et profil des objets capturés. En B° Spot anti-CAS : puis représentation 3D et profil des objets capturés. En C° Spot anti-CD41 : image puis représentation 3D et profil des objets. Cela permet de vérifier l'absence de NP140-CAS/NP480-OVA sur le spot anti-CD41. Pour chaque spot, il s'agit d'une image présentée parmi les 15 collectées. Z scale anti-OVA=480 nm, 140 nm sur anti-CAS et 15 nm sur anti-CD41.

Les résultats obtenus sur les **spots anti-OVA** sont les suivants :

- Densité surfacique en NP480-OVA : $66\,400 \pm 15\,000$ particules/mm²
- Densité surfacique en NP140-CAS : $6\,600 \pm 1100$ particules/mm²

Les résultats obtenus sur **spots anti-CAS** sont les suivants :

- Densité surfacique en NP480-OVA : $6\,200 \pm 1\,200$ particules/mm²
- Densité surfacique en NP140-CAS : $138\,700 \pm 13\,000$ particules/mm²

Nous ne mettons pas en évidence sur les images que nous avons réalisées de NPs interagissant avec les spots anti-CD41. Ces spots devraient donc être fonctionnels, car disponibles pour le piégeage des EVs dérivées de plaquettes en milieu complexe, sur la majorité de la surface. Si nous comparons l'expérience en modules couplés ci-dessus avec celle réalisée en SPRi, nous avons obtenu les résultats suivants (tableau 4.1 et figure 4.8).

Remarque : Nous savons que dans cette gamme de concentration (de 10^7 à 10^9 NP/ml), les variations de taux de capture augmentent avec les variations de concentrations (résultat établi avec la gamme dynamique dans le chapitre 3). Ceci nous autorise l'utilisation d'un facteur correctif, car les concentrations ne sont pas exactement les mêmes, elles ont dû être légèrement modifiées lors de la campagne de couplage pour permettre une optimisation du tri des particules en question (pour les NP480-OVA, les expériences SPRi ont été réalisées à $3 \cdot 10^7$ contre $5 \cdot 10^7$ particules dans les expériences de couplage/ pour les NP140-CAS, les expériences SPRi ont été réalisées à $2 \cdot 10^8$ contre $5 \cdot 10^7$ particules dans les expériences de couplage) et pour être en adéquation avec l'échantillon biologique (avec une concentration de calibrants qui ne dépasse pas celle des EVs). Cette opération permet de lisser les légères différences de concentration. Cette correction va nous permettre de comparer les résultats de la connexion avec les valeurs obtenues en SPRi. En tenant compte des écarts de concentrations et des relations obtenues lors de la campagne de validation du module NBA, nous pouvons corriger les taux de capture obtenue en SPRi pour déterminer les taux de capture dans les mêmes conditions de concentrations que l'expérience de couplage.

	Taux de capture (particule par mm^2)	Écart type
NP480-OVA en SPRi corrigé*	65 450	19 200
NP480-OVA en module NBA	66 400	15 020
NP140-CAS en SPRi corrigé*	109 375	11 300
NP140-CAS en module NBA	138 700	13 000

Tab. 4.1. Densité surfacique de NPs sur spot anti-OVA et anti-CAS obtenu lors des expériences SPRi ou en module couplé, en tampon PBS/tween à bas débit ($1 \mu\text{l}/\text{min}$).

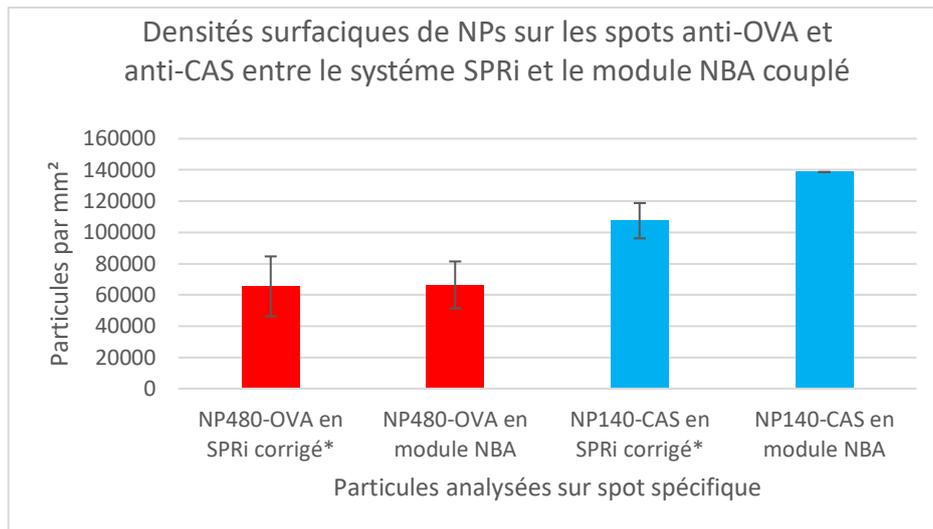


Fig. 4.8. Valeurs d'immunocapture sur spot anti-OVA et spot anti-CAS lors de la capture à bas débit en SPRi et lors de l'expérience de couplage (*valeur SPRi corrigée tenant compte des facteurs de dilution). Déviation standard basée sur 3 expériences, incluant chacune 2 spots de la même famille.

Pour l'injection du mix sur les spots anti-OVA, nous observons que le signal spécifique est de $66\,400 \pm 15\,000$ particules/mm² pour l'approche couplée contre $65\,000 \pm 19\,000$ particules/mm² attendu dans le cas de l'injection du mix en module seul à faible débit. Sur les spots anti-CAS, le signal obtenu de $138\,700 \pm 13\,000$ est un peu plus fort que pour la valeur de l'expérience sans le couplage avec la partie tri (109 375). Cependant, la différence est relativement faible et en parallèle, les réponses non spécifiques sont très faibles (environ 6 000 particules/mm²).

L'ensemble de ces résultats constituent une première preuve de concept pour le modèle simple de tri + immunocapture des particules, en conditions idéales, sans perturbation majeure des événements d'immunocapture par le dispositif de tri. Ceci est considéré comme un résultat important pour la continuité du projet, car ils prouvent qu'en conditions simples, les dispositifs sont robustes aux étapes de tri et de capture avec un couple de particules développées par nos soins. L'étape suivante est naturellement de complexifier l'échantillon en diluant cette fois les NPs dans des échantillons biologiques.

4.3 Expérience en module couplés, en milieu plasma

L'échantillon mix de NPs (NP480 et NP140 à $5 \cdot 10^7$ particules/ml et NP920 à 10^7 particules/ml) a été injecté, dilué dans du plasma sanguin dans deux conditions de dilution, plasma dilué par 1000 ou

par 10 (la concentration en EVs initiale est estimée à 10^{12} particules / ml par NTA). Le plasma¹⁶³ est le résultat d'un processus de centrifugation du sang conduisant à l'élimination des éléments cellulaires. Il correspond à la partie majoritaire du sang (55% du volume total). Il est essentiellement composé de sels minéraux, de lipides, de glucides et de protéines (albumine, facteur de coagulation, immunoglobines). Le plasma utilisé dans nos expériences est fourni par l'EFS de Toulouse⁹³.

L'expérience d'injection des NPs en milieu complexe, et, quelle que soit la dilution du plasma, s'est déroulée sans différence majeure par rapport aux expériences précédentes en tampon PBS/tween (observation réalisée en direct en fluorescence dans les canaux du dispositif de tri). En effet, la présence de plasma aux différentes dilutions n'a semble-t-il pas induit de modification du phénomène de tri de NPs : aucun problème de bouchage, ni de perturbation fluïdique n'ont été observés⁹³.

Une fois l'échantillon de NPs en plasma injecté dans les modules couplés et les lavages effectués, la puce est caractérisée en microscopie de fluorescence. Ceci permet la mise en évidence des NP480-OVA piégées sur la puce et d'éventuelles interactions de NP920 non triés par le dispositif, comme le montre la figure 4.9 :

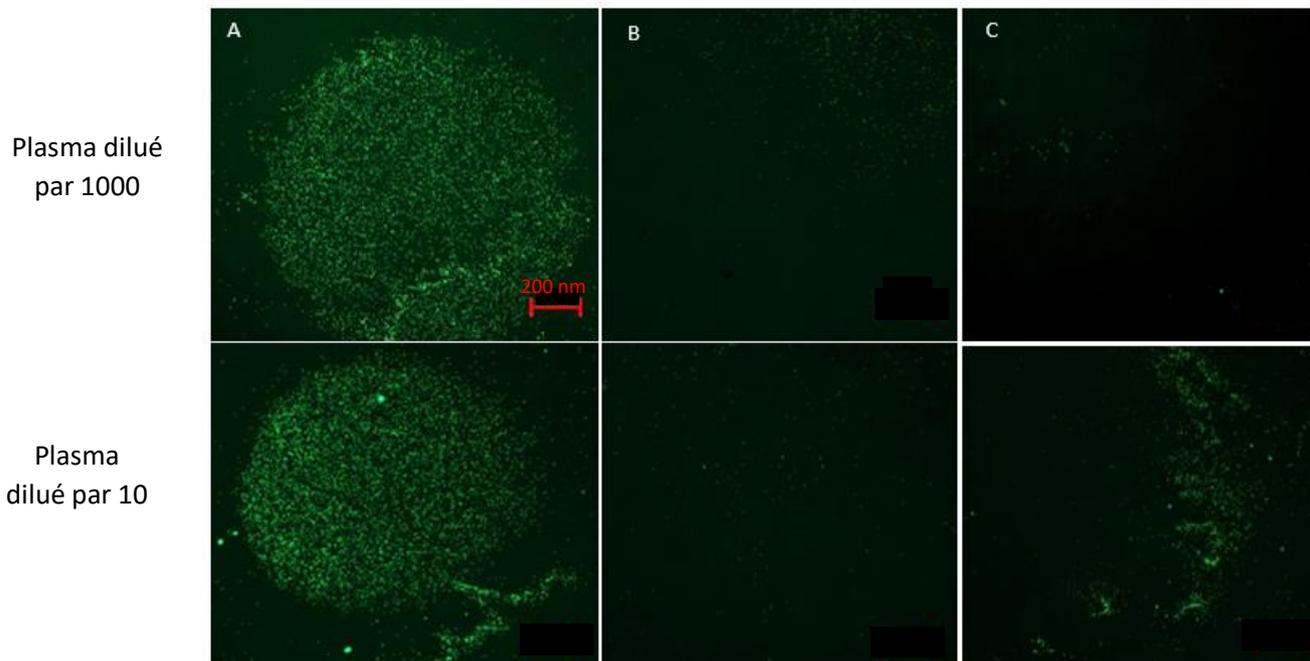


Fig. 4.9. Images de la biopuce en microscopie de fluorescence, avec en A° un spot anti-OVA, en B° un spot anti-CAS et en C° un spot anti-CD41. Les paramètres de fluorescence sont les suivants : pour les NP480 : $\lambda=506/530$ nm (em/abs) et pour les NP920 : $\lambda= 636/686$ nm (em/abs). La fluorescence a été vérifiée dans les deux filtres en conservant les mêmes paramètres de puissance (95%) pour toutes les images (avec un grossissement en 5X). Le plasma à une concentration estimée à 10^{12} particules/ml¹⁶⁴.

