



Amélioration de la détection des vésicules extracellulaires issues des polynucléaires neutrophiles par cytométrie en flux

Amandine Bonifay

► To cite this version:

Amandine Bonifay. Amélioration de la détection des vésicules extracellulaires issues des polynucléaires neutrophiles par cytométrie en flux. Sciences pharmaceutiques. 2021. dumas-03524489

HAL Id: dumas-03524489

<https://dumas.ccsd.cnrs.fr/dumas-03524489>

Submitted on 13 Jan 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.



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

MÉMOIRE
DU DIPLÔME D'ÉTUDES SPECIALISÉES
DE BIOLOGIE MÉDICALE

Soutenu le 10 Septembre 2021

Par M^{lle} BONIFAY Amandine
Née le 05 Janvier 1993

Conformément aux dispositions du décret n°2003-76
du 23 janvier 2003, tenant lieu de

THÈSE
POUR LE DIPLÔME D'ÉTAT DE DOCTEUR EN PHARMACIE

----oOo----

TITRE :

Amélioration de la détection des vésicules extracellulaires issues des
polynucléaires neutrophiles par cytométrie en flux

----oOo----

JURY :

Président : Pr Françoise DIGNAT-GEORGE

Directeur de thèse : Pr Romaric LACROIX

Membres : Pr Jean-Robert HARLÉ, Dr Shirley FRITZ, Stéphane ROBERT

ADMINISTRATION :

<i>Doyen :</i>	Mme Françoise DIGNAT-GEORGE
<i>Vice-Doyens :</i>	M. Jean-Paul BORG, M. François DEVRED, M. Pascal RATHELOT
<i>Chargés de Mission :</i>	Mme Pascale BARBIER, M. David BERGE-LEFRANC, Mme Manon CARRE, Mme Caroline DUCROS, Mme Frédérique GRIMALDI, M. Guillaume HACHE
<i>Conseiller du Doyen :</i>	M. Patrice VANELLE
<i>Doyens honoraires :</i>	M. Patrice VANELLE, M. Pierre TIMON-DAVID,
<i>Professeurs émérites :</i>	M. José SAMPOL, M. Athanassios ILIADIS, M. Henri PORTUGAL, M. Philippe CHARPIOT
<i>Professeurs honoraires :</i>	M. Guy BALANSARD, M. Yves BARRA, Mme Claudette BRIAND, M. Jacques CATALIN, Mme Andrée CREMIEUX, M. Aimé CREVAT, M. Gérard DUMENIL, M. Alain DURAND, Mme Danielle GARÇON, M. Maurice JALFRE, M. Joseph JOACHIM, M. Maurice LANZA, M. José MALDONADO, M. Patrick REGLI, M. Jean-Claude SARI
<i>Chef des Services Administratifs :</i>	Mme Florence GAUREL
<i>Chef de Cabinet :</i>	Mme Aurélie BELENGUER
<i>Responsable de la Scolarité :</i>	Mme Nathalie BESNARD

DEPARTEMENT BIO-INGENIERIE PHARMACEUTIQUE

Responsable : Professeur Philippe PICCERELLE

PROFESSEURS

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

MAITRES DE CONFERENCES

BIOPHYSIQUE

M. Robert GILLI
Mme Odile RIMET-GASPARINI
Mme Pascale BARBIER
M. François DEVRED
Mme Manon CARRE
M. Gilles BREUZARD
Mme Alessandra PAGANO

GENIE GENETIQUE ET BIOTECHNOLOGIE

M. Eric SEREE-PACHA
Mme Véronique REY-BOURGAREL

PHARMACIE GALENIQUE, PHARMACOTECHNIE
INDUSTRIELLE,
BIOPHARMACIE ET COSMETOLOGIE

M. Pascal PRINDERRE
M. Emmanuel CAUTURE
Mme Véronique ANDRIEU
Mme Marie-Pierre SAVELLI

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

M. Jérémie MAGALON
Mme Carole SIANI

ENSEIGNANTS CONTRACTUELS

ANGLAIS

Mme Angélique GOODWIN

DEPARTEMENT BIOLOGIE PHARMACEUTIQUE

Responsable : Professeur Françoise DIGNAT-GEORGE

PROFESSEURS

BIOLOGIE CELLULAIRE

M. Jean-Paul BORG

HEMATOLOGIE ET IMMUNOLOGIE

Mme Françoise DIGNAT-GEORGE
Mme Laurence CAMOIN-JAU
Mme Florence SABATIER-MALATERRE
Mme Nathalie BARDIN

MICROBIOLOGIE

M. Jean-Marc ROLAIN
M. Philippe COLSON

PARASITOLOGIE ET MYCOLOGIE MEDICALE,
HYGIENE ET ZOOLOGIE

Mme Nadine AZAS-KREDER

MAITRES DE CONFERENCES

BIOCHIMIE FONDAMENTALE, MOLECULAIRE ET CLINIQUE

M. Thierry AUGIER
M. Edouard LAMY
Mme Alexandrine BERTAUD
Mme Claire CERINI
Mme Edwige TELLIER
M. Stéphane POITEVIN

HEMATOLOGIE ET IMMUNOLOGIE

Mme Aurélie LEROYER
M. Romaric LACROIX
Mme Sylvie COINTE

MICROBIOLOGIE

Mme Michèle LAGET
Mme Anne DAVIN-REGLI
Mme Véronique ROUX
M. Fadi BITTAR
Mme Isabelle PAGNIER
Mme Sophie EDOUARD
M. Seydina Mouhamadou DIENE

PARASITOLOGIE ET MYCOLOGIE MEDICALE, HYGIENE ET ZOOLOGIE

Mme Carole DI GIORGIO
M. Aurélien DUMETRE
Mme Magali CASANOVA
Mme Anita COHEN

BIOLOGIE CELLULAIRE

Mme Anne-Catherine LOUHMEAU

ATER

BIOCHIMIE FONDAMENTALE, MOLECULAIRE ET CLINIQUE

Mme Anne-Claire DUCHEZ

BIOLOGIE CELLULAIRE ET MOLECULAIRE

Mme Alexandra WALTON

A.H.U.

HEMATOLOGIE ET IMMUNOLOGIE

Mme Mélanie VELIER

DEPARTEMENT CHIMIE PHARMACEUTIQUE

Responsable : Professeur Patrice VANELLE

PROFESSEURS

CHIMIE ANALYTIQUE, QUALITOLOGIE ET NUTRITION

Mme Catherine BADENS

CHIMIE PHYSIQUE – PREVENTION DES RISQUES ET NUISANCES TECHNOLOGIQUES

M. David BERGE-LEFRANC

CHIMIE MINERALE ET STRUCTURALE – CHIMIE THERAPEUTIQUE

M. Pascal RATHELOT
M. Maxime CROZET

CHIMIE ORGANIQUE PHARMACEUTIQUE

M. Patrice VANELLE
M. Thierry TERME

PHARMACOGNOSIE, ETHNOPHARMACOGNOSIE

Mme Evelyne OLLIVIER

MAITRES DE CONFERENCES

BOTANIQUE ET CRYPTOLOGIE, BIOLOGIE CELLULAIRE

Mme Anne FAVEL
Mme Joëlle MOULIN-TRAFFORT

CHIMIE ANALYTIQUE, QUALITOLOGIE ET NUTRITION

Mme Catherine DEFOORT
M. Alain NICOLAY
Mme Estelle WOLFF
Mme Elise LOMBARD
Mme Camille DESGROUAS
M. Charles DESMARCHELIER

CHIMIE PHYSIQUE – PREVENTION DES RISQUES ET
NUISANCES TECHNOLOGIQUES

M. Pierre REBOUILLON

CHIMIE THERAPEUTIQUE

Mme Sandrine ALIBERT
Mme Caroline DUCROS
M. Marc MONTANA
Mme Manon ROCHE
Mme Fanny MATHIAS

CHIMIE ORGANIQUE PHARMACEUTIQUE
HYDROLOGIE

M. Armand GELLIS
M. Christophe CURTI
Mme Julie BROGGI
M. Nicolas PRIMAS
M. Cédric SPITZ
M. Sébastien REDON

PHARMACOGNOSIE, ETHNOPHARMACOLOGIE

M. Riad ELIAS
Mme Valérie MAHIOU-LEDDER
Mme Sok Siya BUN
Mme Béatrice BAGHDIKIAN

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

CHIMIE ANALYTIQUE, QUALITOLOGIE ET NUTRITION

Mme Anne-Marie PENET-LOREC

CHIMIE PHYSIQUE – PREVENTION DES RISQUES ET
NUISANCES TECHNOLOGIQUES

M. Cyril PUJOL

DROIT ET ECONOMIE DE LA PHARMACIE

M. Marc LAMBERT

GESTION PHARMACEUTIQUE, PHARMACOECONOMIE
ET ETHIQUE PHARMACEUTIQUE OFFICINALE, DROIT ET
COMMUNICATION PHARMACEUTIQUES A L'OFFICINE ET
GESTION DE LA PHARMAFAC

Mme Félicia FERRERA

A.H.U.

CHIMIE ANALYTIQUE, QUALITOLOGIE ET
NUTRITION

M. Mathieu CERINO

ATER

CHIMIE PHYSIQUE – PREVENTION DES RISQUES ET
NUISANCES TECHNOLOGIQUES

M. Duje BURIC

DEPARTEMENT MEDICAMENT ET SECURITE SANITAIRE

Responsable : Professeur Benjamin GUILLET

PROFESSEURS

PHARMACIE CLINIQUE	M. Stéphane HONORÉ
PHARMACODYNAMIE	M. Benjamin GUILLET
TOXICOLOGIE ET PHARMACOCINETIQUE	M. Bruno LACARELLE Mme Frédérique GRIMALDI M. Joseph CICCOLINI

MAITRES DE CONFERENCES

PHARMACODYNAMIE	M. Guillaume HACHE Mme Ahlem BOUHLEL M. Philippe GARRIGUE
PHYSIOLOGIE	Mme Sylviane LORTET Mme Emmanuelle MANOS-SAMPOL
TOXICOLOGIE ET PHARMACOCINETIQUE	Mme Raphaëlle FANCIULLINO Mme Florence GATTACECCA
TOXICOLOGIE GENERALE ET PHARMACIE CLINIQUE	M. Pierre-Henri VILLARD Mme Caroline SOLAS-CHESNEAU Mme Marie-Anne ESTEVE

A.H.U.

PHYSIOLOGIE / PHARMACOLOGIE PHARMACIE CLINIQUE	Mme Anaïs MOYON M. Florian CORREARD
---	--

ATER.

TOXICOLOGIE ET PHARMACOCINETIQUE	Mme Anne RODALLEC
----------------------------------	-------------------

CHARGES D'ENSEIGNEMENT A LA FACULTE

Mme Valérie AMIRAT-COMBRALIER, Pharmacien-Praticien hospitalier

M. Pierre BERTAULT-PERES, Pharmacien-Praticien

hospitalier Mme Marie-Hélène BERTOCCHIO,

Pharmacien-Praticien hospitalier Mme Martine BUES-

CHARBIT, Pharmacien-Praticien hospitalier M. Nicolas

COSTE, Pharmacien-Praticien hospitalier

Mme Sophie GENSOLLEN, Pharmacien-Praticien

hospitalier M. Sylvain GONNET, Pharmacien

titulaire

Mme Florence LEANDRO, Pharmacien adjoint M.

Stéphane PICHON, Pharmacien titulaire

M. Patrick REGGIO, Pharmacien conseil, DRSM de l'Assurance Maladie

Mme Clémence TABELLE, Pharmacien-

Praticien attaché Mme TONNEAU-PFUG,

Pharmacien adjoint

M. Badr Eddine TEHHANI, Pharmacien – Praticien

hospitalier M. Joël VELLOZZI, Expert-Comptable

Mise à jour le 23 janvier 2020

Remerciements

Je remercie le Pr Françoise DIGNAT-GEORGE d'avoir accepté d'être le président de ce jury de mémoire de D.E.S. de Biologie Médicale, mais aussi de m'avoir accueillie dans son laboratoire de recherches pour effectuer ce travail. C'est grâce à la mise en place de nouvelles unités d'enseignement à la Faculté de Pharmacie, désirées par le Pr DIGNAT-GEORGE en tant que Doyen de la Faculté de Pharmacie, que j'ai pu en 3^e année de mes études découvrir l'univers de la recherche au sein du VRCM au départ et notamment la MP Team. Depuis, j'ai poursuivi dans cette direction en passant le concours de l'internat en pharmacie et en réalisant un cursus recherche en parallèle de mon internat dans le but de pouvoir concourir à une carrière hospitalo-universitaire.

Je remercie le Pr Romaric LACROIX pour avoir encadré ce mémoire de D.E.S. de Biologie Médicale et pour superviser également ma thèse de science. Je le remercie également de partager avec moi ses réflexions scientifiques et ses connaissances. Vous êtes un véritable exemple et je suis très heureuse d'avoir la chance de travailler avec vous.

Je remercie les membres du jury ayant acceptés de participer à cette soutenance, le Pr HARLÉ, chef de service de Médecine Interne à l'hôpital de la Timone. Je remercie également le Pr HARLÉ de m'avoir accepté en stage dans son service ce qui m'a permis de découvrir le fonctionnement d'un service clinique et d'y contribuer. Je remercie également Dr Shirley FRITZ, biologiste médicale dans le secteur d'immunophénotypage cellulaire dans le laboratoire d'hématologie de l'Hôpital de la Conception et Stéphane ROBERT ingénieur en cytométrie responsable de la plateforme AMUTICYT au sein du C2VN.

Je remercie le laboratoire d'hématologie de la Conception dirigé par le Pr DIGNAT-GEORGE. Tout d'abord le secteur d'hématologie cellulaire où j'ai pu apprendre les bases de la cytologie et acquérir des connaissances solides qui me permettent d'assurer des gardes en toute sérénité grâce au Dr Maxime LOYENS, assistant à l'époque et aux Drs Yaël BERDA et Maud ARIPN. Je remercie également chaleureusement le secteur d'immunophénotypage où j'ai fait des rencontres extraordinaires. Notamment le Dr Corinne BRUNET qui est une femme passionnante et qui m'a transmis énormément de connaissance, j'aurais aimé que vous partiez à la retraite un plus tard pour avoir la chance de travailler plus longtemps avec vous ! C'est également dans ce laboratoire que j'ai fait la connaissance du Dr Shirley FRITZ, je te ne remercierai jamais assez pour ton aide, tes conseils et ton apprentissage. Je suis extrêmement ravie de savoir que l'on va travailler ensemble les prochaines années.

Je remercie l'équipe du laboratoire de recherche, la MP Team initialement, qui est devenue la MV Team (qui sera bientôt la EV Team qui sait !). Tout d'abord, je remercie très chaleureusement Stéphane ROBERT pour son aide si précieuse et son soutien moral irremplaçable. Je suis heureuse de te compter parmi mes amis et maintenant tu me fais également l'honneur de participer en tant que jury à ma soutenance de thèse qui traite d'un sujet où tu m'as tout appris : la cytométrie de flux ! Je remercie le Dr Sylvie COINTE pour ses conseils et son enseignement, mais surtout pour avoir montré à des petits étudiants d'un UE d'initiation à la recherche de 3^e année de pharmacie ses travaux de thèse ! Je me souviens de ta présentation sur les microvésicules qui m'avait passionnée, tellement que j'étais venue te voir à la fin de ta présentation pour savoir comment faire pour avoir le même cursus que toi. S'en est suivi une semaine où avec mon amie Giulia, nous t'avions suivie à l'Hôpital et à la Faculté pour découvrir le quotidien d'une assistante hospitalo-universitaire. Et maintenant me voilà parmi la MV Team grâce à tes conseils. Je remercie Corinne CHAREYRE pour son aide si précieuse, merci pour ton dévouement pour notre équipe, tu es indispensable ! Je remercie le Dr Anne-Claire DUCHEZ pour ses conseils, je suis ravie que tu aies rejoint notre équipe, depuis maintenant plus d'un an et demi, mais je tenais à te le redire.

Je remercie tous les autres membres de l'équipe de 3 du C2VN.

Je remercie vivement tous les étudiants de l'époque où ce travail de mémoire de D.E.S. a été initié : Marie NOLLET, Marie HOUSSAY, Anne-Lyne CHATEAU, Xavier HEIM, Estelle BALDUCCI qui est un véritable exemple pour moi, Léa PLANTUREUX qui fait maintenant partie de la MV Team (très heureuse de travailler avec toi !), Mathilde DACOS (Lorissette n°2 au départ !) et Pauline FRANCOIS devenues de véritables amies, merci d'être là au quotidien pour m'écouter, et bien évidemment Stéphane et Loris qui étaient toujours là dans les moments de rigolade. Je me souviendrai toujours de ces soirées dans les appartements respectifs de chacun, dans les différents bars (GlamRock, Black U...) et surtout à la plage (aux bains des dames) où nous passions des heures à rigoler et à refaire le monde. De très belles photos attestent de ces moments, merci à Marie NOLLET de nous avoir créé tous ces souvenirs. Je remercie tous les étudiants passés ou actuellement dans l'équipe 3 du C2VN, notamment Mélanie VELIER, Cléa DUBROU et Raphaël CAUCHOIS.

Je remercie mes anciens co-internes qui ont partagé avec moi des semestres d'internat, notamment Céline BOSCHI et Paul-Rémi qui se sont lancés eux aussi dans l'aventure de la thèse de science. Mais aussi Marie SAPPÀ, Célia MAGNAN, Zeina MARASHI, Nicolas SILLAMY.

Lors de mon internat j'ai également pu apprendre auprès d'internes cliniciens, je pense notamment à Ferdinand VILLETARD et bien évidemment à mes co-internes de l'HDJ de médecine interne, Sandrine ROQUE un véritable puits de science, merci pour tout ce que tu m'as appris lors de ces 6 mois de stage, Beila BRAMI et le Dr Caroline SOUBRIER.

Je remercie mes amies de longue date que j'ai rencontrées lors de mes études de pharmacie : Sophie BONNET, ma binôme, Manon CAPPADORO (maintenant FINK), Mathilde KERSALE, Chloé VELLOZZI (maintenant CALANI), Marion VEZSENYI (maintenant WUHLIN) et Giulia MIZOULE. Je n'oublierai jamais tous ces bons moments passés ensemble, les soirées en pharmacie (notamment les galas et les carnivals), les fous rires avec Sophie à la BU de médecine, les moments plus durs de préparation du concours de l'internat avec Giulia, les journées à La Ciotat avec Marion et Nicolas. Les merveilleux moments qu'ont été vos mariages en 2019 (Manon, Marion et Chloé) et maintenant tous les bébés d'amour, Roméo, Nolan et Léonie.

Merci d'être encore là, à mes côtés, les copines, merci pour votre soutien et merci de croire en moi ! Je vous aime fort.

Je remercie ma famille, mon papa, ma maman, mon frère « Rémidou », ma mamie, et mon papi. Je remercie mon papa pour son aide précieuse lorsque les cours de physique devenaient incompréhensibles à mes yeux, tu savais tout expliquer. Je remercie particulièrement ma maman pour ces heures passées à me faire réciter en première année (PACES) des matières comme la chimie organique (avec les boulettes = benzène que je dessinais au tableau du bureau) ou encore les textes de sciences humaines et sociales où tu finissais par t'assoupir de fatigue ! Merci à ma famille de croire en moi et de m'avoir tant aidée. Je vous aime très fort. Je suis fière de mon petit frère qui va également finir ces études de kinésithérapie cette année, bravo Rémidou.

Je remercie bien évidemment toute ma famille, ma tante Chantal et mes cousines Cindy et Stacy ainsi que mon tonton Guy et tatie Christine, mon cousin Maxime et ma grande cousine Claire.

Pour finir, je remercie celui qui partage mon quotidien depuis maintenant plus de 4 ans, Loris. Le monde de la recherche nous a fait nous rencontrer, mais nous partageons maintenant tellement plus. Je fais des choses avec toi que je n'aurais jamais imaginé faire, je pense notamment à nos jours de bivouac dans les Dolomites ou les Pyrénées, où nous sommes partis avec nos sacs à dos, à l'aventure, en totale autonomie. Merci de me supporter quotidiennement, de m'écouter râler, de m'aider grâce à ton expérience, de ne jamais te lasser de mes histoires de recherche, de m'apaiser grâce à tes câlins, de me faire voyager, et de partager mes moments de folie ! Je t'aime.

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

Abréviations

ADN :	acide désoxyribonucléique
ANCA :	anticorps anti-cytoplasmique des polynucléaires neutrophiles
ARN :	acide ribonucléique
BPCO :	bronchopneumopathie chronique obstructive
CA :	corps apoptotiques
CMF :	cytométrie de flux
Cryo-EM :	cryo-electronic microscopy
ELISA :	technique d'immunoabsorption par enzyme liée
FITC :	fluorescein isothiocyanate
fMLP :	N-formylméthionine-leucyl-phénylalanine
FSC :	forward scatter
HDL :	lipoprotéine de haute densité
ICAM-1 :	molecule d'adhésion intercellulaire 1
ISAC :	international society for advancement of cytometry
ISEC :	international society of extracellular vesicles
ISTH :	international society of thrombosis and hemostasis
LBA :	liquid bronchoalvéolaire
MET :	microscopie électronique à transmission
MISEV :	minimal information to study extracellular vesicles
MV :	microvésicules
NDMV :	microvésicules issues de polynucléaires neutrophiles
NF- κ B :	nuclear factor kappa B
NTA :	nanoparticles tracking analysis
PCR :	polymerase chain reaction
PE :	phycoérythrine
PNN :	polynucléaire neutrophile
PS :	phosphatidylsérine
RTPS :	resistive pulse sensing
SDRA :	syndrome de détresse respiratoire aiguë
SSC :	side scatter
SEC :	chromatographie d'exclusion de taille
VE :	vésicules extracellulaires
VCAM :	protéine d'adhésion aux cellules vasculaires
VSSC :	violet side scatter

Liste des figures

Figure 1 :	Différentes étapes impliquées dans la clairance des corps apoptotiques	5
Figure 2 :	Mécanisme de formation des 3 types de vésicules extracellulaires	8
Figure 3 :	Les vésicules extracellulaires comme stratégie d'administration intelligente pour des applications thérapeutiques	9
Figure 4 :	Principaux contextes pathologiques où la biopsie liquide des vésicules extracellulaires est étudiée	11
Figure 5 :	Principe de fonctionnement l'« Exoscreen »	12
Figure 6 :	Impact des NDMV sur différentes cellules cibles	14
Figure 7 :	Principe de la centrifugation différentielle.....	19
Figure 8 :	Schématisation de la technique de centrifugation par gradient de densité	20
Figure 9 :	Principe de la chromatographie d'exclusion de taille	21
Figure 10 :	Principe de la chromatographie associant deux techniques de séparation des vésicules extracellulaires.....	22
Figure 11 :	Principe de l'ultrafiltration.....	23
Figure 12 :	Principe de la séparation immunomagnétique	24
Figure 13 :	Principe du déplacement latéral déterministe	25
Figure 14 :	Principe de fonctionnement d'un cytomètre de flux.....	29
Figure 15 :	Impact du débit du liquide de gaine sur l'analyse d'un échantillon.....	30
Figure 16 :	Séparation des 3 sous-populations de leucocytes circulants par les paramètres de diffractions de la lumière : SSC et FSC	31
Figure 17 :	Principe de la détection de fluorescence	32
Figure 18 :	Classification des principaux fluorochromes en fonction de leur brillance.....	33
Figure 19 :	Exemple de chevauchement des spectres d'émission des fluorochromes FITC et PE	33
Figure 20 :	Différents types de miroirs utilisables dans le système optique d'un cytomètre de flux	34
Figure 21 :	Schématisation des deux types de photodétecteurs.....	35
Figure 22 :	Comparaison des performances des photodétecteurs en fonction de la longueur d'onde des photons incidents	36
Figure 23 :	Paramètres exploitables du signal analogique déclenché par un événement	37
Figure 24 :	Ensemble des éléments aborder par le MIFlowCyt EV	38

Figure 25 : Schématisation de la diffraction de la lumière en fonction des modèles de Rayleigh et de la théorie des « Mie »	40
Figure 26 : Schématisation du paramètre W2 du cytomètre Gallios	40
Figure 27 : Effet de l'efficacité de détection du bruit de fond sur la sensibilité de fluorescence	43
Figure 28 : Différence d'index de séparation des billes SPHERO8pks entre les cytomètres de flux Navios et CytoFLEX	44
Figure 29 : Différence de détection de nanobilles entre le VSSC et le blues side scatter (BSSC)	47
Figure 30 : Différents moyens de marquage fluorescent des MV pour détection par cytométrie de flux	47
Figure 31 : Répartition des antigènes ciblés pour la détection des NDMV par CMF (à partir du Tableau 2).....	49
Figure 32 : Équivalence des systèmes de standardisation MegamixPlus FSC et SSC.....	50
Figure 33 : Principe d'un trieur	52
Figure 34 : Cellule portant des VE	53
Figure 35 : Principe de la microscopie électronique à transmission	55
Figure 36 : Principe de la microscopie de force atomique	55
Figure 37 : Principe de l'analyse du suivi individuel de particules.....	56
Figure 38 : Principe de la mesure par impédance des MV : Resistive pulse sensing and tunable	57
Figure 39 : Corrélation entre le contenu vésiculaire en acides nucléiques, protéines et lipides et les analyses « omics » possibles	58

Liste des tableaux

Tableau 1 : Principales caractéristiques des sous-types de vésicules extracellulaires	4
Tableau 2 : Études cliniques mesurant les NDMV par cytométrie de flux.....	16
Tableau 3 : Résumé des principales méthodes de concentration et de purification des vésicules extracellulaires	26
Tableau 4 : Résumé des principales techniques d'étude des MV	27

Table des matières

Introduction	1
Contexte bibliographique	3
Partie 1 Les vésicules extracellulaires	3
1.1 Définition	3
1.1.1 « Grandes » vésicules extracellulaires	4
1.1.1.1 Les corps apoptotiques	4
1.1.1.2 Les microvésicules	5
1.1.2 « Petites » vésicules extracellulaires ou exosomes	7
1.2 Potentiel intérêt d'utilisation des Microvésicules	8
1.2.1 Vecteur thérapeutique	9
1.2.2 Cible thérapeutique	10
1.2.3 Biomarqueur, notion de biopsie liquide	10
1.3 Intérêt des vésicules extracellulaires issues de polynucléaires neutrophiles	12
1.3.1 Propriétés non cellulaires des NDMV	13
1.3.2 Capacité NDMV à induire une réponse chez une cellule cible	13
1.3.3 NDMV et pathologie humaine	14
Partie 2 Méthodes de purifications et de concentration des vésicules extracellulaires	18
2.1 Centrifugation différentielle	19
2.2 Centrifugation avec gradient de densité	20
2.3 Méthode purification par la taille	21
2.3.1 Chromatographie d'exclusion de taille	21
2.3.2 Filtration tangentielle	22
2.4 Chromatographie par échange d'ion	23
2.5 Méthode de purification par précipitation	23
2.5.1 Précipitation avec polymères	23
2.5.2 Précipitation par solvant organique protéique	23
2.6 Séparation immunologique	24
2.7 Système microfluidique : principe du déplacement latéral déterministe	25

Partie 3 Les Méthodes de Détection des Vésicules extracellulaires	27
3.1 Cytométrie en flux	28
3.1.1 Développement historique	28
3.1.2 Principes généraux de la cytométrie en flux	28
3.1.2.1 Chambre d'analyse	30
3.1.2.2 La source lumineuse	30
3.1.2.3 Paramètres optiques obtenus	31
3.1.2.4 Système optique	34
3.1.2.5 Conversion des photons en électrons : Photodétecteurs	34
3.1.2.6 Conversion des électrons en signal analytique	36
3.1.3 Analyse des MV par cytométrie en flux	37
3.1.3.1 Stratégies d'analyse	39
3.1.3.2 Limites de l'analyse des MV par CMF	42
3.1.3.3 Intérêt du CytoFLEX dans l'étude des MV	46
3.1.3.4 Outils de détection des MV en cytométrie de flux	47
3.1.3.5 Standardisation	49
3.1.4 Autres techniques reposant sur la cytométrie de flux	51
3.1.4.1 Tri de Microvésicules	51
3.1.4.2 Imageur en flux	53
3.2 Autres méthodes de détection	54
3.2.1 Méthode d'étude individuelle des vésicules extracellulaires	54
3.2.1.1 Techniques de microscopie	54
3.2.1.2 Analyse du suivi individuel de particules (Nanoparticle Tracking Analysis)	56
3.2.1.3 Impédance : Resistive pulse sensing and tunable	57
3.2.2 Méthodes permettant d'étudier un ensemble de vésicules extracellulaires	57
Travaux personnels	59
Discussion & Perspectives	91
Bibliographie	96
Serment de Galien	108
Résumé	109

INTRODUCTION

Le terme « vésicules extracellulaire » (VE) désigne l'ensemble des vésicules émises par les cellules de l'organisme dans le milieu extracellulaire. En effet, les VE sont produites par toutes les cellules de l'organisme et sont retrouvées dans les fluides biologiques tels que le sang, la salive ou encore l'urine. Les VE sont constituées d'une bicouche lipidique et transportent des protéines et acides nucléiques issus de la cellule parentale. De par leur contenu, les VE sont des éléments indispensables de la communication intercellulaire. Il existe un grand nombre de sous-populations de VE en fonction de la cellule parentale et du stimulus qui a conduit à leur formation. Des MV issues d'une même origine cellulaire peuvent posséder des propriétés différentes en fonction du stimulus auquel a été exposée la cellule parentale. Les VE sont étudiées en pathologie humaine comme des éléments pouvant être une cible thérapeutique lorsqu'elles ont été reconnues comme des éléments délétères dans un contexte pathologique, ou au contraire comme des agents thérapeutiques, cette technique est appelée la « vésiculothérapie ». L'une des applications les plus étudiées des VE est leur intérêt comme biomarqueur. En effet, leur présence dans les fluides biologiques permet d'obtenir rapidement des informations sur un tissu dont les cellules ne sont pas présentes dans le prélèvement. Cette notion est maintenant connue sous le terme de « biopsie liquide ».

Cependant, cet intérêt des VE comme biomarqueur utilisé en clinique est limité par l'existence de limites technologiques des outils de détection actuellement disponible ne permettant pas une analyse sensible et spécifique de sous-population de VE d'intérêt. La première étape nécessaire avant la caractérisation d'un échantillon de VE est leur concentration et purification. Ces étapes sont primordiales, car elles conditionnent la sensibilité de l'analyse de l'échantillon¹. Une des techniques les plus utilisées est la cytométrie de flux (CMF), car elle permet une étude individuelle des VE dans un temps d'analyse compatible avec la routine des laboratoires hospitaliers. Cependant, cette technique nécessite d'être améliorée notamment en termes de sensibilité de détection de fluorescence. En effet, la CMF a été initialement mise au point pour l'étude phénotypique de cellule en suspension de possède pas une sensibilité de détection de fluorescence permettant une analyse de suspension de VE. Les VE étant des éléments de petite taille et avec une faible densité antigénique la plupart des cytomètres actuels ne permettent qu'une détection partielle des VE contenues dans un échantillon.

Après une introduction sur les VE, ce travail détaillera les outils actuellement disponibles pour concentrer et purifier à partir d'un échantillon les VE, puis, les techniques permettant de les caractériser. L'objectif de cette partie bibliographique est de montrer les avantages et inconvénients de ces nombreuses techniques, et de mettre en évidence que la détection des VE peut être améliorée. Pour répondre à ce but, une partie expérimentale portera sur l'amélioration de la détection de VE issues de PNN en augmentant la sensibilité de détection du signal fluorescent généré pour une VE par CMF. L'utilisation de la chromatographie d'exclusion de taille, d'une combinaison d'anticorps et d'un cytomètre de flux fluo-sensible, nous a permis d'améliorer le signal fluorescent des VE. L'association de ces améliorations a permis d'une part d'améliorer de la détection des NDMV dans des échantillons plasmatiques de patients atteints de sepsis, et dans un deuxième temps, le tri spécifique des NDMV à partir d'échantillon plasmatique de patients atteints de COVID.

CONTEXTE BIBLIOGRAPHIQUE

Partie 1 Les vésicules extracellulaires

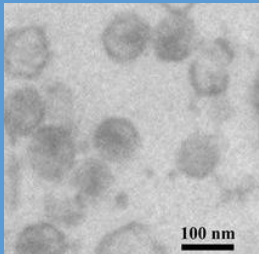
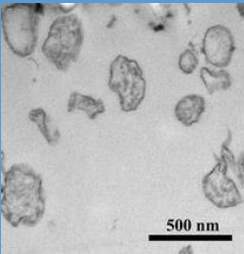
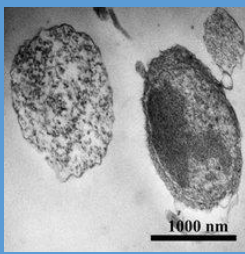
1.1 Définition

Les vésicules extracellulaires (VE) représentent un continuum de vésicules délimitées par une membrane constituée d'une bicouche lipidique, avec une taille comprise entre 50 et 3000nm. Toutes les cellules de l'organisme sont capables de vésiculer et ainsi les VE peuvent être retrouvées dans tous les fluides biologiques tels que le sang, le liquide pleural, la salive ou le liquide céphalo-rachidien rendant plus ou moins facile l'accès aux VE. Elles sont étudiées dans de nombreux domaines comme des éléments participants à des processus physiopathologiques ou comme étant le reflet d'un événement biologique (biomarqueur). Certaines études les envisagent également comme vecteurs ou cibles thérapeutiques. Classiquement, 3 catégories de VE sont distinguées selon leurs mécanismes de formation : les corps apoptotiques (CA), les microvésicules (MV) et les exosomes (Tableau 1).

C'est en 2005 que pour la première fois un sous-comité de standardisation de biologie vasculaire est créé au sein de l'International Society of Thrombosis and Hemostasis (ISTH), dans le but de démarrer un travail de nomenclature et de standardisation sur les VE². Puis en 2011, une société internationale pour les VE (ISEV) est créée et reprend largement les travaux initiaux pour clarifier et proposer un consensus sur les différentes sous-populations de VE³. Cette société propose donc d'utiliser le terme de « vésicule extracellulaire » comme terme générique pour parler de particules libérées de façon physiologique ou pathologique par la cellule, formée d'une bicouche lipidique, ne pouvant pas se répliquer et ne contenant pas de noyau fonctionnel. Depuis, l'ISEV publie régulièrement des recommandations aux chercheurs : les MISEV pour Minimal information for studies of extracellular vesicles. Les dernières recommandations datent de 2018 et concernent non seulement la nomenclature, mais également les outils à mettre en œuvre pour prouver l'origine vésiculaire des échantillons, ou encore les bonnes pratiques de préparation des échantillons⁴. Les méthodes d'isolement des VE ne permettent pas actuellement d'obtenir des préparations ne contenant qu'une seule catégorie de VE. Pour cette raison l'ISEV préfère l'utilisation des termes suivants pour qualifier les préparations de VE : les « petites » VE et « larges » VE⁴.

Tableau 1 : Principales caractéristiques des sous-types de vésicules extracellulaires

Images issues de Németh A et coll., Sci Rep 2017

	Exosomes	Microvésicules	Corps apoptotiques
			
Taille	< 100 nm	100-1000 nm	> 1000 nm
Origine	Exocytose de corps multivésiculaires	Bourgeonnement de la membrane plasmique	Mort cellulaire par apoptose
Composition	Lipides, Protéines, ARN, micro-ARN	Lipides, Protéines, ARN, micro-ARN	Lipides, Protéines, ARN, micro-ARN, ADN, organites cellulaires
Méthodes de détection	- Microscopie électronique	- Cytométrie en flux - Microscopie électronique	- Cytométrie en flux - Microscopie électronique
Méthodes de quantification	- Resistive pulse sensing (RTPS) - Nanoparticle tracking analysis (NTA)	- Cytométrie en flux - Resistive pulse sensing (RTPS) - Nanoparticle tracking analysis (NTA)	- Cytométrie en flux
Méthodes de purification	- Ultracentrifugation (>100 000 g) - Centrifugation avec gradient de sucrose - Séparation immunomagnétique - Microfluidique	- Ultracentrifugation - Chromatographie par exclusion de taille - Chromatographie échangeuse d'ion - Séparation immunomagnétique	- Centrifugation

1.1.1 « Larges » vésicules extracellulaires

Les « larges » VE sont définies comme des éléments d'une taille supérieure à 100 nm. Cette première catégorie de VE comprend deux sous-populations : les CA et les MV.

1.1.1.1 Les corps apoptotiques

Les CA sont produits lors de l'apoptose cellulaire. Ce sont les VE possédant la taille la plus importante, entre 1 μm et 5 μm ⁵. Ils peuvent contenir des acides nucléiques tels que de l'ADN, des ARN ou micro-ARN, mais également des organites cellulaires. Ils possèdent au

niveau de leur membrane plasmique un grand nombre de protéines, et de phospholipides notamment la phosphatidylsérine (PS). La PS est considérée comme un message « eat-me » par les cellules phagocytaires telles que les macrophages (Figure 1)⁶. Les CA ont montré un intérêt dans la communication intercellulaire et notamment la propagation de signaux inflammatoires⁷.

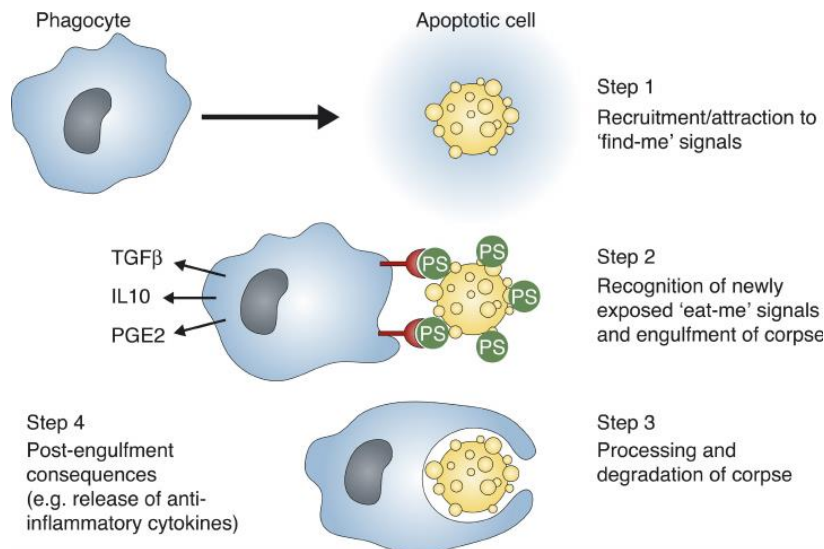


Figure 1 : Différentes étapes impliquées dans la clairance des corps apoptotiques

Étape 1 : Signaux « find-me » (faibles niveaux de nucléotides ATP et UTP, fractalkine, lysophosphatidylcholine ou sphingosine 1-phosphate) libérés par les cellules apoptotiques. Ils aident à attirer les phagocytes mobiles à proximité de la cellule en apoptose.

Étape 2 : Mise en jeu des récepteurs « d'engloutissement » pour engager des signaux « eat-me » sur les corps apoptotiques et libération de cytokines anti-inflammatoires (TGFβ, l'IL10 et la prostaglandine E2 (PGE2))

Étape 3 : Internalisation des corps apoptotiques

Légende : IL10 : interleukine 10 ; PGE2 : Prostaglandine E2 ; TGFβ : Facteur de croissance transformant β

Extraite de Ravichandran K. et coll., J Exp Med 2010

1.1.1.2 Les microvésicules

Les MV ont été décrites pour la première fois comme des poussières de plaquettes en 1967 par Peter Wolf⁸. Ce dernier les a observées dans un culot de centrifugation rapide d'un plasma déplété en plaquettes. Peter Wolf montrait déjà qu'elle possédait une activité procoagulante par la mesure de la génération de thrombine d'un plasma déplété en plaquette. Mais elles ont longtemps été considérées comme des éléments inertes, ne possédant pas d'activité biologique.

De façon générale, les MV ont un diamètre compris entre 100 et 1000nm et sont produites à partir du bourgeonnement de la membrane plasmique. Elles véhiculent donc un grand nombre de protéines membranaires (permettant de les différencier des sous-populations de MV), de phospholipides et notamment des phospholipides négatifs tels que la PS ou phosphatidyléthanolamine. Les MV transportent également du matériel cytoplasmique, comme des protéines, organites (mitochondrie⁹) ou encore des acides nucléiques tels que des ARN¹⁰ ou miARN¹¹. Tout d'abord, elles ont été étudiées comme vecteur d'information biologique, notamment pour leurs propriétés procoagulantes, et comme nouvel acteur de communication intercellulaire. Ce n'est que dans un deuxième temps qu'elles ont été considérées comme de potentiels marqueurs biologiques plus ou moins facilement accessibles dans l'organisme puisqu'elles sont présentes dans tous les fluides corporels. Il est important de noter que toutes les cellules de l'organisme sont capables de produire des MV, il existe donc une grande variété de MV et cette diversité est d'autant plus importante qu'une même cellule peut produire des MV différentes en fonction de la stimulation qui a entraîné la vésiculation.

