



**HAL**  
open science

# Caractérisation, quantification et isolation de vésicules extracellulaires du plasma sanguin à l'aide de nanoparticules d'or ou magnétiques conjuguées à des protéines

Romain Linares

► **To cite this version:**

Romain Linares. Caractérisation, quantification et isolation de vésicules extracellulaires du plasma sanguin à l'aide de nanoparticules d'or ou magnétiques conjuguées à des protéines. Hématologie. Université de Bordeaux, 2016. Français. NNT : 2016BORD0344 . tel-01483569

**HAL Id: tel-01483569**

**<https://theses.hal.science/tel-01483569>**

Submitted on 6 Mar 2017

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

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

# Thèse de doctorat de l'Université de Bordeaux

Ecole doctorale des sciences de la vie et de la santé

Spécialité : Biochimie

**Par Romain LINARES**

En vue de l'obtention du grade de docteur

**Caractérisation, quantification et isolation de  
vésicules extracellulaires du plasma sanguin à l'aide  
de nanoparticules d'or ou magnétiques conjuguées à  
des protéines**

Sous la direction du Professeur Alain Brisson

A soutenir le 2 décembre 2016

Membres du jury :

M. HEIJNEN Harry, <i>Professeur, Université d'Utrecht</i>	Rapporteur
M. VAN NIEL Guillaume, <i>Chargé de recherche, CNRS UMR144</i>	Rapporteur
Mme GAZEAU Florence, <i>Directrice de recherche, CNRS UMR7057</i>	Examineur
M. BARTHELEMY Philippe, <i>Professeur, Université de Bordeaux</i>	Examineur
M. MORNET Stéphane, <i>Chargé de recherche, CNRS UPR9048</i>	Examineur
M. BRISSON Alain, <i>Professeur, Université de Bordeaux</i>	Directeur de thèse



---

Mots-clés : Vésicules extracellulaires, Plasma sanguin, Thiolation de protéines, Nanoparticules d'or conjuguées à des protéines, Immunomarquage à l'or, Extraction magnétique, Annexine-A5, Phosphatidylsérine, Microscopie électronique, Cytométrie en flux

**English title: Phenotyping, quantification and isolation of extracellular vesicles from blood plasma using gold or magnetic nanoparticles conjugated to proteins.**

Keywords: Extracellular vesicles, Blood plasma, Protein thiolation, Protein-conjugated gold nanoparticles, Immunogold labelling, Magnetic extraction, Annexin-A5, Phosphatidylserine, Electron microscopy, Flow cytometry

---

**Résumé** : Les vésicules extracellulaires (VEs) sont des vésicules membranaires de taille majoritairement submicrométrique présentes dans les fluides biologiques et émises par les cellules en réponse à divers stimuli. Les VEs sont impliquées dans de nombreux phénomènes physiologiques mais également dans des pathologies telles que cancers ou maladies cardiovasculaires. Elles pourraient donc être utilisées comme biomarqueurs de ces pathologies. Bien que les VEs soient aujourd’hui largement étudiées, nos connaissances sur le sujet demeurent limitées. Ceci est principalement dû aux difficultés de caractérisation des VEs et à l’absence de standardisation de leurs méthodes d’étude et d’isolation. La première partie de mon travail de thèse a porté sur le développement d’une méthode de thiolation de protéines. Des anticorps ont été modifiés pour exposer des thiols et ont été conjugués à des nanoparticules d’or fonctionnalisées par des maléimides. Le couplage des anticorps thiolés aux nanoparticules d’or a été étudié de manière quantitative et des conditions de conjugaison optimales ont été déterminées par des approches biochimiques. La seconde partie de ce travail a concerné la caractérisation des VEs du plasma sanguin de sujets sains par microscopie électronique à transmission (MET). La morphologie, la taille et le phénotype des VEs ont été déterminés par cryo-MET combinée au marquage par des nanoparticules d’or conjuguées à des protéines. La quantification objective des VEs du plasma sanguin a été réalisée à l’aide d’une méthode originale de MET basée sur la sédimentation de VEs sur grille de MET. La troisième partie de cette étude a consisté à mettre au point une méthode d’isolation de VEs à l’aide de particules magnétiques conjuguées à de l’AnxA5. Des conditions permettant d’extraire la totalité des VEs exposant la phosphatidylsérine contenues dans un plasma sanguin ont été déterminées par cytométrie en flux (CF).

Ce travail a permis d’apporter une caractérisation détaillée des VEs du plasma sanguin du sujet sain et peut servir de référence pour des études ultérieures concernant les VEs contenues dans des plasmas ou autres liquides biologiques pathologiques.

---

**Abstract:** Extracellular vesicles (EVs) are submicrometric membrane vesicles found in body fluids and produced by cells in response to various stimuli. EVs are involved in numerous physiological processes but also in pathologies as cancers or cardiovascular diseases. Even if EVs are largely studied, our knowledge about them remains limited. This is mainly caused by the difficulties to characterize EVs and by the lack of standardized methods allowing their characterization. The first part of my PhD work focused on the development and optimization of a protein thiolation method. Antibodies modified to expose few thiols were conjugated to gold nanoparticles functionalized with maleimides. The binding of thiolated antibodies to gold nanoparticles was quantitatively studied and optimal conjugation conditions were determined using biochemical methods. The second part of my PhD work concerned the characterization of blood plasma EVs from healthy subjects using transmission electron microscopy (TEM). EVs morphology, size and phenotype were determined by cryo-TEM combined with labelling with protein-conjugated gold nanoparticles. The near-absolute quantification of blood plasma EVs was achieved using an original TEM method based on the direct sedimentation of EVs onto TEM grids. The third part of this study consisted in developing an EV isolation method using AnxA5-conjugated magnetic particles. Conditions allowing total extraction of blood plasma phosphatidylserine-exposing EVs were determined using flow cytometry (FC).

This study presents a detailed characterization of blood plasma EVs from healthy subjects and can serve as a reference for future studies on EVs contained in pathological plasmas or other body fluids.

---

## Remerciements

Je tiens tout d'abord à remercier Madame Florence Gazeau et Messieurs Harry Heijnen, Guillaume Van Niel, Philippe Barthélemy et Stéphane Mornet pour avoir accepté de consacrer de leur temps afin d'évaluer mon travail de thèse.

M. Brisson, un simple merci ne suffirait pas à exprimer ma gratitude envers vous. Vous avez été un enseignant passionnant et passionné en licence/master et vous avez grandement contribué à me donner l'envie d'embrasser la voie de la biochimie structurale ! Merci de m'avoir permis de découvrir l'univers de la recherche en m'acceptant dans votre laboratoire lorsque que j'étais étudiant en master. Merci également de m'avoir renouvelé votre confiance en me donnant l'opportunité de réaliser cette thèse. Merci enfin pour votre disponibilité au cours de ces années, le tout dans la joie et la bonne humeur ! J'ai énormément appris à votre contact et resterai toujours admiratif de vos talents d'orateur, de votre rigueur scientifique et de vos régulières idées de génie.

Je tiens aussi à remercier toute l'équipe « Vésicules extracellulaires et Réparation membranaire » dans laquelle j'ai eu la chance de passer cinq années géniales.

Céline, merci pour ta perpétuelle bonne humeur, pour ton efficacité, pour ton Annexine et pour les tranches de rire quotidiennes. Ca me manquera. Merci également pour le gros boulot de relecture et pour ton aide sur les manips de dernière minute. Celle qui prendra ta place dans mon éventuel futur labo va devoir assurer ! « *C'est pas faux !* »

Anthony, merci pour ton aide avec les expériences de microscopie optique et pour ta « coolitude » extrême !

Flora, merci pour ta gentillesse et ton sourire permanent (ainsi que pour ton appareil photo/téléphone salvateur, sans lequel cette thèse ne serait pas complète !).

Merci également à Sisareuth pour m'avoir initié à la microscopie électronique.

Je remercie également tous les stagiaires que j'ai encadrés au cours de ma thèse et qui ont contribué d'une façon ou d'une autre à ce travail : Yan Boucaud, Karine Da Silva Lages, Amélie Lopez et Florelle Domart.

---

Je citerai ensuite le philosophe Nicolas Arraud (à moins que ça ne soit Nicolas Boisseau ?),

*« Hâtez-vous lentement, et, sans perdre courage,  
Vingt fois sur le métier remettez votre ouvrage :  
Polissez-le sans cesse et le repolissez ;  
Ajoutez quelquefois, et souvent effacez. »*

Nicolas, j'ai bien pris conscience du sens de ces quelques vers pendant la rédaction ! Tu as toi aussi contribué à me donner l'envie de faire de la recherche, au point de forcer les barrages étudiants pour venir en TP ! Merci pour ton amitié, pour ces années au labo et au pub et pour nos discussions scientifiques ou moins scientifiques. L'open space est bien vide depuis ton départ ! Que la Suisse t'apporte ce que tu désires, en amour comme au boulot.

Merci, à nouveau, à Stéphane Mornet pour avoir appris les rudiments de la synthèse de nanoparticules d'or au biologiste que je suis, ainsi que pour ses nombreux conseils sur le sujet. Je remercie également toutes les personnes que j'ai pu côtoyer pendant ces années au CBMN, et qui ont contribué humainement ou scientifiquement à ce travail.

Merci à ma moitié, Audrey. Parce que tu partages ma vie, que tu m'as supporté et encouragé pendant ces trois années, et plus prosaïquement pour le coup de main de relecture et de mise en page à la toute fin de la rédaction.

Merci à toute ma famille (ils sont beaucoup trop nombreux pour que je les cite tous !) pour m'avoir soutenu pendant cette thèse et plus particulièrement merci à mes parents pour m'avoir offert l'opportunité de faire des études et m'avoir toujours poussé vers l'avant.

Merci à mes amis pour leur soutien et pour les bons moments passés ensemble, particulièrement William, les deux Romains, Mathilde, Morgane, Laetitia, Laurent et Cécile.

Merci enfin (et toutes mes excuses !) à celles ou ceux que j'aurais pu oublier de citer...



---

*Ce que j'aimerais être, mais alors vraiment, c'est un soc de charrue. Je ne sais pas en quoi ça consiste, mais ça me paraît une existence qui laisse une trace.*

Terry Pratchett, Les Annales du Disque-Monde, Tome 1 : La huitième couleur.

*La phrase la plus excitante à entendre en science, celle qui annonce de nouvelles découvertes, ce n'est pas « Eureka ! » mais plutôt « Tiens, c'est marrant ça... »*

Isaac Asimov



# SOMMAIRE

<b>A - Introduction .....</b>	<b>1</b>
<b>1. Introduction générale .....</b>	<b>1</b>
<b>2. Contexte et objectifs de la thèse.....</b>	<b>2</b>
2.1. Développement d'une méthode de conjugaison de protéines thiolées à des nanoparticules d'or à des fins d'immunomarquage en MET.....	4
2.2. Caractérisation des VEs du plasma sanguin de sujets sains, par MET.....	5
2.3. Isolation de VEs exposant la PS à l'aide de particules magnétiques conjuguées à l'AnxA5 .....	5
<b>3. Les vésicules extracellulaires .....</b>	<b>6</b>
3.1. Biogénèse des VEs.....	6
3.1.1. Biogénèse des MVs.....	6
3.1.2. Biogénèse des exosomes.....	8
3.2. Composition moléculaire et marqueurs spécifiques des VEs.....	9
3.3. Implications physiopathologiques des VEs .....	11
<b>4. Les méthodes d'études des VEs .....</b>	<b>12</b>
4.1. Les méthodes de purification et d'isolation des VEs .....	12
4.1.1. Le prélèvement sanguin et la préparation du plasma.....	12
4.1.2. L'ultracentrifugation.....	13
4.1.3. La chromatographie d'exclusion de taille .....	14
4.1.4. La filtration et l'ultrafiltration.....	14
4.1.5. La précipitation induite par des polymères.....	15
4.1.6. L'immunoaffinité .....	16
4.1.7. Autres méthodes de purification et d'isolation .....	16
4.2. Les méthodes d'analyse des VEs.....	17
4.2.1. La microscopie électronique à transmission (MET) .....	17
4.2.1.1. <i>La coloration négative</i> .....	18
4.2.1.2. <i>L'ultramicrotomie, ou méthode des coupes ultra-minces</i> .....	19
4.2.1.3. <i>La cryo-MET d'échantillons minces</i> .....	19
4.2.2. La microscopie électronique à balayage .....	20
4.2.3. La cytométrie en flux.....	20
4.2.4. L'analyse du suivi individuel de nanoparticules (NTA) .....	21

---

4.2.5. L'analyse moléculaire : western blot et spectrométrie de masse.....	21
4.2.6. Autres méthodes d'étude.....	22
<b>5. Les nanoparticules d'or et l'immunomarquage en microscopie électronique à transmission .....</b>	<b>24</b>
5.1. Propriétés, synthèse et applications des nanoparticules d'or.....	24
5.2. L'immunomarquage à l'or en microscopie électronique à transmission .....	26
<b>B – Matériels et méthodes.....</b>	<b>28</b>
<b>1. Liste des produits utilisés.....</b>	<b>28</b>
<b>2. Tampons.....</b>	<b>29</b>
<b>3. Préparation des échantillons biologiques .....</b>	<b>30</b>
3.1. Prélèvement sanguin .....	30
3.2. Plasma dépourvu de plaquettes (PFP).....	30
3.3. Globules rouges lysés (GR-L).....	31
<b>4. Préparation de liposomes : MLV, LUV et SUV.....</b>	<b>31</b>
<b>5. Thiolation d'anticorps et caractérisation biochimique des anticorps modifiés .....</b>	<b>32</b>
5.1. Thiolation d'anticorps par modification d'amine primaire par du réactif de Traut ..	32
5.2. Quantification de la thiolation des anticorps par dosage d'Ellman.....	33
<b>6. Synthèse de nanoparticules d'or et conjugaison de protéines thiolées ...</b>	<b>34</b>
6.1. Synthèse de nanoparticules d'or par la méthode de Turkevich .....	34
6.2. Greffage d'une couronne de molécules de PEG hétérobifonctionnel thiol/amine à des NpAu.....	35
6.3. Greffage d'une couronne de molécules de PEG hétérobifonctionnel succinimidyl valérate/maléimide à des NpAu-NH <sub>2</sub> .....	36
6.4. Conjugaison de protéines thiolées à des NpAu-Mal.....	38
<b>7. Synthèse de nanoparticules magnétiques exposant des amines et conjugaison à des protéines thiolées.....</b>	<b>40</b>
7.1. Synthèse de 50nm-PMag et fonctionnalisation par une couronne de molécules de PEG exposant des amines .....	40
7.2. Greffage d'une couronne de molécules de PEG hétérobifonctionnel succinimidyl valérate/maléimide à des PMag exposant des amines .....	40
7.3. Conjugaison de protéines thiolées à des PMag-Mal.....	41
<b>8. Electrophorèse sur gel de polyacrylamide en présence de SDS .....</b>	<b>42</b>

<b>9. Extraction magnétique d'échantillons biologiques par des particules magnétiques conjuguées à l'AnxA5 .....</b>	<b>42</b>
<b>10. Microscopie électronique à transmission (MET) et cryo-MET .....</b>	<b>44</b>
10.1. Méthode de sédimentation de VEs sur grille de MET .....	44
10.2. Cryo-MET.....	45
<b>11. Microscopie optique .....</b>	<b>46</b>
<b>12. Cytométrie en flux .....</b>	<b>46</b>
12.1. Préparation d'AnxA5-Cy5 fluorescente .....	46
12.2. Préparation des échantillons pour l'analyse par CF .....	47
12.2.1. PFP.....	47
12.2.2. GR-L .....	47
12.2.3. Echantillons préparés par extraction magnétique .....	47
12.2.4. Contrôles négatifs.....	47
12.3. Acquisition des données et analyse des résultats de CF .....	48
12.4. Chromatographie d'exclusion de taille (CET).....	48
<b>C - Résultats et discussions .....</b>	<b>49</b>
<b>1. Thiolation d'anticorps et conjugaison d'anticorps thiolés à des nanoparticules d'or .....</b>	<b>49</b>
1.1. Etude de la thiolation de protéines par le réactif de Traut .....	50
1.1.1. Description des méthodes d'étude .....	50
1.1.1.1. <i>Le dosage d'Ellman.....</i>	<i>50</i>
1.1.1.2. <i>La méthode de SDS-PAGE + PEG.....</i>	<i>50</i>
1.1.2. Précision et reproductibilité du dosage d'Ellman .....	52
1.1.3. Notes relatives à l'analyse des expériences de SDS-PAGE + PEG.....	54
1.1.4. Mise au point de la méthode SDS-PAGE + PEG .....	56
1.1.5. Etude de la thiolation de l'AnxA5 .....	58
1.1.5.1. <i>Influence du rapport entre le nombre de molécules de réactif de Traut et d'AnxA5</i>	<i>58</i>
1.1.5.2. <i>Influence de la concentration en AnxA5.....</i>	<i>61</i>
1.1.5.3. <i>Influence du temps de réaction entre le réactif de Traut et l'AnxA5.....</i>	<i>62</i>
1.1.5.4. <i>Conditions de thiolation recommandées pour l'AnxA5 .....</i>	<i>64</i>
1.1.6. Etude de la thiolation des anticorps.....	64
1.1.6.1. <i>Influence du rapport entre le nombre de molécules de réactif de Traut et d'anticorps</i>	<i>66</i>
1.1.6.2. <i>Influence de la concentration en anticorps .....</i>	<i>68</i>

1.1.6.3. Influence du temps de réaction entre le réactif de Traut et les anticorps .....	69
1.1.6.4. Influence du type d'anticorps .....	70
1.1.6.5. Influence du nombre de thiols par anticorps sur l'oligomérisation des anticorps thiolés par formation de ponts disulfures.....	71
1.1.6.6. Conditions de thiolation recommandées pour les anticorps .....	74
1.2. Conjugaison d'anticorps thiolés à des nanoparticules d'or exposant des maléimides et caractérisation biochimique de leur liaison .....	74
1.2.1. Quantification des Ac-SH conjugués aux NpAu-Mal .....	75
1.2.2. Quantification des Ac-SH non conjugués aux NpAu-Mal .....	79
1.2.3. Validation de la spécificité de la conjugaison entre les NpAu-Mal et les Ac-SH .....	81
1.3. Conclusion .....	83
<b>2. Le catalogue des vésicules extracellulaires du plasma sanguin, déterminé par microscopie électronique à transmission .....</b>	<b>84</b>
2.1. Caractérisation des VEs par cryo-MET et immunomarquage par des nanoparticules d'or conjuguées à des protéines .....	85
2.1.1. Morphologie, taille et diversité des VEs.....	85
2.1.2. Identification de VEs exposant la phosphatidylsérine à l'aide de NpAu-AnxA5 .....	90
2.1.3. Phénotypage de VEs et détermination de leur origine cellulaire à l'aide de NpAu-Anticorps .....	95
2.1.3.1. Identification de VEs érythrocytaires à l'aide de NpAu-anti-CD235a.....	95
2.1.3.2. Identification de VEs plaquettaires à l'aide de NpAu-anti-CD41.....	98
2.1.3.3. Identification de VEs leucocytaires à l'aide de NpAu-anti-CD45 .....	101
2.1.3.4. Identification de VEs endothéliales à l'aide de NpAu-anti-CD144.....	104
2.1.3.5. Identification d'exosomes à l'aide de NpAu-anti-CD63 et de NpAu-anti-CD9.....	104
2.1.3.6. Identification de VEs d'origine tumorale dans des milieux de culture cellulaire à l'aide de NpAu-anti-CD326.....	108
2.2. Quantification objective des VEs par sédimentation sur grille de MET .....	110
2.2.1. Limitations de la cryo-MET pour la quantification des VEs.....	110
2.2.2. Sédimentation de VEs sur grille de MET après immunomarquage par des NpAu-Protéine et quantification objective .....	111
2.2.3. Adaptation de la méthode à la cryo-MET.....	116
2.3. Conclusion .....	119
<b>3. Etude de l'agrégation de VEs induite par l'ultracentrifugation .....</b>	<b>121</b>
3.1. Comparaison entre plasma et plasma-100k par cryo-MET .....	121
3.2. Comparaison entre plasma et plasma-100k par sédimentation sur grille de MET .	124

<b>4. Isolation de VEs exposant la PS à l'aide de particules magnétiques conjuguées à l'AnxA5, par MET et CF.....</b>	<b>126</b>
4.1. Etude de la liaison de particules magnétiques conjuguées à l'AnxA5 à des GR-L, par MET .....	127
4.1.1. Liaison de 50nm-PMag-AnxA5 à des GR-L.....	127
4.1.2. Liaison de 1µm-PMag-AnxA5 à des GR-L.....	130
4.2. Analyse par CF de l'extraction de membranes exposant la PS contenues dans une suspension de GR-L, à l'aide de PMag-AnxA5.....	131
4.2.1. Analyse d'une suspension de GR-L dépourvue de PMag-AnxA5 .....	132
4.2.2. Mise en évidence d'un phénomène d'agrégation de GR-L en présence de PMag-AnxA5.. .....	134
4.2.3. Analyse de l'extraction magnétique d'une suspension de GR-L par des 50nm-PMag-AnxA5 .....	137
4.2.4. Analyse de l'extraction magnétique d'une suspension de GR-L par des 1µm-PMag-AnxA5 .....	142
4.3. Analyse par CF de l'extraction de VEs exposant la PS contenues dans le plasma, à l'aide de PMag-AnxA5 .....	144
4.3.1. Analyse de l'extraction magnétique des VEs exposant la PS par des 50nm-PMag-AnxA5 . .....	145
4.3.2. Analyse de l'extraction magnétique des VEs exposant la PS par des 1µm-PMag-AnxA5 ... .....	147
4.4. Dissociation des PMag-AnxA5 après chélation du calcium par de l'EDTA .....	148
4.5. Extraction de VEs d'origine érythrocytaires contenue dans le plasma avec des particules magnétiques conjuguées à un anticorps anti-CD235a, par CF .....	149
4.6. Conclusion .....	152
<b>D – Conclusions générales et perspectives .....</b>	<b>153</b>
<b>E – Références .....</b>	<b>158</b>
<b>F – Annexe.....</b>	<b>172</b>



## Liste des abréviations

- 1 $\mu$ m-PMag** : Particules magnétiques de 1  $\mu$ m de diamètre
- 1 $\mu$ m-PMag-AnxA5** : Particules magnétiques de 1  $\mu$ m de diamètre conjuguées à l'AnxA5
- 1 $\mu$ m-PMag-NH<sub>2</sub>** : Particules magnétiques de 1  $\mu$ m de diamètre exposant des amines
- 50nm-PMag** : Particules magnétiques de 50 nm de diamètre
- 50nm-PMag-anti-CD235a** : Particules magnétiques de 50 nm de diamètre conjuguées à un anticorps anti-CD235a
- 50nm-PMag-AnxA5** : Particules magnétiques de 50 nm de diamètre conjuguées à l'AnxA5
- 50nm-PMag-NH<sub>2</sub>** : Particules magnétiques de 50 nm de diamètre exposant des amines
- Ac** : Anticorps
- Ac-SH** : Anticorps modifié chimiquement et exposant un/des thiol(s)
- AnxA5** : Annexine-A5
- AnxA5-Cy5** : Annexine-A5 conjuguée à un fluorophore Cyanine 5
- AnxA5-SH** : Annexine-A5 mutée exposant un thiol
- APS** : Persulfate d'ammonium
- $\beta$ -ME** : Béta-mercaptoéthanol
- CaCl<sub>2</sub>** : Chlorure de calcium
- CET** : Chromatographie d'exclusion de taille
- CF** : Cytométrie en flux
- CMV** : Corps multivésiculaire
- Cryo-MET** : Cryo-microscopie électronique à transmission
- Di** : Lipide fluorescent 1,1'-dioctadecyl-3,3,3',3'-tetraméthylindodicarbocyanine perchlorate
- DOPC** : 1,2-dioleoyl-sn-glycero-3-phosphocholine
- DOPS** : 1,2-dioleoyl-sn-glycero-3-phospho-L-serine
- DTNB** : Acide dinitro-2,2'-dithio-5,5'-benzoïque ou réactif d'Ellman
- DTT** : Dithiothréitol
- EDTA** : Éthylène diamine tétra-acétique
- Ery-G** : Erythrocyte Ghost / Fantôme d'érythrocyte
- FS** : Forward Scatter ou diffusion axiale
- GR** : Globule rouge
- GR-L** : Globule rouge lysé
- HEPES** : Acide 4-(2-hydroxyéthyl)-1-pipérazine éthane sulfonique
- KAuCl<sub>4</sub>** : Tétrachloroaurate de potassium
- Mal** : Maléimide
- MEB** : Microscopie électronique à balayage
- MET** : Microscopie électronique à transmission
- MV** : Microvésicule
- NaN<sub>3</sub>** : Azide de sodium
- ND** : Non déterminé
- NHS** : N-hydroxysuccinimide
- NpAu** : Nanoparticules d'or
- NpAu-Ac** : Nanoparticules d'or conjuguées à des anticorps
- NpAu-anti-CD144** : Nanoparticules d'or conjuguées à un anticorps anti-CD144
- NpAu-anti-CD235a** : Nanoparticules d'or conjuguées à un anticorps anti-CD235a
- NpAu-anti-CD326** : Nanoparticules d'or conjuguées à un anticorps anti-CD326 (EpCAM)
- NpAu-anti-CD41** : Nanoparticules d'or conjuguées à un anticorps anti-CD41

**NpAu-anti-CD45**: Nanoparticules d'or conjuguées à un anticorps anti-CD45  
**NpAu-anti-CD62P**: Nanoparticules d'or conjuguées à un anticorps anti-CD62P  
**NpAu-anti-CD63**: Nanoparticules d'or conjuguées à un anticorps anti-CD63  
**NpAu-anti-CD9**: Nanoparticules d'or conjuguées à un anticorps anti-CD9  
**NpAu-AnxA5** : Nanoparticules d'or conjuguées à l'AnxA5  
**NpAu-Mal** : Nanoparticules d'or exposant des maléimides  
**NpAu-NH<sub>2</sub>** : Nanoparticules d'or exposant des amines  
**NpAu-Protéine** : Nanoparticules d'or conjuguées à des protéines  
**NTA** : Analyse du suivi individuel de nanoparticules  
**p/L** : Concentration particulaire (particules par litre)  
**PEG** : Polyéthylène glycol ou oxyde de polyéthylène  
**PEG-Mal** : Polyéthylène glycol possédant une fonction maléimide  
**Pégylation** : action de conjuguer une molécule de PEG à une autre molécule  
**PFP** : Plasma dépourvu de plaquettes  
**PMag** : Particules magnétiques  
**PMag-Protéine** : Particules magnétiques conjuguées à des protéines  
**PPACK** : Phenilalanyl-Prolyl-Arginine Chloromethyl Ketone  
**PS** : Phosphatidylsérine  
**PSA** : Antigène spécifique prostatique  
**SDS** : Dodécylsulfate de sodium  
**SDS-PAGE** : Electrophorèse sur gel de polyacrylamide en présence de SDS  
**SDS-PAGE + PEG** : Electrophorèse sur gel de polyacrylamide en présence de SDS, après couplage avec un PEG-Mal  
**SH-PEG-NH<sub>2</sub>** : Polyéthylène glycol hétérobifonctionnel possédant une fonction thiol et une fonction amine  
**Smear** : Bande protéique diffuse et non quantifiable dans lors d'une expérience de SDS-PAGE  
**SS** : Side Scatter ou diffusion latérale  
**SVA** : Succinimidyl valérate  
**SVA-PEG-Mal** : Polyéthylène glycol hétérobifonctionnel possédant une fonction succinimidyl valérate et une fonction maléimide  
**TEMED** : N, N',N'-tétraméthyléthylènediamine  
**VE** : Vésicule extracellulaire

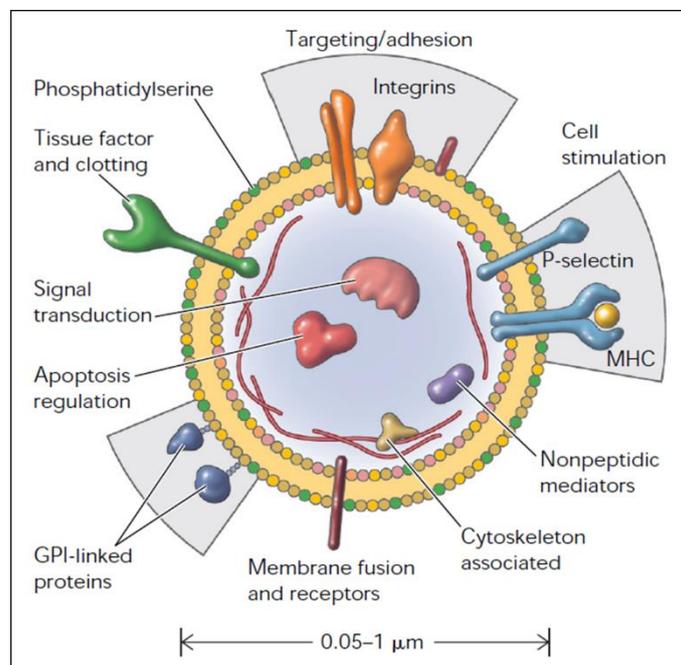
## A - INTRODUCTION

### 1. Introduction générale

En 1946, Erwan Chargaff et Randolph West découvrent qu'un plasma dépourvu de plaquettes est capable de coaguler (Chargaff and West, 1946). Ces observations sont en contradiction avec le dogme de l'époque considérant les plaquettes comme le maillon indispensable de la coagulation. Chargaff et West mettent également en évidence que cette capacité du plasma à coaguler disparaît après une centrifugation à 31.000 g, et concluent à l'existence d'une fraction procoagulante sédimentable, distincte des plaquettes. Environ vingt ans plus tard, Peter Wolf détermine que cette fraction consiste en des particules majoritairement composées de lipides, qu'il nomme « platelet dust » (Wolf, 1967). Ce terme sera ultérieurement remplacé par « microparticules » puis par « vésicules extracellulaires » (VEs), qui est aujourd'hui l'appellation recommandée par la Société Internationale des Vésicules Extracellulaires (ISEV) (Witwer et al., 2013). Dans ce manuscrit, le terme « VEs » regroupe les microvésicules (MVs) et les exosomes, dont les caractéristiques seront ultérieurement présentées plus en détail.

Les VEs sont des vésicules membranaires délimitées par une bicouche lipidique, d'une taille généralement comprise entre 30 nm et 1 µm. Elles sont émises par des cellules activées ou apoptotiques (van der Pol et al., 2012) et sont présentes dans la plupart des fluides biologiques, si ce n'est tous. Des VEs ont été observées dans le sang et le plasma sanguin (Arraud et al., 2014a), l'urine (Pisitkun et al., 2004), la salive (Ogawa et al., 2011), le liquide céphalo-rachidien (Chiasserini et al., 2014), le liquide synovial (Boilard et al., 2010), le liquide d'ascites (Andre et al., 2002), ou encore le lait maternel (Zonneveld et al., 2014). Des VEs sont également retrouvées dans les milieux de cellules en culture (Dragovic et al., 2011; Théry et al., 2006). Elles sont émises par de nombreux types cellulaires, comme les plaquettes (Heijnen et al., 1999), les érythrocytes (Tissot et al., 2010), les neutrophiles et les cellules dendritiques (Hess et al., 1999; Obregon et al., 2006), les cellules endothéliales (Rautou et al., 2011), ou encore certains types de cellules souches (Chen et al., 2010). Les cellules tumorales sont également capables d'émettre des VEs (Al-Nedawi et al., 2008; Zahra et al., 2011), parfois de

manière constitutive (Smalley et al., 2008). Les VEs exposent et transportent des molécules issues de leur cellule d'origine (Doeuvre and Angles-Cano, 2009). La **figure 1** présente les principales caractéristiques des VEs.

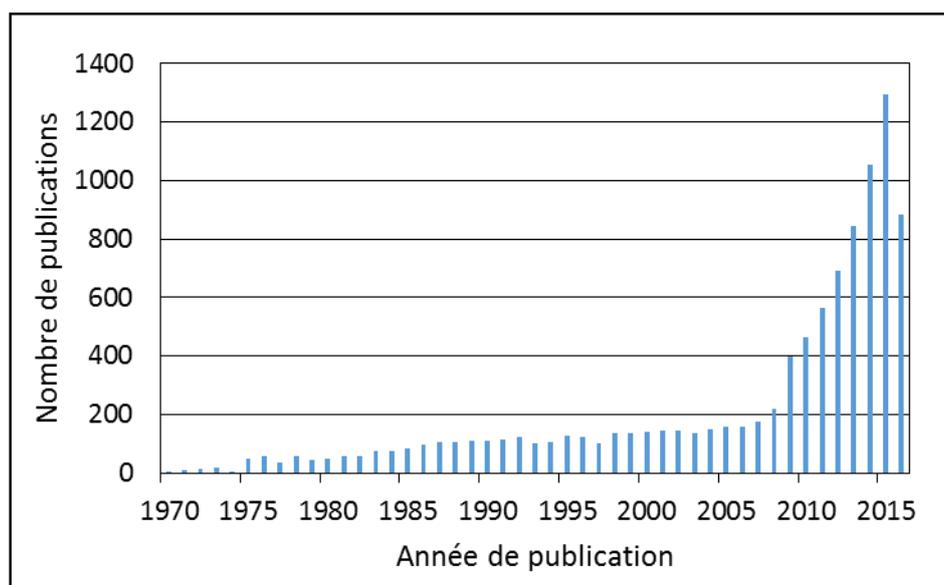


**Figure 1 : Représentation schématique d'une vésicule extracellulaire.** Elle est délimitée par une bicouche lipidique et peut exposer ou transporter différentes molécules provenant de la cellule dont elle est issue (Hugel et al., 2005).

## 2. Contexte et objectifs de la thèse

Considérées pendant longtemps comme un simple déchet cellulaire (Pan et al., 1985), les VEs connaissent un intérêt croissant et le nombre de publications sur le sujet augmente de manière exponentielle depuis une dizaine d'années (**figure 2**). Il est aujourd'hui admis que les VEs sont impliquées dans de multiples phénomènes physiologiques comme la coagulation, l'inflammation ou la communication intercellulaire (Buzas et al., 2014; Morel et al., 2006; Valadi et al., 2007). Les VEs sont également liées à de nombreuses pathologies. Certaines études décrivent par exemple la présence de taux anormalement élevés de VEs dans le cas de maladies cardiovasculaires ou de cancers (Manly et al., 2010; VanWijk et al., 2003). D'autres travaux reportent la présence de VEs exposant des marqueurs spécifiques de pathologies, dans le cas de cancers notamment (Melo et al., 2015; Skog et al., 2008). Les VEs pourraient

donc potentiellement être utilisées comme biomarqueur de ces pathologies. Leur présence dans les fluides biologiques permet d'envisager le concept de biopsie liquide à des fins diagnostics, moins invasive que la biopsie conventionnelle. Certaines études décrivent également leur utilisation comme système de délivrance de molécules actives (Johnsen et al., 2014).



**Figure 2 : Evolution du nombre de publications contenant les mots-clés « Extracellular vesicles », en fonction de l'année de publication.** Données PubMed.

Cependant, malgré la multitude d'études qui leur sont consacrées, nos connaissances sur les VEs demeurent limitées. Du fait de leur petite taille, de leur hétérogénéité et de leur présence dans des milieux complexes comme les fluides biologiques, les VEs sont difficiles à isoler et à caractériser. L'absence de standardisation des méthodes d'étude et d'isolation des VEs entraîne une grande hétérogénéité des résultats et rend ardues les tentatives de comparaison entre des études différentes. L'inconsistance de la nomenclature actuelle des VEs est également problématique. Qu'est-ce qu'une MV ? Qu'est-ce qu'un exosome ? Sur la base de quels critères physiques et moléculaires ces classes de VEs se distinguent-elles ? Des tables rondes ont été organisées par l'ISEV en 2013 (Witwer et al., 2013) et de nombreux papiers ont été publiés (Gould and Raposo, 2013; Lacroix et al., 2012; Yuana et al., 2015) afin de discuter de la standardisation de la nomenclature et des méthodes d'étude et d'isolation des VEs. Malheureusement, le chemin à parcourir reste long et peu de consensus ont pu être établis.

C'est dans ce contexte que s'inscrit mon projet de thèse, qui aura pour objectif global d'étendre notre connaissance fondamentale des VEs.

Dans l'optique d'utiliser les VEs comme biomarqueurs de pathologies, il est nécessaire de caractériser finement les VEs présentes chez les individus sains, afin de pouvoir déceler d'éventuelles différences avec un individu malade. Nous avons souhaité réaliser une caractérisation aussi complète que possible des VEs du plasma sanguin chez l'individu sain, à l'aide de plusieurs méthodes indépendantes de microscopie électronique à transmission (MET) et de cytométrie en flux (CF). Nous souhaitons notamment de répondre aux questions suivantes : à quoi ressemblent les VEs contenues dans le plasma sanguin d'un sujet sain? Quelle est leur morphologie ? Quelle est leur taille? Quelle proportion d'entre elles exposent la PS ? Quelle est leur origine cellulaire et quelles molécules exposent-elles à leur surface ? Quelle est leur concentration ?

Je vais maintenant vous présenter les trois grandes parties de mon travail de thèse

### **2.1. Développement d'une méthode de conjugaison de protéines thiolées à des nanoparticules d'or à des fins d'immunomarquage en MET**

Notre équipe utilise depuis de nombreuses années des nanoparticules d'or conjuguées à l'annexine-A5 (NpAu-AnxA5) pour le marquage de membranes exposant la phosphatidylsérine (PS) contenues dans des échantillons observés par MET. Dans l'optique de caractériser les VEs du plasma sanguin, nous avons souhaité développer de nouveaux outils de marquage permettant de phénotyper ces VEs. Une méthode de thiolation de protéines par du réactif de Traut a été mise au point. Cette méthode a été utilisée pour thioter des anticorps dirigés contre différents antigènes présents à la surface des VEs. La thiolation des anticorps a été étudiée quantitativement à l'aide de méthodes biochimiques. Ces anticorps thiolés (Ac-SH) ont ensuite été conjugués à des nanoparticules d'or (NpAu-Ac), à des fins d'immunomarquage de VEs en MET. La liaison des Ac-SH aux NpAu a été étudiée quantitativement.

## **2.2. Caractérisation des VEs du plasma sanguin de sujets sains, par MET**

Les VEs du plasma sanguin de sujets sains ont été caractérisées par différentes techniques de MET combinées de l'immunomarquage par des NpAu-AnxA5 ou des NpAu-Ac. La morphologie, la taille, le phénotype et l'origine cellulaire de ces VEs ont été étudiés par cryo-MET. Elles ont ensuite été quantifiées à l'aide d'une méthode originale de sédimentation de VEs sur grille de MET. Les résultats de cette quantification ont été comparés avec une étude de CF menée en parallèle par Céline Gounou (Assistante ingénieur en biochimie et biologie moléculaire, Université de Bordeaux, UMR-CBMN) et Nicolas Arraud. Cette partie du projet vise à fournir un catalogue de référence des VEs du plasma sanguin, qui pourra être utilisé ultérieurement pour l'étude d'échantillons pathologiques.

## **2.3. Isolation de VEs exposant la PS à l'aide de particules magnétiques conjuguées à l'AnxA5**

En préambule à cette partie du projet, nous avons étudié l'influence de l'ultracentrifugation sur les VEs, démontrant que cette méthode d'isolation entraîne une agrégation des VEs et peut donc être responsable d'artefacts.

Nous avons développé une méthode d'isolation de VEs alternative, utilisant l'immunomagnétophorèse. Des particules magnétiques de différentes tailles ont été conjuguées à l'AnxA5. Ces particules ont ensuite été utilisées pour isoler les membranes exposant la PS contenues dans des échantillons biologiques et l'efficacité d'extraction magnétique a été évaluée par CF. Nous avons dans un premier temps étudié l'extraction magnétique de suspensions de globules rouges lysés (GR-L), qui sont un modèle de membrane exposant la PS (Schrier et al., 1992), puis l'extraction des VEs exposant la PS contenues dans le plasma sanguin.

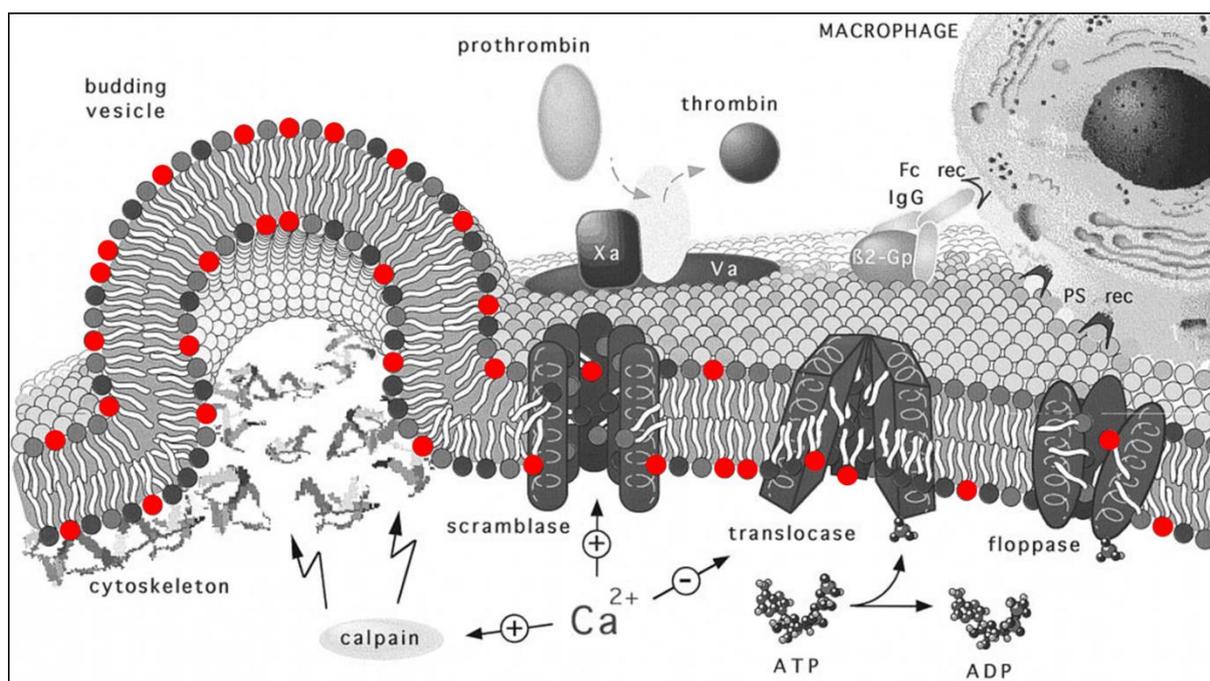
### 3. Les vésicules extracellulaires

Les objectifs de ce travail de thèse étant désormais établis, je vais maintenant présenter brièvement les VEs. Comme décrit précédemment, les VEs se divisent en deux sous-familles appelées microvésicules (MVs) et exosomes. Ces deux types de VEs partagent de nombreux points communs mais diffèrent notamment par leur mode de formation, leur taille et leur composition moléculaire. Cette partie décrira également les implications physiopathologiques des VEs.

#### 3.1. Biogénèse des VEs

##### 3.1.1. Biogénèse des MVs

Les MVs sont formées par bourgeonnement de la membrane plasmique de la cellule (Cocucci et al., 2009) et mesurent généralement entre 100 nm et 1  $\mu$ m (Théry et al., 2006). Dans ce manuscrit, le terme « microvésicules » regroupe l'ensemble des VEs provenant de la membrane plasmique, bien que de nombreux autres termes soient reportés dans la littérature (microparticules, ectosomes, exovésicules, ...). Il y a une vingtaine d'années, un modèle de formation des MVs a été proposé par Zwaal et Schroit (Zwaal and Schroit, 1997). Ce modèle est aujourd'hui encore le plus communément admis. Un stimulus, tel que l'activation d'un récepteur cellulaire, entraîne une augmentation de la concentration en calcium intracellulaire, ce qui déclenche deux phénomènes principaux. Les calpaïnes, protéases responsables de modifications majeures du cytosquelette, sont activées (Lynch and Ludlam, 2007). Parallèlement, l'activité de transporteurs lipidiques membranaires impliqués dans le maintien de l'asymétrie lipidique de la membrane est modifiée (Bever et al., 1983). La phosphatidylsérine (PS), qui est un phospholipide négativement chargé exclusivement présent sur le feuillet interne de la membrane plasmique des cellules au repos (Seigneuret and Devaux, 1984), est alors exposée sur le feuillet externe. Conjointement, ces phénomènes aboutissent au bourgeonnement de la membrane et à l'émission de MVs, qui exposent des antigènes caractéristiques de la cellule d'origine et contiennent une petite fraction de son cytoplasme (Morel et al., 2011). Le modèle de Zwaal et Schroit est représenté en **figure 3**.

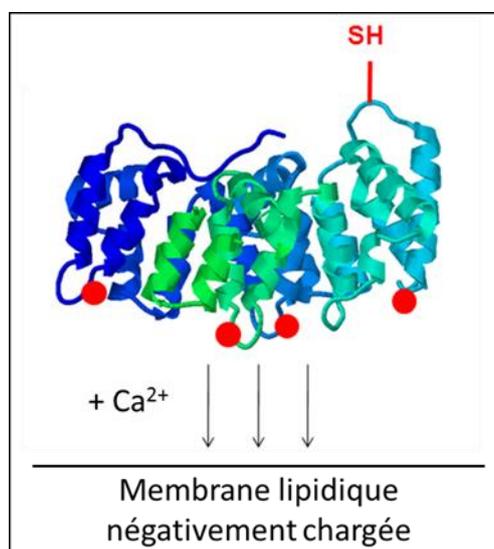


**Figure 3 : Représentation schématique de la formation de MVs par exposition de PS et bourgeonnement de la membrane plasmique.** Les points rouges représentent la PS. Adapté de (Zwaal and Schroit, 1997).

J'ouvre à présent une parenthèse afin de présenter l'annexine-A5 (AnxA5). L'AnxA5 est une petite protéine de 35.600 Da qui possède la capacité de se lier avec une forte affinité aux membranes négativement chargées, contenant par exemple de la PS (**Figure 4**). Cette liaison est strictement calcium-dépendante (Tait et al., 2004). Du fait de cette propriété, l'AnxA5 est couramment utilisée pour le marquage des MVs (Dachary-Prigent et al., 1993), ainsi que celui des corps apoptotiques qui exposent également la PS (Koopman et al., 1994). Sa faculté à se lier aux membranes biologiques joue également un rôle physiologique important, l'AnxA5 étant un acteur majeur de la réparation membranaire (Bouter et al., 2011).

Revenons au modèle de formation des MVs proposé par Zwaal et Schroit. Ce modèle implique l'exposition de PS à la surface des MVs et la plupart des études sur les MVs sont basées sur cette théorie (Lacroix et al., 2012). La présence de MVs n'exposant pas la PS a cependant été reportée par différentes équipes (Connor et al., 2010; Joop et al., 2001), ce qui suggère l'existence de mécanismes de formation alternatifs n'impliquant pas la PS. La question de l'exposition de la PS a été étudiée au cours de ce travail de thèse et sera abordée dans la section 2 du chapitre « Résultats et discussions ». L'étude des MVs exposant la PS est d'un

grand intérêt, car la PS est un lipide procoagulant et ces MVs pourraient donc être impliquées dans des phénomènes thrombotiques (Morel et al., 2006).

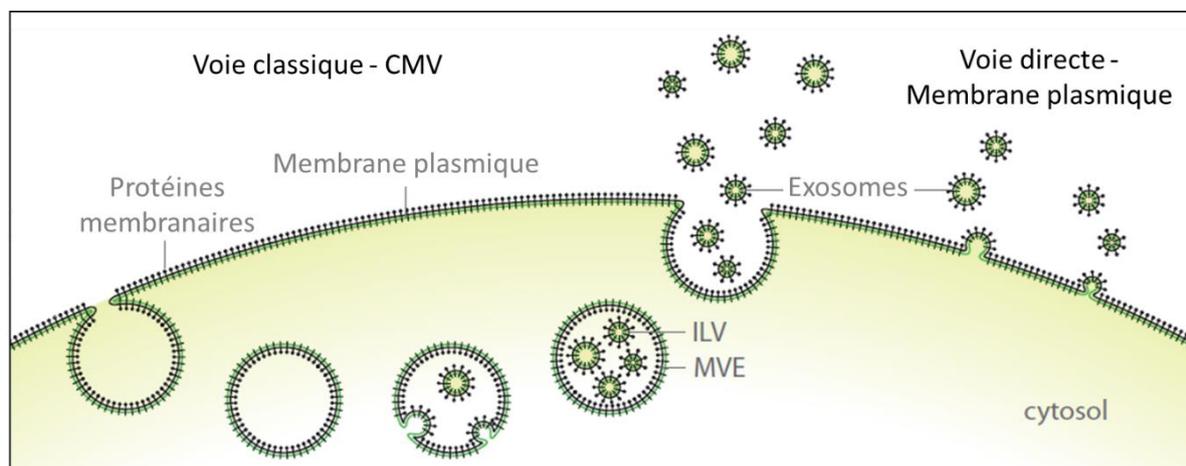


**Figure 4 : Structure de l'AnxA5 et liaison à des membranes lipidiques négativement chargées en présence de calcium.** Le thiol visible sur ce schéma est uniquement présent dans le cas de l'AnxA5-SH mutée qui sera présentée ultérieurement. Adapté de (Brisson and Mornet, 2007)

### 3.1.2. Biogénèse des exosomes

Le terme « exosome » a été proposé pour la première fois en 1981 pour décrire une population de vésicules libérées par différentes lignées cellulaires, tumorales ou non, et présentant une activité 5'-nucléasique (Trams et al., 1981). Deux équipes travaillant sur les réticulocytes décrivent ensuite la sécrétion de petites vésicules par fusion des corps multivésiculaires (CMVs) avec la membrane plasmique (Harding et al., 1983; Pan et al., 1985). Ces études sont considérées comme les premières réelles observations d'exosomes. Aujourd'hui, le terme « exosome » désigne généralement de petites vésicules de 40 à 100 nm de diamètre, libérées lors de l'exocytose des CMVs (Raposo and Stoorvogel, 2013). Les CMVs sont des organelles endosomales, contenant des vésicules intraluminales préalablement formées par invagination de la membrane endosomale. Lors de la fusion d'un CMV avec la membrane plasmique de la cellule, ces vésicules sont libérées dans le milieu extracellulaire et sont appelées exosomes (Théry et al., 2002). Il existe une voie de biogénèse alternative consistant en l'émission directe d'exosomes à partir de domaines particuliers de la membrane

plasmique de la cellule (Booth et al., 2006). Ces domaines sont enrichis en protéines exosomales et les exosomes émis de cette façon sont identiques aux exosomes de la voie classique. Les mécanismes gouvernant cette voie de formation directe n'ont à ce jour pas été élucidés. Ces deux mécanismes de formation sont schématisés en **figure 5**.



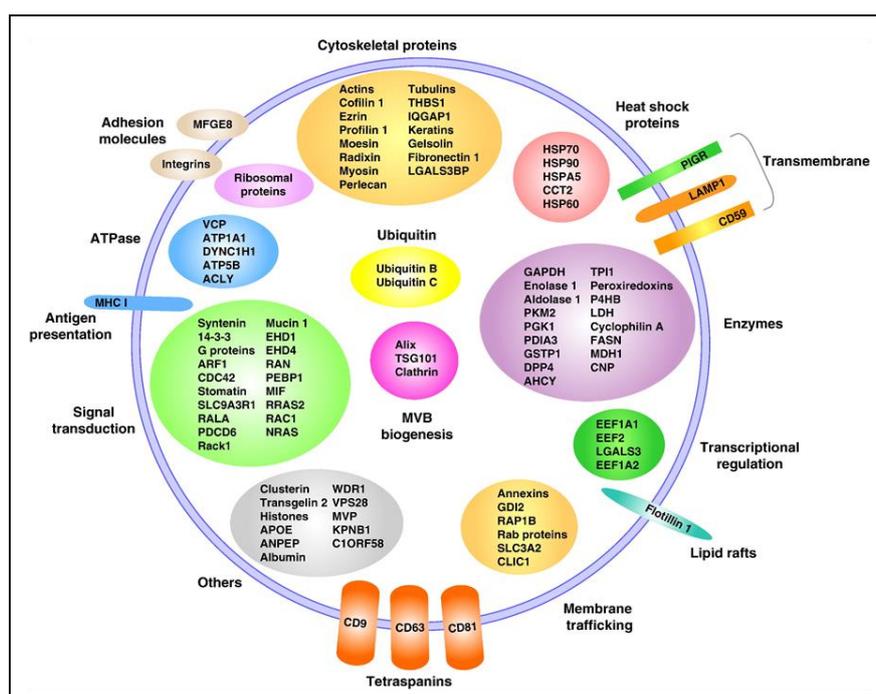
**Figure 5 : Représentation schématique du mode de formation des exosomes.** Deux voies sont représentées, d'une part la fusion des CMVs avec la membrane plasmique (voie classique) et d'autre part l'émission directe (voie directe) depuis la membrane. Adapté de (van der Pol et al., 2012).

### 3.2. Composition moléculaire et marqueurs spécifiques des VEs

Les MVs peuvent exposer des marqueurs caractéristiques de leur cellule d'origine et leur composition est très variable selon le type cellulaire (Muralidharan-Chari et al., 2010). L'exposition de PS à la surface des MVs est décrite dans de nombreuses études bien qu'elle ne soit pas systématique (György et al., 2011b). La présence de facteur tissulaire à la surface de certaines MVs est régulièrement citée (Geddings and Mackman, 2013; Manly et al., 2010; Zwicker et al., 2011). D'autres études reportent la présence d'intégrines ou de sélectines, protéines impliquées dans l'adhésion cellulaire (Théry et al., 2009).

A l'inverse des MVs, la composition moléculaire des exosomes est très largement étudiée. Les exosomes transportent et exposent également des molécules provenant de leur cellule d'origine (Mathivanan et al., 2010), et possèdent une signature caractéristique de la cellule dont ils sont issus (Harris et al., 2015). Lors de la formation des CMVs et de l'invagination de la membrane endosomale, des protéines, des lipides et divers types d'acides nucléiques (ADN, ARNm et microARN) sont emballés. Dans le cas des réticulocytes, la composition lipidique

des exosomes est proche de celle de la cellule d'origine (Johnstone et al., 1987). Les exosomes sont cependant généralement enrichis en cholestérol, sphingomyélines et céramides, et présentent des rafts lipidiques (Simons and Raposo, 2009; Wubbolts et al., 2003). Certains exosomes exposent faiblement la PS (Heijnen et al., 1999), bien que cette propriété soit moins couramment reportée que dans le cas des MVs. De nombreux marqueurs de surface des exosomes sont décrits dans la littérature, dont les plus communs sont des protéines de la famille des tétraspanines (CD9, CD63, CD81) (Kowal et al., 2016; Mathivanan et al., 2010). Les exosomes contiennent également de très nombreuses protéines solubles, les plus couramment décrites étant des protéines impliquées dans la biogénèse des CMVs (Alix, TSG101, clathrines) ou bien des protéines HSP par exemple (Heat Shock Protein) (Mathivanan et al., 2010). La **figure 6** présente les différentes protéines retrouvées dans les exosomes, d'après les résultats de plusieurs études protéomiques.



**Figure 6 : Représentation graphique de la composition protéique des exosomes selon Mathivanan *et al.*** (Mathivanan et al., 2010). Les données proviennent de 19 études protéomiques différentes ayant identifié chacune au moins 30 protéines. Seules les protéines présentes dans plus de 26 % des études sont représentées.

### 3.3. Implications physiopathologiques des VEs

Il est aujourd'hui admis que les MVs et les exosomes sont impliqués dans de nombreuses fonctions physiologiques mais également dans de multiples pathologies.

Les MVs sont impliquées dans l'hémostase (Leroyer et al., 2008), implication qui est clairement illustrée par le syndrome de Scott. Cette pathologie se traduit par des troubles de la coagulation, causés par une réduction de l'activité des transporteurs lipidiques membranaires et une diminution de l'exposition de PS et de l'émission de MVs (Morel et al., 2011). Les MVs sont également impliquées dans la communication intercellulaire (Théry et al., 2009), l'inflammation (Vajen et al., 2015) ou encore l'angiogénèse (Morel et al., 2004). Outre leurs multiples rôles physiologiques, les MVs semblent liées à de nombreuses pathologies. Van Wijk *et al.* décrivent par exemple la relation entre maladies cardiovasculaires à risque thrombotique accru et taux élevés de MVs (VanWijk et al., 2003). D'autres études ont reporté l'implication de MVs dans l'invasion et la transformation tumorale (Antonyak et al., 2011; Giusti et al., 2008). La polyarthrite rhumatoïde (Boilard et al., 2010) ou le diabète (Lakhter and Sims, 2015) sont deux autres exemples de pathologies majeures dans lesquelles les MVs semblent jouer un rôle.

Les exosomes ont été majoritairement caractérisés dans le cas de cellules immunitaires ou tumorales (György et al., 2011b) et semblent grandement liés aux fonctions de l'immunité et au cancer. De nombreuses études décrivent le rôle des exosomes dans la communication intercellulaire, par exemple pour la présentation d'antigènes (Raposo et al., 1996) ou le transfert de matériel génétique entre cellules sous forme d'ARNm et de microARN (Valadi et al., 2007). Théry *et al.* suggèrent que des exosomes pourraient apporter de nouvelles fonctions à une cellule en fusionnant avec la membrane de celle-ci et en y ajoutant leurs protéines de surface (Théry et al., 2002). Les exosomes semblent également jouer un rôle d'élimination de déchets, en évacuant par exemple des molécules de récepteurs de la transferrine inutiles lors de la différenciation des réticulocytes (Johnstone, 1992). De nombreuses recherches décrivent la présence d'exosomes exposant des marqueurs tumoraux dans le cas de cancers (Melo et al., 2015; Skog et al., 2008; Taylor and Gercel-Taylor, 2008). En transférant des protéines ou du matériel génétique, certains exosomes seraient capables

de transformer des cellules saines en cellules tumorales (Peinado et al., 2012) ou bien de stimuler l'angiogénèse, qui est un mécanisme important dans le cadre de l'invasion tumorale (Skog et al., 2008). Les exosomes pourraient également être impliqués dans le métabolisme du peptide A $\beta$ , comme potentiel mécanisme de défense contre les espèces amyloïdes néfastes (van Niel, 2016).

## **4. Les méthodes d'études des VEs**

### **4.1. Les méthodes de purification et d'isolation des VEs**

Les VEs sont contenues dans des fluides biologiques ou dans des milieux de culture cellulaire, qui sont des liquides complexes pouvant contenir des cellules, des débris membranaires, des protéines et divers autres composants. Il est également courant que la concentration des VEs dans le fluide étudié soit faible. La caractérisation des VEs nécessite donc l'emploi de méthodes de purification visant à les isoler et/ou à les concentrer. De très nombreuses méthodes de purification et d'isolation existent, aussi me contenterai-je de décrire les plus fréquemment utilisées.

#### **4.1.1. Le prélèvement sanguin et la préparation du plasma**

Les conditions pré-analytiques sont capitales lors de l'étude de VEs, particulièrement dans le cas des VEs plasmatiques qui sont au cœur de ce travail de thèse. Il n'existe à l'heure actuelle pas de standardisation des méthodes de prélèvement et de préparation des échantillons sanguins toutefois Lacroix *et al.* ont récemment proposé une série de recommandations (Lacroix et al., 2012). Le sang doit être prélevé en utilisant des tubes en plastique contenant préférentiellement du citrate comme anticoagulant, l'EDTA étant notamment connu pour induire l'activation plaquettaire (Enjeti et al., 2007) et donc la production de VEs. Le prélèvement sanguin doit être effectué avec une aiguille d'un diamètre suffisant (21-gauge par exemple), et les premiers millilitres de sang prélevés doivent être éliminés. La préparation du plasma consiste en deux cycles de centrifugation (2500 g, 15 min) visant à éliminer les cellules sanguines et doit débuter après un délai maximum de deux heures à compter du prélèvement, afin de limiter l'activation plaquettaire. Notre équipe a récemment étudié

l'influence de la congélation et de la décongélation du plasma et mis en évidence une augmentation de 35% du nombre de VEs exposant la PS après congélation/décongélation. Une autre étude reporte que le nombre de VEs exposant la PS est multiplié par 7 après un cycle de congélation/décongélation (Yuana et al., 2015). L'utilisation d'échantillons sanguins frais est donc préférable.

#### **4.1.2. L'ultracentrifugation**

L'ultracentrifugation est la méthode d'isolation de VEs la plus répandue et est utilisée dans un très grand nombre d'études (György et al., 2011a; Melo et al., 2015; Raposo et al., 1996; Shet et al., 2003; Théry et al., 2006; Yuana et al., 2013). Cette technique permet de séparer des particules en suspension selon leur taille et leur densité (Beams et al., 1933). Les protocoles d'isolation de VEs consistent généralement en plusieurs cycles de centrifugation successifs à des vitesses différentes, visant à séparer les divers composants de l'échantillon. Les vitesses de centrifugation employées dépendent du fluide et du type de VEs à isoler mais sont communément les suivantes : 300 - 2.000 g pour éliminer cellules et grands fragments, 10.000 - 20.000 g pour isoler les MVs et 100.000 - 200.000 g pour isoler les exosomes (Raposo et al., 1996). L'ultracentrifugation différentielle est aisée à mettre en œuvre et permet également de concentrer les VEs d'un échantillon si nécessaire. Plusieurs études ont reporté que l'ultracentrifugation est susceptible de provoquer l'agrégation artefactuelle de VEs (Erdbrügger et al., 2014; Théry et al., 2006; van der Pol et al., 2012). Ce phénomène peut entraîner des interprétations de résultats erronées, comme par exemple la colocalisation anormale de protéines de surface d'origine cellulaire différente lors d'une analyse par cytométrie en flux (Diamant et al., 2002). La section 3 du chapitre « Résultats et discussions » de ce manuscrit traitera de l'étude de l'agrégation de VEs induite par l'ultracentrifugation. L'ultracentrifugation ne permet pas de séparer les VEs d'autres objets possédant des caractéristiques physiques similaires, comme certains complexes protéiques ou lipoprotéines qui peuvent être co-isolés avec les VEs et sont donc susceptibles de biaiser les résultats obtenus (György et al., 2011a). De plus, il est possible que certaines populations de VEs soient éliminées spécifiquement par l'une des étapes d'ultracentrifugation, y compris à basse vitesse, modifiant artificiellement la composition de l'échantillon (Rubin et al., 2010).

L'ultracentrifugation en gradient de densité est une variante de l'ultracentrifugation dans laquelle l'échantillon à purifier est déposé dans un tube contenant un gradient de concentration d'une molécule, comme du sucrose ou de l'iodixanol (OptiPrep®). L'ensemble est ensuite centrifugé à haute vitesse (100.000-210.000 g) puis les différentes fractions sont collectées (Théry et al., 2006). Cette méthode permet de séparer les VEs de particules non membranaires comme des agrégats protéiques, mais également de séparer différents types de VEs entre elles si elles possèdent des caractéristiques physiques différentes (Raposo and Stoorvogel, 2013). Les exosomes sont généralement retrouvés dans les fractions dont la densité est comprise entre 1.13 et 1.19 g/mL. Une étape de centrifugation supplémentaire est souvent réalisée afin d'éliminer la molécule composant le gradient et de concentrer les VEs (Escola et al., 1998; Théry et al., 2006). La méthode de l'ultracentrifugation en gradient de densité est principalement utilisée dans les études sur les exosomes (Admyre et al., 2007; Mathivanan et al., 2010; Van Deun et al., 2014; Wubbolts et al., 2003).