À partir des caractérisations de biopuce par microscopie de fluorescence, nous pouvons constater que les spots anti-OVA fluorescent dans le vert de façon identique entre les essais en plasma dilué par 1000 et dilué par 10. Néanmoins, les données de fluorescence montrent que l'intensité est plus faible sur les expériences en plasma que lors de celles en PBS/tween (0,1%) (il faut également tenir compte de la fluorescence verte présente sur les spots anti-CD41). Cette observation sera confirmée par AFM avec des valeurs de taux de capture plus faible que les expériences en milieu tampon.

Plusieurs hypothèses peuvent alors être formulées pour interpréter les observations :

- Des éléments contenus dans le milieu biologique pourraient interagir avec la surface des NP480-OVA, via une adsorption de protéines (notamment l'albumine) à la surface des NPs par exemple, et limitent ensuite leur reconnaissance par le spot d'anticorps
- La matrice biologique pourrait posséder des éléments compétiteurs avec l'OVA saturant partiellement les anticorps
- La concentration en NPs en sortie de tri pourrait être modifiée par la présence de matrice biologique (donnée non vérifiable à cause de la complexité de l'échantillon).

Sur les autres spots, même si l'intensité est moindre que sur les spots anti-OVA, nous pouvons observer un léger bruit de fond en fluorescence et même quelques motifs et agrégats de fluorescence sur l'anti-CD41. Il est à rappeler qu'un signal de fluorescence dans le vert, donc dû aux NP480-OVA, était déjà retrouvé sur ces spots anti-CD41 lors d'expériences faites en PBS. Nous pouvons donc formuler l'hypothèse qu'une faible proportion de NP480-OVA viennent interagir sur la surface des spots anti-CD41 dans ces conditions.

Nous pouvons constater en AFM que le nombre de particules NP480-OVA sur les spots anti-OVA est plus faible que dans le cas de l'expérience en PBS/tween (figure 4.11). Ceci peut être dû à une compétition avec des éléments présents dans le milieu biologique ou une possible contamination de la surface des NPs qui perturberaient l'interaction entre les particules et l'anticorps anti-OVA, comme nous l'avons exposé dans les hypothèses. Pour les spots anti-CAS, la densité surfacique est plus forte, d'environ deux fois, que lors de l'expérience en tampon. Il est difficile de formuler une hypothèse qui expliquerait ce résultat à ce stade avec aussi peu de donnée. Nous pouvons noter à ce niveau (comme le montre l'image en plasma dilué par 10 sur le spot anti-CAS de la figure 4.9) que la présence des NP480-OVA sur spot anti-CAS est un événement rare, mais possible. Nous pouvons mettre en avant l'influence du milieu biologique qui a modifié le comportement de capture en comparaison avec les résultats en milieu tampon. Ces résultats ont été obtenus lors d'une campagne expérimentale qu'il

faudrait reproduire afin de confirmer ces premiers résultats. Les résultats AFM sont présentés dans la figure 4.10 :

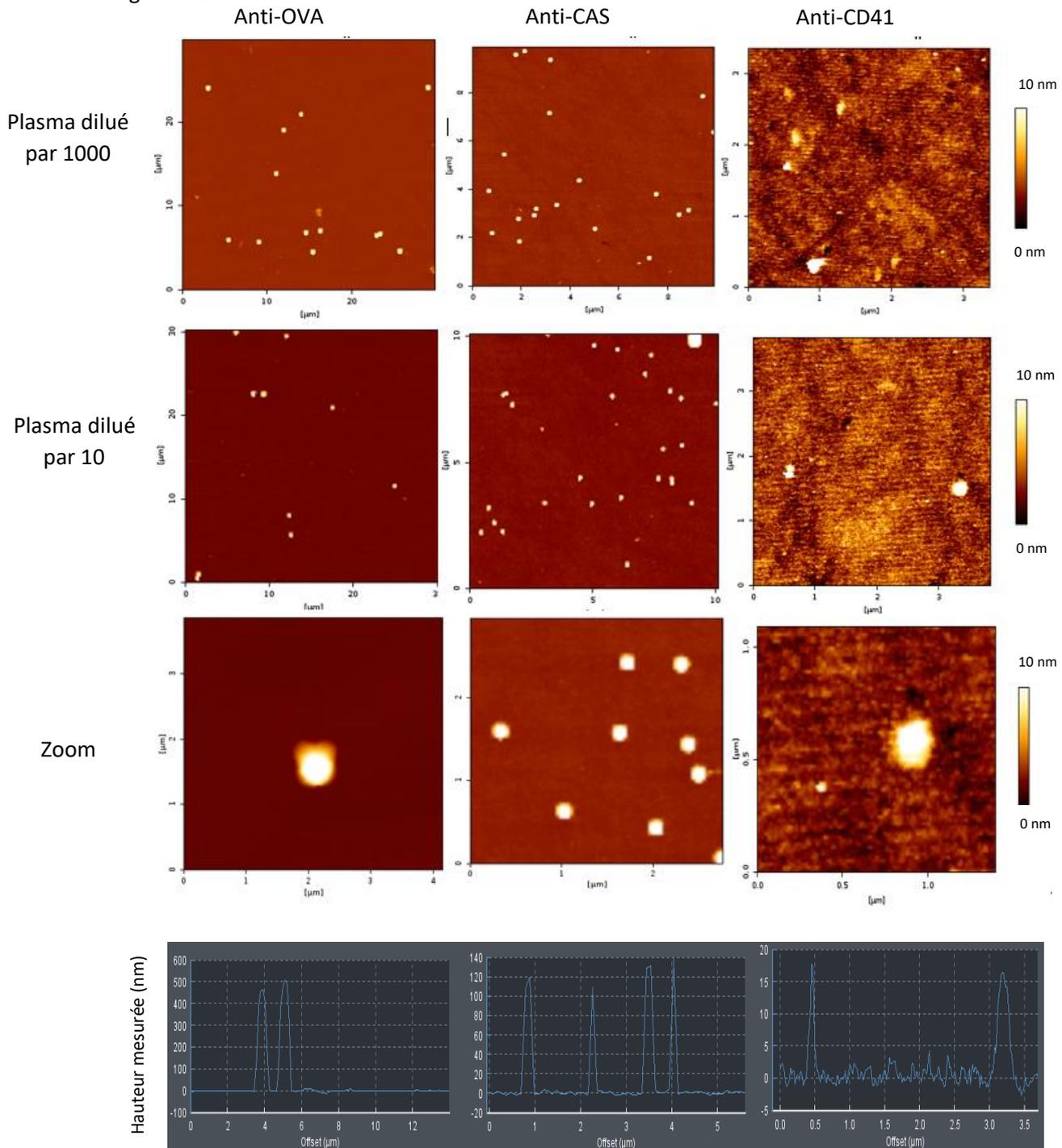


Fig. 4.10. Images AFM de la biopuce après injection du mix de NPs en plasma. En A° un spot anti-OVA, en B° un spot anti-CAS et en C° un spot anti-CD41. Mode AFM QI, surface fixée, imagerie en air. Ligne 1 plasma dilué 1000 fois, ligne 2 plasma dilué par 10, ligne 3 zoom électronique, ligne 4 caractérisations des profils des particules. Z scale anti-OVA=480 nm, 140 nm sur anti-CAS et 10 nm sur anti-CD41.

La quantification des NPs sur les images AFM permet de constater une diminution importante d'environ 5 fois de la densité surfacique des NP480-OVA sur spot anti-OVA, et à l'inverse une augmentation significative des densités de NP140-CAS sur les spots anti-CAS, lorsque les NPs sont injectées dans du plasma, qu'il soit dilué 10 ou 1000 fois.

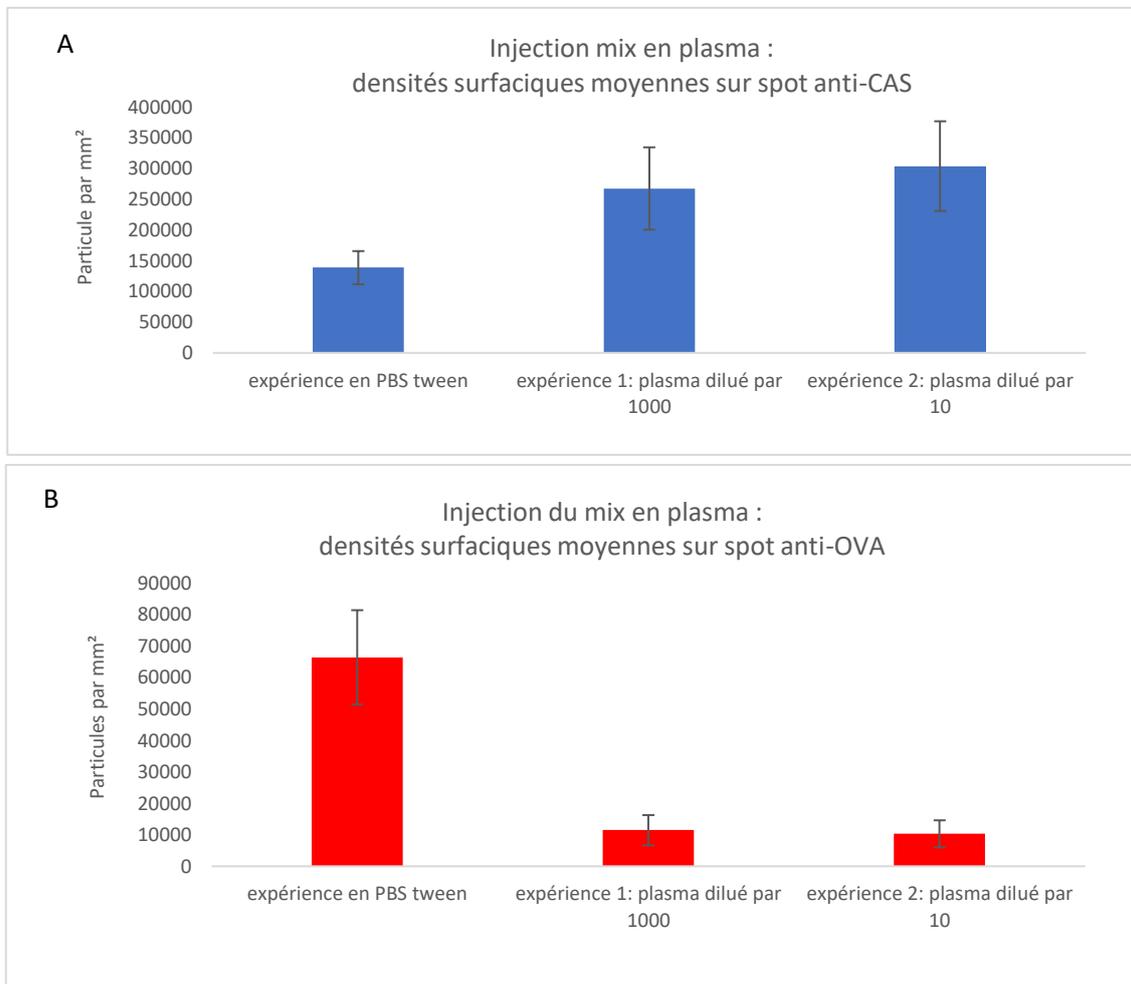


Fig. 4.11. Densité surfacique de NP sur anti-CAS (A) et anti-OVA (B) après injection en tampon ou en plasma, en modules tri+capture couplés. Calculs faits sur la base de 15 images de 900 μm^2 pour les NP480-OVA et de 15 images de 100 μm^2 pour les NP140-CAS, pour chaque condition.