Les MV sont produites par bourgeonnement de la membrane plasmique en mettant en jeu plusieurs mécanismes (Figure 2). Tout d'abord, il est observé une perte de l'asymétrie membranaire des phospholipides. En effet, à l'état basal, la membrane plasmique possède une asymétrie de répartition des phospholipides négatifs (tels que la PS ou la phosphatidyléthanolamine) qui sont situés au niveau de son feuillet interne. Lors d'une activation cellulaire, il existe, généralement, une entrée de calcium cytoplasmique. L'augmentation intracellulaire de calcium va alors entraîner l'activation de différentes enzymes : flippase, floppase, et scramblase. L'enzyme « flippase » permet en temps normal de faire basculer les phospholipides négatifs du feuillet externe vers le feuillet interne, cette enzyme sera donc inactivée lors de la production de MV. La floppase quant à elle permet, à l'inverse, de transférer les phospholipides négatifs sur le feuillet externe de la membrane plasmique. Ces deux enzymes flippase et floppase sont dépendantes de l'ATP. Enfin, la famille d'enzymes appelée « scramblase » correspond à un transporteur phospholipidique non spécifique, activé lors de l'augmentation de la concentration intracellulaire de calcium. Une enzyme de cette famille est bien décrite : la TMEM16F (protéine TransMEMbranaire 16F). Une anomalie de ce transporteur est à l'origine du syndrome de Scott. Dans cette pathologie, il existe une séquestration des phospholipides procoagulants sur le feuillet interne de la membrane plasmique. Il est alors observé des manifestations hémorragiques modérées.

Ensuite, un remaniement du cytosquelette permet la vésiculation cellulaire. Ces mécanismes sont dépendants du type cellulaire et du stimulus associé à la vésiculation. Par exemple, les calpaïnes sont des cystéines protéinases et sont activées lors d'une augmentation de la concentration en calcium intracellulaire. Elles permettent le clivage protéolytique de protéines du cytosquelette telles que la filamine-1, la taline et la myosine. La gelsoline est décrite dans le mécanisme de formation des MV d'origine plaquettaire. Elle coupe des protéines situées à l'extrémité des filaments d'actine permettant le remodelage du cytosquelette et la libération de MV.

Enfin, l'épuration des MV circulantes dépend de plusieurs molécules. L'expression de PS à la surface des MV est reconnue par les macrophages comme un signal « eat-me » et entraîne l'endocytose des MV. La présence d'autres protéines ont également été décrites comme la lactadhérine ou la protéine Del-1 dans l'épuration des MV plaquettaires. Une étude récente montre que l'épuration de MV exogènes est variable en fonction de la quantité de MV injectées, de la voie d'injection choisie, et de la source cellulaire dont proviennent les MV. Mais dans la plupart des cas les MV sont retrouvées 24 heures après injection dans des organes contenant un système phagocytaire important tels que le foie, la rate ou encore le tractus gastro-intestinal¹². Enfin, les études portant sur la vitesse de clairance des MV montrent que celles-ci ne restent pas en circulation plus de 30 minutes après injection à la souris, ou dans la circulation sanguine^{13,14}.

1.1.2 « Petites » vésicules extracellulaires ou exosomes

Les « petites VE » ou exosomes sont les plus petites VE puisqu'elles ont une taille moyenne inférieure à 100 nm. Les exosomes ont un processus de fabrication différent des deux autres sous-populations de VE. En effet, ils ne sont pas directement produits à partir de membrane plasmique cellulaire. Dans un premier temps, la membrane plasmique va s'invaginer, par un processus d'endocytose, pour former une vésicule cytoplasmique appelée endosome. Celui-ci va à son tour former des vésicules en son sein pour devenir un corps multivésiculaire¹⁵. Enfin, la fusion de ce corps multivésiculaire avec la membrane plasmique va entraîner la libération des petites VE dans le milieu extracellulaire (Figure 2).

Pendant longtemps la communauté scientifique a pensé que certains marqueurs membranaires étaient spécifiques des exosomes, tels que les tétraspanines¹⁶ (CD9, CD81 et CD63), mais des études plus récentes montrent l'existence de ces molécules sur d'autres classes de VE notamment les MV. Il en est de même pour la présence de phospholipides négatifs. En

effet, initialement la présence par exemple de PS à la surface des VE n'était retrouvée que sur les CA et les MV, mais ceci a également été remis en cause¹⁷.

L'avancée des connaissances sur la composition membranaire et du contenu des VE évolue donc encore, grâce aux progrès technologiques qui permettent de diminuer les seuils de détection des protéines portées par les VE.

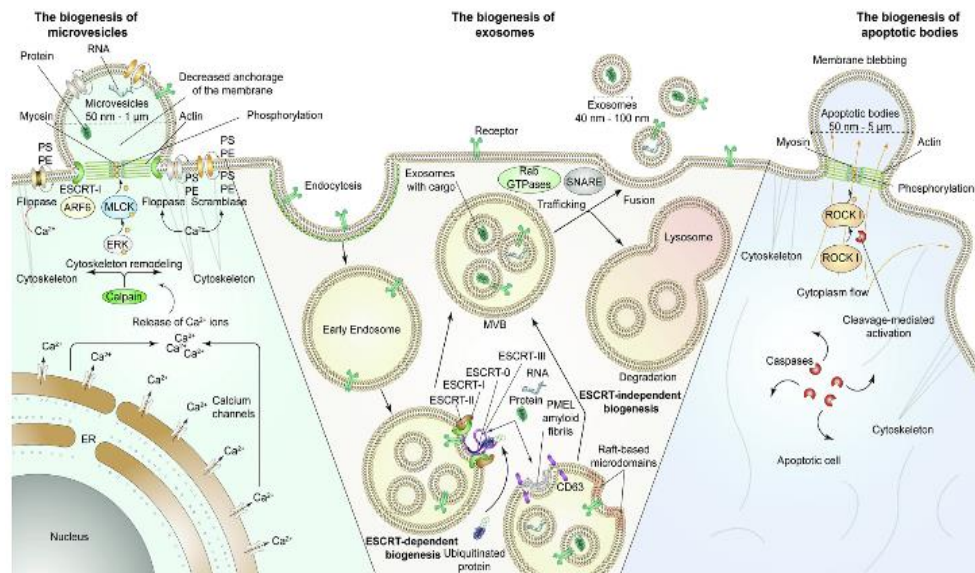


Figure 2 : Mécanisme de formation des 3 types de vésicules extracellulaires

Légende : ARF6 : ADP ribosylation factor 6 ; ERK : extracellular signal-regulated kinase ; ESCRT : endosomal sorting complex required for transport ; MLC : myosin light chain kinase ; MVB : multivesicular body ; PE : phosphatidylethanolamine ; PMEL : premelanosome protein ; PS : phosphatidylsérine ; ROCK : Rho-associated protein kinase ; SNARE : soluble N-ethylmaleimide-sensitive factor activating protein receptor.

Extrait de Tarasov et coll., Semin Cancer Biol, 2019

1.2 Potentiel intérêt d'utilisation des Microvésicules

Depuis leur mise en évidence les MV ont montré un intérêt grandissant en pathologie humaine. Les MV sont des éléments pouvant être ciblées lorsqu'elles sont délétères dans un processus pathologique ou au contraire être administrées comme vecteur thérapeutique. De plus, les MV étant le reflet de nombreux processus physiopathologique, un grand nombre d'études montrent leur intérêt comme biomarqueur.

1.2.1 Vecteur thérapeutique

Du fait de leur rôle dans la communication intercellulaire grâce à leur bagage protéique, lipidique ou en acide nucléique les MV apparaissent comme un vecteur intéressant de thérapie cellulaire (Figure 3). Les résultats les plus prometteurs proviennent des MV issues de cellules mésenchymateuses montrant des propriétés immunosuppressives¹⁸ ou de régénération tissulaire, notamment au niveau du myocarde¹⁹ et de la peau²⁰. D'autres sous-populations de MV montrent un potentiel rôle en thérapie antitumorale telles que les MV issues de lymphocytes natural killer²¹. De plus, la manipulation des cellules *ex vivo* dont elles sont issues par traitement pharmacologique ou par transfection permet de les enrichir en une molécule d'intérêt thérapeutique ou encore de cibler spécifiquement un tissu. Plusieurs études utilisent ainsi des MV enrichies dans le but de délivrer spécifiquement une chimiothérapie anticancéreuse²², ou bien cibler un thrombus en utilisant des MV enrichies en urokinase dans un modèle de thrombose chez la souris²³, ou encore dans le but de cibler des plaques d'athérosclérose²⁴.

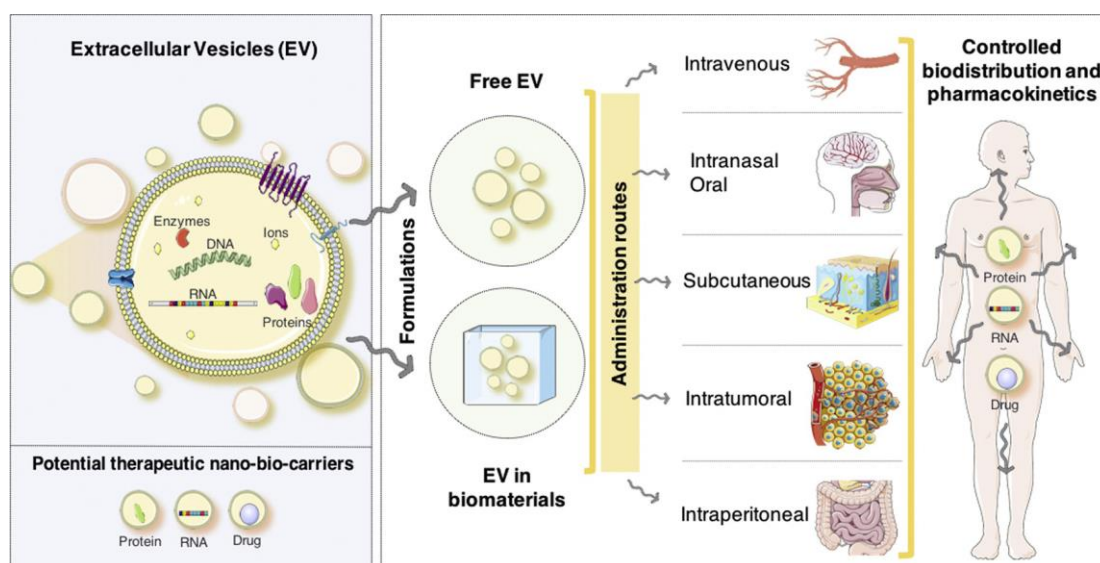


Figure 3 : Les vésicules extracellulaires comme stratégie d'administration intelligente pour des applications thérapeutiques

Extrait de Pinheiro A. et coll, Journal of Controlled Release 2018

1.2.2 Cible thérapeutique

Les MV ont également été décrites comme favorisant des processus pathologiques, comme l'athérosclérose²⁵ ou la thrombose associée au cancer²⁶. Certaines études proposent alors de cibler certaines sous-populations de MV délétères. Par exemple, une étude récente propose comme un nouveau traitement anticoagulant de cibler les MV procoagulantes en ciblant des motifs oxydatifs spécifiques exprimés à leur surface²⁷.

1.2.3 Biomarqueur, notion de biopsie liquide

Le NIH Biomarkers Definitions Working Group définit un biomarqueur comme une caractéristique mesurable objectivement et évaluée comme un indicateur des processus biologiques normaux ou pathogènes ou d'une réponse pharmacologique à une intervention thérapeutique. Le biomarqueur permet ainsi de diagnostiquer une maladie, d'évaluer sa gravité, le risque de récurrence ou encore prédire la réponse ou monitorer la posologie d'un traitement. Les MV véhiculent un grand nombre d'informations de par leur contenu en lipides, protéines et acides nucléiques. Elles ont rapidement été considérées comme de potentiels nouveaux biomarqueurs. Elles sont retrouvées dans de nombreux fluides biologiques tels que le sang, le liquide pleural, l'urine ce qui constitue également un avantage dans l'utilisation comme biomarqueur. Ceci permettrait notamment d'éviter le recours à des gestes invasifs tels qu'une biopsie d'organe. En effet, il est possible de retrouver dans le sang circulant des MV issues de cellules non circulantes comme le cancer du pancréas²⁸, ou de la prostate²⁹, le myélome multiple³⁰, mais également dans les cancers liquides³¹. D'autres contextes physiopathologiques sont également étudiés pour le développement de la biopsie liquide comme les pathologies cardiovasculaires ou les pathologies de la grossesse³². C'est de ce constat que les MV ont montré leur intérêt comme biomarqueur lors de biopsie liquide. À ce jour, de nombreuses études proposent la mesure des MV circulantes dans différents contextes physiopathologiques tels que les pathologies cardiovasculaires, neurologique, ou néoplasique³³ (Figure 4).

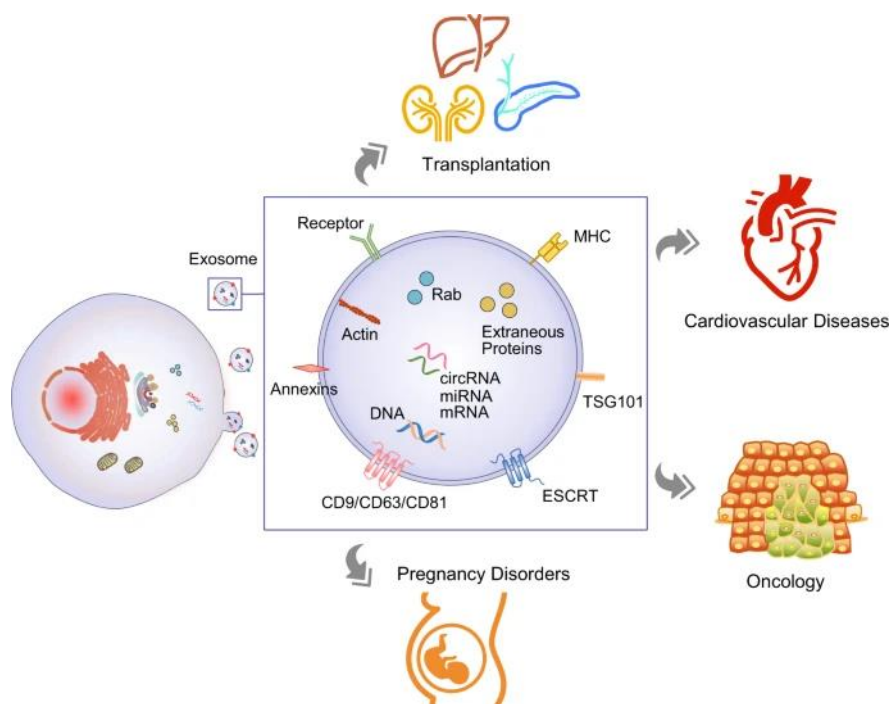


Figure 4 : Principaux contextes pathologiques où la biopsie liquide des vésicules extracellulaires est étudiée

Extrait de Zhou B, et al. Signal Transduct Target Ther. 2020

En 2014, une équipe japonaise a proposé un kit de mesure ultrasensible de VE issues de cellules tumorales chez les patients atteints d'un cancer colorectal directement à partir du sérum du patient sans étape de purification (Figure 5)³⁴. La VE va être ciblée par deux billes. La première bille, « donneur », est revêtue de streptavidine pour capturer un anticorps biotinylé pan-VE (par exemple anti-CD9). La deuxième bille, « accepteur » reconnaîtra les VE grâce à un anticorps reconnaissant spécifiquement la sous-population de VE recherchée. La première bille est également chargée de phtalocyanine qui est excitée avec un laser à 680nm, convertissant le dioxygène en oxygène singulet. Cet oxygène va à son tour engendrer un signal fluorescent au niveau de la deuxième bille, « accepteur », qui elle est chargée en thioxène. La bille « accepteur » va alors émettre un signal à 615 nm enregistré par le lecteur de luminescence. Cette émission se produit uniquement si les deux billes sont à moins de 200 nm, éliminant le signal provenant de vésicules plus grosses ainsi que de protéines solubles.

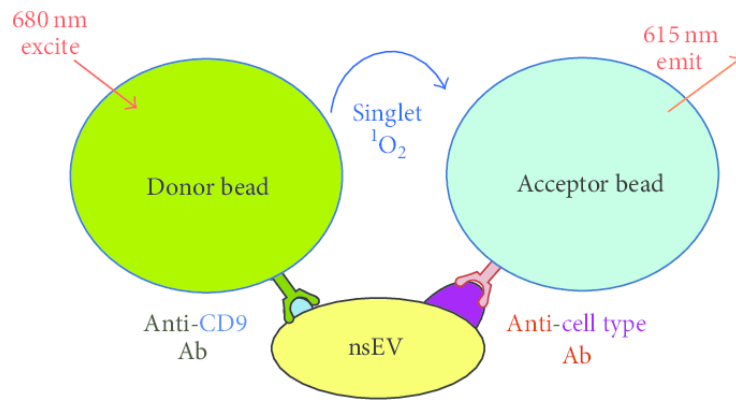


Figure 5 : Principe de fonctionnement l'« Exoscreen »

Depuis d'autres kits de diagnostic *in vitro* reposant sur les VE ont été développés. Par exemple, le kit ExoProfile permet la détection à partir de 10 μ L de plasma de 7 marqueurs relié au cancer du sein²⁸. Des autres kits permettent de mesurer l'activité procoagulante médiée par les VE dépendante du facteur tissulaire, le « Zymuphen MP-TF »³⁵ ou dépendante des phospholipides membranaires, le « STA-ProcoagPPL ».

Dans la suite de l'exposé, nous nous focaliserons sur les « larges » VE ou microvésicules (MV). Plus particulièrement, nous nous sommes intéressés au MV issues de polynucléaires neutrophiles (NDMV). Cette sous-population de MV circulantes a été étudiée dans de nombreux contexte physiopathologique et représente un potentiel biomarqueur en pathologie humaine.

1.3 Intérêt des vésicules extracellulaires issues de polynucléaires neutrophiles

De nombreuses études se sont intéressées aux MV circulantes dans leur ensemble. Or, il est maintenant clairement admis que chaque sous-population de MV circulantes possède des activités biologiques qui lui sont propres et une sous-population de MV peut avoir des effets différents en fonction du stimulus qui a induit sa formation. Il paraît donc essentiel de distinguer ces différentes sous-populations et de les étudier séparément. Dans cette partie l'intérêt des MV issues de polynucléaires neutrophiles (NDMV) en pathologie humaine va être développé. Tout d'abord, les principales propriétés non cellulaires des NDMV vont être détaillées. Ensuite nous décrirons leur capacité à induire une réaction cellulaire après fusion ou liaison avec une cellule cible. Enfin, leur intérêt en pathologie humaine sera étudié.

1.3.1 Propriétés non cellulaires des NDMV

Les NDMV possèdent diverses propriétés grâce aux nombreuses protéines qu'elles portent, en l'absence d'interaction avec une cellule cible. Une propriété antibactérienne d'une sous-population de NDMV a été décrite. Ces NDMV produites lors d'une stimulation par le récepteur Mac-1 (Macrophage 1 antigen) ou en présence d'agents opsonisants ont la capacité de former des agrégats avec les bactéries permettant de limiter la croissance bactérienne au moment des stades précoces d'une infection^{36,37}.

Les NDMV interviennent également dans l'hémostase. Tout d'abord, une activité procoagulante médiée par les NDMV a également été détectée dans certaines études notamment lorsque les cellules mères étaient stimulées par fMLP³⁸, anticorps anticytoplasmique des PNN (ANCA)³⁹ par augmentation de la génération de thrombine *in vitro*. Cette propriété procoagulante peut être médiée par la présence de phospholipides négatifs, de facteur tissulaire⁴⁰ activant la voie extrinsèque de la coagulation mais aussi par l'intermédiaire du facteur XII⁴¹ qui cette fois ci activera la voie intrinsèque de la coagulation. De plus, une autre étude montre, cette fois ci, la capacité des NDMV à pouvoir intervenir dans la lyse d'un thrombus grâce à l'expression du système urokinase et de son récepteur⁴².

1.3.2 Capacité NDMV à induire une réponse chez une cellule cible

Les NDMV sont capables de transférer des informations et d'induire une réponse cellulaire après fusion ou liaison avec une cellule cible⁴³ (Figure 6). Concernant l'inflammation, les NDMV présentent une activité anti-inflammatoire lorsqu'elles sont produites spontanément ou lors de l'utilisation du N-formylméthionine-leucyl-phénylalanine (fMLP). Elles entraînent la diminution de la production d'espèce réactive de l'oxygène et d'interleukine-8. De plus, elles interfèrent avec la voie intracellulaire de signalisation Nuclear Factor-Kappa B (NF- κ B) et augmentent le relargage de facteur de croissance transformant-beta1 (TGF- β 1) par des cellules macrophagiques. Inversement, des effets pro-inflammatoires ont été mis en évidence lorsque les NDMV étaient produites à partir de cellules stimulées par du fMLP, Tumor Necrosis Factor α (TNF- α) ou encore directement par des agents pathogènes. Lorsque de la mise en contact avec des cellules endothéliales la voie NF- κ B était alors stimulée. La vectorisation d'un micro-ARN proinflammatoire a été mis en évidence (miR-155 et miR-23a)⁴⁴.

Gomez et coll. montrent que les NDMV sont capables de favoriser l'athérosclérose grâce au transport du miR-155. Ce micro-ARN va augmenter l'expression des molécules d'adhésion endothéliales comme ICAM-1 (InterCellular Molecular Adhesion) et VCAM (Vascular Cell Adhesion Molecule) qui vont être reconnues par les cellules monocytaires

circulantes et favoriser la croissance de la plaque d'athérosclérose en devenant des cellules spumeuses²⁵. Les NDMV peuvent également interagir avec les plaquettes et augmenter leur expression de P-sélectine par activation de l'intégrine $\alpha_{IIb}\beta_3$ ⁴⁵. Enfin, les NDMV sont également connues pour communiquer avec des cellules de la lignée monocytes/macrophages⁴⁶. Par exemple, il a été décrit qu'elles pouvaient favoriser la voie anti-inflammatoire MerTK (Myeloid-Epithelial-Reproductive Tyrosine Kinase) dépendante dans les macrophages cibles⁴⁷.

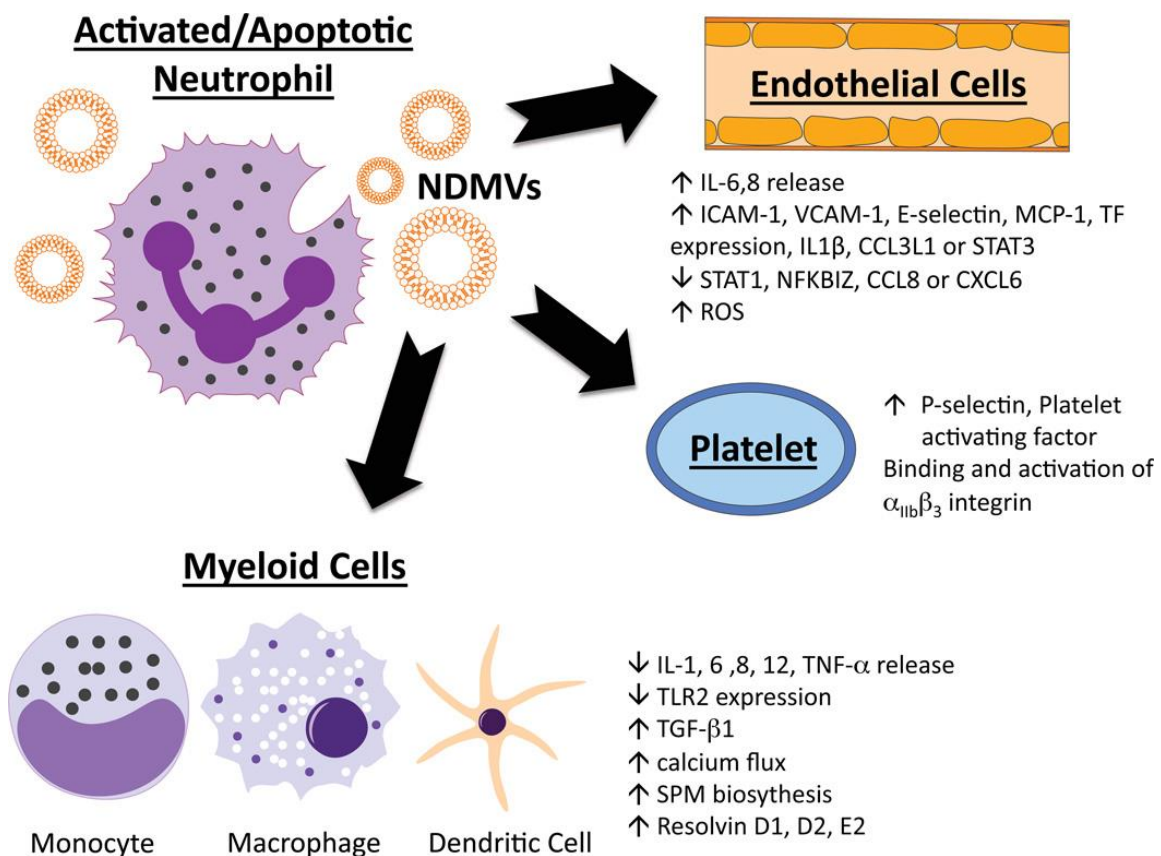


Figure 6 : Impact des NDMV sur différentes cellules cibles

1.3.3 NDMV et pathologie humaine

Les NDMV ont été dosées dans divers processus pathologiques (Tableau 2). Dans le domaine de l'infectiologie, plusieurs études montrent une augmentation des MV circulantes dont les NDMV dans le sepsis⁴⁸. Cette augmentation a également été corrélée à un pronostic défavorable voire au décès des patients⁴⁹⁻⁵¹, c'est également le cas lors d'endocardite infectieuse⁵². Cependant, d'autres études montrent un effet protecteur de cette sous-population de MV. Par exemple, lors du syndrome de détresse respiratoire aigu (SDRA) une augmentation du taux de NDMV est corrélée avec la survie des patients⁵³.

Les patients atteints de maladies auto-immunes voient également leur taux de NDMV augmenter, par exemple, lors des vascularites à ANCA, elles sont également reliées à la survenue d'événements thrombotiques chez ces patients⁴⁰.

Cette augmentation de la concentration de NDMV a également mesuré dans des désordres métaboliques, comme la formation de plaque d'athérosclérose où leur taux est corrélé au risque rupture de la plaque⁵⁴, mais aussi à la survenue de syndrome coronarien aigu ST+ et au décès chez des patients en état de choc cardiogénique⁵⁵. Lors d'hypercholestérolémie familiale, le taux de NDMV a été retrouvé comme élevé et également corrélé avec la mortalité⁵⁶. Enfin, concernant les pathologies pulmonaires telles que la broncho-pneumopathie chronique obstructive (BPCO) le taux de NDMV mesuré cette fois-ci dans le liquide broncho-alvéolaire (LBA) des patients est corrélé avec la gravité de l'atteinte respiratoire.

De ce fait, le dosage des NDMV a été proposé comme biomarqueur dans différentes pathologies, car elles permettent dans certaines d'entre elles une évaluation du pronostic et de la survenue de décès chez les patients.

Concernant l'utilisation des NDMV comme vecteur thérapeutique, deux équipes ont entamé des travaux proposant un nouveau système de délivrance de drogue utilisant les NDMV. La première propose la fabrication *ex vivo* de NDMV enrichie d'une molécule anti-inflammatoire qui entraîne une diminution de l'inflammation pulmonaire et d'un sepsis induit par lipopolysaccharide⁵⁷. La seconde équipe propose d'enrichir les NDMV par de la resolvine D2 pour l'inflammation induite dans un modèle d'accident vasculaire cérébral chez la souris⁵⁸.

Tableau 2 : Études cliniques mesurant les NDMV par cytométrie de flux

Légende : AnnV : annexine V ; BPCO : broncho-pneumopathie chronique obstructive ; LBA : liquide broncho-alvéolaire ; NA : non applicable ; NDMV : vésicules extracellulaires issues de polynucléaires neutrophiles ; NR : non renseigné ; PFP : plasma déplété en plaquettes ; SDRA : syndrome de détresse respiratoire aiguë.

Référence	Échantillon	Nombre de patients	Méthode de purification	Contrôle isotypique	Phénotype des MV	Conclusion de l'étude
Diamant et coll., Circulation 2002 ⁵⁹	PFP	16 Diabètes 18 Contrôles	Centrifugation	Oui	Plaquette : CD61 Lymphocyte B : CD20 Lymphocyte T : CD4, CD8 Monocyte : CD14 Endothéliale : CD34 Granulocyte : CD66e Érythrocyte : Glyco-A	Expression de facteur tissulaire sur les NDMV
Leroyer et coll, J Am Col Card 2007 ⁶⁰	Plaques d'athérosclérose PFP	26	Filtration + Centrifugation	Non	Lymphocyte : CD4 Plaquette : CD31 ; CD41 ; CD62P Neutrophile : CD66b Endothéliale : CD144 Érythrocyte : CD235a Monocyte : CD14 AnnV : Oui	Activité procoagulante des NDMV contenue dans les plaques d'athérosclérose plus importante que les NDMV plasmatiques
Porro et coll, Respiratory Research 2010 ⁶¹	Expectoration	28	Centrifugation	Oui	Leucocyte : CD11a Granulocyte : CD66b Monocyte/Macrophage : CD11b AnnV : Non	NDMV population prédominante parmi les VE dans les expectorations
Guervilly et coll., Crit Care 2011 ⁵³	PFP LBA	52 SDRA	/	Oui	Plaquette : CD41 Endothéliale : CD31+/CD41- Leucocyte : CD45 Neutrophile : CD66b+/CD11b+ AnnV : Non	NDMV dans le LBA prédictif de la survie des patients à J3
Sarlon-Bartoli et coll, JACC 2013 ⁵⁴	PFP	42	Centrifugation	Oui	Leucocyte : CD11b+/CD66b+ or CD15+ AnnV : No	NDMV prédictif de la rupture de plaque d'athérosclérose
Lehner et coll, Shock 2016 ⁵⁰	PFP	30 chocs septiques 18 volontaires sains	Centrifugation	Oui	Neutrophile : CD66b	Taux NDMV corrélé avec un pronostic défavorable des patients en choc septique
Sionis et coll, Int J of cardiology 2017 ⁵⁵	PFP	36 Choc cardiogénique 36 Contrôle	Centrifugation	Oui	Leucocyte : CD45 Neutrophile : CD15 Leucocyte activé : CD11b Granulocyte : CD66b CD15/CD66b + Lymphocyte : CD3 Monocyte : CD14 AnnV : Oui	NDMV ↑ chez les patients en choc cardiogénique, et prédiction des patients des patients développant un SCA ST+ et de la mortalité
Suades et coll., ATVB 2019 ⁵⁶	PFP	140 Hypercholestérolémies familiales	Centrifugation	Oui	Leucocyte : CD45 Neutrophile : CD15 Lymphocyte : CD3 Monocyte : CD14 Monocyte activé : CD14/CD11b Endothéliale : CD62E Érythrocyte : CD235a Plaquette : CD41a Plaquette activée : PAC1 ; CD62P ; TSP1 Tissue factor AnnV : Oui	NDMV ↑ chez patients avec une hypercholestérolémie familiale NDMV ↑ chez patients décédés

Référence	Échantillon	Nombre de patients	Méthode de purification	Contrôle isotypique	Phénotype des MV	Conclusion de l'étude
Guimaraes et coll, J of Infection 2019 ⁵²	PFP	57 endocardites	Centrifugation	NR	Leucocyte : CD45 Neutrophile : CD66b Monocyte : CD14 Endothéliale : CD51/61 Lymphocyte T : CD3 Erythrocytes : CD235a Plaquette : CD41a AnnV : Oui	Taux NDMV à l'admission prédictif de la mortalité des patients atteints d'une endocardite infectieuse
Soni et coll, Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol 2020 ⁶²	PFP LBA	62 patients avec BPCO sévère	Centrifugation	NR	Leucocyte : CD45 Neutrophile : CD66b/CD11b Monocyte : CD45/CD14 Macrophages alvéolaire : CD206/CD71 Plaquette : CD42b/CD31	Taux de NDMV dans le LBA chez les patients atteints de BPCO corrélé avec la sévérité de la pathologie

Malgré le nombre important de travaux étudiant les NDMV peu d'entre eux sont comparables en raison du nombre important de stimuli employés, de modes de concentration et de purification utilisés ou encore selon le mode de stockage des NDMV⁶³. Les travaux actuels montrent que les NDMV peuvent acquérir des propriétés diverses, avec des résultantes parfois opposées selon leur mode de formation.

La poursuite de l'étude de cette sous-population de MV est indispensable pour une meilleure compréhension de leur rôle dans les différentes pathologies dans lesquelles elles sont impliquées, mais également comme biomarqueur ou vecteur thérapeutique. L'utilisation comme biomarqueur des NDMV en milieu hospitalier nécessite une standardisation rigoureuse de leur méthode de caractérisation. La CMF étant l'une des méthodes les plus utilisées pour la caractérisation des MV, nous nous sommes intéressés à optimiser leur détection en améliorant la détection du signal fluorescent émit.

Le chapitre suivant traitera donc des différents outils disponibles permettant la purification et la concentration des NDMV.

Partie 2 Méthodes de purifications et de concentration des vésicules extracellulaires

L'une des premières étapes clefs de la phase préanalytique d'un échantillon de MV correspond à la concentration et la purification de celui-ci. Tout d'abord, la concentration de l'échantillon initial est une étape essentielle pour l'étude des MV en laboratoire de recherche, car la sensibilité des méthodes de détection (détaillées en Partie 3) ne permet pas, dans la plupart des cas, d'obtenir de signal lorsque l'échantillon de MV est analysé de façon brute. De plus, cette étape de concentration permettra une meilleure conservation des échantillons de MV congelés. Quant à la purification, elle occupe une part de plus en plus importante dans les études s'intéressant aux MV. En effet, la séparation des MV d'un échantillon à l'égard des protéines solubles est une étape primordiale pour que l'analyse de l'échantillon soit quasi exclusivement dépendante des MV qu'il contient et non pas d'une contamination par des éléments solubles. Beaucoup des premiers travaux s'intéressants aux MV ne prenaient pas en considération cette purification, notamment par manque de méthodes, en effet, très souvent seulement des étapes de centrifugations successives étaient utilisées. De nos jours, la pureté des échantillons de MV doit être objectivée comme le recommande le MISEV, par exemple, par méthode Western Blot en montrant l'absence dans l'échantillon purifié d'une protéine plasmatique comme l'albumine. Cette étape d'isolement des MV est importante, car les techniques utilisées à cette étape peuvent influencer les résultats de caractérisation de l'échantillon, en CMF¹ mais d'autant plus lors d'un ELISA ou de techniques dites « omics ».

De nos jours, de nombreuses méthodes de purifications des MV existent, mais toutes ne permettent pas d'obtenir le même degré de purification et le même niveau de concentration de l'échantillon (Tableau 3). C'est pour cette raison que certaines techniques sont plutôt dites de « concentration », comme la centrifugation différentielle qui permet seulement une faible purification de l'échantillon, même lorsque plusieurs séries de lavage sont effectuées ; alors que d'autres techniques sont dites de « purification », car elles permettent une véritable séparation entre les MV et les protéines solubles du milieu environnant. Actuellement, plusieurs équipes proposent donc de combiner une méthode de purification des MV à une méthode de concentration^{64,65}.

Dans les chapitres suivants, le principe, ainsi que les avantages et inconvénients des techniques de concentration et de purification des MV, les plus couramment utilisées, seront détaillées.

2.1 Centrifugation différentielle

La centrifugation différentielle est la méthode de concentration des MV la plus utilisée. Elle sépare les MV des autres composants de l'échantillon grâce à leur différence de ratio de sédimentation qui est directement impacté par la taille et la densité de l'élément⁶⁶. Plusieurs étapes de centrifugation pour séparer de façon séquentielle des différents composants du milieu contenant les MV sont nécessaires (Figure 7). Dans un premier temps une centrifugation à faible vitesse pour retirer les cellules résiduelles et débris cellulaire et grande taille, suivie d'une étape de centrifugation à vitesse plus importante pour retirer les corps apoptotiques.

Il n'existe pas de standardisation de la force de centrifugation à utiliser. L'ISEV définit les VE obtenues après une centrifugation comprise entre 10 000 et 20 000g comme des vésicules de grande taille (« large vesicles » ou MV) alors que l'utilisation d'une centrifugation à haute vitesse (> 100 000g) permet d'obtenir des vésicules de petites tailles ou « small vesicle ». Il a été montré que le rendement de cette méthode d'isolement des MV reposait sur plusieurs paramètres dont le type de rotor, la force de centrifugation et la durée de centrifugation⁶⁷.

Cette technique a pour avantage d'être peu coûteuse, l'utilisation de grand volume d'échantillon initial est possible et entraîne de peu de risque de contamination de l'échantillon. En revanche, l'utilisation de liquide visqueux (plasma) demande une étape de dilution préalable, et cette technique peut entraîner l'apparition d'agrégats ou de sédiment protéique, l'ultracentrifugation peut également altérer la fonction des MV et la purification des MV des protéines contenues dans le milieu initial est faible. De plus il est impossible de séparer les MV des exosomes par cette technique puisque les VE sont un continuum de taille de MV et d'exosomes.

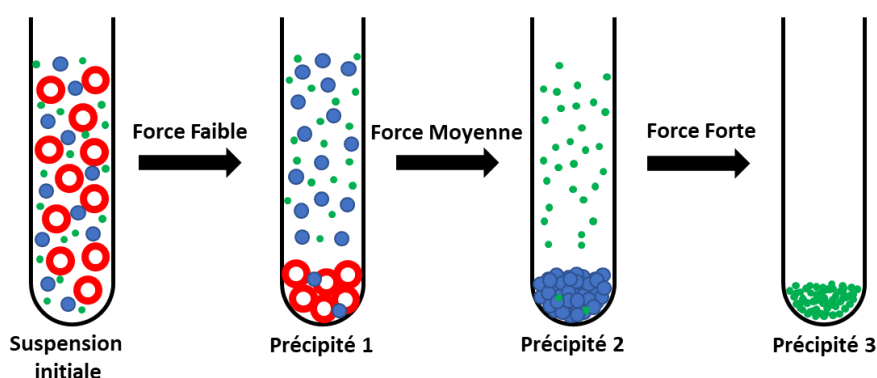


Figure 7 : Principe de la centrifugation différentielle

Plusieurs étapes de centrifugation sont appliquées à un échantillon avec des forces de centrifugation croissantes dans le but de culotter des éléments de taille décroissante.

2.2 Centrifugation avec gradient de densité

Cette méthode permet de séparer des MV des éléments contaminants d'un milieu, grâce au gradient de flottabilité de chaque constituant de l'échantillon, en utilisant un gradient discontinu de sucrose d'iodixanol par superposition de solutions avec des densités différentes (Figure 8). La colonne est ensuite centrifugée à grande vitesse (100 000g) durant 16 à 18 heures pour séparer les MV des autres composants. Cette technique permet contrairement à la centrifugation classique de séparer les MV des protéines solubles de l'environnement et préserve la morphologie des MV. Cette technique de séparation est davantage utilisée pour isoler des exosomes⁶⁸.

Cependant, cette technique ne permet pas de séparer les MV des lipoprotéines de haute densité (HDL) ce qui peut constituer un désavantage à l'utilisation de cette technique pour des échantillons plasmatiques.

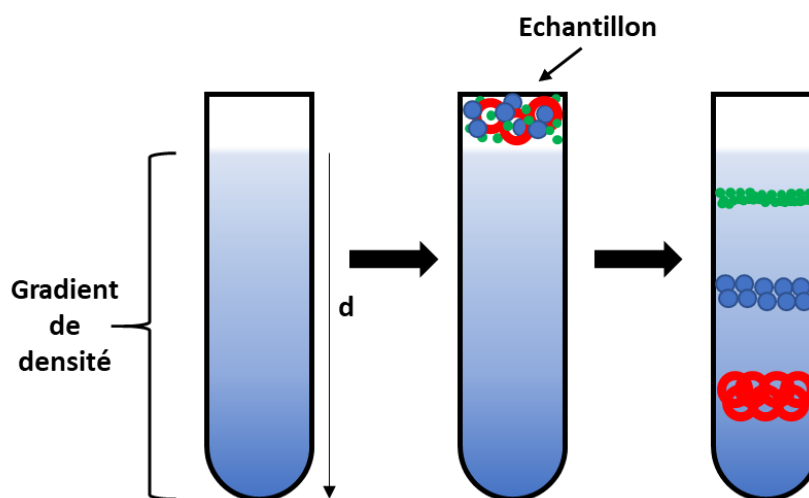


Figure 8 : Schématisation de la technique de centrifugation par gradient de densité

La densité du milieu est croissante en partant du haut du tube vers le bas, permettant de séparer les différents éléments constituant un échantillon en fonction de leur densité.

d : densité

2.3 Méthode purification par la taille

2.3.1 Chromatographie d'exclusion de taille

Cette technique sépare en fonction de la vitesse de déplacement des différents éléments dans une matrice contenant des billes poreuses^{69,70} (Figure 9). Ces pores peuvent avoir une taille variable et conditionnent donc la taille des MV récupérées à la fin de l'élution de l'échantillon dans la colonne de chromatographie. Les MV sont alors récupérés dans le tampon d'élution de la colonne de chromatographie, qui peut être modifié, séparer des autres éléments contenus dans l'échantillon initial (protéines, ions...). Cette méthode possède donc l'un des rendements de purification les plus élevés des MV vis-à-vis des protéines solubles.