#### **4.1.3. La chromatographie d'exclusion de taille**

La chromatographie d'exclusion de taille (CET) est une méthode de chromatographie en phase liquide qui permet de séparer des objets en fonction de leur diamètre hydrodynamique (Lages et al., 1975). La méthode de CET est simple, peu coûteuse et permet notamment de séparer vésicules et protéines (Taylor et al., 1983). Il est généralement nécessaire d'effectuer au préalable une étape de centrifugation à basse vitesse afin d'éliminer les cellules et les grands fragments susceptibles de boucher la colonne (Muller et al., 2014). La méthode de CET a notamment été utilisée pour isoler des VEs contenues dans du plasma et dans du concentré plaquettaire (Böing et al., 2014), de la salive (Ogawa et al., 2008), ou de l'urine (Lozano-Ramos et al., 2015). Cependant, elle implique souvent une dilution de l'échantillon et ne permet donc pas de concentrer les VEs.

#### **4.1.4. La filtration et l'ultrafiltration**

Les méthodes impliquant la filtration ou l'ultrafiltration permettent de séparer les composants d'un fluide biologique en fonction de leur taille à l'aide d'une membrane semi-perméable. La filtration peut également être utilisée pour séparer les VEs des protéines et peut

éventuellement être suivie par une étape de CET (Lamparski et al., 2002; Lawrie et al., 2009; Nordin et al., 2015). Elle peut également être utilisée pour concentrer les VEs, en utilisant des pores de taille inférieure au diamètre des vésicules étudiées. Cette méthode peut cependant entraîner une déformation des VEs lors du passage dans le filtre en cas de pression trop importante. Notre équipe a ainsi constaté que des globules rouges lysés de 7  $\mu\text{m}$  de diamètre pouvaient être extrudés lors d'un passage par des pores calibrés à 200 et 400 nm (données non publiées). La filtration par gravité peut permettre de limiter ces éventuels artefacts mais peut être chronophage ou ne pas être applicable (György et al., 2011a).

#### **4.1.5. La précipitation induite par des polymères**

Plusieurs types de kits commerciaux de purification des VEs sont aujourd'hui disponibles, dont les kits Exoquick<sup>®</sup> ou Total Exosome Isolation<sup>®</sup> par exemple. Ces kits sont basés sur la précipitation des VEs en présence de polymères hydrophiles. En liant les molécules d'eau, les molécules de polymère forcent les éléments les moins solubles comme les VEs à précipiter. Les VEs peuvent ensuite être récupérées par centrifugation à basse vitesse. Ces kits sont aujourd'hui utilisés dans de nombreuses études, principalement axées sur les exosomes (Chugh et al., 2013; Lane et al., 2015; Umezu et al., 2013). Ils ont l'avantage d'être simples d'usage et prêts à l'emploi mais ne permettent pas de séparer les exosomes de contaminants tels que les lipoprotéines. L'échantillon peut être contaminé par des molécules de polymère, ce qui peut être incompatible avec les analyses ultérieures. Bien que ces kits soient vendus pour la purification d'exosomes, ils sont aspécifiques et normalement utilisables pour tous types de VEs. Il est intéressant de constater que des solutions de polymère de type polyéthylène glycol (PEG) sont couramment utilisées depuis plus de 50 ans pour isoler et concentrer des virus (Albertsson and Frick, 1960; Kangro and Mahy, 1996). Rider *et al.* décrit l'emploi d'une méthode similaire moins coûteuse car n'employant pas de kit commercial mais basée sur le même principe de précipitation induite par des molécules de PEG (Rider et al., 2016).

#### **4.1.6. L'immunoaffinité**

Différentes techniques de purification des VEs utilisent l'immunoaffinité. Elles sont basées sur la capture de VEs à l'aide d'une molécule spécifique d'un des antigènes de surface des VEs, comme un anticorps. Les anticorps peuvent être conjugués à des particules, magnétiques ou non. Les VEs capturées sont ensuite isolées par extraction magnétique ou sédimentation des particules (Lässer et al., 2012). De nombreux types d'anticorps (anti-CD326, -CD81, -CD63, -CD9, -CD31) (Arakelyan et al., 2015; Kowal et al., 2016; Tauro et al., 2012), ou encore de l'AnxA5 ou de la lactadhérine (Shih et al., 2016) ont été conjugués à des particules et ont été utilisés avec succès pour isoler des VEs issues de différents milieux. Les molécules de reconnaissance peuvent également être immobilisées sur une surface, sur laquelle est déposé l'échantillon contenant les VEs, potentiellement à l'aide d'un système microfluidique. Des études présentent par exemple la capture de VEs exposant l'antigène CD63 (C. Chen et al., 2010) ou CD41 (Ashcroft et al., 2012) dans des échantillons de sérum. L'immunoaffinité possède l'avantage d'être une méthode spécifique, permettant d'isoler des VEs en fonction d'un antigène de surface choisi, et non pas en fonction de leurs propriétés physiques. Elle peut être difficilement applicable à de grands volumes d'échantillon et reste généralement assez coûteuse.

#### **4.1.7. Autres méthodes de purification et d'isolation**

Parmi les méthodes de purification et d'isolation moins fréquemment utilisées, il est possible de citer la purification acoustique, qui utilise des ondes de type ultrason pour séparer des particules en fonction de leur taille (Lee et al., 2015), ou la dialyse qui permet de séparer les VEs de particules plus petites comme des agrégats protéiques par diffusion à travers une membrane semi-perméable (Musante et al., 2014).

## 4.2. Les méthodes d'analyse des VEs

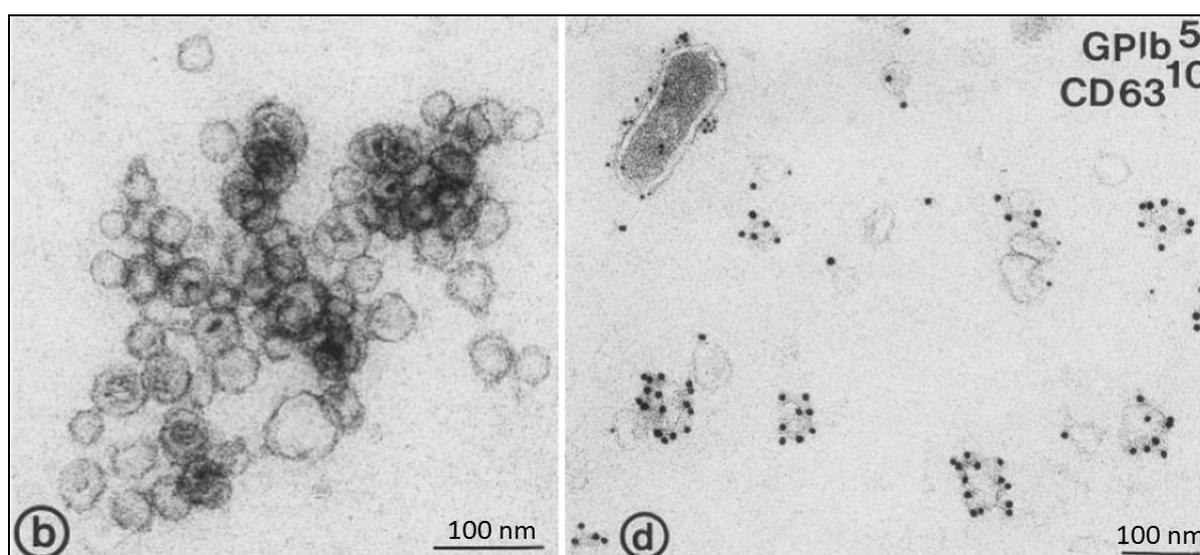
A l'instar des méthodes d'isolation et de purification, les méthodes d'analyse des VEs sont nombreuses et variées. Cette section décrira brièvement les plus utilisées, en mettant l'accent sur les techniques utilisées au cours de mon travail de thèse. Il est intéressant de noter que l'ISEV recommande l'usage d'au moins deux techniques de caractérisation indépendantes pour toute étude concernant les VEs (Witwer et al., 2013), afin de recouper et d'affiner les résultats obtenus.

### 4.2.1. La microscopie électronique à transmission (MET)

Développé par Ernst Ruska en 1933, le microscope électronique à transmission utilise un faisceau d'électrons pour illuminer un échantillon mince et en donner une image agrandie. La source d'électrons est généralement une pointe d'hexaborure de lanthane ou un canon à émission de champ. Les électrons émis sont accélérés sous haute tension dans une colonne où règne un vide poussé, et sont focalisés sur l'échantillon à l'aide d'un système de lentilles électromagnétiques. Lors de l'interaction entre le faisceau et les atomes composant l'échantillon, les électrons peuvent notamment être transmis ou diffusés. Ces électrons sont collectés sur un écran recouvert d'une couche phosphorescente ou sur un détecteur de type caméra CCD, ce qui permet de construire une image. Dans le cas d'échantillons biologiques, la MET permet d'atteindre des résolutions de quelques Å lors de l'analyse de molécules, ou de l'ordre du nanomètre dans le cas d'assemblages supramoléculaires comme les VEs (van der Pol et al., 2010). Grâce à cette résolution, la MET permet de déterminer la taille et la morphologie des VEs. Lorsqu'elle est combinée au marquage par des nanoparticules d'or conjuguées à des anticorps, la MET permet d'obtenir des informations sur les molécules exposées par les VEs. Les principales techniques de préparation d'échantillons applicables à l'étude de VEs par MET sont développées ci-dessous.

#### 4.2.1.1. La coloration négative

La méthode de préparation d'objets biologiques la plus répandue est la coloration négative, qui est utilisée dans de nombreuses études concernant les VEs (Böing et al., 2014; Heijnen et al., 1999; Yuana et al., 2014). L'échantillon est déposé sur une grille de cuivre recouverte d'un film de carbone continu puis contrasté à l'aide d'une solution généralement composée de sels d'atomes lourds comme l'acétate d'uranyle. Les grains de colorant se déposent dans les creux et autour des objets, générant un contraste du fait de leur fort numéro atomique (Hayat and Miller, 1990). La coloration négative est une méthode rapide, simple à mettre en œuvre et peu coûteuse. Les échantillons ne sont néanmoins pas observés dans leur état natif car les vésicules subissent un phénomène de déshydratation qui peut affecter leur taille et leur morphologie. La **figure 7** présente des images de MET de VEs préparées par coloration négative.



**Figure 7 : Images de MET présentant des échantillons de VEs préparés par la méthode de coloration négative.** Adapté de (Heijnen et al., 1999). La plupart des VEs visibles sur l'image de droite sont marquées par des nanoparticules d'or couplées à des anticorps. L'immunomarquage en MET sera abordé ultérieurement.

#### 4.2.1.2. *L'ultramicrotomie, ou méthode des coupes ultra-minces*

La méthode d'ultramicrotomie est une technique de préparation permettant l'obtention de coupes ultra-minces, d'une épaisseur généralement inférieure à 100 nm, à partir d'un échantillon massif (Hayat, 1970). Pour étudier les VEs avec cette méthode, il est nécessaire de les centrifuger pour former un culot. Ce culot est ensuite fixé chimiquement, contrasté et enrobé dans de la résine. Il est ensuite coupé à l'aide d'un ultramicrotome, coloré puis observé en MET. Cette technique a été notamment utilisée pour imager des VEs issues de liquide synovial (György et al., 2012) ou de surnageant de culture de levures (Rodrigues et al., 2008). Cette méthode, qui permet d'observer un grand nombre de VEs, peut cependant induire des artefacts liés aux étapes de fixation, de déshydratation et de coupe. Ces phénomènes peuvent affecter la taille, la morphologie et l'antigénicité des VEs (Ayache et al., 2010).

La cryo-ultramicrotomie, une variante de l'ultramicrotomie, utilise la congélation ultra-rapide plutôt que l'enrobage en résine pour durcir l'échantillon (Raposo et al., 1996).

Il est également possible d'utiliser ces techniques d'ultramicrotomie pour faire des coupes de cellules et observer par exemple l'émission de VEs (Heijnen et al., 1999; Pan et al., 1985).

#### 4.2.1.3. *La cryo-MET d'échantillons minces*

La cryo-MET est une méthode de microscopie électronique à transmission, permettant d'imager des échantillons biologiques minces dans leur état quasi-natif et hydraté (Dubochet et al., 1988). Cette technique est particulièrement adaptée à l'étude de petits objets membranaires comme les VEs et de nombreux travaux récents reportent l'usage de cette méthode pour imager les VEs (Arraud et al., 2014a; Höög and Lötvall, 2015; Milasan et al., 2016; Tatischeff et al., 2012; Yuana et al., 2013). La cryo-MET permet la résolution des deux feuillettes de la bicouche lipidique entourant les VEs, grâce aux atomes de phosphore relativement lourds contenus dans les têtes polaires des phospholipides. Ceci permet de valider la nature membranaire d'une vésicule de manière univoque. Le principal avantage de la cryo-MET est de permettre l'observation des VEs contenues dans un milieu complexe comme le plasma, sans étapes de séchage, de fixation, de coloration ou de coupe, réduisant les éventuels artefacts liés à la préparation de l'échantillon.

#### **4.2.2. La microscopie électronique à balayage**

A l'instar de la MET, la microscopie électronique à balayage (MEB) utilise un faisceau d'électrons pour imager un échantillon mais permet l'observation d'échantillons épais et procure notamment des informations topographiques. La MEB a notamment été utilisée pour imager des VEs issues de sang (Kralj-Iglic et al., 2011), de milieux de culture cellulaire (Sokolova et al., 2011) ou de sérum (C. Chen et al., 2010). Cette technique permet de déterminer la morphologie et la taille des VEs.

#### **4.2.3. La cytométrie en flux**

La cytométrie en flux (CF) est une méthode d'analyse multi-paramétrique initialement utilisée pour la caractérisation des cellules (Givan, 2001). La CF est aujourd'hui l'une des principales méthodes d'étude des VEs. Elle permet de déterminer la concentration de VEs dans un échantillon et peut également détecter l'intensité de fluorescence d'un objet préalablement marqué par un fluorophore. Cette caractéristique permet d'identifier les VEs à partir de leurs antigènes de surface. La CF dite conventionnelle détecte les VEs sur la base de leur intensité de diffusion de la lumière. Bien que largement utilisée (Ayers et al., 2011; Chironi et al., 2009; Horstman et al., 2007), cette méthode est peu sensible et ne permet de détecter que 1 à 2 % des VEs, à cause de leur taille trop faible (Arraud et al., 2014b; Van der Pol, 2010). Il est possible de déclencher la détection d'une VE sur la base de son intensité de fluorescence plutôt que son intensité de diffusion de la lumière. Initialement développée pour la caractérisation de particules virales (Brussaard et al., 2000; Marie et al., 1999), cette méthode est de plus en plus appliquée à l'étude des VEs (Arraud et al., 2016; Hoen et al., 2012; Jimenez et al., 2001; van der Vlist et al., 2012). L'intensité de fluorescence d'une vésicule submicrométrique étant supérieure à son intensité de diffusion de la lumière (van der Pol et al., 2010), cette méthode permet d'abaisser le seuil de détection et de détecter une plus grande proportion de VEs. Une étude menée par notre équipe a estimé que des VEs de 100 à 150 nm marquées par de l'AnxA5 fluorescente pouvaient être détectées (Arraud et al., 2014b). Cette limite de 100-150 nm est cependant encore trop haute pour détecter la totalité des VEs, en particulier les exosomes dont la taille est inférieure à 100 nm.

Il existe également des cytomètres dits « imageurs », qui combinent un cytomètre en flux et un microscope optique à fluorescence. Ce type d'appareil permet, en plus de l'analyse cytométrique classique, d'imager individuellement les VEs et de visualiser un éventuel marquage fluorescent (Clark, 2015; Erdbrügger et al., 2014).

#### **4.2.4. L'analyse du suivi individuel de nanoparticules (NTA)**

L'analyse du suivi individuel de nanoparticules (NTA) est une méthode biophysique basée sur la diffusion de la lumière, permettant de déterminer la concentration et la distribution de taille d'une suspension de particules (Gardiner et al., 2013) de taille comprise entre 50 nm et 1 µm (van der Pol et al., 2010). Le NTA est rapidement devenu une méthode très populaire dans le domaine des VEs grâce à sa simplicité d'utilisation (Gercel-Taylor et al., 2012; Maas et al., 2015; Sokolova et al., 2011). La principale limitation du NTA est l'absence de marquage spécifique des VEs. Tous les types de particules sont donc détectés et des lipoprotéines ou des immunocomplexes peuvent fausser la concentration et la distribution de taille de l'échantillon.

Une technique de NTA couplée à l'utilisation de fluorophores a récemment fait son apparition (F-NTA) (Dragovic et al., 2011). Le principe est similaire à celui du NTA conventionnel mais les particules sont détectées et suivies grâce à leur signal de fluorescence. Comme pour la cytométrie en flux, il en résulte un gain de sensibilité théorique.

#### **4.2.5. L'analyse moléculaire : western blot et spectrométrie de masse**

La technique de Western Blot est une méthode biochimique permettant la détection et l'identification de protéines contenues dans un échantillon biologique. La première étape de cette technique est une électrophorèse sur gel, qui permet de séparer les protéines en fonction de leur poids moléculaire. Les protéines sont ensuite transférées sur une membrane de nitrocellulose, puis la présence éventuelle de protéines est révélée par immunomarquage (Burnette, 1981; Hnasko and Hnasko, 2015). Cette méthode permet l'analyse de la composition protéique d'un échantillon de VEs. Les marqueurs recherchés sont généralement des marqueurs des exosomes, comme le CD63, le CD9 ou la protéine Alix (Bobrie et al., 2012). Raposo *et al.* ont quant à eux pu mettre en évidence la présence de molécules du complexe

majeur d'histocompatibilité à la surface d'exosomes grâce à cette méthode (Raposo et al., 1996).

La spectrométrie de masse est une technique physique d'analyse qui permet d'identifier précisément des molécules contenues dans un échantillon, par rapport à leur masse. Dans le domaine des VEs, elle permet notamment d'étudier leur composition lipidique et protéique, ainsi que les métabolites contenus dans les VEs (Kreimer et al., 2015; Pocsfalvi et al., 2016).

#### 4.2.6. Autres méthodes d'étude

Il existe de nombreuses autres méthodes de caractérisation des VEs, moins communément utilisées.

La méthode de tRPS (tunable Resistive Pulse Sensing), basée sur le principe du compteur Coulter (Coulter, 1953), permet notamment de déterminer la taille et la concentration d'une population de VEs. Le principe physique de cette technique la limite cependant à l'étude d'échantillons possédant une faible polydispersité (Anderson et al., 2015). Cette technique s'est popularisée récemment et a été notamment utilisée pour caractériser des VEs issues de milieu de culture cellulaire (Lane et al., 2015) ou de fluide céphalorachidien (Maas et al., 2014). La méthode de diffusion dynamique de la lumière est une méthode biophysique permettant de mesurer la distribution de taille d'une suspension de particules dans une large gamme de tailles (1 nm-6  $\mu$ m). Elle est cependant peu adaptée à l'analyse de solutions polydisperses et ne permet pas de déterminer la concentration d'un échantillon, ni d'obtenir d'informations sur les marqueurs de surface des VEs (van der Pol et al., 2010).

La microscopie à force atomique (AFM) est également parfois utilisée pour l'étude des VEs, et permet de déterminer la taille et la morphologie des VEs avec une résolution nanométrique. (Siedlecki et al., 1999; Yuana et al., 2010).

Citons également la résonance plasmonique de surface (SPR) (Rupert et al., 2016), la spectroscopie Raman (Tatischeff et al., 2012), la microbalance à cristal de quartz (QCM) (György, 2012), la microscopie optique (MO) (Choi and Lee, 2016; Lai et al., 2015), ou les tests de type « ELISA » (Logozzi et al., 2009).

La **figure 8** récapitule les caractéristiques principales des méthodes d'étude des VEs les plus répandues.

Méthode d'étude	Gamme de taille détectée	Distribution de taille	Concentration	Détection de marqueurs
Microscopie électronique en transmission	< 1 nm	Oui	Non*	Oui
Microscopie électronique à balayage	< 1 nm	Oui	Non	Oui
Cytométrie en flux conventionnelle	< 300 - 700 nm	Non	Oui	Oui
Cytométrie en flux + fluorescence	< 100-150 nm	Non	Oui	Oui
Analyse par suivi de nanoparticule individuelle	50 nm - 1 µm	Oui	Oui	Oui**
Diffusion dynamique de la lumière	1 nm - 6 µm	Oui	Non	Non
Tunable Resistive Pulse Sensing	70 nm - 10 µm	Oui	Oui	Non
Microscopie à force atomique	< 1 nm	Oui	Non	Non
Tests fonctionnels "ELISA"	-	Non	Non	Oui
Western blot & Spectrométrie de masse	-	Non	Non	Oui

**Figure 8 : Tableau récapitulatif des principales méthodes d'étude applicables aux VEs.** \* = à l'exception de la méthode de MET de sédimentation sur grille présentée dans ce manuscrit de thèse. \*\* = uniquement dans le cas de l'utilisation d'un marqueur fluorescent.

## 5. Les nanoparticules d'or et l'immunomarquage en microscopie électronique à transmission

Les nanoparticules d'or (NpAu) sont utilisées de manière empirique depuis près de deux millénaires, notamment pour colorer le verre et la porcelaine. On leur conférait également toutes sortes de propriétés curatives en cas de syphilis, de dysenterie, d'épilepsie... Ce n'est qu'à partir du milieu du 19<sup>ème</sup> siècle que l'or colloïdal commença à être étudié de manière scientifique, avec les travaux de Michael Faraday. Il décrit la synthèse de solutions d'or colloïdal rouge sombre par réduction de chloroaurate par du phosphore (Daniel and Astruc, 2004), fondant ainsi les bases des nanotechnologies modernes.

### 5.1. Propriétés, synthèse et applications des nanoparticules d'or

A l'échelle nanométrique, les propriétés des matériaux changent et peuvent être différentes du matériau massif. Elles sont notamment très dépendantes de la taille de l'objet étudié (Brust and Kiely, 2002). Ce phénomène est en grande partie dû au fait que le rapport surface/volume augmente à mesure que la taille d'une particule diminue et que les atomes de surface ont un comportement différent des atomes situés dans le volume. Dans le cas des NpAu par exemple, la proportion d'atomes d'or en surface est plus importante que pour de l'or massif, ce qui confère de nouvelles propriétés à l'or colloïdal. La couleur rouge sombre de certaines suspensions de NpAu est due à l'une de ces propriétés. Lorsqu'une nanoparticule métallique est soumise à un champ électromagnétique, certains électrons de la particule peuvent se mettre à osciller collectivement. Lorsque la fréquence de l'onde incidente correspond à la fréquence des oscillations, un phénomène de résonance, appelé résonance du plasmon de surface, apparaît (Sönnichsen et al., 2002). Dans le cas de NpAu de 10 nm de diamètre, cette résonance a lieu dans le spectre visible, avec une bande d'absorption centrée vers 520 nm, ce qui donne sa coloration rouge à la suspension de NpAu (Daniel and Astruc, 2004). Cette propriété sera utilisée pour déterminer la concentration particulaire des suspensions de NpAu utilisées au cours de cette étude, par mesure de leur densité optique (DO) à 520 nm. Le coefficient d'extinction molaire vaut  $\epsilon_{520\text{nm}} = 1.804 \times 10^{-16} \text{ L.p}^{-1}.\text{cm}^{-1}$  pour des NpAu de 10 nm de diamètre (Stéphane Mornet, communication personnelle).

Les protocoles de synthèse de NpAu les plus répandus utilisent la réduction d'un sel d'or par un agent réducteur. L'ajout de l'agent réducteur permet la nucléation des ions Au en NpAu. Un agent stabilisant est également requis, qui peut être adsorbé ou lié chimiquement à la surface des NpAu. Ce composé est généralement chargé, afin que les particules soient elles même chargées et se repoussent les unes les autres permettant à la solution colloïdale d'être stable (Sperling et al., 2008). La méthode décrite par John Turkevich *et al.* en 1951 (Turkevich et al., 1951) est le protocole de synthèse de NpAu le plus répandu. Du tétrachloroaurate de potassium ( $\text{KAuCl}_4$ ) est réduit par du citrate de sodium, ce qui aboutit à la formation de NpAu en suspension aqueuse. Dans cette méthode, les ions citrate jouent également le rôle d'agent stabilisateur. Ils sont adsorbés à la surface des NpAu et leur confèrent une charge négative, assurant la répulsion électrostatique des particules entre elles (Sperling et al., 2008). La taille des NpAu peut être contrôlée en modifiant les quantités relatives de sel d'or et de citrate de sodium (Frens, 1973). Une autre méthode de synthèse populaire est la méthode de Brust-Schiffrin (Brust et al., 1994). Cette méthode est également basée sur la réduction d'un sel d'or mais est réalisée dans des solvants organiques. Elle permet d'obtenir des NpAu mesurant entre 1 et 5 nm et possédant une faible polydispersité. Ces nanoparticules peuvent ensuite être fonctionnalisées par des thioalcanes, dont les atomes de soufre se lient avec une forte affinité aux atomes d'or (Sapsford et al., 2013). Les NpAu synthétisées par cette méthode ont notamment la particularité de pouvoir être séchées, stockées puis resuspendues dans un solvant organique sans que leur nature colloïdale ne soit altérée.

Les NpAu peuvent ensuite être fonctionnalisées par différents ligands, en échangeant l'agent stabilisateur contre une autre molécule. Les molécules de PEG sont couramment utilisées car elles confèrent une stabilisation stérique aux NpAu et permettent de réduire l'adsorption non spécifique de molécules à la surface des particules (Kanaras et al., 2002). Le nouveau ligand peut également porter une fonction réactive, permettant de coupler une molécule d'intérêt à aux NpAu dans l'optique de leur donner de nouvelles propriétés (Sperling et al., 2008). Le protocole de couplage le plus commun utilise une réaction d'acylation entre acide carboxylique et amine pour coupler les molécules d'intérêt par le biais d'une liaison amide. Une stratégie utilisant des thiols et des maléimides pour créer une liaison thioéther est également applicable (Hermanson, 2013).

Les nanoparticules d'or possèdent de nombreuses applications, telles que la délivrance spécifique de drogues (Cai et al., 2008) ou la destruction de cellules tumorales par hyperthermie (Pissuwan et al., 2006). Les NpAu sont également couramment utilisées dans une technique de spectrométrie Raman particulière, le SERS (Surface-Enhanced Raman Scattering), où elles exaltent le signal Raman et permettent un immense gain de sensibilité de la technique (Wokaun et al., 1982). Une autre application majeure des NpAu est l'immunomarquage à l'or pour la MET.

## **5.2. L'immunomarquage à l'or en microscopie électronique à transmission**

Les électrons sont fortement diffusés par les atomes lourds. Avec un numéro atomique de 79, l'or est très dense aux électrons et offre un fort contraste en MET (Roth, 1996), les NpAu apparaissant sous la forme de points noirs sur les images. L'immunomarquage à l'or consiste à cibler une molécule d'intérêt à l'aide d'un anticorps dirigé contre cette molécule, puis à utiliser des nanoparticules d'or pour révéler cette liaison.

Il existe deux méthodes d'immunomarquage à l'or. La première est un marquage en deux étapes. Elle consiste dans un premier temps à incuber l'échantillon avec un anticorps dirigé contre la molécule à marquer. Cet anticorps est appelé anticorps primaire. Après des étapes de lavage visant à éliminer l'anticorps primaire en excès, l'échantillon est incubé avec un anticorps secondaire couplé à une NpAu. Cet anticorps est choisi pour être capable de reconnaître l'anticorps primaire, permettant ainsi de révéler sa liaison aux molécules d'intérêt grâce au contraste apporté par les NpAu (Alberts et al., 2008). Il est possible d'utiliser des NpAu conjuguées à la protéine A ou à la protéine G à la place des NpAu conjuguées à l'anticorps secondaire, les protéines A et G étant capables de reconnaître le fragment Fc des anticorps de type IgG (Tapia et al., 1983). La seconde méthode est un marquage direct, qui consiste à utiliser des NpAu directement conjuguées à l'anticorps primaire, ce qui permet de réaliser un marquage en une seule étape et d'éviter les lavages (Arraud et al., 2014a; Brisson and Mornet, 2007). Il est également possible de marquer et d'identifier plusieurs antigènes simultanément. Dans le cas de la méthode directe, chaque anticorps d'intérêt est conjugué à un type de NpAu de taille différente, permettant de différencier les anticorps lors de l'observation par MET (Arraud et al., 2014b). Dans le cas de la méthode indirecte, il est possible d'utiliser des NpAu conjuguées à la protéine A de tailles différentes pour reconnaître

les différents anticorps, en incubant les réactifs dans l'ordre suivant : anticorps 1, nanoparticule d'or 1, anticorps 2, nanoparticule d'or 2. Des lavages sont effectués entre chaque étape pour éliminer les anticorps ou les nanoparticules non liés (Geuze et al., 1981). Il est également possible d'utiliser des anticorps primaires de différentes sortes, par exemple un anticorps de lapin et un anticorps de cochon d'inde. Le marquage est ensuite révélé en utilisant un anticorps secondaire dirigé contre l'anticorps de lapin et un autre dirigé contre l'anticorps de cochon d'inde, ces deux anticorps étant conjugués à des NpAu de tailles différentes (Tapia et al., 1983). L'immunomarquage à l'or peut être appliqué à la plupart des méthodes de MET, dont celles présentées précédemment.

La technique d'immunomarquage par des NpAu en MET est très largement utilisée depuis sa première description en 1971 (Faulk and Taylor, 1971). Dans le domaine des VEs, l'immunomarquage à l'or permet d'identifier des molécules exposées à la surface des vésicules. Ceci peut par exemple permettre de déterminer leur origine cellulaire ou si elles exposent la PS. De nombreuses études concernant les VEs utilisent l'immunomarquage à l'or, que ce soit avec des méthodes de préparation de type coloration négative (Berckmans et al., 2011; Melo et al., 2015), ultramicrotomie (Heijnen et al., 1999; Raposo et al., 1996) ou cryo-MET (Arraud et al., 2014b; Linares et al., 2015). Les anticorps couramment utilisés sont généralement dirigés contre les marqueurs des VEs tels que le CD9, le CD63 ou le CD81. Pour marquer la PS, l'AnxA5 ou la lactadhérine sont généralement utilisées. Le terme « immuno » marquage est utilisé dans ce document dans le cas de l'AnxA5 même si cette protéine n'est pas un anticorps.

## B – MATÉRIELS ET MÉTHODES

### 1. Liste des produits utilisés

Le cacodylate de sodium provient d'Agar Scientific (Gometz-La-Ville, France). Le réactif de Traut (2-Imino-thiolane) provient de Thermo Fisher Scientific (Villebon sur Yvette, France). Les phospholipides 1,2-dioleoyl-sn-glycero-3-phosphocholine (DOPC) et 1,2-dioleoyl-sn-glycero-3-phospho-L-serine (DOPS) proviennent d'Avanti Polar Lipids (Alabaster, AL, USA). Le lipide fluorescent 1,1'-dioctadecyl-3,3',3'-tetraméthylindodicarbocyanine perchlorate (DiI18(5) ou DiI) provient d'Invitrogen (Villebon-sur-Yvette, France). L'anticoagulant D-phenylalanyl-prolyl-arginine chlorométhyl ketone (PPACK) provient de Haematologic Technologies (Cryoep, Montpellier, France). Le colorant bleu de Coomassie Biosafe et le mélange acrylamide-bisacrylamide proviennent de BioRad (Marnes-la-Coquette, France). Le fluorophore Cyanine 5-maléimide (Cy5-Mal) provient de GE Healthcare (Vélizy-Villacoublay, France). Le fluorophore Fluorescéine-5-maléimide (Fluo-Mal) provient de Molecular Probes (Life Technologies, Saint-Aubin, France). Le polyéthylène glycol (PEG) maléimide et le PEG hétérobifonctionnel succinimidyl valérate/maléimide (SVA-PEG-Mal) proviennent de Laysanbio (Arab, AL, USA).

Les anticorps anti-CD41 proviennent d'Abcam (Cambridge, Angleterre). Les anticorps anti-CD235a, anti-CD45 et anti-CD9, ainsi que les anticorps anti-CD235a couplés à de la phycoérythrine, proviennent de Beckman Coulter (Villepinte, France). Les anticorps anti-CD63 proviennent de BD (Becton Dickinson, Le Pont de Claix, France). Les anticorps anti-HER2 Herceptin® nous ont été donnés par le Pr. Jacques Robert (Institut Bergonié, Bordeaux, France) et les anticorps anti-CD326 (BioLegend, Londres, Angleterre) par le Dr Sandrine Dabernat (INSERM 1035, Bordeaux, France). Les anticorps anti-CD62P proviennent de Biocytex (Marseille, France). Les anticorps anti-PSA 1A7 et 3E6 proviennent d'Epsilon Biotech (Zonhoven, Belgique).

L'annexine-A5 (AnxA5) est produite au laboratoire, selon la méthode décrite par Richter *et al.* (Richter et al., 2005). L'AnxA5 mutée exposant un thiol (AnxA5-SH) est également produite au laboratoire selon la méthode décrite par Bérat *et al.* (Bérat et al., 2007).

Les particules magnétiques de 1  $\mu\text{m}$  exposant des amines (1 $\mu\text{m}$ -PMag-NH<sub>2</sub>) proviennent d'Ocean Nanotech (San Diego, CA, USA). Les microbilles Sphero<sup>®</sup> 1  $\mu\text{m}$  Ultra Rainbow proviennent de Spherotech (Interchim, Montluçon, France). Les nanoparticules d'or de 4 nm conjuguées à l'AnxA5 et les 50nm-PMag-AnxA5 nous ont été données par le D<sup>r</sup> Stéphane Mornet (ICMCB, Pessac, France).

Les grilles de MET recouvertes d'un film de carbone continu proviennent de LFG Distribution (Lyon, France). Les grilles de MET recouvertes d'un film de carbone perforé proviennent de Ted Pella (Redding, CA, USA).

Tous les autres produits sont choisis avec la plus haute pureté disponible et proviennent de Sigma-Aldrich (Saint-Quentin-Favallier, France).

## 2. Tampons

Tous les tampons utilisés lors de cette étude sont préparés à partir d'eau déionisée (18 M $\Omega$ ) produite par un système RiOs5 de Millipore (Molsheim, France). La liste ci-dessous présente la composition des tampons, ainsi que leur abréviation qui sera utilisée dans le reste de ce document.

- Tampon CF : 150 mM NaCl, 10 mM HEPES (acide 4-(2-hydroxyéthyl)-1-pipérazine éthane sulfonique), 0.02% NaN<sub>3</sub>, pH 7.4

Ce tampon peut également contenir de la BSA (albumine de sérum de bovin) à 1 g/L, du CaCl<sub>2</sub> à 2 mM et/ou du PPACK à 10  $\mu\text{M}$  lorsque cela est spécifié.

- Tampon Phosphate : 50 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub><sup>-</sup>, pH 8

- Tampon HEPES : 100 mM HEPES, pH 7.8

- Tampon HEPES-EDTA : 50 mM HEPES, 10 mM EDTA, pH 7

- Tampon Cacodylate : 100 mM C<sub>2</sub>H<sub>6</sub>AsNaO<sub>2</sub>, 0.02% NaN<sub>3</sub>, pH 7.4

Ce tampon peut également contenir du CaCl<sub>2</sub> à 2 mM lorsque cela est spécifié.

- Tampon Borate : 100 mM  $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$ , pH 8
- Tampon de migration SDS-PAGE : 25 mM Tris, 192 mM Glycine, 3.5 mM SDS

Les tampons sont filtrés à 0.22  $\mu\text{m}$  après préparation.

Tous les tampons utilisés pour la synthèse et la fonctionnalisation des nanoparticules d'or (NpAu) sont préalablement dégazés dans un bain à ultrasons et sous pression réduite, à l'aide d'une pompe à membrane. De l'argon est ensuite injecté dans le tampon pendant 15 minutes puis la bouteille est rapidement refermée. Ces étapes visent à réduire au maximum la quantité d'oxygène dissous dans le tampon afin d'éviter que l'oxygène puisse interférer avec les étapes de synthèse et de fonctionnalisation.

### **3. Préparation des échantillons biologiques**

#### **3.1. Prélèvement sanguin**

Le sang a été collecté auprès de quatre personnes saines (une femme, trois hommes) après signature d'un consentement éclairé. Du sang provenant de la veine antécubitale a été prélevé en utilisant une aiguille de 21-Gauge (diamètre externe 0.7239 mm) après application d'un tourniquet légèrement serré. Celui-ci a été retiré après le remplissage du premier tube, qui est éliminé. Le sang a été collecté dans des tubes BD Vacutainer® de 4.5 mL contenant 0.1 volume de citrate de sodium à 105 mM (Becton Dickinson).

#### **3.2. Plasma dépourvu de plaquettes (PFP)**

La préparation du PFP débute moins d'une heure après le prélèvement sanguin. Les tubes de sang sont centrifugés une première fois (2500 g, 15 min, 25 °C) en utilisant une centrifugeuse Eppendorf 5804R (Montesson, France) équipée d'un rotor A-4-44 de type swinging bucket. 1.8 mL de surnageant est collecté pour chaque tube puis transféré dans un tube Eppendorf de 2 mL. Les tubes Eppendorf subissent une seconde centrifugation identique à la première, et le PFP est obtenu en collectant 1.3 mL de surnageant pour chaque tube. Le PFP est utilisé frais dans la journée ou aliquoté et congelé à -80 °C pour une utilisation ultérieure.

### 3.3. Globules rouges lysés (GR-L)

A partir d'un tube de sang centrifugé une première fois (2500 g, 15 min, 25 °C) en 3.2, des globules rouges sont prélevés dans le culot puis dilués 200 fois dans de l'eau déionisée afin de les lyser par choc osmotique. Les globules rouges lysés (GR-L) sont utilisés frais dans la journée, ou aliquotés et congelés à -80 °C pour une utilisation ultérieure.

## 4. Préparation de liposomes : MLV, LUV et SUV

Des liposomes sont préparés par réhydratation d'un film lipidique (Garnier et al., 2012). Des lipides 1,2-dioleoyl-sn-glycero-3-phosphocholine (DOPC), 1,2-dioleoyl-sn-glycero-3-phospho-L-serine (DOPS) et 1,1'-dioctadecyl-3,3,3',3'-tetraméthylindodicarbocyanine perchlorate (Di) en poudre sont dissous dans du chloroforme puis mélangés dans un ballon dans des proportions DOPC/DOPS/DI 79/20/1. Le chloroforme est ensuite évaporé sous pression réduite à l'aide d'un évaporateur rotatif (Rotavapor Büchi, Flavelle, Suisse), entraînant la formation d'un film lipidique. Celui-ci est ensuite réhydraté avec du tampon CF et vortexé. La suspension lipidique est ensuite soumise à cinq cycles de congélation/décongélation par trempages successifs du ballon dans de l'azote liquide puis dans de l'eau chaude. Ces étapes permettent d'obtenir des liposomes multilamellaires (MLV) de taille hétérogène, qui servent de matériel de base à la fabrication de liposomes unilamellaires de grande taille (LUV) et de petite taille (SUV).

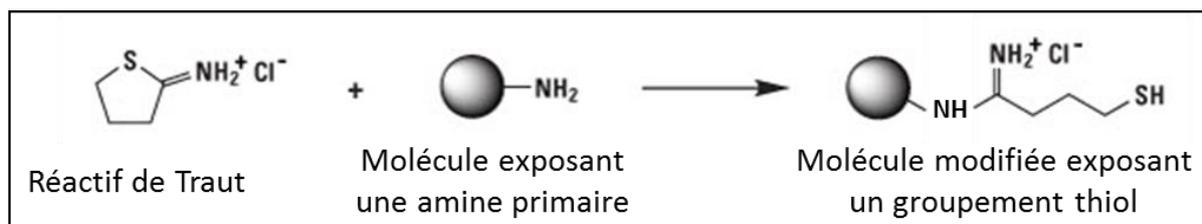
Les LUV sont obtenus après extrusion de MLV avec un Mini-Extrudeur Avanti. Les MLV passent au travers de membranes de polycarbonate possédant des pores de diamètre calibré. Les LUV utilisés lors de cette étude ont subi deux extrusions successives à 800 nm et 400 nm. Dix passages sont effectués pour chaque membrane.

Les SUV sont obtenus après sonication de MLV avec un sonicateur à sonde de titane Branson modèle 250 (Danbury, CT, USA). Les MLV sont soniqués durant 30 minutes avec un paramètre d'amplitude de 20%. La sonde relargue des particules de titane dans la solution de SUV, qui sont éliminées par une centrifugation à 16.000 g pendant 10 minutes. Les SUV formés ont un diamètre de 30 à 50 nm.

## 5. Thiolation d'anticorps et caractérisation biochimique des anticorps modifiés

### 5.1. Thiolation d'anticorps par modification d'amine primaire par du réactif de Traut

La stratégie de conjugaison de protéines à des NpAu utilisée dans cette étude nécessite des protéines exposant au moins un thiol accessible, ce qui n'est pas le cas de la plupart des protéines ou des anticorps. Le réactif de Traut (ou 2-Iminothiolane) est une molécule qui réagit avec les amines primaires pour former un composé thiolé (Traut et al., 1973). Cette réaction est présentée dans la **figure 9**. Les amines naturellement accessibles à la surface des anticorps, provenant des résidus lysines et arginines ainsi que du N-terminal, seront utilisées pour cette thiolation.



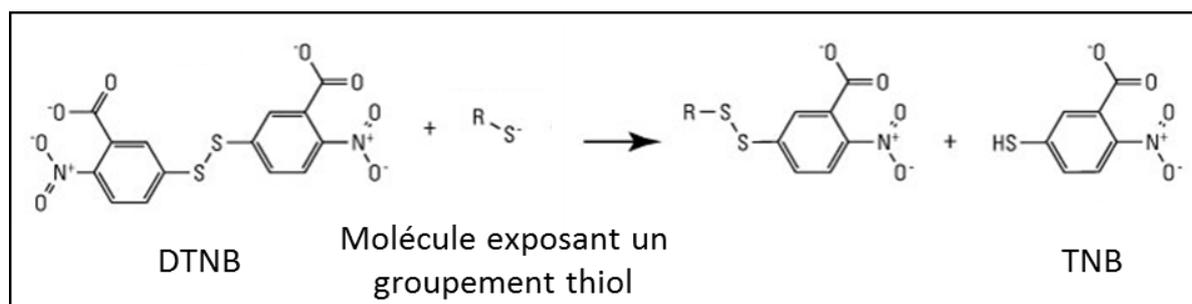
**Figure 9 : Réaction entre le réactif de Traut et une molécule exposant une amine primaire.** Après réaction, la molécule est modifiée et expose un thiol (*ThermoFisher.com*).

La réaction entre le réactif de Traut et les amines étant favorisée à pH basique, le tampon des anticorps est échangé contre un tampon à pH 8 contenant 50 mM de  $\text{NaH}_2\text{PO}_4^-$  (tampon Phosphate). Les anticorps sont lavés par ultrafiltration, en utilisant des filtres à centrifuger Amicon® (Merck Millipore) possédant une membrane poreuse calibrée à 30 kDa et d'un volume de 500  $\mu\text{L}$ . Cinq cycles de centrifugation (14.000 g, 5 min, température ambiante) sont effectués en utilisant une centrifugeuse Eppendorf 5415D. Les anticorps lavés sont récupérés en retournant le filtre Microcon® dans un tube neuf et en le centrifugeant à 1000 g pendant une minute. La concentration des anticorps est déterminée par mesure de la densité optique à 280 nm en utilisant un spectrophotomètre UV/visible Nanodrop 2000c (Thermo Fisher Scientific). Les anticorps sont ensuite incubés avec du réactif de Traut dilué dans de l'eau, en excès de 100 fois par rapport au nombre d'anticorps. La concentration finale en anticorps est

ajustée à 1 mg/mL avec le tampon utilisé pour les lavages précédents et le mélange est incubé pendant 20 minutes. L'excès de réactif de Traut est ensuite éliminé par ultrafiltration en utilisant le protocole décrit pour le changement de tampon des anticorps, à la différence que le tampon utilisé pour les lavages est un tampon à pH 7 contenant 50 mM d'HEPES et 10 mM d'EDTA (tampon HEPES-EDTA). La concentration finale des anticorps thiolés est ensuite déterminée par spectrophotométrie. Les anticorps thiolés sont appelés Ac-SH dans le reste de ce document. Les Ac-SH modifiés dans les conditions décrites précédemment présentent en moyenne un thiol réactif par molécule. Une étude détaillée de cette modification chimique est présentée dans la section 1 du chapitre « Résultats et discussions ».

## 5.2. Quantification de la thiolation des anticorps par dosage d'Ellman

Le dosage d'Ellman est une méthode colorimétrique de quantification des thiols (Ellman, 1959). Cette méthode utilise l'acide dinitro-2,2'-dithio-5,5'-benzoïque (DTNB), aussi appelé réactif d'Ellman, qui est ajouté en excès par rapport aux thiols à doser. En présence de thiols, le DTNB est clivé et libère une molécule d'acide thionitrobenzoïque (TNB) selon la réaction présentée en **figure 10**. Ce composé absorbe la lumière à 412 nm ( $\epsilon_{412\text{nm}} = 13600 \text{ M}^{-1}$ , données Interchim) et la concentration en thiols est déterminée par mesure de la densité optique à 412 nm, avec un spectrophotomètre UV/visible Nanodrop 2000c.



**Figure 10 :** Structure de l'acide dinitro-2,2'-dithio-5,5'-benzoïque (DTNB), aussi appelé réactif d'Ellman et réaction en présence de thiols. *ThermoFisher.com*.

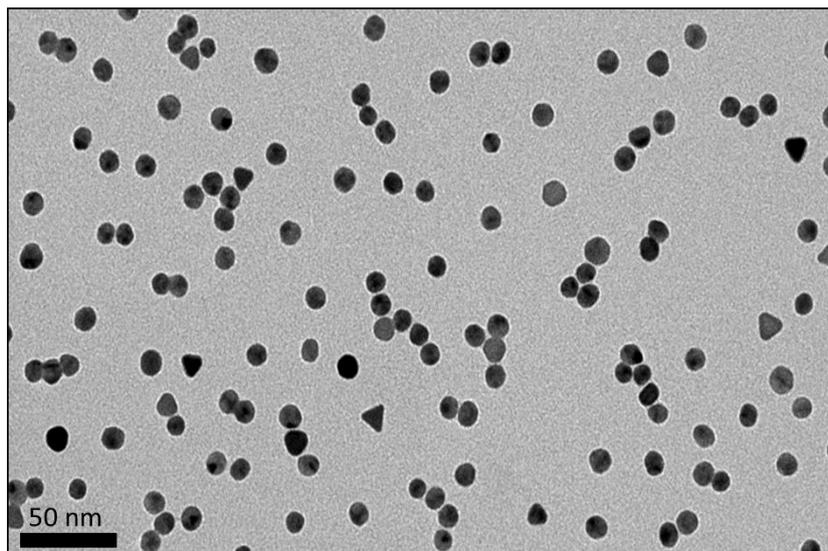
## 6. Synthèse de nanoparticules d'or et conjugaison de protéines thiolées

Des nanoparticules d'or (NpAu) de 10 nm de diamètre ont été synthétisées d'après la méthode de Turkevich, qui utilise la réduction d'un sel d'or ( $\text{KAuCl}_4$ ) par des ions citrate ( $\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7^{3-}$ ) (Turkevich et al., 1951). Les NpAu ont été conjuguées à des protéines thiolées selon une méthode adaptée d'un brevet déposé par A. Brisson et S. Mornet (Brisson and Mornet, 2007). La concentration particulaire (p/L) des NpAu est déterminée après chaque étape de la synthèse, par mesure de la densité optique à 520 nm ( $\epsilon_{520\text{nm}} = 1.804 \times 10^{-16} \text{ L.p}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ) en utilisant un spectrophotomètre UV/visible Ultrospec 2100 pro (GE Healthcare). Cette longueur d'onde correspond à la fréquence de résonance du plasmon de surface pour des NpAu de 10 nm de diamètre.

### 6.1. Synthèse de nanoparticules d'or par la méthode de Turkevich

La propreté de la verrerie est un point crucial de cette synthèse. La verrerie est donc systématiquement nettoyée avec de l'eau régale, composée d'un volume d'acide nitrique pour trois volumes d'acide chlorhydrique.

600 mL d'eau sont chauffés à 100 °C dans un ballon bicol sous agitation magnétique et chauffage à reflux, en utilisant un bain d'huile silicone. 313.4 mg de tétrachloroaurate de potassium ( $\text{KAuCl}_4$ ) à 99,995% de pureté sont dissous dans 150 mL d'eau puis ajoutés dans le ballon. 1.515 g de citrate de sodium dihydrate est dissous dans 75 mL d'eau puis également ajouté dans le ballon. Après un temps de réaction de 20 minutes, la solution initialement jaune vire au rouge sombre, signe caractéristique de la présence de NpAu. A l'issue de cette étape, les NpAu sont stabilisées électrostatiquement par les ions citrate présents dans le milieu (Daniel and Astruc, 2004) et peuvent être fonctionnalisées par d'autres molécules. La concentration de la suspension de NpAu est classiquement de l'ordre de  $2 \times 10^{16}$  p/L, pour un volume final d'environ 825 mL. Les NpAu ont un diamètre moyen d'environ 10 nm, vérifié par microscopie électronique à transmission. Une image de MET de ces NpAu est présentée en **figure 11**.



**Figure 11 : Image de MET de NpAu synthétisées par la méthode de Turkevich.** Le diamètre moyen des NpAu de ce lot est de  $10.85 \pm 0.97$  nm, mesuré sur 200 particules. Les NpAu sont majoritairement sphériques, avec une cependant une minorité de NpAu de forme pyramidale ou ovoïde.

## 6.2. Greffage d'une couronne de molécules de PEG hétérobifonctionnel thiol/amine à des NpAu

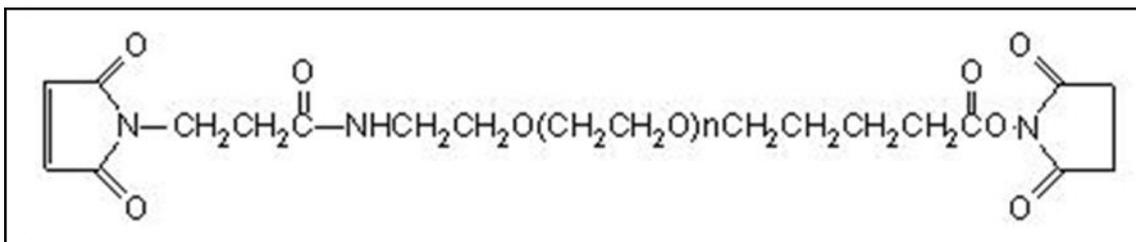
L'objectif de cette étape est de fonctionnaliser les NpAu par des molécules de polyéthylène glycol (PEG) présentant une amine. Un PEG possédant une amine à chaque extrémité est modifié par du réactif de Traut afin qu'il expose un thiol en moyenne. Il est ensuite greffé aux NpAu produites précédemment par le biais des thiols, une liaison se formant entre les atomes d'or électrophiles et les atomes de soufre nucléophiles.

4.75 g de PEG bis-aminé ( $\text{NH}_2\text{-PEG-NH}_2$ ) d'un poids moléculaire de 1628 g/mol sont dissous dans 150 mL d'un tampon à pH 8 et contenant 100 mM de borate de sodium (tampon Borate). Une mesure du pH est effectuée après dissolution complète et le pH est ramené à 8 avec quelques mL d'acide chlorhydrique à 1 M. 395 mg de réactif de Traut sont dissous dans une quantité d'eau minimale puis ajoutés à la solution de PEG. Le pH est à nouveau réajusté à 8 avec quelques mL de soude 1 M puis le mélange est incubé pendant 16 heures, à l'abri de la lumière et sous agitation magnétique. Le réactif de Traut étant ajouté en quantité équimolaire par rapport aux molécules de PEG, la moitié des fonctions amines sont modifiées. Statistiquement, chaque molécule de PEG présente donc un thiol et une amine. Ce PEG

modifié est appelé SH-PEG-NH<sub>2</sub>. 100 mg de borohydrure de sodium (NaBH<sub>4</sub>) en poudre sont ensuite directement ajoutés à la solution de SH-PEG-NH<sub>2</sub>. Ce composé réducteur permet de couper les éventuels ponts disulfures formés entre les molécules de PEG lors de l'étape précédente. Après une incubation de 10 minutes sous hotte aspirante et sous agitation, le pH est ajusté à 7 avec quelques mL d'acide chlorhydrique à 1 M. Les 825 mL de la suspension de NpAu synthétisée précédemment sont ensuite ajoutés rapidement à la solution de SH-PEG-NH<sub>2</sub> puis le mélange est agité manuellement et vigoureusement pendant quelques secondes. L'ensemble est incubé pendant 16 heures à l'abri de la lumière et sous agitation magnétique. Il est ensuite évaporé sous pression réduite et à 70 °C à l'aide d'un évaporateur rotatif jusqu'à réduire le volume à environ 100 mL. Le SH-PEG-NH<sub>2</sub> est ensuite éliminé par plusieurs centrifugations successives (25.000 g, 20 min, température ambiante) ou par ultrafiltration en utilisant une cellule à agitation modèle 8400 (Merck Millipore) équipée d'une membrane poreuse calibrée à 100 kDa. La concentration finale en SH-PEG-NH<sub>2</sub> doit être inférieure à 10<sup>-7</sup> M pour ne pas interférer avec le couplage ultérieur du second PEG. Ceci correspond à un facteur de dilution d'environ 100.000. Cette étape permet également d'augmenter la concentration de la suspension de NpAu jusqu'à une valeur comprise entre 10<sup>17</sup> et 10<sup>18</sup> p/L. Une centrifugation finale destinée à éliminer les éventuels agrégats ou particules de mauvaise qualité est effectuée. Le culot solide est éliminé tandis que le reste de la suspension est récupéré, aliquoté dans des tubes à faible adhésion de 2 mL et stocké à 4 °C. A l'issue de cette étape, les NpAu sont stabilisées par une couronne de SH-PEG-NH<sub>2</sub> et exposent à leur surface une moyenne de 1042 amines chacune (Brisson and Mornet, 2007). Elles sont appelées NpAu-NH<sub>2</sub>. Ces NpAu-NH<sub>2</sub> sont stables pendant plusieurs années.

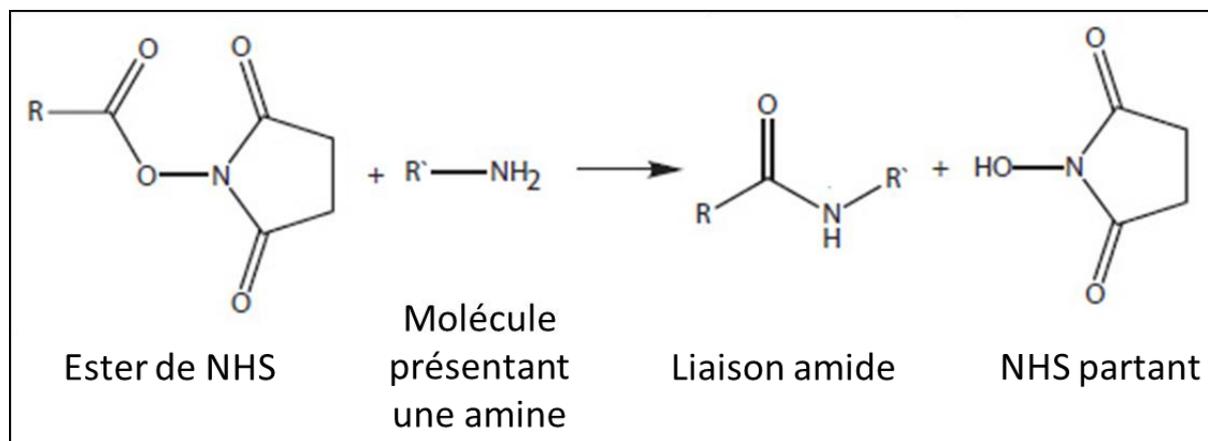
### **6.3. Greffage d'une couronne de molécules de PEG hétérobifonctionnel succinimidyl valérate/maléimide à des NpAu-NH<sub>2</sub>**

Le but de cette étape est d'obtenir des NpAu exposant des maléimides en surface, qui seront utilisés ultérieurement pour le couplage de protéines thiolées. On utilise un PEG hétérobifonctionnel possédant à l'une de ses extrémités un maléimide et à l'autre un ester de NHS (N-hydroxysuccinimide) sous la forme d'un SVA (succinimidyl valérate). La formule de cette molécule de SVA-PEG-Mal est présentée en **figure 12**.



**Figure 12 : Formule semi-développée du SVA-PEG-Mal.** Le maléimide est à gauche et le succinimidyl valérate à droite. *Laysanbio.com*

L'ester de NHS du SVA peut réagir avec une amine primaire pour former une liaison amide (Hermanson, 2013), selon la réaction décrite en **figure 13**.



**Figure 13 : Réaction entre un ester de NHS et une amine.** Cette réaction aboutit à la formation d'une liaison amide. Adapté d'*idtdna.com*

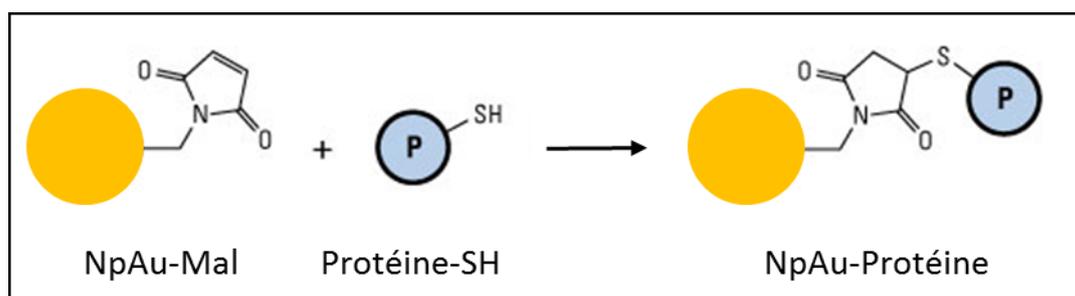
Un volume de NpAu-NH<sub>2</sub> est mélangé à un volume équivalent d'un tampon à pH 7.8 contenant 100 mM d'HEPES. Du SVA-PEG-Mal d'un poids moléculaire de 3400 g/mol est ajouté directement à cette solution, en excès de 10.000 fois par rapport au nombre de NpAu-NH<sub>2</sub>, puis est incubé pendant 2h à l'abri de la lumière, sous agitation et dans une atmosphère majoritairement composée d'argon. L'excédent de SVA-PEG-Mal est ensuite éliminé par ultrafiltration, avec des filtres à centrifuger Amicon® (Merck Millipore) possédant une membrane poreuse calibrée à 100 kDa et d'un volume de 5 mL. Cinq cycles de centrifugation (4000 g, 4 min, température ambiante) sont effectués en utilisant une centrifugeuse Eppendorf 5804R équipée d'un rotor A-4-44 de type swinging bucket. Les lavages sont effectués avec du tampon HEPES-EDTA. La concentration finale en SVA-PEG-Mal doit être

inférieure à  $10^{-8}$  M pour ne pas interférer avec le couplage ultérieur des protéines thiolées. Ceci correspond à un facteur de dilution d'environ 1.000.000.

A l'issue de cette étape, les NpAu sont fonctionnalisées par les molécules de SVA-PEG-Mal et exposent donc des maléimides à leur surface, utilisés ultérieurement pour greffer des protéines thiolées. Ces particules sont appelées NpAu-Mal. Les maléimides sont sujets à une hydrolyse rapide (données non présentées), l'étape de couplage aux protéines thiolées est donc effectuée dans l'heure qui suit la fin des lavages.

#### 6.4. Conjugaison de protéines thiolées à des NpAu-Mal

Cette étape vise à coupler des protéines thiolées aux maléimides des NpAu-Mal produites précédemment, selon la réaction présentée en **figure 14**. Les maléimides réagissent avec les thiols pour former une liaison thioéther (Nair et al., 2014).

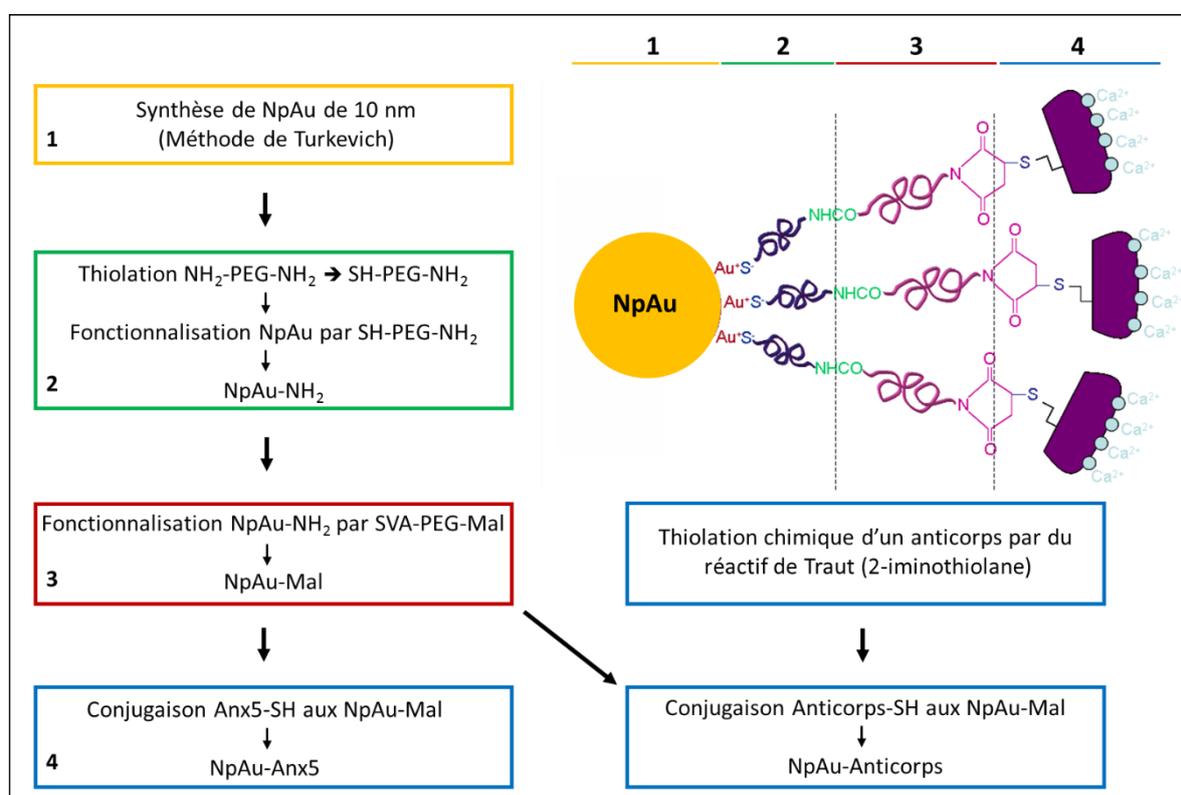


**Figure 14 : Réaction entre un maléimide porté par une NpAu-Mal et une protéine exposant un thiol.** Cette réaction aboutit à la formation d'une liaison thioéther. Adapté de *Thermofisher.com*

Au cours de ce travail de thèse, deux types de protéines thiolées ont été couplées aux NpAu-Mal : des anticorps modifiés chimiquement pour exposer des thiols (Ac-SH) produits par la méthode présentée précédemment, et de l'AnxA5 mutée exposant une cystéine et donc un thiol (AnxA5-SH). L'AnxA5-SH est stockée sous forme de dimère, formé par l'établissement d'un pont disulfure entre deux AnxA5-SH. L'AnxA5-SH dimère est préalablement incubée avec du DTT (dithiothréitol) à 10 mM pendant 30 minutes. Le DTT est un agent réducteur qui permet de couper les ponts disulfures, rendant ainsi accessible le thiol de l'AnxA5-SH. Les protéines sont ensuite lavées par ultrafiltration, en utilisant des filtres à centrifuger Microcon® possédant une membrane poreuse calibrée à 10 kDa et d'un volume de 500  $\mu$ L. Cette étape a

pour but d'éliminer l'excédent de DTT présent dans la solution. Cinq cycles de centrifugation (14.000 g, 5 min, température ambiante) sont effectués en utilisant une centrifugeuse Eppendorf 5415D. Les lavages sont effectués avec du tampon HEPES-EDTA.