D'autre part, sur le spot anti-CD41, nous nous attendions à une capture des EVs contenues dans le plasma. Or, la densité d'objets types EVs est extrêmement faible. Cela peut s'expliquer par plusieurs raisons :

- L'anticorps choisi, l'anti-CD41, n'a pas répondu convenablement par rapport à nos résultats en PPLs. Il n'est pas le plus pertinent pour la capture d'EVs à partir de plasma (le signal de capture sur anti-CD41 obtenu dans la précédente étude de notre groupe est de 0,6% avec une dilution

par 50¹⁶⁵). Nous l'avons choisi pour une première évaluation sur la base de nos résultats et nous compléterons nos puces avec d'autres anticorps lors de la prochaine campagne.

- La présence des particules de calibration a perturbé l'immunocapture des EVs CD41+
- Il ne faut pas exclure une sensible dégradation de la fonctionnalité de l'anticorps et/ou l'évolution de la qualité de l'échantillon, qui expliquerait l'absence de capture
- Les EVs CD41+ contenues dans cet échantillon ont une taille qui serait supérieure au seuil de coupure du module de tri (700 nm) dans ce lot (la vérification n'a pas pu être réalisée à cause de la complexité de l'échantillon).
- L'échantillon de plasma ne présentait que peu d'EVs plaquettaires, ou d'EVs plaquettaires intactes¹⁶⁵
- La complexité de l'échantillon a peut-être légèrement modifié les concentrations de NPs en sortie de tri
- Les phases de lavages ont conduit à une dégradation structurale des EVs.

Sur la base de l'ensemble de ces résultats, nous pouvons constater en milieu biologique des modifications de comportement des NPs et vésicules dans la solution MADNESS, mais il est important de dire que des solutions existent pour réussir à passer les problèmes rencontrés :

- Le dispositif de tri est en cours d'amélioration avec des rayons de coupures qui seront plus faibles, pour éliminer plus de « contaminant ». L'augmentation des débits de sortie et des volumes en sorties des canaux latéraux est également un objectif que nous avons fixé.
- Les anticorps choisis pour piéger les EVs peuvent être modifiés pour permettre une capture plus efficace
- Les étapes de lavage peuvent être investiguées pour permettre une amélioration du rapport signal/bruit.
- Il est également possible d'apporter des éléments nouveaux au banc expérimental pour permettre une amélioration de la collection et de l'injection des fractions triées (chambre de collection, boucle d'injection).

Conclusion :

Afin de réaliser le couplage entre les deux dispositifs de tri et de capture, nous avons dans un premier temps réalisé des expériences d'immunocapture en SPRi à bas débit (1 μ l/min), pour appréhender les réponses des différents spots anti-OVA et anti-CAS dans les conditions fluidiques de sortie de tri. Les résultats obtenus en termes d'efficacité de capture, de réponses non spécifiques, et de densité surfacique ont permis d'estimer les réponses attendues et de rajouter des étapes de lavages en établissant et validant un protocole complet d'injection et de traitement de la puce avant investigation AFM. Fort de ces données SPRi/AFM d'immunocapture, nous avons réalisé des expériences de couplage des deux modules, en tampon PBS/tween. Nous constatons que les résultats obtenus en SPRi bas débit et ceux obtenus par les approches couplées miniaturisées sont dans la même gamme. Ces résultats, de mix de NPs en tampon PBS/tween, indiquent donc que nous avons pu reproduire, en module miniature de capture, les conditions efficaces d'immunocapture de ces NPs, sur puce. Aussi, ces résultats très encourageants tendent à montrer que la connexion du module NBA au module de tri n'affecte à priori pas la composition ni la concentration en NP480 et NP140 dans le mélange.

Nous avons ensuite complexifié le milieu en y incorporant du plasma sanguin, soit dilué par 1000, soit par 10. Notre objectif était d'évaluer l'influence d'un milieu biologique complexe sur l'efficacité de tri et d'immunocapture des NPs. Le suivi du tri a mis en évidence que la présence de ce milieu biologique ne perturbait pas, à priori, d'un point de vue qualitatif, le comportement des NPs dans les voies principales et secondaires. Nous avons cependant pu observer, par les analyses par microscopie sur puce, que la densité en NP480-OVA est environ 5 fois plus faible sur les spots anti-OVA, que lorsqu'elles sont diluées dans du tampon PBS/tween. Les NP140-CAS voient quant à elle leur densité surfacique sur spot anti-CAS augmenter 2 fois, lorsqu'elles sont injectées en plasma. Ces résultats indiquent donc que des éléments contenus dans le plasma sanguin dilué même 1000 fois semblent agir soit sur les NPs, soit sur les spots d'immunocapture, soit sur les 2 à la fois. Il est à noter qu'au sein de l'équipe, des expériences de capture sur puce ont déjà été menées au préalable en plasma, et que ce dernier ne perturbait pas le fonctionnement des anticorps greffés sur puce. Dans cette autre étude, d'autres anticorps ont été testés donc nous pourrions les greffer sur la puce pour vérifier les réponses. L'hypothèse la plus probable est donc que des éléments contenus dans le plasma interagissent à la surface des NPs, sans en perturber le tri hydrodynamique, mais induisant une modification d'efficacité de leur immunocapture sur puce.

Conclusion générale

Nous avons mis en place la solution globale MADNESS basée sur une approche microfluidique consistant à coupler un dispositif de tri par filtration hydrodynamique avec un module d'immunocapture (module NBA) sur puce multiplexe. Ce module est issu de la miniaturisation de l'approche d'immunocapture de la plateforme NBA, développée dans notre groupe en 2017. Cette miniaturisation vise à compléter la plateforme analytique avec l'incorporation d'une étape de prétraitement, que constitue le module de tri, qui présente des innovations importantes (fractionnement de l'échantillon selon un rayon critique de coupure, limitation du colmatage, efficacité de tri, facilité de couplage avec le module NBA). Le développement de particules calibrantes biofonctionnalisées et caractérisées représente une partie importante du travail, nécessaire pour qualifier les performances de la solution analytique MADNESS. Utilisées comme matériel de référence, mais également comme particules calibrantes ou étalon interne, pour combler le manque d'informations sur l'immunocapture en temps réel qui s'opère au sein du module NBA car fonctionnant sans élément de transduction.

Dans le chapitre 1, nous avons contextualisé la situation concernant les EVs et les problèmes analytiques qui les concernent : une grande hétérogénéité et une complexité de ces particules freinent leurs utilisations actuelles en tant que biomarqueurs et système de délivrance de médicaments. En effet, leurs implications dans de nombreuses pathologies sont prouvées (cancer, maladie d'Alzheimer, maladie cardiovasculaire) et leur utilisation en tant que bio-indicateurs de pathologie n'est pas encore possible par manque de techniques de caractérisation et de dosage fiables. Pour répondre à ce problème d'analyse, nous avons établi l'inventaire des techniques usuelles utilisées pour l'enrichissement de l'échantillon initial en EVs, ainsi que leurs avantages et inconvénients pour permettre un positionnement de la technique de tri hydrodynamique. Les techniques utilisées le plus souvent sont la centrifugation, la filtration, la chromatographie d'exclusion stérique et les approches basées sur les phénomènes de capture sur substrat. Les limitations de ces techniques sont connues et la société savante internationale travaillant sur les EVs (ISEV) met à jour ses guides et recommandations pour limiter les erreurs d'interprétation en conseillant fortement entre autres une combinaison de différentes techniques pour mieux qualifier ces EVs. Pour tenter de combler ce manque de technique standard d'analyse des EVs, des méthodes émergentes voient régulièrement le jour. Nous en avons décrit précisément certaines et identifiées les avancées. Afin de contribuer à ce domaine par une approche originale, notre travail a consisté à développer une solution alliant tri et immunocapture : un dispositif de tri par ondes acoustiques et un dispositif de tri par filtration hydrodynamique, à connecter en amont d'un module de capture sur puce multiplexe. Dans le cadre

du projet MADNESS, nous avons couplé notre module NBA avec le dispositif microfluidique basé sur la filtration hydrodynamique. Nous le ferons avec le dispositif acoustique lorsque les dernières étapes d'amélioration dudit dispositif de tri seront réalisées. Nous souhaitons mettre en place une méthode inédite de tri et de capture qui répondent à la demande criante exprimée par la communauté de moyens de caractérisation des EVs et de ses sous-populations.

En l'absence d'élément de transduction, nous avons développé des particules submicrométriques permettant de qualifier les performances en termes de tri et d'immunocapture de la solution MADNESS. En effet, il n'existe pas de matériel standard de référence idéale mimant les EVs et disponible en grande quantité, ce qui nous a conduits à développer nos propres modèles. Les particules biomimétiques que nous avons utilisées ont des caractéristiques en taille, forme et en présence de protéine surfacique proches de celles des EVs : elles sont sphériques avec des tailles connues (140/480/920 nm), ont été biofonctionnalisées en ovalbumine ou en caséine (pour donner les calibrants NP480-OVA/NP140-OVA ou NP140-CAS et NP920) pour être piégées par immunocapture par des anticorps greffés en surface de la biopuce. Afin de pouvoir les utiliser dans les expériences de capture, il a fallu optimiser le protocole de fonctionnalisation et mettre en place les méthodes de caractérisation fine de nos particules calibrantes. Une analyse en taille et en concentration a été effectuée par la TRPS, puis un dosage protéique par μ BCA a permis de déterminer le taux de recouvrement des différents lots de NPs en protéines. Le point clé de la qualification de nos lots de nanoparticules correspond aux expériences de piégeage sur puce permettant d'évaluer les gammes dynamiques et les spécificités de capture des différentes NPs biofonctionnalisées. Cette étape d'immunocapture est nécessaire pour valider le lot testé et garantir son utilisation ensuite en mélange aux EVs. La dernière phase de caractérisation correspond à une analyse métrologique et morphomécanique de la surface des différents spots, par microscopie de fluorescence et AFM en utilisant une méthodologie rigoureuse d'acquisition et de traitement de données. Ce travail a constitué une autre part importante du projet pour la détermination des densités de particules par unité de surface de spots. Cette valeur de densité sera essentielle pour interpréter les résultats d'immunocapture. Les particules ont permis d'alimenter les développements du groupe « tri » chez nos collègues de Toulouse, qui ont montré que ces particules présentaient des avantages significatifs (limitation des agrégats, faible colmatage sur la surface du dispositif, disponibilité en grande quantité), ce qui a conduit à leur utilisation systématique dans le développement de la solution MADNESS.