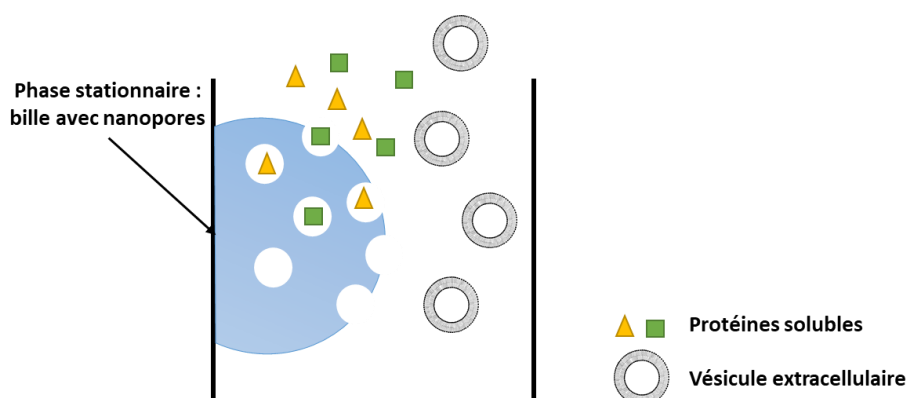


Figure 9 : Principe de la chromatographie d'exclusion de taille

Une colonne est remplie d'une phase stationnaire constituée de bille avec des nanopores ne pouvant laisser entrer des éléments de taille inférieure à environ 70 nm. Les MV les plus grandes seront donc éluées plus rapidement que les protéines solubles contenues dans l'échantillon initial. Cette technique permet donc la séparation entre les éléments solubles et les MV.

Lorsque des échantillons plasmatiques sont étudiés, une autre forme de contamination des MV peut persister après passage sur colonne de chromatographie, il s'agit des lipoprotéines plasmatiques. Une étude récente propose d'intégrer directement à la colonne de chromatographie une phase supplémentaire capturant les éléments possédant des charges positives, tels que les lipoprotéines⁷¹. Les MV possédant généralement à leur surface des charges négatives par la présence dans leur membrane de phospholipides anioniques, elles ne sont pas retenues dans cette phase de la colonne (Figure 10).

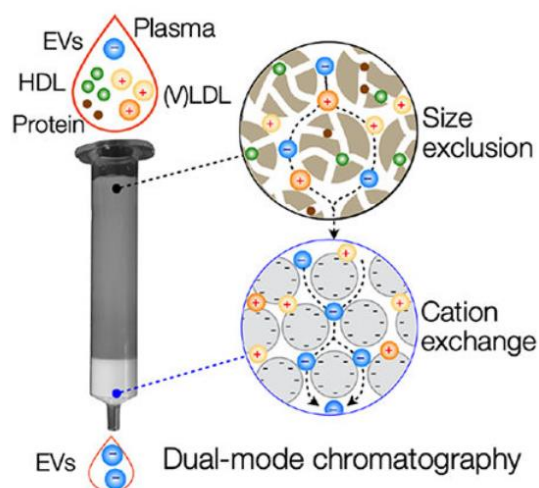


Figure 10 : Principe de la chromatographie associant deux techniques de séparation des vésicules extracellulaires.

Mais l'utilisation de grand volume d'échantillon est limitée pour cette technique. Il est alors nécessaire d'associer plusieurs techniques, la première permettant de concentrer l'échantillon (comme l'ultracentrifugation) et dans un second temps la purification de celui-ci par utilisation de la chromatographie d'exclusion de taille⁶⁵.

2.3.2 Filtration tangentielle

La filtration tangentielle ou ultrafiltration est souvent utilisée comme première étape de concentration d'échantillon avec un volume important⁷². Les filtres utilisés ont souvent une taille de tamis comprise entre 50 et 100kDa, permettant à la plupart des protéines contenues dans un échantillon plasmatique ou issues de culture cellulaire d'être éliminées après passage à travers le filtre (Figure 11). Cependant, les MV sont retenues dans le milieu initial et les experts considèrent cette technique comme ayant une faible efficacité de purification. De plus, les MV les plus larges vont avoir tendance à obstruer les pores de la membrane de filtration et endommager les MV à cause d'une pression fluide importante. Dans un but d'améliorer cette technique d'isolement des MV, une étude récente propose un système de filtration tangentielle cyclique qui inclut deux membranes connectées à une pompe péristaltique qui alimente un flux constant vers les membranes⁷³.

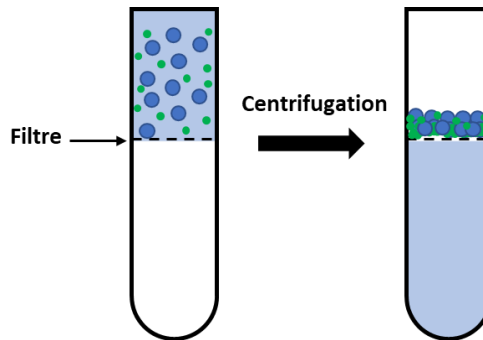


Figure 11 : Principe de l'ultrafiltration

Un filtre avec des pores de taille connue permet de séparer les éléments d'un échantillon selon leur taille. Cette technique permet essentiellement de concentrer l'échantillon en MV, mais pas de le purifier efficacement des protéines solubles.

2.4 Chromatographie par échange d'ion

Les MV portent des charges négatives à leur surface de par l'exposition de phospholipides négatifs tels que la PS ou la phosphatidyléthanolamine ou encore la présence de glycans qui vont pouvoir se lier à une matrice échangeuse d'ions chargée positivement⁷⁴.

2.5 Méthode de purification par précipitation

2.5.1 Précipitation avec polymères

L'utilisation de polymères avec des propriétés très hydrophile permet de faciliter la précipitation des MV à faible vitesse de centrifugation (<20000g), mais ne permet pas la séparation des MV et des protéines solubles de l'échantillon, la pureté est donc limitée^{75,76}. Pour limiter ce problème de pureté de l'échantillon final des kits commerciaux propose l'utilisation d'enzyme permettant de d'éliminer les protéines du plasma comme la protéinase K.

2.5.2 Précipitation par solvant organique protéique

Le solvant organique est attiré par les résidus de protéines animés chargés de manière opposée et favorise l'agrégation des protéines et des MV⁷⁷. La pureté obtenue par cette technique est faible.

2.6 Séparation immunologique

La séparation immunologique ou immunoaffinité est l'une des seules techniques permettant l'isolement de sous-populations de MV grâce à l'expression d'antigène spécifique. Brièvement, un échantillon préconcentré de MV est mis en contact avec des billes magnétiques recouvertes d'anticorps ciblant la protéine d'intérêt. Cela permet un retrait spécifique de ces MV exprimant le marqueur à leur surface. En fonction de l'objectif choisi, les expérimentateurs pourront dépléter toutes les MV en choisissant un marqueur générique (CD81, CD9 et CD63)⁷⁸, ou bien sélectionner une sous-population de MV en utilisant un marqueur spécifique de lignée. Par exemple, le choix de l'antigène CD15 permettra un isolement spécifique des NDMV⁷⁹. Cette technique permet donc d'obtenir des échantillons dont la pureté est excellente et très homogène (Figure 12).

L'inconvénient de cette méthode est qu'elle peut entraîner la perte de fonction de la protéine ciblée, son coût et les faibles volumes d'échantillons traitables.

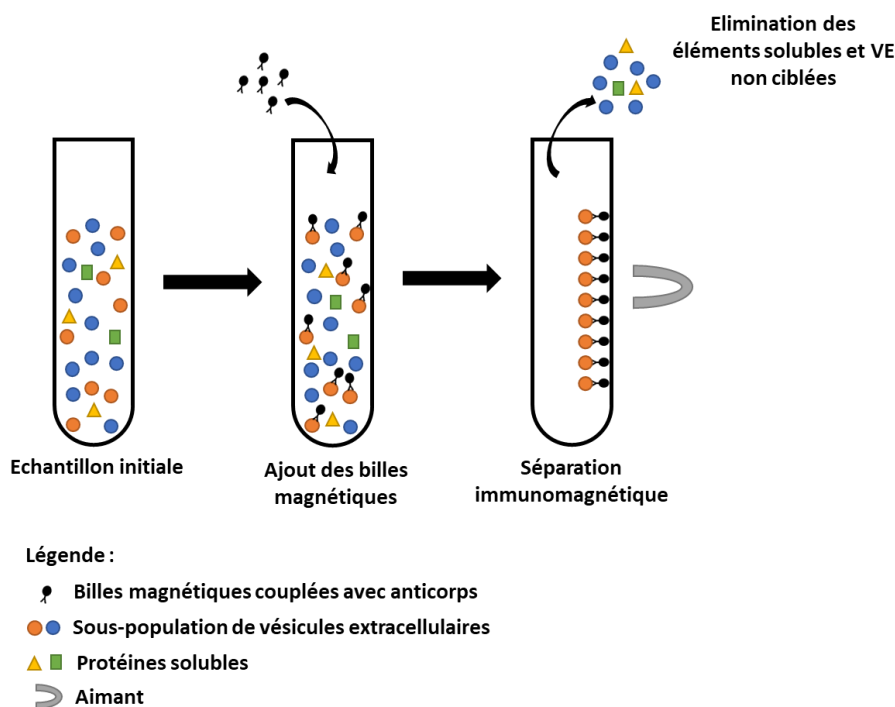


Figure 12 : Principe de la séparation immunomagnétique

Une sous-population de MV peut être isolée d'un environnement complexe constitué de protéines solubles et d'autres sous-populations de MV grâce à l'utilisation de la technique de séparation immunomagnétique. En effet, l'utilisation d'une bille magnétique couplée avec un anticorps monoclonal dirigé contre une protéine spécifique exprimée par la sous-population de MV d'intérêt permet de séparer celle-ci du reste de l'échantillon.

2.7 Système microfluidique : principe du déplacement latéral déterministe

Le déplacement latéral déterministe (ou deterministic lateral displacement (DLD) en anglais) est une méthode de microfluidique passive et n'ayant pas besoin de marquage préalable de l'échantillon. Cette séparation est effectuée dans un réseau de piliers disposés régulièrement pour orienter le trajet du fluide dans un canal microfluidique. La trajectoire des MV est déterminée par leur position par rapport aux différentes lignes de courant. Les particules ayant une taille supérieure par rapport au diamètre critique sont déviées le long des rangées de piliers tandis que les particules plus petites restent dans l'axe du canal (Figure 13).

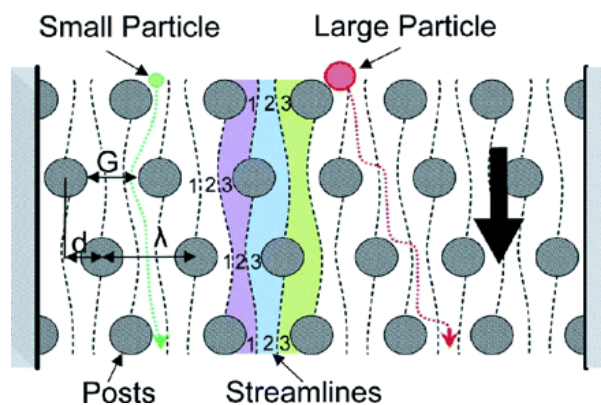


Figure 13 : Principe du déplacement latéral déterministe

Figure extraite de : John A. Davis et coll. PNAS 2003

Cette technique permet donc de séparer des éléments en fonction de leur taille. Mais d'autres mécanismes de séparation peuvent être obtenus par exemple grâce à l'ajout de billes recouvertes d'anticorps dans le système microfluidique. Il existe donc plusieurs méthodes utilisant le principe de la microfluidique permettant l'isolement des MV⁸⁰.

Tableau 3 : Résumé des principales méthodes de concentration et de purification des vésicules extracellulaires

	Principe	Avantages	Inconvénients	Concentration	Purification	Application aux NDMV
Centrifugation différentielle	Séquence de centrifugation de force concentration croissante pour séparer des éléments de taille décroissante	Rapide Coût	Peu applicable aux fluides visqueux	+	-	+ ^{37,81}
Centrifugation avec gradient de densité	Superposition de solutions avec des densités différentes, séparation des éléments par leur gradient de flottabilité	Rapide Séparation des exosomes	Chronophage	+	-	-
Chromatographie d'exclusion de taille	Séparation des éléments en fonction de leur taille, les VE étant éluées rapidement	Conservation de la structure des VE	Coût	-	+	+ ⁸²
Filtration	Membrane avec des pores de différentes tailles laissant passer les éléments les plus petits	Rapide	VE adhérentes à la membrane Déformation et dégâts sur les VE	+	-	+ ⁸³
Précipitation	Précipitation des VE grâce à différents composés puis centrifugation faible force	Isolement doux des exosomes	Contamination par éléments non vésiculaires (lipoprotéines)	+	-	-
Séparation Immunologique	Séparation en fonction de l'expression antigénique grâce à l'utilisation d'anticorps monoclonaux	Etude de sous-population	Non applicable aux grands volumes	+	+	+ ⁷⁹
Echange d'ion	Séparation grâce aux charges négatives portées par les VE	Haute purification	Absence de séparation de sous-population	-	+	-
Microfluidiques	Séparation dans des circuits miniatures par différentes méthodes	Très petits volumes d'échantillon	Expertise requise	-	+	-

En conclusion, il existe un grand nombre d'autres techniques de concentration et de purification des MV, telles que les systèmes de microfluidiques, nanostructure filtration... Ce nombre continue de croître en parallèle des avancées technologiques⁸⁴.

Après l'obtention d'un échantillon vésiculaire concentré et/ou purifié en fonction des techniques utilisées, il est nécessaire de le caractériser en concentration, en taille d'éléments, phénotypiquement ou encore en termes d'activité. Plusieurs méthodes existent pour cette caractérisation, les plus couramment utilisées vont être détaillées dans la partie suivante.

Partie 3 Les Méthodes de Détection des Vésicules extracellulaires

Après l'obtention d'une suspension de MV, l'étape suivante est leur caractérisation. Il est possible de caractériser les MV d'un échantillon biologique sans étape de purification ou de concentration. Ceci est réalisable lors que l'on désire quantifier les différentes sous-populations circulantes de MV par CMF par exemple. Il existe de nombreuses méthodes permettant de connaître la taille des MV isolées ou bien de connaître leur expression antigénique de surface ou intramembranaire (Tableau 4). Une des méthodes les plus utilisées pour la caractérisation de ces MV est la CMF.

Tableau 4 : Résumé des principales techniques d'étude des MV

	Méthodes	Quantification	Phénotypage	Taille	Limites	Applications aux NDMV
Analyse individuelle MV	Cytométrie en flux	+	+	Limité	Agrégats, diamètre < 200nm	+ (Tableau 2)
	Analyse individuelle de particules	+	-	+	Artefacts (débris cellulaires et protéines)	+ ^{81,85}
	Impédance	+	-	+	Artefacts (débris cellulaires, lipides et protéines)	+ ²⁵
	Microscopie électronique	Limité	Limité	+	Artefacts pendant la préparation de l'échantillon	+ ⁶³
	Microscopie de force atomique	Limité	Limité	+	Artefacts (débris cellulaires et protéines)	-
Population de MV	ELISA	+	+	-	Accessibilité des molécules portées par les MV	+ ⁸⁶
	Tests fonctionnels	+	+	-	Accessibilité des molécules portées par les MV	+ ^{79,87}
	Spectrométrie de masse	-	+	-	Échantillon > 10µg	+ ⁸⁸

3.1 Cytométrie en flux

3.1.1 Développement historique

Initialement, la CMF est née du besoin d'automatisation du comptage des cellules sanguines circulantes. Les origines de la CMF débutent en 1934 avec Moldavan qui a conçu le premier appareil avec lequel il énumérait les cellules en les faisant défiler dans un fin capillaire où elles étaient vues par un capteur photo-électrique. L'utilisation d'un anticorps couplé à une molécule fluorescente (fluorochrome) date de 1941, pour détecter des pneumocoques. Puis en 1945, W Coulter a mis au point un appareil permettant de compter des cellules et de mesurer leur taille par variation de résistivité du courant liquidien. C'est en 1953 que Crosland-Taylor utilise pour la première fois un système d'injection de l'échantillon dans un flux laminaire (système décrit par Reynolds en 1833). L'utilisation d'un laser comme source lumineuse n'est apparue qu'en 1969 par Dan villa, car il permet une meilleure focalisation du faisceau, une grande puissance d'excitation et une stabilité du chromatisme. Dans les années 70, les chercheurs de Los Alamos et de Stanford associaient des méthodes de mesure individuelle du volume ou de la fluorescence de cellules entraînées par un flux avec des méthodes électrostatiques permettant le tri cellulaire dans des conditions vitales. La diffusion de la lumière compléta rapidement la liste des propriétés capables de discriminer plusieurs types cellulaires. Dans les années 80 seulement 3 paramètres de fluorescences étaient analysables par cellule, aujourd'hui il est possible d'en acquérir 21 pour les cytomètres les plus performants.

De nos jours les cytomètres continuent d'évoluer pour permettre l'acquisition de nouvelles données. Par exemple, certains cytomètres proposent de prendre une photographie de chaque élément passant devant le détecteur, il est également possible de trier une ou plusieurs sous-populations de cellules sélectionnées selon un phénotype particulier et celles-ci pourront être utilisées pour les tests *in vitro* ou encore être mises en culture.

3.1.2 Principes généraux de la cytométrie en flux

La CMF est basée sur l'analyse de signaux optiques ou physiques émis par une particule coupant le faisceau lumineux d'un laser. Pour fonctionner, un cytomètre en flux nécessite une combinaison de plusieurs systèmes (Figure 14) :

- Fluidique : pour introduire et canaliser les cellules
- Optique : une source d'excitation et de récupération des signaux
- Électronique : pour convertir les signaux optiques en des signaux électroniques proportionnels et les numériser pour les analyser avec un ordinateur

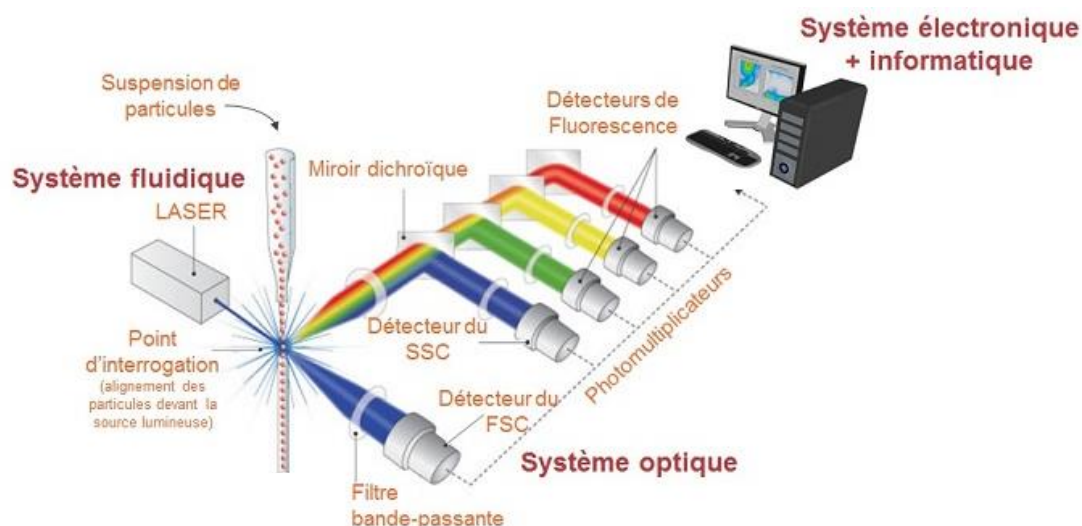


Figure 14 : Principe de fonctionnement d'un cytomètre de flux

Schématisation des principaux composants d'un cytomètre de flux : système fluidique, optique et électronique.

Tout d'abord, les cellules ou autres éléments (MV, virus, bactéries...) doivent être mis en suspension pour pouvoir être analysés. Les éléments sont ensuite amenés au centre de la buse de façon à les aligner les uns derrière les autres afin d'être excités un par un avec le faisceau lumineux. Le liquide de gaine subit une accélération progressive ce qui entraîne un étirement du liquide échantillon et ainsi aligne les éléments au centre du jet. L'utilisation d'un laser comme faisceau lumineux présente de nombreux avantages : puissance, stabilité, finesse du faisceau. Puis les différents signaux optiques émis par l'élément doivent être focalisés, séparés, puis acheminés vers des systèmes de détection, les photodétecteurs. Ils sont pour cela, sélectionnés par différents circuits optiques, composés d'une alternance de miroirs et de filtres. La lumière diffusée renseigne sur la morphologie et la structure de la cellule. En effet, si la diffusion de la lumière est mesurée dans l'axe du rayon incident, l'intensité du signal peut être corrélée avec la taille de la cellule alors que sous un angle de 90° , la mesure correspond à la structure intracellulaire de la cellule. La préincubation des échantillons avec des anticorps couplés à un fluorochrome ciblant des antigènes spécifiques permet de distinguer, en fonction de l'expression antigénique, différentes sous-populations constituant l'échantillon. Enfin, les signaux optiques sont convertis en signaux électriques par des photomultiplicateurs.

3.1.2.1 *Chambre d'analyse*

La chambre d'analyse, ou chambre de flux est située au cœur du système instrumental et a pour objectif de délivrer un flux à cellule unique à l'endroit de mesure, c'est-à-dire où l'élément rencontre la source lumineuse. Pour rendre cela possible, il est nécessaire de concentrer les éléments à analyser au centre d'un flux étroit grâce à un liquide de gaine. Le débit du liquide de gaine détermine la vitesse à laquelle les éléments passent devant la source lumineuse. Le contrôle du débit est un paramètre important pour éviter le passage de deux éléments ou plus de façon simultanée devant la source lumineuse créant ainsi des événements de coïncidence pour compromettent l'analyse cellule à cellule de l'échantillon (Figure 15).

Une technique alternative existe à l'utilisation d'un liquide vecteur, elle utilise la focalisation acoustique.

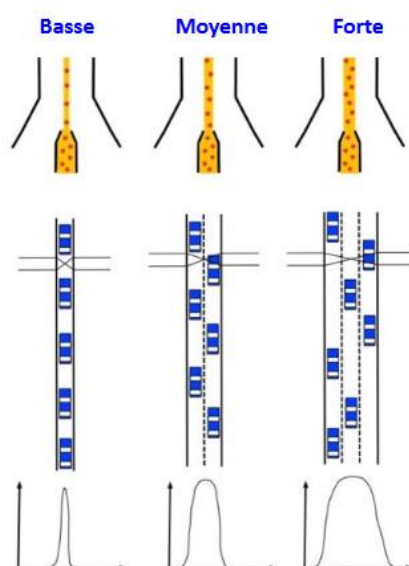


Figure 15 : Impact du débit du liquide de gaine sur l'analyse d'un échantillon

3.1.2.2 *La source lumineuse*

La source lumineuse peut être un laser, mais également une lampe à arc ou encore des diodes électroluminescentes. Les lampes à arc sont des sources lumineuses brillantes et puissantes et émettant à des longueurs d'ondes multiples, mais ceci peuvent constituer un vrai désavantage pour l'excitation spécifique d'un fluorochrome. C'est pour cette raison que les lasers sont largement répandus comme source lumineuse dans les cytomètres de flux. Ils sont une source brillante et cohérente (faisceau constitué de photons ayant les mêmes caractéristiques), avec une longueur d'onde étroite (monochromatique), et directive c'est-à-dire qu'elle possède un angle d'ouverture très faible (rectiligne) et se propage dans une seule direction.

3.1.2.3 Paramètres optiques obtenus

La CMF est une technique multiparamétrique, ceci est possible grâce à l'analyse de la lumière diffractée et transmise dans différentes directions après la rencontre entre l'élément à analyser et le faisceau lumineux. Nous pouvons distinguer les paramètres optiques intrinsèques correspondant à une simple diffusion de lumière, des paramètres optiques induits obtenus grâce à l'incubation préalable des cellules à analyser avec des sondes fluorescentes.

3.1.2.3.1 Paramètres optiques intrinsèques : Diffusion lumineuse

La lumière diffusée est analysée selon deux angles. Tout d'abord, un petit angle de 1 à 9° permettant l'obtention du paramètre « Forward Scatter » ou FSC, ce paramètre est corrélé à la taille de l'élément. Mais également un angle à 90° permettant d'obtenir des informations relatives à la granulosité des éléments passés devant la source lumineuse, ce paramètre est appelé « Side Scatter » ou SSC.

Comme illustré par la figure n°13, ces deux paramètres FSC et SSC permettent à eux seuls de distinguer les 3 sous-populations de leucocytes circulants : polynucléaires, monocytes et lymphocytes (Figure 16). Cependant la distinction de sous-populations lymphocytaires circulantes, comme les lymphocytes B, T ou NK, ne peut être obtenue par ces deux paramètres. Ceci est rendu possible par l'utilisation de sonde fluorescente spécifique.

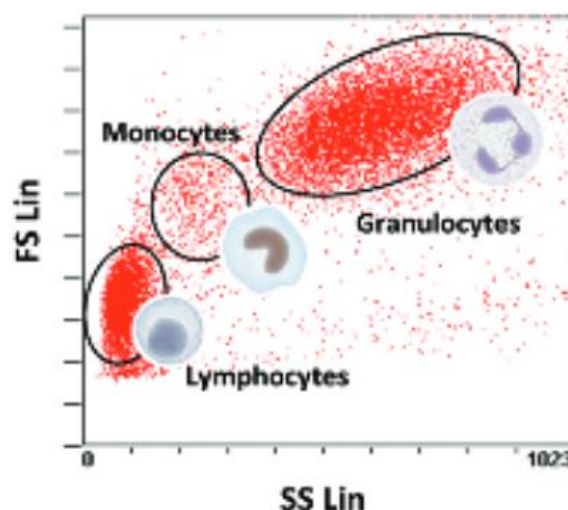


Figure 16 : Séparation des 3 sous-populations de leucocytes circulants par les paramètres de diffractions de la lumière : SSC et FSC

3.1.2.3.2 Paramètre optique induit : La fluorescence

Dans le but d'obtenir des données supplémentaires correspondant à l'expression antigénique membranaire des différents éléments de la suspension analysée, il est nécessaire d'utiliser des sondes fluorescentes spécifiques.

Ces sondes sont souvent des anticorps monoclonaux reconnaissant un épitope spécifique d'une lignée cellulaire. Ces sondes sont couplées à des fluorochromes ou fluorophores. Les fluorochromes sont des substances chimiques capables d'émettre de la lumière fluorescente après excitation. Elles sont composées de plusieurs noyaux aromatiques conjugués ou encore de molécules planes et cycliques qui possèdent une ou plusieurs liaisons π . Le fluorochrome absorbe l'énergie du laser puis réémet l'énergie absorbée dans un premier temps par vibration et dissipation de chaleur puis par émission de photons d'une longueur d'onde plus élevée (Figure 17A). Les fluorochromes sont caractérisés par plusieurs paramètres dont leur déplacement de Stokes correspondant à la différence entre les maxima d'excitation et d'émission, la détection d'une espèce fluorescente est d'autant plus facile que ce déplacement est important (Figure 17B).

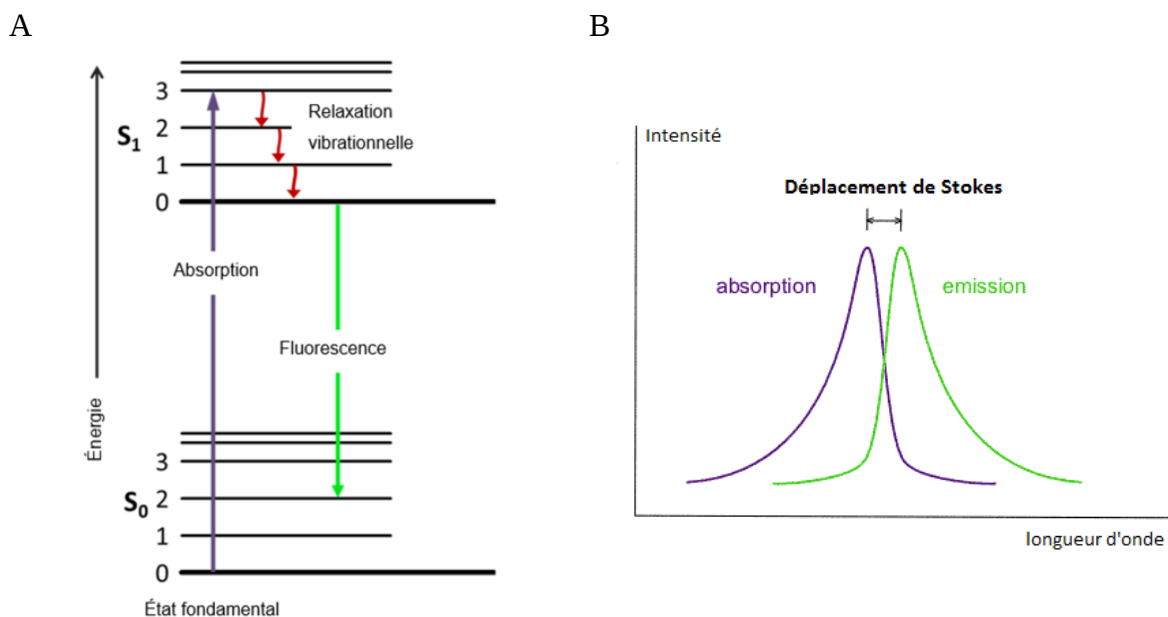


Figure 17 : Principe de la détection de fluorescence

(A) : l'électron excité par absorption d'un photon est instable, afin de retourner dans un état stable, il perd de l'énergie en émettant un photon ayant une longueur d'onde plus grande (car l'énergie est plus faible)

(B) : Schématisation du déplacement de Stokes correspondant à la différence entre les maxima d'émission et d'absorption

Un autre paramètre important est le rendement quantique, calculé par le rapport entre le nombre de photons émis sur le nombre de photons absorbés par molécule. Ce paramètre est proportionnel à la brillance du fluorochrome (Figure 18).

	Fluorochrome			
	Very Bright	Bright	Moderate	Dim
Laser				
Ultraviolet (355 nm)		BD Horizon™ BUV563 BD Horizon™ BUV661 BD Horizon™ BUV737	BD Horizon™ BUV395 BD Horizon™ BUV496	BD Horizon™ BUV805
Violet (405 nm)	BD Horizon™ BV421 BD Horizon™ BV650 BD Horizon™ BV711	BD Horizon™ BV480 BD Horizon™ BV605 BD Horizon™ BV786	BD Horizon™ BV510	BD Horizon™ V450 BD Horizon™ V500
Blue (488 nm)	BD Horizon™ BB515 BD Horizon™ BB700 BD Horizon™ PE-CF594 PE-Cy™5	PE PE-Cy™7	FITC Alexa Fluor® 488 PerCP-Cy™5.5	PerCP
Yellow/Green (561 nm)	PE BD Horizon™ PE-CF594 PE-Cy5 PE-Cy7			
Red (640 nm)		APC Alexa Fluor® 647 BD Horizon™ APC-R700		Alexa Fluor® 700 APC-H7 APC-Cy7

Figure 18 : Classification des principaux fluorochromes en fonction de leur brillance

L'augmentation du nombre de lasers dans un cytomètre associé à la complexification des systèmes optiques permettant de trier les photons émis ont permis d'augmenter le nombre de paramètres analysable par événement détecté.

L'obstacle majeur dans les analyses multiparamétriques est constitué par le chevauchement important des spectres d'émission des fluorochromes employés pour révéler les anticorps, comme illustré par la figure n°19 pour les spectres d'émission des fluorochromes phycoérythrine (PE) et isothiocyanate de fluorescéine (FITC). Pour annuler ce phénomène, il est nécessaire d'employer des compensations électroniques de fluorescence afin de soustraire la superposition des deux signaux de fluorescence.

De plus, l'introduction de plusieurs lasers a permis de vaincre une telle interférence en rendant possible l'excitation de plusieurs fluorochromes à spectres d'excitation et d'émission bien distincts.

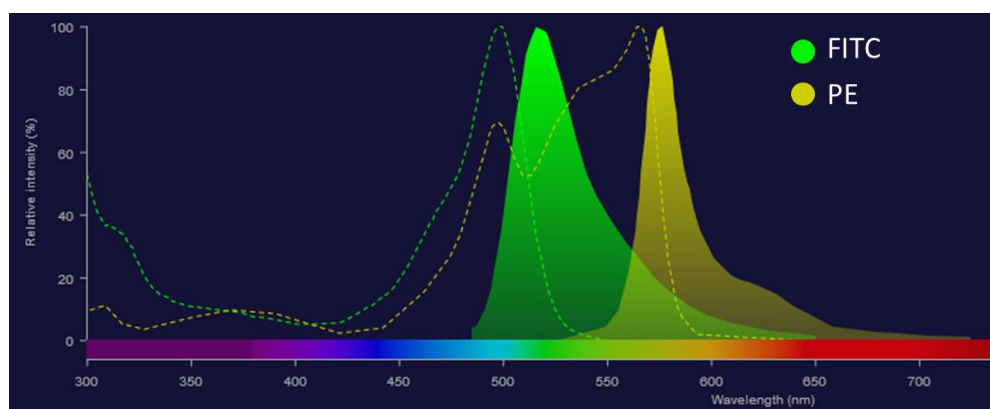
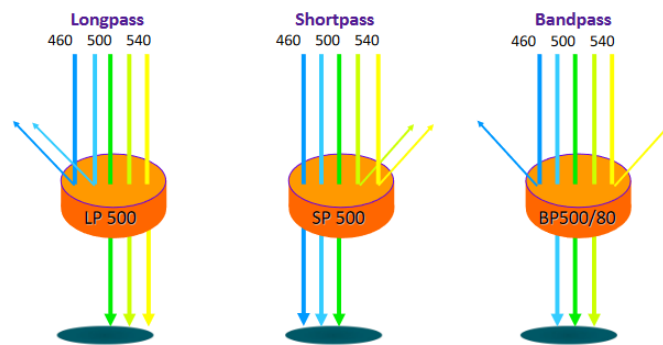


Figure 19 : Exemple de chevauchement des spectres d'émission des fluorochromes FITC et PE

3.1.2.4 Système optique

Les différents signaux optiques émis par l'événement doivent être focalisés, séparés puis acheminés vers des systèmes de détection. Ils sont pour cela sélectionnés par différents circuits optiques, composés d'une alternance de miroirs et de filtres. Un miroir est une surface réfléchissante contrairement au filtre. Suivant le traitement de sa surface, on peut obtenir 3 types de miroirs : « Passe-haut » ne laissant passer que la lumière au-dessus d'une certaine fréquence d'onde, « Passe-bas » ne laissant passer que la lumière au-dessous d'une certaine fréquence d'onde et les « Passe-bande » ne laissant passer qu'une bande ou intervalle de fréquences compris entre une fréquence basse et une fréquence haute (Figure 20). De plus, les longueurs d'onde réfléchies varient aussi avec l'angle formé par le rayon incident et la surface du filtre. Si les longueurs d'onde non réfléchies sont transmises, on obtient ainsi des miroirs dichroïques. Pour les filtres, on retrouve en transmission les mêmes courbes que pour les miroirs, par contre les longueurs d'onde non transmises ne sont pas réfléchies. Elles sont soit absorbées, soit détruites.

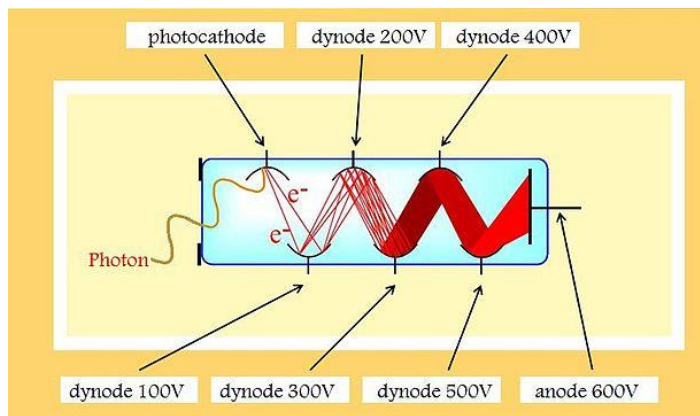


**Figure 20 : Différents types de miroirs utilisables dans le système optique
d'un cytomètre de flux**

3.1.2.5 Conversion des photons en électrons : Photodétecteurs

Les photons qui ont traversé le système optique doivent être convertis en un signal électronique afin de permettre l'acquisition et l'analyse de données. Ceci est réalisé grâce à des photodétecteurs. Il en existe de deux types : photomultiplicateurs (Figure 21A) et photodiodes (Figure 21B).

A



B

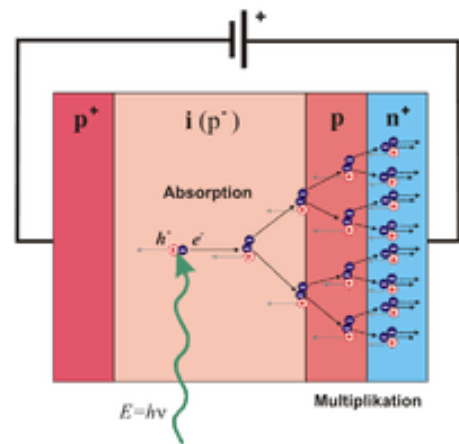


Figure 21 : Schématisation des deux types de photodétecteurs

(A) : Photomultiplicateur

(B) : Photodiode à avalanche

Les photomultiplicateurs se présentent sous la forme d'un tube électronique. Sous l'action de la lumière (des photons émis par les fluorochromes), des électrons sont arrachés d'un métal par effet photoélectrique à une photocathode, le faible courant électrique ainsi généré est amplifié par une série de dynodes utilisant le phénomène d'émission secondaire pour obtenir un gain important. Ce détecteur permet de compter les photons individuellement et est sensible de l'ultraviolet à l'infrarouge proche.

Une photodiode est un semiconducteur formé une jonction P-N photoréceptrice généralement non amplificatrice. Dans cette configuration il y a apparition de 3 zones : une zone de charge d'espace et 2 régions neutres (N et P). Lorsque les photons pénètrent dans le semiconducteur (avec une énergie suffisante), ils créent des photoporteurs. Ces photoporteurs sont constitués d'une paire « électron-trou ». Chaque paire créée se traduit par la circulation d'une charge élémentaire. On observe ainsi une augmentation du courant. Récemment, les photodiodes ont été améliorées dans le but d'engendrer un signal électrique plus important pour un seul photon détecté. Ce système est appelé photodiodes à avalanche. Elles se distinguent des photodiodes classiques par le fait que les photons entrants déclenchent en interne une avalanche de charges. En effet, les porteurs de charge libérés par la lumière sont accélérés par le champ électrique de telle sorte qu'ils produisent d'autres paires électron-trou par ionisation d'impact. L'utilisation de ces photodétecteurs en CMF (notamment dans le cytomètre CytoFLEX de Beckman Coulter) à permet d'augmenter l'efficacité quantique (QE) notamment pour les longueurs d'onde supérieures à 800 nm (Figure 22). L'efficacité quantique est le rapport entre

le nombre de charges électroniques collectées et le nombre de photons incidents sur une surface photoréactive (correspondant aux photodétecteurs). Plus l'efficacité quantique est importante plus la détection de photon est sensible. Ce paramètre est donc intéressant à mesurer et permet d'évaluer les performances un cytomètre le flux.

Le signal électrique ainsi transformé en un signal électrique il va pouvoir à son tour devenir un signal analogique grâce à un logiciel appelé convertisseur analogique digital.