Les protéines thiolées sont ajoutées en quantité variable aux NpAu-Mal fraîchement préparées. Typiquement, les rapports utilisés sont de 10 Anx5-SH ou de 5 Ac-SH par NpAu-Mal. Les concentrations classiquement utilisées sont de l'ordre de 0.1 à 1 mg/mL pour les protéines et de l'ordre de  $2$  à  $8 \times 10^{17}$  p/L pour les NpAu-Mal. L'ensemble est incubé pendant 16 heures à l'abri de la lumière, sous agitation et dans une atmosphère composée majoritairement d'argon. Le mélange est ensuite lavé par afin d'éliminer les éventuelles protéines non liées. Trois cycles de centrifugation (34.000 g, 30 minutes, température ambiante) sont effectués, en utilisant une ultracentrifugeuse Optima™ MAX-E équipée d'un rotor MLS50 de type swinging bucket. Les NpAu conjuguées à des protéines sont récupérées et stockées à 4 °C dans des tubes à faible adhésion de 2 mL. Ces particules sont appelées NpAu-Protéine. Les NpAu-Protéine sont stables pendant plusieurs années. La **figure 15** récapitule les différentes étapes de la synthèse des NpAu-Protéine.



**Figure 15 : Résumé des différentes étapes de la synthèse et de la fonctionnalisation des NpAu, suivi de leur conjugaison à des protéines thiolées.**

## 7. Synthèse de nanoparticules magnétiques exposant des amines et conjugaison à des protéines thiolées

Des nanoparticules de maghémite magnétiques fonctionnalisées par des amines (50nm-PMag-NH<sub>2</sub>) ont été produites par les D<sup>rs</sup> Laurent Adumeau et Stéphane Mornet. La section 7.1 traite de la stratégie de synthèse originale utilisée pour produire ces particules (Adumeau, 2015). N'ayant pas été impliqué dans cette étape du projet, je me contenterai de décrire sommairement le protocole employé. Les 50nm-PMag-NH<sub>2</sub>, ainsi que des particules magnétiques commerciales de 1 µm exposant des amines (1µm-PMag-NH<sub>2</sub>) ont ensuite été conjuguées à l'AnxA5 (PMag-AnxA5).

### 7.1. Synthèse de 50nm-PMag et fonctionnalisation par une couronne de molécules de PEG exposant des amines

Des particules magnétiques d'un diamètre moyen de  $7.5 \pm 2.4$  nm ont été synthétisées d'après une méthode mise au point par Massart (Massart, 1981). Ces particules sont ensuite assemblées par une méthode dite « d'assemblage induit par évaporation d'émulsion », initialement décrite par Bai *et al.* (Bai et al., 2007). Cette étape aboutit à la formation de clusters d'un diamètre de  $79 \pm 34$  nm. Ces clusters sont ensuite enrobés dans une matrice de silice à des fins de stabilisation, puis sont triés par centrifugation différentielle. Cette dernière étape permet d'obtenir une population de taille plus homogène, avec un diamètre moyen de  $54 \pm 16$  nm.

Ces particules subissent ensuite plusieurs modifications chimiques aboutissant à leur fonctionnalisation par une couronne dense de molécules de PEG possédant une fonction amine à leur extrémité (50nm-PMag-NH<sub>2</sub>), de manière similaire aux NpAu-NH<sub>2</sub>.

### 7.2. Greffage d'une couronne de molécules de PEG hétérobifonctionnel succinimidyl valérate/maléimide à des PMag exposant des amines

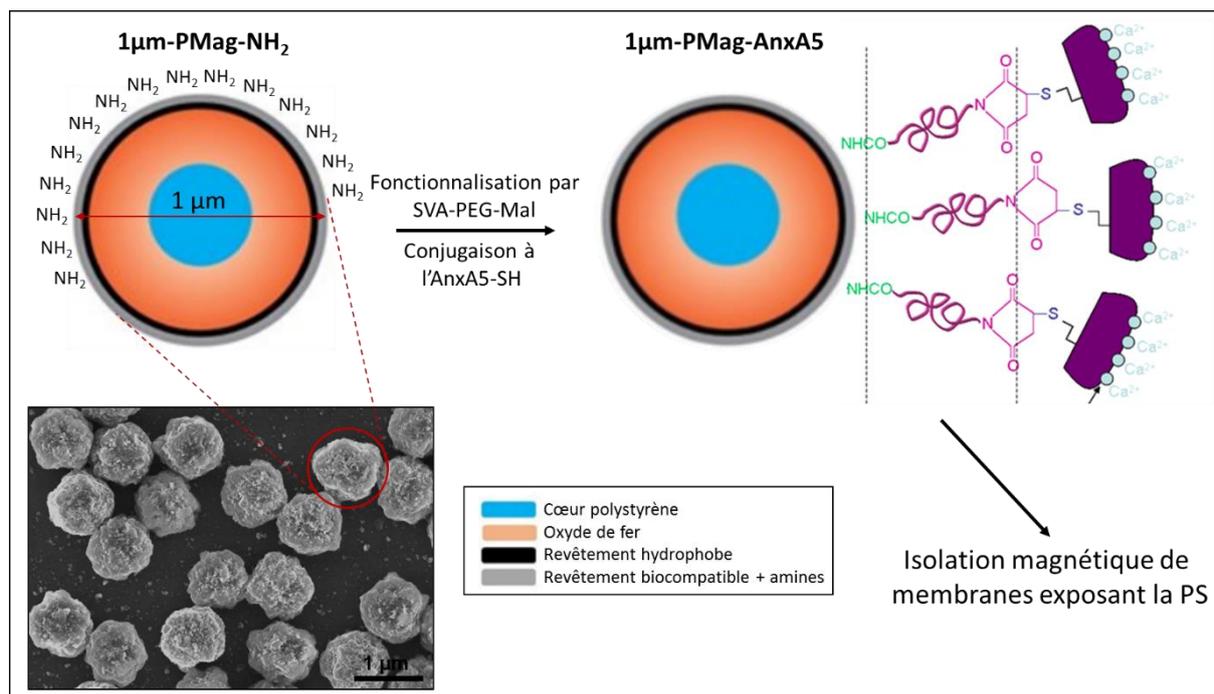
La fonctionnalisation des PMag-NH<sub>2</sub> par un SVA-PEG-Mal est réalisée selon un protocole similaire à celui présenté pour les NpAu-NH<sub>2</sub>, à la différence que le SVA-PEG-Mal est ici ajouté en excès de 20.000 par rapport au nombre de particules pour les 50nm-PMag-NH<sub>2</sub> ou en excès

de  $10^8$  pour les  $1\mu\text{m-PMag-NH}_2$ . De plus, la purification des particules n'est pas effectuée par ultrafiltration mais par magnétophorèse. A l'issue de cette étape, les PMag exposent des maléimides à leur surface, utilisés ultérieurement pour greffer des protéines thiolées. Elles sont appelées PMag-Mal.

### 7.3. Conjugaison de protéines thiolées à des PMag-Mal

La conjugaison d'AnxA5-SH aux PMag-Mal est réalisée selon un protocole similaire à celui utilisé pour les NpAu-Mal, à la différence que la purification des particules n'est pas effectuée par ultracentrifugation mais par magnétophorèse. Les PMag conjuguées à l'AnxA5 sont appelées PMag-AnxA5.

La **figure 16** présente les caractéristiques des  $1\mu\text{m-PMag-NH}_2$  et récapitule brièvement les étapes de fonctionnalisation et de conjugaison d'AnxA5 à ces PMag.



**Figure 16 : Caractéristiques des  $1\mu\text{m-PMag-NH}_2$ , fonctionnalisation par des maléimides et conjugaison d'AnxA5-SH.** Les étapes de fonctionnalisation et de conjugaison sont similaires pour les  $50\text{nm-PMag-NH}_2$ . Adapté d'*oceannanotech.com*

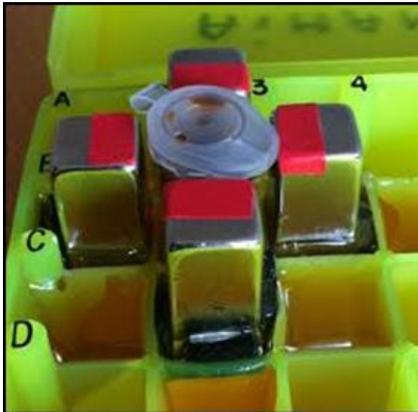
## 8. Electrophorèse sur gel de polyacrylamide en présence de SDS

L'électrophorèse sur gel de polyacrylamide en présence de SDS (dodécylsulfate de sodium), aussi appelée SDS-PAGE, est une technique biochimique classique permettant de séparer des protéines en fonction de leur taille (Gallagher, 2008). Un gel de polyacrylamide est fabriqué par polymérisation d'une solution d'acrylamide/bis-acrylamide (rapport 29/1) en présence de persulfate d'ammonium (APS) et de N,N,N',N'-tétraméthyléthylènediamine (TEMED). Ce gel est discontinu et comporte deux parties, qui sont préparées successivement. La première partie, appelée gel de concentration, comporte les puits permettant de déposer les échantillons sur le gel. Son rôle est de concentrer les échantillons déposés dans ces puits en une fine bande, afin d'améliorer la résolution finale du gel. La seconde partie, appelée gel de séparation, permet de séparer les protéines suivant leur taille. Ces deux gels contiennent du SDS, un détergent anionique qui dénature les protéines et leur confère une charge négative proportionnelle à leur masse. Les échantillons d'intérêt, qui peuvent être préalablement chauffés à 95 °C et traités par du béta-mercaptoéthanol ( $\beta$ -ME) afin de réduire les ponts disulfures ou la liaison or-soufre, sont déposés dans les puits du gel en présence d'un tampon de migration à pH 8 contenant du Tris, de la glycine et du SDS. L'ensemble est ensuite soumis à une différence de potentiel électrique, qui permet la migration des protéines négativement chargées par le SDS vers la cathode. La révélation du gel est effectuée grâce à un bain de bleu de Coomassie qui colore les protéines en bleu. L'intensité de la coloration est proportionnelle à la quantité de protéines et il est ainsi possible de quantifier ces protéines à l'aide d'une gamme de référence.

## 9. Extraction magnétique d'échantillons biologiques par des particules magnétiques conjuguées à l'AnxA5

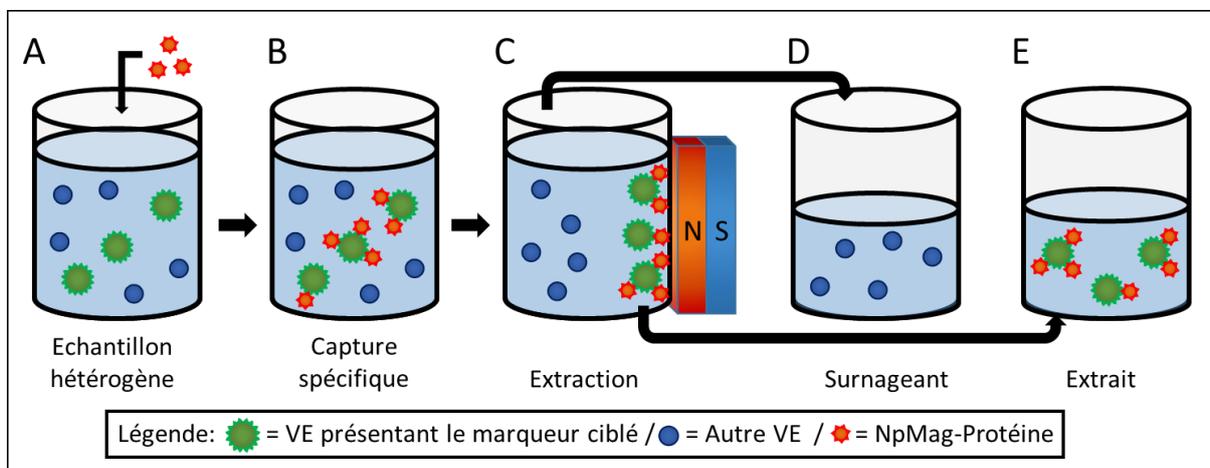
Un échantillon d'intérêt (PFP, GR-L ou liposomes) est déposé dans un tube Eppendorf de 2 mL puis une quantité variable de PMag-AnxA5 est ajoutée. Du  $\text{CaCl}_2$  est ajouté au mélange à une concentration finale de 2 à 10 mM. Dans le cas de PFP, du PPACK à 10  $\mu\text{M}$  est également ajouté. L'ensemble est incubé pendant 2 heures sous agitation puis le tube contenant l'échantillon est placé au centre d'un système composé de 4 aimants néodyme N42 de dimension 40 x 10 x 10 mm et d'une force d'adhérence individuelle 15 kg. La **figure 17**

présente une photographie de ce système, qui permet d'extraire les PMag en les concentrant contre les parois du tube. Le temps d'extraction est de 30 minutes.



**Figure 17 : Photographie du système d'extraction magnétique fabriqué pour cette étude.** Le pôle positif des aimants est coloré en rouge. Le tube contenant l'échantillon et les PMag-AnxA5 est placé au centre du système, qui permet la création d'un champ magnétique plus homogène et une extraction plus efficace qu'avec un unique aimant placé par exemple sur le côté du tube. *Photo Flora Bouvet.*

Le liquide contenant les objets n'ayant pas été extraits est ensuite retiré délicatement et mis de côté pour analyse ultérieure. Les PMag-AnxA5 concentrées sur les parois du tube et les éventuels objets capturés sont resuspendus en tampon CF supplémenté par 2 mM de  $\text{CaCl}_2$  et mis de côté pour analyse ultérieure. La **figure 18** récapitule les différentes étapes de la méthode d'extraction magnétique par des PMag-Protéine.



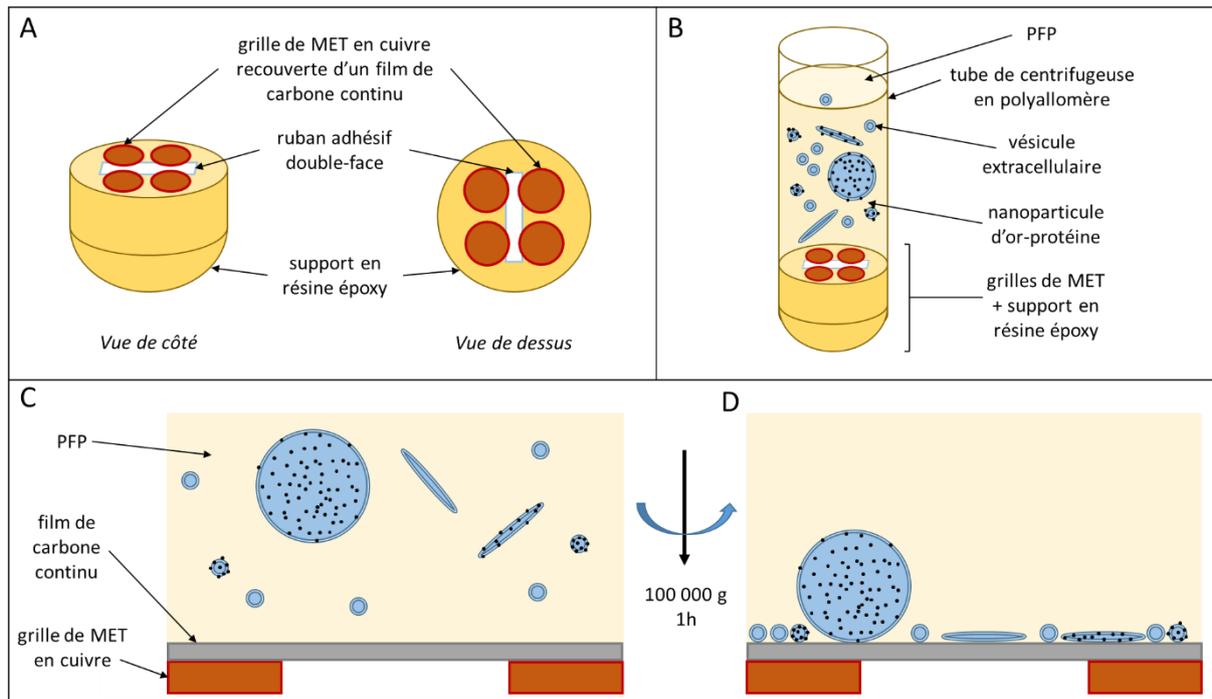
**Figure 18 : Principe de l'extraction magnétique de VEs par des PMag-Protéine** (A) Un échantillon biologique hétérogène contenant plusieurs types de VEs est mélangé à des PMag fonctionnalisées par une protéine d'intérêt. (B) Les PMag-Protéine se fixent spécifiquement sur les VEs exposant la molécule cible. (C) Un aimant positionné contre la paroi du tube attire les PMag et les VEs capturées. (D) Le surnageant (ou fraction non extraite) dépourvu de toutes les VEs exposant la molécule cible est récupéré. (E) La fraction extraite contenant uniquement les VEs d'intérêt liées aux PMag-Protéine est récupérée.

## 10. Microscopie électronique à transmission (MET) et cryo-MET

### 10.1. Méthode de sédimentation de VEs sur grille de MET

100  $\mu$ L de PFP sont mélangés avec 1  $\mu$ L de PPACK à 1 mM et 2  $\mu$ L de NpAu-AnxA5 à  $2 \times 10^{16}$  p/L, puis supplémentés par 10 mM de  $\text{CaCl}_2$  et incubés pendant 30 minutes à température ambiante. Pour le marquage par des NpAu -anti-CD235a ou -anti-CD41, un protocole similaire est utilisé mais sans PPACK ni  $\text{CaCl}_2$ . De plus, le temps d'incubation est porté à 1h. Après cette étape de marquage, l'échantillon est dilué 30 fois dans un tampon à pH 7.4 contenant 100 mM de cacodylate de sodium et 0,02% d'azoture de sodium (tampon Cacodylate), supplémenté par 2 mM de  $\text{CaCl}_2$  dans le cas de NpAu-AnxA5. Ce mélange est ensuite déposé dans un tube en polyallomère de 4.5 mL contenant une pièce de résine époxy hémisphérique de 12 mm de diamètre, sur laquelle quatre grilles de MET recouvertes d'un film de carbone continu sont fixées à l'aide d'un morceau de ruban adhésif double-face. Le tube contenant l'échantillon est ensuite centrifugé (100.000 g, 1 h, 20 °C) en utilisant une ultracentrifugeuse Optima™ MAX-E équipée d'un rotor MLS50 de type swinging bucket. Le liquide contenu dans le tube est ensuite éliminé avec précaution, puis les grilles sont récupérées et séchées à l'air pendant 15 min, avant d'être stockées dans une boîte pour une observation ultérieure. L'observation au microscope doit préférentiellement avoir lieu dans la semaine qui suit la préparation des grilles, celles-ci se dégradant au cours du temps. La **figure 19** présente le dispositif utilisé pour la sédimentation de VEs sur grille de MET et résume le principe de cette méthode.

Les grilles sont ensuite transférées dans un porte-objet et observées à l'aide d'un microscope électronique à transmission FEI/Philips CM120 (Eindhoven, Pays-Bas) équipé d'un filament d'hexaborure de lanthane ( $\text{LaB}_6$ ) et utilisé à une tension de 120 kV. Les images sont enregistrées par une caméra USC1000-SSCCD de marque Gatan (Grandchamp, France) et analysées avec le logiciel Digital Micrograph (Gatan).



**Figure 19 : Schéma présentant la méthode de sédimentation de VEs sur grille de MET.** (A) Vue de côté et de dessus d'un support de résine possédant une extrémité arrondie et une extrémité plate. Un morceau de ruban adhésif double-face est collé sur la partie plate et quatre grilles de MET en cuivre recouvertes d'un film de carbone continu sont fixées dessus. (B) Le support de résine et les quatre grilles fixées à sa surface sont insérés dans un tube de centrifugeuse en polyallomère de 4.5 mL puis du PFP dilué et préalablement marqué par des NpAu-Protéine est déposé dans le tube. (C-D) Vues en coupe d'une grille de MET recouverte d'un film de carbone continu et du PFP présent à sa surface avant (C) et après (D) un cycle de centrifugation (100.000 g, 1 h). Les VEs initialement en suspension dans le PFP sont intégralement sédimentées sur la grille.

## 10.2. Cryo-MET

7  $\mu\text{L}$  d'échantillon d'intérêt (PFP ou GR-L) sont mélangés avec 1  $\mu\text{L}$  de PPACK à 100  $\mu\text{M}$ , 1  $\mu\text{L}$  de  $\text{CaCl}_2$  à 20-100 mM et 1  $\mu\text{L}$  de NpAu-AnxA5 à  $2 \times 10^{16}$  p/L puis le mélange est incubé pendant 30 minutes. En cas d'utilisation de NpAu-Ac, la procédure est identique, excepté que le  $\text{CaCl}_2$  et le PPACK sont remplacés par 2  $\mu\text{L}$  d'échantillon. La durée d'incubation est également portée à 1h. En cas de double marquage par deux types de NpAu-Protéine, généralement des NpAu-AnxA5 de 4 nm de diamètre et des NpAu-Ac de 10 nm de diamètre, l'échantillon est d'abord marqué par les NpAu-Ac pendant 30 minutes puis par les NpAu-AnxA5 pendant 30 minutes supplémentaires. Après incubation, 4  $\mu\text{L}$  d'échantillon sont déposés sur une grille de MET

recouverte d'un film de carbone perforé, qui aura préalablement été exposée à un traitement UV-ozone (BHK, Claremont, CA, USA) afin de rendre sa surface hydrophile. L'excédent de liquide est ensuite absorbé par capillarité avec un papier filtre et la grille est plongée rapidement dans un bain d'éthane liquide refroidi par de l'azote liquide, en utilisant une cryo-chambre EM-CPC (Leica Microsystems SAS, Nanterre, France). La grille est ensuite stockée à -196 °C dans de l'azote liquide jusqu'à son observation.

Le grille est transférée dans un cryo-porte-objet Gatan 626 refroidi à -170 °C par de l'azote liquide et observée à l'aide du microscope électronique à transmission CM120 décrit plus haut ou d'un FEI/Philips Tecnai F20 équipé d'un canon à effet de champ et utilisé à une tension de 200 kV. L'observation est réalisée sous une faible dose d'électrons afin de limiter les dommages d'irradiation.

Les images sont enregistrées par une caméra Gatan USC1000-SSCCD et analysées avec le logiciel Digital Micrograph.

## 11. Microscopie optique

Du PFP et des GR-L ont été marqués par de l'AnxA5 couplée à de la fluorescéine (AnxA5-Fluo) et ont été observés à l'aide d'un microscope Olympus IX81 (Rungis, France) équipé d'un cube de fluorescence U-MNIBA2. Les images ont été enregistrées avec une caméra Olympus ColorView 3.

## 12. Cytométrie en flux

### 12.1. Préparation d'AnxA5-Cy5 fluorescente

De l'AnxA5-SH a été conjuguée avec de la Cyanine 5-Maléimide (Cy5-Mal), un fluorophore réactif des maléimides, par la méthode décrite par Bouter *et al* (Bouter et al., 2011). Cette protéine modifiée est appelée AnxA5-Cy5.

## 12.2. Préparation des échantillons pour l'analyse par CF

### 12.2.1. PFP

5 µL de PFP sont dilués dans 495 µL de tampon CF supplémenté par de la BSA et du PPACK, dans un tube de cytométrie. 1 µL d'AnxA5-Cy5 à 10 µg/mL et 2.5 µL de CaCl<sub>2</sub> à 2 M sont ajoutés au tube, et le mélange est incubé durant 45 minutes à l'abri de la lumière. 2.5 µL de microbilles Sphero® 1 µm Ultra Rainbow à 10<sup>10</sup> p/L sont ajoutés au tube après incubation et sont utilisées à titre de référence interne lors de l'acquisition et de l'analyse, afin de déterminer le volume d'échantillon acquis.

### 12.2.2. GR-L

10 µL de GR-L sont dilués dans 490 µL de tampon CF supplémenté par de la BSA et du PPACK, dans un tube de cytométrie. 1 µL d'AnxA5-Cy5 à 10 µg/mL et 2.5 µL de CaCl<sub>2</sub> à 2 M sont ajoutés au tube, et le mélange est incubé durant 45 minutes à l'abri de la lumière. 2.5 µL de microbilles Sphero® 1 µm Ultra Rainbow à 10<sup>10</sup> p/L sont ajoutés au tube après incubation.

### 12.2.3. Echantillons préparés par extraction magnétique

Les échantillons préparés par extraction magnétique sont déjà dilués à la bonne concentration lors des étapes de séparation et ne nécessitent donc pas de dilution supplémentaire.

Dans le cas d'un marquage par l'AnxA5-Cy5, 500 µL d'échantillon sont déposés dans un tube de cytométrie. 1 µL d'AnxA5-Cy5 à 10 µg/mL et 2.5 µL de CaCl<sub>2</sub> à 2 M sont ajoutés au tube, et le mélange est incubé durant 45 minutes à l'abri de la lumière. 2.5 µL de microbilles Sphero® 1 µm Ultra Rainbow à 10<sup>10</sup> p/L sont ajoutés au tube après incubation.

### 12.2.4. Contrôles négatifs

Pour des échantillons marqués par de l'AnxA5-Cy5, le contrôle négatif est un tube préparé et analysé de façon identique, mais dans lequel le CaCl<sub>2</sub> n'a pas été ajouté.

### 12.3. Acquisition des données et analyse des résultats de CF

Les échantillons ont été analysés par un cytomètre en flux Beckman Coulter Gallios 3 lasers/10 couleurs, fonctionnant avec le logiciel Gallios Cytometer 1.2. Les paramètres utilisés sont FS, SS, et FL6 pour l'AnxA5-Cy5. Ils sont mesurés en « Area Mode » et réglés sur une échelle logarithmique. Le détecteur FS a été réglé en mode  $W^2$  (Robert et al., 2012). Le flux est réglé à environ 10  $\mu\text{L}/\text{min}$ . Chaque échantillon est acquis en duplicat. La durée d'acquisition est d'une minute.

Pour la détection des VEs avec un discriminant sur le FS, la valeur de seuil du détecteur FS a été réglée à 1. Le voltage du détecteur FS est réglé sur 237 V et le gain sur 2. Le voltage du détecteur SS est réglé sur 935 V et le gain sur 7.5. Dans ces conditions, le bruit de fond détecté est en moyenne de  $100 \pm 50$  évènements par seconde (ev/s).

Pour la détection des VEs avec un discriminant sur le FL, la valeur de seuil pour le détecteur de fluorescence FL6 a été réglée à 1. Le voltage du détecteur FL 6 est réglé sur 530 V. Dans ces conditions, le bruit de fond est en moyenne de  $10 \pm 5$  ev/s pour des échantillons contenant 2.8 nM d'AnxA5-Cy5 ou de l'anticorps-anti-CD235-PE dilués 250 fois (concentration initiale inconnue).

Les résultats ont été analysés avec le logiciel Kaluza 1.2 (Beckman Coulter).

### 12.4. Chromatographie d'exclusion de taille (CET)

Les expériences de chromatographie d'exclusion de taille ont été réalisées sur un appareil FPLC micro Akta (GE Healthcare) équipé d'une colonne Superdex 200 PC 3.2/30 (GE Healthcare), utilisant du tampon Phosphate.

## C - RESULTATS ET DISCUSSIONS

### 1. Thiolation d'anticorps et conjugaison d'anticorps thiolés à des nanoparticules d'or

Le brevet intitulé « Functionalization of gold nanoparticles with oriented proteins. Application to the high-density labelling of cell membranes » décrit la synthèse de nanoparticules d'or exposant des maléimides (NpAu-Mal) et la conjugaison d'annexine-A5 thiolée produite par mutagenèse dirigée (AnxA5-SH) à ces nanoparticules d'or (Brisson and Mornet, 2007). Ces NpAu conjuguées à l'AnxA5 (NpAu-AnxA5) permettent le marquage de membranes exposant la phosphatidylsérine (PS) contenues dans des échantillons destinés à une observation par MET. Un des objectifs majeurs de ce travail de thèse a été la mise au point et l'optimisation d'une méthode de conjugaison d'anticorps à des NpAu-Mal, afin de pouvoir cibler d'autres molécules que la PS et ainsi marquer et phénotyper des vésicules extracellulaires (VEs).

Le protocole de synthèse et de fonctionnalisation permettant de produire les NpAu-Mal étant bien maîtrisé au laboratoire, nous l'avons réutilisé pour ce projet. Cependant, les anticorps n'exposent pas naturellement de thiols, qui sont indispensables pour le couplage de protéines aux NpAu-Mal. Il est par conséquent nécessaire d'en ajouter artificiellement. Nous avons donc mis au point une méthode de thiolation d'anticorps utilisant le réactif de Traut (ou 2-iminothiolane), une petite molécule qui réagit avec les amines pour former un composé thiolé. Les anticorps thiolés (Ac-SH) ainsi produits ont été caractérisés biochimiquement et leur thiolation a été évaluée par SDS-PAGE et dosage d'Ellman. Les Ac-SH ont ensuite été conjugués à des NpAu-Mal et leur liaison aux nanoparticules a été caractérisée et quantifiée.

Ces expériences ont été réalisées conjointement par Céline Gounou et moi-même, ainsi que par une étudiante en Master 1 que nous avons encadrée, Karine Da Silva Lages.

## 1.1. Etude de la thiolation de protéines par le réactif de Traut

### 1.1.1. Description des méthodes d'étude

#### 1.1.1.1. Le dosage d'Ellman

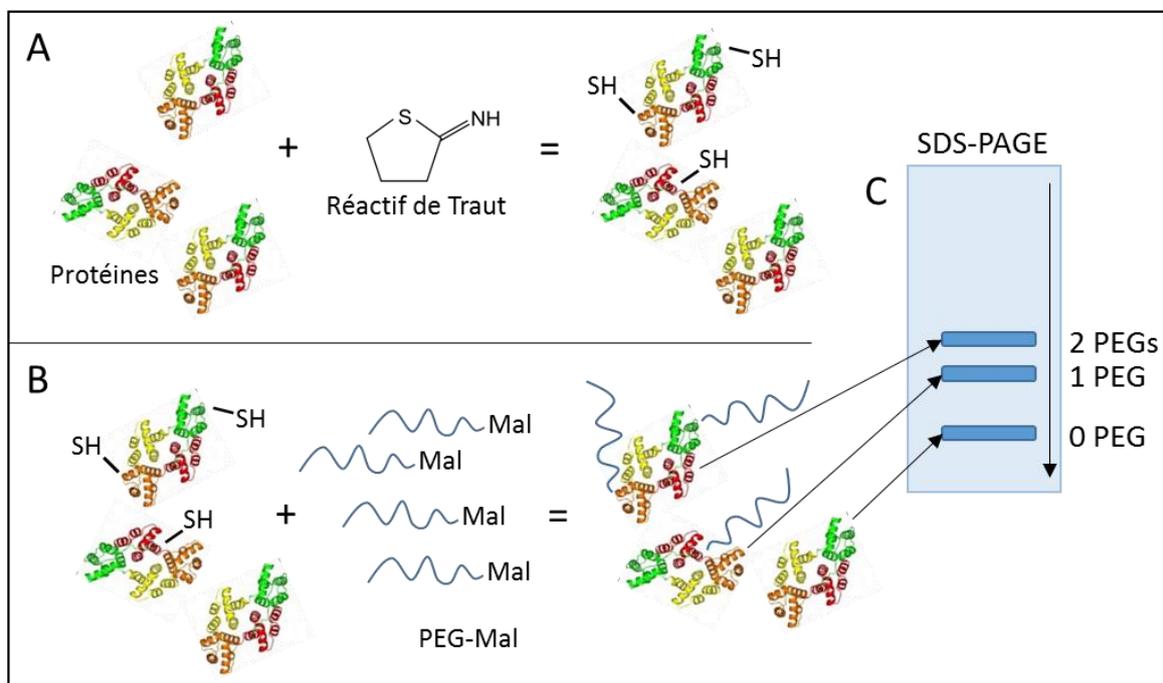
Le réactif de Traut a déjà été utilisé dans différentes études pour ajouter des thiols à des protéines en modifiant leurs amines (Jue et al., 1978; Stanisic et al., 2003; Traut et al., 1973). Les amines présentes dans les protéines sont portées par les résidus lysines et arginines, ainsi que par le NH<sub>2</sub> terminal. Cette réaction de thiolation des protéines a été étudiée de manière quantitative afin de déterminer des conditions de réaction adaptées à la conjugaison d'anticorps aux nanoparticules d'or.

Nous avons utilisé une méthode biochimique de dosage des thiols appelée dosage d'Ellman, qui utilise l'acide dinitro-2,2'-dithio-5,5'-benzoïque, aussi appelé réactif d'Ellman ou DTNB. Le DTNB est une molécule possédant un pont disulfure interne. Ce pont disulfure est clivé en présence de molécules thiolées, libérant deux molécules de TNB, un composé chromogénique absorbant la lumière à 412 nm. La concentration en thiols est ensuite déterminée par spectrophotométrie. D'après le volume d'échantillon analysé et sa concentration en protéine, il est possible de calculer un nombre de thiols moyen par protéine.

#### 1.1.1.2. La méthode de SDS-PAGE + PEG

Le dosage d'Ellman a été combiné à une technique de SDS-PAGE particulière permettant d'obtenir des informations supplémentaires sur la thiolation des protéines. La technique de SDS-PAGE classique permet de séparer des protéines en fonction de leur taille puis de les quantifier après coloration. L'ajout d'un ou plusieurs thiols à une protéine n'étant pas directement observable par SDS-PAGE, nous avons utilisé une méthode de détection indirecte. Après leur thiolation mais avant leur dépôt sur le gel de polyacrylamide, les protéines sont mises en présence d'un excès de molécules de PEG possédant une fonction maléimide à l'une de leurs extrémités (PEG-Mal). Une ou plusieurs molécules de PEG-Mal peuvent ainsi se greffer à une protéine thiolée, après réaction entre un maléimide et un thiol.

Cette réaction est appelée pégylation. Une protéine non thiolée à laquelle aucun PEG-Mal n'est couplé migre dans le gel en fonction de sa masse moléculaire propre. A l'inverse, une protéine thiolée couplée à une ou plusieurs molécules de PEG-Mal migrera plus lentement à cause de l'encombrement stérique supplémentaire. Ceci se traduit par l'apparition de bandes protéiques distinctes de la bande protéique correspondant à la protéine non pégylée. Il est de plus possible de distinguer le nombre de PEGs couplés à une protéine, chaque espèce possédant une masse moléculaire apparente différente et apparaissant donc sous la forme d'une bande protéique distincte sur le gel. Cette méthode permet de déterminer le nombre de thiols d'une protéine modifiée capables de réagir avec les molécules de PEG-Mal et d'estimer les proportions des différentes espèces pégylées présentes dans l'échantillon. Cette réaction de pégylation mime sommairement la réaction de conjugaison des protéines thiolées aux NpAu-Mal, dans laquelle des PEG-Mal sont également impliqués bien qu'ils soient dans ce cas greffés à des nanoparticules d'or. Cette méthode, appelée « SDS-PAGE + PEG », permet ainsi d'obtenir des informations sur la réactivité des thiols ajoutés aux protéines. Le principe de la méthode SDS-PAGE + PEG est schématisé en **figure 20**.



**Figure 20 : Analyse de la thiolation de protéines par SDS-PAGE, après couplage de PEG-Mal aux protéines thiolées (SDS-PAGE + PEG).** (A) Thiolation de protéines par du réactif de Traut. (B) Couplage de molécules de PEG-Mal aux thiols réactifs des protéines modifiées. (C) Analyse par SDS-PAGE des protéines thiolées après réaction avec le PEG-Mal.

### 1.1.2. Précision et reproductibilité du dosage d'Ellman

Nous avons dans un premier temps testé la précision et la reproductibilité du dosage d'Ellman. Différentes solutions de molécules thiolées de concentration connue ont été quantifiées par dosage d'Ellman et la concentration en thiols obtenue a été comparée à la concentration théorique en molécules thiolées. Un premier test a été effectué avec une solution de  $\beta$ -mercaptoéthanol ( $\beta$ -ME). Les résultats sont présentés en **figure 21**.

$[\beta\text{-ME}]_{\text{théorique}}$	0	10	20	30
$[\text{SH}]_{\text{mesurée}}$	0	11,35	20,91	29,07
Ecart-type	0	1,05	0,79	2,77

**Figure 21 : Comparaison entre la concentration en  $\beta$ -ME et la concentration en thiols déterminée par dosage d'Ellman.** Les concentrations sont données en  $\mu\text{M}$ . Un échantillon ne contenant pas de  $\beta$ -ME est utilisé comme blanc et sa DO est soustraite de la DO mesurée pour les autres échantillons. Chaque échantillon est mesuré trois fois et un écart-type est calculé à partir des valeurs de ces trois mesures.

La molécule de  $\beta$ -ME possède un unique thiol, les concentrations en  $\beta$ -ME et en thiols sont donc théoriquement identiques. Expérimentalement, la concentration en thiols mesurée par dosage d'Ellman correspond à  $102.2 \pm 8.3 \%$  de la concentration en  $\beta$ -ME, calculée à partir des trois concentrations théoriques testées. Les concentrations en  $\beta$ -ME et en thiols sont donc très proches. Une expérience similaire a ensuite été réalisée avec du dithiothréitol (DTT), dont les résultats sont présentés en **figure 22**.

$[\text{DTT}]_{\text{théorique}}$	0	10	20	30
$[\text{SH}]_{\text{mesurée}}$	0	23,86	41,58	62,80
Ecart-type	0	2,70	1,11	1,20

**Figure 22 : Comparaison entre la concentration en DTT et la concentration en thiols déterminée par dosage d'Ellman.** Les concentrations sont données en  $\mu\text{M}$ . Un échantillon ne contenant pas de DTT est utilisé comme blanc et sa DO est soustraite de la DO mesurée pour les autres échantillons. Chaque échantillon est mesuré trois fois et un écart-type est calculé à partir des valeurs de ces trois mesures.

Chaque molécule de DTT possède deux thiols, la concentration en thiols est donc théoriquement égale au double de la concentration en DTT. La concentration en thiols mesurée par dosage d'Ellman correspond à  $213.7 \pm 17.4$  % de la concentration en DTT, calculée à partir des trois concentrations théoriques testées. Le résultat est proche des 200 % attendus. Une dernière expérience visant à quantifier les thiols de l'AnxA5-SH a été réalisée. La protéine est quantifiée par mesure de la DO à 280 nm et la concentration en thiols de la solution d'AnxA5-SH est déterminée par dosage d'Ellman. Les résultats sont présentés en **figure 23**.

$[\text{AnxA5-SH}]_{\text{théorique}}$	0	10	20	30
$[\text{SH}]_{\text{mesurée}}$	0	8,33	17,40	25,25
Ecart-type	0	1,85	1,53	2,25

**Figure 23 : Comparaison entre la concentration en AnxA5-SH déterminée par mesure de la DO à 280 nm et la concentration en thiols déterminée par dosage d'Ellman.** Les concentrations sont données en  $\mu\text{M}$ . Un échantillon ne contenant pas d'AnxA5-SH est utilisé comme blanc et sa DO est soustraite de la DO mesurée pour les autres échantillons. Chaque échantillon est mesuré trois fois et un écart-type est calculé à partir des valeurs de ces trois mesures.

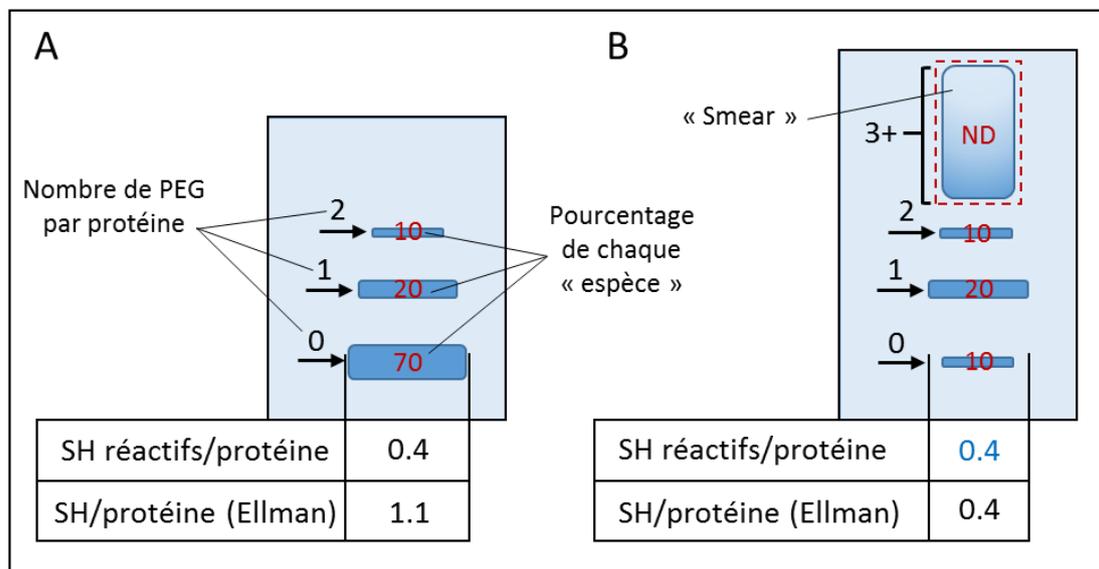
L'AnxA5-SH possède un unique thiol, les concentrations en AnxA5-SH et en thiols sont donc théoriquement identiques. Expérimentalement, la concentration en thiols mesurée par dosage d'Ellman correspond à  $84.9 \pm 1.9$  % de la concentration en AnxA5-SH, calculée à partir des trois concentrations théoriques testées. Le résultat est à nouveau conforme à la valeur attendue, bien que la concentration en thiols soit inférieure d'environ 15 % à la concentration en AnxA5-SH. Nous avons mené des expériences complémentaires (données présentées ultérieurement) montrant qu'environ 10 % des thiols de molécules d'AnxA5-SH de la solution utilisée ne sont pas réactifs, ce qui est cohérent avec une concentration en thiols par dosage d'Ellman légèrement inférieure à celle attendue.

Les résultats de dosage d'Ellman obtenus pour le  $\beta$ -ME, le DTT et l'AnxA5-SH confirment la précision et la reproductibilité de cette méthode et valident son utilisation ultérieure pour la quantification de la thiolation des protéines.

### 1.1.3. Notes relatives à l'analyse des expériences de SDS-PAGE + PEG

Afin de faciliter l'analyse et la compréhension des expériences de quantification de thiolation de protéines par SDS-PAGE + PEG, les images de gels d'électrophorèse seront annotées de la façon suivante, résumée en **figure 24**. Des flèches noires numérotées identifieront les bandes protéiques correspondant aux différents nombres de PEGs liés par protéine (1 = un PEG-Mal lié par protéine et donc un thiol réactif, 2 = deux thiols réactifs par protéine, etc...). Chaque bande protéique d'intérêt sera accompagnée d'un chiffre rouge, qui indique la proportion de protéines contenue dans cette bande, en pourcentage de la quantité totale de protéines déposée dans le puits du gel. Ces proportions sont obtenues par estimation visuelle des intensités relatives des bandes protéiques. Dans le cas des expériences de SDS-PAGE + PEG présentées, cette méthode est plus adaptée que la détermination informatique par un logiciel de type « ImageJ ». Une annotation « < 1 » indique qu'une bande protéique est visible mais qu'elle est trop peu intense pour être quantifiée précisément. Prenons l'exemple d'un puits dans lequel trois bandes protéiques sont visibles (**figure 24-A**), correspondant respectivement à la protéine non pégylée, à la protéine pégylée une fois et à la protéine pégylée deux fois. 70 % de la protéine est sous forme non pégylée, 20 % sous une forme pégylée une fois et 10 % sous une forme pégylée deux fois, pour un total de 100 %. Pour de hautes valeurs de pégylation, généralement à partir de trois molécules de PEG par protéine, les bandes protéiques correspondantes deviennent diffuses et forment ce que l'on appelle un « smear », plusieurs bandes protéiques différentes se confondant en une seule (**figure 24-B**). Ce phénomène est dû au fait que la masse moléculaire de chaque PEG-Mal est légèrement différente d'une molécule à une autre. Les protéines couplées à un ou plusieurs PEG-Mal migrent ainsi chacune dans le gel à une vitesse légèrement différente, malgré des valeurs de thiolation identiques, ce qui donne un aspect diffus aux bandes. Le phénomène est d'autant plus marqué que le nombre de molécules de PEG-Mal liées par protéine est grand. Les bandes de type « smear » sont encadrées par une ligne pointillée rouge. La proportion de protéines présente dans ces bandes diffuses ne peut être quantifiée précisément. Aucune valeur n'est donc indiquée et le chiffre rouge est remplacé par « non déterminé » (ND). Il est cependant possible d'estimer la quantité de protéines présente dans un « smear » en soustrayant la quantité de protéines présentes dans les bandes quantifiables de la quantité totale de protéines. A partir des bandes quantifiées de chaque puits, une valeur de pégylation moyenne

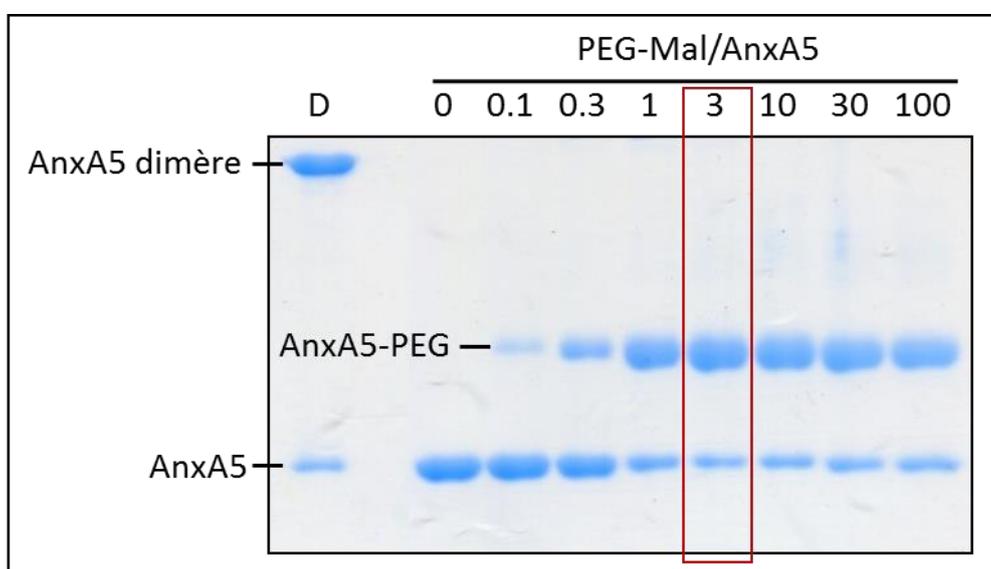
est indiquée sous le gel. Elle est calculée de la façon suivante : si trois bandes protéiques sont présentes sur le gel, correspondant respectivement à la protéine non pégylée, à la protéine pégylée une fois et à la protéine pégylée deux fois et contenant respectivement 70 %, 20 % et 10 % de la quantité totale de protéine, la valeur moyenne de pégylation sera de 0.4 PEG par protéine ( $\frac{70 \times 0 + 20 \times 1 + 10 \times 2}{100} = 0.4$ ), soit 0.4 thiol réactif par protéine. Si une bande de type « smear » est présente, cette valeur de pégylation moyenne ne peut être calculée de manière absolue. Le chiffre indiquant la valeur de pégylation de l'échantillon est dans ce cas écrit en bleu et signale que la valeur déterminée est une valeur minimum, calculée à partir des bandes quantifiables et ne tenant pas compte des protéines pégylées présentes dans le « smear ». La valeur de thiolation obtenue par dosage d'Ellman est indiquée sous chaque puits.



**Figure 24 : Schéma décrivant les annotations utilisées pour l'analyse des expériences d'analyse de la thiolation de protéines par SDS-PAGE + PEG.** (A) Puits contenant trois bandes protéiques définies, correspondant respectivement à 0, 1 et 2 molécules de PEG par protéine. (B) Puits contenant trois bandes protéiques définies, correspondant respectivement à 0, 1 et 2 molécules de PEG par protéine, ainsi qu'une bande de type « smear », correspondant à 3 PEGs ou plus par protéine. L'encadré en pointillés rouges et la mention « ND » indiquent une bande non quantifiable de type « smear ». (A-B) Les flèches noires indiquent la valeur de pégylation correspondant à la bande. Les chiffres rouges indiquent la proportion de protéines contenue dans cette bande, en pourcentage de la quantité totale de protéines déposée dans le puits. La première ligne de valeurs sous l'image du gel indique la valeur de pégylation moyenne déterminée par lecture de l'intensité des bandes du gel et donc le nombre moyen de thiols réactifs par protéine. La deuxième ligne de valeurs indique la thiolation moyenne de l'échantillon correspondant déterminée par dosage d'Ellman.

#### 1.1.4. Mise au point de la méthode SDS-PAGE + PEG

Des expériences préliminaires visant à valider l'utilisation de la méthode SDS-PAGE + PEG pour l'analyse de la thiolation de protéines ont été réalisées. Nous avons déterminé la quantité de PEG-Mal nécessaire pour coupler l'intégralité des éventuels thiols réactifs présents à la surface des protéines. De l'AnxA5-SH à 1 mg/mL a été incubée pendant 30 minutes avec des quantités variables de PEG-Mal, de 0 à 100 molécules de PEG-Mal par AnxA5-SH, puis la réaction a été stoppée par ajout d'un excès de DTT. Les échantillons ont ensuite été analysés par SDS-PAGE. Les résultats de cette expérience sont présentés en **figure 25**.



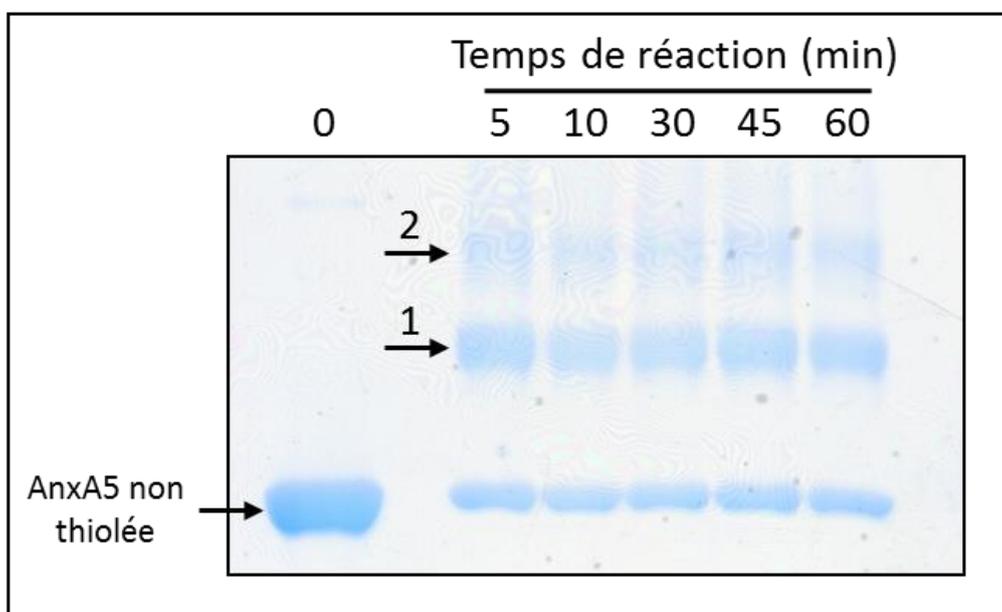
**Figure 25 : Influence du rapport entre le nombre de molécules de PEG-Mal et d'AnxA5-SH sur l'efficacité de couplage.** Le puits « D » contient de l'AnxA5-SH sous forme de dimère.

Des molécules d'AnxA5-SH greffées à un PEG-Mal (AnxA5-PEG) sont présentes dès un rapport PEG-Mal/AnxA5-SH égal à 0.1, à hauteur d'environ 10 % de la quantité totale de protéines déposée dans le puits. La quantité d'AnxA5-PEG augmente progressivement jusqu'à un rapport PEG-Mal/AnxA5-SH égal à 3 pour atteindre environ 90 % de la quantité totale de protéines, puis n'évolue plus. Cela signifie que toutes les protéines réactives sont couplées à une molécule de PEG-Mal. Il reste cependant environ 10 % d'AnxA5-SH non couplée, quelle que soit le rapport PEG-Mal/AnxA5-SH utilisé, ce qui indique que ces 10 % d'AnxA5-SH ne sont pas réactifs. Le puits « D » contenant le dimère d'AnxA5-SH utilisé pour produire l'AnxA5-SH monomère utilisée dans cette expérience présente une petite quantité d'AnxA5-SH

monomère, équivalente à la quantité d'AnxA5-SH non couplée en présence de PEG-Mal. Il est donc probable que le stock d'AnxA5-SH dimère ne soit pas totalement pur et contienne une petite quantité d'AnxA5 non réactive ou ne possédant pas de thiol. Ceci est cohérent avec les résultats du dosage d'Ellman réalisé précédemment sur l'AnxA5-SH, qui indiquait qu'environ 15 % de l'AnxA5-SH n'était pas réactive. Ce phénomène est probablement dû au vieillissement de la protéine.

Afin de s'assurer que les molécules de PEG-Mal soient en excès suffisant par rapport aux thiols à coupler, un rapport PEG-Mal/Protéine égal à 20 sera utilisé pour l'ensemble des expériences de SDS-PAGE + PEG ultérieures.

Nous avons ensuite étudié le temps de réaction entre PEG-Mal et protéine thiolée afin de déterminer le temps d'incubation nécessaire pour que tous les thiols réactifs se couplent aux molécules de PEG-Mal. De l'AnxA5 à 1 mg/mL est thiolée par du réactif de Traut puis incubée avec un excès de PEG-Mal/AnxA5 égal à 20, avec un temps de réaction de 5 à 60 minutes. La réaction est stoppée par ajout d'un excès de DTT et les échantillons sont analysés par SDS-PAGE. Les résultats de cette expérience sont présentés en **figure 26**.



**Figure 26 : Influence du temps de réaction entre PEG-Mal et protéine thiolée sur l'efficacité de couplage.** Le temps de réaction « 0 » est réalisé en l'absence de PEG-Mal. Les conditions de thiolation utilisées sont les suivantes : concentration en AnxA5 = 3 mg/mL, rapport entre molécules de réactif de Traut et d'AnxA5 = 100 et temps de réaction = 30 minutes.

La réaction de couplage entre PEG-Mal et AnxA5 thiolée est rapide et totale après 5 minutes de réaction. Afin de s'assurer que cette réaction soit complète, toutes les expériences de SDS-PAGE + PEG-Mal suivantes seront réalisées en incubant les échantillons de protéines thiolées avec le PEG-Mal pendant 15 minutes.

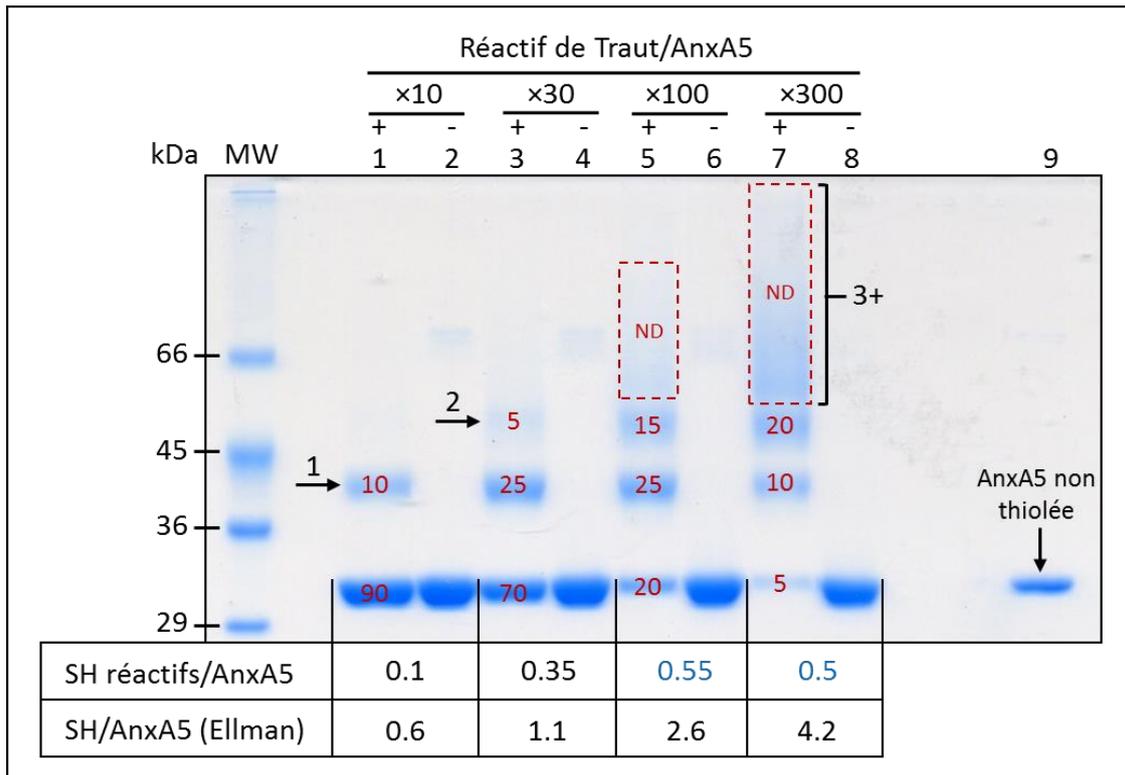
#### **1.1.5. Etude de la thiolation de l'AnxA5**

Bien que l'objectif final de cette étude de la thiolation des protéines soit la production d'anticorps thiolés, nous avons choisi de mener des expériences préliminaires avec l'AnxA5. Nous disposons d'AnxA5 au laboratoire et nous connaissons bien cette protéine, en faisant un bon modèle protéique alternatif pour l'étude. L'AnxA5 possède également l'avantage d'être une protéine monomérique et donc de posséder une structure plus simple que les anticorps, ce qui rend son analyse par SDS-PAGE + PEG moins complexe.

Différents paramètres susceptibles d'influer sur la thiolation des protéines ont été étudiés par SDS-PAGE + PEG et dosage d'Ellman : le rapport entre le nombre de molécules de réactif de Traut et de protéines (rapport Traut/Protéine), la concentration en protéines, et le temps de réaction entre réactif de Traut et protéines.

##### *1.1.5.1. Influence du rapport entre le nombre de molécules de réactif de Traut et d'AnxA5*

L'influence du rapport entre le nombre de molécules de réactif de Traut et d'AnxA5 a été étudiée en incubant l'AnxA5 avec du réactif de Traut en excès de 10 à 300 fois par rapport au nombre de protéines. La concentration en AnxA5 est fixée à 3 mg/mL et le temps de réaction à 30 minutes. Les résultats de cette expérience sont présentés en **figure 27**.



**Figure 27 : Influence du rapport entre le nombre de molécules de réactif de Traut et d'AnxA5 sur la thiolation de l'AnxA5, par dosage d'Ellman et SDS-PAGE + PEG.** Les signes « + » et « - » indiquent la présence ou non de PEG-Mal dans l'échantillon. Le puits annoté « MW » à gauche du gel contient un marqueur de taille dont les masses moléculaires sont données en kDa. Le puits 9 contient de l'AnxA5 non thiolée.

L'analyse par SDS-PAGE + PEG indique une augmentation attendue de la thiolation de l'AnxA5 en fonction du rapport Traut/AnxA5. Cette augmentation de la thiolation se traduit par l'apparition de nouvelles bandes protéiques de masse moléculaire apparente supérieure à celle de l'AnxA5. Pour un rapport Traut/AnxA5 de 10 (puits 1), deux bandes sont visibles. La bande inférieure, située entre 29 kDa et 36 kDa, correspond à l'AnxA5 n'ayant pas liée de molécule de PEG-Mal et ne présentant donc pas de thiol réactif. Cette bande contient 90 % de la quantité totale de protéines déposée sur le gel. Une seconde bande est visible entre 35 kDa et 45 kDa, correspondant à de l'AnxA5 ayant lié une molécule PEG-Mal et possédant donc un thiol réactif. Cette bande représente environ 10 % de la quantité totale de protéines. La valeur de pégylation moyenne déterminée par SDS-PAGE est par conséquent de 0.1 PEG par AnxA5, soit 0.1 thiol réactif par protéine. Cette condition (10 Traut/AnxA5, concentration en AnxA5 = 3 mg/mL et temps de réaction = 30 minutes) permet d'obtenir uniquement des

molécules d'AnxA5 qui ne possèdent pas de thiol réactif ou qui en possèdent un seul. Ces conditions de thiolation peuvent être intéressantes dans l'optique de fixer le nombre maximum de thiols réactifs par AnxA5 à 1, afin de limiter d'éventuels phénomènes d'agrégation de protéines par formation de ponts disulfures. Cette problématique sera abordée plus en détail ultérieurement dans le cas des anticorps. Les puits 3, 5 et 7 correspondant respectivement à des rapports Traut/AnxA5 de 30, 100 et 300 montrent une diminution progressive de la quantité d'AnxA5 non pégylée conjointement à l'apparition de molécules d'AnxA5 couplées à un nombre croissant de molécules de PEG-Mal. De l'AnxA5 pégylée deux fois et présentant donc deux thiols réactifs est observée pour un rapport Traut/AnxA5 égal à 30, puis de l'AnxA5 pégylée trois fois et plus pour des rapports Traut/AnxA5 égaux à 100 ou 300. Ces deux dernières conditions montrent également l'apparition d'une bande de type « smear ». Ces bandes ne sont pas précisément quantifiables mais elles indiquent une importante thiolation des protéines. Pour le rapport Traut/AnxA5 de 300, 95 % des molécules d'AnxA5 sont pégylées au moins une fois, la bande correspondant à l'AnxA5 non pégylée ne représentant plus que 5% de la quantité totale de protéines. Cette condition de thiolation permet de modifier la quasi-totalité des molécules d'AnxA5. Le nombre de thiols réactifs par AnxA5 est cependant très variable, et la présence de nombreux thiols réactifs par protéine pourrait entraîner un phénomène d'agrégation comme évoqué précédemment.