Dans le troisième chapitre, nous avons présenté le développement et la caractérisation du module NBA. La description de la plateforme NBA est indispensable pour définir les caractéristiques du module. La première phase a consisté à concevoir le dispositif, en présentant les techniques de fabrication de salle blanche, suivi d'expériences de simulations pour appréhender au mieux le

comportement des fluides dans ce module de capture. Une fois le module développé, nous avons réalisé une caractérisation fluidique en injectant une solution tampon à différentes pressions pour déterminer les conditions de débit en fonction de la pression appliquée. Nous avons ainsi pu mettre en place un protocole équivalent à celui de la SPRi (en appliquant une correspondance entre pression appliquée et le débit obtenu). Les NP140-OVA et les NP480-OVA ont été injectées à différentes concentrations pour déterminer des gammes dynamiques et les limites de détection du modèle, en partant des informations connues sur les limites usuelles de la méthode SPRi. Les expériences ont été réalisées en SPRi et sur le module NBA pour permettre une comparaison des densités surfaciques sur spots, après immunocapture. À ce stade une gamme dynamique est définie entre 10^7 part/ml et 10^9 part/ml en SPRi et en module NBA, nous permettant de déterminer une gamme de travail en concentration de NPs injectées. Nous pouvons observer que les taux de capture sont plus importants (environ 4 fois pour les NP480-OVA par exemple) en module NBA pour une concentration donnée. Une fois cette validation réalisée et dans l'optique de coupler les deux dispositifs, nous avons besoin d'un nouveau type de particules avec une autre protéine de surface, pour permettre d'injecter en parallèle les particules de 140 nm et celle de 480 nm. Les expériences ont été réalisées en SPRi avec les NP140-CAS, avec des taux de capture spécifiques dont les valeurs sont supérieures à $2\Delta R\%$ pour les concentrations choisies, des interactions non spécifiques faibles et une contamination croisée très faible. Nous avons pu valider ce nouveau modèle de particules calibrantes. Par la suite, les NP140-CAS et les NP480-OVA ont été co-injectées en tampon pour valider la non-perturbation des particules entre elles. La validation de cette étape a permis d'injecter la solution de calibrants en milieu biologique en SPRi, pour vérifier que la complexité de la matrice ne perturbe pas la capture de ces particules. Enfin, les expériences ont été réalisées en module NBA, et les résultats comparés avec ceux obtenus en SPRi. Cette comparaison montre que le module d'immunocapture est fonctionnel (en capturant de la même manière les NPs qu'avec la technique SPRi en milieu complexe) et prêt à être couplé au dispositif de tri.

Dans le chapitre 4, nous avons couplé les deux dispositifs, vérifié les conditions d'écoulements particuliers (avec un débit de $1\mu\text{l}/\text{min}$ et une étanchéité vérifiée) liés à la présence du dispositif de tri et réalisé, comme dans le chapitre 3, des co-injections de nanoparticules en conditions idéales (en milieu tampon). Nous avons préalablement réalisé des expériences d'immunocapture à bas débit ($1\mu\text{l}/\text{min}$) pour nous rapprocher des conditions d'écoulement fluide en entrée du dispositif NBA. Les résultats de ces expériences de co-injection de particules en milieu tampon ont montré que le tri et l'immunocapture sont robustes (reproductibles avec les valeurs bas débit du SPRi) lorsque les dispositifs sont connectés avec des résultats similaires à ceux obtenus lorsque les échantillons sont injectés dans les dispositifs individuellement. Nous avons ensuite complexifié les solutions en injectant

les NP140-CAS et les NP480-OVA en milieu biologique. Des modifications de comportement d'immunocapture des NPs ont été observées lorsque la solution est diluée dans du plasma. Les NP480-OVA présentent un taux de capture 5 fois plus faible, alors que les NP140-CAS eux présentent des densités surfaciques plus élevées (2 fois environ) qu'en conditions idéales. D'après les résultats obtenus, plusieurs hypothèses ont pu être proposées, mais nous pensons que la raison principale de cette modification de comportement d'immunocapture réside dans l'adsorption de composés de la matrice biologique autour des particules, ceci entraînant une modification de leur immunocapture. L'ensemble de ce travail nous a permis de valider la solution MADNESS avec des résultats probants en milieu idéal et des premiers résultats en milieu biologique encourageants. La réussite du tri et de l'immunocapture en milieu biologique serait un résultat majeur pour le positionnement de ces travaux au niveau national et international, et permettrait d'envisager des actions de maturations de technologies pour des niches applicatives en diagnostic et suivi thérapeutique.

Perspectives

À travers l'ensemble des résultats obtenus ayant permis de valider une première configuration de dispositifs couplés de tri et d'immunodétection d'EVs, nous pouvons définir un ensemble d'actions à réaliser pour atteindre une solution préanalytique & analytique globale, intégrée et robuste pour caractériser les EVs et les sous-populations informatives. Pour cela, les travaux de développement sur le dispositif de tri par ondes acoustiques se poursuivent actuellement pour atteindre sa configuration finale et également être couplés avec le module NBA. Le potentiel accordable du tri par filtration hydrodynamique permettra de viser de nouveaux seuils de rayons critiques (100 nm notamment) et des améliorations vont être réalisées pour permettre des écoulements avec des débits en sortie plus importants. Ceci entraînera une diminution des temps d'expériences et limitera les effets de transfert de masse qui conduisent à une augmentation des interactions non spécifiques.

Pour la partie module NBA, l'automatisation du patterning avec des instruments commerciaux permettra de greffer plus d'anticorps différents, et ainsi d'avoir la possibilité de capturer les particules biologiques avec plusieurs cibles. Des travaux d'optimisation sur le biomimétisme des particules calibrantes seront menés en particulier dans l'exposition et la densité des protéines de surfaces afin de rapprocher les conditions d'immunocaptures entre cibles biologiques et particules biofonctionnalisées. Il faut également préciser que des solutions de « matériel standard de référence » sont en train d'être mises en place dans la communauté des EVs. Disposer de tels « matériels » permettrait à la fois de fiabiliser nos résultats et également de compléter notre jeu de particules calibrantes pour aider au développement de nos solutions analytiques.

Une seconde cellule fluidique a également été imaginée, à partir d'un matériau transparent (tel que le verre ou le polycarbonate) pour permettre de suivre par microscopie à fluorescence, l'écoulement et la capture de particules fluorescentes à travers une fenêtre d'observation, en temps réel. Il est important également de faire évoluer les étapes de caractérisation en incorporant de nouvelles techniques (spectroscopie Raman sur puce notamment) et en améliorant/augmentant en débit les techniques de caractérisation disponibles (apport de l'AFM High speed, permettant de réduire drastiquement les temps de scan des surfaces des puces).

Enfin, une solution séduisante consisterait à une intégration complète des deux dispositifs (tri et module NBA) sur une même puce, limitant les volumes morts, en permettant un temps de capture plus rapide. Pour atteindre cet objectif, une première étape d'optimisation et de rapprochement des deux systèmes pourrait être réalisée avec la mise en place de boucles d'injections, d'un réservoir de

collecte et d'une chambre de concentration intermédiaire de l'échantillon. Ce système répondrait aux cahiers des charges des besoins analytiques des EVs et pourrait être mis en place dès les prochaines étapes expérimentales.

ANNEXE

Annexe 2.1 : présentation de la qualification des lots biofonctionnalisés

Protocole	Lot	Échantillon	Modèle protéique	Concentration attendue (part/ml)	Concentration moyenne TRPS	Quantité de protéine par NP	Concentration de travail	Immunocapture
Intermédiaire*	9	140	OVA	7,00E+11	Conforme	1000	1E+7 à 1E+9	+
		480	OVA	5,00E+10	Conforme	16000	1E+7 à 1E+9	+
	10	140	OVA	7,00E+11	Conforme	1900	1E+7 à 1E+9	+
		480	OVA	5,00E+10	Conforme	27400	1E+7 à 1E+9	+
Final	11	140	OVA	7,00E+11	Conforme	1200	1E+7 à 1E+9	++
		480	OVA	5,00E+10	Conforme	18000	1E+7 à 1E+9	++
	12	140	CAS	7,00E+11	Conforme	3500	1E+7 à 1E+9	+++
		480	OVA	5,00E+10	Conforme	16700	1E+7 à 1E+9	+++
	13	140	CAS	7,00E+11	Conforme	3400	1E+7 à 1E+9	+++
		480	OVA	5,00E+10	Conforme	20000	1E+7 à 1E+9	+++
	14	140	CAS	7,00E+11	Conforme	2150	1E+7 à 1E+9	+++
		480	OVA	5,00E+10	Conforme	16300	1E+7 à 1E+9	+++
	15	140	CAS	7,00E+11	Conforme	2400	1E+7 à 1E+9	+++
		480	OVA	5,00E+10	Conforme	20170	1E+7 à 1E+9	+++
	16	140	CAS	7,00E+11	Conforme	3700	1E+7 à 1E+10	+++
		480	OVA	5,00E+10	Conforme	17000	1E+7 à 1E+9	+++
	17	140	CAS	7,00E+11	Conforme	3000	1E+7 à 1E+11	+++
		480	OVA	5,00E+10	Conforme	35000	1E+7 à 1E+9	+++

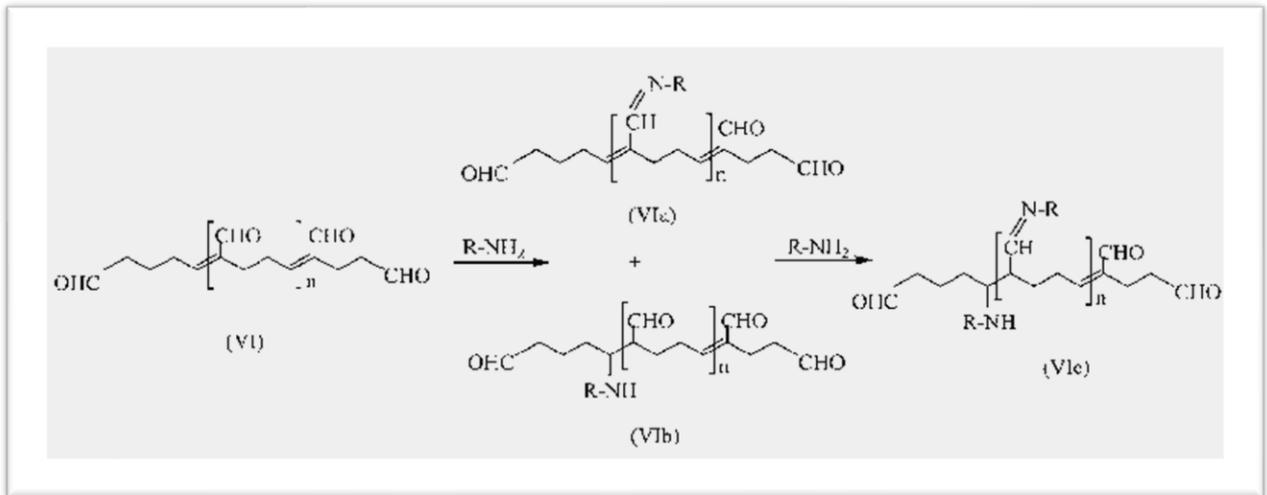
*Tab. Annexe 2.1. Tableau récapitulatif des lots de NPs biofonctionnalisés, d'après les expériences de TRPS et de dosage μ BCA. *Les valeurs sont obtenues avant optimisation de l'étape de dosage avant la lecture par spectroscopie visible.*

Annexe 2.2 : protocole standard d'immunocapture

Étape	Procédure SPRI
Puce d'Or	Développé en salle blanche
Activation de la surface	EDC/sulfo-NHS (200/50 mM), 30 min
Spotting/greffage des anticorps	Mode manuel et incubation sous ultrasons (37kHz en fréquence/30% de puissance), 30 min
Préparation de la puce	Insertion en SPRI
Amorçage en tampon en instrument	1 ml/min
Passivation à la RSA	20 µl/min, 5 min
200 µg/ml, pH 4,5	
Nettoyage à l'OG 40 mM	30 sec.
Passivation à la RSA	20 µl/min, 5 min
Passivation à l'éthanolamine	20 µl/min, 10 min
Préparation de la puce	20 µl/min en tampon
Injection de l'échantillon	20 µl/min, 10 min
Fin de l'injection	20 µl/min en tampon
Étape de conservation de la surface	20 µl/min, 5 min

Tab. Annexe 2.2. Présentation du protocole expérimental réalisé en SPRI.