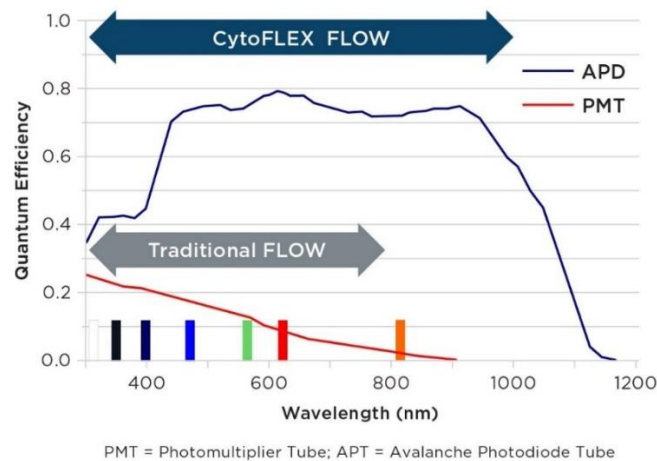


Figure 22 : Comparaison des performances des photodétecteurs
en fonction de la longueur d'onde des photons incidents

3.1.2.6 Conversion des électrons en signal analytique

L'ordinateur ne peut traiter ces données que si elles sont sous forme binaire (signal digital). Le rôle du convertisseur analogique digital est de convertir, comme son nom l'indique, un signal analogique (valeur continue) en signal digital (valeur discontinue) assimilable par l'ordinateur. C'est-à-dire de transformer une valeur comprise entre 0 et 10 volts en une valeur binaire. La digitalisation du signal est effectuée par des logiciels d'analyse spécifiques de plus en plus complexes et performants qui doivent permettre l'analyse rapide d'un grand nombre de données afin de pouvoir interpréter les résultats obtenus.

Le passage des particules devant la source lumineuse au sein de la chambre analytique dure moins de 10µs, durant ce temps les photodétecteurs fournissent un bref courant électronique convertit en voltage par des amplificateurs. Le signal donné par une particule est représenté sous la forme d'une courbe gaussienne constituant le signal analogique. Ce signal est caractérisé par la hauteur de pic ou amplitude nommé « H » pour Height ou « P » pour Peak, l'aire ou surface sous la courbe nommée « A » pour area ou « I » pour intégrale, et la largeur de pic nommée « W » pour Width ou « TOF » pour Time Of Flight (Figure 23).

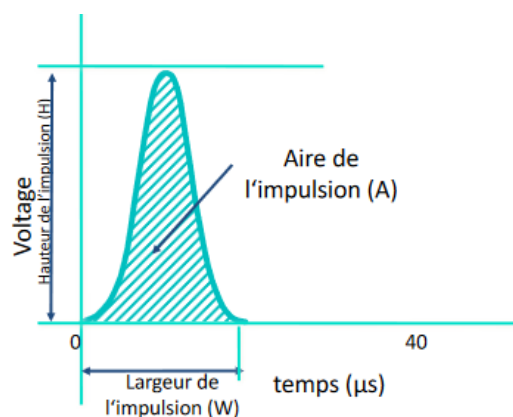


Figure 23 : Paramètres exploitables du signal analogique déclenché par un événement

Trois paramètres extraits du signal analogique : la hauteur (H) et la largeur de l'impulsion (W) ainsi que l'aire sous la courbe (A).

La durée du signal dépend du temps d'exposition de la particule au laser et le signal varie durant le passage, car la particule n'est pas exposée de la même façon au laser en début, milieu et fin de course. En effet chaque cellule émet un flash de lumière dont l'amplitude maximale est atteinte au centre du laser. On comprend alors que l'émission ou la diffraction lumineuse diffère durant la course de la particule au sein de la chambre analytique.

La CMF est donc un système complexe qui permet l'analyse rapide d'un grand nombre d'événement dans un temps cours. De plus cette analyse est multiparamétrique, c'est-à-dire que plusieurs informations sont obtenues simultanément pour un même élément. Ces caractéristiques ont fait de la CMF l'une des méthodes les plus utilisées pour la détection, la quantification et la caractérisation des MV. Dans le chapitre suivant les spécificités liées à l'analyse des MV par CMF vont être détaillées.

3.1.3 Analyse des MV par cytométrie en flux

La CMF est la méthode de référence utilisée pour la détection des MV. Elle permet l'analyse des MV une à une et ainsi l'étude de sous-population de MV. Une analyse multiparamétrique est possible et augmente la spécificité de l'analyse. Cette technique rend possible la quantification des MV d'un échantillon. Tout cela est possible pour un grand nombre d'événements (milliers) dans un temps très court, de l'ordre de la minute.

Mais elle possède des limites technologiques, détaillées plus loin, elles sont liées à la petite taille des MV à analyser, à leur faible index de réfraction et la faible densité antigénique des protéines présentes à leur surface.

Actuellement, il existe un effort important à l'échelle internationale d'amélioration de la qualité d'analyse des MV par CMF. À ce titre, de nombreuses publications existent, mais récemment l'ISEV a publié les informations minimales à utiliser pour la détection des MV par CMF (MI-FlowCyt-EV)⁸⁹. Ces recommandations vont des paramètres préanalytiques à respecter jusqu'au partage des données obtenues (Figure 24).

MIFlowCyt-EV Reporting Framework		
Category	Components	Objective
1 Preanalytical variables & experimental design	1.1. Report preanalytical variables conforming to MISEV guidelines* 1.2. Report experimental design according to MIFlowCyt guidelines*	Reproducibility
2 Sample preparation	2.1. Sample staining* 2.2. Sample washing steps* 2.3. Sample dilution*	Reproducibility
3 Assay controls	3.1. Buffer-only* 3.2. Buffer with reagents* 3.3. Unstained controls* 3.4. Isotype controls** 3.5. Single-stained controls* 3.6. Procedural controls** 3.7. Serial dilution* 3.8. Detergent-treated EV samples	Proof of single vesicle detection
4 Instrument calibration & data acquisition	4.1. Trigger channel(s) and threshold(s)* 4.2. Flow rate & volumetric quantification ($\mu\text{L min}^{-1} / \mu\text{L}$)* 4.3. Fluorescence Calibration (MESF/ERF units)* 4.4. Light Scatter Calibration (nm^2)	Standardization
5 EV characterization	5.1. EV diameter/surface area/volume approximation 5.2. EV refractive index approximation 5.3. Epitope number approximation	Advanced standardization
6 FC data reporting	6.1. Complete MIFlowCyt checklist* 6.2. Calibrated channel detection range 6.3. EV number concentration 6.4. EV brightness	Reproducibility
7 FC data sharing	7.1. Share data to public repository	Reproducibility

Figure 24 : Ensemble des éléments aborder par le MIFlowCyt EV

Extrait de Welsh et coll., JVE 2020

Le MIFlowCyt-EV a été conçu pour aider les chercheurs à produire des données robustes et de qualité afin que celle-ci soit reproductible. Ces recommandations seront bien sûr actualisées au fur et à mesure des avancées technologiques et scientifiques dans le domaine des MV.

Concernant l'analyse des MV par CMF nous allons détailler dans les paragraphes suivants les stratégies d'analyses existantes, les limites de l'analyse des MV par CMF ainsi que l'effort de standardisation de cette technique et les outils actuellement disponibles permettant de les détecter en fluorescence.

3.1.3.1 Stratégies d'analyse

La stratégie d'analyse contribue à l'amélioration de la détection des MV par CMF en plus des évolutions technologiques précédemment évoquées par les industriels pour proposer des cytomètres de flux fluo-sensible mieux adaptés à l'étude des MV (Cf. Paragraphe 3.1.3). Cette stratégie d'analyse comprend deux paramètres : le seuillage (ou paramètre de déclenchement) et le « gating ». Le choix du paramètre de déclenchement peut être basé une donnée de diffraction (FSC ou SSC) et/ou de fluorescence.

3.1.3.1.1 Déclenchement par la diffraction lumineuse

Les MV ont la capacité de diffracter la lumière ce qui permet leur détection par les paramètres FSC ou SSC. Dans cette stratégie le seuil de détection des événements sur un paramètre scatter est fixé par l'expérimentateur, et dans un second temps les paramètres de fluorescence pourront être étudiés sur la fenêtre d'analyse établie par le seuillage du paramètre de diffraction.

Le recueil des données de diffraction pour des éléments de petite taille comme les MV nécessite d'intégrer plusieurs paramètres dont : leur diamètre, l'indice de réfraction et la dispersion de la lumière. En effet, la quantité de lumière diffusée par toute particule est directement proportionnelle au diamètre de la particule et inversement proportionnelle à la longueur d'onde de la lumière utilisée pour la détecter.

Il faut alors distinguer deux cas de figure (Figure 25). Le premier lorsque le diamètre de l'événement est supérieur à la longueur d'onde d'illumination. Dans ce cas la « théorie de Mie » est applicable. Cette théorie, publiée en 1908 et appliquée aux MV en 2012, nous informe que la lumière sera préférentiellement diffractée vers l'avant, alors le paramètre FSC semble l'outil de choix. Le deuxième cas correspond aux MV ayant un diamètre plus petit que la longueur d'excitation du laser (correspondant aux plus petites MV), ici, la « théorie des Mie » ne peut plus être appliquée. Dans ce cas, ce sera le modèle de Rayleigh qu'il faudra prendre en compte. Celui-ci nous indique que la lumière sera plus préférentiellement diffractée vers l'avant, mais diffusée dans toutes les directions, c'est-à-dire isotropique. Le paramètre SSC sera alors préféré comme paramètre de déclenchement.

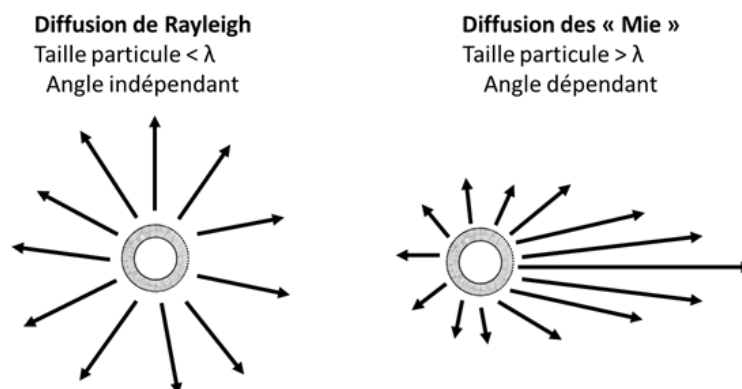


Figure 25 : Schématisation de la diffraction de la lumière en fonction des modèles de Rayleigh et de la théorie des « Mie »

En conclusion, pour l'analyse des MV par CMF il faudra donc préférer un cytomètre de flux optimisé en SSC comme l'est le CytoFLEX.

Le cytomètre en flux Gallios (Beckman Coulter), optimisé en FSC, a montré qu'il était capable à distinguer des particules de tailles inférieures à la longueur d'onde du laser de façon précise et robuste grâce à l'utilisation de son paramètre W2 (wide angle). Ce paramètre FSC modifié correspond à une augmentation de l'angle de capture des données de diffraction de la lumière (Figure 26) et ainsi d'avoir une meilleure résolution entre des événements de petite taille.

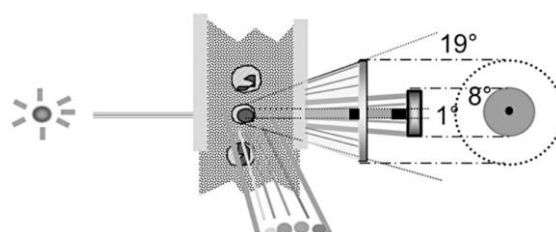


Figure 26 : Schématisation du paramètre W2 du cytomètre Gallios

Extrait du poster Poncelet et coll., Transfusion and Apheresis Science 2015

3.1.3.1.2 Déclenchement par une donnée de fluorescence

La deuxième stratégie possible est utilisation d'un paramètre de fluorescence comme paramètre de déclenchement des événements. Les MV n'étant pas physiologiquement fluorescentes il est indispensable d'utiliser un marqueur exogène, comme un anticorps monoclonal ou une protéine fluorescente. Cependant, l'existence d'un marqueur présent sur toutes les MV en quantité suffisante pour être détectée par CMF est encore débattue, même l'utilisation du marquage Annexine V est remise en cause⁹⁰. Cette problématique limite alors l'utilisation de cette stratégie de déclenchement, mais celle-ci peut montrer un intérêt lorsqu'elle est associée en amont à un seuillage par un paramètre de diffraction.

3.1.3.1.3 Comparaison des stratégies

Plusieurs équipes se sont intéressées à comparer les différentes méthodes de détection des MV, déclenchement par diffraction lumineuse ou par une donnée de fluorescence. Les résultats montrent que la détection par déclenchement fluorescent entraîne une augmentation du nombre de MV enregistrées au cours de l'analyse. En effet, lorsque Arraud et coll. comparent le déclenchement par marquage des MV par l'Annexine V et par le FSC, ils retrouvent environ 40 fois plus de MV⁹¹. De plus, cette méthode de détection permet d'analyser des événements de taille inférieure, environ 100nm alors que le seuil est plutôt de 200nm lorsqu'un paramètre de diffraction est utilisé sur des cytomètres classiques. Mais ce seuil de détection par un paramètre de diffraction lumineuse a pu être abaissé grâce au développement d'une nouvelle génération de cytomètre de flux comme le NanoFCM^{92,93}. L'utilisation d'un déclencheur fluorescent pose plusieurs questions. Tout d'abord, sur la spécificité des événements enregistrés qui a été discutée, mais également sur le marqueur fluorescent à utiliser. À ce jour, le marqueur universel des MV n'est pas défini et des marqueurs anciens comme l'Annexine V ciblant la PS sont grandement discutés. Une étude comparant 5 marqueurs fluorescents couramment utilisés montre qu'aucun d'eux n'est capable de détecter toutes les MV présentes dans du plasma déplaqueté et seulement des MV. Dans cette étude la détection par le paramètre de diffraction SSC, contrairement aux études précédemment citées, permet d'obtenir la plus grande concentration de MV⁹⁴. Une deuxième limite de cette méthode est la faiblesse du signal obtenu en fluorescence pour certaines MV, liée à une densité antigénique réduite. Le positionnement du seuil entre le bruit de fond du cytomètre et la population de MV peut alors être hasardeux. Pour éviter une mauvaise analyse, il est alors indispensable d'utiliser un contrôle isotypique permettant de définir la hauteur du signal de fluorescence obtenue sans MV. Une autre limite de l'utilisation d'un déclencheur fluorescent est la standardisation de cette numération. Il existe actuellement seulement des outils permettant de standardiser les numérations en paramètres de diffraction de la lumière (SSC et FSC) comme les billes Megamix mises au point par la société Biocytex (cf. chapitre 3.1.4.3).

En conclusion, actuellement il n'existe pas d'accord sur le choix de la stratégie de détection des MV. Même si la stratégie par fluorescence semble plus sensible, le manque de standardisation rend son utilisation délicate. La détection par un paramètre de diffraction est donc la méthode de choix pour le moment. Cependant, le couplage de ces deux méthodes pourrait aboutir à de nouvelles stratégies de détection intéressantes en termes de sensibilité et de spécificité.

3.1.3.2 Limites de l'analyse des MV par CMF

Les limites de l'analyse peuvent être séparées en deux parties. Tout d'abord, des limites liées aux éléments analysés, les vésicules extracellulaires, puis les limites en lien avec les cytomètres.

3.1.3.2.1 Limites liées aux MV

Les MV sont des éléments de petite taille ayant une médiane proche de 200nm. Cette petite taille entraîne la présence en faible nombre des protéines d'intérêt exposées à leur surface, soit une faible densité antigénique. De plus, les MV possèdent un faible indice de réfraction, cela signifie que leur détection par le paramètre SSC sera limitée. Ces éléments intrinsèques aux MV ne sont pas modifiables, il faudra donc adapter les techniques pour améliorer leur détection. Concernant l'environnement dans lequel les MV sont contenues, celui-ci peut être complexe (plasma, ou autres liquides biologiques) et peut apporter d'autres inconvénients comme l'apparition d'un bruit de fond important. Lorsque cela est nécessaire, il est possible de les séparer de cet environnement en utilisant des méthodes de purification de MV, comme la chromatographie d'exclusion de taille. En routine hospitalière lorsque la quantification des MV est recherchée ces étapes de concentration et de purification ne sont pas obligatoires. En effet la quantification absolue des MV connue dans un échantillon biologique serait faussée ou difficilement interprétable.

Le deuxième versant des limites de l'analyse des MV concerne donc la technologie de la CMF.

3.1.3.2.2 Limites liées à la CMF

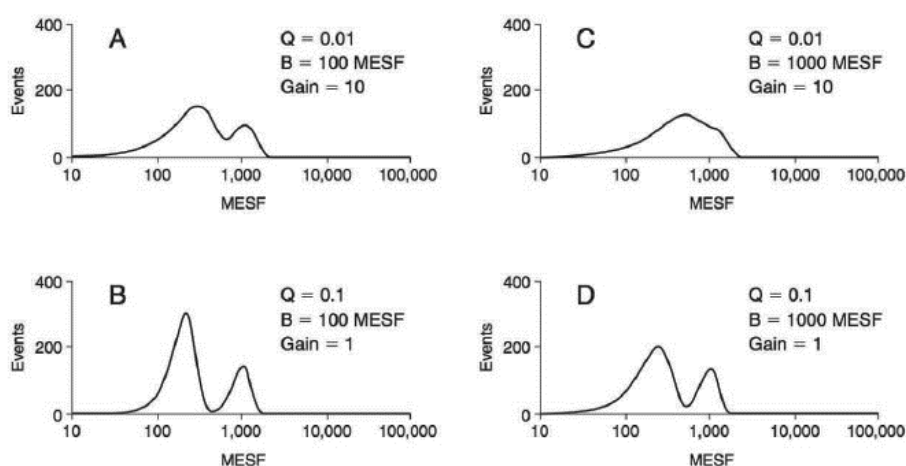
Les limites d'ordre technologique sont des éléments pouvant être améliorés et ont tendance à diminuer grâce aux avancées technologiques et scientifiques. Cependant, certains paramètres nécessitent encore des améliorations afin d'augmenter la sensibilité de détection des MV.

- **Résolution en scatter et fluorescence**

La résolution est la capacité d'un cytomètre à émettre deux signaux différents pour deux populations d'éléments étudiées afin de les distinguer l'un de l'autre. Ce paramètre est primordial dans l'analyse des MV par CMF, car l'intervalle de taille des éléments en suspension est restreint, allant de 100 à 1000 nm.

Pour étudier la résolution des paramètres de diffraction lumineuse d'un cytomètre, il existe des billes calibrées de différentes tailles, par exemple les billes Megamix-Plus produites par Biocytex. De cette acquisition de billes en suspension, il est possible de calculer l'index de séparation (IS). Cette capacité de distinction d'événement de petite taille doit être un paramètre essentiel dans le choix du cytomètre à utiliser pour l'analyse des VE.

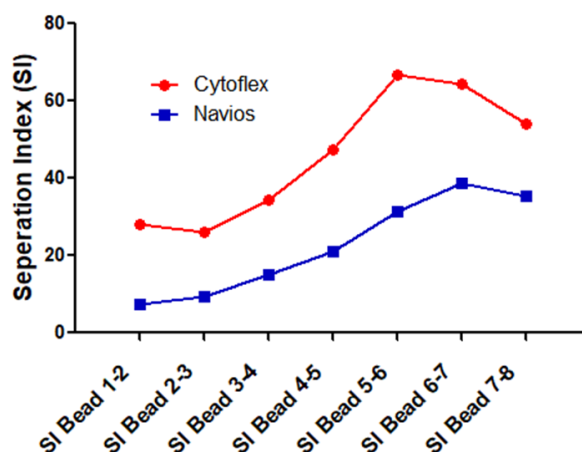
Concernant la détection de fluorescence, la sensibilité est définie comme la capacité d'un cytomètre à différencier des sous-populations de faibles intensités de fluorescence. Concernant l'analyse des MV elle consistera plutôt à séparer les MV du bruit de fond. Cette sensibilité de fluorescence dépend de 2 paramètres : le bruit de fond (B) et l'efficacité de détection (Q). L'efficacité de détection correspond aux nombres de photoélectrons par molécule de fluorochrome analysé par particule. Modifier l'un ou l'autre de ces 2 paramètres permet d'améliorer le gain entre 2 populations comme illustré par la figure n°27.



**Figure 27 : Effet de l'efficacité de détection du bruit de fond
sur la sensibilité de fluorescence**

Extrait de Hoffman et coll, Characterization of Flow Cytometer Instrument 2007

L'IS peut également être appliqué à des paramètres de fluorescence comme l'illustre la figure 28 où des billes possédant des niveaux de fluorescence différents ont été analysées en parallèle sur le cytomètre Navios et CytoFLEX. Nous constatons que le CytoFLEX obtient une meilleure séparation entre les différentes billes du kit SPHERO Rainbow 8 peak (Spherotech, Lake Forest, Etats-Unis), et ceux quel que soit le niveau de fluorescence. Celui-ci permet d'apprécier la résolution d'un appareil et même de comparer les différences entre plusieurs instruments.



**Figure 28 : Différence d'index de séparation des billes SPHERO8pks
entre les cytomètres de flux Navios et CytoFLEX**

La résolution est bien sûr liée aux paramètres intrinsèques à l'instrument, mais également par aux conditions d'analyse. Poncelet et coll., ont montré que le débit d'analyse, mais aussi l'analyse du signal en pic plutôt qu'en aire sous la courbe influençait la résolution de l'analyse⁹⁵. D'autres paramètres sont également connus comme l'alignement des lasers, le positionnement de la barre d'obturation, le retrait du filtre neutre (pour les FACS Aria par exemple) ou la modification des gains des photodétecteurs notamment en FSC⁹⁶.

Le contrôle de ces données permet de garantir la meilleure résolution pour obtenir une limite de détection la plus intéressante possible.

- *Bruit de fond*

Le bruit de fond est un élément essentiel à prendre en compte, car celui-ci influence directement la limite de détection de l'appareil. Il faut distinguer 4 types de bruit de fond : électronique, fluide, optique et lié à l'échantillon.

Le bruit de fond électronique est engendré par les photodétecteurs. En effet, il génère spontanément de faibles signaux. Ce bruit de fond est difficilement contrôlable mais il est très faible.

Le bruit de fond fluide est lié au liquide de gaine et solutions tampons utilisées pour suspendre les éléments à analyser. Mais il est également dépendant des liquides de maintenance des instruments, du vieillissement des tubulures et réservoirs. Il est important que ces différents liquides soient dépourvus de particules et de solutés fluorescents pour engendrer le plus faible bruit possible. Une filtration de ces différents liquides ainsi qu'un bon entretien de l'appareil peuvent aider à réduire ce bruit de fond fluide.

Le 3^e bruit de fond est optique. C'est le plus important. Celui-ci est d'une part lié à la diffusion non spécifique de la lumière le long du trajet optique. Pour l'évaluer, un « LED pulser » peut être utilisé. Il permettra en l'absence de flux de déterminer quel est le canal possédant le plus faible bruit de fond et donc la meilleure option de détection. D'autres paramètres influencent le bruit de fond optique comme la présence de particules sur les parois extérieures de la cellule analytique, l'alignement des lasers, le positionnement de la barre d'obturation ou encore l'usure des filtres optiques pouvant entraîner le passage de lumière en dehors de la bande de transmission initiale.

Enfin, le bruit de fond lié à l'échantillon est apporté par l'environnement dans lequel sont en suspension les MV (par exemple du plasma) et par l'excès de réactif fluorescent (anticorps libres non fixés). La plupart du temps aucune étape de lavage de l'échantillon après marquage n'est effectuée. Cependant, celui-ci pourrait permettre de diminuer drastiquement ce bruit de fond augmentant ainsi de façon significative la résolution (l'index de séparation) entre le bruit de fond résiduel de l'appareil et les MV analysées.

- *Limite de détection*

La limite de détection est directement influencée par la résolution de l'instrument et le bruit de fond présent lors de l'analyse. Concernant les MV plusieurs études ont montré une discordance de diamètre entre l'analyse de billes artificielles et l'analyse de MV. En effet, Chandler et coll. ont montré que pour une bille en polystyrène de 400 nm la taille de la MV correspondante était de 1000 nm⁹⁷. Cet écart est lié à une différence importante de l'indice de réfraction entre des vésicules artificielles et biologiques, d'un facteur 10 environ.

De plus, il a été montré que l'utilisation du paramètre SSC, et non pas FSC, permettait d'augmenter la sensibilité de l'analyse de vésicule extracellulaire⁹⁸. Le choix entre les paramètres SSC et FSC comme discriminant, dépendra fortement du type de configuration du cytomètre. Enfin, de façon intéressante, une étude montre que le seuillage en paramètre fluorescent permet une meilleure discrimination entre les MV et le bruit de fond et une augmentation de la détection des MV plasmatiques contenus dans un PFP (facteur 30 entre les deux stratégies de seuillage)⁹¹. Mais cette approche possède des limites notamment sur la spécificité des événements analysés et le choix du marqueur utilisé (Cf. chapitre « Comparaison des stratégies »).

Une nouvelle génération de cytomètres de flux fluo-sensibles est maintenant accessible pour l'étude des MV⁹⁹. Ces cytomètres ont une capacité augmentée pour détecter des événements ayant un signal fluorescent faible qui n'auraient pas été différenciés du bruit de fond lors de l'utilisation d'un cytomètre standard.

C'est le cas du CytoFLEX commercialisé par l'industriel Beckman Coulter. Dans le chapitre suivant les avantages pour l'analyse des MV de ce nouveau cytomètre vont être détaillés.

3.1.3.3 Intérêt du CytoFLEX dans l'étude des MV

Le CytoFLEX est un cytomètre en flux possédant des améliorations technologiques favorables à une meilleure détection des MV. Tout d'abord, il est équipé photodétecteurs type avalanches photodiodes en silicone, qui comme vu précédemment, possède un rendement quantique important et un faible bruit de fond électronique. De plus, le multiplexage de longueur d'onde remplace les miroirs dichroïques traditionnellement utilisés pour diviser la lumière en intervalle de longueurs d'ondes. Cette technologie permet de réduire de 20 à 50% les pertes de signal tout au long du circuit. La chambre d'analyse a également été spécialement imaginée pour améliorer la capture de la lumière émise grâce à un système optique catadioptrique initialement utilisé pour les télescopes astronomiques. Ces différentes améliorations rendent possible l'utilisation de lasers diode et de petites aires pour les avalanches photodiodes permettant une réduction importante du bruit de fond de l'appareil¹⁰⁰. De plus ce cytomètre possède un nouveau paramètre : le violet side scatter (VSSC) permettant une augmentation de la résolution entre des éléments de petites tailles par rapport au SSC classiquement obtenu avec le laser bleu (Figure 29)¹⁰¹. En effet, lors de l'entrée dans un milieu d'un indice de réfraction différent, les ondes lumineuses sont réfractées par le nouveau milieu inversement proportionnel à la longueur d'onde de la lumière, avec des longueurs d'onde plus petites ayant une réfraction plus élevée que des longueurs d'onde plus grandes. Cet effet a été découvert pour la première fois par Isaac Newton lorsqu'il a divisé la lumière blanche en un arc-en-ciel de couleurs individuelles à l'aide d'un prisme, la lumière rouge réfractant le moins et la lumière violette le plus réfractant. Sur la base de cette propriété physique, l'utilisation de la lumière violette (405nm) aidera à amplifier les différences d'indices de réfraction entre les particules et leurs milieux environnants, par rapport à la longueur d'onde bleue (488nm) classiquement utilisée pour le paramètre SSC, et à son tour augmentera la capacité de détecter des particules avec un indice de réfraction inférieur, comme les MV¹⁰². Le CytoFLEX est donc un cytomètre de choix pour l'analyse des MV.

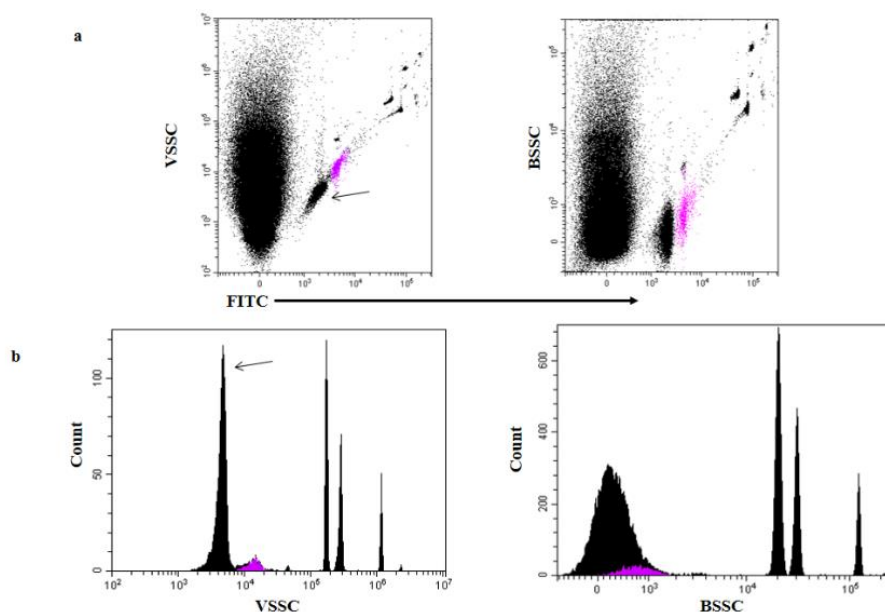


Figure 29 : Différence de détection de nanobilles entre le VSSC et le blues side scatter (BSSC)

Le VSSC permet de distinguer les nanobilles de 100 et 300 nm et pas le BSSC, il possède donc une meilleure performance dans la détection d'événements de petite taille.

Extrait de Lucchetti D et coll, Int J Mol Sci 2020

En plus de l'utilisation d'un instrument adapté à la détection des MV il est important de considérer les outils de marquage des MV.

3.1.3.4 Outils de détection des MV en cytométrie de flux

De nombreux outils permettent de détecter les MV par CMF en générant un signal fluorescent après excitation par un laser (Figure 30). Nous pouvons distinguer deux types de réactifs : ceux permettant une détection globale des MV contenue dans un échantillon et ceux permettant de mettre en évidence une sous-population de MV parmi un mélange hétérogène.

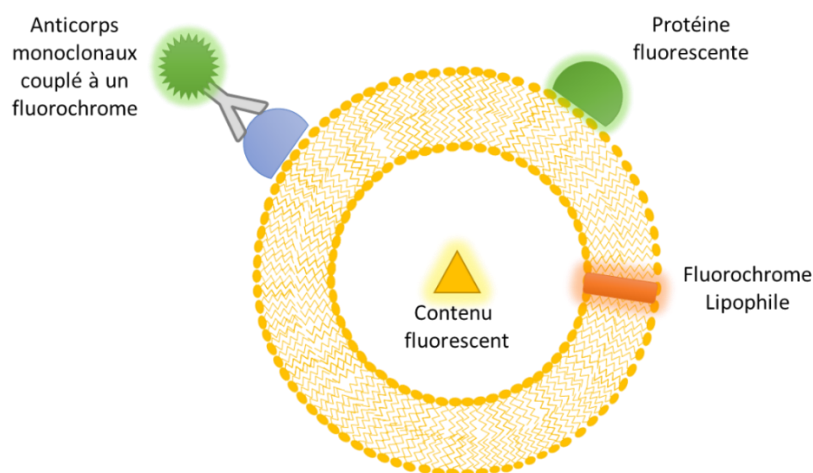


Figure 30 : Différents moyens de marquage fluorescent des MV pour détection par cytométrie de flux

- *Marqueur générique de MV*

Plusieurs marqueurs génériques existent pour la détection des MV avec des modes de marquages différents. Une catégorie de marqueur cible la membrane plasmique, parmi eux il faut distinguer les fluorochromes lipophiles qui vont avoir la capacité de s'insérer dans la bicouche lipidique des MV et les molécules reconnaissant des phospholipides négatifs de la membrane, par exemple la phosphatidylsérine par l'annexine V (dépendante de la présence de calcium) ou la lactadhérine. Des traceurs cellulaires sont également utilisables et vont pénétrer dans la MV et devenir fluorescent après dégradation par une enzyme cytoplasmique. Il existe également des anticorps monoclonaux pouvant reconnaître une majorité de MV comme l'anticorps anti CD29 ou CD59¹⁰³. Une étude s'est intéressée à comparer l'efficacité de ces différents modes de détection des MV issues d'une lignée cellulaire en culture ou plasmatique par fluorescence en CMF⁹⁴. Cette étude montre qu'il n'existe pas, parmi les solutions testées, de marqueurs permettant de détecter toutes les MV et seulement les MV en contexte plasmatique.

- *Marqueur spécifique d'une sous-population de MV*

Lorsque l'on souhaite détecter spécifiquement une sous-population de MV, l'utilisation d'un anticorps monoclonal devient alors indispensable. En effet, il permet la reconnaissance spécifique d'un épitope situé sur une protéine préalablement sélectionnée par l'expérimentateur. Le choix de la protéine ciblée est alors une étape délicate puisque la petite taille des MV et la faible densité antigénique rendent parfois non détectables des protéines qui au niveau cellulaire donnent un signal analysable par CMF. Ce choix est d'autant plus difficile qu'il n'existe pas d'étude montrant l'expression de panel élargi d'antigènes à la surface des différentes sous-populations de MV. Les antigènes ciblés sont donc, pour la majorité des cas, choisis de façon empirique en fonction du phénotype de la cellule parentale.

Concernant l'analyse des NDMV, plusieurs marqueurs plus ou moins spécifiques de cette sous-population sont utilisés tels que l'anticorps anti-CD66b, anti-CD11b, ... (Figure 31). Il n'existe pas de consensus puisqu'il n'existe pas dans la littérature d'étude évaluant de façon complète le phénotype des NDMV.

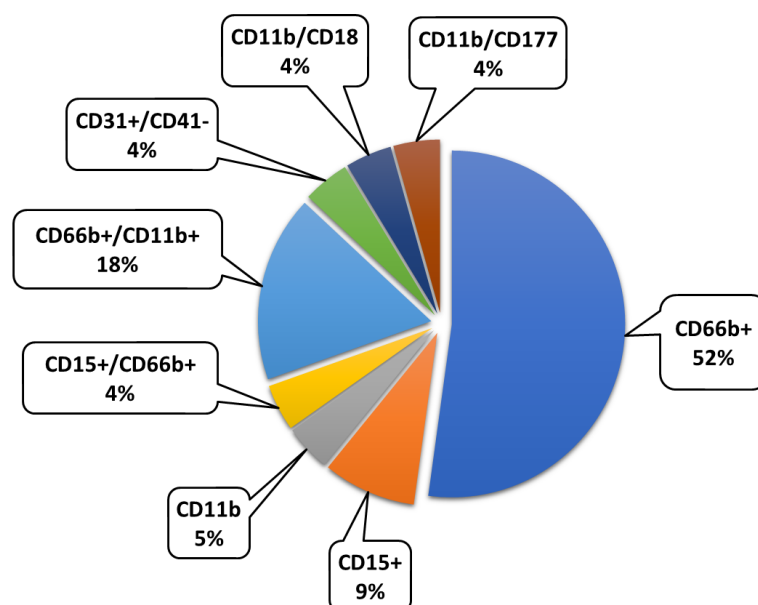


Figure 31 : Répartition des antigènes ciblés pour la détection des NDMV par CMF
(à partir du Tableau 2)

Au regard du nombre important de cytomètre de flux disponible, des différents protocoles de marquages et des différentes stratégies de détection des MV, la standardisation de leur détection est un challenge important.

3.1.3.5 Standardisation

3.1.3.5.1 Pourquoi est-il nécessaire de standardiser ?

La standardisation est définie comme « ramener un produit, une production à une norme, à un modèle unique ou à un petit nombre de modèles aux caractéristiques définies ». Elle est essentielle puisque sans elle la comparaison de travaux entre différents laboratoires est difficile, voire impossible. Depuis que les MV sont étudiées il existe peu de cadre permettant une bonne technique et analyse des données. En effet, un grand nombre de paramètres préanalytiques, analytiques ou post-analytiques ont été reconnus comme influençant les résultats obtenus^{104,105}. C'est pour cette raison que de nombreux travaux portant sur les MV sont contradictoires, et compliquent l'utilisation des MV comme biomarqueur en routine hospitalière.

Dans le cadre des MV plusieurs sociétés savantes : ISTH, ISEV et ISAC constituent désormais un groupe de travail. Ce groupe a pour but de poser des règles d'étude de la mesure des MV par CMF qui pourront être suivies par l'ensemble des laboratoires.

3.1.3.5.2 Outils de standardisation

- *Standardisation basée sur la diffraction lumineuse*

Les paramètres de diffraction de la lumière sont généralement utilisés pour créer les fenêtres d'analyses des MV. Ces paramètres sont standardisés grâce à l'utilisation de billes de polystyrène de tailles connues. Au départ les fenêtres d'analyse des MV étaient simplement placées sous une bille de 1 μm ¹⁰⁶, et bien souvent la sensibilité des cytomètres de flux faisait que la fenêtre d'analyse se superposait avec le bruit de fond de l'appareil. Depuis, les kits disponibles se sont complexifiés pour obtenir des fenêtres d'analyse plus précises. Par exemple le Megamix est adapté soit pour les cytomètres optimisés en SSC avec le Megamix-Plus SSC contenant les billes de tailles suivantes : 0,16 μm ; 0,20 μm ; 0,24 μm et 0,5 μm ou bien pour les cytomètres optimisés en FSC avec les billes de tailles suivantes : 0,10 μm ; 0,30 μm ; 0,50 μm et 0,90 μm . Ces deux mélanges de billes ont été choisis de telle sorte que les fenêtres d'analyse soient comparables entre deux cytomètres optimisés pour des paramètres de diffraction différents. En effet, la fenêtre d'analyse entre la bille 0,16-0,20 μm et 0,50 μm du kit SSC correspond exactement au même intervalle de taille des MV que la fenêtre d'analyse entre la bille 0,30 et 0,90 μm sur le kit FSC (Figure 32)¹⁰⁷. De cette façon deux cytomètres peuvent être standardisés en prenant en compte le fait que des éléments de même taille présentant des index de réfraction différents génèrent des signaux d'intensité différente variant en fonction de l'angle de détection utilisé.

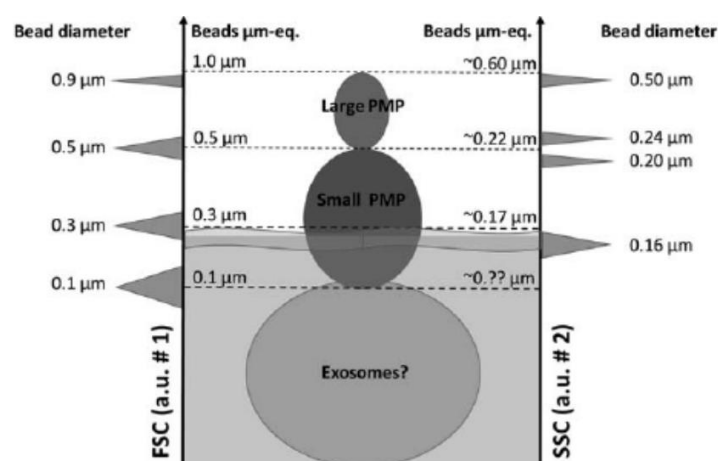


Figure 32 : Équivalence des systèmes de standardisation MegamixPlus FSC et SSC

Extrait de Poncelet et coll., *Cytometry Part A* 2016

La principale limite de cette technique du Megamix est qu'elle ne permet pas une bonne estimation de la taille des MV. Les indices de réfraction entre les billes utilisées et les MV sont trop éloignés. Pour répondre à ce problème, d'autres calibrant possédant des indices de

réfraction plus proche des MV existent, comme des billes de silices creuses qui pour certains auteurs constitueraient une meilleure stratégie de « gating » des MV^{108,109}. D'autres systèmes n'utilisant des billes sont également développés, comme les liposomes synthétiques de tailles connues, ou des virions¹¹⁰. Cependant, ces matériaux d'origine biologique présentent une stabilité plus faible que les billes synthétiques. Van Der Pol et coll. proposent une autre alternative. Grâce un logiciel informatique par le « Scatter-diameter model » ils convertissent le signal scatter en une approximation de taille des MV en associant un indice de réfraction de 1,4 aux MV¹¹¹. Cette valeur d'indice de réfraction attribuée aux MV peut être discuter en raison de la variabilité de cette donnée en fonction de l'origine des MV¹¹².

- *Standardisation basée sur la fluorescence*

L'analyse d'un paramètre de fluorescence est délicate entre plusieurs cytomètres de flux car elle est soumise à de nombreux paramètres, notamment la sensibilité intrinsèque du cytomètre. Les outils disponibles ne sont pas applicables à l'étude des MV (comme les Quantibrite commercialisés par BD), car elle ne s'intéresse pas à de faibles niveaux de fluorescence et ne standardise qu'une seule fluorescence (la phycoérythrine). Actuellement, il n'existe pas donc d'outils permettant de la standardisation de la fluorescence entre différents cytomètres pour l'étude des VE. Plusieurs équipes de recherche travaillent sur ce sujet. Une étude récente propose une approche de CMF optimisée pour l'identification et la numération de MV issues de cellules souches mésenchymateuses basées sur l'utilisation de billes d'étalonnage (Rosetta beads calibration) et l'application d'un seuil de déclenchement fluorescent, les auteurs montrent des résultats de reproductibilité et de sensibilité intéressants avec un coefficient de variation de mesure inférieur à 20%¹¹³.