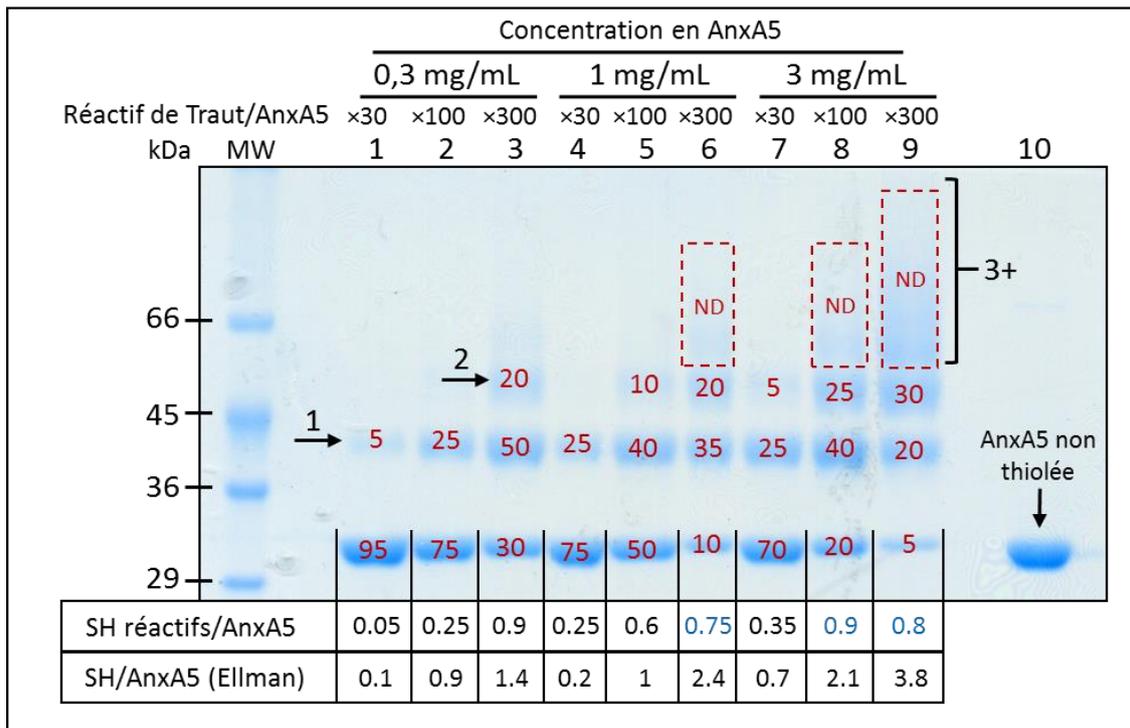
Les valeurs de thiolation obtenues par dosage d'Ellman sont respectivement de 0.6, 1.1, 2.6 et 4.2 pour les rapports Traut/AnxA5 de 10, 30, 100 et 300. Ces valeurs sont supérieures au nombre de thiols réactifs estimé par l'analyse SDS-PAGE + PEG mais sont cohérentes avec ces dernières. Dans le cas du rapport Traut/AnxA5 de 10, la valeur de 0.6 thiol par protéine obtenue par dosage d'Ellman correspond bien au fait que les molécules d'AnxA5 de cet échantillon sont non pégylées ou pégylées une fois. Pour le rapport Traut/AnxA5 de 30, le puits contient des molécules d'AnxA5 non pégylées, pégylées une fois et pégylées deux fois, dans des proportions respectives de 70 %, 25 % et 5 %. La valeur de thiolation moyenne déterminée par dosage d'Ellman est d'environ un thiol par AnxA5. La proportion d'AnxA5 pégylée une fois n'est cependant pas majoritaire. Cet exemple illustre la différence entre le nombre moyen de thiols par protéine obtenu par dosage d'Ellman et la distribution statistique réelle des thiols réactifs à la surface des protéines modifiées. Cette différence est également

visible pour le rapport Traut/AnxA5 de 300, pour lequel une valeur de 4.2 thiols par AnxA5 est obtenue par dosage d'Ellman. Parallèlement, l'expérience de SDS-PAGE + PEG indique que l'AnxA5 non pégylée a presque totalement disparu et que l'échantillon est composé d'un mélange hétérogène d'AnxA5 exposant un nombre de thiols réactifs variable, de zéro à plus de trois par protéine. De manière générale, le nombre de thiols réactifs estimé par SDS-PAGE est plus faible que le nombre de thiols déterminé par dosage d'Ellman. Cette tendance a été confirmée par l'intégralité des expériences de SDS-PAGE + PEG présentées ultérieurement. La précision du dosage d'Ellman a été précédemment validée avec différentes molécules thiolées, dont l'AnxA5-SH, nous estimons donc que les valeurs de thiolation obtenues par cette méthode sont exactes. Comment expliquer la différence de résultats entre SDS-PAGE + PEG et dosage d'Ellman ? Notre hypothèse est qu'une partie des thiols ajoutés après incubation avec le réactif de Traut sont capables de réagir avec une petite molécule comme le DTNB utilisé dans le dosage d'Ellman mais sont incapables de réagir avec les molécules de PEG-Mal, plus encombrantes. Il est possible que des phénomènes de gêne stérique limitent la réaction entre thiols et maléimides, ce qui réduit le nombre de PEG-Mal liés. Les informations obtenues par dosage d'Ellman et SDS-PAGE + PEG sont donc différentes et complémentaires. Le dosage d'Ellman détermine le nombre moyen de thiols par protéine de manière absolue, tandis que la méthode SDS-PAGE + PEG estime plutôt le nombre de thiols réactifs par protéine.

Les échantillons déposés dans les puits surmontés d'un signe « - » n'ont pas été incubés avec du PEG-Mal et servent de contrôle négatif. Seule la bande protéique correspondante à l'AnxA5 non pégylée est observée, quelle que soit la valeur de thiolation de l'échantillon. L'apparition de bandes de masse moléculaire apparente supérieure est donc due à la liaison des molécules de PEG-Mal aux molécules d'AnxA5 thiolées par le réactif de Traut.

#### *1.1.5.2. Influence de la concentration en AnxA5*

L'influence de la concentration en protéine sur la thiolation de l'AnxA5 a ensuite été étudiée. Des expériences similaires à celles présentées pour l'influence du rapport Traut/AnxA5 ont été réalisées, avec des concentrations en AnxA5 comprises entre 0.3 et 3 mg/mL, un temps de réaction de 30 minutes et des rapports Traut/AnxA5 de 30, 100 et 300. La **figure 28** présente les résultats de cette expérience.

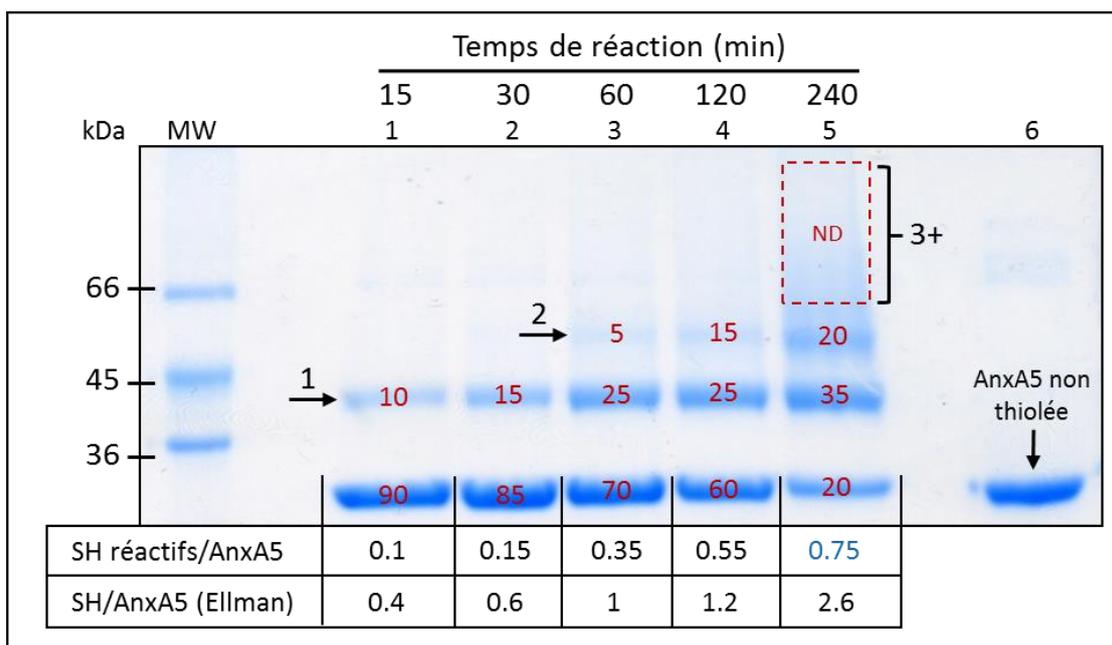


**Figure 28 : Influence de la concentration en protéine sur la thiolation de l'AnxA5, par dosage d'Ellman et SDS-PAGE + PEG.** Le puits noté « MW » à gauche du gel contient un marqueur de taille, dont les masses moléculaires sont données en kDa. Le puits 10 contient de l'AnxA5 non thiolée.

L'expérience de SDS-PAGE + PEG montre que pour un rapport Traut/AnxA5 fixe, la thiolation augmente avec la concentration en AnxA5. Il est donc possible de faire varier la concentration en protéines pour obtenir les valeurs de thiolation désirées. Dans l'optique de produire des molécules d'AnxA5 possédant au maximum un thiol réactif, il est par exemple possible d'utiliser une concentration en AnxA5 de 0.3 mg/mL avec un rapport Traut/AnxA5 de 100, ou une concentration en AnxA5 de 3 mg/mL avec un rapport Traut/AnxA5 inférieur à 30.

### 1.1.5.3. Influence du temps de réaction entre le réactif de Traut et l'AnxA5

Le dernier paramètre étudié est l'influence du temps de réaction entre le réactif de Traut et l'AnxA5. Le rapport Traut/AnxA5 est fixé à 100 et la concentration en AnxA5 à 1 mg/mL. La réaction est stoppée après un temps d'incubation variable de 15 à 240 minutes par dilution de l'échantillon et élimination du réactif de Traut par lavage. Les échantillons sont ensuite analysés par SDS-PAGE + PEG et dosage d'Ellman. Les résultats de cette expérience sont présentés en **figure 29**.



**Figure 29 : Influence du temps de réaction entre le réactif de Traut et l'AnxA5 sur la thiolation de l'AnxA5, par dosage d'Ellman et SDS-PAGE + PEG.** Le puits noté « MW » à gauche du gel contient un marqueur de taille, dont les masses moléculaires sont données en kDa. Le puits 6 contient de l'AnxA5 non thiolée. Les bandes de cette expérience de SDS-PAGE ont été un peu moins colorées que les autres expériences présentées dans ce travail et sont donc légèrement moins intenses.

De manière attendue, la thiolation de l'AnxA5 augmente avec le temps, sans atteindre un plateau après 240 minutes de réaction. Au bout de 15 minutes de réaction, de l'AnxA5 pégylée une fois est présente à hauteur de 10 % de la quantité totale de protéines. La proportion d'AnxA5 pégylée une seule fois augmente à 15 % après 30 minutes de réaction. De l'AnxA5 pégylée deux fois apparaît à partir d'une heure de réaction, puis de l'AnxA5 pégylée trois fois ou plus après quatre heures de réaction. Bien qu'il soit possible de faire varier le temps de réaction entre réactif de Traut et AnxA5 pour ajuster la thiolation des protéines, il est recommandé d'utiliser un temps de réaction inférieur ou égal à 30 minutes. En effet, le réactif de Traut s'hydrolyse rapidement à pH 8, qui est le pH du tampon phosphate utilisé lors de la réaction de thiolation. Il est donc préférable d'augmenter les concentrations en réactif de Traut et/ou en AnxA5 si des taux de thiolation élevés sont souhaités.

#### 1.1.5.4. Conditions de thiolation recommandées pour l'AnxA5

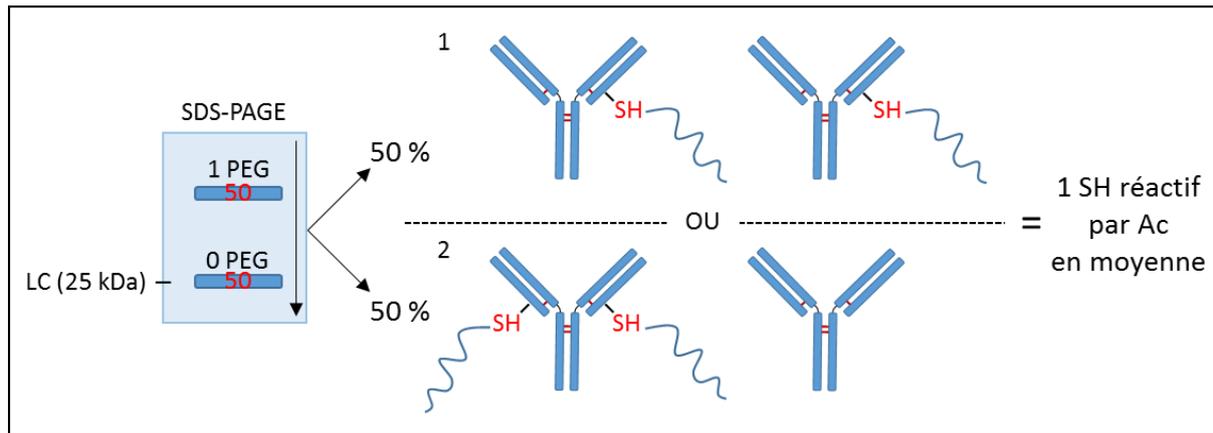
L'influence des différents paramètres de thiolation de l'AnxA5 a permis de déterminer la valeur de thiolation moyenne de la protéine ainsi que la répartition statistique des thiols réactifs à la surface de cette protéine en fonction de ces paramètres. Afin de produire des molécules d'AnxA5 avec au maximum un thiol réactif par protéine, il est recommandé d'utiliser les conditions suivantes : rapport Traut/AnxA5 = 100, concentration en AnxA5 = 1 mg/mL et temps de réaction = 15-30 minutes. Ces conditions permettent de limiter une éventuelle agrégation de protéines par le biais de la formation de ponts disulfures, au détriment de la proportion d'AnxA5 thiolée. Pour obtenir des molécules d'AnxA5 possédant un nombre important de thiols réactifs, il est recommandé de travailler avec des rapports Traut/AnxA5 de 300 ou plus, des concentrations en AnxA5 comprises entre 1 et 3 mg/mL par exemple et un temps de réaction de 30 minutes.

#### 1.1.6. Etude de la thiolation des anticorps

L'étude de la thiolation de l'AnxA5 a permis d'obtenir des informations qualitatives et quantitatives sur l'influence de trois paramètres de thiolation, qui sont le rapport Traut/protéine, la concentration en protéines et le temps de réaction entre le réactif de Traut et les protéines. L'influence de ces trois paramètres et l'influence du type d'anticorps utilisé ont été étudiées sur des anticorps, par SDS-PAGE + PEG et dosage d'Ellman. Le phénomène d'oligomérisation des Ac-SH par formation de ponts disulfures a ensuite été étudié par chromatographie d'exclusion de taille (CET). Pour cette étude de la thiolation des anticorps, nous avons utilisé un anticorps anti-CD235a dirigé contre la glycophorine A, un anticorps Herceptin® dirigé contre le récepteur HER2, surexprimé dans certains types de cancer du sein (Slamon et al., 1989), et deux anticorps anti-PSA différents, appelés ci-après 1A7 et 3E6. Les trois derniers anticorps n'ont pas d'intérêt direct dans le cadre de mon travail de thèse sur les VEs et sont utilisés comme modèle d'anticorps.

Les anticorps sont des protéines de 150 kDa qui migrent lentement sur gel SDS-PAGE, ce qui les rend difficiles à analyser. Contrairement à l'AnxA5 qui est une protéine monomérique, les anticorps sont composés de quatre sous-unités, deux chaînes lourdes (HC) et deux chaînes légères (LC). Avant d'être analysés par SDS-PAGE, les anticorps ont été incubés avec du  $\beta$ -ME

et chauffés à 95 °C pendant 10 minutes afin de réduire leurs ponts disulfures internes et de dissocier leurs quatre chaînes. Les chaînes lourdes et légères des anticorps ainsi traités sont d'une taille plus adaptée à l'analyse par SDS-PAGE et migrent sous la forme de deux bandes, respectivement à 50 kDa et 25 kDa. Lors de l'analyse des expériences de SDS-PAGE + PEG d'anticorps thiolés, il est nécessaire de raisonner en termes de chaînes lourdes et de chaînes légères, et non plus de protéine entière comme pour l'AnxA5. Il suffit en effet qu'une seule des quatre chaînes d'un anticorps soit thiolée pour que celui-ci puisse se conjuguer aux NpAu-Mal. Les quatre chaînes sont indépendamment susceptibles d'être modifiées par le réactif de Traut, et donc de réagir avec une ou plusieurs molécules de PEG-Mal. Ainsi, en plus des deux bandes correspondant aux chaînes lourdes et légères non pégylées, des bandes supplémentaires seront observées en cas de pégylation de l'une ou l'autre de ces chaînes. Le calcul de la valeur de pégylation moyenne déterminée par SDS-PAGE + PEG est également plus complexe. Il est en effet nécessaire de tenir compte du fait qu'un anticorps possède une paire de chaque type de chaîne. Un exemple illustrant le raisonnement appliqué pour déterminer la valeur de pégylation moyenne d'un échantillon est présenté en **figure 30**, dans laquelle seule la thiolation des chaînes légères est considérée afin de simplifier l'explication. Dans cet exemple, le puits présente deux bandes correspondant à la chaîne légère et à la chaîne légère pégylée une fois. Chacune de ces bandes contient 50% de la quantité totale de chaîne légère. Cela signifie que 50% des chaînes légères de l'échantillon possèdent un thiol réactif. L'échantillon est donc composé d'un mélange d'anticorps possédant 0, 1 ou 2 chaîne(s) légère(s) pégylée(s) et la valeur de moyenne de pégylation de l'échantillon sera de 1 PEG par anticorps ( $\frac{50 \times 0 + 50 \times 2}{100} = 1$ ), soit un thiol réactif. Prenons maintenant un exemple un peu plus complexe et tenant compte des chaînes lourdes et légères. Si un puits présente respectivement 40 % et 20 % de chaînes lourdes respectivement pégylées une et deux fois et 30 % de chaînes légères pégylées une fois, la valeur de pégylation moyenne de l'échantillon sera de 2.2 PEGs par anticorps ( $\frac{40 \times 2 + 20 \times 4 + 30 \times 2}{100} = 2.2$ ), soit 2.2 thiols réactifs. Les valeurs moyennes calculées de cette manière n'ont qu'un but comparatif avec les valeurs obtenues par dosage d'Ellman et ne reflètent pas la distribution statistique réelle des thiols à la surface des anticorps.



**Figure 30 : Exemple d'analyse de la thiolation d'un anticorps par SDS-PAGE + PEG.**

#### 1.1.6.1. Influence du rapport entre le nombre de molécules de réactif de Traut et d'anticorps

L'influence du rapport entre le nombre de molécules de réactif de Traut et d'anticorps (Traut/Ac) a été étudiée en incubant un anticorps avec du réactif de Traut en excès de 10 à 1000 fois par rapport au nombre de molécules d'anticorps. La concentration en anticorps est fixée à 1 mg/mL et le temps de réaction à 20 minutes. Les résultats de cette expérience sont présentés en **figure 31**. Comme attendu, l'expérience de SDS-PAGE + PEG montre une augmentation de la thiolation des chaînes lourdes et des chaînes légères en fonction du rapport Traut/Ac. Les chaînes lourdes sont globalement plus pégylées que les chaînes légères. Ceci s'explique par le nombre d'acides aminés deux fois plus important des chaînes lourdes en comparaison des chaînes légères. Une bande correspondant à la liaison d'un PEG-Mal apparaît à partir d'un rapport Traut/Ac de 30 (puits 9) pour la chaîne lourde et à partir d'un rapport Traut/Ac de 300 (puits 11) pour la chaîne légère. La condition 100 Traut/Ac est intéressante car elle permet de n'obtenir que des chaînes lourdes non pégylées, ou pégylées une seule fois. Les chaînes lourdes pégylées une fois représentent 20 % de la quantité totale de protéines déposée dans le puits. D'après le mode de calcul présenté précédemment, chaque anticorps possédant deux chaînes lourdes, cela signifie que la valeur de pégylation moyenne de cet échantillon est de 0.4 PEG par anticorps. Comme dans le cas de l'AnxA5, ce type de condition est recommandé dans l'optique de limiter une éventuelle agrégation par formation de ponts disulfures, au détriment d'une importante proportion d'anticorps non modifiés. A partir de 300 Traut/Ac (puits 11), une bande de type « smear » apparaît pour les chaînes lourdes, indiquant la présence de chaînes lourdes pégylées trois fois ou plus. La



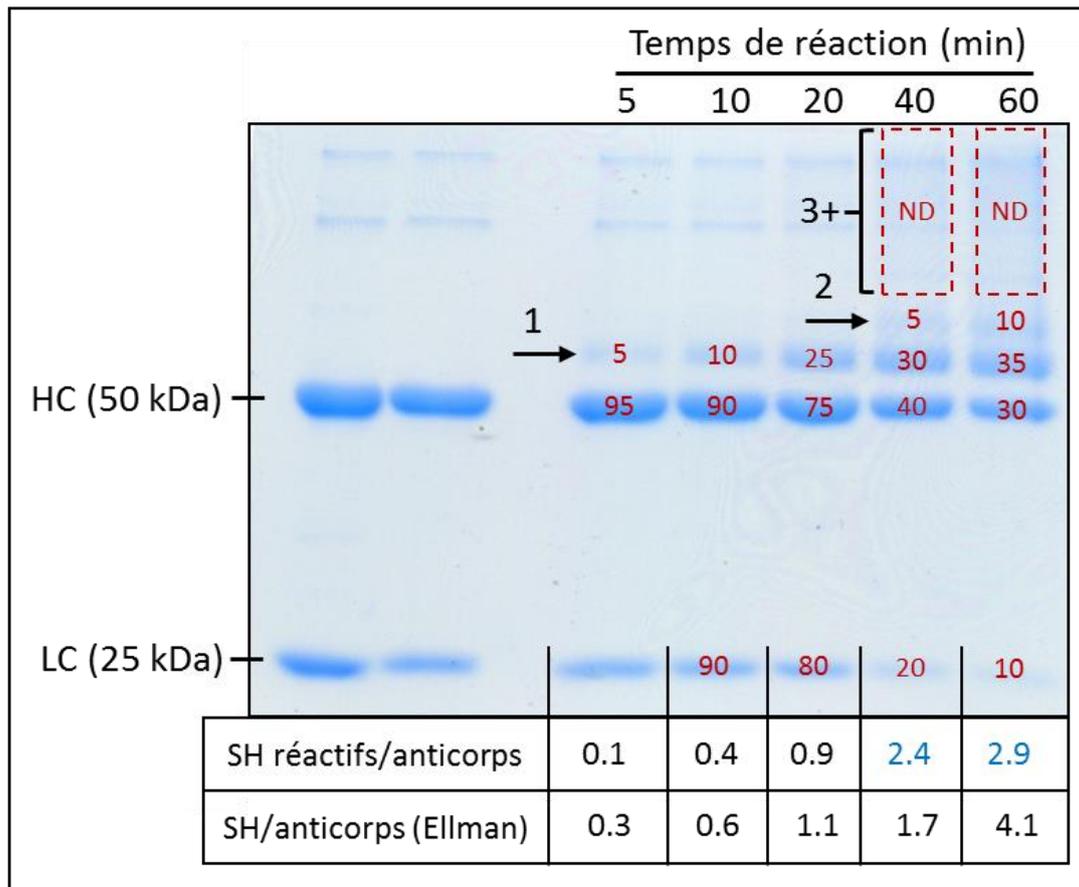
différence entre les valeurs déterminées par SDS-PAGE + PEG et dosage d'Ellman est cependant plus faible que dans le cas de l'AnxA5.

Les puits 3 à 7 servent de contrôle négatif. Ils contiennent les mêmes anticorps thiolés que les puits 8 à 12 mais n'ont pas été incubés avec du PEG-Mal avant le dépôt sur gel. Ces puits ne montrent aucune bande additionnelle, à l'instar de ce qui a été observé pour l'AnxA5. L'apparition de bandes protéiques de masse moléculaire apparente supérieure est donc due au couplage de PEG-Mal aux thiols des anticorps modifiés par le réactif de Traut.

#### *1.1.6.2. Influence de la concentration en anticorps*

L'influence de la concentration en protéines sur la thiolation des anticorps a ensuite été étudiée. Des expériences similaires à celles présentées pour l'influence du rapport Traut/Ac ont été réalisées, avec des concentrations en anticorps comprises entre 0.3 et 3 mg/mL, un temps de réaction fixé à 20 minutes et un rapport Traut/Ac de 30, 100 et 300. La **figure 32** présente les résultats de cette expérience. L'expérience de SDS-PAGE + PEG indique que pour un rapport Traut/Ac donné, la thiolation des chaînes lourdes et légères augmente en fonction de la concentration en anticorps. Outre le rapport Traut/Ac, il est donc possible de faire varier la concentration en protéines pour obtenir les valeurs de thiolation désirées. Dans l'optique de produire des molécules d'anticorps possédant un nombre de thiols réactifs proche de 1, il est par exemple possible d'utiliser une concentration en anticorps de 0,3 mg/mL couplée à un rapport Traut/Ac de 300, ou une concentration en anticorps de 1 mg/mL couplée à un rapport Traut/Ac de 100, ou encore une concentration en anticorps de 3 mg/mL couplée à un rapport Traut/Ac de 30. Ces trois conditions donnent des résultats similaires. Il est également possible de modifier l'intégralité des molécules d'anticorps en utilisant une concentration en anticorps de 3 mg/mL ou plus et un rapport Traut/Ac de 300 ou plus, au détriment d'une thiolation plus importante et hétérogène.



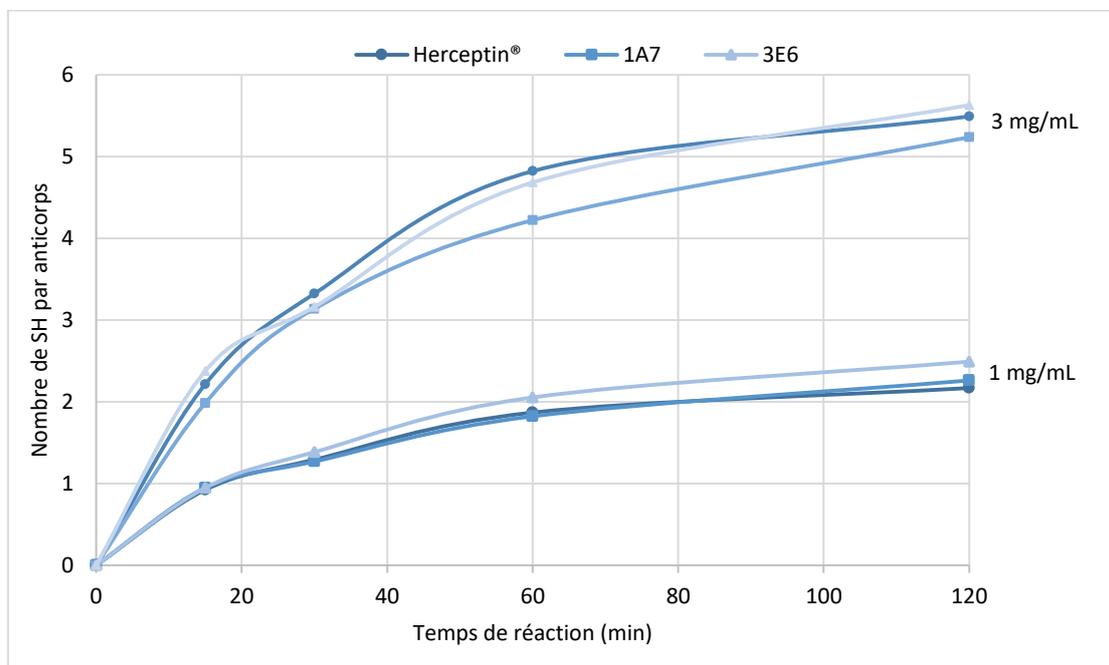


**Figure 33 : Influence du temps de réaction entre le réactif de Traut et l'anticorps sur la thiolation de l'anticorps, par dosage d'Ellman et SDS-PAGE + PEG.** Les deux puits de gauche contiennent respectivement de l'anticorps non thiolé et de l'anticorps non thiolé + PEG-Mal. Ils sont également considérés comme le point « 0 minute » de la gamme de temps. Les 5 puits de droite contiennent des échantillons d'anticorps thiolés correspondant aux différents temps de réaction entre réactif de Traut et anticorps, puis incubés avec du PEG-Mal. Seules les bandes protéiques additionnelles des chaînes lourdes modifiées sont visibles sur le gel, à cause d'une coloration globale du gel moins intense. Les chaînes légères sont malgré tout pégylées, car la bande visible à 25 kDa, correspondant à la chaîne légère non modifiée, disparaît progressivement. L'anticorps utilisé est un anticorps anti-CD235a.

#### 1.1.6.4. Influence du type d'anticorps

Nous avons ensuite souhaité déterminer si la thiolation était dépendante du type d'anticorps utilisé. Pour cela, nous avons comparé la réaction de thiolation de trois anticorps différents, l'anticorps anti-HER2 Herceptin® et deux anticorps anti-PSA 1A7 et 3E6. Ces anticorps ont été thiolés en utilisant un rapport Traut/Ac de 100 et un temps de réaction de 20 minutes. Deux

concentrations en anticorps ont été testées, 1 mg/mL et 3 mg/mL. La valeur de thiolation moyenne par anticorps a ensuite été déterminée par dosage d'Ellman. Les résultats obtenus sont présentés en **figure 34**.



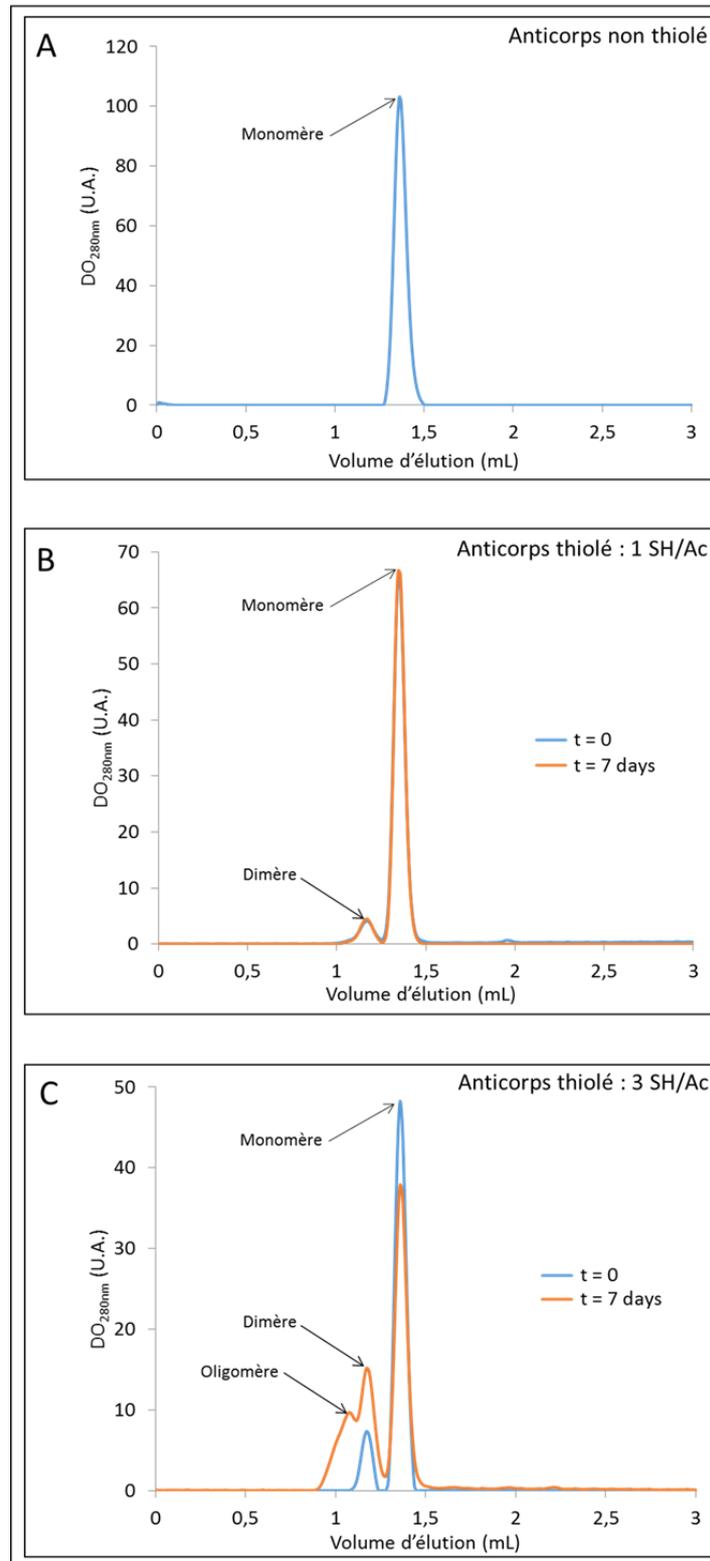
**Figure 34 : Influence du type d'anticorps sur la thiolation, étudiée par dosage d'Ellman.** Les anticorps utilisés sont un anticorps Herceptin® et deux anticorps anti-PSA 1A7 et 3E6. Le rapport Traut/Ac est fixé à 100 et le temps de réaction est de 20 minutes. Deux concentrations en anticorps sont utilisées, 3 mg/mL pour les trois courbes en haut du graphique et 1 mg/mL pour les trois courbes en bas du graphique.

Pour des conditions de thiolation identiques, les courbes correspondant aux trois anticorps sont superposables, indiquant une valeur de thiolation moyenne similaire. La thiolation des anticorps ne semble donc pas dépendante du type d'anticorps utilisé et les résultats de cette étude peuvent vraisemblablement être généralisés à d'autres types d'anticorps que ceux utilisés précédemment.

#### 1.1.6.5. Influence du nombre de thiols par anticorps sur l'oligomérisation des anticorps thiolés par formation de ponts disulfures

La présence de thiols à la surface d'une molécule peut théoriquement mener à la formation spontanée de ponts disulfures. Nous avons donc étudié l'influence de la valeur de thiolation

moyenne des Ac-SH sur leur éventuelle oligomérisation, ainsi que l'influence du temps de stockage des Ac-SH sur leur oligomérisation. Des molécules d'anticorps ont été thiolées selon deux conditions différentes puis la valeur de thiolation moyenne de chaque lot d'Ac-SH a été déterminée par dosage d'Ellman. Les deux échantillons d'anticorps thiolés obtenus présentent respectivement des valeurs de thiolation moyennes de un et trois thiols par anticorps. En se référant aux expériences de SDS-PAGE + PEG précédentes, cela correspond environ à un et trois thiols réactifs par anticorps. Les Ac-SH ont ensuite été analysés par chromatographie d'exclusion de taille (CET) le jour de leur thiolation, puis après une semaine de stockage à 4 °C. Les résultats de ces expériences sont présentés en **figure 35**. La **figure 35-A** présente le profil d'un anticorps non thiolé, à titre de référence. Un unique pic d'élution est observé vers 1.4 mL, correspondant à l'anticorps sous forme monomérique. Dans le cas des anticorps exposant un thiol (**Figure 35-B**), un pic d'élution majoritaire est également présent à 1.4 mL et correspond à nouveau à l'anticorps sous forme monomérique. Un second pic représentant 6 % de la quantité totale d'anticorps est observé vers 1.2 mL et correspond à des dimères d'anticorps, vraisemblablement liés par des ponts disulfures. La courbe bleue (t=0) et la courbe rouge (t=7 jours) étant superposées, l'échantillon n'a pas évolué durant cette période d'une semaine. Ceci montre que la petite quantité de dimères d'anticorps est déjà présente à t=0. Il est probable qu'ils soient formés lors des étapes de lavage visant à éliminer l'excès de réactif de Traut, au cours desquelles la concentration en anticorps peut atteindre 10 mg/mL. Dans le cas des anticorps exposant une moyenne de trois thiols par molécule (**Figure 35-C**), la proportion de dimère à t=0 augmente pour atteindre 22 % de la quantité totale de protéines. Après une semaine, cette quantité de dimère atteint 25 % et un troisième pic apparaît vers 1.1 mL. Il correspond vraisemblablement à des trimères ou à d'autres degrés d'oligomérisation d'anticorps, qui représentent 19 % de la quantité totale de protéines. Parallèlement, la hauteur du pic de monomère diminue, confirmant l'agrégation des Ac-SH. Ces résultats de CET confirment l'importance d'une étape de thiolation des anticorps finement contrôlée, aboutissant à un nombre minimal de thiols par anticorps, afin d'éviter d'éventuels problèmes d'agrégation d'Ac-SH, et par extension des nanoparticules couplées à ces Ac-SH. Cette problématique a notamment été reportée par Vingerhoeds *et al.* (Vingerhoeds et al., 1996) dans le cas de liposomes fonctionnalisés par une enzyme.



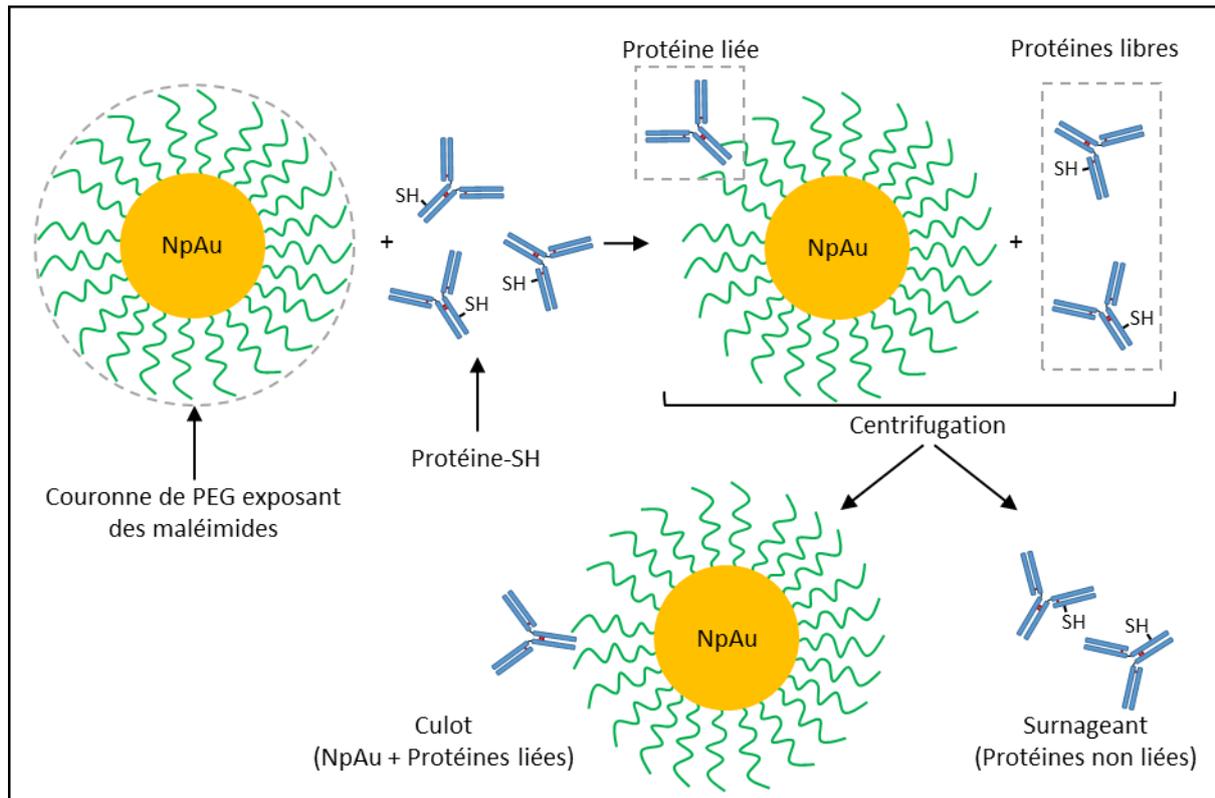
**Figure 35 : Etude de la formation de ponts disulfures entre des Ac-SH au cours du temps, par CET.** (A) Anticorps non thiolé jouant le rôle de référence. (B) Anticorps thiolé exposant en moyenne 1 thiol par molécule. (C) Anticorps thiolé exposant en moyenne 3 thiols par molécule. (B,C) Les courbes bleues correspondent à une mesure le jour de la thiolation. Les courbes orange correspondent à une mesure une semaine après la thiolation.

#### 1.1.6.6. Conditions de thiolation recommandées pour les anticorps

L'influence des différents paramètres de thiolation de l'AnxA5 a permis de déterminer la valeur de thiolation moyenne de la protéine ainsi que la répartition statistique des thiols réactifs à la surface des anticorps en fonction de ces paramètres. Dans l'optique de produire des molécules d'anticorps exposant environ un thiol réactif, les conditions suivantes sont recommandées : rapport Traut/anticorps = 100, concentration en anticorps = 1 mg/mL et temps de réaction = 20 minutes. Ces conditions permettent de limiter l'agrégation des anticorps par formation de ponts disulfures, au détriment de la proportion d'anticorps modifiés. Les anticorps thiolés utilisés dans le chapitre suivant pour la conjugaison à des nanoparticules d'or ont été modifiés en utilisant ces conditions de réaction.

#### 1.2. Conjugaison d'anticorps thiolés à des nanoparticules d'or exposant des maléimides et caractérisation biochimique de leur liaison

Des anticorps anti-CD235a ont été modifiés par du réactif de Traut afin d'exposer environ un thiol réactif, en utilisant un rapport réactif de Traut/Ac égal à 100, une concentration en anticorps de 1 mg/mL et un temps de réaction de 20 minutes. Ces Ac-SH ont ensuite été incubés avec des NpAu-Mal, dans des rapports Ac-SH/NpAu-Mal compris entre 1 et 20. Après incubation, les Ac-SH n'ayant pas réagi avec les maléimides des NpAu-Mal sont éliminés par plusieurs centrifugations successives à l'issue desquelles les NpAu-Ac purifiées (culot) et les Ac-SH non liés (surnageant) sont séparés (**figure 36**). Le protocole complet de synthèse de NpAu-Mal et leur conjugaison à des Ac-SH est décrit dans la section 6 du chapitre « Matériels et Méthodes ». La liaison des Ac-SH aux NpAu-Mal a été caractérisée quantitativement afin de valider le protocole de conjugaison d'anticorps aux nanoparticules d'or. Les quantités d'anticorps couplés aux NpAu et d'anticorps libres ont été quantifiées par SDS-PAGE et le caractère spécifique de la liaison entre Ac-SH et NpAu-Mal a été validé.

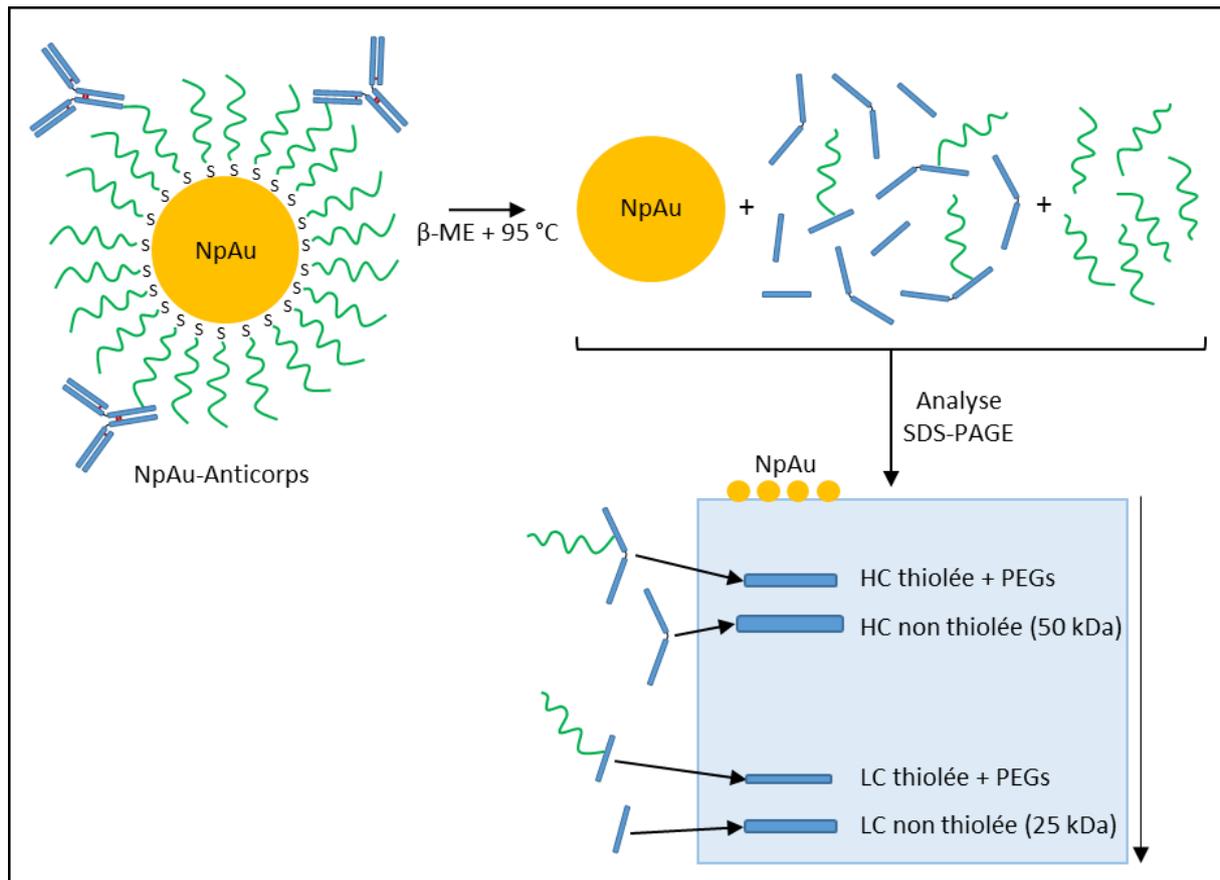


**Figure 36 : Etapes de conjugaison des Ac-SH aux NpAu-Mal et de séparation par centrifugation des NpAu-Ac et des Ac-SH non liés.**

### 1.2.1. Quantification des Ac-SH conjugués aux NpAu-Mal

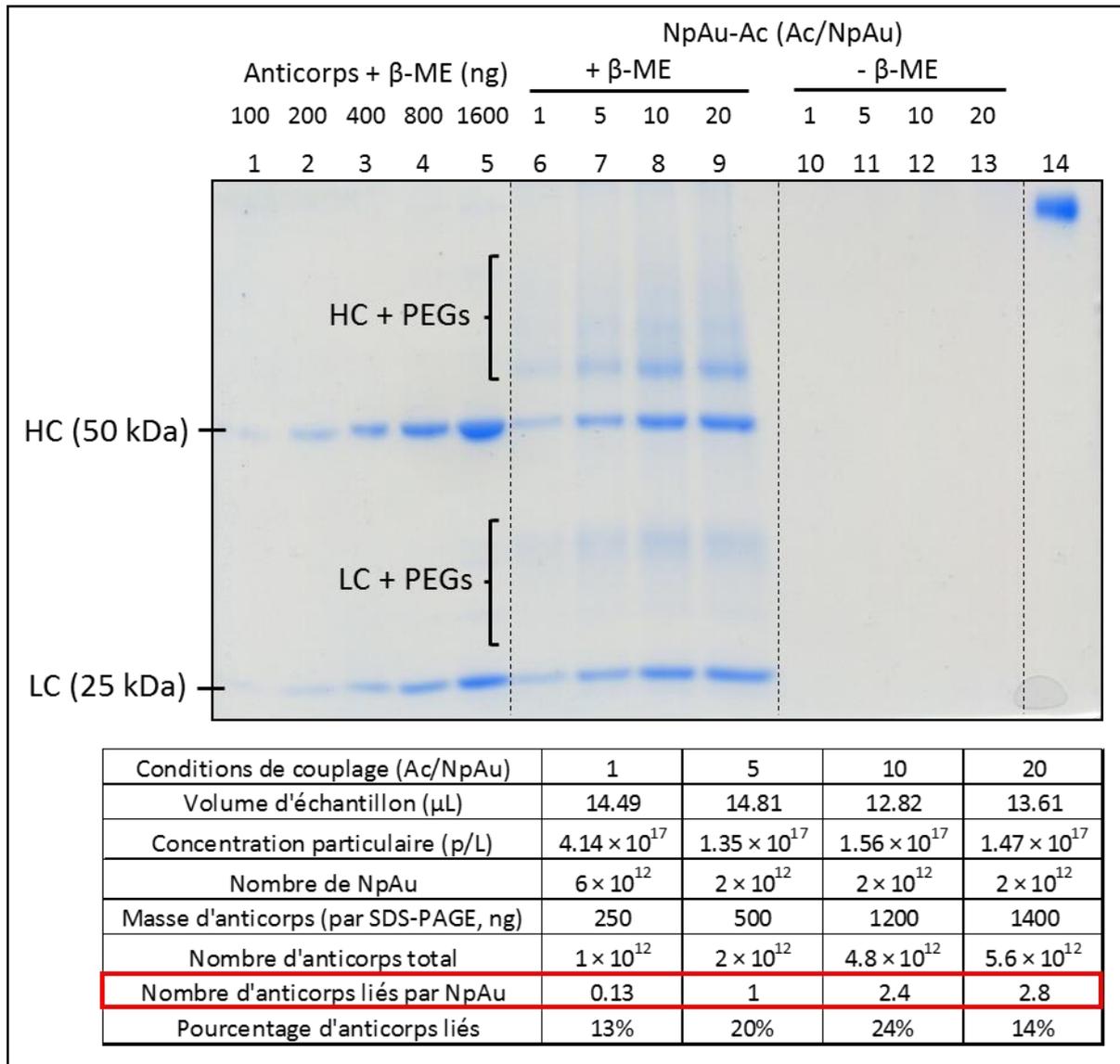
Afin de quantifier les anticorps liés aux NpAu-Mal, nous avons analysé des NpAu-Ac purifiées par SDS-PAGE. Les NpAu-Ac sont préalablement incubées avec du  $\beta$ -ME et chauffées à 95 °C pendant 10 minutes. Ce traitement réducteur réduit les ponts disulfures des anticorps mais permet également de couper la liaison entre les atomes d'or de la nanoparticule et les atomes de soufre du SH-PEG-NH<sub>2</sub>, La liaison or-soufre étant clivable en conditions réductrices. Cette caractéristique permet de décrocher la couronne de PEGs des nanoparticules, et par conséquent les anticorps préalablement conjugués à ces PEGs. Les échantillons ainsi traités sont ensuite déposés sur le gel d'électrophorèse. Les nanoparticules, qui sont trop volumineuses et électriquement neutres, ne pénètrent pas dans le gel et restent dans le puits où a été déposé l'échantillon. A l'inverse, les anticorps dénaturés et décrochés des nanoparticules migrent dans le gel de façon classique. Il faut cependant tenir compte du fait qu'une partie des chaînes lourdes et/ou légères des anticorps sont couplées aux molécules de PEG décrochées des NpAu car le traitement réducteur ne coupe que la liaison or-soufre.

Comme pour les expériences de quantification de la thiolation de protéines par SDS-PAGE + PEG, la présence de molécules de PEG couplées à une chaîne d'un anticorps entraîne un retard de migration sur le gel et l'apparition d'une seconde bande protéique distincte. Deux bandes sont donc observées pour la chaîne lourde (HC et HC + PEGs) et pour la chaîne légère (LC et LC + PEGs). Les molécules de PEG seules ne sont pas visibles sur le gel. Ce principe est résumé en **figure 37**.



**Figure 37 : Principe de la méthode de quantification des Ac-SH conjugués aux nanoparticules d'or après traitement réducteur, par SDS-PAGE.**

Les bandes protéiques sont ensuite quantifiées par estimation visuelle de leur intensité et comparaison avec une gamme d'anticorps de concentration connue. D'après la quantité de NpAu-Ac déposées dans le puits, il est possible de calculer le nombre de molécules d'anticorps couplées par nanoparticule. La **figure 38** présente le résultat d'une expérience de quantification des anticorps conjugués à des NpAu-Ac.



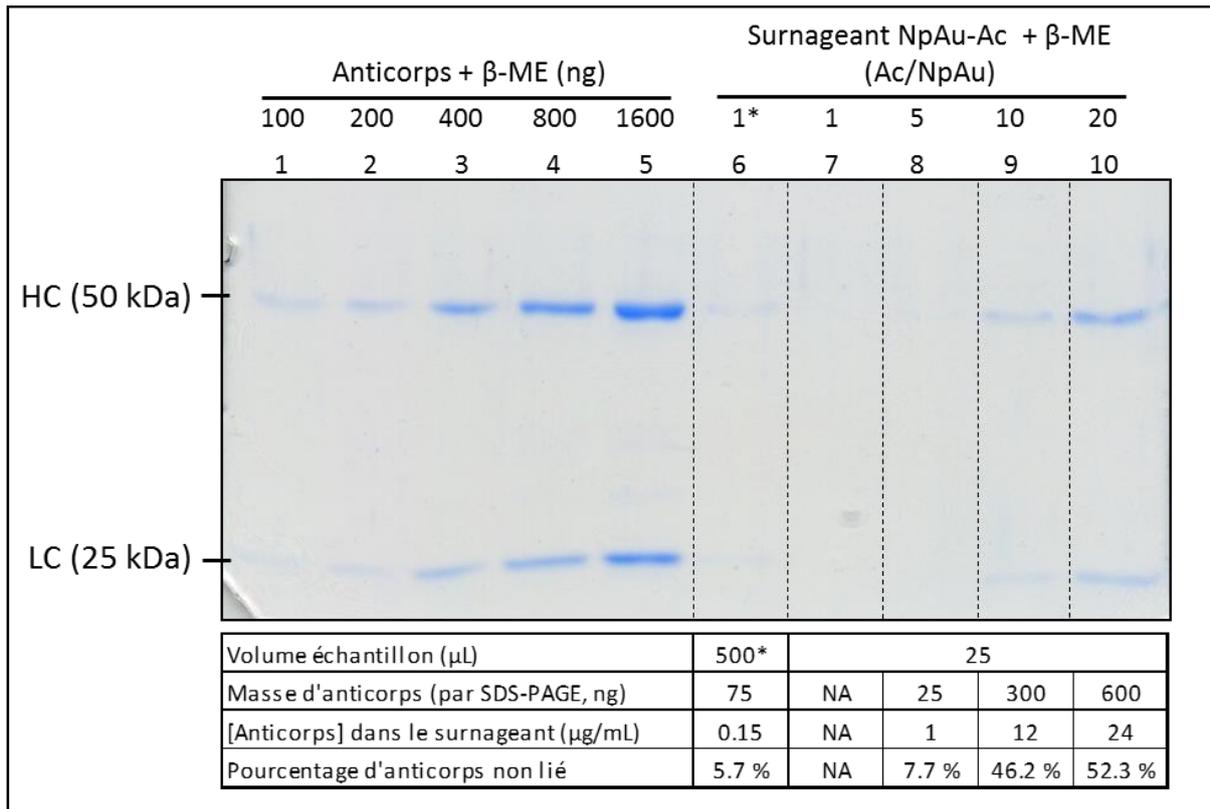
**Figure 38 : Quantification des anticorps liés à des NpAu-Ac, par SDS-PAGE.** Les puits 1 à 5 contiennent une gamme de quantités d'anticorps dénaturés comprise entre 100 et 1600 ng. Les puits 6 à 9 contiennent les échantillons de NpAu-Ac ayant subi un traitement réducteur. Les valeurs 1/5/10/20 indiquent le rapport Ac-SH/NpAu-Mal utilisé lors du couplage. Les puits 10 à 13 contiennent les mêmes échantillons de NpAu-Ac mais n'ayant pas subi de traitement réducteur et servent de contrôle négatif. Le puits 14 contient un anticorps n'ayant pas subi de traitement réducteur. Le tableau sous l'image du gel d'électrophorèse récapitule les conditions expérimentales et indique notamment le nombre d'anticorps liés par nanoparticule pour les quatre conditions de couplage (encadré rouge). L'anticorps utilisé est un anticorps anti-CD235a

Deux bandes protéiques sont visibles dans chaque puits de la gamme d'anticorps (puits 1 à 5), correspondant à la chaîne lourde (HC, 50 kDa) et à la chaîne légère (LC, 25 kDa). Nous utiliserons seulement les bandes correspondant aux chaînes lourdes pour la quantification des anticorps car elles sont plus intenses et permettent un résultat plus précis. Les puits 6 à 9 contiennent les échantillons de NpAu-Ac après traitement réducteur et présentent chacun quatre bandes. Elles correspondent, de haut en bas, à la chaîne lourde + PEGs, à la chaîne lourde, à la chaîne légère + PEGs et à la chaîne légère. Le nombre d'anticorps conjugués par nanoparticule déterminé par quantification des bandes du gel est respectivement de 0.13/1/2.4/2.8 Ac par NpAu pour des conditions de couplage correspondant à 1/5/10/20 anticorps incubés par NpAu-Mal. Un rapport Ac/NpAu de 1 ne permet pas de produire des NpAu-Ac utilisables en MET car statistiquement, seulement 13 % des nanoparticules sont conjuguées à un anticorps. Un rapport Ac/NpAu de 5 permet d'obtenir des NpAu-Ac exposant en moyenne un anticorps. Il est cependant probable qu'une petite fraction des nanoparticules ne soit conjuguée à aucun anticorps ou, à l'inverse, à plusieurs anticorps. Les deux dernières conditions permettent d'obtenir des NpAu-Ac conjuguées respectivement à 2.4 et 2.8 anticorps. La quasi-totalité des NpAu-Ac exposent donc probablement au moins un anticorps. Une saturation de la liaison semble être observée à partir du rapport Ac/NpAu égal à 10, la quantité d'Ac-SH liés évoluant peu pour un rapport Ac/NpAu égal à 20. La taille d'un anticorps est de l'ordre de 10 nm (Reth, 2013), ce qui est similaire à la taille des nanoparticules utilisées dans l'étude, il est donc probable que des phénomènes de gêne stérique empêchent la liaison de nouvelles molécules d'anticorps aux NpAu-Mal une fois que quelques protéines y sont déjà conjuguées. Il serait intéressant de tester des rapports Ac-SH/NpAu supérieurs 20 afin de déterminer le nombre maximal d'anticorps pouvant être conjugués par NpAu, mais de telles conditions consomment des quantités d'anticorps supérieures au milligramme et n'ont donc pas été testées. L'expérience effectuée avec des rapports Ac/NpAu compris entre 1 et 20 semble cependant indiquer que le nombre maximum d'anticorps conjuguables par nanoparticule est proche de 3, ce qui est cohérent avec les tailles de 10 nm des nanoparticules et des anticorps. Il serait également intéressant d'évaluer l'avidité des NpAu-Ac pour leur cible en fonction de la quantité d'anticorps couplée. Ces expériences seront réalisées dans les semaines à venir et figureront dans la version finale de ce manuscrit. Nous avons choisi d'utiliser un rapport Ac/NpAu de 5 pour la conjugaison des NpAu-Ac utilisées ultérieurement dans cette étude. Cette condition permet d'obtenir des nanoparticules conjuguées en

moyenne à une molécule d'anticorps, ce qui est un bon compromis entre quantité d'anticorps consommée durant la conjugaison et efficacité de marquage en MET. Les NpAu-Ac ainsi produites ont été utilisées dans la seconde section du chapitre « Résultats et discussions » à des fins d'immunomarquage de VEs par MET.

### 1.2.2. Quantification des Ac-SH non conjugués aux NpAu-Mal

Parallèlement à la détermination de la quantité d'anticorps conjuguée aux NpAu-Ac, nous avons déterminé la quantité d'anticorps non liés, n'ayant pas réagi avec les maléimides des NpAu-Mal. Nous avons pour cela quantifié les anticorps contenus dans le surnageant issu du premier cycle de centrifugation de l'étape visant à séparer les NpAu-Ac et les anticorps non liés. Les concentrations en protéines étant faibles, la quantification des anticorps ne peut être réalisée par lecture de la DO à 280 nm et a donc été déterminée par SDS-PAGE. Lors de l'étape de centrifugation, le volume d'échantillon total est de 4 mL. Après centrifugation, 3.8 mL de surnageant sont récupérés, ce qui signifie que ce premier surnageant de centrifugation contient 95 % de l'anticorps non lié. Un léger facteur correctif est donc appliqué aux valeurs obtenues par SDS PAGE pour obtenir la quantité réelle d'anticorps non liés. Les Ac-SH sont soumis à un traitement réducteur puis déposés sur gel de polyacrylamide. Après dénaturation, les Ac-SH migrent sous la forme de chaînes lourdes et de chaînes légères. La quantification des bandes protéiques est effectuée par estimation visuelle de l'intensité des bandes et comparaison avec une gamme d'anticorps de concentration connue. La **figure 39** présente le résultat d'une expérience de quantification des Ac-SH non conjugués aux NpAu-Ac, présents dans le premier surnageant de centrifugation.



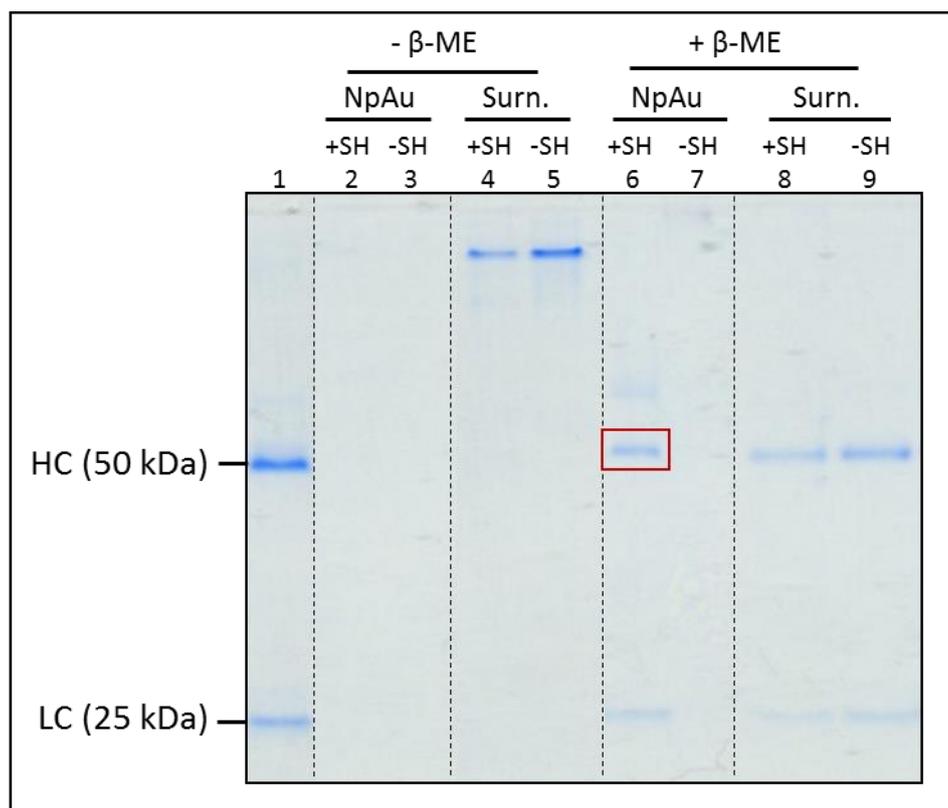
**Figure 39 : Quantification des anticorps non liés aux NpAu-Ac.** Les puits 1 à 5 contiennent une gamme d'anticorps comprise entre 100 et 1600 ng, et ayant subi un traitement réducteur. Les puits 6 à 10 contiennent les surnageants issus de la première étape de centrifugation visant à séparer les NpAu-anti-CD235a et les anticorps non liés. Ces surnageants ont subi un traitement réducteur. Les valeurs 1\*/1/5/10/20 indiquent le rapport Ac-SH/NpAu-Mal utilisé lors du couplage. L'astérisque signale un échantillon ayant été concentré 20 fois avant son dépôt dans le gel. Le volume équivalent déposé est donc 20 fois supérieur à celui des autres puits. Le tableau sous l'image du gel d'électrophorèse récapitule les conditions expérimentales. L'anticorps utilisé est un anticorps anti-CD235a

Dans le cas du rapport Ac/NpAu de 1 (puits 7), la concentration en anticorps dans le surnageant est trop faible pour être détectée par SDS-PAGE, dont le seuil de détection est compris entre 50 et 100 ng. L'échantillon a donc été concentré 20 fois par microcon (puits 6). Après quantification, nous estimons qu'il reste environ 5 % de la quantité d'anticorps initialement incubée dans ce surnageant. Pour les rapports Ac/NpAu de 5, 10 et 20, cette proportion d'anticorps non liés est respectivement de 7.7 %, 46.2 % et 52.3 % de la quantité initialement incubée. En additionnant ce pourcentage d'anticorps non conjugués au pourcentage d'anticorps conjugués déterminé précédemment, les pourcentages obtenus sont

respectivement de 17.7 %, 27 %, 70.2 % et 66.3 %. Ces totaux devraient théoriquement valoir 100 % mais il est probable qu'une proportion variable des anticorps non conjugués soit perdue lors des étapes de centrifugation et de lavage, par exemple par adsorption sur les parois des tubes. Le phénomène semble d'autant plus marqué que la quantité d'anticorps incubée est faible, ce qui est cohérent avec cette explication. La quantification des anticorps non conjugués présents dans le premier surnageant de centrifugation ne semble pas adaptée et la quantification directe des anticorps conjugués apparaît plus fiable.