Annexe 3.1 : étape de fixation de la surface des puces avec le glutaraldéhyde



Annexe 3.1 : réaction de réticulations du glutaraldéhyde avec les protéines pour permettre de fixer la surface des puces d'or¹⁶⁶

Annexe 3.2 flow charts

Flow Chart du dispositif fluidique

- 1- **Masque 1** : Réalisation des cellules fluidiques sur silicium



- 2- **Masque 2** : Réalisation de l’empreinte pour le joint (alignement FAV)



- 3- **Masque 3** : Réalisation des trous en FAR



Les étapes en salle blanche du développement de la cellule fluidique sont :

- CAO des masques
- Développement des masques pour la cellule, les ouvertures fluidiques et le joint
- Dépôt de résine sur les wafers en silicium 4 pouces
- Gravure plasma en DRIE pour la cellule, puis pour les ouvertures et la position des joints
- Étape de nettoyage
- Découpe de chaque cellule à la scie
- Récupération des joints en PDMS pour les installer sur la cellule fluidique

Hors salle blanche, développement du packaging :

- Construction du support de base pour positionner la cellule fluidique et la puce d’or
- Développement du capot permettant de clore le système et permettant de fixer les connectiques fluidiques
- Découpe permettant de créer des fenêtres d’observations

Annexe 3.3 : présentation des deux protocoles expérimentale d'immunocapture des particules

Étape	Procédure SPRI	Procédure Module
Puce d'Or	Protocole identique	
Activation de la surface	EDC/sulfo-NHS (200/50 mM), 30 min	
Spotting/greffage des anticorps	Mode manuel et incubation sous ultrasons (37kHz en fréquence/30% de puissance), 30 min	
Préparation de la puce	Eau ultrapure	
Amorçage en tampon en instrument	1 ml/min	20 mbar
Passivation à la RSA 200 µg/ml, pH 4,5	20 µl/min, 5 min	8 mbar, 5 min
Nettoyage à l'OG 40mM	30 sec.	
Passivation à la RSA	20 µl/min, 5 min	8 mbar, 5 min
Passivation	20 µl/min, 10 min	8 mbar, 10 min
Préparation de la puce	20 µl/min en tampon	20 mbar en tampon
Injection de l'échantillon	20 µl/min, 10 min	8 mbar, 10 min
Fin de l'injection	20 µl/min en tampon	8 mbar en tampon
Étape de conservation de la surface	20 µl/min, 5 min	8 mbar, 5 min

Annexe. 3.3. Protocole d'immunocapture dans le SPRI et son équivalence dans le module NBA.

Bibliographies

1. Siegel RL, Miller KD, Jemal A. Cancer statistics, 2019. *CA A Cancer J Clin.* 2019;69(1):7-34. doi:10.3322/caac.21551
2. Yabroff KR, Lund J, Kepka D, Mariotto A. Economic Burden of Cancer in the US: Estimates, Projections, and Future Research. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2011;20(10):2006-2014. doi:10.1158/1055-9965.EPI-11-0650
3. Targeting cancer cells with nanotherapeutics and nanodiagnostics: Current status and future perspectives. *Seminars in Cancer Biology.* 2021;69:52-68. doi:10.1016/j.semcan.2020.01.011
4. Soluble PD-L1 as a Biomarker in Malignant Melanoma Treated with Checkpoint Blockade | Cancer Immunology Research | American Association for Cancer Research. Accessed March 31, 2022. <https://aacrjournals.org/cancerimmunolres/article/5/6/480/468774/Soluble-PD-L1-as-a-Biomarker-in-Malignant-Melanoma>
5. Soluble podoplanin as a biomarker in diffuse-type gastric cancer. Accessed March 31, 2022. <https://www.spandidos-publications.com/10.3892/or.2022.8262>
6. Analysis of circulating DNA and protein biomarkers to predict the clinical activity of regorafenib and assess prognosis in patients with metastatic colorectal cancer: a retrospective, exploratory analysis of the CORRECT trial - The Lancet Oncology. Accessed March 31, 2022. [https://www.thelancet.com/journals/lanonc/article/PIIS1470-2045\(15\)00138-2/fulltext](https://www.thelancet.com/journals/lanonc/article/PIIS1470-2045(15)00138-2/fulltext)
7. Raposo G, Stoorvogel W. Extracellular vesicles: Exosomes, microvesicles, and friends. *J Cell Biol.* 2013;200(4):373-383. doi:10.1083/jcb.201211138
8. Willms E, Cabañas C, Mäger I, Wood MJA, Vader P. Extracellular Vesicle Heterogeneity: Subpopulations, Isolation Techniques, and Diverse Functions in Cancer Progression. *Front Immunol.* 2018;9. doi:10.3389/fimmu.2018.00738
9. Obeid S. *Analyse Quantitative et Qualitative Sur Puce de Vésicules Extracellulaires En Milieux Complexes Au Sein d'une Plateforme Nanobioanalytique.* thesis. Bourgogne Franche-Comté; 2017. Accessed April 25, 2020. <http://www.theses.fr/2017UBFCD009>
10. Doyle LM, Wang MZ. Overview of Extracellular Vesicles, Their Origin, Composition, Purpose, and Methods for Exosome Isolation and Analysis. *Cells.* 2019;8(7):727. doi:10.3390/cells8070727
11. Chargaff E, West R. The biological significance of the thromboplastic protein of blood. *J Biol Chem.* 1946;166(1):189-197.
12. Wolf P. The nature and significance of platelet products in human plasma. *Br J Haematol.* 1967;13(3):269-288. doi:10.1111/j.1365-2141.1967.tb08741.x
13. Mallocci M, Perdomo L, Veerasamy M, Andriantsitohaina R, Simard G, Martínez MC. Extracellular Vesicles: Mechanisms in Human Health and Disease. *Antioxid Redox Signal.* 2019;30(6):813-856. doi:10.1089/ars.2017.7265

14. Simons M, Raposo G. Exosomes – vesicular carriers for intercellular communication. *Current Opinion in Cell Biology*. 2009;21(4):575-581. doi:10.1016/j.ceb.2009.03.007
15. Momen-Heravi F. Isolation of Extracellular Vesicles by Ultracentrifugation. In: Kuo WP, Jia S, eds. *Extracellular Vesicles: Methods and Protocols*. Methods in Molecular Biology. Springer; 2017:25-32. doi:10.1007/978-1-4939-7253-1_3
16. Yáñez-Mó M, Siljander PRM, Andreu Z, et al. Biological properties of extracellular vesicles and their physiological functions. *J Extracell Vesicles*. 2015;4:27066. doi:10.3402/jev.v4.27066
17. Colombo M, Raposo G, Théry C. Biogenesis, secretion, and intercellular interactions of exosomes and other extracellular vesicles. *Annu Rev Cell Dev Biol*. 2014;30:255-289. doi:10.1146/annurev-cellbio-101512-122326
18. Kim KM, Abdelmohsen K, Mustapic M, Kapogiannis D, Gorospe M. RNA in extracellular vesicles. *Wiley Interdiscip Rev RNA*. 2017;8(4):10.1002/wrna.1413. doi:10.1002/wrna.1413
19. Engineered Extracellular Vesicles for Cancer Therapy - Zhang - 2021 - Advanced Materials - Wiley Online Library. Accessed March 31, 2022. <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/adma.202005709>
20. Crescitelli R, Lässer C, Jang SC, et al. Subpopulations of extracellular vesicles from human metastatic melanoma tissue identified by quantitative proteomics after optimized isolation. *Journal of Extracellular Vesicles*. 2020;9(1):1722433. doi:10.1080/20013078.2020.1722433
21. Lane RE, Korbie D, Hill MM, Trau M. Extracellular vesicles as circulating cancer biomarkers: opportunities and challenges. *Clin Transl Med*. 2018;7:14. doi:10.1186/s40169-018-0192-7
22. de Jong OG, Kooijmans SAA, Murphy DE, et al. Drug Delivery with Extracellular Vesicles: From Imagination to Innovation. *Acc Chem Res*. 2019;52(7):1761-1770. doi:10.1021/acs.accounts.9b00109
23. Phillips W, Willms E, Hill AF. Understanding extracellular vesicle and nanoparticle heterogeneity: Novel methods and considerations. *Proteomics*. 2021;21(13-14):e2000118. doi:10.1002/pmic.202000118
24. Yuan T, Huang X, Woodcock M, et al. Plasma extracellular RNA profiles in healthy and cancer patients. *Sci Rep*. 2016;6(1):1-11. doi:10.1038/srep19413
25. Definition of liquid biopsy - NCI Dictionary of Cancer Terms - National Cancer Institute. Published February 2, 2011. Accessed October 30, 2021. <https://www.cancer.gov/publications/dictionaries/cancer-terms/def/liquid-biopsy>
26. Li W, Li C, Zhou T, et al. Role of exosomal proteins in cancer diagnosis. *Mol Cancer*. 2017;16(1):145. doi:10.1186/s12943-017-0706-8
27. Zamani P, Fereydouni N, Butler AE, Navashenaq JG, Sahebkar A. The therapeutic and diagnostic role of exosomes in cardiovascular diseases. *Trends Cardiovasc Med*. 2019;29(6):313-323. doi:10.1016/j.tcm.2018.10.010
28. Special issue on the role of extracellular vesicles in human diseases | Experimental & Molecular Medicine. Accessed May 17, 2020. <https://www.nature.com/articles/s12276-019-0208-4>