Pour l'instant, le document « MI-FlowCyt-EV » ne préconise l'utilisation d'aucun système par rapport à un autre, mais demande aux chercheurs de spécifier dans la section « Materials and Methods » de leur publication la méthode de standardisation employée.

3.1.4 Autres techniques reposant sur la cytométrie de flux

Des techniques dérivées de la CMF sont également développées.

3.1.4.1 Tri de Microvésicules

La technique de tri correspond à la séparation de particules d'intérêt à partir d'une population hétérogène. Les particules sont aspirées de l'échantillon et injectées une à une par une buse dans un courant continu de tampon.

En appliquant au jet, une onde de vibration d'une fréquence et d'une amplitude déterminée, il va se rompre pour donner des gouttes à un point précis appelé « break of point ». Au moment de l'interception de la particule avec le faisceau laser, la lumière déviée et la fluorescence émise génère un signal qui est traité par le programme de tri afin de décider si la particule doit être isolée ou non selon les critères définis par l'utilisateur. La distance entre le point d'impact du laser avec la particule et le « break of point » est appelée le « drop delay ». Si une particule d'intérêt devant être triée a été détectée, le cytomètre attend qu'elle arrive jusqu'au « break of point » pour charger électriquement la goutte. Comme celle-ci contient la particule à trier, en passant entre les plaques de déflection fortement chargées, elle est déviée du côté de la plaque de polarité opposée et collectée (Figure 33). Le mode de tri peut être modifié pour choisir un maximum de pureté ou un maximum de rendement ou un maximum de précision dans le comptage pour un clonage.

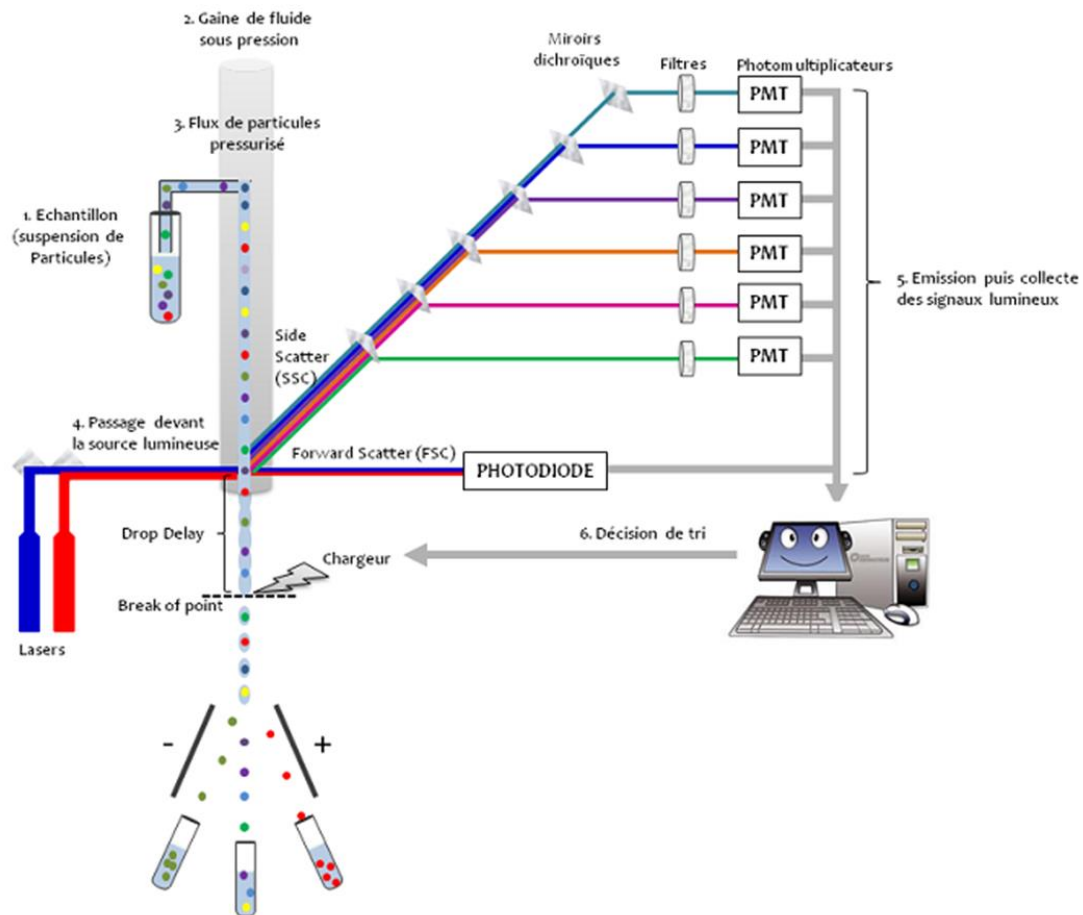


Figure 33 : Principe d'un trieur

Concernant les MV, les analyseurs-trieurs ne sont pas encore beaucoup utilisés. Certains travaux montrent que cette technologie est effectivement applicable au tri de MV^{114,115}. Mais il existe de nombreuses contraintes et interrogations. La plupart des instruments actuellement

disponible est été designer pour le tri de cellule et non pas de MV. Mais les industriels travaillent sur le sujet puisque récent Beckman Coulter ont développé le CytoFLEX SRT Benchtop Cell Sorter qui possède les mêmes améliorations technologiques que le cytomètre en flux CytoFLEX. De plus l'obtention d'une quantité suffisante de MV pour pouvoir effectuer des analyses post-tri est très chronophage. Les MV en sorti de tri sont également très diluées ce qui peut entrainer une étape supplémentaire de concentration pouvant conduire à perdre des MV. Enfin la pureté de l'échantillon de MV obtenu est également discutable et reste à montrer.

Le tri de MV serait intéressant à développer, car il permettrait d'obtenir à partir d'un échantillon contexte, tel que du plasma, une suspension d'une sous-population de MV circulantes. Cet échantillon pourrait ensuite être caractérisé par les techniques détaillées dans le chapitre suivant.

3.1.4.2 Imageur en flux

La CMF en image repose sur le même principe que la CMF conventionnelle. Les signaux émis par la particule lorsqu'elle passe devant le laser sont collectés par un microscope qui les dirige vers un système optique qui décomposera cette lumière. Chacune des bandes spectrales est ensuite orientée vers une caméra pour convertir les photons en pixels formant l'image. Cette technologie permet de nombreuses applications comme l'étude morphologique, d'internalisation de particules ou de signalisation cellulaire.

Plusieurs études montrent que cette technologie est applicable à l'étude des MV, et même pour des MV avec une taille inférieure à 200 nm (Figure 34)¹¹⁶. Certaines études proposent cet outil comme une méthode robuste et fiable d'étude individuelle des MV dans des contextes pathologiques tels que le cancer¹¹⁷. Une étude montre également qu'il est possible d'étudier l'adhésion entre une ou plusieurs MV et une lignée cellulaire d'intérêt¹¹⁸.

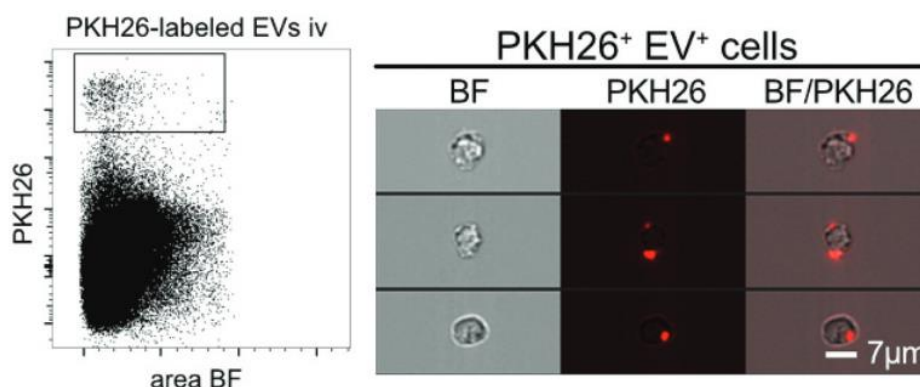


Figure 34 : Cellule portant des VE

Les MV sont marquées par le PKH26, le marquage rouge correspond au marquage vésiculaire.

Extrait de Kranich et coll. JEV 2020

3.2 Autres méthodes de détection

3.2.1 Méthode d'étude individuelle des vésicules extracellulaires

3.2.1.1 Techniques de microscopie

Il existe plusieurs techniques de microscopie permettant d'imager les MV. Chaque stratégie d'imagerie possède des avantages et inconvénients mais aussi des seuils de résolution différents. Une revue compare les différentes techniques existantes, les plus conventionnelles et les techniques émergentes¹¹⁹. Ici nous détaillerons les deux outils de microscopie les plus utilisées pour l'étude des MV, la microscopie électronique à transmission et la microscopie de force atomique.

3.2.1.1.1 Microscopie électronique à transmission

La microscopie électronique à transmission (MET) permet une analyse morphologique, structurale et chimique d'échantillons solides à l'échelle atomique. La résolution des images obtenues est d'environ de 5nm. Cette technique repose sur l'interaction des électrons avec la matière et la détection des électrons ayant traversé l'échantillon. Les échantillons étudiés doivent donc être préalablement amincis afin d'être transparents aux électrons (Figure 35A). Il existe également une méthode dite de cryo-électron microscopie (cryo-EM) (Figure 35B). Celle-ci est préférée pour l'étude des MV, car elle permet une meilleure préservation de la structure des VE. En effet, la cryo-EM consiste en une congélation rapide des échantillons dans de l'éthane liquide (-160°C) et fige ces derniers dans leur état natif dans une glace amorphe sans utiliser de colorant ou de fixateur chimique. Elle permet également de réduire les dommages d'irradiation causés par le faisceau d'électrons¹²⁰. Cette technique permet de visualiser la bicouche de phospholipide délimitant les MV et de mesurer le diamètre des MV d'un échantillon. Il est également possible de phénotyper les MV en utilisant des anticorps liés à des billes de diamètre compris entre 4 et 40 nm permettant de mettre en évidence la présence d'une protéine.

La principale limite de cette méthode est le nombre important d'images nécessaire à obtenir pour obtenir des différences significatives entre deux échantillons.

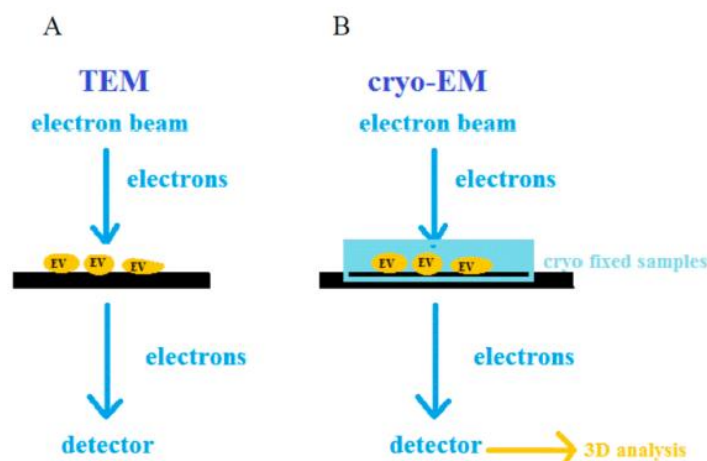


Figure 35 : Principe de la microscopie électronique à transmission

Extrait de Szatanek et coll., Int J Mol Sci 2017

3.2.1.1.2 Microscopie de force atomique

La microscopie de force atomique permet l'analyse d'une surface point par point grâce à un balayage par une sonde constituée d'une pointe fine à l'extrémité d'un micro-levier flexible. Le principe est la mesure de l'interaction attractive ou répulsive entre les atomes constituant la pointe nanométrique et les atomes surfaciques d'un échantillon. Lorsque la pointe est à proximité d'une surface, les forces d'interactions entre la pointe et l'échantillon entraînent une déviation du levier qui suit la loi de Hooke. L'analyse de la déviation du levier, à l'aide d'un laser, permet à la fois de déterminer le parcours exact de la pointe et de mesurer les forces d'interactions entre cette dernière et l'échantillon (Figure 36).

La découverte de la complexité de l'organisation topographique membranaire à cette échelle implique le développement de nouvelles techniques d'identification des structures observées. Parmi ces dernières, l'utilisation de pointes dites « fonctionnalisées » sur lesquelles ont été fixés un anticorps spécifique ou des groupements réactifs ouvre de nombreuses perspectives.

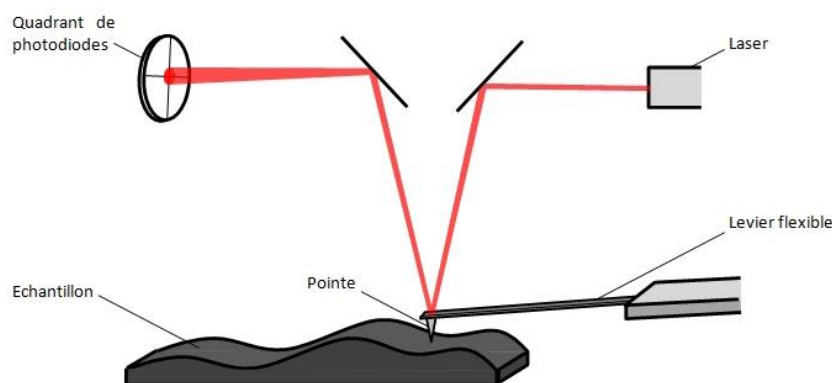


Figure 36 : Principe de la microscopie de force atomique

3.2.1.2 Analyse du suivi individuel de particules (Nanoparticle Tracking Analysis)

L'analyse du suivi individuel de particules est une méthode récente développée depuis 2006 et distribuée par Malvern Panalytical Ltd (Royaume-Uni). Brièvement, cette technique étudie l'effet d'un faisceau laser sur une suspension de particules. Deux données sont alors collectées individuellement, c'est-à-dire particule à particule, la lumière diffusée et le mouvement Brownien des particules. Le logiciel permet de calculer le diamètre hydrodynamique à l'aide de l'équation de Stokes-Einstein (Figure 37). Il est possible d'étudier des éléments avec une taille comprise entre 10 et 1000 nm, permettant ainsi l'étude de tous les types de vésicules extracellulaires. Il est également possible de calculer la concentration en particules d'un échantillon puisque le volume analysé est connu. Enfin, un mode fluorescence donne également accès à des résultats spécifiques pour les particules marquées (jusqu'à 4 lasers de longueurs d'onde différentes). Les autres avantages de cette technique sont, la rapidité de l'analyse ainsi que la facilité de préparation d'un échantillon (simple suspension). En revanche, il existe plusieurs inconvénients. En effet il a été décrit que la présence de poussière ou d'agréats protéiques interférerait dans la mesure des particules de petite taille, posant une question sur la pureté des échantillons pouvant être analysés avec cette technique¹²¹. De plus, la présence de grosses particules réduirait le nombre de petites particules que le logiciel peut détecter, il est donc recommandé de répéter les mesures lorsque les particules d'un échantillon possèdent une hétérogénéité de taille importante¹²².

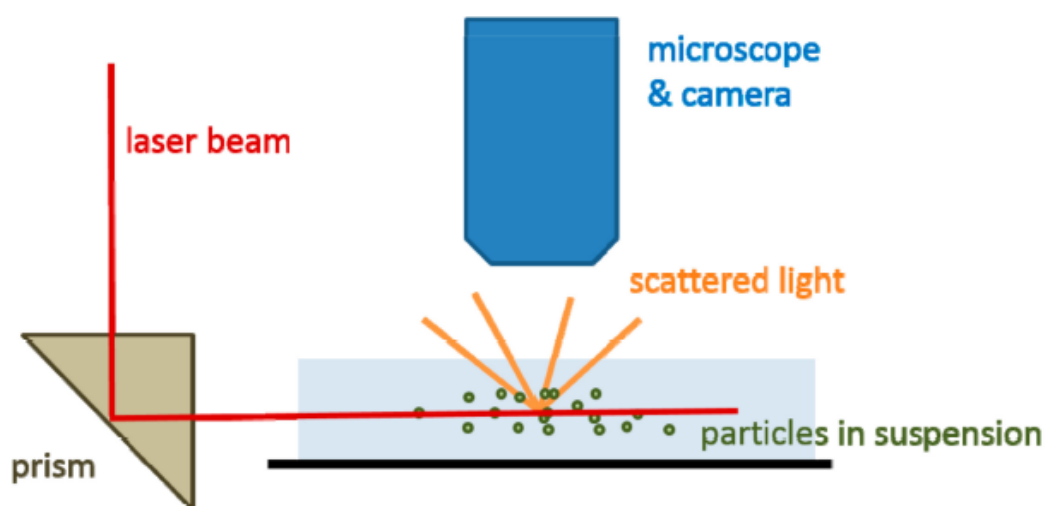


Figure 37 : Principe de l'analyse du suivi individuel de particules

Extrait de Szatanek et coll., Int J Mol Sci 2017

3.2.1.3 Impédance : Resistive pulse sensing and tunable

Cette technique est basée sur le principe de Coulter (Wallace Coulter en 1940), une particule en suspension dans une solution d'électrolytes entre dans l'ouverture et un volume égal de solution d'électrolytes est déplacé. Ce déplacement d'électrolyte augmente l'impédance à l'intérieur du circuit entraînant la génération d'une impulsion de tension proportionnel au volume de la MV (indépendant de la forme ou de l'indice de réfraction de la MV) (Figure 38). Contrairement à la CMF, cette méthode est indépendante de l'index de réfraction des éléments étudiés. Cette technique permet essentiellement d'énumérer les MV contenues dans un échantillon et de connaître la taille des éléments¹²³.

Une bonne préparation de l'échantillon est essentielle, car la présence de grosses particules ou de débris cellulaire peut obstruer l'ouverture. De plus, la présence de MV avec une membrane endommagée entraîne une augmentation de conductivité et ainsi les MV paraissent de taille plus petite par rapport à ce qu'elles ne sont pas vraiment. Enfin, cette technique ne permet pas de phénotyper les éléments d'un échantillon, il est donc impossible de connaître l'origine des MV présente dans un échantillon.

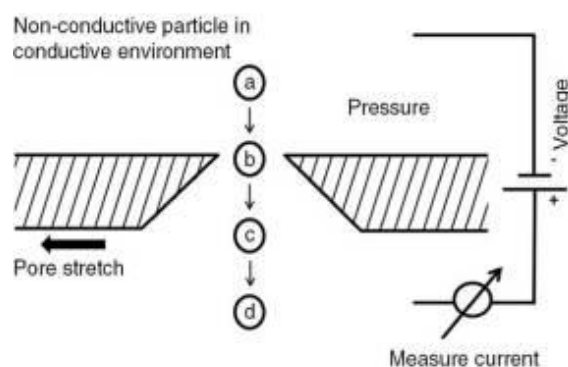


Figure 38 : Principe de la mesure par impédance des MV : Resistive pulse sensing and tunable

Extrait de Coumans F. et coll., JEV 2014

3.2.2 Méthodes permettant d'étudier un ensemble de vésicules extracellulaires

Des techniques plus conventionnelles d'analyse d'échantillon dans sa globalité peuvent être appliquées à l'étude des MV. En effet, pour étudier la présence d'une protéine la technique de western blot, ELISA, ou spectrométrie de masse¹²⁴ peuvent être utilisées. Des tests d'activités sont également élaborés par plusieurs équipes comme un test de génération de facteur Xa dépend du facteur tissulaire porté par les MV¹²⁵ ou un test de génération de plasmine dépend des MV plasmatiques portant le CD15⁷⁹. L'étude du contenu en acide nucléique est également possible grâce à des techniques telles que la PCR quantitative ou Northern Blot.

Plus récemment des techniques de « omics » sont également appliquées à l'étude des MV (Figure 39). Elles permettent d'étudier la composition en acides nucléiques, protéines ou lipides d'un échantillon de MV¹²⁶. Ces techniques possèdent un seuil de sensibilité très bas et permettent la création de databases exhaustives sur le contenu des MV accessiblement librement. La difficulté est l'analyse et le tri de l'information obtenue.

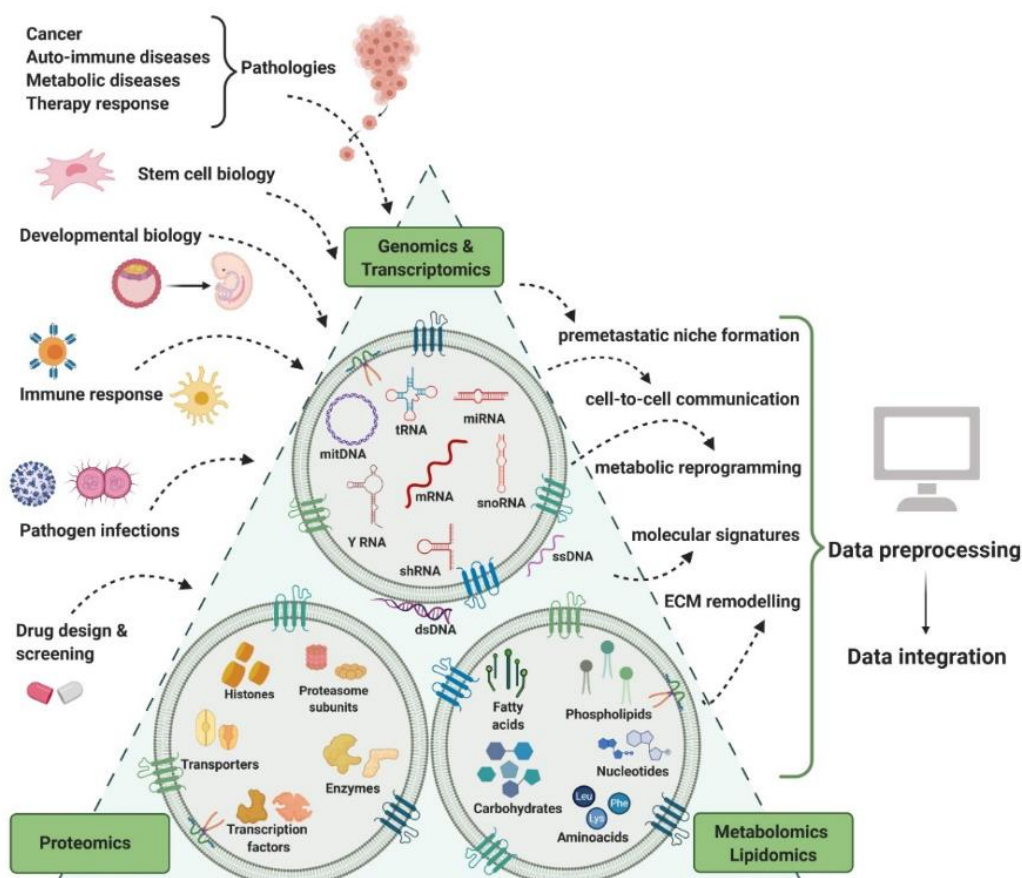


Figure 39 : Corrélation entre le contenu vésiculaire en acides nucléiques, protéines et lipides et les analyses « omics » possibles

Extrait de Chitoiu L et coll., Int J Mol Sci 2020

Il existe un grand nombre de techniques de caractérisation des MV, ce nombre est en constante augmentation et les limites technologiques sont de plus en plus repoussées notamment les seuils de détection qui sont de plus en plus bas.

Cette revue des différentes méthodes de purification, concentration et caractérisation des MV nous permet de mieux appréhender la partie suivante de ce travail qui est un travail personnel visant à améliorer la détection des NDMV par CMF.

TRAVAUX PERSONNELS

Article : Nouvelle stratégie améliorant la sensibilité de mesure des vésicules extracellulaires issues de polynucléaires neutrophiles

L'intérêt grandissant des MV comme potentiel biomarqueur dans divers contextes pathologiques amène les unités de recherche et les laboratoires de biologie médicale à standardiser et améliorer leur méthode de détection.

La CMF étant la méthode la plus employée et la mieux représentant dans les laboratoires de biologie médicale, nous nous intéressés à amélioration de la détection d'une sous-population de MV circulantes, celles issues de polynucléaires neutrophiles. En effet cette population de MV est un potentiel biomarqueur dans différents contextes pathologiques tels que

Le but de ce travail a été d'améliorer la détection des vésicules extracellulaires issues de polynucléaires neutrophiles en contexte plasmatique en utilisant une nouvelle méthode améliorant le signal fluorescent des événements par cytométrie en flux.

Pour répondre à cette problématique, nous avons dans un premier temps déterminé les meilleurs marqueurs à utiliser en CMF, c'est-à-dire ceux ayant la meilleure sensibilité et spécificité parmi un panel de 54 anticorps.

Dans le but d'augmenter la sensibilité du marquage nous avons également utilisé la technique de chromatographie d'exclusion de taille post marquage des MV couplées à un multimarquage. Nous avons également montré la linéarité de mesure de cette technique en contexte plasmatique. Enfin nous avons montré l'intérêt de l'utilisation de ce protocole de détection des NDMV, associant les différentes améliorations techniques, dans un contexte pathologique qui est le sepsis. En effet, il a été décrit que lors du sepsis la sous-population de NDMV était augmentée et celle-ci pourrait donc représenter un potentiel biomarqueur de cette pathologie.

Enfin la combinaison de ces différentes améliorations techniques rend possible le tri de MV à partir d'échantillon plasmatique.

Title Page:

A new combined strategy with improved sensitivity to count and sort large neutrophil-derived extracellular vesicles: validation in infectious disorders

Amandine Bonifay¹, Stéphane Robert¹, Belinda Champagne¹, Paul-Rémi Petit², Aude Eugène², Corinne Chareyre¹, Anne-Claire Duchez¹, Mélanie Velier^{1,2}, Shirley Fritz², Loris Vallier¹, Romaric Lacroix^{1,2} and Françoise Dignat-George^{1,2}

1. Aix-Marseille University, C2VN, INSERM 1263, INRA 1260, Marseille, France

2. Department of Hematology and Vascular Biology, CHU La Conception, APhM, Marseille, France

Keywords (3-7)

Neutrophils

Extracellular vesicles

Flow cytometry

Size exclusion chromatography

Sorting

Infectious associated diseases

Introduction

Research in the last 10 years has uncovered a number of unexpected aspects of polymorphonuclear neutrophil (PMN) biology. Their heterogeneous features, from PMN maturity, functionality and death has led to a reconsideration of their role in many diseases including inflammatory and infectious disorders¹, cardiovascular² and thrombotic diseases³ and to cancer⁴.

Newly recognized PMN functions include the ability to release subcellular mediators such as extracellular DNA⁵ and extracellular vesicles (EV)⁶ involved in immune and thrombo-inflammatory responses. Indeed, as other eukaryotic cells, PMN have been shown to generate EV, spontaneously or after activation. It is now well admitted that Large EV (LEV) generation is the end point of an activation cascade requiring increases in intracellular calcium concentration, rearrangement of the cytoskeleton and the budding of these vesicles from the plasma membrane⁷. Consequently LEV convey a spectrum of molecules from their parent cells, like anionic phospholipids such as phosphatidylserine (PS)⁸, membrane and cytosolic proteins⁹, and nucleic acids¹⁰; however, they differ in composition, size and biogenesis from other

subcellular structures, such as apoptotic bodies or small EV¹¹. LEV exert biological effects by stimulating receptors of the target cell, or by transfer of vesicle content, such as protein, lipids, mRNA, or microRNA. LEV displays distinct molecular profiles, *in vitro*, according to cellular stimulation and *in vivo*, depending on the pathophysiological context of the disease. Additionally, it has been shown that circulating LEV act together with soluble mediators to enhance biological processes, such as coagulation¹², inflammation¹³, and immune response¹⁴. Among LEV, Neutrophil derived EV (NDEV) are detected in small amounts in the circulation in normal physiologic conditions. However, NDEV have been shown to accumulate at the sites of infection or inflammation¹⁵ and their circulating levels are elevated in a variety of infectious disorders such as sepsis¹⁶, COVID-19¹⁷, atherosclerotic disorders and renal diseases including IgA nephropathy and, tubulointerstitial nephritis^{18,19} or in anti-neutrophil cytoplasmic antibody (ANCA)-associated vasculitis²⁰.

Several studies have highlighted the potential role of NDEV as a biomarker. Accordingly, the increase of NDEV in plasma is correlated to disease severity and/or evolution in clinical settings such as infectious endocarditis (ref), familial hypercholesterolemia (ref) and chronic obstructive pulmonary disease. Furthermore, elevated circulating NDEV is an independent predictor of atherosclerosis burden²¹ and instable plaque²², and high level of NDEV in pleural fluids were associated with better outcome²³ in patients with acute respiratory distress syndrome.

Because of these clinical associations, identification of NDEV molecular signatures could improve our knowledge on their role in inflammation, infection and thrombosis and their value as a prognostic indicator of vascular diseases. While this is an interesting prospect, no complete/extensive characterization of NDEV antigenic profile have been establish up to know and the clinical use of this potential biomarker is currently hampered by methodological issues. In aforementioned studies, flow cytometry (FCM) has already been used to enumerate NDEV levels in patients. FCM appears as the most suitable technique for the measurement of EV in plasmatic environment for clinical application. Indeed, FCM is a multi-parametric technology providing information on a single particle basis, and offering potential for high-throughput processing. Therefore, the technology is adapted to large-scale use in most hospital laboratories. However, until now FCM applications to NDEV remains challenging and is impeded by several technical issues: 1/ selection of the antibodies currently used for the NDEV detection, according to their antigenic expression on the parental cell 2/ subcellular size of ND EV with difficulties to detect weakly expressed antigens with a low fluorescent signal 3/ high fluorescent background noise generated by various confounding components including non-EV particles and unbound reagents. Such technical issues not only hampered enumeration of NDEV in

human plasma but explain why isolation of EV using FCM sorting is currently an impractical solution or downstream applications.

Therefore, the objective of the present study was first to establish an extensive antigenic signature of NDEV, by using a large panel of 54 antigenic specificities known to be expressed on PMN and selecting those generating the highest detection signal while preserving a good specificity. We next develop a new strategy to overcome the low fluorescent signal of NDEV, combining a selection of the best antibodies specificities used as a cocktail, a powerful detection using high fluo-sensitive flow cytometer and reduction of background noise by Size Exclusion Chromatography. Finally, the performances of this new strategy with enhanced sensitivity, was used to improve enumeration of NDEV in plasma from patient with sepsis and to make feasible an efficient sorting of NDEV from COVID-19 patients by reference to the currently used FCM protocol.

Material and Methods

Sample processing

Blood samples for quantification or sorting LEV of sepsis, COVID-19 patients or healthy controls were enrolled in the study approved by the Medical Ethics Committee of Aix-Marseille University. Samples were collected and processed according to the International Society on Thrombosis and Haemostasis and International Society of Extracellular Vesicles (ISEV) guidelines²⁴⁻²⁶. Briefly, after a light tourniquet was applied, samples were drawn from the antecubital vein using a butterfly device with a 21-gauge needle. Blood was collected into 5mL Vacutainer tubes containing 0.129 mol/L sodium citrate (BD Diagnostics, Franklin Lakes, NJ, USA), and the first few milliliters were discarded. The samples were subjected to two successive centrifugations (2,500 g for 15 min at room temperature (RT)) to prepare platelet-free plasma (PFP). The PFP was homogenized and stored at -80°C until use.

Cell isolation

PMN were collected from 3 independent healthy donors (Blood Bank, Etablissement Français du Sang, Marseille). Cells were isolated from whole blood collected on Anticoagulant Citrate Dextrose. First, mononuclear cells were separated by gradient density separation (1.077g/mL, lymphocytes separation medium, Eurobio, Courtaboeuf, France) at 500 g for 20 minutes. The upper part of the gradient was discarded, and the peripheral blood mononuclear cell (PBMC) were collected independently from Neutrophil-Red blood cells part. Red blood cells were lysed

using 50 mM Ammonium chloride buffer during 10 minutes. PMN were washed with Phosphate-buffered saline (PBS) Ca/Mg free, Bovine Serum Albumin (BSA) 0.1% and then centrifuged 5 minutes at 300g and resuspended in PBS, BSA 0.1% buffer. Secondly, PMN were purified by an immunomagnetic separation using first anti-CD66bAPC (allophycocyanin) antibody staining and then anti-APC magnetic beads (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Germany). For monocytes, PBMC were stained with the same process but using anti-CD14APC antibody. Cell separation was realized with an autoMACS Pro Separator (Miltenyi Biotec). All steps were performed at 4°C to avoid cell activation.

The main lymphocytes cell subsets were purified from PBMC by flow cytometry cell sorting using MoFlo Astrios EQ (Beckman Coulter, Villepinte, France) and the following staining strategy: anti-CD45ECD (R-phycoerythrin Texas Red-X) (J33), anti-CD3PB (Pacific Blue) (UCHT1), anti-CD4FITC (fluoresceine isothiocyanate) (13B8.2), anti-CD8BV785 (Brillant Violet) (SK1, Biolegend, San Diego, California, United State), anti-CD56PC7 (Phycoerythrin Cyanin 7) (N901), anti-CD19APCAlexa700 (HIB19, Biolegend), anti-CD14PE (phycoerythrin) (RMO52), anti-CD66bAPC (80H3) were incubated with PBMC during 20 min at 4°C. All antibodies except anti-CD8 and anti-CD19 were purchased from Beckman Coulter. A washing step (300 g, 5 min) was performed to remove unbound antibodies. Cells were gated in FSC/SSC, and the doublets were excluded using FSC width- FSC Height dot plot. Lymphocytes were selected with a CD45/SSC chart. TCD4, TCD8, B and NK lymphocytes were sorted according to their phenotype: CD3+/CD4+, CD3+/CD8+, CD19+/CD3-, CD56+/CD3- respectively. Residual neutrophil and/or monocyte were removed using a CD66b/CD14 dot plot exclusion.

Cell purity checked by FCM was above 95% for each leukocyte subsets. Leukocyte subsets were incubated at $5 \cdot 10^5$ cells/mL in 0.22µm filtered Roswell Park Memorial Institute medium (RPMI) medium supplemented with 10% Foetal Bovine Serum, for 24 h without stimuli or with N-formylmethionine-leucyl-phenylalanin (fMLP) at 2µM. PMN activation was confirmed by the increased ICAM-1 expression (CD54PE, 84H10).

Extracellular vesicles isolation and purification

Supernatant of culture medium were collected and centrifuged twice (300 g, 5 min) to remove cells and once (2500 g, 10 min) to remove apoptotic bodies. EV were concentrated, by 100kDa ultrafiltration at 1000 g, 15 min (UFC910008 Amicon Ultra-15 Merck, Darmstadt, Germany) and purified by size exclusion chromatography (SEC) on qEVoriginal/70nm columns provided from Izon Science (Oxford, England). Purified EV were concentrated by ultrafiltration and

stored at -80°C in PBS-/- aliquotes, at 1.10^3 EV/ μ L, after enumerated by FCM according to Cointe et al²⁷.

LEV flow cytometry

EV gating strategy and staining protocol

Detail protocol is provided in the supplemental file according to the MIFlowCyt-EV guidelines²⁸. Briefly, EV analysis by FCM was performed using a 4 lasers (Violet-Blue-Yellow-Red) CytoFLEX S cytometer (Beckman Coulter) equipped with a plate reader. The instrument performances were daily checked, using CytoFLEX Daily QC fluorosphere beads and SPHERO Rainbow 8-peak (Spherotech, Lake Forest, Etats-Unis). The stability of the LEV gate was ensured by the use of Megamix-Plus Forward Scatter (FSC) and Side Scatter (SSC) purchased from BioCytex, (Marseille, France). The gating strategy is illustrated in Supplemental Figure 1.

Regarding staining, all antibodies were centrifuged 2 min at 13,000 g to remove aggregates. LEV (30 μ L) were incubated with 10 μ L of AnnexinV-FITC (AnnV) (Beckman Coulter), and 10 μ L of the antibody(ies) of interest (Ab). The best antibody concentration was determined after titration on NDEV (Supplemental Figure 2). After 20min of incubation at RT, samples were diluted in 150 μ L of AnnV binding buffer and analysed. To avoid any carry over, a washing step was performed between each sample. When necessary, EV were spiked in large EV-free plasma prepared by serial filtrations at 0.22 μ m. For some experiments the unbound antibody was removed by SEC.

Antibodies specificities

CD10PE (ALB1), CD105PE (TEA3/17.1.1), CD106PE (1G11), CD109PE (8A3), CD116PE (SCO6), CD11aPE (25.3), CD11bPE (Bear1), CD11cPE (BU15), CD120bPE (80M2), CD122PC7 (CF1), CD123PE (SSDCLY107D2), CD126PE (M91), CD13PE (SJ1D1), CD14PE (RMO52), CD15PE (80H5), CD157PE (SY/11B5), CD16PE (3G8), CD166PE (3A6), CD18PE (7E4), CD184PE (12G5), CD24PE (ALB9), CD26PE (4EL-1C7), CD300aPE (E59.126), CD31PE (1F11), CD32PE (2E1), CD328PE (Z176), CD33PE (D3HL60.251), CD36APC (FA6.152), CD40PE (MAB89), CD43PE (DFT1), CD44PE (J.173), CD45PE (J33), CD48ECD (J4.57), CD49dAPC (HP2/1), CD54PE (84H10), CD55PE (JS11KSC2.3), CD58PE (AICD58), CD59PE (MEM-43), CD62LPE (DREG56), CD62P-PE (CLBThromb/6), CD64PE (22), CD65PB (88H7), CD66bAPC (80H3), CD66cPE (KOR-SA3544), CD69PE (TP1.55.3), CD85dPE (42D1), CD85jPE (HP-F1), CD85kPE (ZM3.8), CD86PE (HA5.2B7), CD90PE

(F15-42-1-5), HLA-DR-PE (Immu-357), LactoferrinPE (CLB13.17), OSCAR-PE (11.1CN5), TIA-1PE (2G9A10F5) were provided by Beckman Coulter (Villepinte, France). CD66bPE (G10F5) was purchased from BioLegend.

Positivity threshold definition

The fluorescence positivity threshold was determined using isotypic controls. Its final concentration was chosen after fluorescence matching with the specific antibody so that the background fluorescent noise was not significantly different between the 2 antibodies. (Supplemental Figure 3).

EV sorting

Samples were sorted on Astrios EQ (Beckman Coulter) equipped with aerosol catcher and installed in a Class II Cabinet Hood, in a depressurized L2 room. A 70µm nozzle was used, with 60 PSI condition (drop frequency was around 95,000Hz). Speed of sample acquisition was similar for all sample, with a limited number of events/sec below 30,000. PFP samples (100µl) were stained with antibody(ies) at their optimal concentration and then diluted in binding buffer supplemented with hirudin (2U/mL) (BioCytex). For some conditions SEC was used (qEV single 70nm columns, Izon) to remove unbound antibody according to the manufacturer instruction. The sorting strategy was defined using Gigamix beads (equal mix of Megamix+ FSC and SSC beads) to determine a scatter LEV gate. It was defined for the top limit with the 0.9µm bead, and for the bottom limit to the end of the 0.16µm bead. Fluorescence channels were monitored with Sphero 8 peaks beads. Sorted NDEV were defined as AnnexinV-FITC and PE-conjugated antibodies positive and CD41 negative events and sorted Platelet-EV as AnnexinV-FITC and CD41-APC positive and PE-conjugated antibodies negative events.

Transmission electron microscopy

NDEV pellets were fixed in PFA 2%, glutaraldehyde 2.5% overnight, post-fixed in 2% osmium for 1 h on ice, dehydrated in gradient series of acetone baths and embedded in epoxy resin. Pellets were sectioned on an UC7 ultra-microtome (Leica, Wetzlar, Germany), sections were contrasted with aqueous uranyl acetate 1% (10 min) and lead citrate (4 min). The grids were observed at 80 kV on a FEI Morgagni transmission electron microscope (ThermoFisher, Waltham, USA) and images were acquired using a MegaView3 camera (Emsis, Muenster, Germany).

Tunable Resistive Pulse Sensing

Tunable Resistive Pulse Sensing (TRPS) was performed using a qNano Gold TRPS measurement instrument (Izon, Oxford, UK). Before using the samples, the instrument was calibrated with CPC200 beads, mean diameter 210 nm and with NP150 nanopore membranes stretched around 41.01 nm were used. Voltage was set in 0.78V to achieve a stable current 110-120 nA and the pressure at 12 mbars, with the root mean square noise below 10 pA. Samples and calibration beads were diluted in running buffer (PBS filtered under 0.22 μ m). Samples were analyzed using a NP150 nanopore (Izon). Measurement and analysis were performed with Izon Control Suite V3.3.3.2001 Software.

Western Blot

NDEV pellet were lysed with RIPA buffer, separated on 4-12% NUPAGE gel under SDS-reducing conditions and non-reducing condition for CD63 and transferred onto the nitrocellulose membrane (Amersham Protran, Merck Sigma-Aldrich, St Quentin Fallavier, France) for western analysis. Membranes were blocked with 3% bovine serum albumin / tris-buffered saline (TBS, ET220B, Euromedex, Souffelweyersheim, France), 1h at RT. Then the membranes were incubated overnight at 4°C with antibodies for the designated antigens and purchased from Cell Signaling Technology, integrin β 3 (1:1000, #4702); from ThermoFisher Scientific CD63 (1:1000, #10628D), Glyceraldehyde-3phosphate deshydrogenase (GAPDH) (1:1000, #MAT-11114), albumin (1:1000, #MA532531). Next, the horse radish peroxidase (HRP)-conjugated secondary antibody (1:3000-1:5000, Pierce, Thermo Fisher) was added for 1h at RT. Immunocomplexes were visualized by enhanced chemiluminescence (ECL or ECL femto) according to the manufacturer's instructions (Pierce, Rockford, IL, USA). Specific bands were detected using a G-BOX Imaging System (GeneSys, Cambridge, UK).