### 1.2.3. Validation de la spécificité de la conjugaison entre les NpAu-Mal et les Ac-SH

Nous avons validé la spécificité du couplage entre les NpAu-Mal et les Ac-SH en réalisant deux types de contrôles négatifs. Le premier contrôle négatif vise à démontrer la nécessité des thiols portés par les Ac-SH pour effectuer la conjugaison aux NpAu-Mal. Deux expériences de conjugaison d'anticorps à des NpAu-Mal ont été effectuées, avec des anticorps thiolés dans un cas et des anticorps non thiolés dans l'autre, les anticorps non thiolés étant théoriquement incapables de réagir avec les maléimides portés par les NpAu-Mal. Après incubation, les nanoparticules sont séparées des anticorps non liés par ultracentrifugation comme présenté en **figure 35** puis ces deux fractions sont analysées par SDS-PAGE afin de détecter la présence d'anticorps liés aux nanoparticules et d'anticorps non liés dans le surnageant de centrifugation. La **figure 40** présente le résultat de cette expérience. L'analyse des puits contenant les nanoparticules révèle qu'en absence de traitement réducteur (puits 2-3), aucune bande protéique n'est observée sur le gel que ce soit dans le cas des anticorps thiolés ou non. Ce résultat est attendu car les éventuels anticorps liés aux NpAu ne peuvent migrer dans le gel qu'après avoir été décrochés par un traitement réducteur. Dans le cas des échantillons réduits (puits 6-7), une bande correspondant à la présence d'anticorps est observée dans le cas des NpAu incubées avec les Ac-SH, contrairement aux nanoparticules incubées avec des anticorps non thiolés. C'est la preuve que seuls les anticorps thiolés sont capables de réagir avec les maléimides exposés par les nanoparticules. L'analyse des puits contenant les surnageants (4-5 et 8-9) révèle que la quantité d'anticorps non liés est environ deux fois plus importante dans le cas des anticorps non thiolés comparé aux Ac-SH, ce qui étaye le résultat précédent. Ces résultats valident la nécessité de la présence de thiols à la surface des anticorps pour leur conjugaison aux NpAu-Mal.



**Figure 40 : Validation de la nécessité de la présence de thiols à la surface des anticorps pour leur conjugaison à des NpAu-Mal, par SDS-PAGE.** Le puits 1 contient de l'anticorps ayant subi un traitement réducteur. Les puits 2 à 5 contiennent des échantillons non réduits, avec les NpAu-Ac en positions 2-3 et le surnageant de centrifugation en positions 4-5. Les puits 6 à 9 contiennent les mêmes échantillons mais ayant subi un traitement réducteur, avec les NpAu-Ac en positions 6-7 et le surnageant de centrifugation en positions 8 et 9. Les sigles « +SH » et « -SH » indiquent si les anticorps ont été thiolés ou non.

Une expérience similaire a été réalisée afin de démontrer la nécessité de la présence de maléimides portés par les NpAu-Mal pour la conjugaison d'Ac-SH. Deux expériences de conjugaison d'anticorps thiolés à des NpAu-Mal ont été effectuées mais dans l'une des expériences, les maléimides sont préalablement inactivés. Les Ac-SH ne peuvent donc théoriquement pas être conjugués en l'absence de maléimides. Seules les nanoparticules présentant des maléimides fonctionnels ont pu être conjuguées aux Ac-SH (données non présentées), validant la nécessité de la présence de maléimides à la surface des NpAu-Mal pour la conjugaison des Ac-SH. Ces deux expériences démontrent l'absence de conjugaison

d'anticorps aux nanoparticules lorsque les thiols ou les maléimides sont absents et valident ainsi la spécificité du couplage entre Ac-SH et NpAu-Mal.

### 1.3. Conclusion

Nous avons étudié la thiolation des protéines par le réactif de Traut, à l'aide de deux méthodes indépendantes : le dosage d'Ellman et une méthode de SDS-PAGE après couplage de molécules de PEG-Mal aux protéines thiolées. L'AnxA5 a été utilisée comme protéine modèle et a permis d'étudier l'influence sur la thiolation de la quantité de réactif de Traut, de la concentration en protéines et du temps de réaction. La thiolation d'anticorps a ensuite été étudiée de manière similaire à la thiolation de l'AnxA5 et les conditions permettant l'exposition d'une moyenne d'un thiol réactif par anticorps ont été déterminées. Ces conditions sont les suivantes : un rapport réactif de Traut/anticorps égal à 100, une concentration en anticorps de 1 mg/mL et un temps de réaction de 20 minutes. Nous avons ensuite montré par CET qu'une thiolation importante des anticorps favorisait leur oligomérisation par le biais de ponts disulfures, justifiant l'utilisation de conditions de thiolation résultant en l'exposition d'un thiol réactif par anticorps en moyenne. Des anticorps thiolés ont ensuite été conjugués à des NpAu exposant des maléimides la liaison des anticorps aux NpAu a été caractérisée de manière quantitative, par SDS-PAGE. Des conditions de conjugaison permettant d'obtenir des NpAu-Ac conjuguées en moyenne à un anticorps ont été déterminées. Ces NpAu-Ac seront utilisées ultérieurement pour l'immunomarquage de VEs en MET.

## **2. Le catalogue des vésicules extracellulaires du plasma sanguin, déterminé par microscopie électronique à transmission**

Le plasma sanguin, comme les autres fluides biologiques, contient des vésicules extracellulaires. Bien que ces VEs aient été largement étudiées par de nombreuses équipes et à l'aide de méthodes variées, des interrogations majeures subsistent à leur sujet. A quoi ressemblent-elles ? Quelle est leur morphologie ? Quelle est leur taille ? Quelle proportion d'entre elles expose la PS ? Quelle est leur origine cellulaire et quelles molécules exposent-elles à leur surface ? Quelle est leur concentration dans le plasma d'un sujet sain ? Dans l'optique d'utiliser les VEs du plasma sanguin comme biomarqueur de pathologies, il est nécessaire de répondre à ces questions fondamentales, qui restent sans réponse jusqu'aujourd'hui. Caractériser ces VEs chez le sujet sain est une étape importante afin de pouvoir identifier les éventuelles différences avec les VEs contenues dans le plasma d'une personne malade. Une importante partie de ces trois années de thèse a ainsi été consacrée à l'élaboration d'un catalogue des vésicules extracellulaires du plasma sanguin de sujets sains.

Nous avons utilisé pour cela différentes techniques de microscopie électronique à transmission, dont la cryo-MET. Les méthodes de MET sont relativement peu utilisées pour la caractérisation des VEs, en comparaison d'autres techniques comme la CF ou le NTA. La MET n'a pourtant pas d'équivalent lorsqu'il s'agit d'imager et de caractériser ces petits objets membranaires que sont les VEs. Et comme nous aimons le répéter au laboratoire, « voir, c'est croire » ! Ces techniques de MET ont été combinées à de l'immunomarquage par des nanoparticules d'or conjuguées à des protéines (NpAu-Protéine), utilisées pour marquer spécifiquement les VEs.

La préparation des échantillons de cryo-MET et l'acquisition des images de la section 2.1 ont été réalisées conjointement par Sisareuth Tan (Assistant ingénieur en microscopie électronique, CNRS, UMR-CBMN) et moi-même.

Par souci de simplicité et sauf exception signalée, le terme « VEs » sera utilisé dans la section « Le catalogue des vésicules extracellulaires du plasma sanguin, déterminé par microscopie électronique à transmission » pour désigner les vésicules extracellulaires contenues dans le

plasma sanguin. De même, le terme « plasma » sera utilisé pour désigner le PFP (plasma dépourvu de plaquettes).

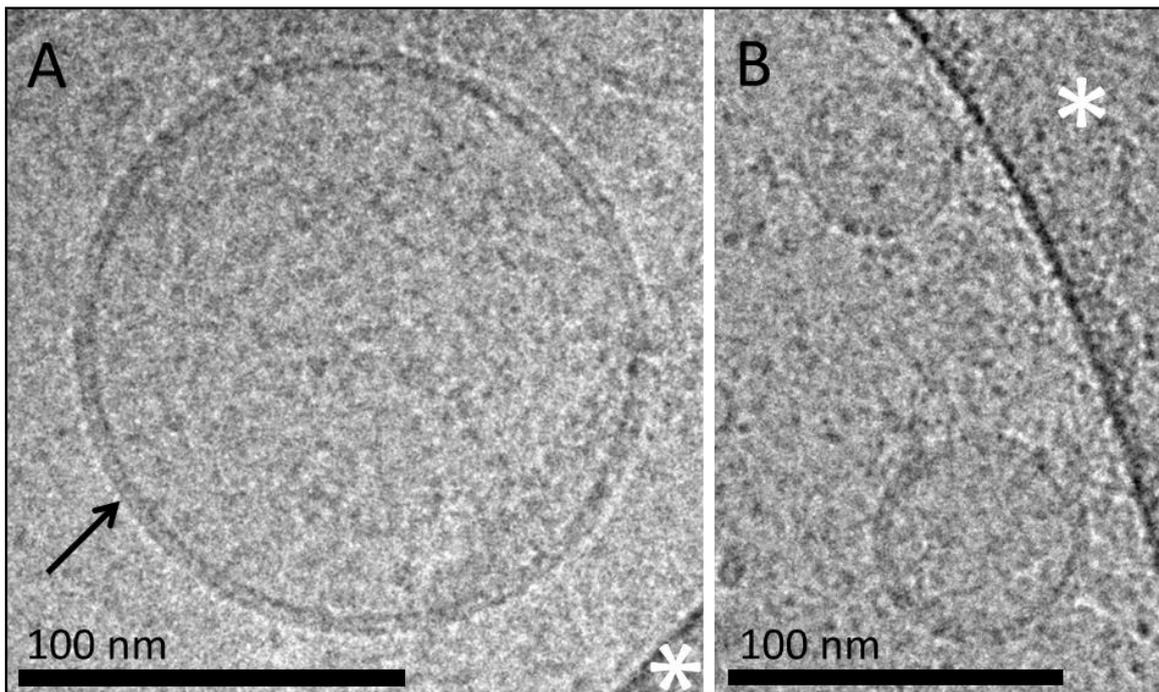
Une partie des résultats présentés dans cette section a été publiée et les deux articles concernés sont présentés en annexe (Arraud et al., 2014a, 2014b).

## 2.1. Caractérisation des VEs par cryo-MET et immunomarquage par des nanoparticules d'or conjuguées à des protéines

La cryo-MET est une méthode de choix pour l'étude des VEs, permettant d'imager ces objets membranaires dans leur état quasi-natif et hydraté. A l'inverse de beaucoup d'autres techniques de MET, elle n'implique aucune étape de séchage, de fixation, de coloration ou de coupe. Elle autorise de plus l'observation d'échantillons de plasma pur et non traité, permettant d'éviter les artefacts liés aux techniques de préparation et de purification des VEs présentées dans l'introduction. Cette section traitera de la caractérisation morphologique des VEs issues du plasma de sujets sains et de leur phénotypage par immunomarquage avec des NpAu-Protéine.

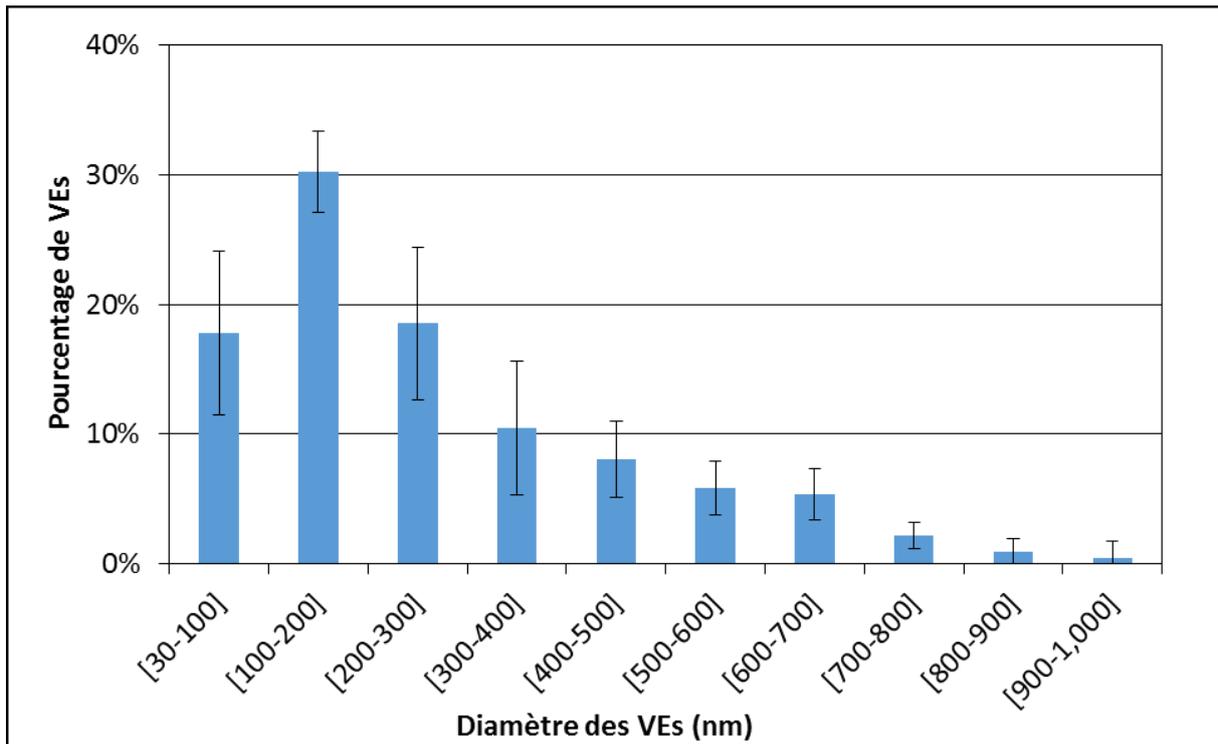
### 2.1.1. Morphologie, taille et diversité des VEs

Nous nous sommes d'abord intéressés à la morphologie et à la taille des VEs. Du plasma pur et non traité a simplement été déposé sur une grille de cryo-MET, l'excédent de liquide a été drainé avec un papier filtre et la grille a été plongée rapidement dans de l'éthane liquide refroidi par de l'azote liquide, avant d'être observée à basse température avec un cryo-microscope électronique à transmission. Grâce à la cryo-MET, nous avons mis en évidence trois morphologies de VEs différentes. La première morphologie correspond à des VEs de forme sphérique, dont trois exemples sont présentés en **figure 41**. Cette morphologie sphérique se traduit par une forme circulaire sur les images de cryo-MET, celles-ci étant le résultat de la projection bidimensionnelle d'un objet en trois dimensions. Les VEs sphériques sont délimitées par une bicouche lipidique, caractérisée en cryo-MET par deux fines lignes sombres espacées d'environ 4 nm. Cette caractéristique permet d'affirmer avec certitude la nature membranaire des VEs. Les VEs sphériques représentent environ la moitié des VEs d'un échantillon de plasma observé par cryo-MET.



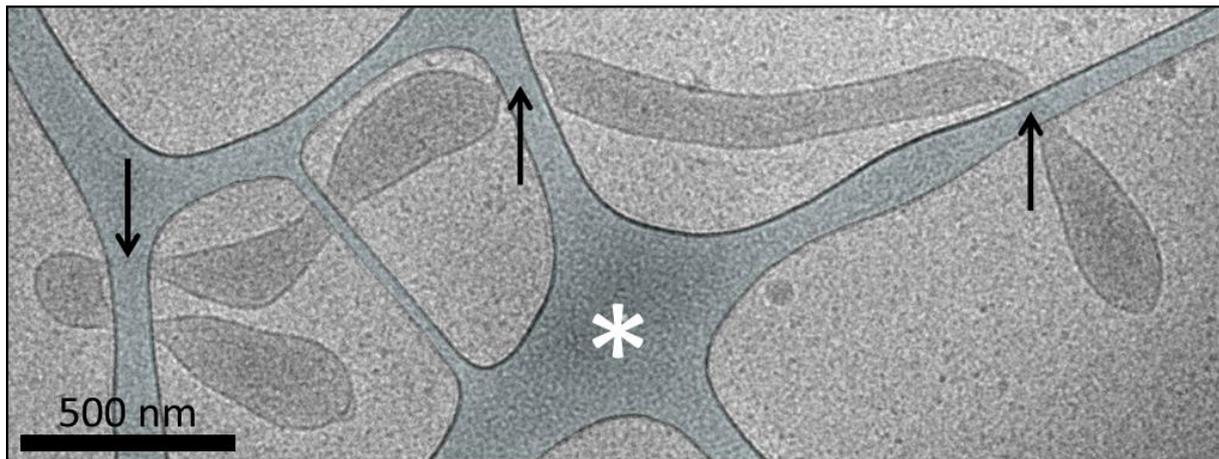
**Figure 41 : Images de cryo-MET présentant des VEs de morphologie sphérique.** Le film de carbone perforé de la grille de cryo-MET est visible sur ces deux images et est indiqué par un astérisque blanc. Les VEs sont enrobées dans une fine couche de plasma congelé, qui donne un aspect granuleux aux images à cause de sa forte concentration en protéines (60 mg/mL) et en sels. Ces VEs mesurent respectivement 150 nm (A), 45 nm et 60 nm (B) de diamètre et sont caractérisées par la présence d'une bicouche lipidique (A, flèche noire).

Le diamètre des VEs sphériques a été mesuré et un histogramme de taille a été établi, présenté en **figure 42**. Leur diamètre est compris entre 30 nm et 1  $\mu$ m, mais plus de 80% d'entre elles mesurent entre 50 et 500 nm. Nous n'avons observé aucune VE sphérique d'une taille inférieure à 30 nm. Ce résultat est attendu car la courbure de la membrane lipidique limite physiquement le diamètre minimum de toute vésicule à environ 25 nm (Reineccius, 1995).



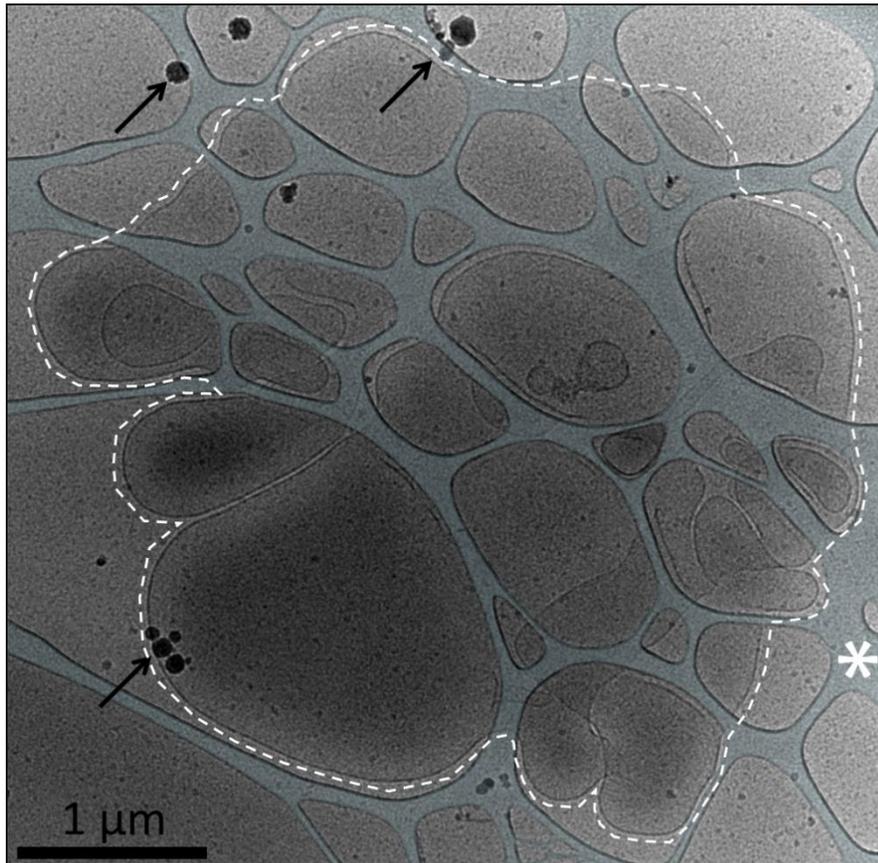
**Figure 42 : Histogramme de taille des VEs sphériques observées par cryo-MET.** Cet histogramme est établi à partir de 300 images de VEs sphériques provenant de 30 grilles indépendantes, préparées à partir de 15 échantillons de plasma différents. L'analyse des grilles de cryo-MET est réalisée de la façon suivante : les grilles sont scannées une première fois à faible grossissement ( $\times 300$ ) afin de détecter les plus grosses VEs, puis une seconde fois à fort grossissement ( $\times 5000$ ) pour la détection des objets de taille submicrométrique. Les images obtenues ont été réparties aléatoirement en trois jeux de données et un histogramme de taille a été établi à partir de chacun d'entre eux. Les barres d'erreurs correspondent à l'écart-type entre ces trois histogrammes

Les VEs tubulaires sont le deuxième type de VEs observées et constituent également environ la moitié des VEs détectées par cryo-MET. La **figure 43** présente un exemple de VE tubulaire. Le terme de vésicule tubulaire désigne dans cette étude les VEs présentant un rapport longueur/largeur supérieur à 5. La longueur de ces VEs tubulaires est comprise entre 500 nm et plus de 10  $\mu\text{m}$ , avec une taille moyenne de  $2.2 \pm 1.3 \mu\text{m}$ . Leur largeur est comprise entre 40 et 500 nm. La présence systématique d'une bicouche lipidique, non visible sur l'image présentée, confirme la nature membranaire de ces objets. Bien que présent en quantités non négligeables dans chacun des échantillons de plasma que nous avons analysés, ce type de VEs n'a jamais été décrit auparavant.



**Figure 43 : Image de cryo-MET présentant une VE tubulaire.** Le film de carbone perforé est coloré en bleu pâle afin de mieux le distinguer de la VE tubulaire et est indiqué par un astérisque blanc. Le tube mesure 3.7  $\mu\text{m}$  de long pour une largeur moyenne d'environ 150 nm. Il est suspendu sur le film de carbone et on peut constater une légère déformation de la vésicule au niveau des points de contact avec le film (flèches noires), ce qui est attendu dans le cas d'un objet souple comme une vésicule membranaire.

Nous avons observé une troisième morphologie de VEs, regroupant des objets de taille comprise entre 1  $\mu\text{m}$  et 8  $\mu\text{m}$  et n'étant ni sphériques ni tubulaires. Ces VEs sont appelées grands fragments membranaires et représentent environ 10% des VEs observées par cryo-MET. La **figure 44** présente un exemple de VE appartenant à cette catégorie des grands fragments membranaires. A l'instar des vésicules tubulaires, ces grands fragments membranaires n'ont jamais été décrits précédemment, bien qu'ils soient retrouvés dans l'intégralité des plasmas que nous avons analysés. La présence d'objets membranaires de taille micrométrique dans le plasma est inattendue, compte tenu du fait que la préparation du plasma inclut deux cycles de centrifugation à 2500 g, censés éliminer l'intégralité des objets de grande taille. Malgré l'hétérogénéité en termes de forme, de taille et d'aspect de ces grands fragments membranaires, environ 30% d'entre eux sont très similaires à l'objet présenté en **figure 44**, mesurant tous de 6 à 8  $\mu\text{m}$  et présentant une forme arrondie caractéristique.



**Figure 44 : Image de cryo-MET d'un grand fragment membranaire.** Il possède une forme arrondie et mesure environ  $6.5 \mu\text{m} \times 7.5 \mu\text{m}$ . Le fragment est délimité par une ligne pointillée blanche. Le film de carbone perforé est coloré en bleu pâle afin de mieux le distinguer de l'objet d'intérêt et est indiqué par un astérisque blanc. Les flèches noires pointent des particules de contaminants.

Ainsi, et contrairement à leur image d'Epinal, les VEs ne sont pas uniquement des vésicules sphériques de taille submicrométrique et présentent au contraire une grande variété de morphologies et de tailles. Un plasma observé par cryo-MET contient  $50 \pm 25\%$  de VEs sphériques,  $50 \pm 25\%$  de VEs tubulaires et  $10 \pm 5\%$  de grands fragments membranaires. Ces proportions ont été calculées sur la base de 500 VEs, provenant de 50 échantillons de plasma différents. L'importante variabilité de ces valeurs est due au faible nombre de VEs observées pour chaque échantillon de plasma. Il est très important de noter que ces valeurs ne sont exactes que dans le cas d'un plasma observé par cryo-MET. La composition en VEs du plasma sera à nouveau abordée ultérieurement. Il existe également des VEs atypiques, observées en nombre restreint ou même en une unique occasion, et que nous aimons appeler « moutons à cinq pattes ». Bien que certaines de ces VEs puissent parfois être classées dans l'une des trois grandes catégories présentées précédemment, elles se distinguent par des caractéristiques

uniques comme une structure ou un aspect particulier. Une sélection non exhaustive de ces VEs est présentée dans l'**annexe 2**.

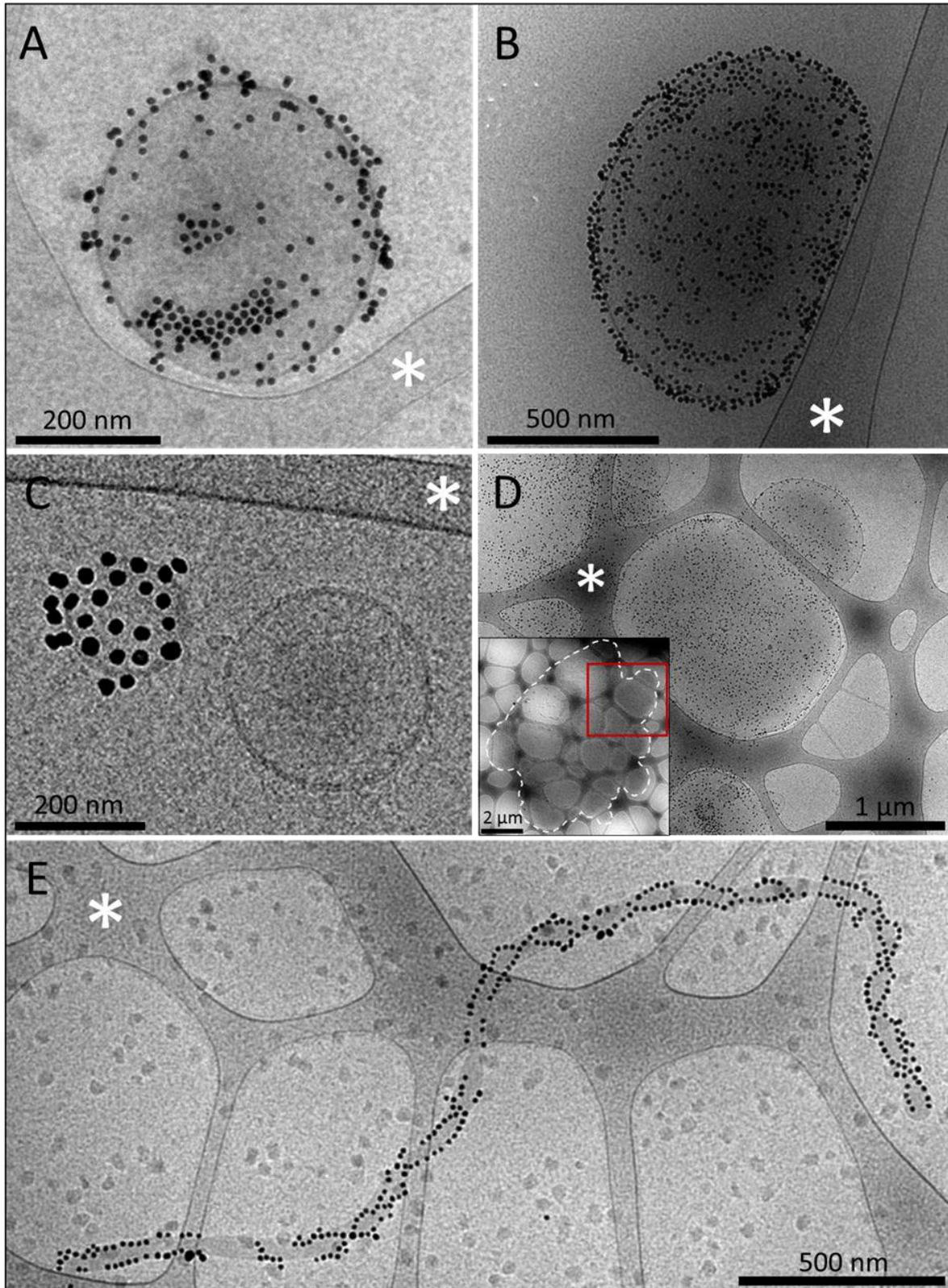
Des plaquettes sanguines résiduelles sont parfois observées dans le plasma, en de très rares occasions, dont un exemple est présenté dans l'**annexe 3**. Ces plaquettes ne présentent pas de pseudopodes et leurs organelles sont distribuées de manière homogène, ce qui est caractéristique de plaquettes non activées (Morgenstern, 1997; White, 2007). Ceci indique que les procédures de collecte du sang, de préparation du plasma et de congélation de l'échantillon pour la cryo-MET n'induisent pas d'activation plaquettaire. Ce point est capital afin de s'assurer que les VEs observées dans le plasma y sont nativement présentes et n'ont pas été émises par ces rares plaquettes résiduelles.

Le plasma contient également une dernière classe d'objets non vésiculaires mesurant entre 10 et 50 nm (images non présentées). Bien que nous n'ayons pu les caractériser avec certitude, ces particules sont vraisemblablement des complexes lipoprotéiques.

### **2.1.2. Identification de VEs exposant la phosphatidylsérine à l'aide de NpAu-AnxA5**

Nous nous sommes ensuite intéressés aux molécules exposées à la surface des VEs, en nous focalisant dans un premier temps sur la phosphatidylsérine (PS). La PS est un acteur majeur du mécanisme de formation de certaines VEs selon le modèle proposé par Zwaal et Schroit (Zwaal and Schroit, 1997), qui est aujourd'hui encore le modèle le plus communément admis. De nombreuses études considèrent également que la majorité, voire la totalité des VEs, exposent la PS (Biró et al., 2003; György et al., 2011a; Lacroix et al., 2012; Morel et al., 2011). De plus, la PS est un lipide procoagulant, ce qui signifie que son exposition à la surface de VEs pourrait être impliquée dans la régulation de l'hémostase ou dans les désordres thrombotiques observés dans certains cas de cancers ou de maladies cardiovasculaires (Lentz, 2003). Afin d'étudier les VEs exposant la PS, des nanoparticules d'or conjuguées covalamment à l'annexine-A5 (NpAu-AnxA5) ont été synthétisées (*cf.* Matériels et méthodes 6). L'AnxA5 est une protéine se liant aux lipides négativement chargés comme la PS, de manière calcium-dépendante et avec une très forte affinité (Tait et al., 2004). Le mode de préparation et d'observation des échantillons pour la cryo-MET est identique à ce qui a été présenté pour

l'étude de la morphologie des VEs, à la différence que le plasma est incubé avec des NpAu-AnxA5, du PPACK et du CaCl<sub>2</sub> avant d'être congelé. La **figure 45** présente une sélection d'images de VEs après marquage par des NpAu-AnxA5, observées par cryo-MET.

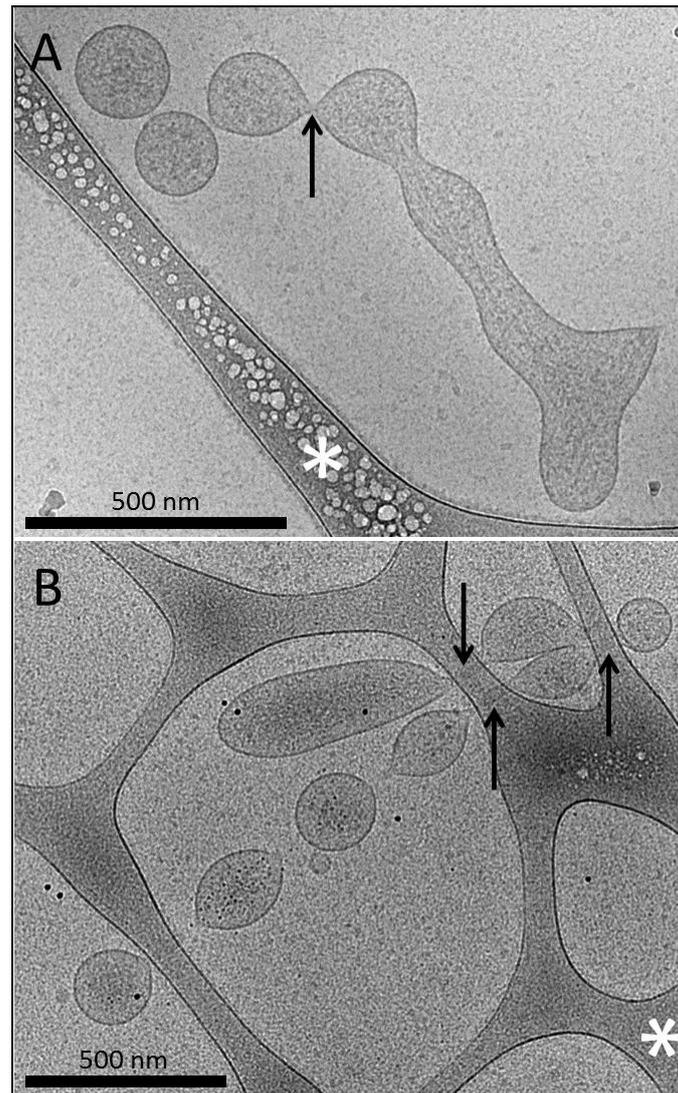


**Figure 45 : Images de cryo-MET présentant le marquage de VEs par des NpAu-AnxA5.** (A-B) VEs sphériques fortement marquées par les NpAu-AnxA5 et exposant donc la PS. La VE visible sur l'image B est légèrement déformée par le film de carbone. (C) Cette image présente deux petites VEs sphériques séparées par quelques dizaines de nanomètres. Celle de gauche est intégralement marquée par les NpAu-AnxA5 tandis que celle de droite en est totalement dépourvue. Ceci illustre la forte spécificité de marquage des NpAu-AnxA5. (D) La vignette en bas à gauche présente un grand fragment membranaire de forme arrondie mesurant  $8 \mu\text{m} \times 6.5 \mu\text{m}$ , intégralement marqué par les NpAu-AnxA5 et délimité par une ligne pointillée blanche. Un agrandissement de la zone encadrée en rouge permet de constater la forte spécificité et densité de marquage des NpAu-AnxA5. (E) VE tubulaire marquée par des NpAu-AnxA5 et mesurant environ  $2.8 \mu\text{m}$  de long pour  $60 \text{ nm}$  de large environ. Les VEs tubulaires exposant la PS sont rarement observées. (A-E) Le film de carbone perforé est indiqué par des astérisques blancs.

Les VEs sphériques, les VEs tubulaires et les grands fragments membranaires sont à nouveau observés. Nous avons constaté la présence d'un marquage dense et spécifique par les NpAu-AnxA5 sur environ 50% des VEs sphériques, démontrant que celles-ci exposent la PS et sont donc potentiellement procoagulantes. Les 50% de VEs sphériques restantes sont totalement dénuées de NpAu-AnxA5 et n'exposent donc pas de PS. Les VEs tubulaires sont quant à elles majoritairement non marquées, avec seulement 10% de VEs PS-positives. De manière surprenante, la totalité des grands fragments membranaires de forme arrondie et de taille comprise entre  $6$  et  $8 \mu\text{m}$  sont intégralement marqués par les NpAu-AnxA5. La présence dans le plasma de grandes surfaces membranaires potentiellement prothrombotiques est une question intrigante, sur laquelle nous reviendrons ultérieurement. A titre de contrôle négatif, toutes les expériences de marquage par des NpAu-AnxA5 ont également été réalisées en l'absence de calcium. Aucun marquage par les nanoparticules n'a été observé, ce qui est en accord avec la stricte dépendance au  $\text{Ca}^{2+}$  de la liaison de l'AnxA5 à la PS. Pour l'intégralité des expériences d'immunomarquage présentées dans ce manuscrit, la concentration de NpAu-Protéine a été ajustée afin d'obtenir un marquage optimal tout en réduisant le nombre de nanoparticules non liées.

La présence de VEs n'exposant pas la PS est en contradiction avec le modèle classique de formation des VEs par Zwaal et Schroit et suggère l'existence d'autres mécanismes de biogénèse dans lesquels la rupture de l'asymétrie membranaire n'est pas impliquée. Les VEs tubulaires, majoritairement PS-négatives, pourraient par exemple se former par

fragmentation directe d'autres cellules, par un mécanisme similaire à celui impliqué dans la formation des plaquettes à partir des mégacaryocytes (Italiano Jr. and Hartwig, 2007). Les VEs sphériques PS-négatives pourraient également être issues d'un phénomène similaire, ou bien se former à partir de la scission de VEs tubulaires n'exposant pas de PS. En effet, certaines VEs tubulaires ont tendance à se fragmenter et à former des « chapelets » de VEs, souvent de forme sphérique. Deux images de cryo-MET illustrant ce phénomène sont présentées en **figure 46**. Reininger *et al.* (Reininger et al., 2006) ont montré que des VEs tubulaires de plusieurs dizaines de  $\mu\text{m}$  pouvaient se former lorsque des plaquettes soumises à des forces de cisaillement interagissent avec des surfaces recouvertes de facteur Von Willebrand. Dans le cas de vésicules tubulaires synthétiques, il est également connu que des tubes membranaires peuvent se fragmenter en vésicules sphériques, par un phénomène appelé « pearling instability » (Tsafrir et al., 2001). La préexistence de ces tubes fragmentés dans le plasma est cependant hautement improbable. En effet, un échantillon de plasma observé par cryo-MET ne contient qu'un très faible nombre de VEs par unité de surface, les VEs étant couramment distantes de plusieurs dizaines, voire centaines de microns sur la grille de MET. Notre hypothèse est que cette fragmentation des VEs tubulaires peut être causée par un stress mécanique lors de la congélation de l'échantillon (**figure 46-A**) et/ou suite au contact entre le film de carbone perforé et la vésicule tubulaire (**figure 46-B**). Elle semble également dépendante du type de VE tubulaire, certaines présentant une tendance accrue à se fragmenter.



**Figure 46 : Images de cryo-MET illustrant la fragmentation de VEs tubulaires en VEs sphériques.** (A) VE tubulaire de  $1.5 \mu\text{m}$  de long et de  $140 \text{ nm}$  de large. L'extrémité supérieure du tube est fragmentée en trois VEs sphériques. La VE sphérique la plus à droite est en cours de séparation mais est toujours reliée à la vésicule tubulaire par un petit fragment de membrane (flèche noire). Les VEs sphériques nouvellement formées possèdent un diamètre proche de la largeur de la VE tubulaire d'origine. (B) VE tubulaire presque intégralement fragmentée en VEs sphériques, dont la taille initiale avoisine  $2.5 \mu\text{m}$  de long. Les flèches noires pointent les déformations du tube au niveau des points de contact avec le film de carbone. Il est possible que la fragmentation de ce tube ait été induite par un stress mécanique causé par le film de carbone. (A-B) Le film de carbone perforé est signalé par un astérisque blanc.

### 2.1.3. Phénotypage de VEs et détermination de leur origine cellulaire à l'aide de NpAu-Anticorps

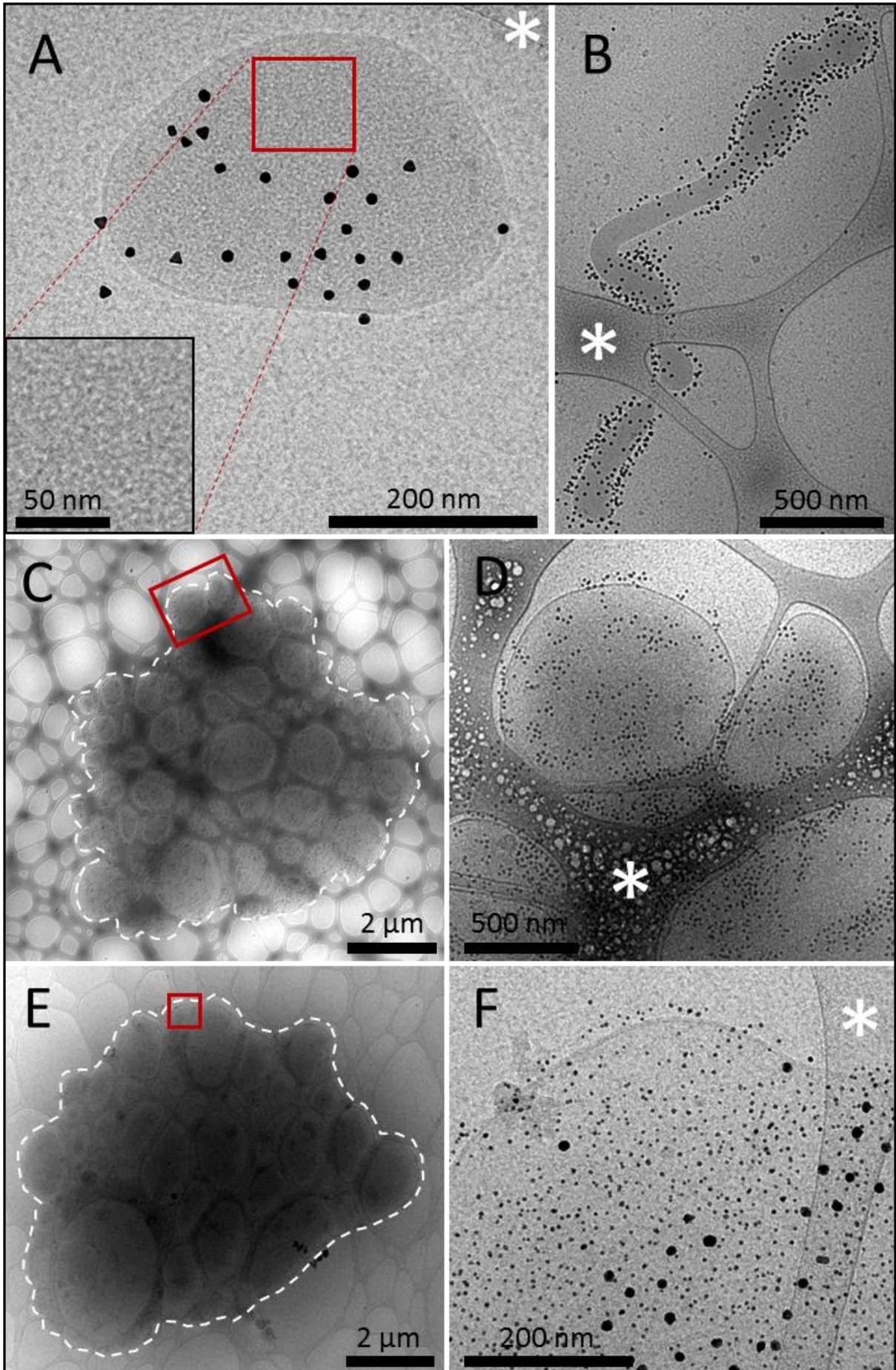
Les VEs étant produites par les cellules, nous avons ensuite souhaité identifier leur origine cellulaire. Pour cela, des nanoparticules d'or conjuguées à différents anticorps d'intérêt ont été synthétisées (NpAu-Ac). Le mode de préparation et d'observation des échantillons pour la cryo-MET est à nouveau identique à ce qui a été présenté pour l'étude de la morphologie des VEs et de l'exposition de PS, à la différence que le plasma est incubé avec des NpAu-Ac avant d'être congelé.

#### 2.1.3.1. Identification de VEs érythrocytaires à l'aide de NpAu-anti-CD235a

Les globules rouges, aussi appelés érythrocytes ou hématies, sont des cellules sanguines anucléées dont le rôle est d'assurer le transport du dioxygène aux poumons et d'en évacuer le dioxyde de carbone. Les globules rouges sont les cellules sanguines les plus nombreuses ( $5 \times 10^6$  par  $\mu\text{L}$  de sang), nous avons donc souhaité caractériser les éventuelles VEs d'origine érythrocytaire, en utilisant des nanoparticules d'or conjuguées à des anticorps anti-glycophorine A (ou CD235a). La glycophorine A est une protéine transmembranaire présente en grande quantité à la surface des érythrocytes ( $5 \times 10^6$  copies/cellule) (Poole, 2000).

La **figure 47** présente une sélection d'images de VEs après marquage par des NpAu-anti-CD235a. Un marquage dense et spécifique est observé sur environ 20% des VEs sphériques et sur un tiers des VEs tubulaires, indiquant une origine érythrocytaire. Le fait qu'une part importante des VEs tubulaires provienne des globules rouges indique probablement qu'un mécanisme de biogénèse particulier est impliqué. Leur formation pourrait être liée au stress mécanique subi par les érythrocytes lorsqu'ils se déplacent dans le système circulatoire, notamment dans les plus fins capillaires. Le fait que les globules rouges soient de loin les cellules sanguines les plus nombreuses est une explication évidente au grand nombre de VEs tubulaires d'origine érythrocytaire, mais il est parallèlement étonnant de retrouver peu de vésicules sphériques dérivées de ce type cellulaire. L'observation des grands fragments membranaires a révélé une nouvelle surprise : les fragments arrondis de 6 à 8  $\mu\text{m}$  précédemment marqués par les NpAu-AnxA5 sont également tous marqués par les NpAu-anti-

CD235a, indiquant une origine érythrocytaire. Nous avons réalisé des expériences de double marquage par deux types de nanoparticules, des NpAu-AnxA5 de 4 nm et des NpAu-anti-CD235a de 10 nm, qui permettent de mettre en évidence la double positivité de ces grands fragments à la PS et à la glycophorine A (**Figure 47-E et 47-F**). La taille de ces VEs étant très proche de celle d'un globule rouge, notre hypothèse est que ces grands fragments membranaires sont des « fantômes » d'érythrocytes (Ery-G), c'est-à-dire la membrane d'un globule rouge en fin de vie, vidée de son contenu en hémoglobine. Afin de tester cette hypothèse, des globules rouges ont été lysés (GR-L) par choc osmotique après dilution dans de l'eau puis congelés et observés par cryo-MET. Ces GR-L s'avèrent être identiques aux Ery-G en termes de forme et de taille. Ils sont logiquement marqués par les NpAu-anti-CD235a, mais également par les NpAu-AnxA5 et exposent donc la PS, en accord avec l'étude de Schrier *et al.* (Schrier et al., 1992) et de manière identique aux Ery-G. Un de ces GR-L est visible dans l'**annexe 4**. Des expériences de microscopie optique à fluorescence ont également été réalisées. Des GR-L et des Ery-G ont été observés après marquage par de l'AnxA5 fluorescente (**annexe 5**). Les images obtenues confirment les similarités observées entre GR-L et Ery-G par cryo-MET, en termes de forme, de taille et d'exposition de PS. Elles confirment également que leur taille moyenne de 7  $\mu\text{m}$  n'est pas affectée par un éventuel artefact de préparation lié à la cryo-MET. Ces données tendent fortement à prouver que les Ery-G sont effectivement des membranes de globules rouges vidées de leur contenu. Il est impossible pour le moment de dire si les Ery-G sont présents de manière physiologique dans le sang ou s'ils résultent d'un artefact de prélèvement ou de préparation. Notre hypothèse étant que les Ery-G soient des globules rouges en fin de vie, il est possible que ceux observés dans le plasma passent leurs dernières minutes dans le système circulatoire avant d'être éliminés principalement par le foie, la rate et les macrophages (Jandl et al., 1956). Quelle que soit leur origine, ils sont présents dans la totalité des échantillons de plasma que nous avons analysés, qu'ils soient sains ou pathologiques, préparés par nos soins ou non. Ils sont susceptibles d'exercer une activité biologique *in vivo* (Whelihan and Mann, 2013) ou *in vitro*, dans le cas de produits sanguins stockés par exemple (Simak and Gelderman, 2006). Il est nécessaire d'en tenir compte lors de l'étude des VEs, particulièrement lors des études par cytométrie en flux où leur grande taille les rend aisément détectables. Il est également intéressant de noter que peu de VEs sphériques ou tubulaires d'origine érythrocytaire exposent la PS. Ceci indique qu'elles sont majoritairement issues de globules rouges intacts et ne proviennent donc pas des Ery-G.



**Figure 47 : Images de cryo-MET présentant le marquage de VEs par des NpAu-anti-CD235a.**

(A) VE sphéroïde d'origine érythrocytaire marquée par les NpAu-anti-CD235a. Elle possède une texture granuleuse caractéristique de la plupart des VEs d'origine érythrocytaire, visible dans la zone agrandie encadrée en rouge. (B) VE tubulaire d'origine érythrocytaire densément marquée par les NpAu-anti-CD235a. Des déformations au niveau des points de contact entre la vésicule et le film de carbone sont à nouveau visibles. (C) Grand fragment membranaire d'origine érythrocytaire marqué par des NpAu-anti-CD235a, de type Ery-G. Il est délimité par une ligne pointillée blanche. (D) Agrandissement de la zone encadrée en rouge sur l'image C. (E) Grand fragment membranaire d'origine érythrocytaire de type Ery-G simultanément marqué par des NpAu-anti-CD235a de 10 nm et par des NpAu-AnxA5 de 4 nm. Il est délimité par une ligne pointillée blanche. (F) Agrandissement de la zone encadrée en noir sur l'image E, illustrant la densité et la spécificité du double marquage par les NpAu-AnxA5 et les NpAu-anti-CD235a. (A, B, D, F) Les astérisques blancs signalent le film de carbone perforé.

Nous avons également remarqué que la plupart des VEs tubulaires et sphériques d'origine érythrocytaire possédaient une texture granuleuse particulière et relativement dense aux électrons (**figure 47-A**), alors que la plupart des autres VEs sont homogènes et transparentes. Après nos nombreuses observations, nous sommes même capables de reconnaître ces VEs par une simple observation de leur texture, sans marquage par les NpAu-anti-CD235a. Notre hypothèse est que ces vésicules contiennent de l'hémoglobine, contenant elle-même du fer qui est dense aux électrons. Ceci est cohérent avec le fait que ni les GR-L ni les Ery-G ne présentent cette texture particulière, ceux-ci étant vidés de leur contenu.

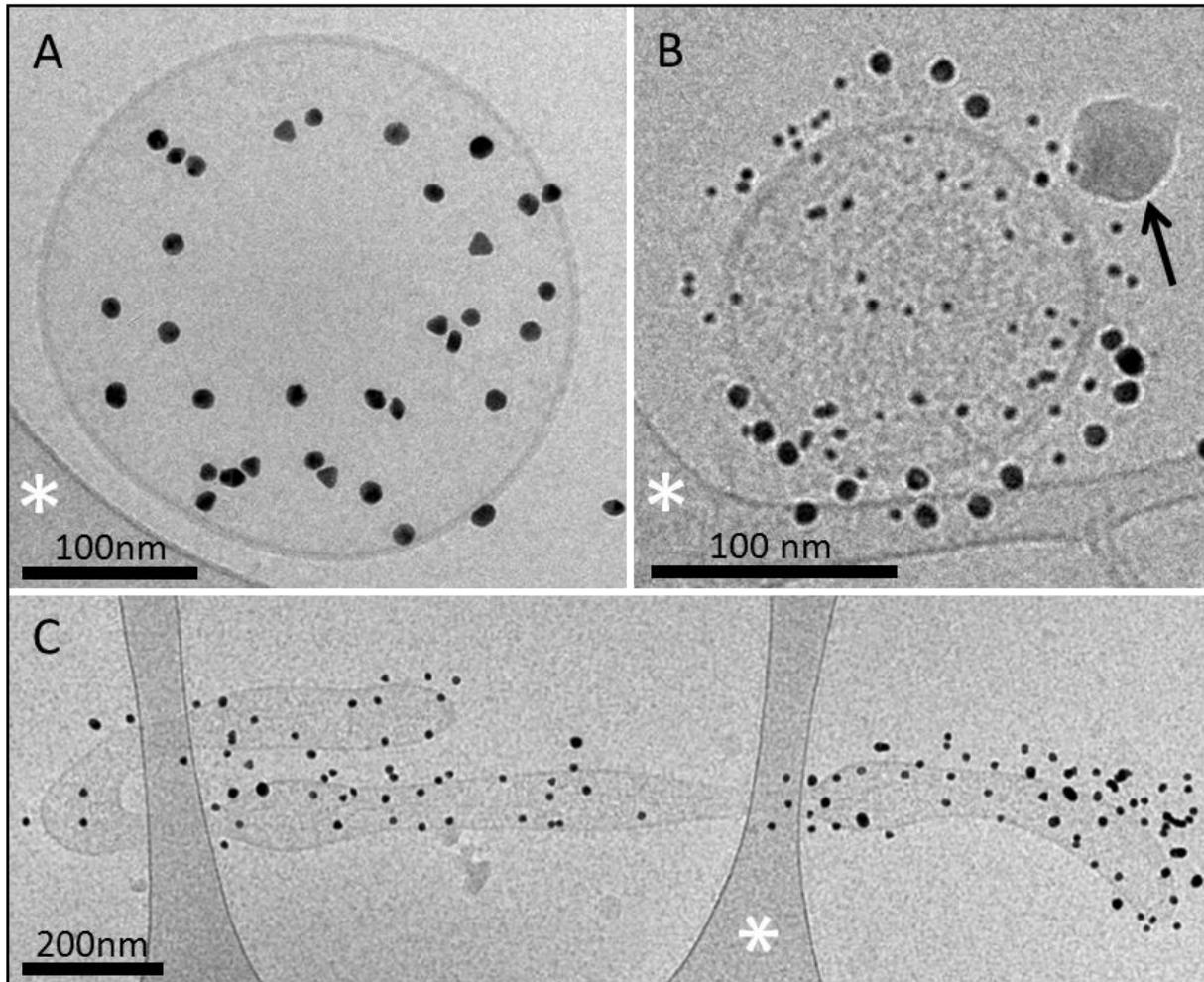
#### *2.1.3.2. Identification de VEs plaquettaires à l'aide de NpAu-anti-CD41*

Les plaquettes sanguines sont le second type cellulaire du sang en termes de concentration avec 400.000 plaquettes par  $\mu\text{L}$  de sang. Elles sont notamment impliquées dans la coagulation et sont un acteur majeur de la formation du caillot sanguin. Elles contiennent en outre de grandes quantités de matériel vésiculaire qu'elles peuvent libérer dans la circulation suite à leur activation (Heijnen et al., 1999). Il est donc logique de tenter d'identifier et de caractériser les VEs d'origine plaquettaire. Nous avons pour cela utilisé des nanoparticules d'or conjuguées à des anticorps dirigés contre la chaîne  $\alpha_{2b}$  de l'intégrine  $\alpha_{2b}\beta_3$  (NpAu-anti-CD41), aussi appelée CD41. L'intégrine  $\alpha_{2b}\beta_3$  est une protéine transmembranaire présente en quantité

importante à la surface des plaquettes (environ  $10^5$  copies par cellule) (Bennett, 1990) et qui joue notamment un rôle dans la coagulation et dans l'adhésion cellulaire.

La **figure 48** présente une sélection d'images de VEs observées par cryo-MET, après marquage par des NpAu-anti-CD41. Environ 30% des VEs sont marquées par les NpAu-anti-CD41, réparties de manière égale entre VEs sphériques, VEs tubulaires et grands fragments membranaires. Les VEs sphériques d'origine plaquettaire sont globalement de petite taille, leur diamètre étant majoritairement compris entre 100 et 500 nm. Des expériences de double marquage par des NpAu-AnxA5 de 4 nm et des NpAu-anti-CD41 de 10 nm ont été réalisées, révélant qu'environ 50% des VEs CD41-positives exposent également la PS. Nous avons ensuite mené des expériences complémentaires afin de déterminer si toutes les VEs d'origine plaquettaire exposaient l'antigène CD41. Un plasma riche en plaquettes (PRP) a été préparé en centrifugeant du sang à 200 g pendant 10 min, puis en récupérant le surnageant. Ce surnageant contient environ 800.000 plaquettes par  $\mu\text{L}$ . Les plaquettes ont ensuite été activées par ajout de TRAP (Thrombin Receptor-Activating Peptide) ou de CRP-XL (Collagen-Related Peptide) afin de déclencher l'émission de VEs. Après activation, le PRP activé est incubé avec des NpAu-anti-CD41 puis est congelé et observé avec un cryo-microscope, comme pour les expériences sur le plasma. L'observation de ces échantillons révèle que de nombreuses VEs d'origine plaquettaire ne sont pas marquées par les NpAu-anti-CD41 et n'exposent donc pas l'antigène CD41. Il est probable que certaines VEs non marquées proviennent de membranes internes ne contenant pas de CD41. Il est également possible que la formation de ces VEs résulte d'un phénomène sélectif aboutissant à l'absence de CD41 à leur surface. L'utilisation d'autres marqueurs plaquettaires est donc nécessaire si l'on souhaite caractériser l'intégralité des VEs d'origine plaquettaire.

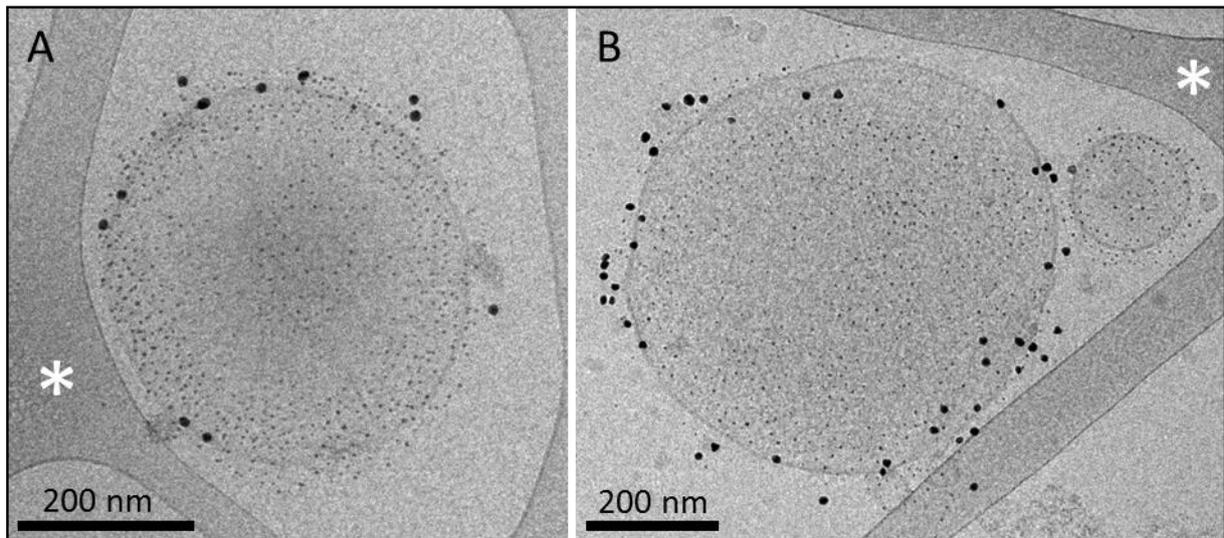
Toutes les plaquettes résiduelles observées dans les échantillons de plasma sont marquées par les NpAu-anti-CD41.



**Figure 48 : Images de cryo-MET présentant le marquage de VEs par des NpAu-anti-CD41.** (A) VE sphérique de 280 nm de diamètre marquée par les NpAu-anti-CD41 et donc d'origine plaquettaire. (B) VE sphérique de 150 nm de diamètre doublement marquée par des NpAu-AnxA5 de 4 nm et des NpAu-anti-CD41 de 10 nm. Elle expose donc la PS et est d'origine plaquettaire. La flèche noire pointe une contamination par un cristal de glace. La présence de nanoparticules autour de la VE marquée est due à un phénomène de redistribution qui peut se produire durant l'étape de vitrification et qui n'est pas lié à l'avidité ou au type de NpAu-Protéine. (C) VE tubulaire marquées par des NpAu-anti-CD41. Le tube mesure 2.1  $\mu\text{m}$  de long pour environ 100 nm de large. (A-C) Les astérisques blancs signalent le film de carbone perforé.

Dans l'optique de tester d'autres marqueurs plaquettaires, des NpAu-anti-CD62P ont été synthétisées. L'antigène CD62P, aussi appelé P-sélectine, est exposé à la surface des plaquettes activées ou des cellules endothéliales activées (Koedam et al., 1992). Aucune VE exposant le CD62P n'a été détectée dans le plasma. Cependant, peu d'observations ont été réalisées et il est nécessaire d'en effectuer de nouvelles avant de pouvoir conclure. Le CD62P

n'étant exposé que lors de l'activation, nous avons incubé des NpAu-anti-CD62P avec du PRP activé ou avec du sérum et avons observé ces échantillons par cryo-MET. Dans les deux types d'échantillons, des VEs exposant le CD62P sont présentes, dont deux exemples sont visibles en **figure 49**. Ces VEs sont probablement majoritairement issues des plaquettes activées et leur marquage indique que les NpAu-anti-CD62P sont capables de reconnaître leur cible.



**Figure 49 : Images de cryo-MET présentant le marquage de VEs issues de sérum (A) et de PRP activé (B) par des NpAu-anti-CD62P.** (A) VE sphérique marquée par les NpAu-anti-CD62P, probablement d'origine plaquettaire. Elle est également marquée par des NpAu-AnxA5 de 4 nm et expose donc la PS. (B) VEs sphériques mesurant respectivement environ 700 nm et 180 nm de diamètre. Celle de gauche est doublement marquée par des NpAu-AnxA5 de 4 nm et des NpAu-anti-CD62P de 10 nm. Elle expose la PS et est probablement d'origine plaquettaire. Celle de droite n'est marquée que par les NpAu-AnxA5. Cette image illustre une fois de plus la grande spécificité du marquage par les NpAu-Protéine. (A-B) Les astérisques blancs signalent le film de carbone perforé.