29. Shetty AK, Upadhy R. Extracellular Vesicles in Health and Disease. *Aging Dis.* 2021;12(6):1358-1362. doi:10.14336/AD.2021.0827
30. Li W, Wang H, Zhao Z, et al. Emerging Nanotechnologies for Liquid Biopsy: The Detection of Circulating Tumor Cells and Extracellular Vesicles. *Adv Mater Weinheim.* 2019;31(45):e1805344. doi:10.1002/adma.201805344
31. Wang YM, Trinh MP, Zheng Y, Guo K, Jimenez LA, Zhong W. Analysis of circulating non-coding RNAs in a non-invasive and cost-effective manner. *TrAC Trends in Analytical Chemistry.* 2019;117:242-262. doi:10.1016/j.trac.2019.07.001
32. Dignat-George F. Extracellular Vesicles: Overview and Clinical Implications. *Blood.* 2018;132(Supplement 1):SCI-25-SCI-25. doi:10.1182/blood-2018-99-109472
33. Jeudy J, Salvador A, Simon R, et al. Overcoming biofluid protein complexity during targeted mass spectrometry detection and quantification of protein biomarkers by MRM cubed (MRM3). *Anal Bioanal Chem.* 2014;406(4):1193-1200. doi:10.1007/s00216-013-7266-6
34. Hassanpour M, Rezaie J, Nouri M, Panahi Y. The role of extracellular vesicles in COVID-19 virus infection. *Infection, Genetics and Evolution.* 2020;85:104422. doi:10.1016/j.meegid.2020.104422
35. Nagelkerke A, Ojansivu M, van der Koog L, et al. Extracellular vesicles for tissue repair and regeneration: Evidence, challenges and opportunities. *Advanced Drug Delivery Reviews.* 2021;175:113775. doi:10.1016/j.addr.2021.04.013
36. Extracellular Vesicles: Potential Roles in Regenerative Medicine - PMC. Accessed August 1, 2022. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4253973/>
37. Journal of Extracellular Vesicles. Wiley Online Library. doi:10.1002/(ISSN)2001-3078
38. Lötvall J, Hill AF, Hochberg F, et al. Minimal experimental requirements for definition of extracellular vesicles and their functions: a position statement from the International Society for Extracellular Vesicles. *J Extracell Vesicles.* 2014;3. doi:10.3402/jev.v3.26913
39. Théry C, Witwer KW, Aikawa E, et al. Minimal information for studies of extracellular vesicles 2018 (MISEV2018): a position statement of the International Society for Extracellular Vesicles and update of the MISEV2014 guidelines. *Journal of Extracellular Vesicles.* 2018;7(1):1535750. doi:10.1080/20013078.2018.1535750
40. EVerZom | Extracellular vesicles for breakthrough therapies. EVerZom. Accessed January 3, 2022. <http://everzom.com/extracellular-vesicles/>
41. Hessvik NP, Llorente A. Current knowledge on exosome biogenesis and release. *Cell Mol Life Sci.* 2018;75(2):193-208. doi:10.1007/s00018-017-2595-9
42. Vesicle formation during reticulocyte maturation. Association of plasma membrane activities with released vesicles (exosomes). - ScienceDirect. Accessed January 4, 2022. <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0021925818480957>
43. Mathivanan S, Ji H, Simpson RJ. Exosomes: Extracellular organelles important in intercellular communication. *Journal of Proteomics.* 2010;73(10):1907-1920. doi:10.1016/j.jprot.2010.06.006

44. György B, Szabó TG, Pásztói M, et al. Membrane vesicles, current state-of-the-art: emerging role of extracellular vesicles. *Cell Mol Life Sci.* 2011;68(16):2667-2688. doi:10.1007/s00018-011-0689-3
45. Anand S, Samuel M, Mathivanan S. Exomeres: A New Member of Extracellular Vesicles Family. In: Mathivanan S, Fonseka P, Nedeva C, Atukorala I, eds. *New Frontiers: Extracellular Vesicles. Subcellular Biochemistry.* Springer International Publishing; 2021:89-97. doi:10.1007/978-3-030-67171-6_5
46. Adan A, Alizada G, Kiraz Y, Baran Y, Nalbant A. Flow cytometry: basic principles and applications. *Critical Reviews in Biotechnology.* 2017;37(2):163-176. doi:10.3109/07388551.2015.1128876
47. Kurien BT, Scofield RH. Western blotting. *Methods.* 2006;38(4):283-293. doi:10.1016/j.ymeth.2005.11.007
48. Butler JE. [34] The amplified ELISA: Principles of and applications for the comparative quantitation of class and subclass antibodies and the distribution of antibodies and antigens in biochemical separates. In: *Methods in Enzymology.* Vol 73. Immunochemical Techniques: Part B. Academic Press; 1981:482-523. doi:10.1016/0076-6879(81)73087-8
49. Micro BCA™ Protein Assay Kit. Accessed July 22, 2021. <https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/23235>
50. Szatanek R, Baj-Krzyworzeka M, Zimoch J, Lekka M, Siedlar M, Baran J. The Methods of Choice for Extracellular Vesicles (EVs) Characterization. *Int J Mol Sci.* 2017;18(6). doi:10.3390/ijms18061153
51. Stetefeld J, McKenna SA, Patel TR. Dynamic light scattering: a practical guide and applications in biomedical sciences. *Biophys Rev.* 2016;8(4):409-427. doi:10.1007/s12551-016-0218-6
52. How TRPS Works | Izon Science. Accessed July 22, 2021. <https://www.izon.com/trps/how-it-works>
53. Surface Plasmon Resonance imaging (SPRi) - HORIBA. Accessed July 22, 2021. <https://www.horiba.com/fra/products/scientific/molecular-and-microanalysis/surface-plasmon-resonance-imaging-spri/>
54. Electron Microscopy | TEM vs SEM - FR. Accessed July 22, 2021. <https://www.thermofisher.com/fr/fr/home/materials-science/learning-center/applications/sem-tem-difference.html>
55. Binnig G, Rohrer H, Gerber Ch, Weibel E. Surface Studies by Scanning Tunneling Microscopy. In: Neddermeyer H, ed. *Scanning Tunneling Microscopy. Perspectives in Condensed Matter Physics.* Springer Netherlands; 1993:31-35. doi:10.1007/978-94-011-1812-5_1
56. McClelland GM, Erlandsson R, Chiang S. Atomic Force Microscopy: General Principles and a New Implementation. In: Thompson DO, Chimenti DE, eds. *Review of Progress in Quantitative Nondestructive Evaluation.* Review of Progress in Quantitative Nondestructive Evaluation. Springer US; 1987:1307-1314. doi:10.1007/978-1-4613-1893-4_148

57. Noda M, Fukui K, Uchiyama S. Mass Spectrometry. In: Senda T, Maenaka K, eds. *Advanced Methods in Structural Biology*. Springer Protocols Handbooks. Springer Japan; 2016:185-198. doi:10.1007/978-4-431-56030-2_11
58. Boireau W, Elie-Caille C. Les vésicules extracellulaires - Définition, séparation, caractérisation. *Med Sci (Paris)*. 2021;37(12):1092-1100. doi:10.1051/medsci/2021201
59. Yuana Y, Levels J, Grootemaat A, Sturk A, Nieuwland R. Co-isolation of extracellular vesicles and high-density lipoproteins using density gradient ultracentrifugation. *Journal of Extracellular Vesicles*. 2014;3(1):23262. doi:10.3402/jev.v3.23262
60. Onódi Z, Pelyhe C, Terézia Nagy C, et al. Isolation of High-Purity Extracellular Vesicles by the Combination of Iodixanol Density Gradient Ultracentrifugation and Bind-Elute Chromatography From Blood Plasma. *Frontiers in Physiology*. 2018;9:1479. doi:10.3389/fphys.2018.01479
61. Lane RE, Korbie D, Anderson W, Vaidyanathan R, Trau M. Analysis of exosome purification methods using a model liposome system and tunable-resistive pulse sensing. *Sci Rep*. 2015;5(1):7639. doi:10.1038/srep07639
62. Konoshenko MY, Lekchnov EA, Vlassov AV, Laktionov PP. Isolation of Extracellular Vesicles: General Methodologies and Latest Trends. BioMed Research International. doi:https://doi.org/10.1155/2018/8545347
63. Yang D, Zhang W, Zhang H, et al. Progress, opportunity, and perspective on exosome isolation - efforts for efficient exosome-based theranostics. *Theranostics*. 2020;10(8):3684-3707. doi:10.7150/thno.41580
64. Takov K, Yellon DM, Davidson SM. Comparison of small extracellular vesicles isolated from plasma by ultracentrifugation or size-exclusion chromatography: yield, purity and functional potential. *J Extracell Vesicles*. 2018;8(1). doi:10.1080/20013078.2018.1560809
65. Majeed SA, Sekhosana KE, Tuhl A. Progress on phthalocyanine-conjugated Ag and Au nanoparticles: Synthesis, characterization, and photo-physicochemical properties. *Arabian Journal of Chemistry*. 2020;13(12):8848-8887. doi:10.1016/j.arabjc.2020.10.014
66. Zhu J, Zhang J, Ji X, Tan Z, Lubman DM. Column-based Technology for CD9-HPLC Immunoaffinity Isolation of Serum Extracellular Vesicles. *J Proteome Res*. 2021;20(10):4901-4911. doi:10.1021/acs.jproteome.1c00549
67. Brennan K, Martin K, FitzGerald SP, et al. A comparison of methods for the isolation and separation of extracellular vesicles from protein and lipid particles in human serum. *Sci Rep*. 2020;10(1):1039. doi:10.1038/s41598-020-57497-7
68. Carnino JM, Lee H, Jin Y. Isolation and characterization of extracellular vesicles from Broncho-alveolar lavage fluid: a review and comparison of different methods. *Respiratory Research*. 2019;20(1):240. doi:10.1186/s12931-019-1210-z
69. Sunkara V, Woo HK, Cho YK. Emerging techniques in the isolation and characterization of extracellular vesicles and their roles in cancer diagnostics and prognostics. *Analyst*. 2016;141(2):371-381. doi:10.1039/c5an01775k

70. Rana A, Zhang Y, Esfandiari L. Advancements in microfluidic technologies for isolation and early detection of circulating cancer-related biomarkers. *Analyst*. 2018;143(13):2971-2991. doi:10.1039/c7an01965c
71. Su W, Li H, Chen W, Qin J. Microfluidic strategies for label-free exosomes isolation and analysis. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*. 2019;118:686-698. doi:10.1016/j.trac.2019.06.037
72. Contreras-Naranjo JC, Wu HJ, Ugaz VM. Microfluidics for exosome isolation and analysis: enabling liquid biopsy for personalized medicine. *Lab Chip*. 2017;17(21):3558-3577. doi:10.1039/c7lc00592j
73. Gholizadeh S, Shehata Draz M, Zarghooni M, et al. Microfluidic approaches for isolation, detection, and characterization of extracellular vesicles: Current status and future directions. *Biosensors and Bioelectronics*. 2017;91:588-605. doi:10.1016/j.bios.2016.12.062
74. Liu F, Vermesh O, Mani V, et al. The Exosome Total Isolation Chip. *ACS Nano*. 2017;11(11):10712-10723. doi:10.1021/acsnano.7b04878
75. Liang LG, Kong MQ, Zhou S, et al. An integrated double-filtration microfluidic device for isolation, enrichment and quantification of urinary extracellular vesicles for detection of bladder cancer. *Sci Rep*. 2017;7:46224. doi:10.1038/srep46224
76. Marczak S, Richards K, Ramshani Z, et al. Simultaneous isolation and preconcentration of exosomes by ion concentration polarization. *Electrophoresis*. Published online February 27, 2018. doi:10.1002/elps.201700491
77. Ibsen SD, Wright J, Lewis JM, et al. Rapid Isolation and Detection of Exosomes and Associated Biomarkers from Plasma. *ACS Nano*. 2017;11(7):6641-6651. doi:10.1021/acsnano.7b00549
78. Wang Z, Wu H jen, Fine D, et al. Ciliated micropillars for the microfluidic-based isolation of nanoscale lipid vesicles. *Lab Chip*. 2013;13(15):2879-2882. doi:10.1039/c3lc41343h
79. Liu C, Guo J, Tian F, et al. Field-Free Isolation of Exosomes from Extracellular Vesicles by Microfluidic Viscoelastic Flows. *ACS Nano*. 2017;11(7):6968-6976. doi:10.1021/acsnano.7b02277
80. Huang LR, Cox EC, Austin RH, Sturm JC. Continuous particle separation through deterministic lateral displacement. *Science*. 2004;304(5673):987-990. doi:10.1126/science.1094567
81. Smith JT, Wunsch BH, Dogra N, et al. Integrated nanoscale deterministic lateral displacement arrays for separation of extracellular vesicles from clinically-relevant volumes of biological samples. *Lab Chip*. 2018;18(24):3913-3925. doi:10.1039/C8LC01017J
82. Gaillard M, Thuairé A, Nonglaton G, Agache V, Roupioz Y, Raillon C. Biosensing extracellular vesicles: contribution of biomolecules in affinity-based methods for detection and isolation. *Analyst*. 2020;145(6):1997-2013. doi:10.1039/C9AN01949A
83. Santana SM, Antonyak MA, Cerione RA, Kirby BJ. Microfluidic isolation of cancer-cell-derived microvesicles from heterogeneous extracellular shed vesicle populations. *Biomed Microdevices*. 2014;16(6):869-877. doi:10.1007/s10544-014-9891-z