Data analysis and statistic

All flow cytometry data (FCS files from CytoFLEX or LMD files from Navios) were analysed with Kaluza analysis 2.1 software. Data were analysed with the use of GraphPad Prism 8 software (GraphPad Software). Statistical calculation was performed using Mann Whitney t test or paired student's t test. Results are presented as mean $\pm$ standard deviation, if not stated otherwise.

Results

Characterisation of NDEV

According to the Minimal Information for Studies of Extracellular Vesicles 2018 (MISEV)²⁶, NDEV were purified from neutrophils culture media (Figure 1A) and characterized as Large EV (LEV) structures using several methods. First, the presence of a bilayer phospholipid membrane enclosed LEV was demonstrated by transmission electronic microscopy (Figure 1B), and by a significant reduction of events after 1/ triton lysis and 2/ 0.1 µm filtration (Figure 1C). Second, the presence of typical membranous and cytosolic LEV associated molecules was shown by 1/ the fixation of AnnV using FCM (Figure 1C) and 2/ the presence of integrin sub-unit β3 and GAPDH was revealed by western blot and without major contamination by soluble molecules like albumin (Figure 1D). Finally, the vesicles were found to have a median size of 191 nm ± 105 nm, employing TRPS (Figure 1E). Taken together, the structural, antigenic and size features of NDEV preparations used in this work were compatible with the definition of LEV.

Definition of a selective antigenic signature of NDEV

Based on fifty-four antigenic specificities known to be expressed on leukocyte, a large phenotypic characterization of NDEV was performed. Antibody labelling was expressed as the percentage of AnnV+/Ab+ NDEV (double positive NDEV) among total AnnV+ NDEV and displayed as a heat map, from 0% dark blue (no double positive LEV) to 100 % red, (all AnnV+ LEV also Ab+).as shown in Table 1. According to their percentage of double positive labelling, the positive markers were considered to be expressed at low (between 14 and 45%), medium (between 40 and 55%) or high (higher than 55%) expression level.

Strikingly, among the 54 tested specificities only 15 allowed a significant detection of NDEV above a threshold of 14%. CD15, CD24 and CD18 were the markers, with the highest expression. CD59, CD65, CD11b, CD66b, CD157, CD66c displayed a median expression, whereas CD45, CD16, Lactoferrin, CD13, CD32 and TIA-1 were detectable with lower percentage. Similar results were obtained when detection of spontaneously generated NDEV was compared to fMLP induced NDEV, except a slightly higher expression for TIA-1 and lower expression for CD15, CD24, CD59 and CD157.

In order to assess the specificity of the markers found to be positive on NDEV, the panel of 15 antibodies was tested on LEV derived from monocytes and lymphocytes subpopulations (TCD4, TCD8, B and NK). As expected (Table 2), the panleukocyte marker CD45 was found to be expressed on all EV subsets. Other antibodies with broad specificity such as CD18 or CD59 were also expressed on leukocyte-LEV subpopulations, whereas others were detected on at least one LEV sub-population of leukocyte origin: CD24 and CD65 (B cells), CD11b

(monocytes and NK cells), and CD157 (monocytes). Finally, 8 markers appear to be selectively expressed by NDEV: CD15, CD66b, CD66c, CD16, lactoferrin, CD13, CD32 and TIA-1. Among them, selecting markers generating the highest detection signal while preserving a good specificity led us to choose CD15, CD66b and CD66c to define a selective antigenic signature defining NDEV.

Next, in order to determine the robustness of these 3 antibody specificities, NDEV enumeration was performed by spiking NDEV in large EV-free plasma. As shown in Figure 2A, CD15, CD66c, CD66b labelling were detectable using NDEV concentrations as low as 50 NDEV/ μ L. NDEV detection remains linear ($r^2 > 0.98$) over total range of concentrations from 50 to 800 NDEV/ μ L (Figure 2B).

To sum up, CD15, CD66c, CD66b specificities were therefore validated as the best candidates for defining a selective NDEV antigenic signature reliable for their detection by FCM.

New strategy to improve detection of NDEV by flow cytometry

Having defined a selective antigenic signature of NDEV, we therefore developed a new strategy to overcome their low fluorescent signal by reducing background noise and increase fluorescent signal.

The first objective of this strategy was to decrease the fluorescent background noise by removing the unbound antibodies using SEC. To that aim NDEV were labeled with the three best markers (CD15, CD66b or CD66c) and the antibody specificities which allowed a detection higher than 40% of NDEV. The staining was compared with or without SEC washing. As illustrated on Figure 3A, compared to the no-wash condition, the level of the background noise (grey dots) was reduced and weakly stained NDEV (blue dots) were detected after SEC. Combining all the specificities, MFI of the background noise was significantly reduced ($p=0.03$) (Figure 2B) and the percentage of detected NDEV was significantly increased (Figure 3C) after washing by SEC.

Taken together, these results demonstrate that SEC improves the detection of NDEV by reducing the fluorescent background noise.

The second objective point of the new strategy was to increase the fluorescent signal of NDEV using the three selected antibodies (CD15, CD66b and CD66c) coupled with the same fluorochrome (PE) combined as a “cocktail” and a powerful fluo-sensitive flow cytometer. To that aim NDEV staining was compared after labeling with CD15 alone or the antibody cocktail with two or three antibodies, with or without SEC washing. When the antibody cocktail was

used without washing step by SEC, the MFI of NDEV significantly increased compared to CD15 alone only when CD15 was combined with the two other antibodies (Figure 4A). However, the fluorescent background noise was also significantly increased (Figure 4B). Consequently, the separation index between NDEV and background noise was not significantly improved (Figure 4C), and finally, the percentage of detection of NDEV was significantly decreased (CD15: $86\% \pm 3$ vs CD15/66b/66c: $80\% \pm 2$, $p=0.03$, Figure 4D). In contrast, when 3 antibodies cocktail was used in combination, with a washing step by SEC, the MFI of NDEV significantly increased compared to CD15 alone (Figure 4A), without increase of the fluorescent background noise (Figure 4B). Consequently, the separation index between NDEV and background noise was significantly increased (Figure 4C), and, the percentage of detection of NDEV was also significantly increased (CD15: $82\% \pm 3$ vs CD15/66b/66c: $91\% \pm 4$, $p=0.008$, Figure 4D). Therefore, due to their synergistic effects, a new strategy-combining a cocktail of the selected antibodies CD15, CD66b and CD66c in association with washing step with SEC was proposed / delineated to improve NDEV detection.

Validation of the new combined strategy to detect NDEV by FCM

The added value of this new combined strategy to enumerate and sort NDEV was further validated in sepsis and COVID 19 patients, two infectious contexts associated with immune-thrombotic and inflammatory complications

The gain in sensitivity was first validated to improve NDEV enumeration in sepsis patients by reference to a method using CD15 as a single labeling of NDEV without washing step. This method was defined as the “reference protocol” because a strategy using either CD66b or CD15 as a single labeling without SEC has been the most often used in the literature to characterize NDEV by FCM. In these conditions, increased level of plasmatic NDEV were detected when the new combine method was used as illustrated in the Figure 5A-B.

This was confirmed on 10 sepsis patients as shown by the significant increase of both the separation index (Figure 5C) and the concentration of NDEV: 5117 ± 5065 and 16266 ± 13390 NDEV/ μ L respectively for the current and the new combine strategy (Figure 5D).

Furthermore, the impact of this new combine method was also measured on Platelet-derived EV. The separation index and enumeration of the Platelet-EV were also significantly increased (Figure 5G and 5H respectively). Interestingly, the ratio between NDEV and Platelet-EV was significantly increased with the new combine method (Figure 5I, 0.3 ± 0.3 vs 1.3 ± 1.4 , $p=0.002$).

These data indicate that the enrichment of NDEV in sepsis patients is not only due to the washing step but also by the combination of antibodies.

Because the sorting of EV subpopulation can only be achieved if the fluorescence and/or light scattering signals of these subpopulation can be resolved and gated from one another, we investigated the benefit of the new combine method to sort NDEV from plasma of COVID-19 patients, by comparison to a method using a single labelling without washing step by SEC. The sorting strategy illustrated in Figure 6A was to select AnnV⁺ events positive for NDEV marker (left panel), excluding Platelet-EV (right panel). Without washing step with SEC, sorting NDEV using CD15 staining alone was not feasible mainly due to the high background noise. Consequently, NDEV sorting by CD15 was possible only after washing with SEC (Figure 6B). Interestingly, the added value of the new combined method was to significantly increase the sorting of NDEV compared to the staining with CD15 alone.

Altogether, the new combine method makes feasible an efficient sorting of NDEV from COVID-19 patients.

Discussion

In this work, we provide an extensive characterization of cell surface antigens conveyed by NDEV allowing to identify a set/ signature/antigenic profile of 15 markers detectable by flow cytometry, including 4 markers (CD157, CD24, CD65 and CD66c) which expression were never been described on EV. From these data, on the basis of markers generating the highest detection signal while preserving a good specificity, CD15, CD66b and CD66c were selected to define a selective NDEV antigenic signature reliable for their detection by FCM. Using this antigenic signature, to improve the detection of NDEV by flow cytometry, we proposed a new strategy combining 1/ the labeling of CD15, CD66b and CD66c with a cocktail of three antibodies coupled with the same fluorochrome (PE), 2/ a washing step by SEC and 3 / detection using a fluo-sensitive instrument. The increase of the fluorescent signal combined with the reduction of the background noise allow to improve enumeration of NDEV in plasma from patient with sepsis and to make feasible an efficient sorting of NDEV from COVID-19 patients by reference to the currently used FCM protocols.

Flow cytometry has been previously used to detect NDEV in plasma of patients. However, this measurement remains challenging because of their small size, and their low antigen density. Moreover, up to known, the antibodies currently used for the NDEV detection have been selected empirically, according to their antigenic expression on the parental cell. Surprisingly, among the 54 antigens already reported to be expressed on PMN, only 15 were detectable on NDEV. This may be due to the lack of exportation of some antigens on vesicles cargos during the vesiculation process. Indeed , it is well known that some regions of cellular membrane are more prone to vesiculate than other, such as cholesterol enriched area (lipid rafts)^{29,30} (Skryabin GO Biochemistry Moscow 2020; Salaün C Traffic 2004). Consequently, a few membrane proteins will be enriched on the EV, while others, although present at the cellular level, are not detectable on the EV generated^{31,32} (Jimenez L J Proteome Res 2019; Jang SC JEV 2019).

Despite the fact that NDEV detection was established using one of the most fluo-sensitive instruments available on the marker³³, another explanation could be the expression of the antigen with a density not enough sufficient to be detectable by FCM. The limited detection of some antigens on NDEV might also potentially be due to the epitopic specificity of the selected clone. However, it is to note that the 54 clones used in this study have been selected on the basis of a good labeling on parental cell, suggesting distinct antigenic configuration between cells and EV.

In contrast, during the vesiculation process, some molecules have concentrated on EV, such as the presence of a glycosylphosphatidylinositol (GPI)³⁴ (Müller G Arch. Biochem. Biophys 2018). Accordingly, among the 15 antigens detected in our work on NDEV, 6 (40%) were GPI-anchored proteins (CD24, CD59, CD66b, CD157, CD66c and CD16). This extended molecular signature of NDEV may also provide biological information because some antigens like (CD16 and CD32) are involved in immune regulation whereas others like CD11b, CD18, CD15, CD24, CD66b, CD66c and CD157 are involved in cell adhesion, inflammation and migration.

Since antigenic density variation on NDEV may occur after stimuli-induced vesiculation, we investigated the effect of fMLP. Surprisingly, we found very few variations for the markers supposed to be affected by fMLP, in agreement with results already reported for the lack of modulation of CD18 expression on EV by FCM after exposure of PNN to fMLP¹⁵. However, we cannot exclude those inducers distinct from fMLP may affect more profoundly the phenotype of antigen conveyed by NDEV.

Beside the challenge of small size and low fluorescence of NDEV inherent to all EV, and despite the fact that no consensus exists on the normal value of EV subpopulation in healthy people, NDEV belongs to what is called the rare subpopulations of EV detectable in healthy people, as it is the case of other leukocyte subpopulations or either endothelial or cancer derived EV. Therefore, one of the novelties of our FCM strategy was first to increase the fluorescent signal of NDEV by associating 3 antibodies (CD15, CD66b and CD66c) with the same fluorochrome (PE). These 3 antibodies have been selected because they generated the highest detection signal while preserving a good specificity since they didn't label EV derived from monocyte and lymphocyte (T, B and NK) origin. To our knowledge, this is the first time that the association between 3 antibodies used as a cocktail was employed to improve the detection of NDEV.

However, the use of antibody cocktail alone doesn't improve the detection of NDEV, due to the increase of background noise associated with the accumulation of unbound antibodies or free fluorophore. To counter this issue, we introduced a washing step by size exclusion chromatography to separate the labeled EV from unbound antibodies and other contaminants. Indeed, several studies have previously shown that SEC is an efficient method to separate EV from soluble proteins³⁵⁻³⁸ (Böing JEV 2014; Gámez-Valero A Sci rep 2016; Gardiner C JEV 2016) and also to decrease fluorescence background noise on EV with fluorescent dye³⁹ (Morales-Kastresana, A. *et al. Sci. Rep.* 2017). So, the present study demonstrates that another

interest of SEC is to improve EV-based biomarker detection using a cocktail antibody without increasing the associated background noise.

The new combine strategy allows to improve enumeration of NDEV in plasma from patient with sepsis by reference to the currently used FCM protocol. In depth analysis of the literature shows that CD66b is the most widely used marker for the measurement of NDEV in clinical cohorts^{40–43} (Milton J of Infection 2019, Headland Sci Transl Med 2015, Porro Resp Res 2010, Leroyer 2007). Other markers also used on NDEV was chosen protocol using single labelling^{44,45} (Diamant Circulation 2002; Danesh Front Immunol 2018). Sometimes the strategy used for NDEV detection was based on a double labeling, for example CD11b and CD18⁴⁶ (Herrmann Nanoscale 2015) or CD66b and CD11b⁴⁷ (O’Dea Plos One 2016). However, the present study shows that both CD11b and CD18 lacks specificity for NDEV, since CD11b was also detected on monocyte-derived EV, and CD18 on monocyte and some subsets of lymphocyte-derived EV. Beside the distinct markers used to detected NDEV by FCM, for example CD15, CD66b or CD177^{48–50}, it is to note that, almost each study used a different pre analytic and labeling protocol, resulting in difficulties to compare the results provided by these studies. Consequently, these studies provided a large range of values reported concerning the plasmatic level of NDEV in healthy individual (from non-detectable to about 400 NDEV per microliter) and more importantly resulted on discrepancies regarding the main clinical message provided by NDEV enumeration in a given clinical context. Focusing on septic shock most of the studies published in the literature are in agreement with the fact there is an increase of NDEV concentration when comparing sepsis or septic shock to healthy donors^{46,47,51,52} (Herrmann Nanoscale 2015; O’Dea Plos One 2016; Lehner Shock 2016; Lashin Shock 2018), except one study doesn’t find this⁵³. Nevertheless, there is some disagreements about the relationship between this increase and patient survival. Some studies showed an increase of NDEV quantification in the non-survivals patients^{45,51,54} while others didn’t evidence such a correlation^{47,53} (Mostefai Am J of Resp and Crit Care Med 2008; O’Dea Plos One 2016). Interestingly, one study showed that increased levels of NDEV co-expressing CD66b and $\alpha 2$ -macroglobulin was associated with patient’s survival during sepsis⁵² (Lashin Shock 2018). Along the same idea, in patients with acute respiratory distress syndrome, NDEV level in bronchoalveolar lavages in were the only subset was associated with an better outcome⁵⁵ (Guervilly Crit Care 2011). However, other studies showed increase of NDEV in plasma was also correlated with the occurrence of disseminated intravascular coagulation during sepsis⁵⁶ (Stiel L Crit Care Med 2016). In conclusion, these studies clearly indicate that a robust strategy

of NDEV counting using FCM is mandatory, to delineate their relevance as a pertinent biomarker in clinical context.

Furthermore, the new combine strategy not only allows an improve of the detection of NDEV-based biomarker but also makes feasible an efficient sorting of NDEV. In fact, compared to FCM, the sort of EV is currently, very challenging because of several limits added to the cell sorting⁵⁷ (Kormelink Cytometry part A 2016). Among them, the sorting time, the dilution and the purity of the sorted EV implies that the isolation of EV using sorting is currently an impractical solution for downstream applications, such as functional tests, for several reasons^{58,59}. First, downstream applications require a higher number of EV than can be sorted within a practical time. Because the sorters devices available today are instruments optimized for cell sorting and not for EV sorting, therefore obtaining enough number of post-sort EV to carry out additional characterization tests leads to very long acquisition time. Another issue is that sorting substantially dilutes particles, an issue that may be amplified by the staining of EV. Dilution of EV in a large volume of buffer involves an additional step of concentration potentially leading to the decrease in the yield of the experiment. Finally, the question of the purity of the sample obtained after sorting also raises questions. Since sorting of particles appears as a fine compromise between purity, sensitivity and throughput, few studies have shown that sorting of EV is possible from cell culture supernatant. In particular EV from cancer cell lines and dendritic cells were sorted after labeling with only cell tracker⁶⁰ (Morales JEV 2019). However to our knowledges, sorting of EV from biological sample⁶⁰ has never been described.

By overcoming the current limitations of EV sorting, our strategy that combines enhanced sensitivity due to antibody combination, reduced background noise and EV concentration by SEC washing step post-labeling, makes feasible an efficient sorting of NDEV from COVID-19 patients plasma. Because sorting offers the opportunity to study the content or functional activity of EV with a specific antigen expression, this opens the door to a better characterization of the biological role of NDEV in COVID-19. Indeed, as illustrated in the neutrophils play a role in COVID-19. Consequently, their derived products like neutrophils-extracellular traps (Zuo Y J Thromb Haemost 2021⁶¹; Tomar B Cells 2020⁶²; Wang J Front Immunol 2020⁶³; Leppkes M EBioMedicine 2020⁶⁴) and NDEV could also be involved in COVID 19 pathophysiology^{17,65}.

In conclusion, combining pre-analytical optimization, broad antibody screening, fluorescence cytometry led to improve the detection of NDEV by enhancing the FCM fluorescent

signal and make possible selective EV sorting at a level required for relevant biomarker detection in clinical practice.

As a conclusion, this work shows that the use of rigorous sample preparation, according to the MISEV and MIFlowCyt-EV recommendations^{28,66}, together with a new combine strategy associating 1/ a selective antigenic signature of NDEV (CD15, CD66b and CD66c) 2/ a optimized labelling strategy based on an antibody cocktail resulting in a higher detection signal while preserving a good specificity 3/ a washing step by size exclusion chromatography. Since FCM is a technique used in many medical biology laboratories, this opens the door to a more valuable access to the NDEV biomarker with hospital routine use.

Although the present study shows an improvement of NDEV detection by FCM in sepsis plasma samples, it is now warranted to test this new combine strategy on more extensive clinical cohort of septic shock patients, and also on patients with other immuno-thrombotic and inflammatory disorders, already reported to be associated with elevated plasmatic levels of NDEV such as atherosclerotic and renal disorders^{18,19} or (ANCA)-associated vasculitis²⁰.

This strategy could also be applied to improve FCM detection of other rare subpopulations of EV generated by tissues with a limited access such as vascular endothelium, cancer cells or placenta, the aim being to encourage the use of liquid biopsy, permitting the analysis of EV in non-solid biological tissues like blood, to promote their use as a minimally invasive procedure. For example, in cardiovascular disorders, detection of LDEV in blood were used to identify in a non-invasive way unstable plaque in asymptomatic patients with high grade carotid stenosis, and detection of endothelial-derived EV in blood to identify patients with (Duval 2010). In pathological pregnancies, the detection of EV originating from the placenta were useful for early detection of pregnancy complications such as preeclampsia⁶⁷ (Gill M Hypertension 2019). Moreover, in oncology, the detection of circulating EV of cancerous origin could allow a non-invasive diagnosis and therapeutic monitoring of cancer^{68,69} (Li W Small Mathods 2018 ; Tian Y ACS Nano 2018). Finally, this new strategy makes feasible the sort of NDEV from COVID-19 plasma and will permit to grow our knowledges of their role in this disease but also, in other infectious disease associated to immuno-thrombotic complication. In the future, this NDEV signature has to be completed by proteomic, lipidomic and miRNA-omic strategies allowing to implement with other characteristics of NDEV.

Declaration of Interest Statement

We acknowledge Beckman Coulter that provide reagents for this study.

References

1. Kolaczowska E, Kubes P. Neutrophil recruitment and function in health and inflammation. *Nat Rev Immunol*. 2013;13(3):159-175. doi:10.1038/nri3399
2. Gaul DS, Stein S, Matter CM. Neutrophils in cardiovascular disease. *Eur Heart J*. 2017;38(22):1702-1704. doi:10.1093/eurheartj/ehx244
3. Kapoor S, Opneja A, Nayak L. The role of neutrophils in thrombosis. *Thromb Res*. 2018;170:87-96. doi:10.1016/j.thromres.2018.08.005
4. Galdiero MR, Varricchi G, Loffredo S, Mantovani A, Marone G. Roles of neutrophils in cancer growth and progression. *J Leukoc Biol*. 2018;103(3):457-464. doi:10.1002/JLB.3MR0717-292R
5. Van Avondt K, Hartl D. Mechanisms and disease relevance of neutrophil extracellular trap formation. *Eur J Clin Invest*. 2018;48 Suppl 2:e12919. doi:10.1111/eci.12919
6. Hong C-W. Extracellular Vesicles of Neutrophils. *Immune Netw*. 2018;18(6):e43. doi:10.4110/in.2018.18.e43
7. Zwaal RF, Schroit AJ. Pathophysiologic implications of membrane phospholipid asymmetry in blood cells. *Blood*. 1997;89(4):1121-1132.
8. Connor DE, Exner T, Ma DDF, Joseph JE. The majority of circulating platelet-derived microparticles fail to bind annexin V, lack phospholipid-dependent procoagulant activity and demonstrate greater expression of glycoprotein Ib. *Thromb Haemost*. 2010;103(5):1044-1052. doi:10.1160/TH09-09-0644
9. Choi D-S, Kim D-K, Kim Y-K, Gho YS. Proteomics, transcriptomics and lipidomics of exosomes and ectosomes. *Proteomics*. 2013;13(10-11):1554-1571. doi:10.1002/pmic.201200329
10. Varela-Eirin M, Varela-Vazquez A, Rodríguez-Candela Mateos M, et al. Recruitment of RNA molecules by connexin RNA-binding motifs: Implication in RNA and DNA transport through microvesicles and exosomes. *Biochim Biophys Acta*. 2017;1864(4):728-736. doi:10.1016/j.bbamcr.2017.02.001
11. 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
12. Del Conde I, Shrimpton CN, Thiagarajan P, López JA. Tissue-factor-bearing microvesicles arise from lipid rafts and fuse with activated platelets to initiate coagulation. *Blood*. 2005;106(5):1604-1611. doi:10.1182/blood-2004-03-1095
13. Aharon A, Brenner B. Microvesicles in Thrombosis and Inflammation. *Isr Med Assoc J*. 2016;18(9):530-533.
14. Cortez-Espinosa N, Mayoral LP-C, Perez-Campos E, et al. Platelets and Platelet-Derived Microvesicles as Immune Effectors in Type 2 Diabetes. *Curr Vasc Pharmacol*. 2017;15(3):207-217. doi:10.2174/1570161115666170126130309
15. Gomez I, Ward B, Souilhol C, et al. Neutrophil microvesicles drive atherosclerosis by delivering miR-155 to atheroprone endothelium. *Nat Commun*. 2020;11(1):214. doi:10.1038/s41467-019-14043-y

16. Prakash PS, Caldwell CC, Lentsch AB, Pritts TA, Robinson BRH. Human microparticles generated during sepsis in patients with critical illness are neutrophil-derived and modulate the immune response. *J Trauma Acute Care Surg.* 2012;73(2):401-406; discussion 406-407. doi:10.1097/TA.0b013e31825a776d
17. Guervilly C, Bonifay A, Burtsey S, et al. Dissemination of extreme levels of extracellular vesicles: tissue factor activity in patients with severe COVID-19. *Blood Advances.* 2021;5(3):628-634. doi:10.1182/bloodadvances.2020003308
18. Daniel L, Fakhouri F, Joly D, et al. Increase of circulating neutrophil and platelet microparticles during acute vasculitis and hemodialysis. *Kidney Int.* 2006;69(8):1416-1423. doi:10.1038/sj.ki.5000306
19. He Z, Zhang Y, Cao M, et al. Increased phosphatidylserine-exposing microparticles and their originating cells are associated with the coagulation process in patients with IgA nephropathy. *Nephrol Dial Transplant.* 2016;31(5):747-759. doi:10.1093/ndt/gfv403
20. Kambas K, Chrysanthopoulou A, Vassilopoulos D, et al. Tissue factor expression in neutrophil extracellular traps and neutrophil derived microparticles in antineutrophil cytoplasmic antibody associated vasculitis may promote thromboinflammation and the thrombophilic state associated with the disease. *Ann Rheum Dis.* 2014;73(10):1854-1863. doi:10.1136/annrheumdis-2013-203430
21. Martínez GJ, Barraclough JY, Nakhla S, et al. Neutrophil-derived microparticles are released into the coronary circulation following percutaneous coronary intervention in acute coronary syndrome patients. *Biosci Rep.* 2017;37(1). doi:10.1042/BSR20160430
22. Sarlon-Bartoli G, Bennis Y, Lacroix R, et al. Plasmatic level of leukocyte-derived microparticles is associated with unstable plaque in asymptomatic patients with high-grade carotid stenosis. *J Am Coll Cardiol.* 2013;62(16):1436-1441. doi:10.1016/j.jacc.2013.03.078
23. Guervilly C, Lacroix R, Forel J-M, et al. High levels of circulating leukocyte microparticles are associated with better outcome in acute respiratory distress syndrome. *Crit Care.* 2011;15(1):R31. doi:10.1186/cc9978
24. Lacroix R, Judicone C, Poncelet P, et al. Impact of pre-analytical parameters on the measurement of circulating microparticles: towards standardization of protocol. *J Thromb Haemost.* 2012;10(3):437-446. doi:10.1111/j.1538-7836.2011.04610.x
25. Coumans FAW, Brisson AR, Buzas EI, et al. Methodological Guidelines to Study Extracellular Vesicles. *Circ Res.* 2017;120(10):1632-1648. doi:10.1161/CIRCRESAHA.117.309417
26. 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. *J Extracell Vesicles.* 2018;7(1):1535750. doi:10.1080/20013078.2018.1535750
27. Cointe S, Judicone C, Robert S, et al. Standardization of microparticle enumeration across different flow cytometry platforms: results of a multicenter collaborative workshop. *J Thromb Haemost.* 2017;15(1):187-193. doi:10.1111/jth.13514
28. Welsh JA, Van Der Pol E, Arkesteijn GJA, et al. MIFlowCyt-EV: a framework for standardized reporting of extracellular vesicle flow cytometry experiments. *J Extracell Vesicles.* 2020;9(1):1713526. doi:10.1080/20013078.2020.1713526

29. Skryabin GO, Komelkov AV, Savelyeva EE, Tchevkina EM. Lipid Rafts in Exosome Biogenesis. *Biochemistry Moscow*. 2020;85(2):177-191. doi:10.1134/S0006297920020054
30. Salaün C, James DJ, Chamberlain LH. Lipid Rafts and the Regulation of Exocytosis. *Traffic*. 2004;5(4):255-264. doi:10.1111/j.1600-0854.2004.0162.x
31. Jimenez L, Yu H, McKenzie AJ, et al. Quantitative Proteomic Analysis of Small and Large Extracellular Vesicles (EVs) Reveals Enrichment of Adhesion Proteins in Small EVs. *J Proteome Res*. 2019;18(3):947-959. doi:10.1021/acs.jproteome.8b00647
32. Jang SC, Crescitelli R, Cvjetkovic A, et al. Mitochondrial protein enriched extracellular vesicles discovered in human melanoma tissues can be detected in patient plasma. *Journal of Extracellular Vesicles*. 2019;8(1):1635420. doi:10.1080/20013078.2019.1635420
33. George SK, Lauková L, Weiss R, et al. Comparative Analysis of Platelet-Derived Extracellular Vesicles Using Flow Cytometry and Nanoparticle Tracking Analysis. *Int J Mol Sci*. 2021;22(8):3839. doi:10.3390/ijms22083839
34. Müller GA. The release of glycosylphosphatidylinositol-anchored proteins from the cell surface. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. 2018;656:1-18. doi:10.1016/j.abb.2018.08.009
35. Böing AN, van der Pol E, Grootemaat AE, Coumans FAW, Sturk A, Nieuwland R. Single-step isolation of extracellular vesicles by size-exclusion chromatography. *J Extracell Vesicles*. 2014;3. doi:10.3402/jev.v3.23430
36. Gámez-Valero A, Monguió-Tortajada M, Carreras-Planella L, Franquesa M la, Beyer K, Borràs FE. Size-Exclusion Chromatography-based isolation minimally alters Extracellular Vesicles' characteristics compared to precipitating agents. *Sci Rep*. 2016;6:33641. doi:10.1038/srep33641
37. Gardiner C, Di Vizio D, Sahoo S, et al. Techniques used for the isolation and characterization of extracellular vesicles: results of a worldwide survey. *J Extracell Vesicles*. 2016;5:32945. doi:10.3402/jev.v5.32945
38. Mateescu B, Kowal EJK, van Balkom BWM, et al. Obstacles and opportunities in the functional analysis of extracellular vesicle RNA - an ISEV position paper. *J Extracell Vesicles*. 2017;6(1):1286095. doi:10.1080/20013078.2017.1286095
39. Morales-Kastresana A, Telford B, Musich TA, et al. Labeling Extracellular Vesicles for Nanoscale Flow Cytometry. *Sci Rep*. 2017;7(1):1878. doi:10.1038/s41598-017-01731-2
40. Guimarães Júnior MH, Ferrari TCA, Teixeira-Carvalho A, et al. Cell-derived microvesicles in infective endocarditis: Role in diagnosis and potential for risk stratification at hospital admission. *J Infect*. 2019;79(2):101-107. doi:10.1016/j.jinf.2019.06.005
41. Headland SE, Jones HR, Norling LV, et al. Neutrophil-derived microvesicles enter cartilage and protect the joint in inflammatory arthritis. *Sci Transl Med*. 2015;7(315):315ra190. doi:10.1126/scitranslmed.aac5608
42. Porro C, Lepore S, Trotta T, et al. Isolation and characterization of microparticles in sputum from cystic fibrosis patients. *Respir Res*. 2010;11:94. doi:10.1186/1465-9921-11-94

43. Leroyer AS, Isobe H, Lesèche G, et al. Cellular origins and thrombogenic activity of microparticles isolated from human atherosclerotic plaques. *J Am Coll Cardiol*. 2007;49(7):772-777. doi:10.1016/j.jacc.2006.10.053
44. Diamant M, Nieuwland R, Pablo RF, Sturk A, Smit JWA, Radder JK. Elevated numbers of tissue-factor exposing microparticles correlate with components of the metabolic syndrome in uncomplicated type 2 diabetes mellitus. *Circulation*. 2002;106(19):2442-2447.
45. Danesh A, Inglis HC, Abdel-Mohsen M, et al. Granulocyte-Derived Extracellular Vesicles Activate Monocytes and Are Associated With Mortality in Intensive Care Unit Patients. *Front Immunol*. 2018;9:956. doi:10.3389/fimmu.2018.00956
46. K. Herrmann I, Bertazzo S, P. O'Callaghan DJ, et al. Differentiating sepsis from non-infectious systemic inflammation based on microvesicle-bacteria aggregation. *Nanoscale*. 2015;7(32):13511-13520. doi:10.1039/C5NR01851J
47. O'Dea KP, Porter JR, Tirlapur N, et al. Circulating Microvesicles Are Elevated Acutely following Major Burns Injury and Associated with Clinical Severity. *PLOS ONE*. 2016;11(12):e0167801. doi:10.1371/journal.pone.0167801
48. Nieuwland R, Berckmans RJ, McGregor S, et al. Cellular origin and procoagulant properties of microparticles in meningococcal sepsis. *Blood*. 2000;95(3):930-935.
49. Huisse M-G, Pease S, Hurtado-Nedelec M, et al. Leukocyte activation: the link between inflammation and coagulation during heatstroke. A study of patients during the 2003 heat wave in Paris. *Crit Care Med*. 2008;36(8):2288-2295. doi:10.1097/ccm.0b013e318180dd43
50. Timár CI, Lorincz AM, Csépanyi-Kömi R, et al. Antibacterial effect of microvesicles released from human neutrophilic granulocytes. *Blood*. 2013;121(3):510-518. doi:10.1182/blood-2012-05-431114
51. Lehner GF, Harler U, Haller VM, et al. Characterization of Microvesicles in Septic Shock Using High-Sensitivity Flow Cytometry. *Shock*. 2016;46(4):373-381. doi:10.1097/SHK.0000000000000657
52. Lashin HMS, Nadkarni S, Oggero S, et al. Microvesicle Subsets in Sepsis Due to Community Acquired Pneumonia Compared to Faecal Peritonitis. *Shock*. 2018;49(4):393-401. doi:10.1097/SHK.0000000000000989
53. Mostefai HA, Meziani F, Mastronardi ML, et al. Circulating microparticles from patients with septic shock exert protective role in vascular function. *Am J Respir Crit Care Med*. 2008;178(11):1148-1155. doi:10.1164/rccm.200712-1835OC
54. Chen H-P, Wang X-Y, Pan X-Y, et al. Circulating Neutrophil-Derived Microparticles Associated with the Prognosis of Patients with Sepsis. *J Inflamm Res*. 2020;13:1113-1124. doi:10.2147/JIR.S287256
55. Guervilly C, Lacroix R, Forel J-M, et al. High levels of circulating leukocyte microparticles are associated with better outcome in acute respiratory distress syndrome. *Crit Care*. 2011;15(1):R31. doi:10.1186/cc9978
56. Stiel L, Delabranche X, Galois A-C, et al. Neutrophil Fluorescence: A New Indicator of Cell Activation During Septic Shock-Induced Disseminated Intravascular Coagulation. *Critical Care Medicine*. 2016;44(11):e1132-e1136. doi:10.1097/CCM.0000000000001851

57. Kormelink TG, Arkesteijn GJA, Nauwelaers FA, van den Engh G, Nolte-'t Hoen ENM, Wauben MHM. Prerequisites for the analysis and sorting of extracellular vesicle subpopulations by high-resolution flow cytometry. *Cytometry Part A*. 2016;89(2):135-147. doi:10.1002/cyto.a.22644
58. Morales-Kastresana A, Musich TA, Welsh JA, et al. High-fidelity detection and sorting of nanoscale vesicles in viral disease and cancer. *Journal of Extracellular Vesicles*. 2019;8(1):1597603.
59. Morales-Kastresana A, Welsh JA, Jones JC. Detection and Sorting of Extracellular Vesicles and Viruses Using nanoFACS. *Current protocols in cytometry*. 2020;95(1):e81.
60. Morales-Kastresana A, Musich TA, Welsh JA, et al. High-fidelity detection and sorting of nanoscale vesicles in viral disease and cancer. *J Extracell Vesicles*. 2019;8(1):1597603. doi:10.1080/20013078.2019.1597603
61. Zuo Y, Zuo M, Yalavarthi S, et al. Neutrophil extracellular traps and thrombosis in COVID-19. *J Thromb Thrombolysis*. 2021;51(2):446-453. doi:10.1007/s11239-020-02324-z
62. Tomar B, Anders H-J, Desai J, Mulay SR. Neutrophils and Neutrophil Extracellular Traps Drive Necroinflammation in COVID-19. *Cells*. 2020;9(6):1383. doi:10.3390/cells9061383
63. Wang J, Li Q, Yin Y, et al. Excessive Neutrophils and Neutrophil Extracellular Traps in COVID-19. *Front Immunol*. 2020;0. doi:10.3389/fimmu.2020.02063
64. Leppkes M, Knopf J, Naschberger E, et al. Vascular occlusion by neutrophil extracellular traps in COVID-19. *EBioMedicine*. 2020;58:102925. doi:10.1016/j.ebiom.2020.102925
65. Krishnamachary B, Cook C, Kumar A, Spikes L, Chalise P, Dhillon NK. Extracellular vesicle-mediated endothelial apoptosis and EV-associated proteins correlate with COVID-19 disease severity. *Journal of Extracellular Vesicles*. 2021;10(9):e12117. doi:10.1002/jev2.12117
66. 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. *J Extracell Vesicles*. 2018;7(1):1535750. doi:10.1080/20013078.2018.1535750
67. Gill M, Motta-Mejia C, Kandzija N, et al. Placental Syncytiotrophoblast-Derived Extracellular Vesicles Carry Active NEP (Neprilysin) and Are Increased in Preeclampsia. *Hypertension*. 2019;73(5):1112-1119. doi:10.1161/HYPERTENSIONAHA.119.12707
68. Li W, Shao B, Liu C, et al. Noninvasive Diagnosis and Molecular Phenotyping of Breast Cancer through Microbead-Assisted Flow Cytometry Detection of Tumor-Derived Extracellular Vesicles. *Small Methods*. 2018;2(11):1800122. doi:https://doi.org/10.1002/smtd.201800122
69. Tian Y, Ma L, Gong M, et al. Protein Profiling and Sizing of Extracellular Vesicles from Colorectal Cancer Patients via Flow Cytometry. *ACS Nano*. 2018;12(1):671-680. doi:10.1021/acsnano.7b07782

Table 1: Extensive Phenotyping of NDEV from basal and stimulated cells

NDEV were phenotyped with a panel of 54 selected markers. The heat map illustrates the NDEV detection from 0% (dark blue) to 100% (red). Results were generated from three independent healthy donors. Data are presented as the mean value of the triplicate with standard deviation.

Stimuli	NDEV				<i>p-value</i>	Stimuli	NDEV				<i>p-value</i>
	No		fMLP				No		fMLP		
	Mean	SD	Mean	SD			Mean	SD	Mean	SD	
CD15	87,5	5,7	84,1	4,4	0.057	CD85d	2,2	0,8	2,2	0,7	>0.999
CD24	69,4	14,9	61,5	12,4	0.115	CD14	2,0	2,0	0,7	1,0	0.453
CD18	56,5	5,2	50,7	4,6	0.194	CD40	1,9	2,5	1,6	2,3	0.356
CD59	55,2	13,0	52,8	14,4	0.146	CD85j	1,7	2,5	1,1	1,5	0.392
CD65	51,4	25,8	50,1	23,8	0.310	CD11a	1,6	1,0	1,9	1,5	0.528
CD11b	48,7	19,8	42,2	16,6	0.284	CD120b	1,6	0,4	1,7	1,0	0.912
CD66b	43,8	12,8	49,8	1,3	0.714	CD300a	1,5	0,4	1,8	0,6	0.149
CD157	43,3	11,8	38,9	10,2	0.126	CD328	1,4	0,2	1,6	0,7	0.560
CD66c	41,2	13,8	42,8	11,3	0.823	CD86	1,1	0,7	0,9	1,0	0.499
CD45	39,2	12,0	35,2	8,2	0.246	CD26	1,0	1,3	0,8	1,0	0.270
CD16	34,4	12,9	25,9	5,2	0.292	CD184	1,0	0,9	1,1	1,1	0.667
Lactoferrine	25,6	5,3	26,6	4,1	0.535	CD126	0,7	1,0	0,4	0,6	0.356
CD13	19,9	8,1	16,9	6,2	0.339	CD109	0,7	0,6	0,4	0,5	0.297
CD32	19,9	6,2	17,2	2,4	0.564	CD64	0,6	0,5	0,5	0,4	0.580
TIA-1	14,7	0,6	24,6	2,6	0.169	OSCAR	0,5	0,3	0,7	0,2	0.300
CD31	13,5	2,2	13,6	2,3	0.156	CD166	0,5	0,5	0,5	0,3	0.635
CD55	12,1	1,7	9,9	1,0	0.057	CD62L	0,5	0,3	0,3	0,0	0.444
CD10	11,0	2,9	11,8	1,3	0.765	CD123	0,5	0,6	0,5	0,5	>0.999
CD44	9,5	1,4	9,5	2,7	0.807	CD116	0,4	0,6	0,5	0,6	0.423
CD43	9,1	1,1	8,8	1,0	0.732	CD54	0,4	0,0	0,3	0,1	0.225
CD11c	6,4	1,4	5,7	0,7	0.403	CD90	0,4	0,5	0,4	0,7	0.635
CD69	5,7	2,5	10,0	10,2	0.445	CD105	0,3	0,1	0,2	0,2	0.456
CD49d	3,4	3,2	2,3	2,5	0.110	CD106	0,3	0,2	0,2	0,1	0.808
CD58	3,1	0,6	3,1	0,9	0.935	HLADR	0,3	0,5	0,3	0,5	>0.999
CD33	2,7	3,0	2,3	3,3	0.473	CD62P	0,2	0,4	0,3	0,5	0.423
CD36	2,6	3,3	2,4	3,5	0.336	CD122	0,2	0,2	0,2	0,2	>0.999
CD48	2,3	0,9	2,2	1,0	0.754	CD85k	0,2	0,2	0,2	0,3	0.742

0%

50%

100%

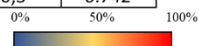


Table 2: Evaluation of specificity for the positive NDEV markers

The antibodies that stained more than 14% of AnnV+ NDEV were tested on EV derived from the main other leukocytes EV subpopulations: monocytes, CD4 T cells, CD8 T cells, B cells and NK cells. The heat map illustrates this detection from 0% (dark blue) to 100% (red) of double positive EV. Results were generated from three independent healthy donors. Data are presented as the mean value of the triplicates with standard deviation.