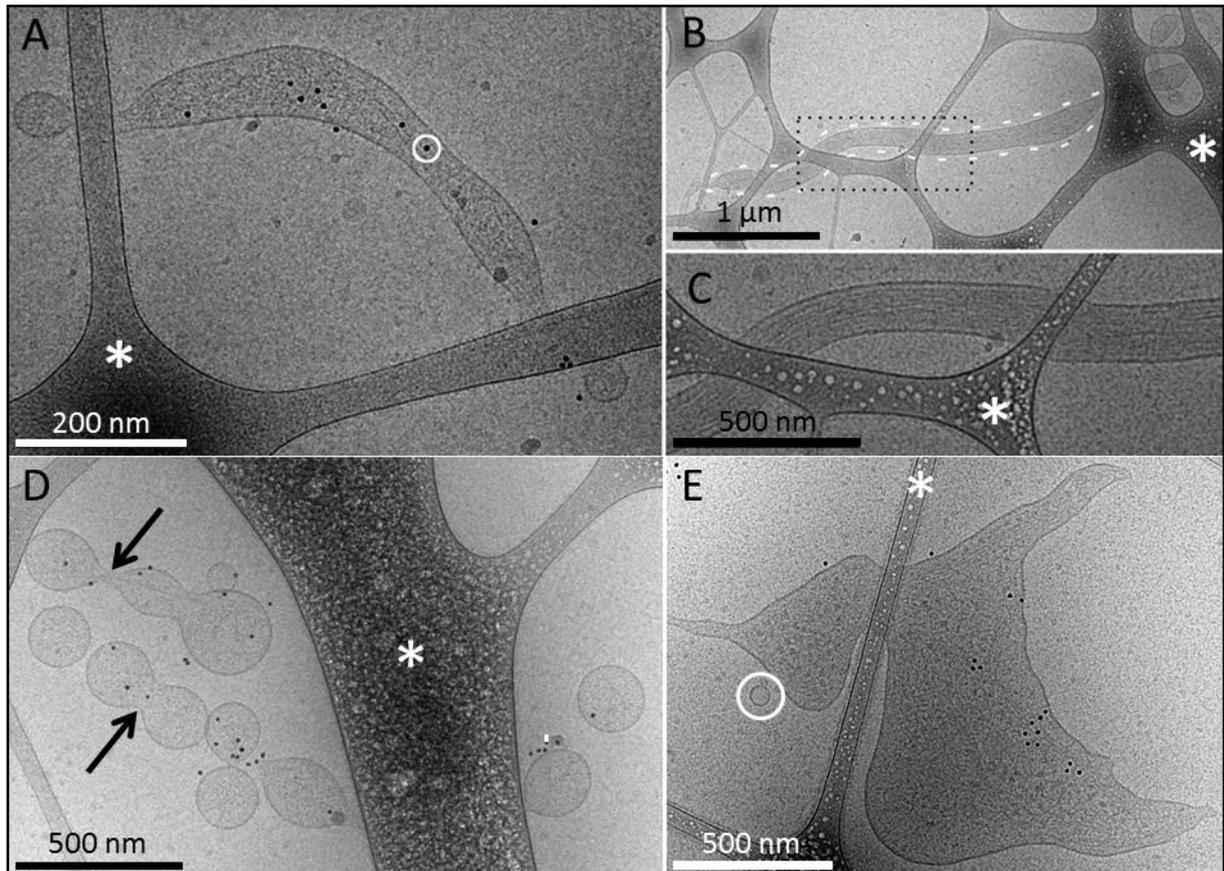
#### 2.1.3.3. Identification de VEs leucocytaires à l'aide de NpAu-anti-CD45

Les globules blancs, ou leucocytes, sont le troisième et dernier type cellulaire circulant dans le sang. Acteurs majeurs du système immunitaire, ils sont principalement impliqués dans la lutte contre les infections et les cancers, et leur concentration est comprise entre 5000 et 10.000 par  $\mu\text{L}$  de sang. Afin de caractériser les potentielles VEs d'origine leucocytaire, des nanoparticules d'or conjuguées à des anticorps anti-CD45 ont été synthétisées. L'antigène CD45, aussi appelé PTPRC (Protein Tyrosine Phosphatase, Receptor type C), est une protéine

transmembranaire présente à la surface de la quasi-totalité des sous-types de leucocytes (Dalchau et al., 1980).

Parmi les VEs qui ne sont jamais marquées par les NpAu-AnxA5, les NpAu-anti-CD235a ou les NpAu-anti-CD41, nous avons identifié une catégorie de VEs tubulaires possédant des caractéristiques particulières et reconnaissables, présentes en quantité comparable aux VEs tubulaires d'origine érythrocytaires. Cette catégorie de VEs présente des striations, probablement dues à la présence de fibres de nature protéique à l'intérieur des tubes. Ces tubes ont également une forte tendance à se fragmenter. 30% de ces tubes sont marqués par les NpAu-anti-CD45 et sont donc d'origine leucocytaire. Aucune VE sphérique et seulement un grand fragment membranaire exposant l'antigène CD45 ont pu être observés. Une sélection d'images de VEs d'origine leucocytaire est présentée en **figure 50**. Les VEs leucocytaires sont-elles quasiment exclusivement tubulaires et si oui, pourquoi ? Les leucocytes polynucléaires peuvent former de longues extensions membranaires, appelées pseudopodes, à des fins de mobilité (Valerius et al., 1981). Ces VEs tubulaires leucocytaires pourraient éventuellement être issues de tels pseudopodes. De plus, l'actine est impliquée dans la formation de ces derniers et pourrait être à l'origine des structures fibreuses observées dans la plupart des VEs leucocytaires. Il est également possible qu'à l'instar des VEs d'origine plaquettaire, toutes les VEs d'origine leucocytaire ne puissent être identifiées avec le seul antigène CD45. Le marquage des VEs leucocytaires par les NpAu-anti-CD45 est très spécifique, mais il est moins dense que celui offert par des NpAu-AnxA5, des NpAu-anti-CD235 ou des NpAu-anti-CD41. Une hypothèse est que la membrane des VEs leucocytaires ne contient qu'un faible nombre de molécules de CD45, en comparaison de la PS, du CD235a pour les globules rouges ou du CD41 pour les plaquettes. Il est aussi possible que les NpAu-anti-CD45 possèdent une avidité moindre pour leur cible, à cause d'un anticorps anti-CD45 moins affin ou d'une conjugaison aux nanoparticules moins efficace. Cette densité de marquage plus faible peut être une des causes de l'absence de VEs sphériques marquées par les NpAu-anti-CD45. Prenons l'exemple de la VE tubulaire en cours de fragmentation présentée en **figure 50-D**. Il apparaît évident que les VEs sphériques visibles sur l'image sont issues d'un unique tube marqué par des NpAu-anti-CD45, mais certaines d'entre elles ne sont pourtant pas marquées, ce qui rendrait leur identification impossible dans un autre contexte. A titre de contrôle positif, des leucocytes ont été incubés avec des NpAu-anti-CD45 et observés par MET

après inclusion en résine et coupe mince, révélant que la membrane plasmique des leucocytes était marquée par les NpAu-anti-CD45, qui sont donc capables de se lier à des membranes d'origine leucocytaire (données non présentées, expérience réalisée par S. Tan).



**Figure 50 : Images de cryo-MET présentant le marquage de VEs par des NpAu-anti-CD45.** (A) VE tubulaire d'origine leucocytaire, marquée par des NpAu-anti-CD45 (cercle blanc). Du matériel fibreux est visible à l'intérieur de la vésicule. (B) VE tubulaire non marquée par des NpAu-anti-CD45 mais dont l'origine est peut-être leucocytaire. La vésicule est délimitée par une ligne pointillée blanche et contient également du matériel fibreux. (C) Agrandissement de la zone encadrée en pointillés noirs sur l'image, permettant d'observer l'organisation longitudinale très régulière des fibres contenues dans la VE tubulaire. (D) VE tubulaire d'origine leucocytaire, marquée par des NpAu-anti-CD45. Le tube est presque totalement fragmenté en VEs sphériques et certaines VEs sont en cours de séparation (flèches noires). (E) Grand fragment membranaire d'origine leucocytaire, marqué par des NpAu-CD45. A l'instar de la majorité des VEs tubulaires d'origine leucocytaire, il contient des fibres. Une petite VE sphérique non marquée est visible à gauche du grand fragment (cercle blanc). Le marquage par les NpAu-anti-CD45 étant peu dense, il est impossible de se prononcer sur la nature de cette VE sphérique. (A-E) Les astérisques blancs signalent le film de carbone perforé.

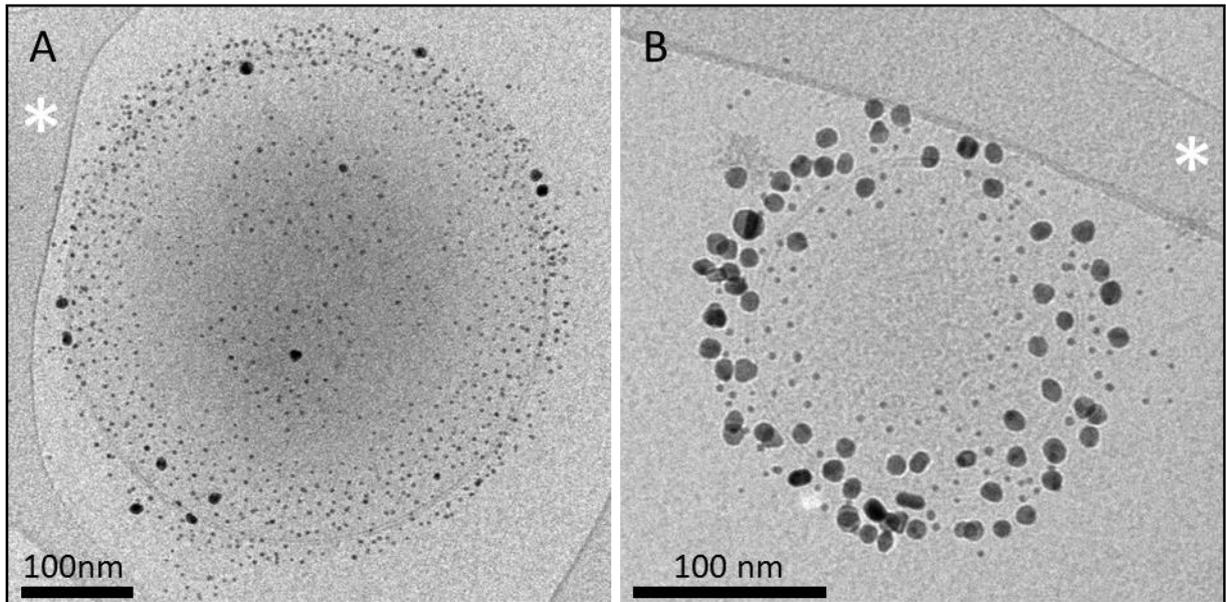
#### *2.1.3.4. Identification de VEs endothéliales à l'aide de NpAu-anti-CD144*

Le marquage d'échantillons de plasma par des NpAu-anti-CD235a, des NpAu-anti-CD41 et des NpAu-anti-CD45 ont permis d'identifier des VEs issues d'érythrocytes, de plaquettes et de leucocytes. Ces VEs représentant 65% de la totalité des VEs présentes dans le PFP, il reste à identifier les VEs composant les 35% restants. Il est possible que ces VEs non identifiées soient malgré tout originaires d'un des trois types cellulaires du sang précédemment étudiés mais que les marqueurs employés lors de cette étude n'aient pas permis de toutes les identifier. Rappelons par exemple que les VEs d'origine plaquettaire ne sont pas toutes marquées par les NpAu-anti-CD41. Il est également possible que les VEs non identifiées proviennent d'autres cellules, dont les plus évidentes sont les cellules endothéliales. Elles sont en effet au contact direct du flux sanguin et sont donc susceptibles de libérer des VEs dans la circulation générale. Nous avons donc synthétisé des NpAu-anti-CD144, dirigées contre la VE-cadhérine, un marqueur des cellules endothéliales (Vestweber, 2008). Aucune VE marquée par des NpAu-anti-CD144 n'a cependant pu être détectée dans le plasma. Il est possible que leur concentration soit trop faible, ou que l'anticorps choisi ne soit pas adapté. La VE-cadhérine est localisée au niveau des jonctions adhérentes des cellules endothéliales (Vestweber, 2008), zones qui sont peut-être peu propices à l'émission de VEs. Les NpAu-anti-CD62P présentées dans le cas des VEs d'origine plaquettaire peuvent également être utilisées pour identifier des VEs d'origine endothéliales mais comme décrit précédemment, la P-sélectine n'est exposée à la surface des cellules endothéliales que lors de l'activation et ce marqueur peut également être présent à la surface des plaquettes activées.

#### *2.1.3.5. Identification d'exosomes à l'aide de NpAu-anti-CD63 et de NpAu-anti-CD9*

Nous avons peu parlé d'exosomes dans cette étude, rassemblant l'intégralité des objets vésiculaires contenus dans le plasma sanguin sous l'appellation de VEs. Il est cependant probable que sur les milliers d'images réalisées pour ce travail, de nombreux exosomes aient été observés. Formés à partir des corps multivésiculaires, ils nécessitent des marqueurs spécifiques pour être caractérisés, qui ne sont pas des marqueurs d'un type cellulaire en particulier. Les antigènes CD63 et CD9, appartenant tous deux à la famille des tétraspanines, sont des protéines transmembranaires régulièrement décrites comme marqueurs des

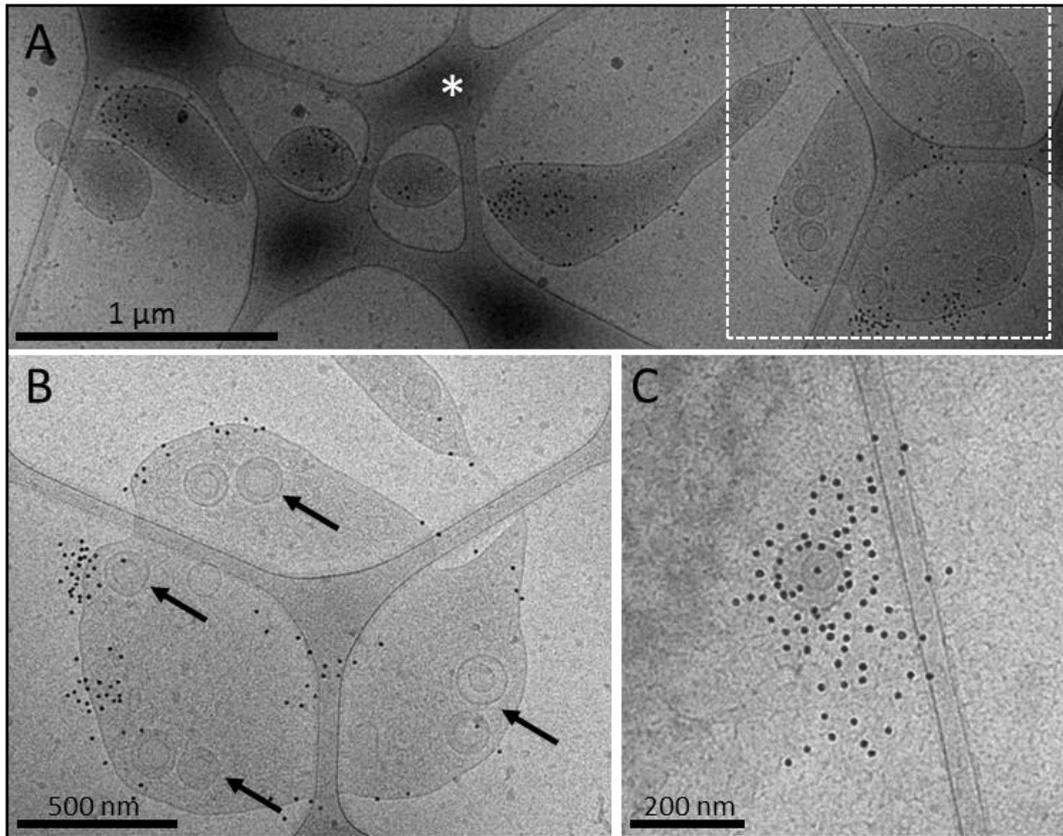
exosomes (Mathivanan et al., 2010). Dans l'optique d'identifier d'éventuels exosomes contenus dans le plasma, des NpAu-anti-CD63 et des NpAu-anti-CD9 ont été synthétisées. Les exosomes sont presque systématiquement décrits comme étant des vésicules d'un diamètre inférieur à 100 nm, nous avons donc prêté une attention particulière aux VEs de petite taille. De plus, ces petites VEs ne sont quasiment jamais marquées par les NpAu-AnxA5, les NpAu-anti-CD235a, les NpAu-anti-CD41 et les NpAu-anti-CD45 et pourraient potentiellement être des exosomes. Le marquage par les NpAu-anti-CD63 s'est révélé négatif, ne permettant pas d'identifier de VEs exposant le CD63 dans le plasma. Souhaitant déterminer si cette absence de marquage était due à une absence de VEs CD63-positives ou à des NpAu-anti-CD63 non fonctionnelles, des NpAu-anti-CD63 ont été incubées avec un échantillon de PRP activé, qui a ensuite été observé par cryo-MET. Contrairement au plasma, le PRP activé contient de grandes quantités de VEs (Heijnen et al., 1999) et permet donc d'observer plus facilement la présence d'un éventuel marquage. De nombreuses VEs issues de PRP activé sont marquées par les NpAu-anti-CD63, dont deux exemples sont présentés en **figure 51**. Ces VEs exposant le CD63 sont de taille et de morphologie très variables, ce qui indique que le CD63 n'est probablement pas un marqueur adapté à la caractérisation des exosomes, en accord avec les données récentes de Kowal *et al.* (Kowal et al., 2016). Le CD63 est également décrit comme un marqueur de l'activation plaquettaire (Murakami et al., 1996; Tschoepe et al., 1993) et semble donc peu spécifique des exosomes. Malgré tout, nous avons observé un marquage par les NpAu-anti-CD63 très intense sur quelques rares vésicules de moins de 200 nm de diamètre, comme celle présentée en **figure 51-B**. Il est possible que ces VEs soient des exosomes, très enrichis en CD63 en comparaison de la plupart des autres VEs observées dans cet échantillon. Il est également intéressant de constater que certaines de ces petites VEs exposent également la PS.



**Figure 51 : Images de cryo-MET présentant le marquage de VEs issues de PRP activé par des NpAu-anti-CD63.** (A) VE sphérique d'environ 450 nm de diamètre, faiblement marquée par les NpAu-anti-CD63. (B) VE sphérique d'environ 160 nm de diamètre, très fortement marquée par les NpAu-anti-CD63. Cette vésicule est probablement un exosome. (A-B) Les deux vésicules sont également marquées par des NpAu-AnxA5 de 4 nm et exposent la PS. Les astérisques blancs signalent le film de carbone perforé.

Les échantillons de plasma marqués par les NpAu-anti-CD9 ont quant à eux révélé de rares VEs exposant l'antigène CD9, dont une VE sphérique et une VE tubulaire. Ces deux exemples sont présentés en **figure 52**. La grande majorité des VEs de moins de 100 nm ne sont malgré tout pas marquées par les NpAu-anti-CD9. Il est cependant impossible d'exclure l'absence de CD9 à leur surface, pour des raisons similaires à celles que nous avons évoquées dans le cas des VEs d'origine leucocytaire. A l'instar du marquage par les NpAu-anti-CD45, il est possible que le marquage par les NpAu-anti-CD9 soit peu dense, rendant difficile l'identification de VEs de petite taille. Les NpAu-anti-CD9 ont été synthétisées assez tardivement au cours de ce projet de thèse et seules quelques expériences ont pu être réalisées avec ce type de nanoparticules. Ces premières images sont encourageantes et de nouvelles observations permettraient probablement d'en apprendre plus sur les VEs exposant le CD9 et sur les éventuels exosomes. La grande VE tubulaire marquée par des NpAu-anti-CD9 (**figure 51-A et 51-B**) est intéressante à plus d'un titre. Bien qu'elle expose le CD9, elle est très éloignée de la définition d'un exosome de par sa taille et sa morphologie. Elle contient en revanche de

nombreuses VEs sphériques mesurant entre 100 et 150 nm de diamètre, qui pourraient être des exosomes. Il est cependant impossible d'affirmer qu'ils exposent également l'antigène CD9. Une autre hypothèse possible est que cette grande VE CD9-positive soit un corps multivésiculaire ou un fragment de cellule contenant un corps multivésiculaire.



**Figure 52 : Images de cryo-MET présentant le marquage de VEs par des NpAu-anti-CD9.** (A) Grande VE tubulaire d'environ 4  $\mu\text{m}$  de long marquée par des NpAu-anti-CD9. Cette VE possède un renflement à son extrémité droite et contient des vésicules sphériques. (B) Agrandissement de la zone encadrée en pointillés blancs sur l'image A. Les flèches noires indiquent de petites vésicules sphériques qui sont contenues dans la grande VE tubulaire. Leur taille est de l'ordre de la centaine de nm et elles possèdent étonnamment presque toutes une double bicouche lipidique. (C) VE sphérique de 130 nm de diamètre marquée par des NpAu-anti-CD9. Comme expliqué en **figure 48**, la présence de nanoparticules autour de la VE marquée est due à un phénomène de redistribution durant l'étape de congélation et qui n'est pas lié à l'affinité ou au type de NpAu-Protéine.

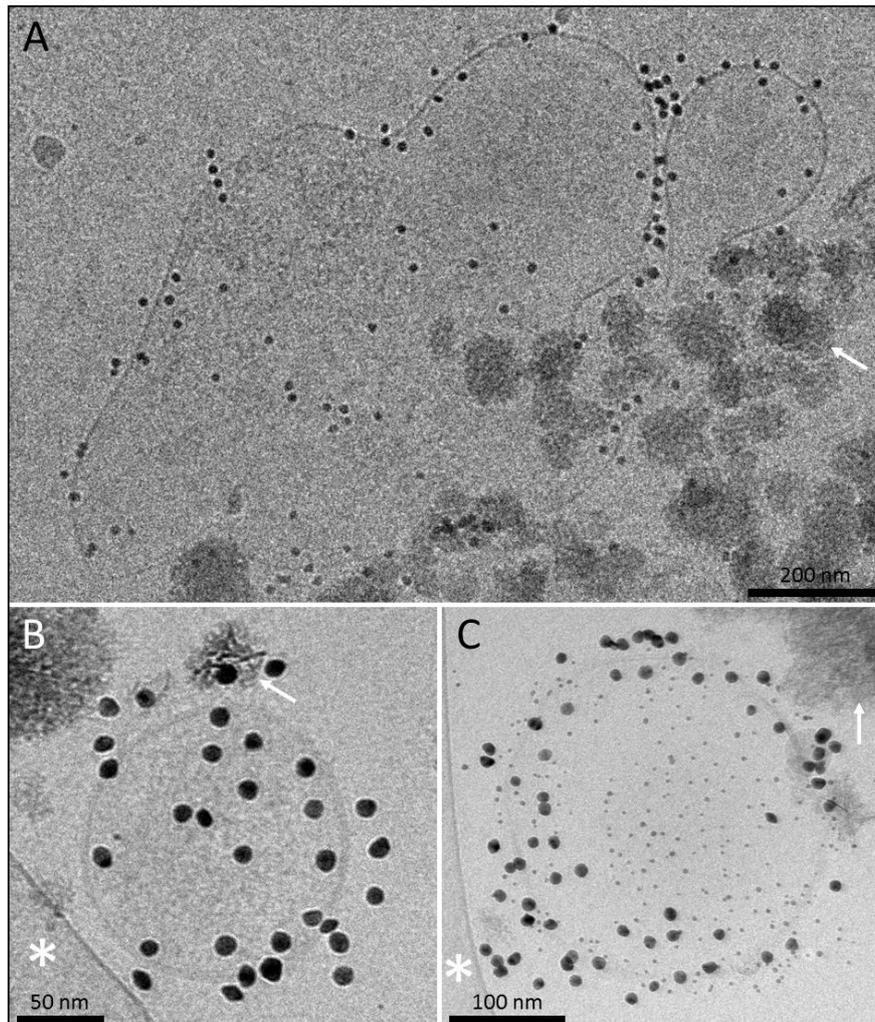
Il est intéressant de s'interroger sur la nature des exosomes et sur la classification qui sépare MVs et exosomes en deux familles bien distinctes. Il est évident que la taille des vésicules ne suffit pas à distinguer exosomes et MVs. Rien ne prouve que des exosomes de plus de 100 nm

ou des MVs de moins de 100 nm ne puissent exister. Bien que les MVs et les exosomes diffèrent par leurs modes de formation théoriques, il est à l'heure actuelle difficile d'affirmer que le bourgeonnement membranaire après exposition de la PS et l'exocytose des CMVs soient les seuls mécanismes impliqués. Booth *et al.* ont par exemple également prouvé que des exosomes, identifiés comme tels à partir de leur taille et de leur exposition des antigènes CD63 et CD81, pouvaient être émis directement depuis la membrane plasmique (Booth *et al.*, 2006). Nous avons également constaté que des marqueurs exosomaux, comme le CD63, pouvaient être exposés par des vésicules de grande taille, permettant de douter de sa spécificité. Les méthodes de purification actuelles ne permettent également pas de séparer de manière fiable et équivoque MVs et exosomes. La majorité des équipes étudiant les exosomes utilisent l'ultracentrifugation différentielle, la centrifugation sur gradient de sucrose ou la précipitation à l'aide de kits commerciaux, mais aucune de ces méthodes ne peut prétendre fournir une suspension d'exosomes purs. Il est donc probable que certaines études concernant les exosomes travaillent avec des échantillons non purs. Toutes ces questions restent aujourd'hui ouvertes et amènent à se questionner sur la nature des exosomes.

#### *2.1.3.6. Identification de VEs d'origine tumorale dans des milieux de culture cellulaire à l'aide de NpAu-anti-CD326*

Ce travail est principalement axé sur la caractérisation de VEs provenant d'individus sains. A terme, un des objectifs est néanmoins de pouvoir utiliser les VEs à des fins diagnostics, pour détecter certaines pathologies. Nous avons donc synthétisé des nanoparticules d'or conjuguées à un anticorps anti-CD326, dans le cadre d'une collaboration avec le Dr. Sandrine Dabernat (INSERM U1035 « Biothérapies de maladies génétiques immunitaires et cancers »), qui travaille notamment sur le cancer du pancréas et sur l'utilisation de l'antigène CD326 comme biomarqueur de cellules tumorales circulantes. L'antigène CD326 ou EpCAM (Epithelial Cell Adhesion Molecule) est une protéine transmembranaire impliquée dans l'adhésion des cellules épithéliales, mais également un biomarqueur cancéreux répandu (Moldenhauer *et al.*, 1987). Nous avons incubé des NpAu-anti-CD326 avec un milieu de culture de cellules tumorales pancréatiques PanC-1, qui expriment l'antigène CD326. Ces échantillons nous ont été fournis par le Dr Sandrine Dabernat. Les échantillons ont ensuite été congelés et observés par cryo-MET comme pour les échantillons de plasma. De très nombreuses VEs sont

observées dans le milieu de culture, dont certaines sont marquées par les NpAu-anti-CD326. Une sélection d'images de VEs marquées par des NpAu-anti-CD326 est présentée en **figure 53**. Ce résultat permet également de confirmer que les NpAu-anti-CD326 sont aptes à reconnaître certaines VEs d'origine épithéliales. Le CD326 étant un biomarqueur cancéreux, les NpAu-CD326 pourraient être utilisées pour détecter l'éventuelle présence de VEs d'origine tumorale dans le plasma de patients atteints de cancer du pancréas, par exemple.



**Figure 53 : Images de cryo-MET présentant le marquage de VEs d'origine épithéliale issues d'un milieu de culture de cellules PanC-1, par des NpAu-anti-CD326.** (A) Grand fragment membranaire d'environ  $1.3 \mu\text{m} \times 700 \text{ nm}$  marqué par des NpAu-anti-CD326 et donc d'origine épithéliale. (B) VE sphérique d'environ  $140 \text{ nm}$  de diamètre, marquée par des NpAu-anti-CD326. (C) VE sphérique d'environ  $320 \text{ nm}$  de diamètre, marquée par des NpAu-anti-CD326 de  $10 \text{ nm}$  de diamètre et des NpAu-AnxA5 de  $4 \text{ nm}$  de diamètre. Cette VE expose donc également la PS. (A-C) Les flèches blanches indiquent la présence de contaminants. (B-C) Les astérisques blancs indiquent le film de carbone perforé.

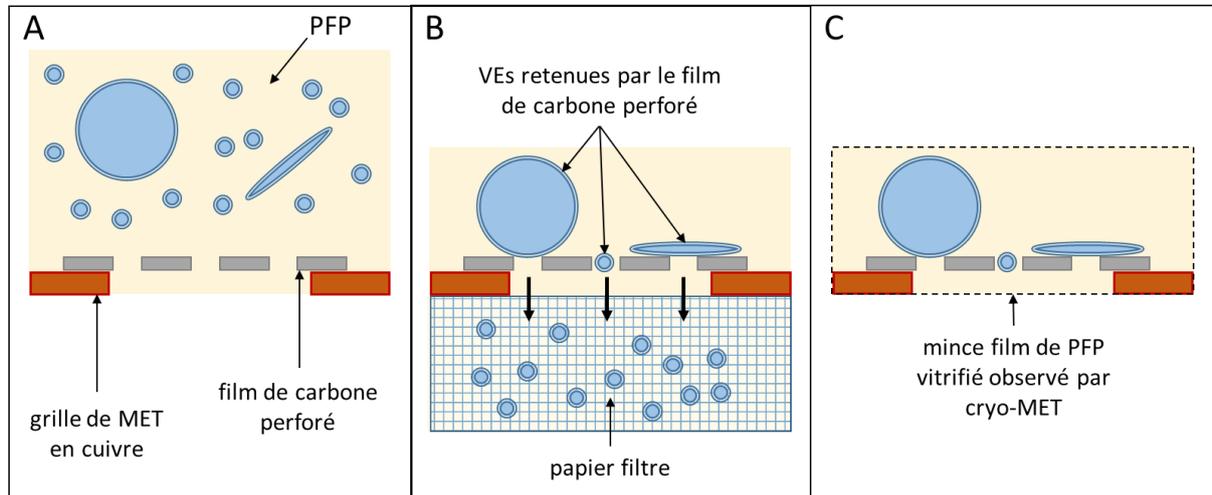
## 2.2. Quantification objective des VEs par sédimentation sur grille de MET

La quantification des VEs est une question capitale mais compliquée. Dans l'optique d'utiliser les VEs comme biomarqueur de pathologies, il est nécessaire de pouvoir déterminer leur concentration. Cependant, leur petite taille, leur hétérogénéité et leurs propriétés physiques rendent complexe leur quantification par des techniques comme la CF conventionnelle ou le NTA. La multitude de méthodes de préparation et d'analyse utilisées dans le domaine des VEs entraîne également à une grande variabilité des résultats. Comme décrit dans l'introduction, les concentrations en VEs dans le plasma sanguin reportées dans la littérature varient de 200 (Shet et al., 2003) à  $10^9$  (Dragovic et al., 2011) VEs par  $\mu\text{L}$ , soit un incroyable facteur 5.000.000 entre ces deux extrêmes ! Dans le but de déterminer la concentration des VEs, nous avons donc développé deux approches. La première est une méthode de CF basée sur la détection des VEs sur la base de leur signal de fluorescence, après marquage par des protéines fluorescente (Arraud et al., 2014b). Cette méthode permet de détecter environ 50 fois plus de VEs que les méthodes de CF conventionnelles, basées sur la détection du signal de diffusion de la lumière des objets. La seconde approche est une méthode originale de sédimentation de VEs sur grille de MET après marquage par des NpAu-Protéine, permettant de déterminer la concentration des VEs de manière objective, fiable et reproductible.

### 2.2.1. Limitations de la cryo-MET pour la quantification des VEs

Nous avons précédemment démontré que l'utilisation de la cryo-MET et de nanoparticules d'or conjuguées à des protéines était un puissant outil pour le phénotypage et la caractérisation morphologique des VEs. La répartition des trois types morphologiques de VEs déterminée par cryo-MET souffre cependant d'une large variabilité, principalement causée par le faible nombre de VEs observables par échantillon. Il existe également une seconde limitation, due au mode de déposition des VEs sur le film de carbone perforé présent à la surface des grilles utilisées pour la cryo-MET. Notre hypothèse est que lors de l'étape de blotting, durant laquelle l'excédent de liquide présent sur la grille est drainé à travers le film de carbone perforé, ce dernier se comporte comme un filet de pêche, retenant préférentiellement les VEs de grande taille comme les grands fragments membranaires et les vésicules tubulaires, tout en laissant passer librement les objets de taille inférieure à celle des

pores du film, comme la plupart des VEs sphériques. Ce phénomène, appelé fish-net artefact (**figure 54**) dans le reste de ce document, entraîne une surreprésentation des VEs de grande taille par rapport aux petites ce qui fausse la quantification de ces VEs par cryo-MET.



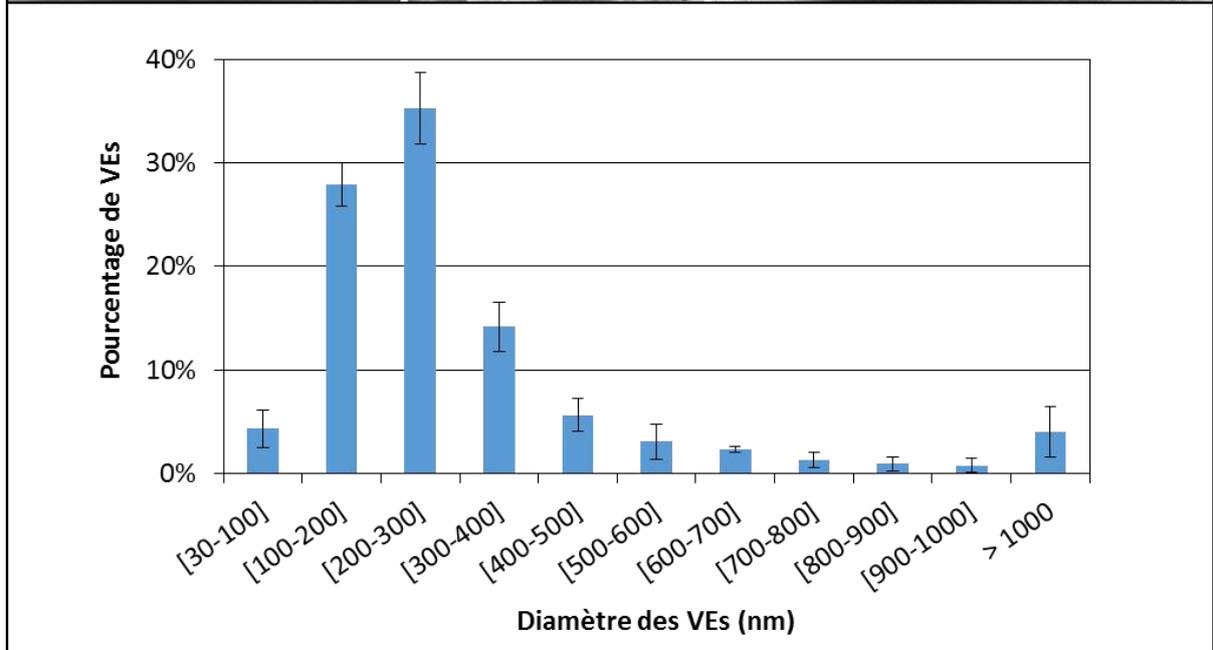
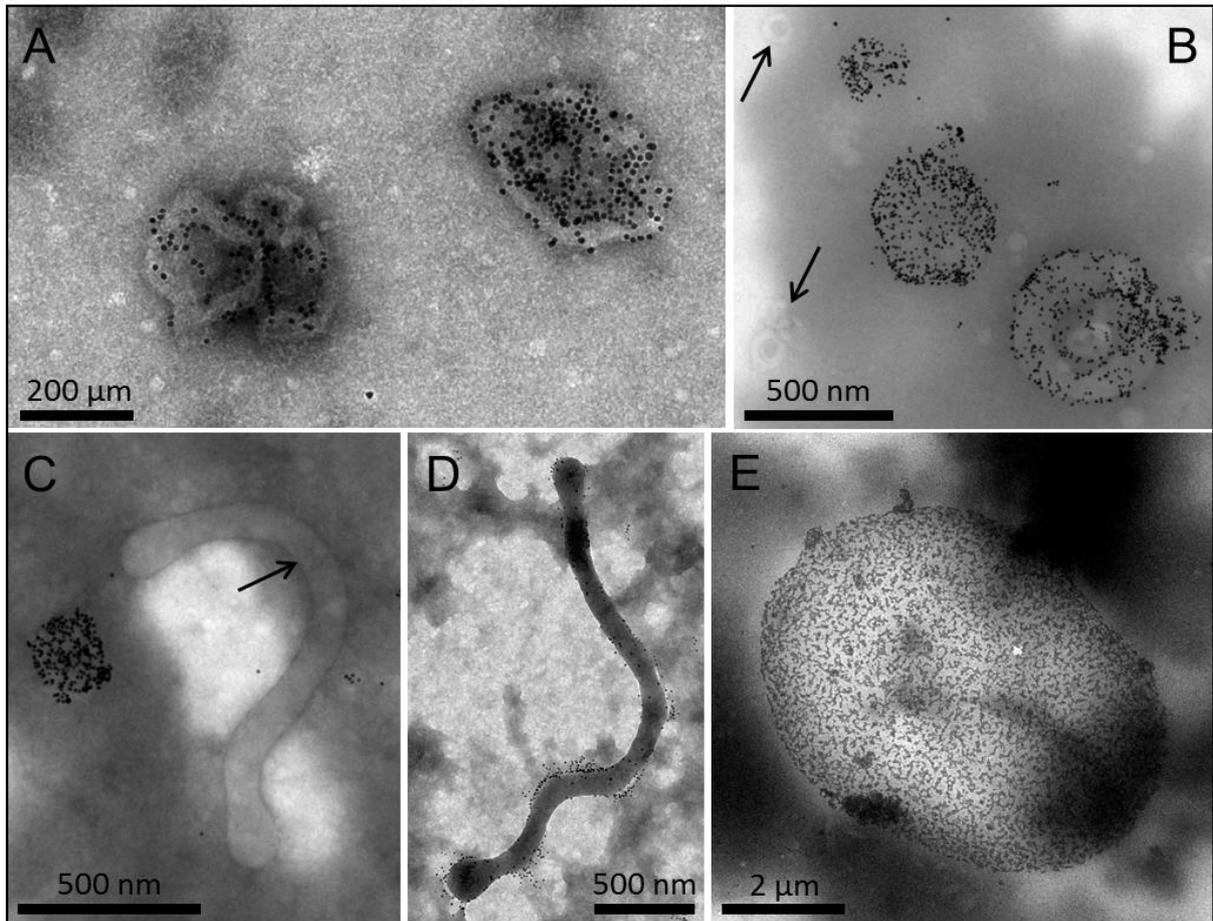
**Figure 54 : Schéma du phénomène de fish-net artefact, lors de l'analyse d'un échantillon de plasma par cryo-MET.** (A) Une goutte de plasma contenant des VEs de tailles variées est déposée sur une grille de cryo-MET en cuivre, recouverte d'un film de carbone perforé. Le schéma n'est pas à l'échelle : la distance entre les deux barreaux de cuivre est de 50  $\mu\text{m}$ , la taille des pores du film de carbone varie de quelques centaines de nm à plusieurs  $\mu\text{m}$ , et la taille des VEs de 30 nm à 8  $\mu\text{m}$ . (B) La majeure partie du liquide est absorbée avec un papier filtre placé sur la face opposée de la grille durant l'étape de blotting. Les VEs de grande taille sont retenues par le film de carbone perforé tandis que la majorité des VEs de petite taille passent librement au travers. (C) Un film de plasma de quelques centaines de nm d'épaisseur est congelé dans l'éthane liquide puis observé par cryo-MET.

### 2.2.2. Sédimentation de VEs sur grille de MET après immunomarquage par des NpAu-Protéine et quantification objective

La cryo-MET ne pouvant être utilisée pour la quantification des VEs à cause du fish-net artefact présenté précédemment, nous avons développé une méthode originale de MET permettant de s'affranchir de cette limitation. Cette méthode consiste à centrifuger du plasma directement sur une grille de MET recouverte d'un film de carbone continu, en utilisant le dispositif présenté dans la partie « Matériels et méthodes » en **figure 19**. L'échantillon de plasma est préalablement incubé avec des NpAu-Protéine afin de marquer les VEs, comme

pour les expériences de cryo-MET. Après une heure de centrifugation à 100.000 g, l'hypothèse est que la totalité des VEs contenues dans l'échantillon sont sédimentées sur le film de carbone continu de la grille. Les grilles sont ensuite récupérées, séchées à l'air puis observées par MET. La morphologie, la taille et le phénotype des VEs sont analysés et le nombre de VEs par unité de surface peut être déterminé. Connaissant le volume de plasma centrifugé, il est possible de calculer la concentration en VEs dans l'échantillon de plasma initial. Une approche similaire a déjà été reportée dans la littérature pour l'étude de particules virales (Hammond et al., 1981) mais le concept n'a jamais été utilisé pour la quantification de VEs.

La fiabilité et la reproductibilité de cette méthode de sédimentation de VEs sur grille ont dans un premier temps été évaluées. Il est en effet nécessaire de s'assurer que les VEs sédimentées sur le film de carbone ne sont pas perdues lors de la récupération des grilles de MET. Une suspension de globules rouges lysés de concentration connue a été sédimentée sur grille puis les GR-L ont été comptabilisés.  $75 \pm 15\%$  des GR-L effectivement présents dans l'échantillon initial sont retrouvés sur la grille après centrifugation, sur la base de trois observations indépendantes. Une expérience complémentaire a démontré que le surnageant ne contient plus aucun GR-L après l'étape de centrifugation, signifiant que les conditions de centrifugation utilisées sont suffisantes pour sédimenter l'intégralité des GR-L contenus dans le tube. Bien que la majorité des GR-L soient adsorbés sur le film de carbone de la grille de MET, il est donc probable qu'un petit pourcentage d'entre eux soit perdu lors de l'étape de récupération des grilles. Nous avons malgré tout considéré ces résultats comme satisfaisants et avons reproduit ces expériences avec des échantillons de plasma, après marquage par des NpAu-AnxA5, des NpAu-anti-CD235a ou des NpAu-anti-CD41. La **figure 55** présente une sélection d'images de MET de VEs marquées par des NpAu-Protéine après sédimentation sur grille. La taille des VEs déterminée par la méthode de sédimentation sur grille est comprise entre 80 nm et 8  $\mu$ m, mais 95% des vésicules mesurent moins d'un micron, avec un diamètre moyen de  $275 \pm 150$  nm. Les VEs ne sont cependant pas observées dans leur état natif car elles ont subi une étape de centrifugation à haute vitesse puis ont été séchées, ce qui peut affecter leur taille et leur morphologie. Considérant qu'une VE sphérique s'aplatit durant ce processus pour former une sorte de double disque, sa taille apparente est probablement légèrement à sa taille réelle. En première approximation, nous estimons que ce diamètre moyen de 275 nm est en réalité plus proche de 200 nm pour une sphère.



**Figure 55 : Images de MET de VEs sédimentées sur grille de MET, après marquage par des NpAu-Protéine.** (A-B) VEs sphériques marquées par des NpAu-AnxA5, qui exposent donc la PS. Ces VEs sont classées dans la catégorie des VEs sphériques sur la base des observations précédentes de cryo-MET, bien que leur forme puisse être légèrement modifiée par les étapes de sédimentation et/ou de séchage. De rares VEs sphériques non marquées sont parfois visibles, signalées par des flèches noires sur l'image B. (C) VE tubulaire non marquée par des nanoparticules. Elle est malgré tout aisément observable grâce à sa forme et à sa taille. Une VE sphérique marquée par des NpAu-AnxA5 est visible à gauche du tube. (D) VE tubulaire marquée par des NpAu-AnxA5. Ces VEs tubulaires exposant la PS sont assez rares. Une (ou deux) VE(s) sphérique(s) marquée(s) par des NpAu-AnxA5 sont visibles à gauche du tube. (E) Ery-G intégralement marqué par des NpAu-AnxA5. (F) Histogramme de taille des VEs obtenu par sédimentation sur grille, établi à partir de 500 images de VEs provenant de trois grilles de MET indépendantes. Les barres d'erreurs correspondent à l'écart-type entre les trois échantillons observés. L'analyse des grilles de MET est réalisée de manière identique à l'analyse des grilles de cryo-MET (*cf.* Figure 42).

Les proportions des différentes sous-populations de VEs obtenues par sédimentation sur grille sont très différentes des résultats obtenus par cryo-MET, confirmant l'hypothèse du fish-net artefact présentée précédemment. Les VEs sphériques représentent ainsi plus de 95% du nombre total de VEs, tandis que les VEs tubulaires et les grands fragments membranaires représentent respectivement moins de 5 et de 0.5% de ce même total. Malgré la faible proportion de VEs tubulaires et de grands fragments membranaires, ils ne doivent pas pour autant être ignorés. Prenons l'exemple des Ery-G. Considérons que leur surface membranaire est équivalente à celle d'un globule rouge, soit  $135 \mu\text{m}^2$  (Tomishige et al., 1998) et assimilons les VEs sphériques à des sphères de 200 nm de diamètre. Dans ces conditions, chaque Ery-G possède une surface membranaire équivalente à celle de 700 VEs sphériques. Ainsi, bien qu'ils soient 500 fois moins nombreux que les VEs sphériques exposant la PS, la surface membranaire développée par les Ery-G est du même ordre de grandeur que celle développée par les VEs sphériques exposant la PS. Les Ery-G pourraient donc contribuer de manière significative à d'éventuels phénomènes impliquant l'exposition de molécules membranaires. Ce même raisonnement est également applicable aux VEs tubulaires. Les fortes concentrations en sels et en protéines du plasma sanguin rendent les grilles obtenues par cette méthode difficilement analysables par MET. L'incubation préalable des échantillons de plasma avec des NpAu-Protéine permet cependant d'identifier les VEs de manière univoque

grâce à la forte densité du marquage par les nanoparticules. Les trois types morphologiques déterminés par les expériences de cryo-MET précédentes (VEs sphériques, VEs tubulaires et grands fragments membranaires) sont à nouveau observés. Nous avons dans un premier temps quantifié les Ery-G, qui sont aisément reconnaissables par leur taille, leur forme et leur marquage dense par les NpAu-AnxA5 ou par les NpAu-anti-CD235. Leur concentration est de  $60 \pm 30$  Ery-G par  $\mu\text{L}$  de plasma pur. Nous avons précédemment émis l'hypothèse que les Ery-G étaient des globules rouges en fin de vie accomplissant leur dernier tour de piste avant d'être éliminés. Cette valeur de 60 Ery-G par  $\mu\text{L}$  est très proche du nombre de globules rouges qui sont éliminés par l'organisme en quelques minutes. La quantification des autres types de vésicules est effectuée selon une méthode de comptage stricte : seules les VEs présentant une forme sphéroïde ou tubulaire bien définie, ainsi qu'un marquage dense et homogène par les NpAu-Protéine, sont comptabilisées. La **figure 56** présente les concentrations respectives des différentes sous-populations de VEs déterminées par cette méthode.

	VEs sphériques	VEs tubulaires	Grands fragments	
			1 - 6 $\mu\text{m}$	6 - 8 $\mu\text{m}$
VEs exposant de la PS	$28000 \pm 7000$	$220 \pm 100$	ND	$60 \pm 30$
VEs érythrocytaires	$2600 \pm 600$	$1800 \pm 800$	ND	$60 \pm 30$
VEs plaquettaires	$11500 \pm 5500$	$220 \pm 100$	ND	0
Total des VEs	> 95%	< 5%	< 0,5%	

**Figure 56: Concentration des différentes sous-populations de VEs déterminée par sédimentation sur grille de MET, en nombre de VEs par  $\mu\text{L}$  de PFP.** Les VEs exposant la PS, ainsi que celles d'origine érythrocytaire et plaquettaire ont été identifiées respectivement par le marquage avec les NpAu-AnxA5, les NpAu-anti-CD235a et les NpAu-anti-CD41. La quantification des grands fragments membranaires est réalisée en scannant 100 carreaux à faible grossissement ( $\times 300$ ). La quantification des VEs de taille submicrométrique est effectuée en scannant 5 carreaux choisis aléatoirement sur la grille à fort grossissement ( $\times 5000$ ). Les concentrations sont calculées de la façon suivante : le nombre de VEs comptabilisées sur la surface équivalente à cinq carreaux ( $2750 \mu\text{m}^2 \times 5 = 13750 \mu\text{m}^2$ ) est extrapolé au nombre total de VEs sédimentées sur la totalité de la surface du support en résine ( $113 \text{ mm}^2$ ), puis divisé par le volume de PFP utilisé pour l'expérience ( $100 \mu\text{L}$ ). Ces chiffres sont obtenus après analyse de 11 grilles indépendantes et les écarts-type ont été calculés à partir de ces 11 expériences indépendantes. ND = absence de données.

Cette méthode de sédimentation sur grille ne permet pas de comptabiliser les VEs non marquées par les NpAu-Protéine, empêchant de quantifier l'intégralité des VEs. Il est cependant possible d'estimer la concentration totale des VEs en combinant les informations obtenues par sédimentation sur grille et par cryo-MET. Bien que la cryo-MET ne permette pas de quantifier les VEs ou d'estimer correctement les proportions des différentes morphologies de VEs, la répartition des différents phénotypes des VEs sphériques peut en effet être considérée comme fiable, car les VEs sphériques ne sont pas affectées par le fish-net artefact. Nous avons déterminé par cryo-MET que la proportion de VEs sphériques exposant la PS est d'environ 50%. Les nombre de VEs sphériques exposant la PS obtenu par sédimentation sur grille étant de 27.000 par  $\mu\text{L}$  de plasma pur, la concentration totale des VEs sphériques est au moins égale à 50.000 VEs par  $\mu\text{L}$  de plasma pur. Parallèlement à ces études par MET, Nicolas Arraud et Céline Gounou ont quantifié les VEs exposant la PS par CF, à l'aide d'une méthode originale de CF détectant les VEs sur la base de leur signal de fluorescence. Rappelons que cette méthode permet de détecter environ 50 fois plus de VEs que les méthodes de CF conventionnelles basées sur la détection du signal de diffusion de la lumière, abaissant la limite de détection aux VEs de 100-150 nm de diamètre. De manière intéressante, cette étude par CF estime le nombre de VEs exposant la PS à  $22\,326 \pm 206$  VEs par  $\mu\text{L}$  de plasma pur, ce qui est très proche des valeurs obtenues par sédimentation sur grille de MET et nous conforte dans la validité de ces chiffres.

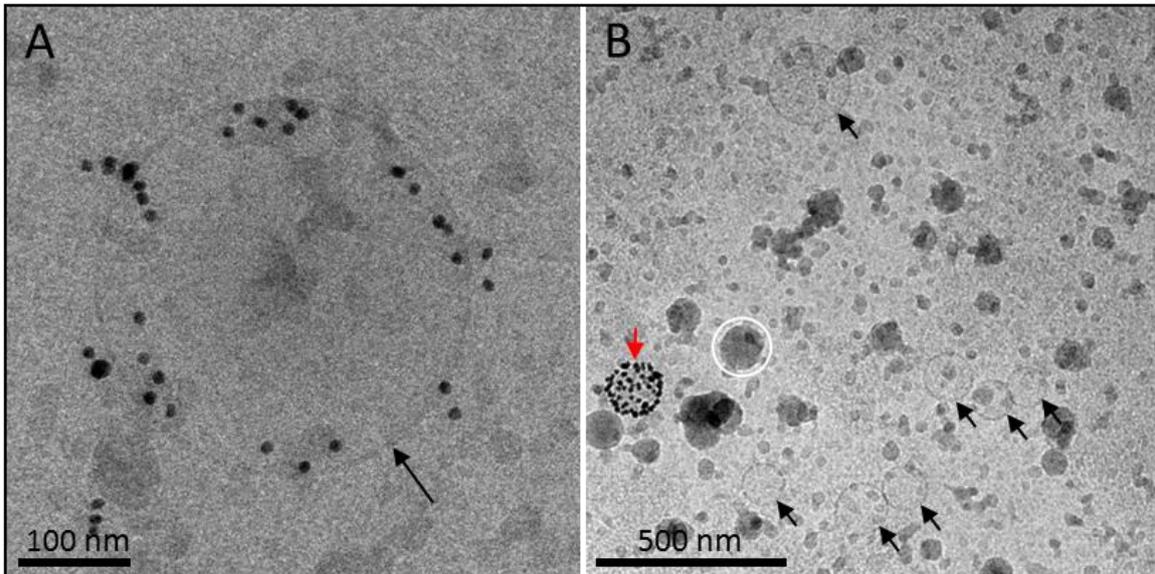
Les plaquettes résiduelles présentes dans le plasma ont également été quantifiées et leur nombre est de moins d'une plaquette par  $\mu\text{L}$  de plasma pur, ce qui est négligeable.

### **2.2.3. Adaptation de la méthode à la cryo-MET**

Bien que la sédimentation de VEs sur grille de MET permette de quantifier de manière fiable certaines des sous-populations de VEs précédemment observées par cryo-MET, elle possède des limitations. La première limitation, évoquée précédemment, est le faible contraste de la majorité des VEs. Ceci rend obligatoire le marquage par des nanoparticules d'or, sans lequel il est difficile de se prononcer avec certitude sur la nature de l'objet observé. Nos tentatives d'augmenter le contraste des VEs par des méthodes classiques de coloration négative avec des sels de métaux lourds n'ont pas abouti, probablement à cause de la grande quantité de

protéines et de sels présents dans le plasma. Nous avons également constaté lors des expériences de cryo-MET que toutes les NpAu-Protéine ne permettaient pas d'obtenir une même densité de marquage, que ce soit à cause d'un nombre de récepteurs plus faible à la surface des VEs ou d'une moins bonne affinité des nanoparticules. Pour obtenir des résultats fiables par sédimentation sur grille, il est nécessaire de n'utiliser que des NpAu-Protéine offrant un marquage dense et uniforme comme les NpAu-AnxA5, les NpAu-anti-CD235a ou les NpAu-anti-CD41, afin de pouvoir identifier les VEs marquées de manière univoque. Ceci exclut par exemple l'usage de NpAu-anti-CD45 ou de NpAu-anti-CD9 dont la spécificité de marquage est bonne mais dont la densité de marquage est faible. Enfin, le nombre de vésicules de taille inférieure à 100 nm est très probablement sous-estimé avec cette méthode. La cryo-MET a en effet révélé que cette population de VEs est rarement marquée par les NpAu-Protéine. De plus, même en cas de marquage, leur petite taille rend malgré tout leur identification difficile. Afin de s'affranchir de la plupart de ces limitations, nous avons tenté de combiner la méthode de sédimentation de VEs sur grille de MET et une préparation de type cryo-MET. Le plasma est incubé avec des NpAu-Protéine et centrifugé sur grille de manière classique, mais au lieu de laisser sécher la grille à l'air libre, celle-ci est congelée comme le serait une grille de cryo-MET standard. L'excédent de liquide est absorbé avec un papier filtre et la grille est rapidement plongée dans un bain d'éthane liquide, puis observée à basse température avec un cryo-microscope. La **figure 57** présente deux images de VEs obtenues par cette méthode. Les VEs sont observées dans leur état natif et hydraté, ce qui se traduit par une forme parfaitement sphérique et une bicouche lipidique bien visible. Le problème du manque de contraste de la méthode de sédimentation sur grille est absent et comme pour une préparation par cryo-MET classique, l'intégralité des VEs est visible, qu'elles soient marquées par des NpAu-Protéine ou non. De manière similaire à la centrifugation sur grille conventionnelle et contrairement à la cryo-MET, un grand nombre de VEs est observé par unité de surface. Cette méthode combine les avantages de la sédimentation sur grille et de la cryo-MET sans en avoir les inconvénients, permettant de caractériser totalement les VEs d'un échantillon de plasma en déterminant leur morphologie, leur taille, leur phénotype et leur concentration précise. Bien que ces images soient prometteuses, nous nous sommes heurtés à des problèmes majeurs de reproductibilité. Contrairement aux grilles utilisées pour la cryo-MET conventionnelle, les grilles utilisées pour cette méthode sont recouvertes d'un film de carbone continu, qui rend l'étape de blotting difficilement contrôlable. Avec une grille de cryo-

MET, l'excédent de liquide passe au travers des pores du film de carbone et est absorbé par le papier-filtre. Ceci permet l'obtention après congélation d'un mince film d'échantillon vitrifié, d'épaisseur régulière et contrôlée. L'épaisseur du film est beaucoup plus difficile à contrôler avec un film de carbone continu à la surface de la grille. Il en résulte des échantillons impossibles à observer à cause d'une épaisseur de glace trop faible ou trop élevée.



**Figure 57 : Images de VEs obtenues par sédimentation sur grille de MET puis préparation de type cryo-MET.** (A) VE sphérique de 340 nm de diamètre adsorbée sur le film de carbone continu de la grille de MET et marquée par des NpAu-AnxA5. Elle est de forme parfaitement circulaire contrairement aux VEs observées par sédimentation sur grille après séchage. La bicouche lipidique est visible malgré la centrifugation et l'adsorption sur le film de carbone. La VE n'est marquée que par une trentaine de NpAu-AnxA5 et est un bon exemple de vésicule qui n'aurait probablement pas été comptabilisée avec la méthode de sédimentation sur grille classique à cause d'un marquage trop faible. (B) Plusieurs VEs sphériques sont visibles sur ce champ de 1.5 µm de côté, de manière similaire à la sédimentation sur grille après séchage et contrairement à ce que l'on peut observer en cryo-MET conventionnelle, où les objets sont souvent séparés par plusieurs dizaines de µm. Plusieurs de ces VEs sont visibles malgré l'absence de marquage par les NpAu-AnxA5 (flèches noires). Une VE sphérique densément marquée par des NpAu-AnxA5 (flèche rouge) et exposant donc la PS est visible à gauche de l'image. De nombreux contaminants sont présents sur ces deux images (cercle blanc en B).

Malgré plusieurs dizaines de tentatives, seules quelques grilles observables ont pu être obtenues, chacune ne comportant que quelques carreaux de bonne qualité. Nous avons étudié l'influence de différents paramètres durant l'étape de blotting, tels que le temps de

contact entre le papier-filtre et la grille, le type de papier-filtre, l'endroit de la grille où est appliqué le papier ou encore les conditions d'humidité de l'atmosphère, sans succès jusqu'à présent. Ces expériences n'ont pu être poursuivies par manque de temps. L'étude exhaustive des paramètres de congélation, ainsi que l'utilisation d'un appareil de congélation automatisé de type Leica EM GP permettant une grande reproductibilité lors de l'étape de blotting, pourraient probablement améliorer la qualité globale des grilles. Il est également nécessaire de vérifier que les VEs adsorbées sur la grille ne sont pas perdues durant l'étape de blotting. Si ces problèmes sont résolus, cette méthode pourrait permettre une meilleure caractérisation des VEs, en combinant les avantages de la cryo-MET et de la sédimentation de VEs sur grille.

### 2.3. Conclusion

L'étude des VEs par cryo-MET a révélé l'existence de trois morphologies principales au sein du plasma sanguin, les VEs sphériques, les VEs tubulaires et les grands fragments membranaires. Les VEs tubulaires et les grands fragments membranaires n'avaient jamais été décrits auparavant. Le marquage par des NpAu-AnxA5 a permis d'identifier les VEs exposant la PS, démontrant que seule une fraction des VEs du plasma sanguin en expose, contrairement à un dogme largement répandu. Les NpAu-AnxA5 ont également permis de mettre en évidence l'existence dans le plasma de grands fragments membranaires de 6 à 8  $\mu\text{m}$  exposant la PS. L'utilisation de NpAu-anti-CD235a, de NpAu-anti-CD41 et de NpAu-anti-CD45 ont ensuite permis d'identifier et de caractériser des VEs d'origine érythrocytaire, plaquettaire et leucocytaire. Les grands fragments membranaires exposant la PS se sont révélés être d'origine érythrocytaire. Nous avons établi que ces objets sont des globules rouges en fin de vie et vidés de leur contenu en hémoglobine, que nous avons nommés « Ery-Ghosts ». Des NpAu-anti-CD63 et des NpAu-anti-CD9 ont ensuite été utilisées pour identifier des exosomes. Aucune VE exposant le CD63 et seulement de rares VEs exposant l'antigène CD9 ont pu être observées. Des NpAu-anti-CD326 ont été utilisées avec succès pour marquer des VEs dans le milieu de culture de cellules tumorales PanC-1.

Nous avons développé une méthode originale de sédimentation de VEs sur grille de MET afin de quantifier les VEs. Cette méthode, combinée à de l'immunomarquage par des NpAu-AnxA5, des NpAu-anti-CD235a et des NpAu-anti-CD41, nous a permis de déterminer que le plasma

contenait environ 95 % de VEs sphériques, 5 % de VEs tubulaires et moins de 1 % de grands fragments membranaires. Cette méthode a également permis de déterminer de manière objective la concentration des VEs dans le plasma, aboutissant à une valeur d'environ 100.000 VEs par  $\mu\text{L}$ , dont seulement 30 % exposent la PS. Le plasma contient également en moyenne 60 Ery-G par  $\mu\text{L}$ . Ces résultats ont été confirmés par une étude de CF menée en parallèle. Nous avons ensuite souhaité combiner sédimentation sur grille de MET et préparation de type cryo-MET. Des résultats encourageants ont été obtenus, permettant d'observer et de quantifier les VEs présentes sur la grille. Des expériences complémentaires sont néanmoins nécessaires pour mettre au point et valider cette approche

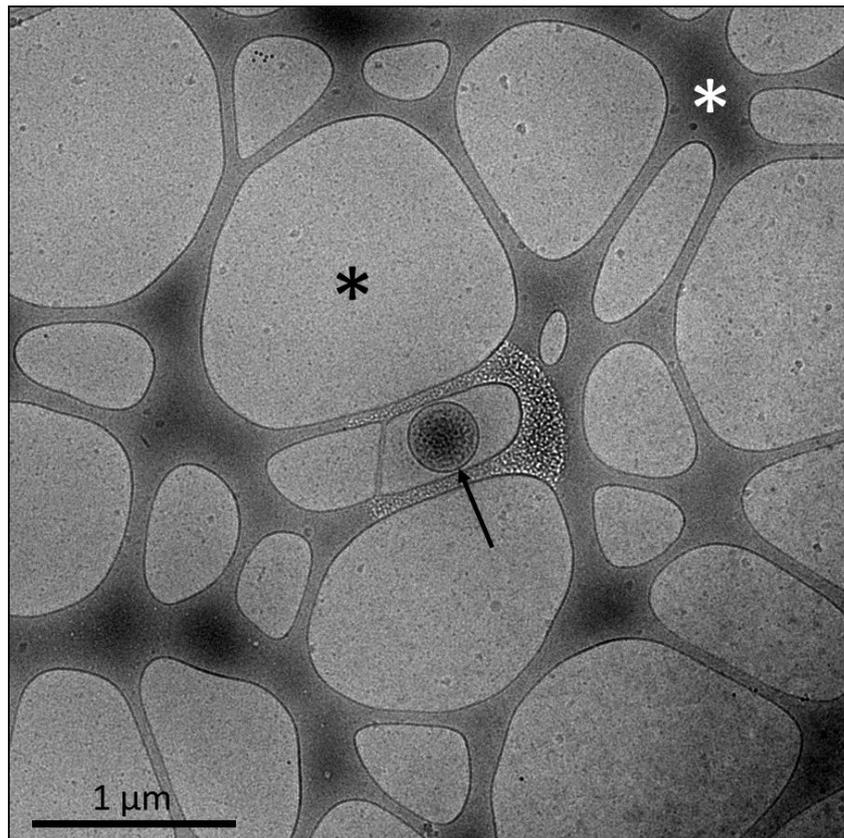
### 3. Etude de l'agrégation de VEs induite par l'ultracentrifugation

Comme exposé dans l'introduction, l'utilisation de méthodes d'isolation adaptées est capitale pour l'étude des VEs, afin de déterminer leurs caractéristiques physiques, leur composition ou leurs fonctions. L'ultracentrifugation est la méthode d'isolation la plus répandue dans le domaine des VEs. Certains résultats préliminaires nous ont suggéré que l'ultracentrifugation pouvait entraîner l'agrégation de VEs. Nous avons donc étudié l'influence de cette méthode d'isolation sur l'agrégation des VEs du plasma sanguin par cryo-MET, sédimentation sur grille et CF. Cette section présentera brièvement les résultats de l'article « High-speed centrifugation induces aggregation of extracellular vesicles » (Linares et al., 2015), dont la version intégrale est présentée en annexe.