84. Wunsch BH, Smith JT, Gifford SM, et al. Nanoscale lateral displacement arrays for the separation of exosomes and colloids down to 20 nm. *Nat Nanotechnol.* 2016;11(11):936-940. doi:10.1038/nnano.2016.134
85. Yamada M, Seki M. Hydrodynamic filtration for on-chip particle concentration and classification utilizing microfluidics. *Lab Chip.* 2005;5(11):1233-1239. doi:10.1039/b509386d
86. Mizuno M, Yamada M, Mitamura R, Ike K, Toyama K, Seki M. Magnetophoresis-Integrated Hydrodynamic Filtration System for Size- and Surface Marker-Based Two-Dimensional Cell Sorting. *Anal Chem.* 2013;85(16):7666-7673. doi:10.1021/ac303336f
87. Ku A, Lim HC, Evander M, et al. Acoustic Enrichment of Extracellular Vesicles from Biological Fluids. *Anal Chem.* 2018;90(13):8011-8019. doi:10.1021/acs.analchem.8b00914
88. Lee K, Shao H, Weissleder R, Lee H. Acoustic Purification of Extracellular Microvesicles. *ACS Nano.* 2015;9(3):2321-2327. doi:10.1021/nn506538f
89. Wu M, Chen C, Wang Z, et al. Separating extracellular vesicles and lipoproteins via acoustofluidics. *Lab Chip.* 2019;19(7):1174-1182. doi:10.1039/c8lc01134f
90. Wang Z, Li F, Rufo J, et al. Acoustofluidic Salivary Exosome Isolation: A Liquid Biopsy Compatible Approach for Human Papillomavirus-Associated Oropharyngeal Cancer Detection. *J Mol Diagn.* 2020;22(1):50-59. doi:10.1016/j.jmoldx.2019.08.004
91. Taller D, Richards K, Slouka Z, et al. On-chip surface acoustic wave lysis and ion-exchange nanomembrane detection of exosomal RNA for pancreatic cancer study and diagnosis. *Lab Chip.* 2015;15(7):1656-1666. doi:10.1039/c5lc00036j
92. Tunable Separation of Nanoparticles in a Continuous Flow Using Standing Surface Acoustic Wave. Accessed February 4, 2022. https://www.sensorsportal.com/HTML/DIGEST/P_3137.htm
93. theses.fr – Lyne Pillemont, UNE APPROCHE MICROFLUIDIQUE GÉNÉRIQUE POUR LA QUALIFICATION DES NANOPARTICULES BIOLOGIQUES. Accessed January 6, 2022. <http://www.theses.fr/s294280>
94. Fouet M. *Microfluidique 3D et Actionneurs Magnétiques. De Leur Intégration à La Préparation d'échantillons Biologiques.* phd. Université de Toulouse, Université Toulouse III - Paul Sabatier; 2016. Accessed November 3, 2021. <http://thesesups.ups-tlse.fr/3102/>
95. Jeong S, Park J, Pathania D, Castro CM, Weissleder R, Lee H. Integrated Magneto-Electrochemical Sensor for Exosome Analysis. *ACS Nano.* 2016;10(2):1802-1809. doi:10.1021/acsnano.5b07584
96. Karabacak NM, Spuhler PS, Fachin F, et al. Microfluidic, marker-free isolation of circulating tumor cells from blood samples. *Nat Protoc.* 2014;9(3):694-710. doi:10.1038/nprot.2014.044
97. Cuadros-Rodríguez L, Gámiz-Gracia L, Almansa-López EM, Bosque-Sendra JM. Calibration in chemical measurement processes. II. A methodological approach. *TrAC Trends in Analytical Chemistry.* 2001;20(11):620-636. doi:10.1016/S0165-9936(01)00111-X
98. NANOMEDICINE: A MAGICAL HOPE FOR THE MEDICAL WORLD | INTERNATIONAL JOURNAL OF PHARMACEUTICAL SCIENCES AND RESEARCH. Published November 1, 2010. Accessed October

- 26, 2021. <https://ijpsr.com/bft-article/nanomedicine-a-magical-hope-for-the-medical-world-2/>
99. Geeurickx E, Lippens L, Rappu P, De Geest BG, De Wever O, Hendrix A. Recombinant extracellular vesicles as biological reference material for method development, data normalization and assessment of (pre-)analytical variables. *Nat Protoc.* 2021;16(2):603-633. doi:10.1038/s41596-020-00446-5
 100. Standardisation of concentration measurements of extracellular vesicles for medical diagnoses - METVES II. Accessed July 22, 2021. <https://www.metves.eu/>
 101. Daniel MC, Astruc D. Gold Nanoparticles: Assembly, Supramolecular Chemistry, Quantum-Size-Related Properties, and Applications toward Biology, Catalysis, and Nanotechnology. *Chem Rev.* 2004;104(1):293-346. doi:10.1021/cr030698+
 102. Microparticule. Accessed July 22, 2021. <http://www.physique-et-matiere.com/microparticule.php>
 103. Saha K, Agasti SS, Kim C, Li X, Rotello VM. Gold Nanoparticles in Chemical and Biological Sensing. *Chem Rev.* 2012;112(5):2739-2779. doi:10.1021/cr2001178
 104. Lu AH, Salabas EL, Schüth F. Magnetic Nanoparticles: Synthesis, Protection, Functionalization, and Application. *Angewandte Chemie International Edition.* 2007;46(8):1222-1244. doi:<https://doi.org/10.1002/anie.200602866>
 105. Bharathala S, Sharma P. Chapter 8 - Biomedical Applications of Nanoparticles. In: Maurya PK, Singh S, eds. *Nanotechnology in Modern Animal Biotechnology.* Elsevier; 2019:113-132. doi:10.1016/B978-0-12-818823-1.00008-9
 106. Eustis S, el-Sayed MA. Why gold nanoparticles are more precious than pretty gold: noble metal surface plasmon resonance and its enhancement of the radiative and nonradiative properties of nanocrystals of different shapes. *Chem Soc Rev.* 2006;35(3):209-217. doi:10.1039/b514191e
 107. Davis ME, Chen Z (Georgia), Shin DM. Nanoparticle therapeutics: an emerging treatment modality for cancer. *Nature Reviews Drug Discovery.* 2008;7(9):771-782. doi:10.1038/nrd2614
 108. Petros RA, DeSimone JM. Strategies in the design of nanoparticles for therapeutic applications. *Nature Reviews Drug Discovery.* 2010;9(8):615-627. doi:10.1038/nrd2591
 109. Lundqvist M, Stigler J, Elia G, Lynch I, Cedervall T, Dawson KA. Nanoparticle size and surface properties determine the protein corona with possible implications for biological impacts. *PNAS.* 2008;105(38):14265-14270. doi:10.1073/pnas.0805135105
 110. Arasi MB, Pedini F, Valentini S, Felli N, Felicetti F. Advances in Natural or Synthetic Nanoparticles for Metastatic Melanoma Therapy and Diagnosis. *Cancers.* 2020;12(10):2893. doi:10.3390/cancers12102893
 111. Barua S, Mitragotri S. Challenges associated with penetration of nanoparticles across cell and tissue barriers: A review of current status and future prospects. *Nano Today.* 2014;9(2):223-243. doi:10.1016/j.nantod.2014.04.008

112. Gawande MB, Goswami A, Asefa T, et al. Core–shell nanoparticles: synthesis and applications in catalysis and electrocatalysis. *Chem Soc Rev.* 2015;44(21):7540-7590. doi:10.1039/C5CS00343A
113. Gupta R, Rai B. Effect of Size and Surface Charge of Gold Nanoparticles on their Skin Permeability: A Molecular Dynamics Study. *Sci Rep.* 2017;7(1):45292. doi:10.1038/srep45292
114. Sanvicens N, Marco MP. Multifunctional nanoparticles – properties and prospects for their use in human medicine. *Trends in Biotechnology.* 2008;26(8):425-433. doi:10.1016/j.tibtech.2008.04.005
115. Valkonen S, van der Pol E, Böing A, et al. Biological reference materials for extracellular vesicle studies. *European Journal of Pharmaceutical Sciences.* 2016;98. doi:10.1016/j.ejps.2016.09.008
116. Phan HT, Haes AJ. What Does Nanoparticle Stability Mean? *J Phys Chem C.* 2019;123(27):16495-16507. doi:10.1021/acs.jpcc.9b00913
117. Jiang J, Oberdörster G, Biswas P. Characterization of size, surface charge, and agglomeration state of nanoparticle dispersions for toxicological studies. *J Nanopart Res.* 2009;11(1):77-89. doi:10.1007/s11051-008-9446-4
118. Wu L, Luderer M, Yang X, et al. Surface Passivation of Carbon Nanoparticles with Branched Macromolecules Influences Near Infrared Bioimaging. *Theranostics.* 2013;3(9):677-686. doi:10.7150/thno.6535
119. Peer D, Karp JM, Hong S, Farokhzad OC, Margalit R, Langer R. Nanocarriers as an emerging platform for cancer therapy. *Nature Nanotechnology.* 2007;2(12):751-760. doi:10.1038/nnano.2007.387
120. Brigger I, Dubernet C, Couvreur P. Nanoparticles in cancer therapy and diagnosis. *Adv Drug Deliv Rev.* 2002;54(5):631-651. doi:10.1016/s0169-409x(02)00044-3
121. Danhier F, Ansorena E, Silva JM, Coco R, Le Breton A, Préat V. PLGA-based nanoparticles: an overview of biomedical applications. *J Control Release.* 2012;161(2):505-522. doi:10.1016/j.jconrel.2012.01.043
122. ABRAXANE 5 mg/ml pdre p dispersion inj p perf. VIDAL. Accessed September 6, 2021. <https://www.vidal.fr/medicaments/abraxane-5-mg-ml-pdre-p-dispersion-inj-p-perf-84573.html>
123. Medintz IL, Uyeda HT, Goldman ER, Mattoussi H. Quantum dot bioconjugates for imaging, labelling and sensing. *Nature Materials.* 2005;4(6):435-446. doi:10.1038/nmat1390
124. Mi Y, Li K, Liu Y, Pu KY, Liu B, Feng SS. Herceptin functionalized polyhedral oligomeric silsesquioxane – conjugated oligomers – silica/iron oxide nanoparticles for tumor cell sorting and detection. *Biomaterials.* 2011;32(32):8226-8233. doi:10.1016/j.biomaterials.2011.07.040
125. Tang D, Cui Y, Chen G. Nanoparticle-based immunoassays in the biomedical field. *Analyst.* 2013;138(4):981-990. doi:10.1039/C2AN36500F
126. Wang J, Munir A, Zhu Z, Zhou HS. Magnetic Nanoparticle Enhanced Surface Plasmon Resonance Sensing and Its Application for the Ultrasensitive Detection of Magnetic