	EV derived from											
	Neutrophil		Monocyte		B cells		CD4+ T cells		CD8+ T cells		NK cells	
	Mean	SD	Mean	SD	Mean	SD	Mean	SD	Mean	SD	Mean	SD
CD15	87,5	5,7	4,5	2,5	5,5	0,2	7,2	2,5	8,4	1,0	4,8	0,7
CD24	69,4	14,9	3,5	1,5	22,9	7,6	8,1	3,7	7,1	5,6	5,0	1,9
CD18	56,5	5,2	46,8	10,0	6,9	1,7	30,8	15,1	39,1	23,4	39,6	10,9
CD59	55,2	13,0	8,3	0,2	13,9	5,2	42,0	10,8	27,4	6,8	18,7	7,4
CD65	51,4	25,8	8,0	3,3	14,1	2,7	0,6	0,1	8,0	4,5	12,4	9,5
CD11b	48,7	19,8	29,9	20,7	7,6	4,7	7,1	3,7	11,7	5,8	24,6	4,4
CD66b	43,8	12,8	4,9	2,5	1,8	1,7	2,1	2,4	2,4	1,8	1,4	0,9
CD157	43,3	11,8	46,0	4,2	4,5	2,6	6,0	1,4	3,7	2,0	5,1	2,6
CD66c	41,2	13,8	2,3	2,0	2,6	0,7	4,1	2,1	4,3	1,6	3,1	2,1
CD45	39,2	12,0	40,7	1,4	38,8	11,9	52,2	10,6	60,1	13,1	51,2	12,2
CD16	34,4	12,9	1,9	1,2	6,2	1,2	3,3	0,1	4,4	2,0	4,8	4,4
Lactoferrine	25,6	5,3	2,8	2,1	7,9	2,5	4,2	3,4	5,1	4,2	3,7	2,4
CD13	19,9	8,1	6,5	3,4	9,2	2,8	6,9	4,0	8,9	5,4	6,6	1,0
CD32	19,9	6,2	5,3	1,1	5,6	1,8	7,0	4,2	6,4	1,6	4,3	2,9
TIA-1	14,7	0,6	3,0	0,8	4,9	1,7	3,4	1,5	5,6	4,9	7,4	3,9



FIGURE 1

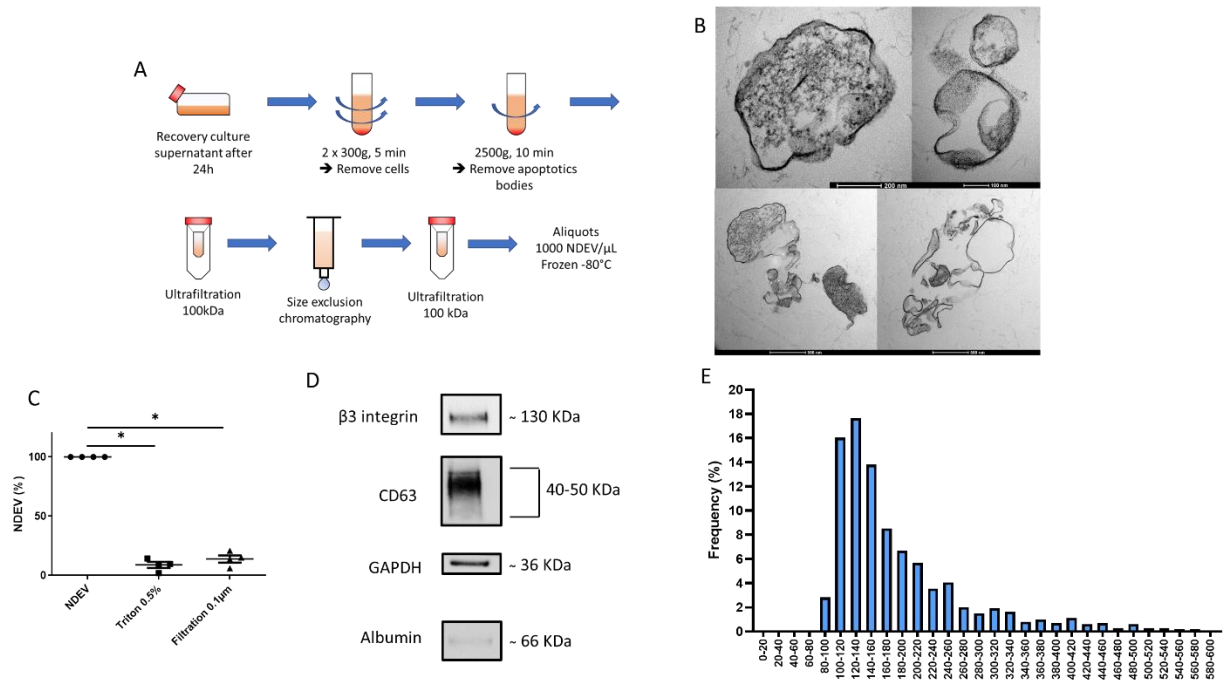


FIGURE 2

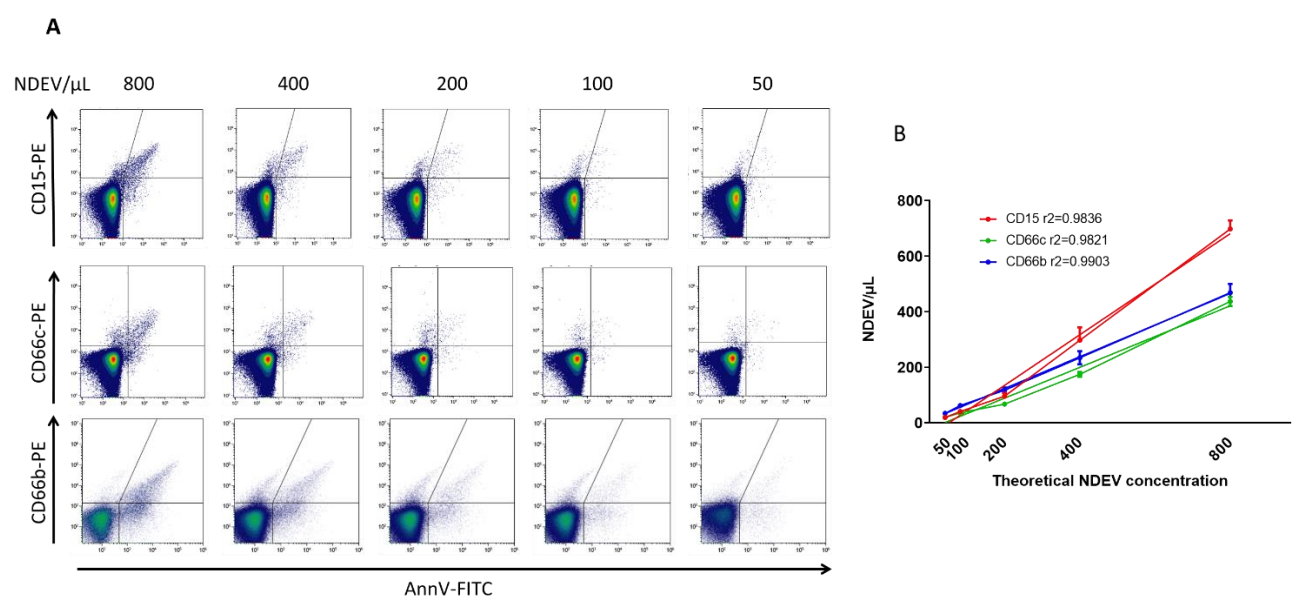


FIGURE 3

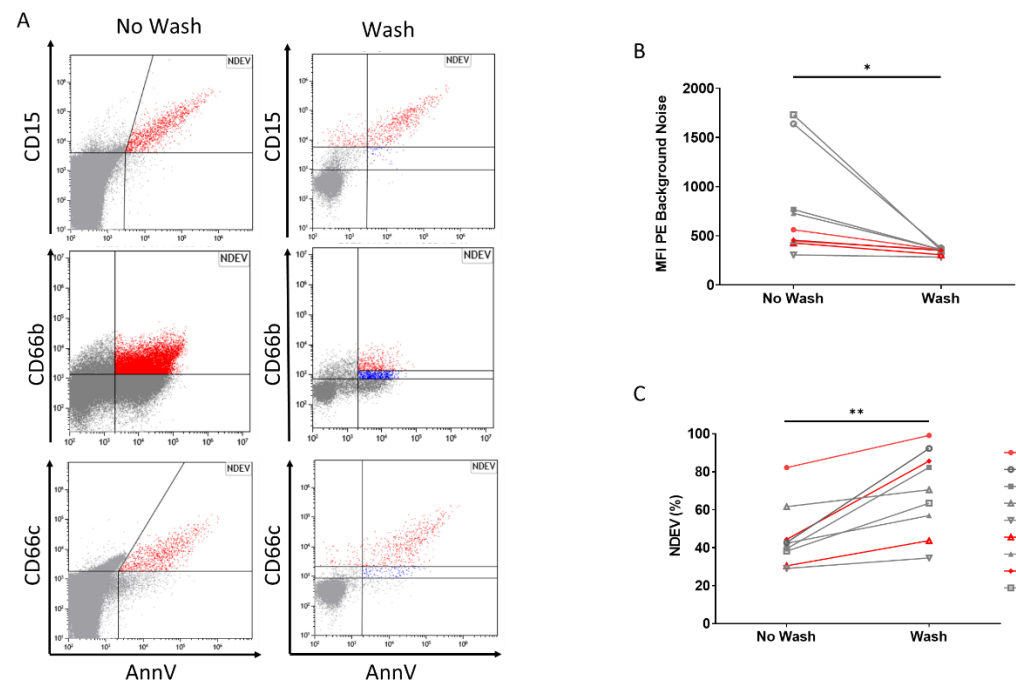


FIGURE 4

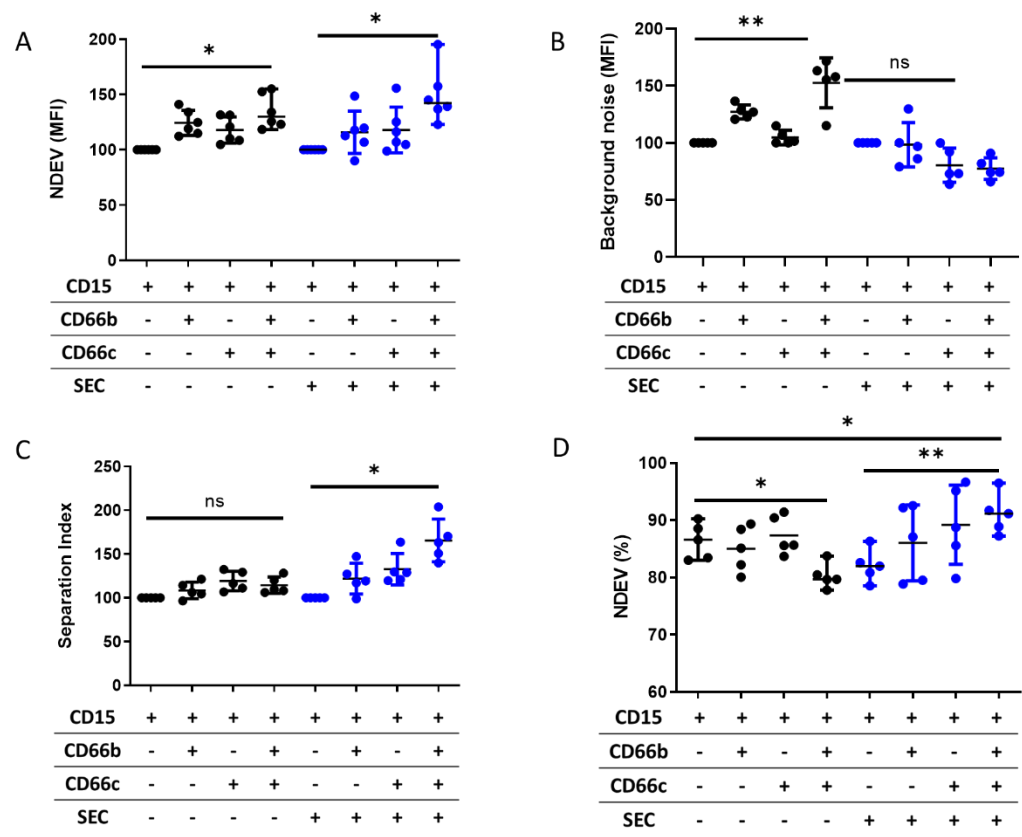


FIGURE 5

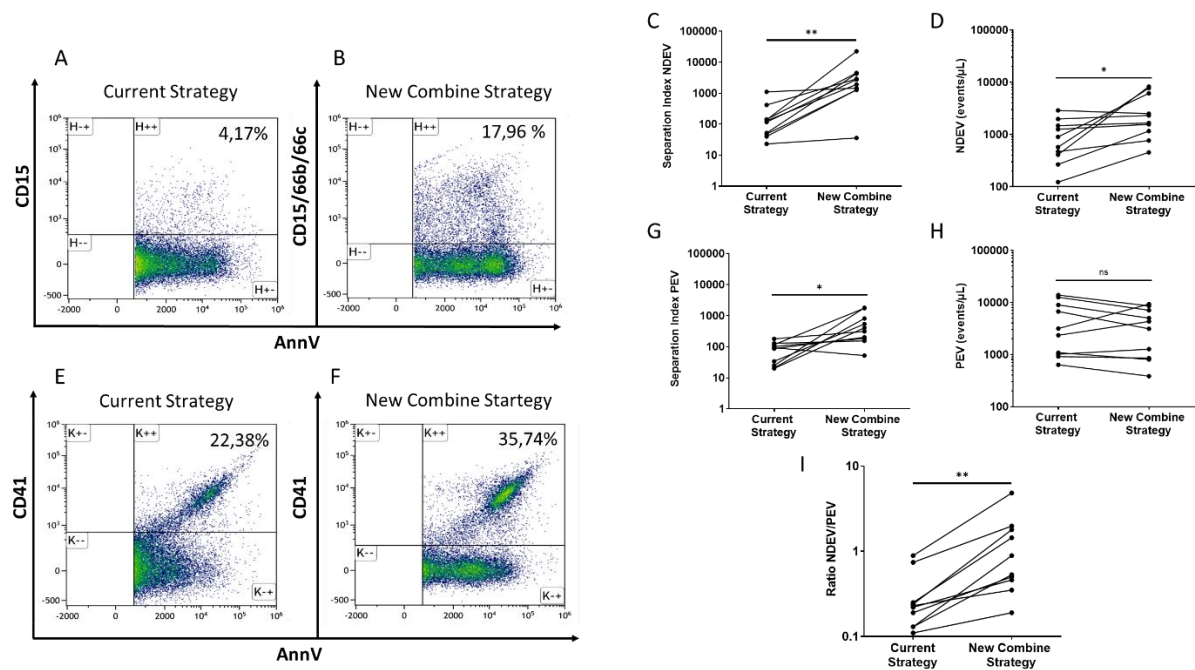
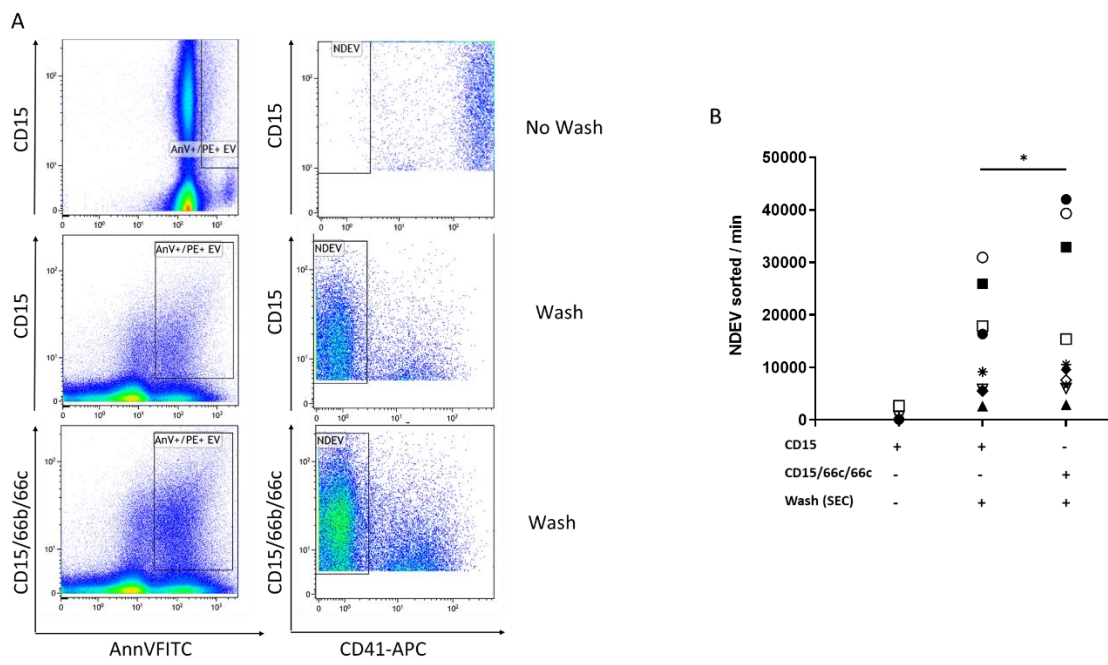
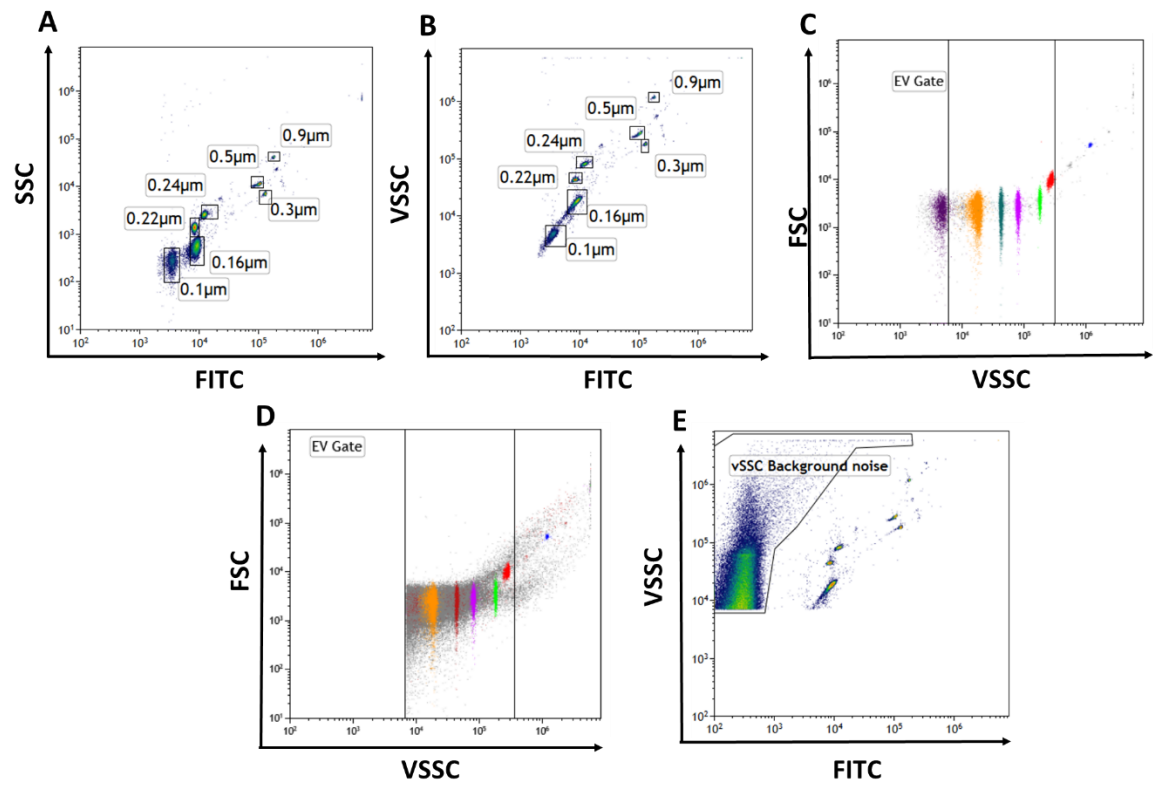


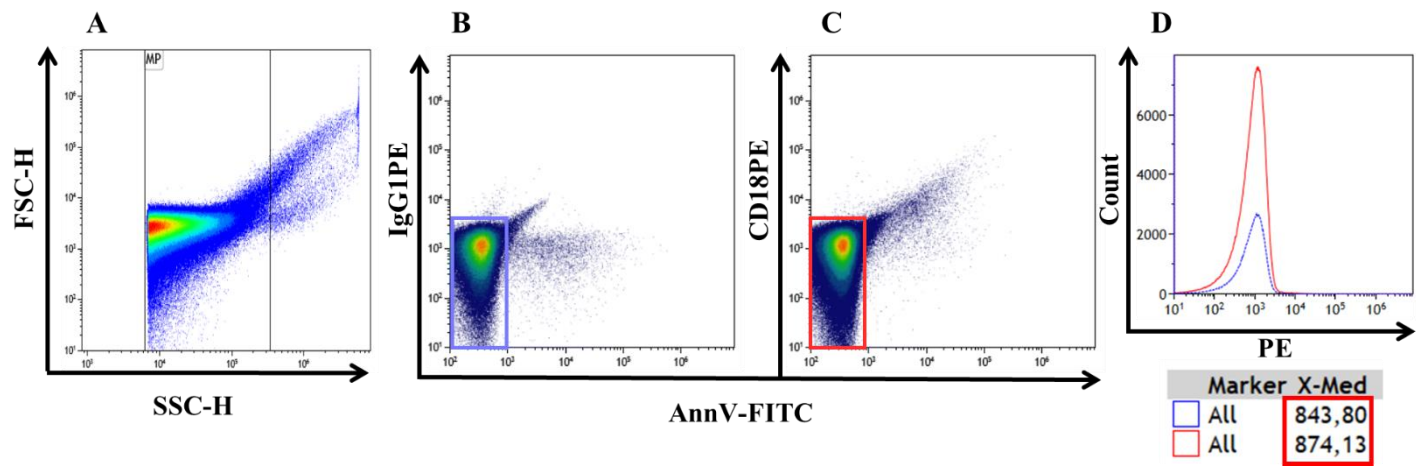
FIGURE 6



SUPPLEMENTAL FIGURE 1



SUPPLEMENTAL FIGURE 2



SUPPLEMENTAL FIGURE 3

Antibody Specificity	Range (µg/mL)	Selected Concentration (µg/mL)
CD15	0.11-0.22-0.43-0.86-1.72	0.43
CD24	0.09-0.17-0.34-0.69-1.38	1.38
CD18	0.06-0.12-0.24-0.48-0.96	0.24
CD59	0.11-0.22-0.43-0.86-1.72	0.11
CD65	0.86-1.72-3.44-6.89-13.77	13.77
CD11b	0.11-0.22-0.43-0.86-1.72	0.11
CD66b	0.11-0.22-0.43-0.86-1.72	0.11
CD157	0.11-0.22-0.43-0.86-1.72	0.22
CD66c	0.01-0.03-0.06-0.11-0.22	0,06
CD45	0.22-0.43-0.86-1.72-3.44	0.86
CD16	0.13-0.26-0.52-1.03-2.07	0.13
Lactoferrine	0.05-0.10-0.21-0.41-0.83	0.21
CD13	0.11-0.22-0.43-0.86-1.72	1.72
CD32	0.17-0.34-0.69-1.38-2.75	0.34
TIA-1	0.17-0.34-0.68-1.36-2.72	0.34

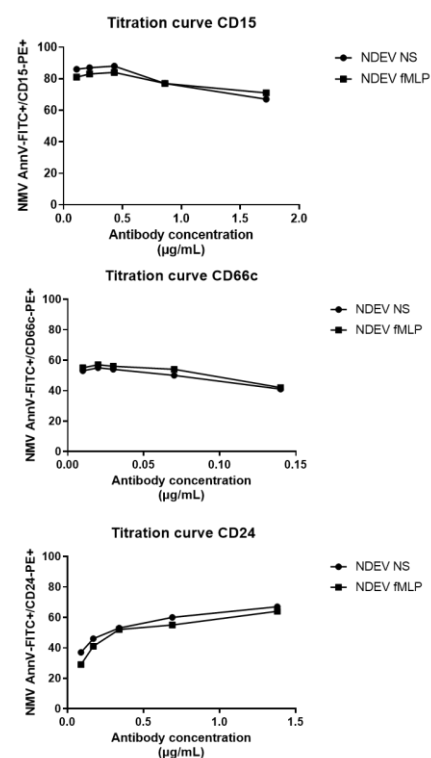


Figure captions

Figure 1: NDEV generation and features

(A) NDEV were collected from cell supernatant (basal or stimulated cells). Then, they were purified by serial centrifugations (to remove dead cells and apoptotic bodies), ultrafiltration, size chromatography separation and a second ultrafiltration. Pure NDEV were numerated to generate aliquots of 1000 AnnV+ NDEV/ μ l. (B) Transmission electron microscopy shows the phospholipid bilayer. (C) Triton 0.5X buffer and 0.1 μ m filtration treatment of NDEV preparation were done to demonstrate the submicronic size of NDEV (D) Western Blot show the presence of membranous proteins: subunit β 3 integrin and tetraspanin (CD63), cytoskeleton protein: GAPDH contained in NDEV, without major contamination by albumin. (E) Tunable Resistive Pulse Sensing was used to determine the size range and shape of NDEV.

Figure 2: Linearity of EV detection with single stain antibody

(A) 3 antibodies were tested on large EV free plasma supplemented with NDEV: CD15, CD66b, and CD66c. (B) 5 points dilutions range was used. Regression curve for each antibody was generated using three independent experiments. Each antibody was used as its optimal staining concentration.

Figure 3: Impact of SEC as a EV antibody stain washing method

SEC columns were used to remove unbound antibodies from NDEV. PE Standard deviation of (in arbitrary units) AnnV-/PE- negative events in EV gate was evaluated on EV samples stained with AnnexinV FITC and antibody and then washed with SEC step or not. (A) SEC was initially balanced with AnnexinV binding buffer. (B) The percentage of AnnV+/PE+ EV among AnnV+ EV was also checked between unwashed and washed vesicles. This experiment was done 3 times with 7 antibodies on NDEV. (C) Example of CD15, CD66b and CD66c detection on EV in unwashed (No SEC) and washed (SEC) conditions. Blue dots represent supplemental AnnV+/PE+ EV detected in wash protocol compared to Red dots detected in both conditions.

Figure 4: Impact of antibodies combination and SEC for NDEV detection

The best three antibodies for the detection of NDEV, CD15, CD66b and CD66b, were associated at their optimal concentration with the same PE fluorochrome in combination with AnnV FITC, and were compared to antibody alone for the detection of AnnV+/PE+ among AnnV+ total EV (A), standard deviation of PE labelling of background noise (B) and the median fluorescence intensity of double positive events (C). Comparisons were done with no washed (No SEC) and washed (SEC) stained EV. This figure is the result of 3 independent experiments.

Figure 5: Plasmatic NDEV detection improvement by optimized strategy

10 PFP from sepsis patients were stained according to classical or optimized method. For old method, PFP were stained with AnnV-FITC, CD15-PE and CD41-APC at their optimal concentrations, supplemented with binding buffer and directly read on CytoFLEX. For New Method, PFP were incubated with CD15, CD66b, CD66c PE and CD41 APC at their optimal concentrations. Samples were purified by circulating through binding buffer balanced SEC. EV fraction was then collected and an aliquot was finally stained with AnnV. Both conditions were analysed during 1 minute, with low speed of acquisition, with standardized FSC-SSC LEV gate. Example of NDEV (A-B) and Platelet EV (D-E) proportions among total AnnV+ LEV. (C and F) SI between LEV population and background was studied for NDEV and PEV respectively. (G) Finally, the ratio between plasmatic PEV and NDEV was determined for each sample with both methods.

Figure 6: Optimized method for the detection of NDEV in COVID-19 plasma led to increase LEV sort efficiency

Three conditions were compared: unwashed condition with CD15 staining alone (n=5), washed condition with CD15 staining alone (n=10) and washed condition with antibody combination staining (CD15/66b/66c) (n=10). (A) Number of NDEV detected per minutes by cell sorter. (B) Comparison of the ratio between NDEV and PEV for staining with CD15 alone and antibody combination (CD15/66b/66c) (C) Illustration of dot plot showing the NDEV sorting by the three conditions.

Supplemental Figure 1: Design of EV protocol on CytoFLEX instrument.

Gigamix+ Beads (0.9 μ m blue, 0.5 μ m red, 0.3 μ m green, 0.24 μ m purple, 0.22 μ m dark green, 0.16 μ m orange, 0.1 μ m dark purple dots) were acquired on CytoFLEX with a FITC threshold to evaluate SSC (A), VSSC (B) and FSC (C) resolution. As the most resolved scatter parameter was VSSC, protocole triggering was then switched to this parameter to 0.1 μ m bead-equivalent cut-off (D). With these settings, optical and fluidic background noise (E, grey dots) were limited and did not generate significant acquisition abort during acquisition.

Supplemental Figure 2: Choice of the best concentration for antibodies

Series of 5 twofold dilutions were performed for the 54 antibodies and then tested on NDEV (from basal or activated cells). Titration curves were generated by analyzing the percentage of AnnV+/Ab+ EV among total Annexin + EV. Results of CD15, CD66c and CD24 are presented as example.

Supplemental Figure 3: Fluorescence Matching of PE antibodies.

For each antibody tested during the screening process, a control condition was realized using an isotype control of the same IgG sub class and AnnexinV FITC to stain EV. From the FSC - SSC EV gate (A), a FITC – PE cytogram was built for the analysis of EV. The optimal concentration of PE isotype (B) was determined by comparison of MFI (median Fluorescence Intensity) in PE channel for the double negative events (blue and red box on B and C graphs), using an antibody of interest at its optimal concentration (C) In this example, CD18 used at 2,5 µL (saturating concentration for EV staining) and IgG1 isotype at 3 µL matched correctly for the double negative events (D).

DISCUSSION & PERSPECTIVES

Les MV sont des éléments clés de la communication intercellulaire grâce au transport de protéines, de lipides et d'acides nucléiques issus de la cellule parentale. De plus, ces MV sont facilement accessibles, car retrouvées dans un grand nombre de fluides biologiques tels que le sang, la salive ou l'urine. Ces caractéristiques positionnent donc les MV comme de potentiels biomarqueurs. La CMF est l'une des méthodes les plus utilisées pour l'étude des MV. Elle permet en effet de quantifier les MV contenues dans un échantillon, mais également de déterminer la présence de protéines au niveau membranaire ou intracytoplasmique.

Cependant, il existe des limites à l'utilisation de cette technique. Tout d'abord, des limites liées aux MV, les MV sont des éléments de petite taille (entre 100 et 1000 nm) la densité antigénique des protéines est donc faible et rend la détection, des éléments les plus petits, impossible. De plus les MV possède un faible indice de réfraction ce qui induit un faible signal des paramètres de dispersion lumineuse (scatters). Des limites sont également liées à la technique de CMF. En premier lieu, le bruit de fond généré par l'appareil peut provenir de différents composants : le système fluidique, électronique, optique et de l'échantillon lui-même. C'est sur le bruit provenant de l'échantillon qu'il est le plus facile d'agir grâce à des techniques de purification telles que la chromatographie d'exclusion de taille. Ces éléments contribuent à générer des signaux non liés à la détection de MV et empêchent la diminution des seuils de détection et une bonne résolution. De plus, la sensibilité de fluorescence des cytomètres est une contrainte importante dans la distinction des éléments faiblement fluorescents et le bruit de fond. Le choix du cytomètre de flux utilisés pour l'analyse de MV est donc un élément déterminant.

Il existe des cytomètres de nouvelle génération, optimisés pour l'analyse des MV, qui permettent une nette amélioration de leur détection et de leur numération. Comme vu précédemment, le CytoFLEX possède plusieurs améliorations techniques favorables à l'étude des MV. La présence photodiodes à avalanches comme photodétecteurs permet d'obtenir un rendement quantique supérieur aux photomultiplicateurs. Ainsi que le paramètre de diffraction optique SSC par le laser violet, et non par le laser bleu, permet une libération d'énergie plus importante. L'amélioration de la détection en fluorescence des MV est donc un enjeu important pour améliorer leur détection et leur numération. Dans ce travail nous proposons plusieurs

améliorations techniques pour obtenir une meilleure séparation entre le bruit le fond de l'instrument et les MV étudiées.

Tout d'abord, le choix des antigènes utilisés pour une détection spécifique et sensible d'une sous-population est un enjeu majeur. La sensibilité correspond ici à la présence de l'antigène sur le plus grand pourcentage de MV d'un échantillon de cette sous-population purifiée. La spécificité a été évaluée ici par rapport aux autres populations de MV circulantes de leucocytes (monocytes, lymphocytes TCD4, TCD8, B et NK). Il aurait également été possible de comparer ces expressions antigéniques avec d'autres populations de MV circulantes, par exemple issu de plaquettes ou de globules rouges. Il n'existe pas dans la littérature d'étude phénotypique étendue des protéines membranaires portées par les MV par CMF. L'utilisation de la CMF pour réaliser ce dépistage antigénique est essentielle et ne pourrait pas être remplacée par d'autres techniques comme la protéomique puisque seules les protéines membranaires nous intéressent. La plupart des études choisissent de façon empirique les marqueurs en fonction de ceux exprimés par la cellule parentale. Cependant, plusieurs études montrent l'existence d'adressages membranaires variables en fonction des protéines. Certaines protéines membranaires vont être enrichies sur les MV, alors que d'autres, pourtant bien présentes au niveau cellulaire, ne seront pas détectables sur les MV générées à cause d'une densité antigénique trop faible^{127,128}. Plusieurs mécanismes ont été étudiés et certaines protéines ont été rapportées comme permettant un adressage sélectif de certaines protéines. Par exemple la protéine ARF6 cible des protéines spécifiques comme l'intégrine $\beta 1$ ou le complexe majeur d'histocompatibilité de classe I en vue de leur incorporation à la membrane des MV¹²⁹. Certains paramètres semblent donc influencer l'adressage protéique à la surface des MV comme la présence d'un ancrage glycosylphosphatidylinositol (GPI), les radeaux lipidiques^{130,131} ou les protéines de la famille des intégrines qui semblent mieux embarquées à la membrane des MV. Il serait intéressant de pouvoir déterminer la probabilité de la présence d'une protéine à la surface des MV façon informatique, grâce à la création d'un algorithme de décision intégrant différentes caractéristiques inhérentes à la protéine étudiée. La réalisation d'un phénotypage étendu nous a permis de choisir, parmi les 54 anticorps testés, 3 possédant les meilleures sensibilités et spécificités : anticorps anti-CD15, anti-CD66b et anti-CD66c, d'après les clones testés dans l'étude.

Lors de la réalisation de ce phénotypage étendu nous avons également réalisé une gamme de dilution au demi en 5 points. Cette étape nous a permis d'établir les concentrations

optimales d'utilisation des anticorps c'est-à-dire permettant d'obtenir le plus grand pourcentage d'éléments doubles positifs (Annexine V et anticorps d'intérêt). Ceci est également un travail important puisque les réactifs utilisés pour marquer les MV ne sont pas initialement mis au point pour les détecter. Comme illustré dans notre travail, l'utilisation de l'anticorps pur ne permet pas toujours d'avoir le taux de positivité le plus important. Un effet cloche est observé dans la plupart des cas. La création de réactif spécifique à l'étude des MV pourrait donc être une perspective intéressante.

Après la détermination des meilleurs antigènes, nous avons les combiner en utilisant le même fluorochrome (phycoérythrine) dans le but d'augmenter la brillance de chaque événement. Cette technique permet d'augmenter la médiane de fluorescence des MV analysées, mais la séparation entre les MV et le bruit de fond diminue. Cela est dû à l'augmentation du bruit de fond lié à la présence d'anticorps libres, non fixés aux MV. De plus, il est possible que l'accumulation de différents anticorps pour marquer les MV puisse induire un encombrement stérique qui finirait par ne plus améliorer cette intensité de fluorescence des éléments.

Pour remédier à l'augmentation du bruit de fond apportée par la présence d'anticorps libre nous proposons de passer sur colonne de chromatographie de taille les échantillons après les avoir marqués pour séparer les MV marquées, éluées rapidement de la colonne, des anticorps non fixés. Cette technique de purification des MV a tout d'abord fait ses preuves pour la purification des MV du milieu extracellulaire les environnant, par exemple de milieu de culture cellulaire¹³², ou d'échantillons biologiques (plasma¹³³, lavage nasal¹³⁴, urine¹³⁵, liquide synovial¹³⁶...). Dans ce travail nous proposons de l'utiliser associée à la combinaison des 3 anticorps, pour diminuer le bruit de fond apporté par les anticorps libres et donc avoir une meilleure discrimination entre les MV et le bruit de fond.

L'association de ces améliorations techniques (le choix d'antigènes sensibles et spécifiques, la combinaison de 3 anticorps et l'utilisation de la SEC post-marquage) nous permet d'augmenter la détection des NDMV à partir d'échantillons plasmatiques de patients atteints de sepsis. En effet, la quantification des NDMV est augmentée en la rapportant à celle des MV issues de plaquettes qui ont subi le même processus de purification. Mais il ne s'agit plus d'une numération absolue des MV contenues dans un échantillon. L'utilisation de la SEC entraîne une perte de matériel et une dilution de l'échantillon. C'est pour cette raison que nous comparons dans notre étude la numération des NDMV à celle de MV issues de plaquettes contenues dans le même échantillon pour apprécier la variation de la détection des NDMV.

Le tri par CMF de MV est un enjeu technique. En effet, le tri appliqué au MV possède de nombreuses limites ajoutées au tri cellulaire. La première remarque est que les appareils disponibles aujourd'hui sont des instruments optimisés pour le tri cellulaire et non pas pour le tri de MV¹³⁷. De même, l'obtention d'un nombre intéressant de MV post-tri pour faire des tests de caractérisations supplémentaires entraîne des temps d'acquisition très longs. De plus, les MV sont diluées dans un volume important de tampon une étape supplémentaire de concentration de l'échantillon sera alors probablement nécessaire et conduira à la diminution du rendement de l'expérience. Enfin, la question de la pureté de l'échantillon obtenu post-tri pose également question. Quelques études ont montré que le tri de MV était possible à partir de surnageant de culture cellulaire, mais aucune à partir d'échantillon biologique¹¹⁴. Notre travail montre que la combinaison des différents anticorps associée au lavage de l'échantillon post-marquage permet de procéder au tri des NDMV à partir d'échantillons plasmatiques issus de patients COVID-19.

Ce travail s'intéresse particulièrement aux NDMV et nous avons vu l'intérêt de l'amélioration de leur détection dans différents contextes physiopathologiques. De nombreuses études montrent simplement une augmentation de cette sous-population de VE sans la relier à un événement clinique ou au pronostic des patients^{50,55,138}. De façon intéressante, il a également montré que cette mesure était corrélée à la gravité des patients atteints de bronchopneumopathie chronique obstructive⁶², au pronostic des patients atteints de sepsis⁴⁹, elles sont également un prédicteur indépendant de la mortalité des patients atteints d'une endocardite infectieuse⁵² ou encore dans le syndrome de détresse respiratoire aiguë ou elles sont un facteur pronostic de la survie des patients⁵³.