Au niveau expérimental, 1.5 mL de plasma a été mélangé à 3 mL de tampon CF, puis l'ensemble a été centrifugé à 100.000 g pendant 1 h à 20°C. Après centrifugation, 3.8 mL de surnageant ont été éliminés et le culot a été resuspendu dans du tampon CF supplémenté de PPACK. Ce culot resuspendu est appelé Plasma-100k.

#### 3.1. Comparaison entre plasma et plasma-100k par cryo-MET

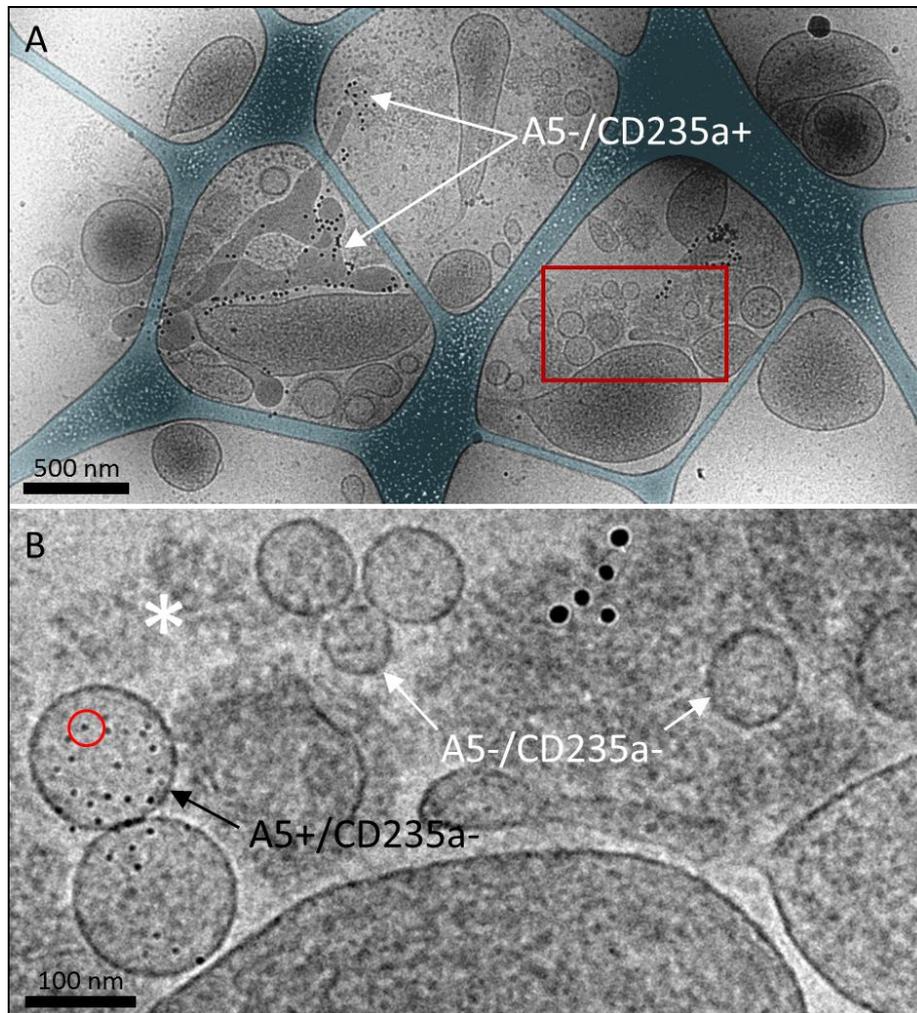
Du plasma non centrifugé et du plasma 100k ont été incubés avec des NpAu-AnxA5 de 4 nm ainsi qu'avec des NpAu-anti-CD235 ou des NpAu-anti-CD41, puis ont été congelés et observés par cryo-MET. Dans le cas du plasma non centrifugé, les VEs observées sont rares, isolées et généralement séparées par quelques dizaines de  $\mu\text{m}$ , comme illustré en **figure 58**.



**Figure 58 :** Image de cryo-MET représentative d'un échantillon de plasma non centrifugé. Une VE sphérique isolée est visible au centre de l'image, indiquée par une flèche noire. La VE est enrobée dans du plasma vitrifié, signalé par l'astérisque noir. Le film de carbone perforé est indiqué par un astérisque blanc.

Dans le cas du plasma-100k, de nombreux agrégats de vésicules sont observés sur la grille. La **figure 59** présente un exemple représentatif d'agrégat de VEs induit par l'ultracentrifugation, observé par cryo-MET. Pouvant mesurer jusqu'à plusieurs microns, ces agrégats sont notamment composés de VEs sphériques, de VEs tubulaires et de fragments membranaires de taille et de morphologie variées. Du matériel amorphe et non vésiculaire est également visible au sein de certains agrégats. Notre hypothèse est que ce matériel est composé d'agrégats protéiques et se comporte comme une sorte de colle qui maintient les VEs ensemble, même après resuspension du culot suite à l'ultracentrifugation. Le marquage de l'échantillon par des nanoparticules d'or conjuguées à des protéines révèle l'hétérogénéité des VEs au sein d'un même agrégat. Les VEs composant les agrégats peuvent en effet exposer des phénotypes très différents. L'agrégat visible en **figure 59** a été incubé avec des NpAu-AnxA5 de 4 nm et des NpAu-anti-CD235a de 10 nm. Certaines VEs sont d'origine

érythrocytaire, d'autres exposent la PS, d'autres encore ne sont marquées par aucun des marqueurs utilisés. Cette hétérogénéité est également constatée lorsque des NpAu-anti-CD41 sont utilisés.

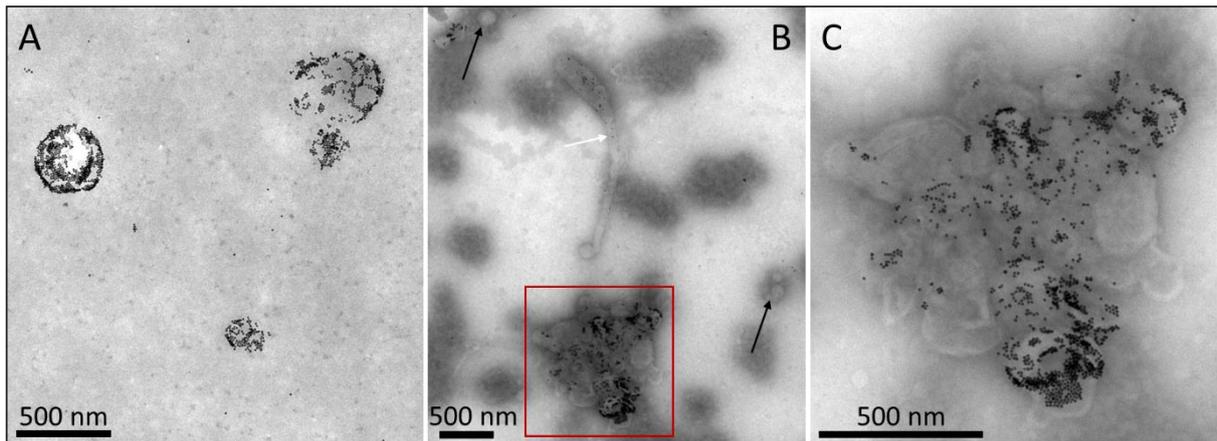


**Figure 59 : Images représentatives de plasma-100k observé par cryo-MET, après marquage par des NpAu-AnxA5 de 4 nm et de NpAu-anti-CD235a de 10 nm.** (A) Agrégat de VEs de tailles et de morphologies variées. Des VEs sphériques et tubulaires sont notamment visibles. Les flèches blanches pointent deux VEs de forme tubulaire, qui sont marquées par les NpAu-anti-CD235a et sont donc d'origine érythrocytaire. Ces VEs ne sont pas marquées par les NpAu-AnxA5 et n'exposent donc pas la PS. Le film de carbone est coloré en bleu afin de le distinguer de l'agrégat de VEs. (B) Agrandissement de la zone encadrée en rouge sur l'image A. Les flèches blanches indiquent de petites VEs négatives pour les deux types d'immunomarquage. La flèche noire pointe une VE marquée par les NpAu-AnxA5, exposant donc la PS. L'astérisque blanc signale du matériel amorphe et non vésiculaire lié à l'agrégat.

### 3.2. Comparaison entre plasma et plasma-100k par sédimentation sur grille de MET

Nous avons ensuite quantifié les agrégats et les VEs présents dans le plasma-100k. La cryo-MET n'est cependant pas adaptée à la quantification, à cause du phénomène de fish-net artefact décrit précédemment en figure 54. Les agrégats de grande taille seraient en effet retenus préférentiellement sur la grille, ce qui fausserait les résultats. Nous avons donc choisi de réutiliser la méthode de sédimentation de VEs sur grille de MET, préalablement employée pour quantifier les VEs du plasma sanguin. Du plasma et du plasma-100k ont été marqués par des NpAu-AnxA5, sédimentés sur grille, puis observés par MET. La **figure 60** présente des images de MET de VEs obtenues par cette méthode. Comme dans le cas de la cryo-MET, les VEs observées dans le plasma sont isolées et distribuées de manière homogène à la surface de la grille (**Figure 60-A**). Dans le cas du plasma-100k, des agrégats de vésicules sont observés en plus des VEs isolées (**Figure 60-B**). Ces agrégats sont généralement en partie marqués par les NpAu-AnxA5 (**Figure 60-C**). Ces données confirment les observations précédentes de cryo-MET.

La concentration en VEs exposant la PS et en agrégats de VEs ont été déterminées dans le plasma et le plasma-100k, par deux expériences indépendantes. La quantité de VEs exposant la PS passe de  $29.500 \pm 500$  VEs /  $\mu\text{L}$  dans le cas du plasma à  $11.500 \pm 500$  VEs /  $\mu\text{L}$  dans le cas du plasma-100k, soit une diminution d'environ 60 %. Aucun agrégat n'est retrouvé dans le plasma, tandis que leur concentration est de 3000 agrégats /  $\mu\text{L}$  dans le cas du plasma-100k. Ces valeurs sont données à titre indicatif et doivent être considérées avec prudence. En effet, certains paramètres comme les conditions utilisées pour la resuspension du culot sont susceptibles d'affecter la taille et le nombre d'agrégats présents dans l'échantillon.



**Figure 60 : Images de MET représentatives de plasma (A) et de plasma-100k (B-C) sédimentés sur grille de MET, après marquage par des NpAu-AnxA5. (A) VEs isolées marquées par les NpAu-AnxA5. (B) Les flèches noires pointent des VEs isolées. Un agrégat de VEs, partiellement marqué par les NpAu-AnxA5, est encadré en rouge. (C) Agrandissement de la zone encadrée en rouge.**

Ce phénomène d'agrégation de VEs induit par l'ultracentrifugation a été confirmé par des expériences de CF réalisées par Céline Gounou et Nicolas Arraud.

Des résultats similaires ont également été observés lorsque l'ultracentrifugation initiale était effectuée à 20.000 g (données non présentées).

Ces résultats démontrent que les conditions d'ultracentrifugation communément utilisées pour l'isolation de VEs peuvent entraîner l'agrégation de ces dernières. Les agrégats formés contiennent des VEs de taille, morphologie et phénotype différents. Cette agrégation peut entraîner des artefacts lors de l'analyse d'échantillons de VEs isolés par ultracentrifugation et ainsi biaiser les résultats obtenus. Ces résultats confirment certaines études ayant montré ou suggéré l'hypothèse d'une agrégation de VEs induites par l'ultracentrifugation (Erdbrügger et al., 2014; Issman et al., 2013; Théry et al., 2006). Il est donc important de développer des méthodes de purification alternatives comme l'immunomagnétophorèse, la CET ou la filtration. C'est dans ce contexte que s'inscrit la dernière section du chapitre « Résultats et discussions », consacré à l'isolation de VEs à l'aide de particules magnétiques conjuguées à des protéines.

#### 4. Isolation de VEs exposant la PS à l'aide de particules magnétiques conjuguées à l'AnxA5, par MET et CF

Afin d'aller plus loin dans notre démarche de caractérisation des VEs, nous avons développé une méthode d'isolation spécifique de VEs utilisant des particules magnétiques conjuguées à l'AnxA5 (PMag-AnxA5), pour capturer et isoler des VEs exposant la PS. Le principe de cette méthode, aussi appelée immunomagnétophorèse, a été exposé précédemment en **figure 18** dans le chapitre « Matériels et méthodes ». Le chapitre précédent a mis en évidence la complexité des VEs, qui constituent un ensemble très hétérogène du point de vue de leur taille, de leur forme et de leur composition moléculaire. Les méthodes de purification de VEs les plus couramment utilisées, comme l'ultracentrifugation ou la chromatographie d'exclusion de taille ne sont pas spécifiques et permettent seulement de séparer les VEs selon leurs caractéristiques physiques, comme leur taille ou leur densité. Nous avons de plus démontré que l'ultracentrifugation est responsable de l'agrégation artefactuelle de VEs. Le fait de pouvoir isoler une population connue de VEs pures sélectionnées sur la base d'un antigène de surface est également intéressant, par exemple dans l'optique de réaliser des études protéogéno-lipidomiques. Cet antigène peut être la PS ou bien un marqueur d'origine cellulaire ou cancéreux.

Deux types de particules magnétiques ont été utilisés au cours de cette étude. Des nanoparticules magnétiques de 50 nm de diamètre (50nm-PMag) nous ont été fournies par les D<sup>rs</sup> S. Mornet et L. Adumeau, et des particules magnétiques commerciales de 1 µm de diamètre (1µm-PMag) ont été obtenues auprès de la société Ocean Nanotech. Ces 50nm-PMag et ces 1µm-PMag exposent des amines à leur surface et ont ensuite été conjuguées à l'AnxA5 (50nm-PMag-AnxA5 et 1µm-PMag-AnxA5) par un protocole similaire à celui utilisé pour les NpAu-AnxA5. Les 50nm-PMag-AnxA5 et les 1µm-PMag-AnxA5 sont rassemblées sous l'appellation « PMag-AnxA5 ». Nous avons tout d'abord choisi d'étudier la liaison des PMag-AnxA5 à des globules rouges lysés, par MET. Les PMag-AnxA5 ont ensuite été utilisées pour isoler des GR-L et des VEs exposant la PS contenues dans le plasma. L'efficacité de l'extraction magnétique a été évaluée par CF et des conditions optimales d'isolation ont été déterminées. La préparation des échantillons, l'acquisition des données et l'analyse des expériences de CF présentées dans ce chapitre ont été réalisées conjointement

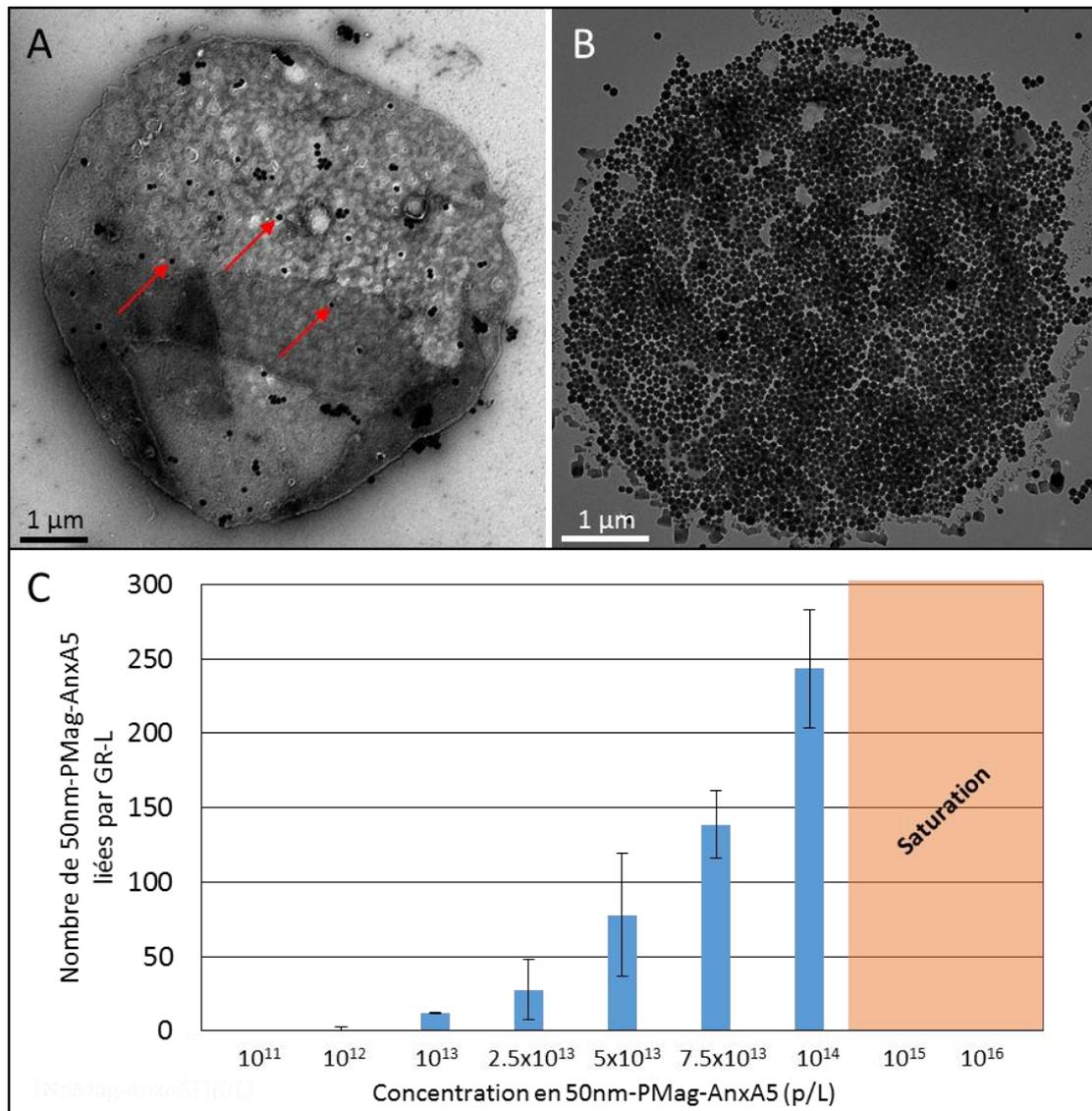
par Céline Gounou et moi-même, ainsi que par un étudiant en Master 2 que nous avons encadré, Yan Boucaud.

#### **4.1. Etude de la liaison de particules magnétiques conjuguées à l'AnxA5 à des GR-L, par MET**

Les GR-L sont un excellent modèle de membrane exposant la PS, et ont de plus l'avantage d'être facilement identifiables par MET grâce à leur taille et à leur forme. Des globules rouges ont été lysés par choc osmotique, après une dilution par 200 dans de l'eau, puis incubés pendant 2 heures avec des concentrations de PMag-AnxA5 variables, en présence de  $\text{Ca}^{2+}$ . Les GR-L marqués sont ensuite observés par MET après adsorption sur une grille de cuivre recouverte d'un film de carbone. Le nombre moyen de PMag-AnxA5 liées par GR-L en fonction de la concentration a été déterminé pour chaque type de PMag-AnxA5.

##### **4.1.1. Liaison de 50nm-PMag-AnxA5 à des GR-L**

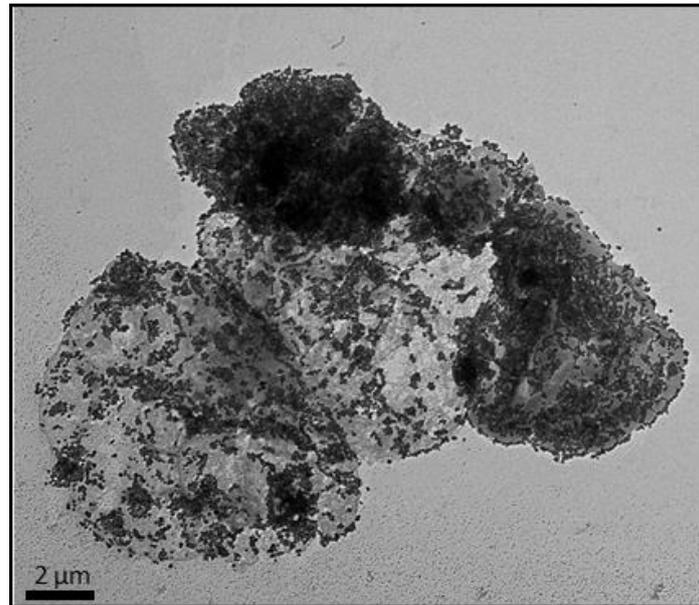
Dans un premier temps, nous avons étudié la liaison des 50nm-PMag-AnxA5 aux GR-L. Les résultats de ces expériences sont présentés en **figure 61**. De manière attendue, le nombre de 50nm-PMag-AnxA5 liée par GR-L augmente avec la concentration en 50nm-PMag-AnxA5. Une liaison faible est observée à des concentrations inférieures à  $10^{13}$  p/L puis le nombre de particules liées augmente rapidement entre  $10^{13}$  p/L et  $10^{14}$  p/L, pour atteindre plusieurs centaines de 50nm-PMag-AnxA5 par GR-L. La saturation de la surface des GR-L est atteinte à partir d'une concentration de  $10^{15}$  p/L. L'influence de la concentration en 50nm-PMag-AnxA5 sur l'extraction des GR-L sera décrite ultérieurement.



**Figure 61 : Etude de la liaison de nanoparticules magnétiques de 50 nm de diamètre conjuguées à l'AnxA5 (50nm-PMag-AnxA5) à des GR-L, par MET.** (A-B) Images de MET de GR-L marqués par des 50nm-PMag-AnxA5, à des concentrations de  $7.5 \times 10^{13}$  p/L (A) et  $10^{15}$  p/L (B). Le GR-L présenté en A est décoré par environ 130 particules magnétiques, tandis que celui présenté en B en est intégralement recouvert. Dans les deux cas, la proportion de particules non liées est très faible, illustrant la forte spécificité de marquage des 50nm-PMag-AnxA5. Des flèches rouges pointent des 50nm-PMag-AnxA5 sur l'image A. (C) Histogramme présentant le nombre moyen de 50nm-PMag-AnxA5 liées par GR-L en fonction de la concentration en 50nm-PMag-AnxA5. 60 images de GR-L issues de trois expériences indépendantes ont été analysées pour chaque concentration. Les écarts-type ont été calculés à partir de ces trois expériences indépendantes. Le comptage des particules magnétiques liées est réalisé manuellement. La zone orangée de l'histogramme signalée par le mot « saturation » indique des concentrations pour lesquelles les 50nm-PMag-AnxA5 recouvrent l'intégralité des GR-L et sont difficilement discernables les unes des autres.

Nous avons observé un phénomène d'agrégation des GR-L, qui sont parfois regroupés en ensembles de quelques objets. Un de ces agrégats de GR-L est présenté en **figure 62**.

Cette agrégation est certainement causée par le fait que chaque 50nm-PMag-AnxA5 est conjuguée à plusieurs molécules d'AnxA5 et est donc capable de se lier à plusieurs GR-L simultanément. Ce phénomène d'agrégation sera abordé plus en détail ultérieurement.



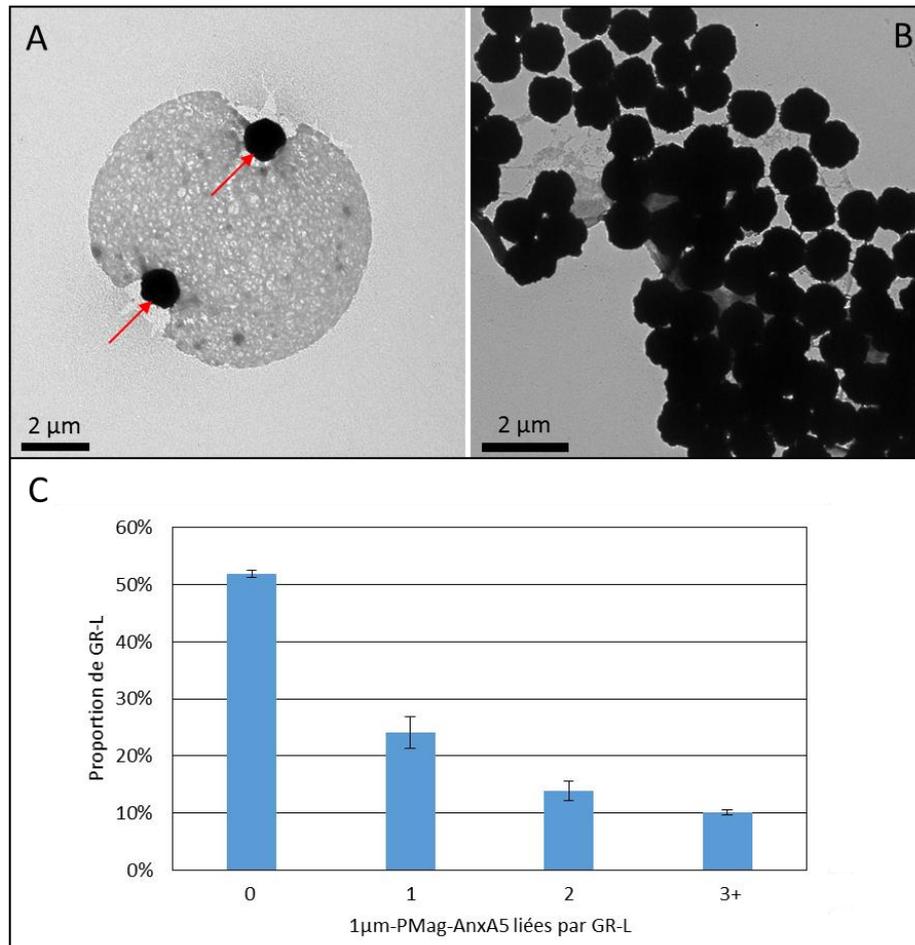
**Figure 62 : Image de MET de GR-L agrégés en présence de 50nm-PMag-AnxA5 et de  $Ca^{2+}$ .**

L'influence du temps d'incubation entre les 50nm-PMag-AnxA5 et les GR-L a ensuite été étudiée. Des GR-L ont été incubés avec des 50nm-PMag-AnxA5 à une concentration de  $10^{14}$  p/L, avec des temps d'incubation compris entre 15 minutes et 16 heures. Les GR-L ont ensuite été observés par MET comme décrit précédemment et le nombre de 50nm-PMag-AnxA5 liées par GR-L a été déterminé (données non présentées). Le nombre de particules liées par GR-L atteint 60% de sa valeur maximale après 15 minutes d'incubation puis continue d'augmenter jusqu'à atteindre un plateau après deux heures. Par conséquent, un temps d'incubation entre GR-L et PMag-AnxA5 de deux heures a été choisi pour l'intégralité des expériences d'extraction magnétique.

#### 4.1.2. Liaison de 1 $\mu$ m-PMag-AnxA5 à des GR-L

Comme pour les 50nm-PMag-AnxA5, nous avons étudié la liaison à des GR-L des particules magnétiques de 1  $\mu$ m conjuguées à l'AnxA5. Des GR-L ont été incubés avec des 1 $\mu$ m-PMag-AnxA5 à  $10^{11}$  ou à  $10^{12}$  p/L pendant 2 heures, puis le nombre de 1 $\mu$ m-PMag-AnxA5 liées par GR-L a été déterminé par MET. La concentration particule des 1 $\mu$ m-PMag-AnxA5 est environ 1000 fois inférieure à celle des 50nm-PMag-AnxA5, du fait de leur diamètre et de leur volume nettement plus grand que celui des particules de 50 nm. Les résultats de ces expériences sont présentés en **figure 63**.

Pour une concentration de  $10^{11}$  p/L, les GR-L ne sont décorés au maximum que par quelques particules. Environ 40% des GR-L ne sont liés à aucune 1 $\mu$ m-PMag-AnxA5, tandis que les pourcentages de GR-L ayant lié 1, 2 ou 3 et plus 1 $\mu$ m-PMag-AnxA5 sont respectivement de 24%, 14% et 10%. Le phénomène d'agrégation de GR-L décrit dans le cas des 50nm-PMag-AnxA5 se manifeste également avec ces particules de 1  $\mu$ m, chacune d'entre elles exposant de nombreuses molécules d'AnxA5. Pour une concentration de  $10^{12}$  p/L, la détermination du nombre de 1 $\mu$ m-PMag-AnxA5 par GR-L est complexe car les GR-L sont majoritairement agrégés et recouverts par les 1 $\mu$ m-PMag-AnxA5, en plus d'être difficilement discernables sur les images de MET (**figure 63-B**). L'influence de la concentration en 1 $\mu$ m-PMag-AnxA5 sur l'extraction des GR-L sera présentée ultérieurement.



**Figure 63 : Etude de la liaison de particules magnétiques de 1 µm de diamètre conjuguées à l'AnxA5 (1µm-PMag-AnxA5) à des GR-L, par MET.** (A-B) Images de MET de GR-L marqués par des 1µm-PMag-AnxA5, à des concentrations de  $10^{11}$  p/L (A) et  $10^{12}$  p/L (B). Des flèches rouges pointent les 1µm-PMag-AnxA5 sur l'image A. Les GR-L présents sur l'image B sont agrégés et totalement recouverts par les 1µm-PMag-AnxA5. (C) Histogramme décrivant la proportion de GR-L marqués par un nombre donné de 1µm-PMag-AnxA5, pour une concentration en 1µm-PMag-AnxA5 de  $10^{11}$  p/L. 50 images de GR-L provenant de deux expériences indépendantes ont été analysées. Les écarts-type sont calculés à partir de ces deux expériences indépendantes.

#### 4.2. Analyse par CF de l'extraction de membranes exposant la PS contenues dans une suspension de GR-L, à l'aide de PMag-AnxA5

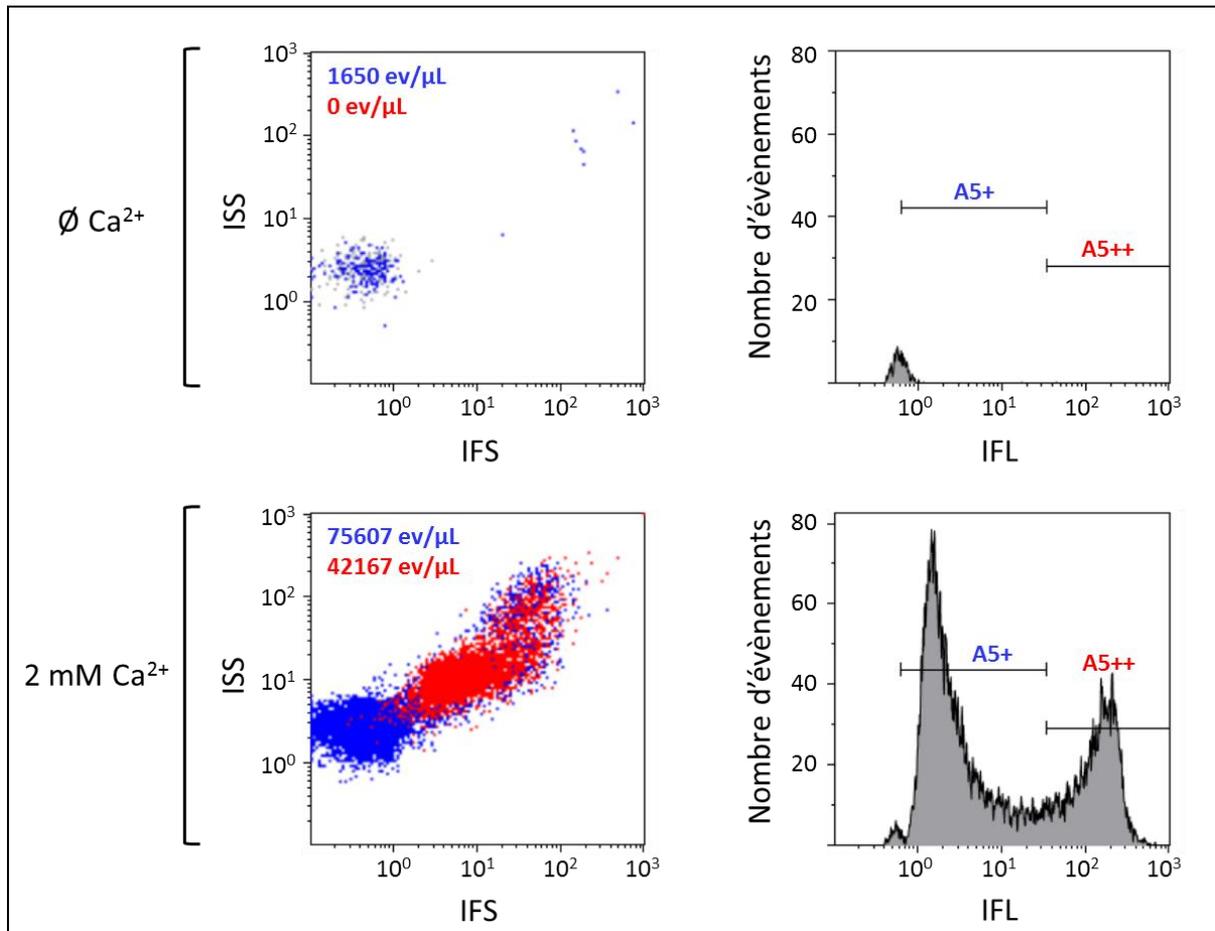
Nous avons ensuite utilisé les PMag-AnxA5 pour isoler les membranes exposant la PS contenues dans une suspension de GR-L. L'efficacité de l'extraction magnétique a été évaluée par CF. La méthode de CF utilisée pour l'intégralité des expériences présentées dans cette section 4 du chapitre « Résultats et discussions » est basée sur la détection du signal de

fluorescence de membranes exposant la PS préalablement marquées par de l'AnxA5 fluorescente (Arraud et al., 2014b). Cette méthode a été présentée précédemment dans la section 12 du chapitre « Matériels et Méthodes ». Les évènements sont détectés en fonction de leur intensité de fluorescence car leur détection en fonction de la diffusion de la lumière est peu adaptée à l'étude des vésicules membranaires. De plus, les particules magnétiques contiennent des métaux qui diffusent fortement la lumière. Elles sont donc détectées par le cytomètre en cas de seuil sur la diffusion de la lumière. Elles ne sont par contre pas fluorescentes, ce qui permet d'éliminer leur signal en utilisant un seuil sur la fluorescence.

#### 4.2.1. Analyse d'une suspension de GR-L dépourvue de PMag-AnxA5

Dans l'optique d'estimer l'efficacité de l'extraction magnétique des membranes exposant la PS par les PMag-AnxA5, il est d'abord nécessaire de caractériser l'échantillon de départ. Une suspension de GR-L a été incubée avec de l'AnxA5-Cy5 en présence de  $Ca^{2+}$  puis analysée par CF, afin de quantifier les membranes exposant la PS présentes dans l'échantillon. Les résultats de cette expérience sont présentés en **figure 64**. En présence de calcium, l'analyse par CF de la suspension de GR-L révèle l'existence de deux populations d'évènements appelées « A5+ » et « A5++ », distinguées par leur intensité de fluorescence. Les évènements fortement fluorescents (A5++) colorés en rouge correspondent pour la plupart aux GR-L, qui peuvent se lier à un grand nombre de molécules d'AnxA5-Cy5 du fait de leur surface membranaire importante. La concentration moyenne des GR-L est de  $42.167 \pm 11.453$  par  $\mu L$  d'une suspension diluée 200 fois. Ceci est cohérent avec la concentration des globules rouges dans le sang, qui est d'environ  $5 \times 10^6$  GR par  $\mu L$  de sang. Les GR sont en effet concentrés environ deux fois par centrifugation après le prélèvement, puis dilués 200 fois lors de l'étape de lyse, ce qui donne une concentration théorique de 50.000 GR-L par  $\mu L$  de suspension diluée 200 fois. La population d'évènements A5+ colorés en bleu sont moins fluorescents et correspondent pour la plupart à des vésicules membranaires de taille submicrométrique, majoritairement formées lors de l'étape de lyse des GR. Leur concentration moyenne est de  $75.607 \pm 15.562$  par  $\mu L$  de suspension de GR-L diluée 200 fois, soit du même ordre de grandeur que les GR-L. Le contrôle négatif de cette expérience de CF est réalisé avec un échantillon de GR-L incubé en présence d'AnxA5-Cy5 mais dépourvu de calcium. La liaison de l'AnxA5 étant strictement dépendante de la présence d'ions  $Ca^{2+}$ , seuls de rares évènements sont observés,

qui correspondent au bruit de fond dû à l'appareillage ou à de petites poussières. Ces évènements détectés en l'absence de calcium sont soustraits des évènements détectés en présence de calcium. Un échantillon de GR-L dépourvu de PMag-AnxA5 est analysé pour chaque expérience d'extraction magnétique et sert de référence afin d'estimer l'efficacité de l'extraction.

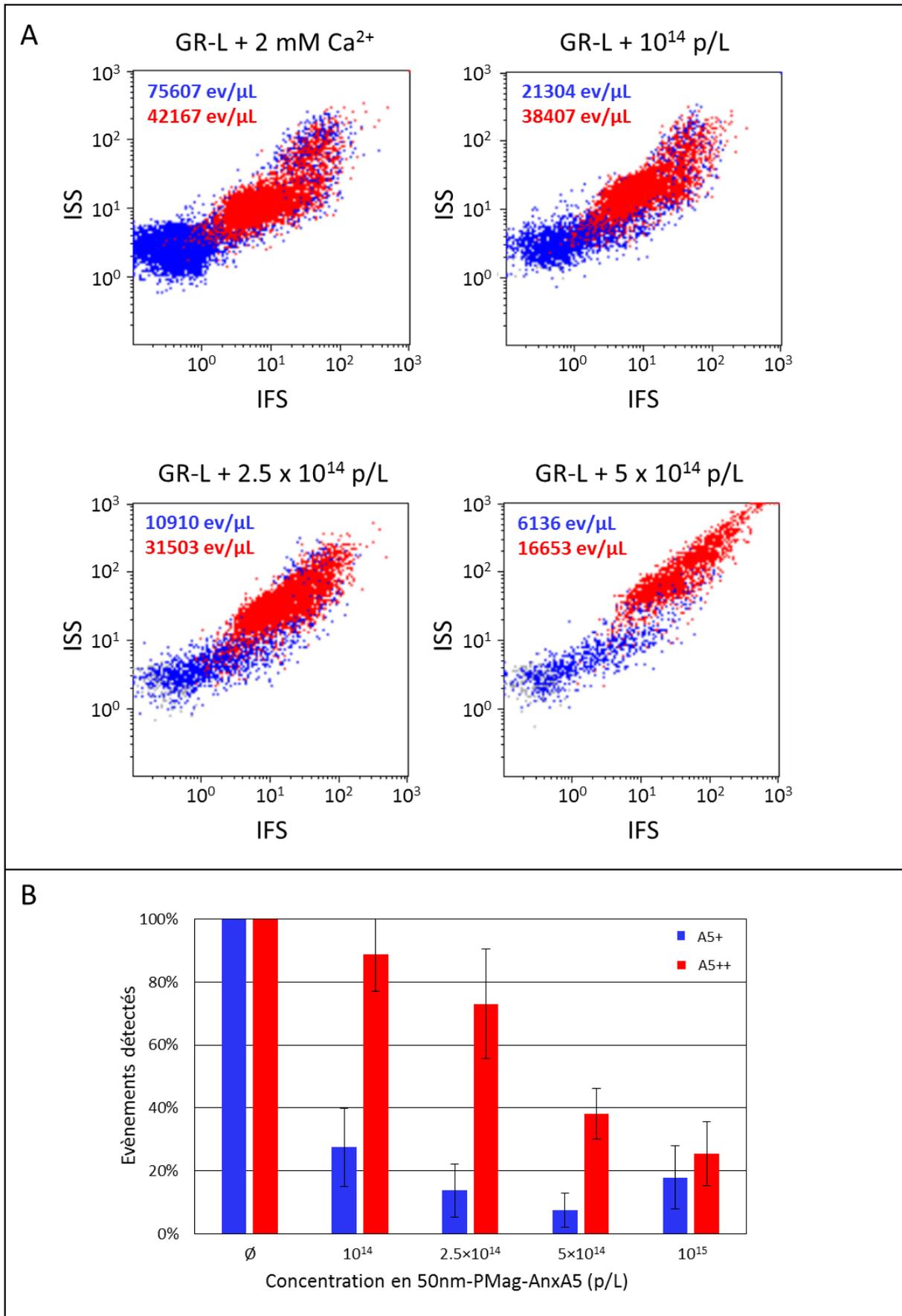


**Figure 64 : Analyse d'une suspension de GR-L incubé avec de l'AnxA5-Cy5, en absence ( $\emptyset$   $\text{Ca}^{2+}$ ) et en présence (2 mM  $\text{Ca}^{2+}$ ) de calcium, par CF.** Les deux diagrammes de gauche sont des « dot plots » représentant l'intensité des signaux de Forward Scatter/Side Scatter (IFS/ISS). Le dot plot est un mode de représentation biparamétrique des données. Chaque point correspondant à un évènement de valeurs FS/SS données. Les deux diagrammes de droite sont des histogrammes présentant la distribution de l'intensité de fluorescence (IFL) des évènements détectés (IFL/Nombre d'évènements). Deux populations A5+ et A5++ sont discriminées sur la base de leur intensité de fluorescence et sont respectivement colorées en bleu et rouge sur les dot plots. Le nombre d'évènements est la moyenne des valeurs obtenues pour sept expériences indépendantes.

#### 4.2.2. Mise en évidence d'un phénomène d'agrégation de GR-L en présence de PMag-AnxA5

Nous avons dans un premier temps souhaité mettre en évidence le phénomène d'agrégation de GR-L précédemment observé par MET, à l'aide de la CF. Une suspension de GR-L a été incubée en présence de concentrations variables de 50nm-PMag-AnxA5, puis analysée par CF sans extraction magnétique. Les résultats de cette expérience sont présentés en **figure 65**.

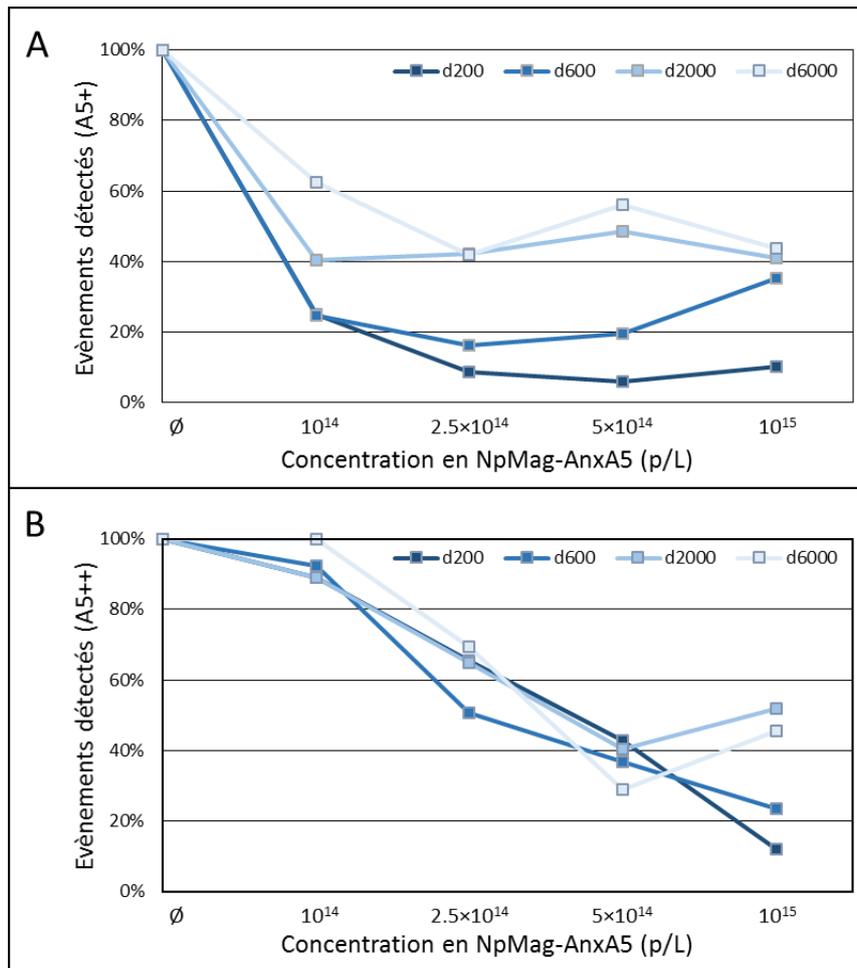
Une augmentation globale des intensités FS/SS des événements détectés en fonction de la concentration en 50nm-PMag-AnxA5 est observée sur les dot plots présentés en **figure 65-A**, qui se traduit par l'apparition progressive de points en haut à droite des dot plots. Cette forme de « queue de comète » est caractéristique d'un phénomène d'agrégation observé par CF. L'agrégation des GR-L et des vésicules membranaires contenues dans la suspension entraîne la formation d'objets plus gros, qui diffusent donc plus la lumière. Cette modification des intensités FS/SS est accompagnée d'une diminution du nombre d'événements A5+ et A5++ détectés, visible sur l'histogramme présenté en **figure 65-B**. Parallèlement, une augmentation de l'intensité de fluorescence moyenne des événements détectés est observée (données non présentées), en accord avec un phénomène d'agrégation. Pour une concentration de  $10^{14}$  p/L, le pourcentage d'événements A5++ détectés après incubation avec les 50nm-PMag-AnxA5 est de 90 % du nombre d'événements de la suspension de GR-L sans 50nm-PMag-AnxA5. Cette valeur diminue à mesure que la concentration en particules magnétiques augmente, jusqu'à atteindre moins de 30% pour une concentration de  $10^{15}$  p/L. Le pourcentage d'événements A5+ chute à moins de 30 % dès  $10^{14}$  p/L, puis diminue légèrement jusqu'à  $5 \times 10^{14}$  p/L avant d'augmenter à  $10^{15}$  p/L. Cette augmentation a été constatée sur l'intégralité des expériences effectuées. Notre hypothèse est qu'à partir d'une certaine concentration en particules magnétiques, des vésicules trop petites et trop peu fluorescentes pour être détectées directement s'agrègent et forment des objets suffisamment fluorescents pour être détectés, avec pour conséquence une légère augmentation du nombre d'événements A5+ détectés. Les écarts-types relativement importants constatés sur cette expérience, ainsi que sur les autres expériences de CF présentées ultérieurement, sont probablement dus à la composition variable des échantillons biologiques, dont le contenu en événements A5+ et A5++ peut légèrement changer d'un échantillon à l'autre. Nous avons également mis en évidence ce phénomène d'agrégation dans le cas des  $1\mu\text{m}$ -PMag-AnxA5.



**Figure 65 : Mise en évidence du phénomène d'agrégation de GR-L en présence de 50nm-PMag-AnxA5, par CF.** (A) Dot plots IFS/ISS présentant le nombre d'évènements A5+ et A5++ détectés à différentes concentrations en 50nm-PMag-AnxA5. (B) Histogramme décrivant l'évolution du nombre d'évènements A5+ et A5++ détectés en fonction de la concentration en 50nm-PMag-AnxA5. La valeur de 100% correspond arbitrairement au nombre d'évènements détectés dans un échantillon dépourvu de particules magnétiques et les autres valeurs de pourcentage sont déterminées par rapport à cet échantillon. Cette convention sera utilisée dans l'intégralité des expériences de CF présentées dans cette section. Les données ont été acquises lors de sept expériences indépendantes, dont les valeurs ont été moyennées. Les écarts-type sont calculés à partir de ces sept expériences indépendantes.

Nous avons ensuite étudié l'influence de la concentration en GR-L sur le phénomène d'agrégation. Des GR-L dilués de 200 à 6000 fois ont été incubés avec des concentrations variables de 50nm-PMag-AnxA5 puis ont été analysés par CF. La diminution du nombre d'évènements a ensuite été déterminée pour chaque dilution de GR-L et chaque concentration en 50nm-PMag-AnxA5. Les résultats de cette expérience sont présentés en **figure 66**.

Dans le cas des évènements A5+, il existe une corrélation inverse entre le nombre d'évènements détectés et le facteur de dilution de la suspension de GR-L. Le phénomène d'agrégation semble ainsi limité par la dilution, sans toutefois disparaître. Dans le cas des évènements A5++, aucun effet n'est observé et l'agrégation des GR-L semble uniquement fonction de la concentration en particules magnétiques, à l'exception peut-être de la condition à  $10^{15}$  p/L. Notre hypothèse est que la grande surface membranaire des GR-L permet la liaison d'un grand nombre de 50nm-PMag-AnxA5 ce qui favorise le phénomène d'agrégation même à des dilutions élevées, contrairement à des vésicules membranaires plus petites. L'utilisation de PMag-AnxA5 monovalentes n'exposant qu'une molécule d'AnxA5 pourrait probablement limiter ce phénomène.

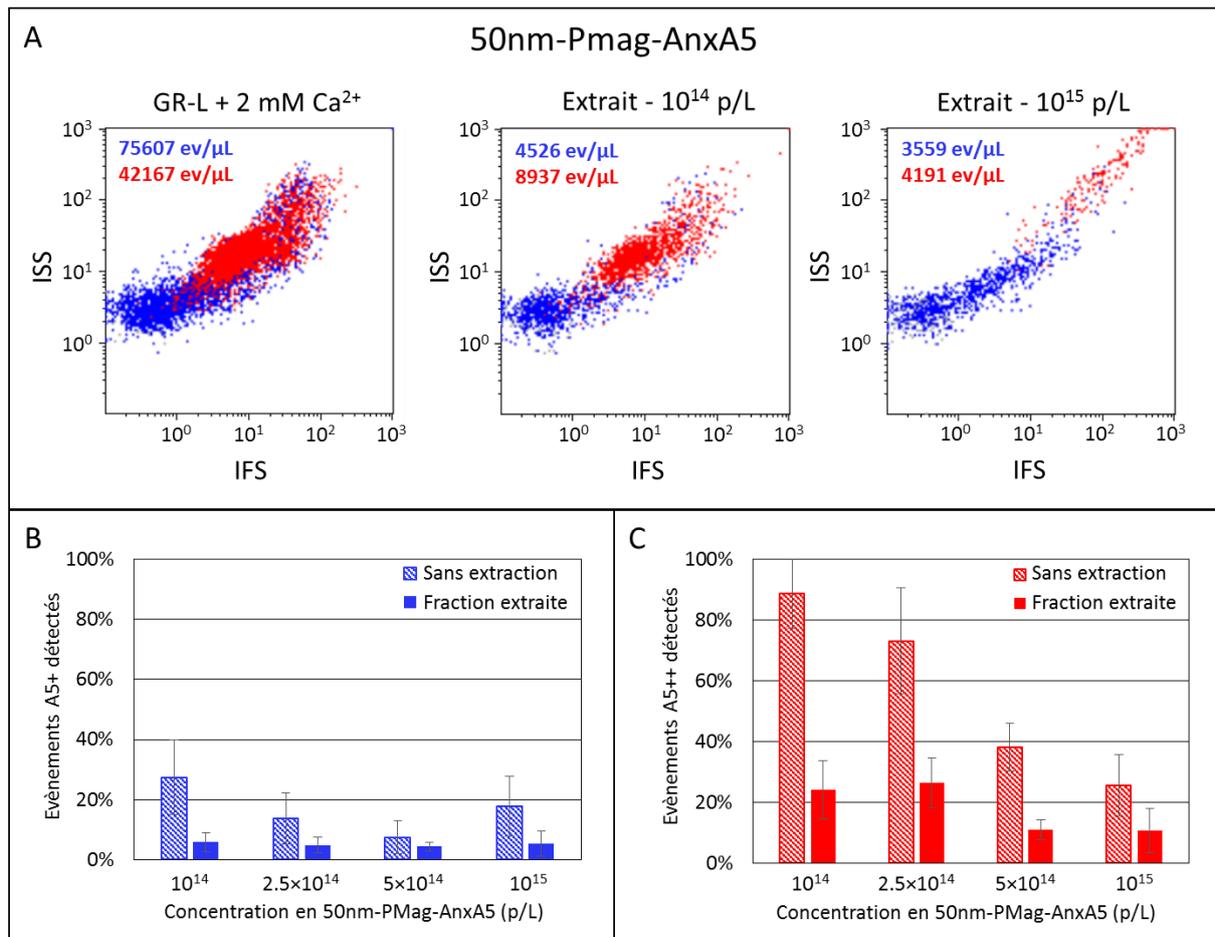


**Figure 66 : Influence de la concentration en GR-L sur le phénomène d'agrégation des GR-L, par CF.** Chaque courbe correspond à une condition de dilution des GR-L (d200, d600, d2000 et d6000). Les graphiques A et B présentent respectivement les résultats pour les événements A5+ et A5++. La valeur de 100% correspond pour chaque courbe au nombre d'évènements détectés dans un échantillon de GR-L à la dilution correspondante mais dépourvu de 50nm-PMag-AnxA5. Les autres valeurs de pourcentage sont déterminées par rapport à cet échantillon.

#### 4.2.3. Analyse de l'extraction magnétique d'une suspension de GR-L par des 50nm-PMag-AnxA5

Nous avons ensuite étudié l'efficacité d'extraction des membranes exposant la PS par des 50nm-PMag-AnxA5. Une suspension de GR-L a été incubée avec des concentrations variables de 50nm-PMag-AnxA5, les échantillons ont été séparés magnétiquement en suivant le protocole présenté dans la section 9 du chapitre « Matériels et méthodes », puis ont été analysés par CF après marquage par de l'AnxA5-Cy5. Les deux fractions résultant de la séparation magnétique sont appelées « fraction extraite » et « fraction non extraite ». Nous

avons dans un premier temps analysé la fraction extraite. Les résultats de cette expérience sont présentés en **figure 67**. Afin d'évaluer au mieux l'efficacité de l'extraction magnétique, il est nécessaire de considérer le phénomène d'agrégation de membranes observé précédemment. En effet, le nombre d'objets détectés par CF est modifié par la simple incubation de l'échantillon avec les PMag-AnxA5, avant même l'étape d'extraction magnétique. Il est donc inexact de se baser uniquement sur l'évolution du nombre d'évènements par rapport à un échantillon de GR-L sans PMag-AnxA5 pour quantifier la proportion d'objets extraits. Les échantillons incubés avec les PMag-AnxA5 mais n'ayant pas subi d'extraction sont donc également analysés par CF. Ces échantillons sont appelés « sans extraction » et servent de point de comparaison pour estimer l'efficacité de l'extraction magnétique. La quantité d'évènements détectés dans la fraction extraite semble peu dépendante de la concentration en 50nm-PMag-AnxA5 et est faible y compris pour de fortes concentrations en particules magnétiques, que ce soit pour les évènements A5+ ou A5++. Dans le cas des évènements A5++, le nombre d'évènements présents dans la fraction extraite semble même diminuer lorsqu'une forte concentration en particules magnétiques est utilisée. La présence d'une « queue de comète » visible sur les dot plots correspondant à la fraction extraite indique que les évènements analysés sont fortement agrégés. Outre le phénomène d'agrégation décrit précédemment, les membranes liées aux 50nm-PMag-AnxA5 sont concentrées contre les parois du tube lors de l'extraction magnétique, avant d'être resuspendues dans du tampon. Ces étapes entraînent probablement de profondes modifications de la structure des GR-L et des vésicules membranaires. Il est possible que certaines membranes fusionnent ou que d'autres se fragmentent. L'agrégation des membranes par le biais des PMag-AnxA5 peut également être favorisée par la concentration des objets. L'efficacité de la resuspension de la fraction extraite est également difficilement contrôlable et susceptible d'être source de variations. De plus, les particules magnétiques liées aux membranes augmentent artificiellement les intensités de FS/SS des évènements détectés. La modification du signal de CF découlant de ces considérations rend l'analyse des fractions extraites inadaptée pour quantifier l'efficacité de l'extraction magnétique.



**Figure 67 : Analyse de la fraction extraite d'un échantillon de GR-L pour différentes concentrations de 50nm-PMag-AnxA5, par CF.** (A) Dot plots IFS/ISS présentant le nombre d'évènements A5+ et A5++ détectés pour différentes concentrations de 50nm-PMag-AnxA5. (B-C) Histogrammes décrivant l'évolution du nombre d'évènements A5+ (B) et A5++ (C) détectés en CF en fonction de la concentration en 50nm-PMag-AnxA5. Les barres hachurées correspondent aux échantillons sans extraction tandis que les barres pleines correspondent à la fraction extraite. Les données ont été acquises lors de sept expériences indépendantes, dont les valeurs ont été moyennées. Les écarts-type sont calculés à partir de ces sept expériences indépendantes.

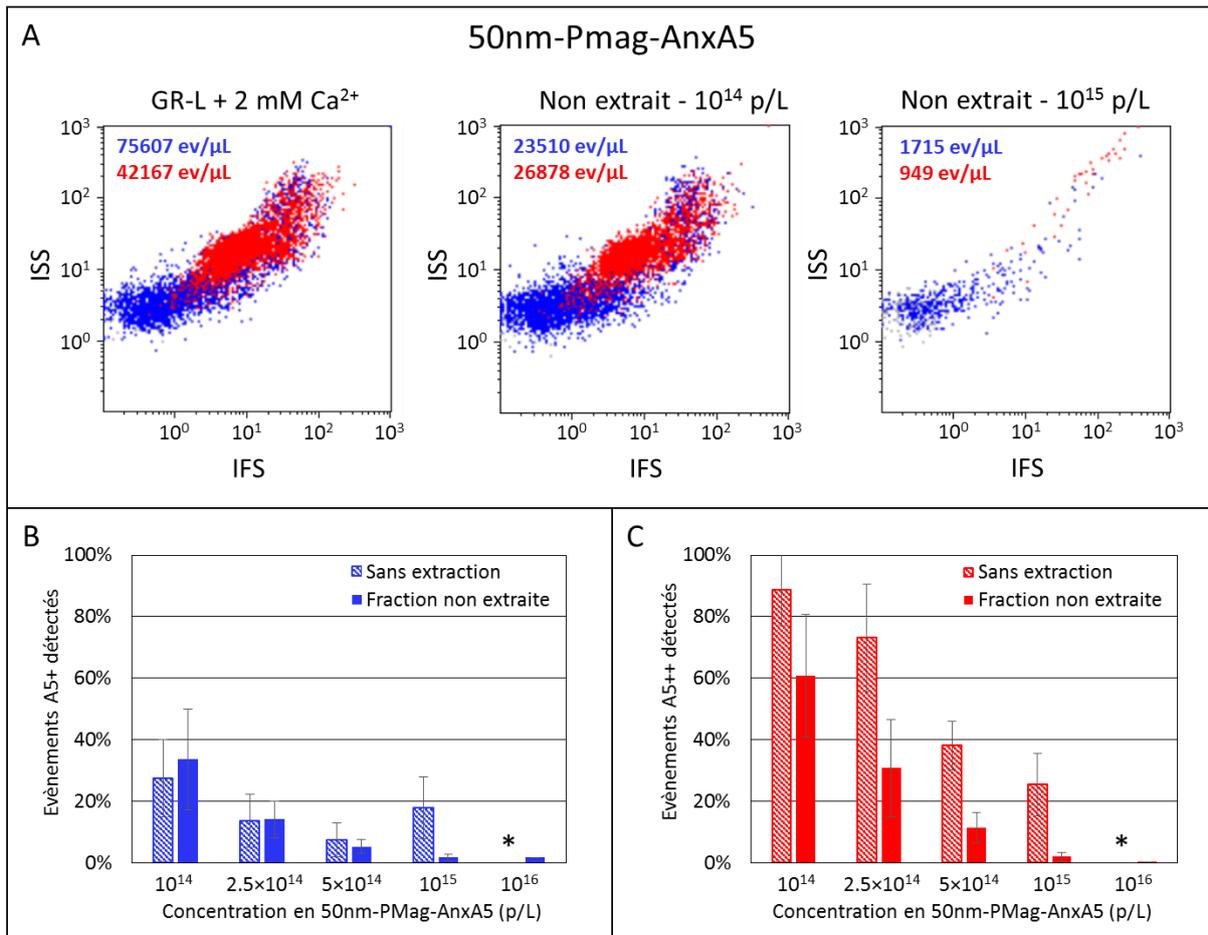
Il apparaît donc plus pertinent de caractériser la fraction non extraite, contenant les objets n'ayant pas été capturés et extraits par les PMag-AnxA5. L'absence d'évènements dans la fraction non extraite indiquerait une efficacité d'extraction de 100%. La **figure 68** présente les résultats de l'analyse de la fraction non extraite d'une suspension de GR-L incubée avec des 50nm-PMag-AnxA5.

Une diminution du nombre d'évènements A5+ et A5++ est observée dans la fraction non extraite. Cette diminution est d'autant plus importante que la concentration en 50nm-PMag-

AnxA5 est élevée. Il est cependant important de comparer ces valeurs au nombre d'évènements détectés dans l'échantillon sans extraction. Dans le cas des évènements A5+, il n'y a pas de différence entre l'échantillon sans extraction et la fraction non extraite pour des concentrations de  $10^{14}$  et  $2.5 \times 10^{14}$  p/L. Cela signifie qu'il n'y a pas d'extraction. A partir de  $5 \times 10^{14}$  p/L, le nombre d'évènements dans la fraction non extraite diminue par rapport à l'échantillon sans extraction jusqu'à s'approcher de zéro. La quasi-totalité des évènements A5+ a donc probablement été extraite. Dans le cas des évènements des GR-L (A5++), le nombre d'évènements détectés dans la fraction non extraite est inférieur à celui détecté dans l'échantillon sans extraction dès la première concentration, signe qu'une partie des GR-L sont extraits. La quantité de GR-L extraits augmente avec la concentration en particules magnétiques et est quasi-totale à partir de  $10^{15}$  p/L.

Afin de nous assurer que tous les GR-L avaient été extraits par les 50nm-PMag-AnxA5, nous avons analysé la fraction non extraite de cette expérience par MET. Aucun GR-L n'a pu être observé sur plusieurs centaines de carreaux de la grille de MET. Bien que cette observation ne permette pas de quantifier de manière absolue les GR-L présents dans la fraction non extraite, elle démontre qualitativement une quasi-absence de GR-L et donc l'efficacité de leur extraction. Les dot plots correspondant à la fraction non extraite pour des concentrations de  $10^{15}$  et  $10^{16}$  p/L montrent la présence d'une petite « queue de comète », malgré le faible nombre d'évènements de l'échantillon. Comme exposé précédemment, ce phénomène est un signe d'agrégation. Notre hypothèse est que de rares agrégats de vésicules et de GR-L subsistent dans l'échantillon après extraction. Il est possible que ces agrégats soient liés à un nombre trop faible de particules magnétiques pour être extraits. Une autre hypothèse est qu'une faible proportion des objets extraits ait contaminé la fraction non extraite lors de la séparation des deux fractions.