- Nanoparticle-Enriched Small Molecules. *Anal Chem.* 2010;82(16):6782-6789.
doi:10.1021/ac100812c
127. Thakur A, Qiu G, Ng SP, et al. Direct detection of two different tumor-derived extracellular vesicles by SAM-AuNIs LSPR biosensor. *Biosens Bioelectron.* 2017;94:400-407.
doi:10.1016/j.bios.2017.03.036
 128. Rojalin T, Koster HJ, Liu J, et al. Hybrid Nanoplasmonic Porous Biomaterial Scaffold for Liquid Biopsy Diagnostics Using Extracellular Vesicles. *ACS sensors.* 2020;5(9):2820-2833.
doi:10.1021/acssensors.0c00953
 129. Malic L, Sandros MG, Tabrizian M. Designed Biointerface Using Near-Infrared Quantum Dots for Ultrasensitive Surface Plasmon Resonance Imaging Biosensors. *Anal Chem.* 2011;83(13):5222-5229. doi:10.1021/ac200465m
 130. Huang X, El-Sayed IH, Qian W, El-Sayed MA. Cancer Cell Imaging and Photothermal Therapy in the Near-Infrared Region by Using Gold Nanorods. *J Am Chem Soc.* 2006;128(6):2115-2120.
doi:10.1021/ja057254a
 131. Frontiers | Use of Nanoparticles in Tissue Engineering and Regenerative Medicine | Bioengineering and Biotechnology. Accessed October 29, 2021.
<https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fbioe.2019.00113/full>
 132. Magnetofection of Green Fluorescent Protein Encoding DNA-Bearing Polyethyleneimine-Coated Superparamagnetic Iron Oxide Nanoparticles to Human Breast Cancer Cells | ACS Omega. Accessed October 29, 2021. <https://pubs.acs.org/doi/10.1021/acsomega.9b01000>
 133. Pol E van der, Sturk A, Leeuwen T van, Nieuwland R, Coumans F. Standardization of extracellular vesicle measurements by flow cytometry through vesicle diameter approximation. *Journal of Thrombosis and Haemostasis.* 2018;16(6):1236-1245.
doi:10.1111/jth.14009
 134. Koukoulas T, Piper B, Rajagopal S, Robinson S, Zeqiri B. *Calibration of Acoustical Devices through Particle Motion Measurements in Air and Water Using Laser Based Methods.*; 2015.
 135. Gäggeler HW, Baltensperger U, Emmenegger M, et al. The epiphaniometer, a new device for continuous aerosol monitoring. *Journal of Aerosol Science.* 1989;20(5):557-564.
doi:10.1016/0021-8502(89)90101-8
 136. Buchegger P, Sauer U, Toth-Székély H, Preininger C. Miniaturized Protein Microarray with Internal Calibration as Point-of-Care Device for Diagnosis of Neonatal Sepsis. *Sensors.* 2012;12(2):1494-1508. doi:10.3390/s120201494
 137. qNano Gold TRPS measurement | Izon Science. Accessed September 3, 2021.
<https://www.izon.com/trps/qnano-gold>
 138. 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.* These de doctorat. Besançon; 2013. Accessed July 27, 2021.
<http://www.theses.fr/2013BESA2043>
 139. Obeid S. *Analyses Quantitative et Qualitative Sur Puce de Vésicules Extracellulaires En Milieux Complexes Au Sein d'une Plateforme Nanobioanalytique.* 2017.

140. Wood RW. On a Remarkable Case of Uneven Distribution of Light in a Diffraction Grating Spectrum. *Proc Phys Soc London*. 1902;18(1):269-275. doi:10.1088/1478-7814/18/1/325
141. Fano U. The Theory of Anomalous Diffraction Gratings and of Quasi-Stationary Waves on Metallic Surfaces (Sommerfeld's Waves). *J Opt Soc Am, JOSA*. 1941;31(3):213-222. doi:10.1364/JOSA.31.000213
142. Liedberg B, Nylander C, Lunström I. Surface plasmon resonance for gas detection and biosensing. *Sensors and Actuators*. 1983;4:299-304. doi:10.1016/0250-6874(83)85036-7
143. Mariani S, Minunni M. Surface plasmon resonance applications in clinical analysis. *Anal Bioanal Chem*. 2014;406(9-10):2303-2323. doi:10.1007/s00216-014-7647-5
144. Binnig G, Quate CF, Gerber Ch. Atomic Force Microscope. *Phys Rev Lett*. 1986;56(9):930-933. doi:10.1103/PhysRevLett.56.930
145. PNP-TR-Au - NanoWorld®. Accessed November 3, 2021. <https://www.nanoworld.com/pyrex-nitride-triangular-silicon-nitride-cantilever-afm-tip-pnp-tr-au>
146. microParticles GmbH | Monodisperse Nano- und Mikropartikel. Accessed July 22, 2021. <https://microparticles.de/en>
147. Carbodiimide Crosslinker Chemistry - FR. Accessed July 22, 2021. [//www.thermofisher.com/fr/fr/home/life-science/protein-biology/protein-biology-learning-center/protein-biology-resource-library/pierce-protein-methods/carbodiimide-crosslinker-chemistry.html](http://www.thermofisher.com/fr/fr/home/life-science/protein-biology/protein-biology-learning-center/protein-biology-resource-library/pierce-protein-methods/carbodiimide-crosslinker-chemistry.html)
148. Hermanson GT. *Bioconjugate Techniques*. Academic Press; 2010.
149. L'ovalbumine, La Principale Protéine Du Blanc D'oeuf. Structure Moléculaire Banque D'Images Et Photos Libres De Droits. Image 13411903. Accessed July 22, 2021. https://fr.123rf.com/photo_13411903_l-ovalbumine-la-principale-prot%C3%A9ine-du-blanc-d-oeuf-structure-mol%C3%A9culaire.html
150. Ovalbumin - an overview | ScienceDirect Topics. Accessed November 3, 2021. <https://www.sciencedirect.com/topics/neuroscience/ovalbumin>
151. Milk Casein Proteins: Ancient, Diverse, and Essential. International Milk Genomics Consortium. Accessed July 27, 2021. <https://milkgenomics.org/article/milk-casein-proteins-ancient-diverse-essential/>
152. Materials | Free Full-Text | Adsorption of Milk Proteins (β -Casein and β -Lactoglobulin) and BSA onto Hydrophobic Surfaces | HTML. Accessed October 29, 2021. <https://www.mdpi.com/1996-1944/10/8/893/htm>
153. Beta-Casein - an overview | ScienceDirect Topics. Accessed November 3, 2021. <https://www.sciencedirect.com/topics/food-science/beta-casein>
154. Bartczak D, Kanaras AG. Preparation of Peptide-Functionalized Gold Nanoparticles Using One Pot EDC/Sulfo-NHS Coupling. *Langmuir*. 2011;27(16):10119-10123. doi:10.1021/la2022177
155. Obeid S. Analyse quantitative et qualitative sur puce de vésicules extracellulaires en milieux complexes au sein d'une plateforme nanobioanalytique. :199.

156. theses.fr – Balasubramaniam Namasivayam, Détermination des performances de la plateforme NanoBioAnalytique pour la détection et la caractérisation de vésicules extracellulaires : exploration de lysats plaquettaires humain à visée neuroprotectrice. Accessed February 7, 2022. <http://www.theses.fr/s213987>
157. Development of a NanoBioAnalytical platform for “on-chip” qualification and quantification of platelet-derived microparticles - ScienceDirect. Accessed February 8, 2022. <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0956566316308569?via%3Dihub>
158. Glutaraldéhyde (FT 171). Caractéristiques - Fiche toxicologique - INRS. Accessed November 1, 2021. https://www.inrs.fr/publications/bdd/fichetox/fiche.html?refINRS=FICHETOX_171
159. Introduction à la microfluidique - Patrick Tabeling - Google Livres. Accessed May 5, 2022. https://books.google.fr/books?hl=fr&lr=&id=fRSWDgAAQBAJ&oi=fnd&pg=PA9&dq=principles+of+microfluidique+tabeling&ots=6e_IcKnmtj&sig=jTjI-Dx7KZaVHZmrDig93r-Z2-I&redir_esc=y#v=onepage&q=principles%20of%20microfluidique%20tabeling&f=false
160. Kunicki TJ. Platelet membrane glycoproteins and their function: an overview. *Blut*. 1989;59(1):30-34. doi:10.1007/BF00320245
161. Nedelkov D, Nelson RW. Practical considerations in BIA/MS: optimizing the biosensor–mass spectrometry interface. *Journal of Molecular Recognition*. 2000;13(3):140-145. doi:10.1002/1099-1352(200005/06)13:3<140::AID-JMR496>3.0.CO;2-P
162. Kortt AA, Clem Gruen L, Oddie GW. Influence of mass transfer and surface ligand heterogeneity on quantitative BIAcore™ binding data. Analysis of the interaction of NC10 Fab with an anti-idiotypic Fab'. *Journal of Molecular Recognition*. 1997;10(3):148-158. doi:10.1002/(SICI)1099-1352(199705/06)10:3<148::AID-JMR360>3.0.CO;2-F
163. admin. Le don de plasma, pensez-y ! Etablissement français du sang. Published October 2021. Accessed August 1, 2022. <https://dondesang.efs.sante.fr/articles/Le-don-de-plasma>
164. Bairamukov V, Bukatin A, Landa S, et al. Biomechanical Properties of Blood Plasma Extracellular Vesicles Revealed by Atomic Force Microscopy. *Biology (Basel)*. 2020;10(1):4. doi:10.3390/biology10010004
165. Obeid S, Sung PS, Le Roy B, et al. NanoBioAnalytical characterization of extracellular vesicles in 75-nm nanofiltered human plasma for transfusion: A tool to improve transfusion safety. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine*. 2019;20:101977. doi:10.1016/j.nano.2019.02.026
166. Migneault I, Dartiguenave C, Bertrand M, Waldron K. Glutaraldehyde: Behavior in aqueous solution, reaction with proteins, and application to enzyme crosslinking. *BioTechniques*. 2004;37:790-796, 798. doi:10.2144/3705A0790