Mais cette démarche pourrait être appliquée à d'autres sous-populations de MV pour améliorer leur détection par CMF dans des échantillons biologiques. Par exemple, en oncologie la détection de MV circulantes d'origine cancéreuse pourrait permettre un diagnostic non invasif. Plusieurs études proposent de concentrer les MV sur des billes recouvertes par des anticorps anti glypican-1¹³⁹, EpCam (Epithelial cell adhesion molecule) ou HER2 (Human Epidermal Growth Factor Receptor-2)¹⁴⁰ puis de les détecter par CMF. Dans le cas de la recherche du glypican c'est le cancer pancréatique qui est traqué chez les patients, alors que l'intensité d'expression de la protéine HER2 permet de classer les types de cancers du sein. Une autre étude s'intéresse au cancer colorectal et propose la détection de MV CD147 positive pour orienter le diagnostic⁹³. Il existe également un intérêt grandissant concernant la détection des

MV issues du placenta dans la détection précoce de complications de la grossesse telles que la prééclampsie. Une étude propose le dosage de MV double positive pour les marqueurs : PLAP (placenta alcaline phosphatase) et NEP (néprilysine) pour mettre en évidence plus tôt au cours de la grossesse la survenue de l'état de prééclampsie et ainsi mieux prendre en charge les patientes¹⁴¹. La détection d'une sous-population de MV peut aussi aider à établir le pronostic d'un patient, par exemple le dosage de MV issues de cellules endothéliales est un facteur pronostic négatif au cours du cancer colorectal¹⁴². Cette démarche pourrait être également appliquée aux MV issues de lymphocytes pour ensuite essayer de détecter les MV dans des contextes pathologiques comme les lymphomes et pourrait constituer un biomarqueur circulant facilement accessible de diagnostic ou de rechute de la pathologie. L'amélioration de la détection des MV par CMF trouvera donc des applications dans de nombreux domaines de la biologie médicale. La CMF est une technique présente dans de nombreux laboratoires de biologie médicale permettra de favoriser leur utilisation comme biomarqueur en routine hospitalière à partir de prélèvement peu invasif, l'objectif étant d'encourager l'utilisation de la biopsie liquide.

BIBLIOGRAPHIE

1. Tian Y, Gong M, Hu Y, et al. Quality and efficiency assessment of six extracellular vesicle isolation methods by nano-flow cytometry. *J Extracell Vesicles*. 2020;9(1):1697028. doi:10.1080/20013078.2019.1697028
2. Freyssinet J-M, Dignat-George F. More on: Measuring circulating cell-derived microparticles. *J Thromb Haemost*. 2005;3(3):613-614. doi:10.1111/j.1538-7836.2005.01169.x
3. Coumans FAW, Brisson AR, Buzas EI, et al. Methodological Guidelines to Study Extracellular Vesicles. *Circ Res*. 2017;120(10):1632-1648. doi:10.1161/CIRCRESAHA.117.309417
4. 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. *J Extracell Vesicles*. 2018;7(1):1535750. doi:10.1080/20013078.2018.1535750
5. Poon IKH, Parkes MAF, Jiang L, et al. Moving beyond size and phosphatidylserine exposure: evidence for a diversity of apoptotic cell-derived extracellular vesicles in vitro. *J Extracell Vesicles*. 2019;8(1):1608786. doi:10.1080/20013078.2019.1608786
6. Depraetere V. “Eat me” signals of apoptotic bodies. *Nat Cell Biol*. 2000;2(6):E104. doi:10.1038/35014098
7. Berda-Haddad Y, Robert S, Salers P, et al. Sterile inflammation of endothelial cell-derived apoptotic bodies is mediated by interleukin-1 α . *Proc Natl Acad Sci USA*. 2011;108(51):20684-20689. doi:10.1073/pnas.1116848108
8. 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
9. Liu D, Dong Z, Wang J, Tao Y, Sun X, Yao X. The existence and function of mitochondrial component in extracellular vesicles. *Mitochondrion*. 2020;54:122-127. doi:10.1016/j.mito.2020.08.005
10. Kim KM, Abdelmohsen K, Mustapic M, Kapogiannis D, Gorospe M. RNA in extracellular vesicles. *WIREs RNA*. 2017;8(4):e1413. doi:https://doi.org/10.1002/wrna.1413
11. Liu T, Zhang Q, Zhang J, et al. EVmiRNA: a database of miRNA profiling in extracellular vesicles. *Nucleic Acids Research*. 2019;47(D1):D89-D93. doi:10.1093/nar/gky985
12. Wiklander OPB, Nordin JZ, O’Loughlin A, et al. Extracellular vesicle in vivo biodistribution is determined by cell source, route of administration and targeting. *J Extracell Vesicles*. 2015;4:26316. doi:10.3402/jev.v4.26316
13. Thomas GM, Panicot-Dubois L, Lacroix R, Dignat-George F, Lombardo D, Dubois C. Cancer cell-derived microparticles bearing P-selectin glycoprotein ligand 1 accelerate thrombus formation in vivo. *J Exp Med*. 2009;206(9):1913-1927. doi:10.1084/jem.20082297

14. Matsumoto A, Takahashi Y, Chang H-Y, et al. Blood concentrations of small extracellular vesicles are determined by a balance between abundant secretion and rapid clearance. *J Extracell Vesicles*. 2020;9(1):1696517. doi:10.1080/20013078.2019.1696517
15. Tschuschke M, Kocherova I, Bryja A, et al. Inclusion Biogenesis, Methods of Isolation and Clinical Application of Human Cellular Exosomes. *J Clin Med*. 2020;9(2). doi:10.3390/jcm9020436
16. Perez-Hernandez D, Gutiérrez-Vázquez C, Jorge I, et al. The intracellular interactome of tetraspanin-enriched microdomains reveals their function as sorting machineries toward exosomes. *J Biol Chem*. 2013;288(17):11649-11661. doi:10.1074/jbc.M112.445304
17. Sharma R, Huang X, Brekken RA, Schroit AJ. Detection of phosphatidylserine-positive exosomes for the diagnosis of early-stage malignancies. *Br J Cancer*. 2017;117(4):545-552. doi:10.1038/bjc.2017.183
18. Qian X, An N, Ren Y, Yang C, Zhang X, Li L. Immunosuppressive Effects of Mesenchymal Stem Cells-derived Exosomes. *Stem Cell Rev Rep*. Published online September 15, 2020. doi:10.1007/s12015-020-10040-7
19. Lai RC, Arslan F, Lee MM, et al. Exosome secreted by MSC reduces myocardial ischemia/reperfusion injury. *Stem Cell Res*. 2010;4(3):214-222. doi:10.1016/j.scr.2009.12.003
20. Ha DH, Kim H-K, Lee J, et al. Mesenchymal Stem/Stromal Cell-Derived Exosomes for Immunomodulatory Therapeutics and Skin Regeneration. *Cells*. 2020;9(5). doi:10.3390/cells9051157
21. Farcas M, Inngjerdingen M. Natural killer cell-derived extracellular vesicles in cancer therapy. *Scand J Immunol*. 2020;92(4):e12938. doi:10.1111/sji.12938
22. Pi F, Binzel DW, Lee TJ, et al. Nanoparticle orientation to control RNA loading and ligand display on extracellular vesicles for cancer regression. *Nat Nanotechnol*. 2018;13(1):82-89. doi:10.1038/s41565-017-0012-z
23. Pawlowski CL, Li W, Sun M, et al. Platelet microparticle-inspired clot-responsive nanomedicine for targeted fibrinolysis. *Biomaterials*. 2017;128:94-108. doi:10.1016/j.biomaterials.2017.03.012
24. Ma Q, Fan Q, Han X, et al. Platelet-derived extracellular vesicles to target plaque inflammation for effective anti-atherosclerotic therapy. *J Control Release*. 2020;329:445-453. doi:10.1016/j.jconrel.2020.11.064
25. Gomez I, Ward B, Souilhol C, et al. Neutrophil microvesicles drive atherosclerosis by delivering miR-155 to atheroprone endothelium. *Nat Commun*. 2020;11(1):214. doi:10.1038/s41467-019-14043-y
26. Lacroix R, Vallier L, Bonifay A, et al. Microvesicles and Cancer Associated Thrombosis. *Semin Thromb Hemost*. 2019;45(6):593-603. doi:10.1055/s-0039-1693476

27. Obermayer G, Afonyushkin T, Goederle L, et al. Natural IgM antibodies inhibit microvesicle-driven coagulation and thrombosis. *Blood*. 2020;(blood.2020007155). doi:10.1182/blood.2020007155
28. Yee NS, Zhang S, He H-Z, Zheng S-Y. Extracellular Vesicles as Potential Biomarkers for Early Detection and Diagnosis of Pancreatic Cancer. *Biomedicines*. 2020;8(12). doi:10.3390/biomedicines8120581
29. Minciacchi VR, You S, Spinelli C, et al. Large oncosomes contain distinct protein cargo and represent a separate functional class of tumor-derived extracellular vesicles. *Oncotarget*. 2015;6(13):11327-11341. doi:10.18632/oncotarget.3598
30. Rajeev Krishnan S, De Rubis G, Suen H, Joshua D, Lam Kwan Y, Bebawy M. A liquid biopsy to detect multidrug resistance and disease burden in multiple myeloma. *Blood Cancer J*. 2020;10(3):37. doi:10.1038/s41408-020-0304-7
31. Khalife J, Sanchez JF, Pichiorri F. Extracellular Vesicles in Hematological Malignancies: From Biomarkers to Therapeutic Tools. *Diagnostics (Basel)*. 2020;10(12). doi:10.3390/diagnostics10121065
32. Zhou B, Xu K, Zheng X, et al. Application of exosomes as liquid biopsy in clinical diagnosis. *Signal Transduct Target Ther*. 2020;5(1):144. doi:10.1038/s41392-020-00258-9
33. Zhou B, Xu K, Zheng X, et al. Application of exosomes as liquid biopsy in clinical diagnosis. *Signal Transduct Target Ther*. 2020;5(1):144. doi:10.1038/s41392-020-00258-9
34. Yoshioka Y, Kosaka N, Konishi Y, et al. Ultra-sensitive liquid biopsy of circulating extracellular vesicles using ExoScreen. *Nat Commun*. 2014;5:3591. doi:10.1038/ncomms4591
35. Hellum M, Øvstebø R, Trøseid A-MS, Berg JP, Brandtzaeg P, Henriksson CE. Microparticle-associated tissue factor activity measured with the Zymuphen MP-TF kit and the calibrated automated thrombogram assay. *Blood Coagulation & Fibrinolysis*. 2012;23(6):520-526. doi:10.1097/MBC.0b013e328354a256
36. Timár CI, Lorincz AM, Csépanyi-Kömi R, et al. Antibacterial effect of microvesicles released from human neutrophilic granulocytes. *Blood*. 2013;121(3):510-518. doi:10.1182/blood-2012-05-431114
37. Lőrincz ÁM, Bartos B, Szombath D, et al. Role of Mac-1 integrin in generation of extracellular vesicles with antibacterial capacity from neutrophilic granulocytes. *Journal of Extracellular Vesicles*. 2020;9(1):1698889. doi:10.1080/20013078.2019.1698889
38. Mesri M, Altieri DC. Leukocyte microparticles stimulate endothelial cell cytokine release and tissue factor induction in a JNK1 signaling pathway. *J Biol Chem*. 1999;274(33):23111-23118.
39. Hong Y, Eleftheriou D, Hussain AAK, et al. Anti-neutrophil cytoplasmic antibodies stimulate release of neutrophil microparticles. *J Am Soc Nephrol*. 2012;23(1):49-62. doi:10.1681/ASN.2011030298

40. Kambas K, Chrysanthopoulou A, Vassilopoulos D, et al. Tissue factor expression in neutrophil extracellular traps and neutrophil derived microparticles in antineutrophil cytoplasmic antibody associated vasculitis may promote thromboinflammation and the thrombophilic state associated with the disease. *Ann Rheum Dis*. 2014;73(10):1854-1863. doi:10.1136/annrheumdis-2013-203430
41. Wang Y, Luo L, Braun OÖ, et al. Neutrophil extracellular trap-microparticle complexes enhance thrombin generation via the intrinsic pathway of coagulation in mice. *Scientific Reports*. 2018;8(1):4020. doi:10.1038/s41598-018-22156-5
42. Lacroix R, Plawinski L, Robert S, et al. Leukocyte- and endothelial-derived microparticles: a circulating source for fibrinolysis. *Haematologica*. 2012;97(12):1864-1872. doi:10.3324/haematol.2012.066167
43. Johnson BL, Kueth JW, Caldwell CC. Neutrophil derived microvesicles: emerging role of a key mediator to the immune response. *Endocr Metab Immune Disord Drug Targets*. 2014;14(3):210-217. doi:10.2174/1871530314666140722083717
44. Butin-Israeli V, Bui TM, Wiesolek HL, et al. Neutrophil-induced genomic instability impedes resolution of inflammation and wound healing. *J Clin Invest*. 2019;129(2):712-726. doi:10.1172/JCI122085
45. Pluskota E, Woody NM, Szpak D, et al. Expression, activation, and function of integrin alphaMbeta2 (Mac-1) on neutrophil-derived microparticles. *Blood*. 2008;112(6):2327-2335. doi:10.1182/blood-2007-12-127183
46. Eken C, Sadallah S, Martin PJ, Treves S, Schifferli JA. Ectosomes of polymorphonuclear neutrophils activate multiple signaling pathways in macrophages. *Immunobiology*. 2013;218(3):382-392. doi:10.1016/j.imbio.2012.05.021
47. Eken C, Martin PJ, Sadallah S, Treves S, Schaller M, Schifferli JA. Ectosomes released by polymorphonuclear neutrophils induce a MerTK-dependent anti-inflammatory pathway in macrophages. *J Biol Chem*. 2010;285(51):39914-39921. doi:10.1074/jbc.M110.126748
48. Nieuwland R, Berckmans RJ, McGregor S, et al. Cellular origin and procoagulant properties of microparticles in meningococcal sepsis. *Blood*. 2000;95(3):930-935.
49. Chen H-P, Wang X-Y, Pan X-Y, et al. Circulating Neutrophil-Derived Microparticles Associated with the Prognosis of Patients with Sepsis. *J Inflamm Res*. 2020;13:1113-1124. doi:10.2147/JIR.S287256
50. Lehner GF, Harler U, Haller VM, et al. Characterization of Microvesicles in Septic Shock Using High-Sensitivity Flow Cytometry. *Shock*. 2016;46(4):373-381. doi:10.1097/SHK.0000000000000657
51. Danesh A, Inglis HC, Abdel-Mohsen M, et al. Granulocyte-Derived Extracellular Vesicles Activate Monocytes and Are Associated With Mortality in Intensive Care Unit Patients. *Front Immunol*. 2018;9:956. doi:10.3389/fimmu.2018.00956

52. Guimarães Júnior MH, Ferrari TCA, Teixeira-Carvalho A, et al. Cell-derived microvesicles in infective endocarditis: Role in diagnosis and potential for risk stratification at hospital admission. *J Infect.* 2019;79(2):101-107. doi:10.1016/j.jinf.2019.06.005
53. Guervilly C, Lacroix R, Forel J-M, et al. High levels of circulating leukocyte microparticles are associated with better outcome in acute respiratory distress syndrome. *Crit Care.* 2011;15(1):R31. doi:10.1186/cc9978
54. Sarlon-Bartoli G, Bennis Y, Lacroix R, et al. Plasmatic level of leukocyte-derived microparticles is associated with unstable plaque in asymptomatic patients with high-grade carotid stenosis. *J Am Coll Cardiol.* 2013;62(16):1436-1441. doi:10.1016/j.jacc.2013.03.078
55. Sionis A, Suades R, Sans-Roselló J, et al. Circulating microparticles are associated with clinical severity of persistent ST-segment elevation myocardial infarction complicated with cardiogenic shock. *Int J Cardiol.* 2018;258:249-256. doi:10.1016/j.ijcard.2017.10.044
56. Suades R, Padró T, Crespo J, et al. Liquid Biopsy of Extracellular Microvesicles Predicts Future Major Ischemic Events in Genetically Characterized Familial Hypercholesterolemia Patients. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2019;39(6):1172-1181. doi:10.1161/ATVBAHA.119.312420
57. Wang S, Dong X, Gao J, Wang Z. Targeting Inflammatory Vasculature by Extracellular Vesicles. *AAPS J.* 2018;20(2):37. doi:10.1208/s12248-018-0200-2
58. Dong X, Gao J, Zhang CY, Hayworth C, Frank M, Wang Z. Neutrophil Membrane-Derived Nanovesicles Alleviate Inflammation To Protect Mouse Brain Injury from Ischemic Stroke. *ACS Nano.* 2019;13(2):1272-1283. doi:10.1021/acsnano.8b06572
59. Diamant M, Nieuwland R, Pablo RF, Sturk A, Smit JWA, Radder JK. Elevated numbers of tissue-factor exposing microparticles correlate with components of the metabolic syndrome in uncomplicated type 2 diabetes mellitus. *Circulation.* 2002;106(19):2442-2447.
60. Leroyer AS, Isobe H, Lesèche G, et al. Cellular origins and thrombogenic activity of microparticles isolated from human atherosclerotic plaques. *J Am Coll Cardiol.* 2007;49(7):772-777. doi:10.1016/j.jacc.2006.10.053
61. Porro C, Lepore S, Trotta T, et al. Isolation and characterization of microparticles in sputum from cystic fibrosis patients. *Respir Res.* 2010;11:94. doi:10.1186/1465-9921-11-94
62. Soni S, Garner JL, O'Dea KP, et al. Intra-alveolar neutrophil-derived microvesicles are associated with disease severity in COPD. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* Published online November 4, 2020. doi:10.1152/ajplung.00099.2020
63. Lőrincz ÁM, Timár CI, Marosvári KA, et al. Effect of storage on physical and functional properties of extracellular vesicles derived from neutrophilic granulocytes. *J Extracell Vesicles.* 2014;3:25465. doi:10.3402/jev.v3.25465

64. Benedikter BJ, Bouwman FG, Vajen T, et al. Ultrafiltration combined with size exclusion chromatography efficiently isolates extracellular vesicles from cell culture media for compositional and functional studies. *Sci Rep*. 2017;7(1):15297. doi:10.1038/s41598-017-15717-7
65. Wei R, Zhao L, Kong G, et al. Combination of Size-Exclusion Chromatography and Ultracentrifugation Improves the Proteomic Profiling of Plasma-Derived Small Extracellular Vesicles. *Biol Proced Online*. 2020;22(1):12. doi:10.1186/s12575-020-00125-5
66. Momen-Heravi F, Balaj L, Alian S, et al. Current methods for the isolation of extracellular vesicles. *Biol Chem*. 2013;394(10):1253-1262. doi:10.1515/hsz-2013-0141
67. Cvjetkovic A, Lötvall J, Lässer C. The influence of rotor type and centrifugation time on the yield and purity of extracellular vesicles. *J Extracell Vesicles*. 2014;3. doi:10.3402/jev.v3.23111
68. Mincheva-Nilsson L, Baranov V, Nagaeva O, Dehlin E. Isolation and Characterization of Exosomes from Cultures of Tissue Explants and Cell Lines. *Curr Protoc Immunol*. 2016;115:14.42.1-14.42.21. doi:10.1002/cpim.17
69. Lobb R, Möller A. Size Exclusion Chromatography: A Simple and Reliable Method for Exosome Purification. *Methods Mol Biol*. 2017;1660:105-110. doi:10.1007/978-1-4939-7253-1_9
70. Böing AN, Pol E van der, Grootemaat AE, Coumans FAW, Sturk A, Nieuwland R. Single-step isolation of extracellular vesicles by size-exclusion chromatography. *Journal of Extracellular Vesicles*. 2014;3(1):23430. doi:10.3402/jev.v3.23430
71. Van Deun J, Jo A, Li H, et al. Integrated Dual-Mode Chromatography to Enrich Extracellular Vesicles from Plasma. *Adv Biosyst*. 2020;4(12):e1900310. doi:10.1002/adbi.201900310
72. Busatto S, Vilanilam G, Ticer T, et al. Tangential Flow Filtration for Highly Efficient Concentration of Extracellular Vesicles from Large Volumes of Fluid. *Cells*. 2018;7(12). doi:10.3390/cells7120273
73. Kim K, Park J, Jung J-H, et al. Cyclic tangential flow filtration system for isolation of extracellular vesicles. *APL Bioengineering*. 2021;5(1):016103. doi:10.1063/5.0037768
74. Kosanović M, Milutinović B, Goč S, Mitić N, Janković M. Ion-exchange chromatography purification of extracellular vesicles. *BioTechniques*. 2017;63(2):65-71. doi:10.2144/000114575
75. Chung KY, Quek JM, Neo SH, Too HP. Polymer-Based Precipitation of Extracellular Vesicular miRNAs from Serum Improve Gastric Cancer miRNA Biomarker Performance. *The Journal of Molecular Diagnostics*. 2020;22(5):610-618. doi:10.1016/j.jmoldx.2020.01.016
76. Brown PN, Yin H. Polymer-Based Purification of Extracellular Vesicles. In: Kuo WP, Jia S, eds. *Extracellular Vesicles: Methods and Protocols*. Methods in Molecular Biology. Springer; 2017:91-103. doi:10.1007/978-1-4939-7253-1_8

77. Gallart-Palau X, Serra A, Wong ASW, et al. Extracellular vesicles are rapidly purified from human plasma by Protein Organic Solvent Precipitation (PROSPR). *Scientific Reports*. 2015;5(1):14664. doi:10.1038/srep14664
78. Liang K, Liu F, Fan J, et al. Nanoplasmonic Quantification of Tumor-derived Extracellular Vesicles in Plasma Microsamples for Diagnosis and Treatment Monitoring. *Nat Biomed Eng*. 2017;1. doi:10.1038/s41551-016-0021
79. Cointe S, Harti Souab K, Bouriche T, et al. A new assay to evaluate microvesicle plasmin generation capacity: validation in disease with fibrinolysis imbalance. *J Extracell Vesicles*. 2018;7(1):1494482. doi:10.1080/20013078.2018.1494482
80. Guo S-C, Tao S-C, Dawn H. Microfluidics-based on-a-chip systems for isolating and analysing extracellular vesicles. *Journal of Extracellular Vesicles*. 2018;7(1):1508271. doi:10.1080/20013078.2018.1508271
81. Youn Y-J, Shrestha S, Lee Y-B, et al. Neutrophil-derived trail is a proinflammatory subtype of neutrophil-derived extracellular vesicles. *Theranostics*. 2021;11(6):2770-2787. doi:10.7150/thno.51756
82. Vargas A, Roux-Dalvai F, Droit A, Lavoie J-P. Neutrophil-Derived Exosomes: A New Mechanism Contributing to Airway Smooth Muscle Remodeling. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 2016;55(3):450-461. doi:10.1165/rcmb.2016-0033OC
83. Fahrmann JF, Mao X, Irajizad E, et al. Plasma-Derived Extracellular Vesicles Convey Protein Signatures That Reflect Pathophysiology in Lung and Pancreatic Adenocarcinomas. *Cancers*. 2020;12(5):1147. doi:10.3390/cancers12051147
84. Shao H, Im H, Castro CM, Breakefield X, Weissleder R, Lee H. New Technologies for Analysis of Extracellular Vesicles. *Chem Rev*. 2018;118(4):1917-1950. doi:10.1021/acs.chemrev.7b00534
85. Surmiak M, Kosałka-Węgiel J, Polański S, Sanak M. Endothelial cells response to neutrophil-derived extracellular vesicles miRNAs in anti-PR3 positive vasculitis. *Clin Exp Immunol*. Published online February 2, 2021. doi:10.1111/cei.13581
86. Li L, Zuo X, Xiao Y, Liu D, Luo H, Zhu H. Neutrophil-derived exosome from systemic sclerosis inhibits the proliferation and migration of endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun*. 2020;526(2):334-340. doi:10.1016/j.bbrc.2020.03.088
87. Gasser O, Hess C, Miot S, Deon C, Sanchez J-C, Schifferli JA. Characterisation and properties of ectosomes released by human polymorphonuclear neutrophils. *Exp Cell Res*. 2003;285(2):243-257. doi:10.1016/s0014-4827(03)00055-7
88. Gao J, Wang S, Wang Z. High yield, scalable and remotely drug-loaded neutrophil-derived extracellular vesicles (EVs) for anti-inflammation therapy. *Biomaterials*. 2017;135:62-73. doi:10.1016/j.biomaterials.2017.05.003
89. Welsh JA, Van Der Pol E, Arkesteijn GJA, et al. MIFlowCyt-EV: a framework for standardized reporting of extracellular vesicle flow cytometry experiments. *J Extracell Vesicles*. 2020;9(1):1713526. doi:10.1080/20013078.2020.1713526

90. Connor DE, Exner T, Ma DDF, Joseph JE. The majority of circulating platelet-derived microparticles fail to bind annexin V, lack phospholipid-dependent procoagulant activity and demonstrate greater expression of glycoprotein Ib. *Thromb Haemost.* 2010;103(5):1044-1052. doi:10.1160/TH09-09-0644
91. Arraud N, Gounou C, Turpin D, Brisson AR. Fluorescence triggering: A general strategy for enumerating and phenotyping extracellular vesicles by flow cytometry. *Cytometry A.* 2016;89(2):184-195. doi:10.1002/cyto.a.22669
92. Zhu S, Ma L, Wang S, et al. Light-scattering detection below the level of single fluorescent molecules for high-resolution characterization of functional nanoparticles. *ACS Nano.* 2014;8(10):10998-11006. doi:10.1021/nn505162u
93. Tian Y, Ma L, Gong M, et al. Protein Profiling and Sizing of Extracellular Vesicles from Colorectal Cancer Patients via Flow Cytometry. *ACS Nano.* 2018;12(1):671-680. doi:10.1021/acsnano.7b07782
94. de Rond L, van der Pol E, Hau CM, et al. Comparison of Generic Fluorescent Markers for Detection of Extracellular Vesicles by Flow Cytometry. *Clin Chem.* 2018;64(4):680-689. doi:10.1373/clinchem.2017.278978
95. Poncelet P, Robert S, Bailly N, et al. Tips and tricks for flow cytometry-based analysis and counting of microparticles. *Transfus Apher Sci.* 2015;53(2):110-126. doi:10.1016/j.transci.2015.10.008
96. Lacroix R, Robert S, Poncelet P, Dignat-George F. Overcoming limitations of microparticle measurement by flow cytometry. *Semin Thromb Hemost.* 2010;36(8):807-818. doi:10.1055/s-0030-1267034
97. Chandler WL, Yeung W, Tait JF. A new microparticle size calibration standard for use in measuring smaller microparticles using a new flow cytometer. *J Thromb Haemost.* 2011;9(6):1216-1224. doi:10.1111/j.1538-7836.2011.04283.x
98. Mullier F, Bailly N, Chatelain C, Dogné JM, Chatelain B. More on: calibration for the measurement of microparticles: needs, interests, and limitations of calibrated polystyrene beads for flow cytometry-based quantification of biological microparticles. *J Thromb Haemost.* 2011;9(8):1679-1681; author reply 1681-1682. doi:10.1111/j.1538-7836.2011.04386.x
99. Stoner SA, Duggan E, Condello D, et al. High sensitivity flow cytometry of membrane vesicles. *Cytometry A.* 2016;89(2):196-206. doi:10.1002/cyto.a.22787
100. Brittain GC, Chen YQ, Martinez E, et al. A Novel Semiconductor-Based Flow Cytometer with Enhanced Light-Scatter Sensitivity for the Analysis of Biological Nanoparticles. *Sci Rep.* 2019;9(1):16039. doi:10.1038/s41598-019-52366-4
101. Lucchetti D, Battaglia A, Ricciardi-Tenore C, et al. Measuring Extracellular Vesicles by Conventional Flow Cytometry: Dream or Reality? *Int J Mol Sci.* 2020;21(17). doi:10.3390/ijms21176257
102. Brittain GC, Gulnik S. How to Use Violet Side Scatter to Detect Nanoparticles on the CytoFLEX Flow Cytometer.

103. Franco C, Lacroix R, Vallier L, et al. A new hybrid immunocapture bioassay with improved reproducibility to measure tissue factor-dependent procoagulant activity of microvesicles from body fluids. *Thromb Res.* 2020;196:414-424. doi:10.1016/j.thromres.2020.09.020
104. Lacroix R, Judicone C, Poncelet P, et al. Impact of pre-analytical parameters on the measurement of circulating microparticles: towards standardization of protocol. *J Thromb Haemost.* 2012;10(3):437-446. doi:10.1111/j.1538-7836.2011.04610.x
105. Vila-Liante V, Sánchez-López V, Martínez-Sales V, et al. Impact of sample processing on the measurement of circulating microparticles: storage and centrifugation parameters. *Clin Chem Lab Med.* 2016;54(11):1759-1767. doi:10.1515/cclm-2016-0036
106. Kim HK, Song KS, Lee ES, et al. Optimized flow cytometric assay for the measurement of platelet microparticles in plasma: pre-analytic and analytic considerations. *Blood Coagul Fibrinolysis.* 2002;13(5):393-397. doi:10.1097/00001721-200207000-00003
107. Poncelet P, Robert S, Bouriche T, Bez J, Lacroix R, Dignat-George F. Standardized counting of circulating platelet microparticles using currently available flow cytometers and scatter-based triggering: Forward or side scatter? *Cytometry A.* 2016;89(2):148-158. doi:10.1002/cyto.a.22685
108. Foladori P, Quaranta A, Ziglio G. Use of silica microspheres having refractive index similar to bacteria for conversion of flow cytometric forward light scatter into biovolume. *Water Res.* 2008;42(14):3757-3766. doi:10.1016/j.watres.2008.06.026
109. Parida BK, Garrastazu H, Aden JK, Cap AP, McFaul SJ. Silica microspheres are superior to polystyrene for microvesicle analysis by flow cytometry. *Thromb Res.* 2015;135(5):1000-1006. doi:10.1016/j.thromres.2015.02.011
110. Simonsen JB. A liposome-based size calibration method for measuring microvesicles by flow cytometry. *J Thromb Haemost.* 2016;14(1):186-190. doi:10.1111/jth.13176
111. van der Pol E, Sturk A, van Leeuwen T, Nieuwland R, Coumans F, ISTH-SSC-VB Working group. Standardization of extracellular vesicle measurements by flow cytometry through vesicle diameter approximation. *J Thromb Haemost.* 2018;16(6):1236-1245. doi:10.1111/jth.14009
112. Gardiner C, Shaw M, Hole P, et al. Measurement of refractive index by nanoparticle tracking analysis reveals heterogeneity in extracellular vesicles. *Journal of Extracellular Vesicles.* 2014;3(1):25361. doi:10.3402/jev.v3.25361
113. Simeone P, Celia C, Bologna G, et al. Diameters and Fluorescence Calibration for Extracellular Vesicle Analyses by Flow Cytometry. *Int J Mol Sci.* 2020;21(21). doi:10.3390/ijms21217885
114. Morales-Kastresana A, Musich TA, Welsh JA, et al. High-fidelity detection and sorting of nanoscale vesicles in viral disease and cancer. *J Extracell Vesicles.* 2019;8(1):1597603. doi:10.1080/20013078.2019.1597603

115. Morales-Kastresana A, Welsh JA, Jones JC. Detection and Sorting of Extracellular Vesicles and Viruses Using nanoFACS. *Curr Protoc Cytom.* 2020;95(1):e81. doi:10.1002/cpcy.81
116. Görgens A, Bremer M, Ferrer-Tur R, et al. Optimisation of imaging flow cytometry for the analysis of single extracellular vesicles by using fluorescence-tagged vesicles as biological reference material. *J Extracell Vesicles.* 2019;8(1):1587567. doi:10.1080/20013078.2019.1587567
117. Ricklefs FL, Maire CL, Reimer R, et al. Imaging flow cytometry facilitates multiparametric characterization of extracellular vesicles in malignant brain tumours. *J Extracell Vesicles.* 2019;8(1):1588555. doi:10.1080/20013078.2019.1588555
118. Kranich J, Chlis N-K, Rausch L, et al. In vivo identification of apoptotic and extracellular vesicle-bound live cells using image-based deep learning. *J Extracell Vesicles.* 2020;9(1):1792683. doi:10.1080/20013078.2020.1792683
119. Chuo ST-Y, Chien JC-Y, Lai CP-K. Imaging extracellular vesicles: current and emerging methods. *J Biomed Sci.* 2018;25(1):91. doi:10.1186/s12929-018-0494-5
120. Noble JM, Roberts LM, Vidavsky N, et al. Direct comparison of optical and electron microscopy methods for structural characterization of extracellular vesicles. *J Struct Biol.* 2020;210(1):107474. doi:10.1016/j.jsb.2020.107474
121. Filipe V, Hawe A, Jiskoot W. Critical evaluation of Nanoparticle Tracking Analysis (NTA) by NanoSight for the measurement of nanoparticles and protein aggregates. *Pharm Res.* 2010;27(5):796-810. doi:10.1007/s11095-010-0073-2
122. Erdbrügger U, Lannigan J. Analytical challenges of extracellular vesicle detection: A comparison of different techniques. *Cytometry A.* 2016;89(2):123-134. doi:10.1002/cyto.a.22795
123. Coumans FAW, van der Pol E, Böing AN, et al. Reproducible extracellular vesicle size and concentration determination with tunable resistive pulse sensing. *J Extracell Vesicles.* 2014;3:25922. doi:10.3402/jev.v3.25922
124. Subedi P, Schneider M, Atkinson MJ, Tapio S. Isolation of Proteins from Extracellular Vesicles (EVs) for Mass Spectrometry-Based Proteomic Analyses. *Methods Mol Biol.* 2021;2261:207-212. doi:10.1007/978-1-0716-1186-9_12
125. Vallier L, Bouriche T, Bonifay A, et al. Increasing the sensitivity of the human microvesicle tissue factor activity assay. *Thromb Res.* 2019;182:64-74. doi:10.1016/j.thromres.2019.07.011
126. Chitoiu L, Dobranici A, Gherghiceanu M, Dinescu S, Costache M. Multi-Omics Data Integration in Extracellular Vesicle Biology-Utopia or Future Reality? *Int J Mol Sci.* 2020;21(22). doi:10.3390/ijms21228550
127. Jimenez L, Yu H, McKenzie AJ, et al. Quantitative Proteomic Analysis of Small and Large Extracellular Vesicles (EVs) Reveals Enrichment of Adhesion Proteins in Small EVs. *J Proteome Res.* 2019;18(3):947-959. doi:10.1021/acs.jproteome.8b00647

128. Jang SC, Crescitelli R, Cvjetkovic A, et al. Mitochondrial protein enriched extracellular vesicles discovered in human melanoma tissues can be detected in patient plasma. *Journal of Extracellular Vesicles*. 2019;8(1):1635420. doi:10.1080/20013078.2019.1635420
129. Muralidharan-Chari V, Clancy J, Plou C, et al. ARF6-Regulated Shedding of Tumor Cell-Derived Plasma Membrane Microvesicles. *Current Biology*. 2009;19(22):1875-1885. doi:10.1016/j.cub.2009.09.059
130. Skryabin GO, Komelkov AV, Savelyeva EE, Tchekina EM. Lipid Rafts in Exosome Biogenesis. *Biochemistry Moscow*. 2020;85(2):177-191. doi:10.1134/S0006297920020054
131. Salaün C, James DJ, Chamberlain LH. Lipid Rafts and the Regulation of Exocytosis. *Traffic*. 2004;5(4):255-264. doi:10.1111/j.1600-0854.2004.0162.x
132. Guerreiro EM, Vestad B, Steffensen LA, et al. Efficient extracellular vesicle isolation by combining cell media modifications, ultrafiltration, and size-exclusion chromatography. *PLOS ONE*. 2018;13(9):e0204276. doi:10.1371/journal.pone.0204276
133. Kreimer S, Ivanov AR. Rapid Isolation of Extracellular Vesicles from Blood Plasma with Size-Exclusion Chromatography Followed by Mass Spectrometry-Based Proteomic Profiling. In: Kuo WP, Jia S, eds. *Extracellular Vesicles: Methods and Protocols*. Methods in Molecular Biology. Springer; 2017:295-302. doi:10.1007/978-1-4939-7253-1_24
134. Bartel S, Grutta SL, Cilluffo G, et al. Human airway epithelial extracellular vesicle miRNA signature is altered upon asthma development. *Allergy*. 2020;75(2):346-356. doi:https://doi.org/10.1111/all.14008
135. Lozano-Ramos I, Bancu I, Oliveira-Tercero A, et al. Size-exclusion chromatography-based enrichment of extracellular vesicles from urine samples. *Journal of Extracellular Vesicles*. 2015;4(1):27369. doi:10.3402/jev.v4.27369
136. Foers AD, Chatfield S, Dagley LF, et al. Enrichment of extracellular vesicles from human synovial fluid using size exclusion chromatography. *Journal of Extracellular Vesicles*. 2018;7(1):1490145. doi:10.1080/20013078.2018.1490145
137. Groot Kormelink T, Arkesteijn GJA, Nauwelaers FA, van den Engh G, Nolte-'t Hoen ENM, Wauben MHM. Prerequisites for the analysis and sorting of extracellular vesicle subpopulations by high-resolution flow cytometry. *Cytometry A*. 2016;89(2):135-147. doi:10.1002/cyto.a.22644
138. Headland SE, Jones HR, Norling LV, et al. Neutrophil-derived microvesicles enter cartilage and protect the joint in inflammatory arthritis. *Sci Transl Med*. 2015;7(315):315ra190. doi:10.1126/scitranslmed.aac5608
139. Frampton AE, Prado MM, López-Jiménez E, et al. Glypican-1 is enriched in circulating-exosomes in pancreatic cancer and correlates with tumor burden. *Oncotarget*. 2018;9(27):19006-19013. doi:10.18632/oncotarget.24873

140. Li W, Shao B, Liu C, et al. Noninvasive Diagnosis and Molecular Phenotyping of Breast Cancer through Microbead-Assisted Flow Cytometry Detection of Tumor-Derived Extracellular Vesicles. *Small Methods*. 2018;2(11):1800122. doi:<https://doi.org/10.1002/smtd.201800122>
141. Gill M, Motta-Mejia C, Kandzija N, et al. Placental Syncytiotrophoblast-Derived Extracellular Vesicles Carry Active NEP (Neprilysin) and Are Increased in Preeclampsia. *Hypertension*. 2019;73(5):1112-1119. doi:10.1161/HYPERTENSIONAHA.119.12707
142. Nanou A, Mol L, Coumans FAW, Koopman M, Punt CJA, Terstappen LWMM. Endothelium-Derived Extracellular Vesicles Associate with Poor Prognosis in Metastatic Colorectal Cancer. *Cells*. 2020;9(12). doi:10.3390/cells9122688

SERMENT DE GALIEN

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

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

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

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

Résumé

Les microvésicules (MV) sont des vésicules extracellulaires produites à partir du bourgeonnement de la membrane plasmique. Elles véhiculent un grand nombre d'activités biologiques et participent à des phénomènes physiopathologiques très variés. L'intérêt des MV en pathologie humaine a permis le développement de plusieurs applications : biomarqueur, vecteur ou cible thérapeutique. Parmi les MV circulantes, les MV issues de polynucléaires neutrophiles (NDMV) ont montré un intérêt comme biomarqueur dans divers processus comme l'inflammation. Leur nombre est aussi associé au pronostic de plusieurs pathologies telles que le sepsis, l'athérosclérose, ou les pathologies pulmonaires.

Leur détection fiable est donc devenue un enjeu important. La cytométrie de flux (CMF) est l'une des techniques la plus utilisée pour les détecter et les quantifier. Cette technique permet une détection individuelle et multiparamétrique dans un temps court. Cependant, il existe des limites d'une part liées aux caractéristiques intrinsèques des MV (petite taille, faible densité antigénique et indice de réfraction). D'autres limites sont liées aux instruments. Les sensibilités actuelles de détection en scatter et en fluorescence sont trop faibles et la présence du bruit de fond empêche une bonne détection des MV.

Après une introduction sur les MV, ce travail détaillera les outils actuellement disponibles pour concentrer et purifier les MV à partir d'un échantillon biologique, puis les techniques permettant de les caractériser. L'objectif de cette partie bibliographique est de détailler les avantages et inconvénients de ces nombreuses techniques, et de montrer que la détection des MV peut être améliorée. Une partie expérimentale portera alors sur une combinaison d'approches permettant d'améliorer la détection des NDMV.

Un dépistage antigénique (54 spécificités) identifie le CD15, CD66b et CD66c comme les meilleurs antigènes sensibles et spécifiques pour la détection des NDMV. L'association de la chromatographie d'exclusion de taille et de la combinaison d'anticorps permet de diminuer le bruit de fond en retirant l'excès l'anticorps libre et d'augmenter le signal fluorescent des MV. L'utilisation d'un cytomètre de nouvelle génération permet d'augmenter significativement leur quantification. Ces améliorations ont permis, d'une part, une meilleure détection des NDMV à partir d'un échantillon plasmatique de patients septiques et d'autre part le tri spécifique de NDMV à partir d'un échantillon plasmatique de patients COVID-19.

Ces développements méthodologiques pourraient être appliqués à d'autres sous-populations de MV afin d'améliorer leur détection. Ce travail contribuera à l'utilisation de la détection des MV comme biomarqueur clinique dans les laboratoires de biologie médicale.