L'étude de la liaison du nombre de 50nm-PMag-AnxA5 par GR-L décrite précédemment a montré que pour une concentration supérieure ou égale à  $10^{15}$  p/L, la surface des GR-L est saturée par les particules magnétiques (**figure 61**). Cette concentration semble nécessaire à l'extraction totale des GR-L. A titre de rappel, des GR-L incubés avec des concentrations de  $10^{13}$  et  $10^{14}$  p/L sont en moyenne respectivement liés à 12 et 240 50nm-PMag-AnxA5, ce qui semble donc insuffisant pour extraire la totalité des GR-L

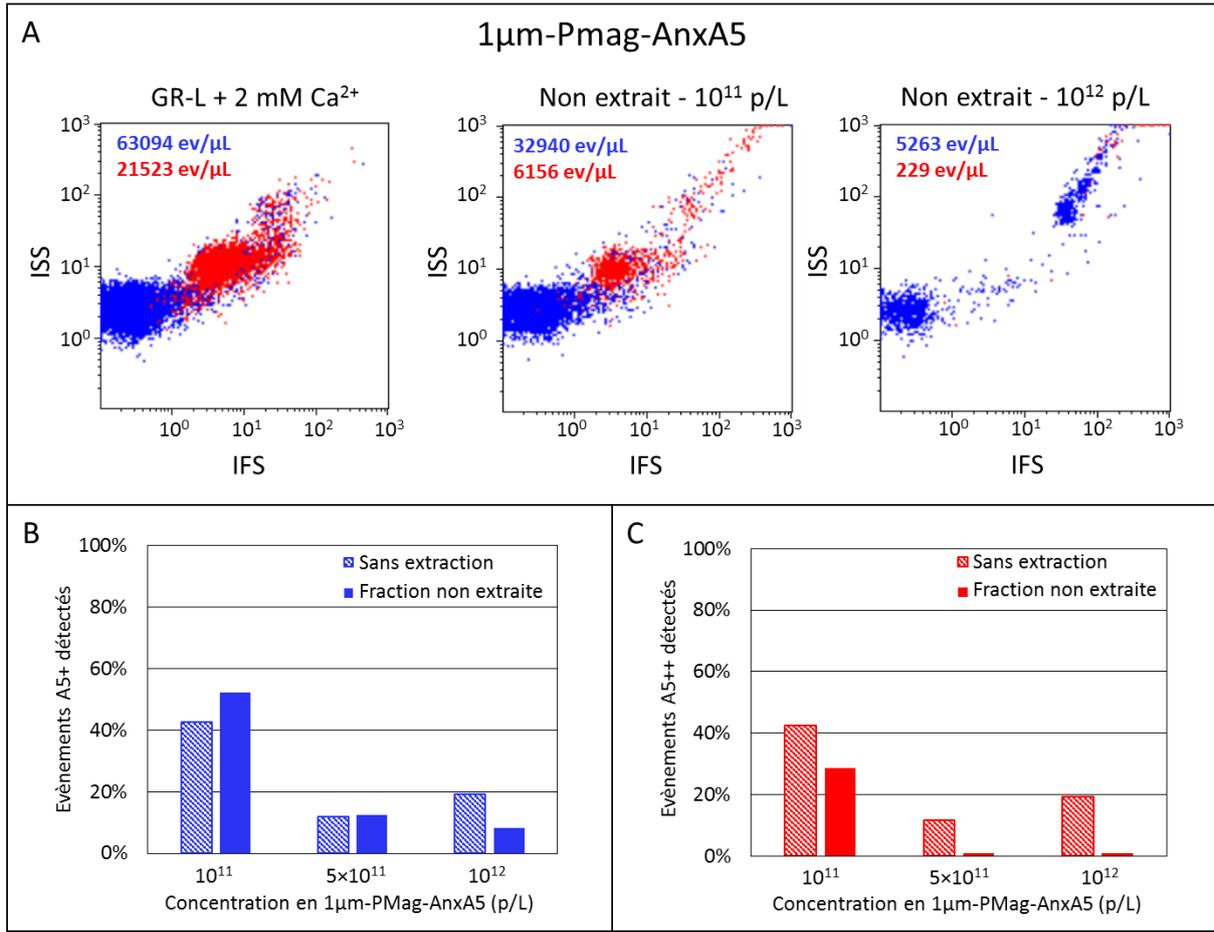


**Figure 68 : Analyse de la fraction non extraite d'un échantillon de GR-L pour différentes concentrations de 50nm-PMag-AnxA5, par CF.** (A) Dot plots FS/SS présentant le nombre d'évènements A5+ et A5++ détectés pour différentes concentrations de 50nm-PMag-AnxA5. (B-C) Histogrammes décrivant l'évolution du nombre d'évènements A5+ (B) et A5++ (C) détectés en CF en fonction de la concentration en 50nm-PMag-AnxA5. Les barres hachurées correspondent aux échantillons sans extraction tandis que les barres pleines correspondent à la fraction non extraite. Les données ont été acquises lors de sept expériences indépendantes, dont les valeurs ont été moyennées. Les écarts-type sont calculés à partir de ces sept expériences indépendantes. Les données relatives à l'échantillon sans extraction pour la concentration de 10<sup>16</sup> p/L ne sont pas disponibles, signalé par un astérisque sur les deux histogrammes.

#### 4.2.4. Analyse de l'extraction magnétique d'une suspension de GR-L par des 1µm-PMag-AnxA5

Comme pour les 50nm-PMag-AnxA5, nous avons évalué l'efficacité de l'extraction magnétique des 1µm-PMag-AnxA5 incubées avec une suspension de GR-L. Le phénomène d'agrégation observé précédemment avec les 50nm-PMag-AnxA5 se manifestant également avec les 1µm-PMag-AnxA5, les échantillons sans extraction seront à nouveau analysés et utilisés à titre de comparaison pour évaluer l'efficacité de l'extraction magnétique. L'analyse de la fraction extraite par les 1µm-PMag-AnxA5 s'est à nouveau révélée non pertinente, nous présenterons donc les résultats concernant l'analyse de la fraction non extraite, qui sont exposés en **figure 69**.

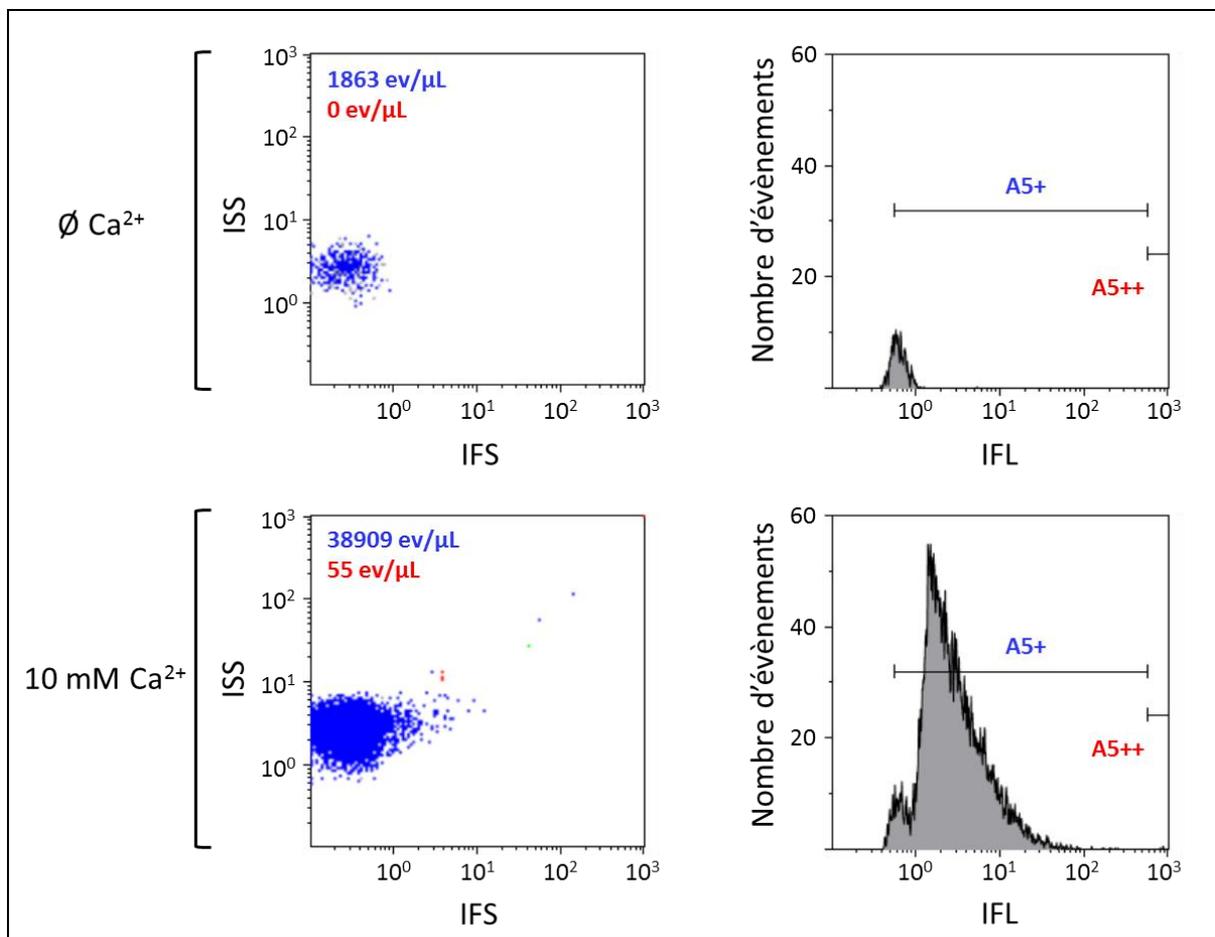
Pour des concentrations de  $10^{11}$  et  $5 \times 10^{11}$  p/L, le nombre d'évènements A5+ détectés est similaire dans l'échantillon sans extraction et dans la fraction non extraite, ce qui indique qu'il n'y a pas d'extraction. Pour une concentration de  $10^{11}$ , une extraction partielle est observée. Une concentration de  $5 \times 10^{11}$  ou  $10^{12}$  p/L permet quant à elle d'extraire la quasi-totalité des GR-L (A5++). Ces résultats sont similaires à ceux obtenus avec les 50nm-PMag-AnxA5, pour une concentration en 1µm-PMag-AnxA5 environ 1000 fois inférieure. Ceci s'explique par une quantité de molécules d'AnxA5 par particule environ 1000 fois plus élevée dans le cas des 1µm-PMag-AnxA5 comparé aux 50nm-PMag-AnxA5. Cette expérience n'a pas été dupliquée. Il convient donc de rester prudent quant aux résultats obtenus, bien que ceux-ci soient cohérents.



**Figure 69 : Analyse de la fraction non extraite d'un échantillon de GR-L pour différentes concentrations de 1µm-PMag-AnxA5, par CF.** (A) Dot plots FS/SS présentant le nombre d'évènements A5+ et A5++ détectés pour différentes concentrations de 1µm-PMag-AnxA5. (B-C) Histogramme décrivant l'évolution du nombre d'évènements A5+ (B) et A5++ (C) détectés en CF en fonction de la concentration en 1µm-PMag-AnxA5. Les barres hachurées correspondent aux échantillons sans extraction tandis que les barres pleines correspondent à la fraction non extraite.

### 4.3. Analyse par CF de l'extraction de VEs exposant la PS contenues dans le plasma, à l'aide de PMag-AnxA5

Le protocole d'extraction utilisé pour les suspensions de GR-L a été appliqué à du plasma sanguin, dans l'optique d'étudier l'efficacité d'extraction des VEs exposant la PS. Du plasma pur a été incubé avec des concentrations variables de PMag-AnxA5 puis séparé magnétiquement et analysé par CF après marquage par de l'AnxA5-Cy5. A l'instar des suspensions de GR-L, l'échantillon de plasma de départ a été caractérisé afin de pouvoir évaluer l'efficacité de l'extraction magnétique. La **figure 70** présente le résultat de l'analyse d'un échantillon de plasma incubé avec de l'AnxA5-Cy5, par CF.

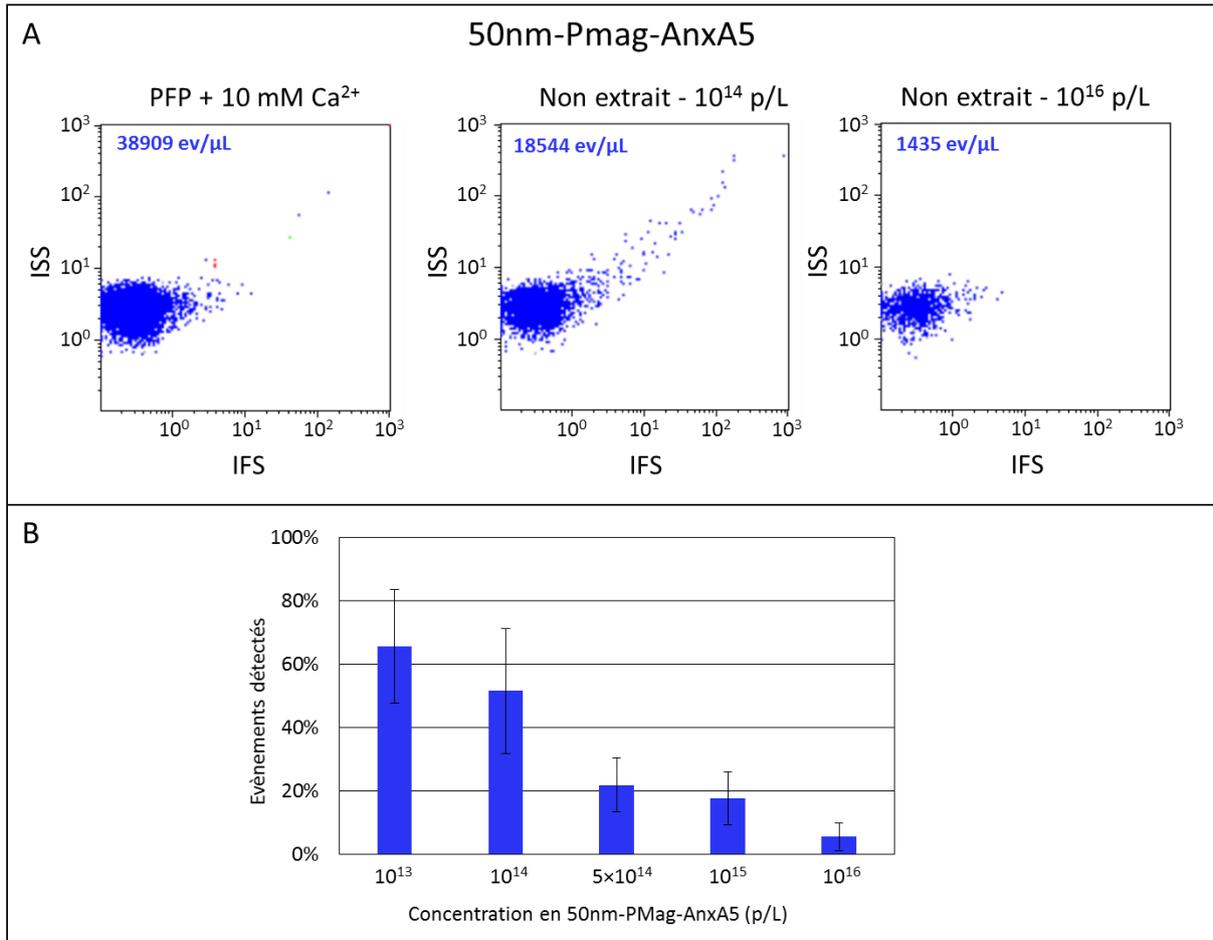


**Figure 70 : Analyse d'un échantillon de plasma incubé avec de l'AnxA5-Cy5, en absence ( $\emptyset$  Ca<sup>2+</sup>) et en présence (10 mM Ca<sup>2+</sup>) de calcium, par CF.** Les deux dot plots IFS/ISS de gauche présentent le résultat de l'analyse d'un échantillon de plasma incubé avec de l'AnxA5-Cy5, en absence ( $\emptyset$  Ca<sup>2+</sup>) et en présence (10 mM Ca<sup>2+</sup>) de calcium. Les deux diagrammes de droite présentent l'intensité de fluorescence des évènements détectés (FL/Nombre d'évènements). Le nombre d'évènements est la moyenne des valeurs obtenues pour six expériences indépendantes.

Le plasma contient du citrate de sodium, utilisé comme anticoagulant lors du prélèvement sanguin. Le citrate de sodium étant un chélateur du calcium, une concentration en  $\text{Ca}^{2+}$  de 10 mM est utilisée lors du marquage par l'AnxA5, afin qu'il reste suffisamment d'ions  $\text{Ca}^{2+}$  dans le milieu pour permettre la liaison de l'AnxA5 à la PS. En présence de calcium, l'analyse du plasma révèle l'existence de deux populations d'évènements appelés « A5+ » et « A5++ », distinguées par leur intensité de fluorescence, comme avec une suspension de GR-L. Les évènements fortement fluorescents (A5++) colorés en rouge sont présents en très faible quantité, en moyenne 50 par  $\mu\text{L}$  de plasma pur. Ils correspondent aux fantômes d'érythrocytes (Ery-G) précédemment décrits dans la section 2 du chapitre « Résultats et discussions ». La population majoritaire est composée des évènements A5+, qui correspondent aux VEs exposant la PS. Leur concentration moyenne est de  $38.909 \pm 6536$  par  $\mu\text{L}$  de plasma pur. En raison de la très faible concentration des Ery-G (A5++), ils ne seront pas pris en compte pour l'étude de l'extraction magnétique par les PMag-AnxA5 et seuls les évènements A5+ seront caractérisés. Le contrôle négatif de cette expérience de CF est à nouveau réalisé en absence de calcium. Les évènements détectés en absence de calcium sont soustraits des évènements détectés en présence de calcium. Un échantillon de plasma est analysé pour chaque expérience d'extraction magnétique et sert de référence afin d'estimer l'efficacité de l'extraction. Comme dans le cas des suspensions de GR-L, un phénomène d'agrégation a été observé lors de l'incubation du plasma avec des PMag-AnxA5. Des expériences complémentaires sont en cours. L'analyse de la fraction extraite des échantillons de plasma s'est heurtée aux mêmes limitations que pour les suspensions de GR-L. L'étude de l'efficacité d'extraction des PMag-AnxA5 sur les VEs contenues dans le plasma sera donc évaluée par analyse de la fraction non extraite. Les données concernant les échantillons « sans extraction » ne sont pas disponibles pour ces expériences et seront réalisées ultérieurement.

#### **4.3.1. Analyse de l'extraction magnétique des VEs exposant la PS par des 50nm-PMag-AnxA5**

Nous avons dans un premier temps évalué l'efficacité d'extraction des 50nm-PMag-AnxA5. La **figure 71** présente l'analyse de la fraction non extraite d'un plasma par des 50nm-PMag-AnxA5, par CF.



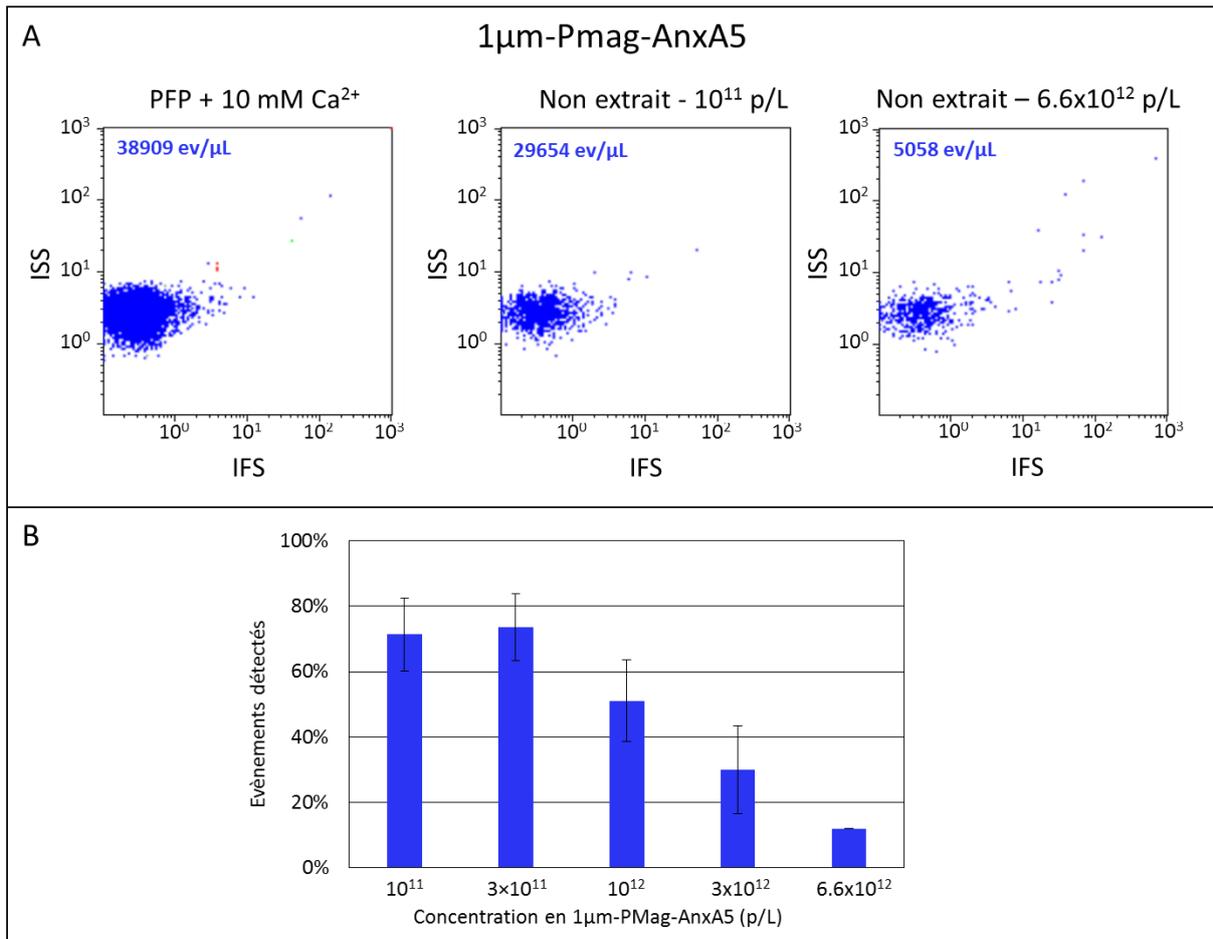
**Figure 71 : Analyse de la fraction non extraite d'un échantillon de plasma pour différentes concentrations de 50nm-PMag-AnxA5, par CF.** (A) Dot plots IFS/ISS présentant le nombre d'évènements A5+ détectés pour différentes concentrations de 50nm-PMag-AnxA5. (B) Histogramme décrivant l'évolution du nombre d'évènements A5+ détectés en CF en fonction de la concentration en 50nm-PMag-AnxA5. La valeur de 100% correspond au nombre d'évènements détectés dans l'échantillon de plasma non incubé avec des 50nm-PMag-AnxA5. Les données ont été acquises lors de six expériences indépendantes, dont les valeurs ont été moyennées. Les écarts-type sont calculés à partir de ces six expériences indépendantes.

Le nombre d'évènements détectés dans la fraction non extraite diminue à mesure que la concentration en 50nm-PMag-AnxA5 augmente. Cette diminution est partiellement causée par l'agrégation des VEs induite par les 50nm-PMag-AnxA5. Cependant, pour une concentration de 10<sup>16</sup> p/L, la quasi-totalité des VEs exposant la PS semblent avoir été extraites. Il est intéressant de constater que les concentrations en 50nm-PMag-AnxA5 utilisées pour aboutir à ce résultat sont extrêmement élevées, et nécessitent un nombre de particules très supérieur à la quantité de VEs à extraire. Si l'on considère le cas d'un plasma contenant

environ 30.000 VEs exposant la PS par  $\mu\text{L}$ , nous avons déterminé qu'une concentration en 50nm-PMag-AnxA5 de  $10^{16}$  p/L était nécessaire pour une extraction quasi-totale, soit  $10^{10}$  p/ $\mu\text{L}$ , ce qui correspond à un rapport d'environ 300.000 particules magnétiques par VE. La nécessité d'utiliser de telles quantités de particules magnétiques est vraisemblablement due à la concentration en VEs très faible du plasma, qui limite les interactions entre VEs et particules magnétiques.

#### 4.3.2. Analyse de l'extraction magnétique des VEs exposant la PS par des $1\mu\text{m}$ -PMag-AnxA5

Nous avons ensuite étudié l'efficacité d'extraction des  $1\mu\text{m}$ -PMag-AnxA5 sur un échantillon de plasma, comme réalisé précédemment avec les 50nm-PMag-AnxA5. Les résultats de l'analyse de la fraction non extraite sont présentés en **figure 72**.



**Figure 72 : Analyse de la fraction non extraite d'un échantillon de plasma pour différentes concentrations de 1 $\mu$ m-PMag-AnxA5, par CF.** (A) Dot plots IFS/ISS présentant le nombre d'évènements A5+ détectés pour différentes concentrations de 1 $\mu$ m-PMag-AnxA5. (B) Histogramme décrivant l'évolution du nombre d'évènements A5+ détectés en cytométrie en fonction de la concentration en 1 $\mu$ m-PMag-AnxA5. Les données ont été acquises lors de six expériences indépendantes, dont les valeurs ont été moyennées. Les écarts-type sont calculés à partir de ces six expériences indépendantes. Le point correspondant à une concentration de  $6.6 \times 10^{12}$  p/L n'a été réalisé qu'une fois.

Comme dans le cas des expériences sur les GR-L, les concentrations particulières atteintes avec les 1 $\mu$ m-PMag-AnxA5 sont plus faibles que pour les 50nm-PMag-AnxA5. Une diminution de 90% du nombre d'évènements est constatée pour une concentration en 1 $\mu$ m-PMag-AnxA5 de  $6.6 \times 10^{12}$  p/L. A nouveau, cette diminution est partiellement causée par l'agrégation des VEs, mais il est probable qu'une proportion importante des VEs ait été extraite.

#### 4.4. Séparation des PMag-AnxA5 et des membranes extraites après chélation du calcium par de l'EDTA

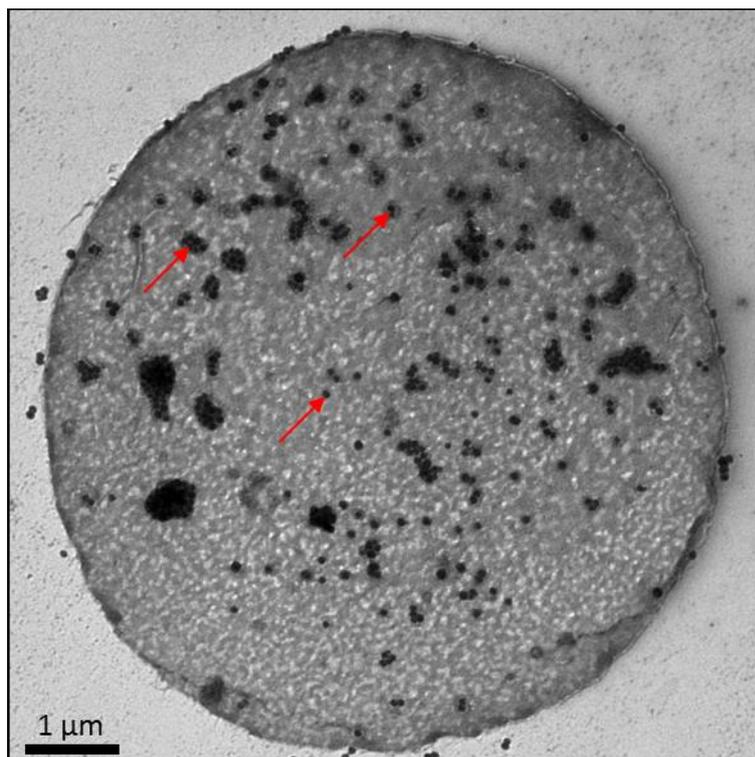
La liaison de l'AnxA5 aux membranes exposant la PS étant dépendante de la présence de calcium dans le milieu, il est envisageable de séparer les PMag-AnxA5 et les membranes extraites en chélatant le calcium présent dans le milieu à l'aide d'EDTA.

L'absorbance à 648 nm d'une suspension de liposomes contenant 20 % de PS et 1 % de Di, un lipide fluorescent, a été mesurée. Les liposomes ont ensuite été incubés avec des 50nm-PMag-AnxA5 pendant 2 heures en présence de calcium puis ont été extraits selon le protocole utilisé précédemment pour les échantillons biologiques. La fraction extraite a été resuspendue dans un volume de tampon CF équivalent au volume de départ. L'absorbance des fractions extraites et non extraites a été mesurée à nouveau, révélant que la quasi-totalité des liposomes avaient été extraits par les 50nm-PMag-AnxA5. La fraction extraite a été mise en présence d'un excès d'EDTA pendant 30 minutes et l'ensemble a été extrait à nouveau. De nouvelles mesures d'absorbance ont montré qu'environ 75% des liposomes avaient pu être séparés des PMag-AnxA5 par le traitement à l'EDTA, validant la faisabilité de l'expérience. Ces résultats doivent être considérés avec prudence car ils n'ont pas été dupliqués. Ils n'ont également pas pu être

reproduits dans le cas de suspensions de GR-L ou de plasma. Des expériences complémentaires doivent être menées.

#### 4.5. Extraction de VEs d'origine érythrocytaire contenue dans le plasma avec des particules magnétiques conjuguées à un anticorps anti-CD235a, par CF

Nous avons également réalisé quelques expériences préliminaires avec des 50nm-PMag conjuguées à un anticorps anti-CD235a, dirigé contre les membranes d'origine érythrocytaire exposant la glycophorine A. Ces 50nm-PMag-anti-CD235a ont été produites par un protocole similaire à la conjugaison des Ac-SH aux NpAu-Mal. Les 50nm-PMag-anti-CD235a ont été incubées avec des GR-L et la spécificité de la liaison a été validée par MET. Une image de GR-L marqué par des 50nm-PMag-anti-CD235a est présentée en **figure 73**.

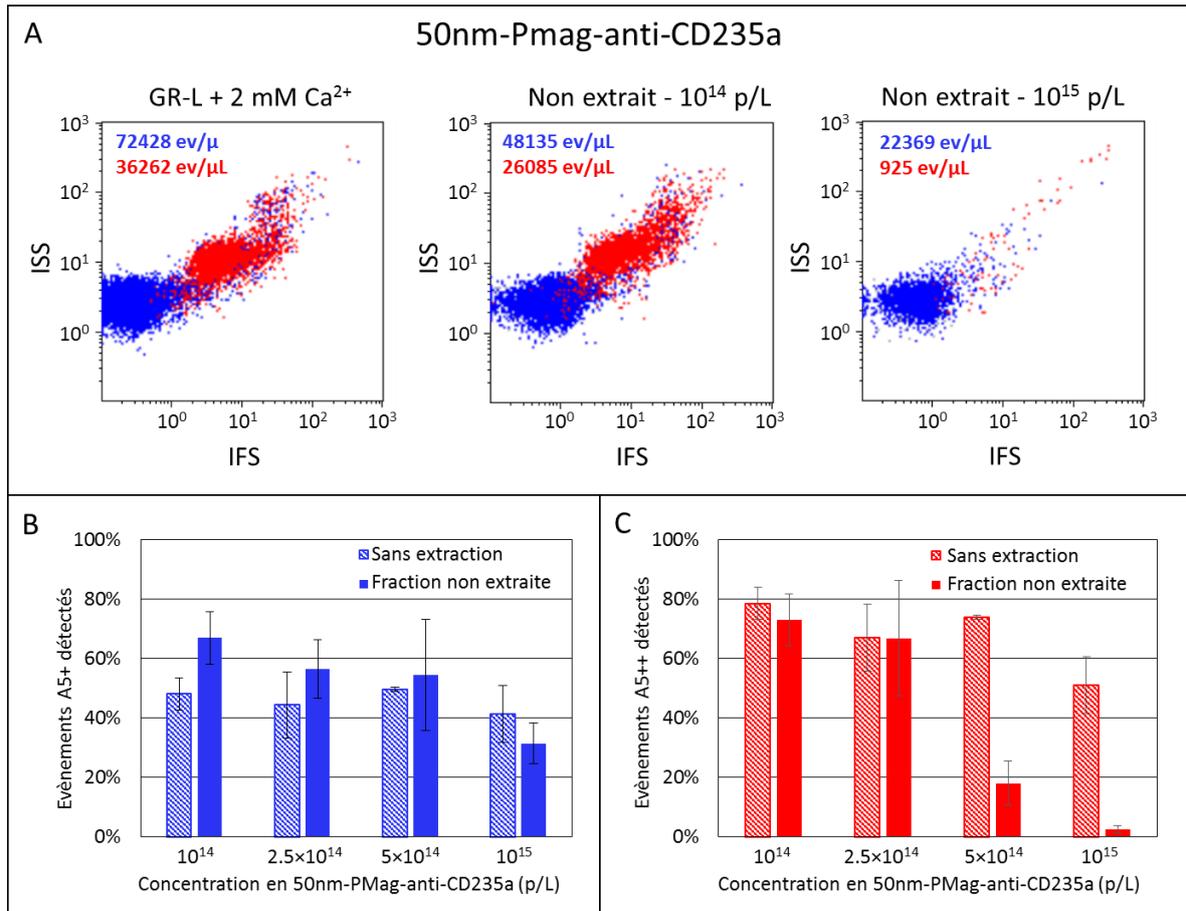


**Figure 73 :** Image de MET d'un GR-L marqué par des 50nm-PMag-anti-CD235a. La concentration en 50nm-PMag-anti-CD235a utilisée est de  $10^{15}$  p/L. Les flèches rouges indiquent des particules ou regroupements de particules.

La liaison des 50nm-PMag-anti-CD235a aux GR-L semble moins efficace que celle des 50nm-PMag-AnxA5, à concentration égale. En effet, pour une concentration de  $10^{15}$  p/L, les 50nm-PMag-AnxA5 saturent la surface des GR-L, ce qui n'est pas le cas de celles conjuguées à l'anticorps anti-CD235a.

L'efficacité d'extraction des membranes érythrocytaires contenues dans la suspension de GR-L a ensuite été évaluée par CF, de manière identique à l'étude réalisée pour les particules conjuguées à l'AnxA5. Les résultats de l'analyse par CF de la fraction non extraite sont présentés en **figure 74**.

Rappelons que le marqueur fluorescent utilisé pour les expériences de CF est l'AnxA5-Cy5, bien que les particules magnétiques utilisées capturent uniquement les membranes d'origine érythrocytaire. Avec une concentration en 50nm-PMag-anti-CD235a de  $10^{15}$  p/L, l'extraction des événements A5++ est quasi-totale et équivalente à celle obtenue avec des 50nm-PMag-AnxA5. Ceci est cohérent avec le fait que les GR-L exposent tous l'antigène CD235a. Dans le cas des événements A5+, le nombre d'événements détectés dans l'échantillon sans extraction et dans la fraction non extraite sont similaires, peu importe la concentration en particules magnétiques utilisée. Ceci indique que le taux d'extraction des événements A5+ est très faible, voire nul. Il est possible que les 50nm-PMag-anti-CD235a possèdent une avidité pour leur cible plus faible que les particules conjuguées à l'AnxA5. Ceci est cohérent avec les résultats obtenus précédemment par MET. Il est également probable qu'une partie des événements restants soient composés de membranes exposant la PS mais n'exposant pas le CD235a, n'ayant par conséquent pas pu être extrait par les 50nm-PMag-anti-CD235a. La présence de membranes n'exposant pas le CD235a dans une suspension de GR-L est un phénomène que nous avons observé, par cryo-MET notamment.



**Figure 74 : Analyse de la fraction non extraite d'un échantillon de GR-L pour différentes concentrations de 50nm-PMag-anti-CD235a, par CF** (A) Dot plots IFS/ISS présentant le nombre d'évènements A5+ détectés pour différentes concentrations de 50nm-PMag-anti-CD235a. (B-C) Histogramme décrivant l'évolution du nombre d'évènements A5+ (B) et A5++ (C) détectés en CF en fonction de la concentration en 50nm-PMag-anti-CD235a. Les barres hachurées correspondent aux échantillons sans extraction et les barres pleines à la fraction non extraite. La valeur de 100% correspond au nombre d'évènements détectés dans l'échantillon de GR-L non incubé avec des 50nm-PMag-anti-CD235a. Les autres valeurs de pourcentage sont déterminées par rapport à cet échantillon et sont la moyenne des valeurs obtenues lors de trois expériences indépendantes. Les écarts-type sont calculés à partir de ces trois expériences indépendantes.

#### 4.6. Conclusion

Nous avons développé une méthode d'isolation spécifique de VEs exposant la PS à l'aide de particules magnétiques conjuguées à l'AnxA5. Des particules magnétiques de 50 nm et de 1  $\mu$ m de diamètre ont été conjuguées à l'AnxA5, puis utilisées pour isoler les membranes exposant la PS contenues dans des échantillons biologiques. Des GR-L ont été utilisés comme modèle et l'efficacité de liaison des PMag-AnxA5 aux GR-L a été validée par MET. Nous avons mis en évidence un phénomène d'agrégation de GR-L, vraisemblablement causé par la multivalence des PMag-AnxA5. L'efficacité d'extraction des GR-L a été évaluée par CF et des conditions permettant l'isolation quasi-totale des membranes exposant la PS de ces échantillons ont été déterminées. Les PMag-AnxA5 ont ensuite été utilisées pour isoler les VEs exposant la PS contenues dans le plasma sanguin et des conditions permettant l'extraction quasi-totale de ces VEs ont également été déterminées. Des PMag ont été conjuguées à un anticorps anti-CD235a et ont été utilisées avec succès pour extraire la quasi-totalité des GR-L contenus dans un échantillon.

## D – CONCLUSIONS GÉNÉRALES ET PERSPECTIVES

L'objectif général de cette thèse intitulée « Caractérisation, quantification et isolation de vésicules extracellulaires du plasma sanguin, à l'aide de nanoparticules d'or ou magnétiques conjuguées à des protéines » était d'étendre nos connaissances fondamentales sur les VEs contenues dans le plasma sanguin d'individus sains. Mon travail a été divisé en trois grandes parties.

La première partie a concerné le développement et l'optimisation d'une méthode de conjugaison d'anticorps à des nanoparticules d'or, afin de pouvoir marquer et identifier des VEs par MET. Nous avons dans un premier temps étudié la thiolation des protéines par le réactif de Traut, à l'aide de deux méthodes indépendantes. Cette thiolation a été quantifiée par dosage d'Ellman et le nombre de thiols réactifs ajoutés aux protéines a été évalué par une méthode de SDS-PAGE après couplage de molécules de PEG-Mal aux protéines thiolées. L'AnxA5 a été utilisée comme protéine modèle et des conditions de thiolation aboutissant au greffage d'un thiol réactif en moyenne par protéine ont été déterminées, ainsi que des conditions permettant une thiolation importante de l'AnxA5 avec couplage de nombreux thiols par protéine. La thiolation d'anticorps a ensuite été étudiée de manière similaire à la thiolation de l'AnxA5. Les conditions permettant l'exposition d'une moyenne d'un thiol réactif par anticorps ont été déterminées. Les conditions utilisées sont les suivantes : un rapport réactif de Traut/anticorps égal à 100, une concentration en anticorps de 1 mg/mL et un temps de réaction de 20 minutes. Nous avons ensuite montré par CET qu'une thiolation importante des anticorps favorisait leur oligomérisation par le biais de ponts disulfures, justifiant l'utilisation de conditions de thiolation modérées et contrôlées. Les anticorps thiolés étant destinés à être conjugués à des NpAu, il existe en effet un risque que leur oligomérisation entraîne l'agrégation des NpAu une fois celles-ci conjuguées aux anticorps. Cette problématique a notamment été abordée par Vingerhoeds (Vingerhoeds et al., 1996), qui décrit l'agrégation de liposomes conjuguées à une enzyme thiolée par du réactif de Traut. Des anticorps thiolés ont ensuite été conjugués à des NpAu exposant des maléimides. Différentes conditions de conjugaison ont été testées et la liaison des anticorps aux NpAu a été caractérisée de manière quantitative. Cette méthode utilise un traitement réducteur

permettant de décrocher les anticorps liés aux nanoparticules d'or. L'analyse ultérieure par SDS-PAGE permet de déterminer le nombre d'anticorps conjugués par NpAu. Nous avons déterminé des conditions de conjugaison permettant d'obtenir des NpAu-Ac conjuguées en moyenne à un anticorps, permettant ensuite de marquer des VEs en MET.

La deuxième grande partie de mon travail de thèse a consisté à établir un catalogue des VEs du plasma sanguin de sujets sains. La morphologie et la taille des VEs ont été déterminées par cryo-MET. La cryo-MET a révélé l'existence de trois types de morphologie. Le premier type est composé de VEs sphériques dont la taille est comprise entre 30 nm et 1  $\mu$ m, 80 % d'entre elles mesurant entre 50 nm et 500 nm. La deuxième morphologie observée correspond à des VEs tubulaires pouvant mesurer jusqu'à plus de 10  $\mu$ m, et qui peuvent parfois se fragmenter pour former des VEs sphériques. La troisième catégorie regroupe de grands fragments membranaires dont la taille est comprise entre 1  $\mu$ m et 8  $\mu$ m. Les VEs tubulaires et les grands fragments membranaires n'avaient jamais été décrits auparavant. Nous avons ensuite caractérisé le phénotype des VEs à l'aide de nanoparticules d'or conjuguées à des protéines. Des NpAu-AnxA5 ont été utilisées afin d'identifier les VEs exposant la phosphatidylsérine. Contrairement à un dogme largement répandu, nous avons démontré que seule une minorité de VEs exposaient la PS. Ceci est en contradiction avec le modèle classique de formation des VEs et suggère l'existence d'autres mécanismes de biogénèse. Le marquage par les NpAu-AnxA5 a révélé que l'intégralité des grands fragments membranaires de 6 à 8  $\mu$ m de diamètre exposait la PS. Nous avons ensuite utilisé différents types de nanoparticules d'or conjuguées à des anticorps afin d'étudier le phénotype et l'origine cellulaire des VEs. Des NpAu-anti-CD235 ont notamment révélé qu'une proportion importante des VEs tubulaires était d'origine érythrocytaire. De manière surprenante, nous avons également découvert que tous les grands fragments membranaires de 6 à 8  $\mu$ m exposant la PS étaient également d'origine érythrocytaire. Nous avons établi que ces objets sont des globules rouges en fin de vie et vidés de leur contenu en hémoglobine, que nous avons nommés « Ery-Ghosts ». Cette hypothèse est corroborée par l'observation de globules rouges lysés *in vitro*, qui sont très similaires aux Ery-G observés par MET, cryo-MET, MO ou CF. L'utilisation de NpAu-anti-CD41 a permis d'identifier des VEs d'origine plaquettaire, réparties de manière équivalente entre VEs sphériques, VEs tubulaires et grands fragments membranaires. Nous avons cependant montré que certaines VEs d'origine plaquettaire n'exposaient pas l'antigène CD41, il est donc

nécessaire d'utiliser d'autres marqueurs afin d'identifier la totalité des VEs issues de ce type cellulaire. Des NpAu-anti-CD62P ont par exemple été utilisées pour marquer avec succès des VEs plaquettaires issues d'un échantillon de plaquettes activées, mais l'antigène CD62P peut être présent à la surface d'autres types cellulaires que les plaquettes. Des NpAu-anti-CD45 ont permis de mettre en évidence une population de VEs tubulaires d'origine leucocytaire, contenant des fibres et possédant une forte tendance à se fragmenter en VEs sphériques plus petites. Nous avons également observé d'autres VEs tubulaires à l'aspect très similaire mais non marquées par les NpAu-anti-CD45, que nous soupçonnons également d'être d'origine leucocytaire. A l'instar des VEs plaquettaires, d'autres marqueurs que le CD45 sont probablement nécessaires pour identifier l'ensemble des VEs leucocytaires. L'utilisation de NpAu-anti-CD144 n'a pas permis d'identifier de VEs d'origine endothéliale, probablement à cause d'une concentration en VEs endothéliales trop faible, d'un choix d'anticorps inapproprié ou d'un problème lors de la conjugaison de l'anticorps aux NpAu. Les cellules endothéliales étant au contact du flot sanguin, elles sont susceptibles de libérer des VEs qui pourraient être observées dans le plasma. Il serait intéressant de conjuguer d'autres anticorps à des NpAu dans l'optique d'identifier ces éventuelles VEs, dirigés par exemple contre les antigènes CD31, CD34 ou CD146 (Middleton et al., 2005). Nous avons ensuite voulu identifier les éventuels exosomes présents dans le plasma, à l'aide de NpAu-anti-CD63 et de NpAu-anti-CD9. Aucune VE exposant le CD63 n'a pu être observée dans le plasma, cependant de nombreuses VEs émises par des plaquettes activées ont été marquées par les NpAu-anti-CD63. La taille de ces VEs est très variable, jusqu'à près de 1  $\mu\text{m}$  de diamètre, ce qui est en contradiction avec la littérature qui décrit les exosomes comme des VEs de petite taille. Par contre, nous avons observé de rares VEs de taille inférieure à 200 nm dont le marquage par les NpAu-anti-CD63 était particulièrement intense. Il s'agit probablement d'exosomes enrichis en CD63. Le CD63 semble cependant un marqueur peu spécifique des exosomes. De rares objets exposant l'antigène CD9 ont été observés dans le plasma à l'aide des NpAu-anti-CD9, mais des expériences additionnelles doivent être menées afin de déterminer si le CD9 peut être utilisé pour identifier spécifiquement les exosomes. Il serait également intéressant de tester des NpAu conjuguées à d'autres anticorps dirigés contre d'autres antigènes des exosomes décrits dans la littérature, comme le CD81 par exemple. Nous avons également synthétisé des NpAu-anti-CD326 et les avons utilisées avec succès pour identifier des VEs issues de cellules tumorales en culture. Bien que l'essentiel de cette étude ait été consacré à l'observation

d'échantillons provenant d'individus sains, une perspective de ce projet serait d'identifier des VEs exposant des marqueurs pathologiques à leur surface dans le plasma.

Afin de quantifier les VEs du plasma sanguin, nous avons développé une méthode originale de sédimentation de VEs sur grille de MET. Cette méthode, combinée à de l'immunomarquage par des NpAu-AnxA5, des NpAu-anti-CD235a et des NpAu-anti-CD41, nous a permis de déterminer que le plasma contenait environ 95 % de VEs sphériques, 5 % de VEs tubulaires et moins de 1 % de grands fragments membranaires. Cette méthode a également permis de déterminer de manière objective la concentration des VEs dans le plasma, aboutissant à une valeur d'environ 100.000 VEs par  $\mu\text{L}$ . Seules 30 % de ces VEs exposent la PS. Le plasma contient également en moyenne 60 Ery-G par  $\mu\text{L}$ , ce qui n'est pas négligeable compte tenu de leur grande surface membranaire. Les résultats de cette quantification par sédimentation sur grille de MET ont été confirmés par une étude de CF menée en parallèle. Il est intéressant de constater que deux méthodes totalement indépendantes fournissent des résultats très proches, ce qui nous conforte dans leur validité. Les concentrations obtenues sont cependant des concentrations minimales, les méthodes de sédimentation sur grille de MET et de CF ne permettant pas de détecter les VEs de moins de 100 nm de diamètre. La principale limitation de cette méthode de sédimentation sur grille est sa dépendance à l'immunomarquage par les NpAu-Protéine, sans lesquelles les VEs sont difficilement identifiables avec certitude. Nous avons donc tenté de la combiner à une préparation de type cryo-MET, afin de cumuler les avantages de ces deux techniques. Des résultats encourageants ont été obtenus, permettant notamment d'observer et de quantifier l'intégralité des VEs présentes sur la grille, indépendamment du marquage ou non par des NpAu-Protéine. Des expériences complémentaires sont néanmoins nécessaires pour mettre au point et valider cette approche pour la caractérisation et la quantification des VEs. Les techniques de MET et d'immunomarquage employées dans cette partie du projet sont théoriquement applicables à l'étude des VEs contenues dans un fluide biologique quelconque et pourraient donc être utilisées pour caractériser d'autres liquides.

Le dernier thème de mon projet de thèse a été l'isolation des VEs. Nous avons montré que les méthodes d'ultracentrifugation couramment utilisées entraînaient la formation d'agrégats de VEs, pouvant induire des artefacts lors de l'analyse ultérieure des échantillons, comme par exemple leur analyse protéomique ou génomique. Nous avons ensuite développé une

méthode d'isolation spécifique de VEs exposant la PS à l'aide de particules magnétiques conjuguées à l'AnxA5. Deux types de particules magnétiques ont été utilisés : des nanoparticules de 50 nm de diamètre, fournies par nos collaborateurs les D<sup>rs</sup> Laurent Adumeau et Stéphane Mornet (ICMCB, Bordeaux), ainsi que des particules commerciales de 1 µm de diamètre. L'AnxA5 a été conjuguée à ces particules par un protocole similaire à celui employé pour les nanoparticules d'or utilisées dans cette étude. Des globules rouges lysés ont été utilisés comme modèle de membrane exposant la PS et l'efficacité de liaison des PMag-AnxA5 aux GR-L a été validée par MET. Nous avons mis en évidence un phénomène d'agrégation de GR-L, vraisemblablement causé par la multivalence des PMag-AnxA5. L'efficacité d'extraction des GR-L a été évaluée par CF et des conditions permettant l'isolation quasi-totale des membranes exposant la PS de ces échantillons ont été déterminées. Les PMag-AnxA5 ont ensuite été utilisées pour isoler les VEs exposant la PS contenues dans le plasma sanguin et des conditions permettant l'extraction quasi-totale de ces VEs ont également été déterminées. Des PMag ont été conjuguées à un anticorps anti-CD235a et ont été utilisées avec succès pour extraire la quasi-totalité des GR-L contenus dans un échantillon. Ces études démontrent la validité de cette approche. A l'instar des NpAu-Protéine, il serait intéressant de conjuguer d'autres anticorps aux PMag et de les utiliser pour capturer et extraire d'autres types de VEs. Les échantillons extraits par cette méthode pourraient être étudiés par spectrométrie de masse ou séquençage, pour des analyses protéo-géno-lipidomiques. Ceci pourrait éventuellement permettre d'identifier des marqueurs moléculaires spécifiques de certaines populations de VEs.

Ce travail a permis d'apporter une caractérisation détaillée des VEs du plasma sanguin du sujet sain et peut servir de référence pour des études ultérieures concernant les VEs contenues dans des plasmas ou autres liquides biologiques pathologiques.

## E – REFERENCES

- Admyre, C., Johansson, S.M., Qazi, K.R., Filén, J.-J., Laheesmaa, R., Norman, M., Neve, E.P.A., Scheynius, A., Gabrielsson, S., 2007. Exosomes with immune modulatory features are present in human breast milk. *J. Immunol.* 179, 1969–1978.
- Adumeau, L., 2015. Développement de stratégies de biofonctionnalisation de surface de nano-objets pour des applications biologiques. Bordeaux.
- Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., Walter, P., 2008. *Molecular Biology of the Cell* 5E, 5th ed. Garland Science, New York.
- Albertsson, P.A., Frick, G., 1960. Partition of virus particles in a liquid two-phase system. *Biochim. Biophys. Acta* 37, 230–237.
- Al-Nedawi, K., Meehan, B., Micallef, J., Lhotak, V., May, L., Guha, A., Rak, J., 2008. Intercellular transfer of the oncogenic receptor EGFRvIII by microvesicles derived from tumour cells. *Nat Cell Biol* 10, 619–624. doi:10.1038/ncb1725
- Anderson, W., Lane, R., Korbie, D., Trau, M., 2015. Observations of Tunable Resistive Pulse Sensing for Exosome Analysis: Improving System Sensitivity and Stability. *Langmuir* 31, 6577–6587. doi:10.1021/acs.langmuir.5b01402
- Andre, F., Scharzt, N.E.C., Movassagh, M., Flament, C., Pautier, P., Morice, P., Pomel, C., Lhomme, C., Escudier, B., Le Chevalier, T., Tursz, T., Amigorena, S., Raposo, G., Angevin, E., Zitvogel, L., 2002. Malignant effusions and immunogenic tumour-derived exosomes. *Lancet* 360, 295–305. doi:10.1016/S0140-6736(02)09552-1
- Antonyak, M.A., Li, B., Boroughs, L.K., Johnson, J.L., Druso, J.E., Bryant, K.L., Holowka, D.A., Cerione, R.A., 2011. Cancer cell-derived microvesicles induce transformation by transferring tissue transglutaminase and fibronectin to recipient cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 108, 4852–4857. doi:10.1073/pnas.1017667108
- Arakelyan, A., Ivanova, O., Vasilieva, E., Grivel, J.-C., Margolis, L., 2015. Antigenic composition of single nano-sized extracellular blood vesicles. *Nanomedicine* 11, 489–498. doi:10.1016/j.nano.2014.09.020
- Arraud, N., Gounou, C., Linares, R., Brisson, A.R., 2014a. A simple flow cytometry method improves the detection of phosphatidylserine-exposing extracellular vesicles. *J. Thromb. Haemost.* doi:10.1111/jth.12767
- Arraud, N., Gounou, C., Turpin, D., Brisson, A.R., 2016. Fluorescence triggering: A general strategy for enumerating and phenotyping extracellular vesicles by flow cytometry: Phenotyping of EVs by Fluorescence Triggering in FCM. *Cytometry Part A* 89, 184–195. doi:10.1002/cyto.a.22669
- Arraud, N., Linares, R., Tan, S., Gounou, C., Pasquet, J.-M., Mornet, S., Brisson, A.R., 2014b. Extracellular vesicles from blood plasma: determination of their morphology, size, phenotype and concentration. *J. Thromb. Haemost.* 12, 614–627. doi:10.1111/jth.12554
- Ashcroft, B.A., de Sonnevile, J., Yuana, Y., Osanto, S., Bertina, R., Kuil, M.E., Oosterkamp, T.H., 2012. Determination of the size distribution of blood microparticles directly in plasma using atomic force microscopy and microfluidics. *Biomed Microdevices* 14, 641–649. doi:10.1007/s10544-012-9642-y
- Ayache, J., Beaunier, L., Boumendil, J., Ehret, G., Laub, D., 2010. Artifacts in Transmission Electron Microscopy, in: *Sample Preparation Handbook for Transmission Electron Microscopy*. Springer New York, pp. 125–170.
- Ayers, L., Kohler, M., Harrison, P., Sargent, I., Dragovic, R., Schaap, M., Nieuwland, R., Brooks, S.A., Ferry, B., 2011. Measurement of circulating cell-derived microparticles by flow cytometry: sources of variability within the assay. *Thromb. Res.* 127, 370–377. doi:10.1016/j.thromres.2010.12.014

- Bai, F., Wang, D., Huo, Z., Chen, W., Liu, L., Liang, X., Chen, C., Wang, X., Peng, Q., Li, Y., 2007. A versatile bottom-up assembly approach to colloidal spheres from nanocrystals. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 46, 6650–6653. doi:10.1002/anie.200701355
- Beams, J.W., Weed, A.J., Pickels, E.G., 1933. THE ULTRACENTRIFUGE. *Science* 78, 338–340. doi:10.1126/science.78.2024.338
- Bennett, J.S., 1990. The molecular biology of platelet membrane proteins. *Semin. Hematol.* 27, 186–204.
- Bérat, R., Rémy-Zolghadry, M., Gounou, C., Manigand, C., Tan, S., Saltó, C., Arenas, E., Bordenave, L., Brisson, A.R., 2007. Peptide-presenting two-dimensional protein matrix on supported lipid bilayers: an efficient platform for cell adhesion. *Biointerphases* 2, 165–172. doi:10.1116/1.2821954
- Berckmans, R.J., Sturk, A., Tienen, L.M. van, Schaap, M.C.L., Nieuwland, R., 2011. Cell-derived vesicles exposing coagulant tissue factor in saliva. *Blood* 117, 3172–3180. doi:10.1182/blood-2010-06-290460
- Bevens, E.M., Comfurius, P., Zwaal, R.F., 1983. Changes in membrane phospholipid distribution during platelet activation. *Biochim. Biophys. Acta* 736, 57–66.
- Biró, E., Sturk-Maquelin, K.N., Vogel, G.M.T., Meuleman, D.G., Smit, M.J., Hack, C.E., Sturk, A., Nieuwland, R., 2003. Human cell-derived microparticles promote thrombus formation in vivo in a tissue factor-dependent manner. *J. Thromb. Haemost.* 1, 2561–2568.
- Bobrie, A., Colombo, M., Krumeich, S., Raposo, G., Théry, C., 2012. Diverse subpopulations of vesicles secreted by different intracellular mechanisms are present in exosome preparations obtained by differential ultracentrifugation. *Journal of Extracellular Vesicles* 1.
- Boilard, E., Nigrovic, P.A., Larabee, K., Watts, G.F.M., Coblyn, J.S., Weinblatt, M.E., Massarotti, E.M., Remold-O'Donnell, E., Farndale, R.W., Ware, J., Lee, D.M., 2010. Platelets amplify inflammation in arthritis via collagen-dependent microparticle production. *Science* 327, 580–583. doi:10.1126/science.1181928
- Böing, A.N., van der Pol, E., Grootemaat, A.E., Coumans, F.A.W., Sturk, A., Nieuwland, R., 2014. Single-step isolation of extracellular vesicles by size-exclusion chromatography. *Journal of Extracellular Vesicles* 3. doi:10.3402/jev.v3.23430
- Booth, A.M., Fang, Y., Fallon, J.K., Yang, J.-M., Hildreth, J.E.K., Gould, S.J., 2006. Exosomes and HIV Gag bud from endosome-like domains of the T cell plasma membrane. *J Cell Biol* 172, 923–935. doi:10.1083/jcb.200508014
- Bouter, A., Gounou, C., Bérat, R., Tan, S., Gallois, B., Granier, T., d'Estaintot, B.L., Pöschl, E., Brachvogel, B., Brisson, A.R., 2011. Annexin-A5 assembled into two-dimensional arrays promotes cell membrane repair. *Nat Commun* 2, 270. doi:10.1038/ncomms1270
- Brisson, A.R., Mornet, S., 2007. Patent WO/2007/122259.
- Brussaard, C.P.D., Marie, D., Bratbak, G., 2000. Flow cytometric detection of viruses. *Journal of Virological Methods* 85, 175–182. doi:10.1016/S0166-0934(99)00167-6
- Brust, M., Kiely, C.J., 2002. Some recent advances in nanostructure preparation from gold and silver particles: a short topical review. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects* 202, 175–186. doi:10.1016/S0927-7757(01)01087-1
- Brust, M., Walker, M., Bethell, D., Schiffrin, D.J., Whyman, R., 1994. Synthesis of thiol-derivatised gold nanoparticles in a two-phase Liquid-Liquid system. *J. Chem. Soc., Chem. Commun.* 801–802. doi:10.1039/C39940000801
- Burnette, W.N., 1981. “Western Blotting”: Electrophoretic transfer of proteins from sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gels to unmodified nitrocellulose and radiographic detection with antibody and radioiodinated protein A. *Analytical Biochemistry* 112, 195–203. doi:10.1016/0003-2697(81)90281-5
- Buzas, E.I., György, B., Nagy, G., Falus, A., Gay, S., 2014. Emerging role of extracellular vesicles in inflammatory diseases. *Nat Rev Rheumatol* 10, 356–364. doi:10.1038/nrrheum.2014.19
- Cai, W., Gao, T., Hong, H., Sun, J., 2008. Applications of gold nanoparticles in cancer nanotechnology. *Nanotechnol Sci Appl* 2008. doi:10.2147/NSA.S3788

- Chargaff, E., West, R., 1946. The biological significance of the thromboplastic protein of blood. *J. Biol. Chem.* 166, 189–197.
- Chen, C., Skog, J., Hsu, C.-H., Lessard, R.T., Balaj, L., Wurdinger, T., Carter, B.S., Breakefield, X.O., Toner, M., Irimia, D., 2010. Microfluidic isolation and transcriptome analysis of serum microvesicles. *Lab Chip* 10, 505–511. doi:10.1039/b916199f
- Chen, T.S., Lai, R.C., Lee, M.M., Choo, A.B.H., Lee, C.N., Lim, S.K., 2010. Mesenchymal stem cell secretes microparticles enriched in pre-microRNAs. *Nucleic Acids Res.* 38, 215–224. doi:10.1093/nar/gkp857
- Chiasserini, D., van Weering, J.R.T., Piersma, S.R., Pham, T.V., Malekzadeh, A., Teunissen, C.E., de Wit, H., Jiménez, C.R., 2014. Proteomic analysis of cerebrospinal fluid extracellular vesicles: a comprehensive dataset. *J Proteomics* 106, 191–204. doi:10.1016/j.jprot.2014.04.028
- Chironi, G.N., Boulanger, C.M., Simon, A., Dignat-George, F., Freyssinet, J.-M., Tedgui, A., 2009. Endothelial microparticles in diseases. *Cell Tissue Res.* 335, 143–151. doi:10.1007/s00441-008-0710-9
- Choi, H., Lee, D.S., 2016. Illuminating the physiology of extracellular vesicles. *Stem Cell Research & Therapy* 7, 55. doi:10.1186/s13287-016-0316-1
- Chugh, P.E., Sin, S.-H., Ozgur, S., Henry, D.H., Menezes, P., Griffith, J., Eron, J.J., Damania, B., Dittmer, D.P., 2013. Systemically Circulating Viral and Tumor-Derived MicroRNAs in KSHV-Associated Malignancies. *PLOS Pathog* 9, e1003484. doi:10.1371/journal.ppat.1003484
- Clark, R.T., 2015. Imaging flow cytometry enhances particle detection sensitivity for extracellular vesicle analysis. *Nat Meth* 12. doi:10.1038/nmeth.f.380
- Cocucci, E., Racchetti, G., Meldolesi, J., 2009. Shedding microvesicles: artefacts no more. *Trends in Cell Biology* 19, 43–51. doi:10.1016/j.tcb.2008.11.003
- Connor, D.E., Exner, T., Ma, D.D.F., Joseph, J.E., 2010. 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.* 103, 1044–1052. doi:10.1160/TH09-09-0644
- Coulter, W., 1953. Means for counting particles suspended in a fluid. 2656508.
- Dachary-Prigent, J., Freyssinet, J.M., Pasquet, J.M., Carron, J.C., Nurden, A.T., 1993. Annexin V as a probe of aminophospholipid exposure and platelet membrane vesiculation: a flow cytometry study showing a role for free sulfhydryl groups. *Blood* 81, 2554–2565.
- Dalchau, R., Kirkley, J., Fabre, J.W., 1980. Monoclonal antibody to a human leukocyte-specific membrane glycoprotein probably homologous to the leukocyte-common (L-C) antigen of the rat. *Eur. J. Immunol.* 10, 737–744. doi:10.1002/eji.1830101003
- Daniel, M.-C., Astruc, D., 2004. Gold nanoparticles: assembly, supramolecular chemistry, quantum-size-related properties, and applications toward biology, catalysis, and nanotechnology. *Chem. Rev.* 104, 293–346. doi:10.1021/cr030698+
- Diamant, M., Nieuwland, R., Pablo, R.F., Sturk, A., Smit, J.W.A., Radder, J.K., 2002. Elevated numbers of tissue-factor exposing microparticles correlate with components of the metabolic syndrome in uncomplicated type 2 diabetes mellitus. *Circulation* 106, 2442–2447.
- Doeuvre, L., Angles-Cano, E., 2009. Des microparticules cellulaires dévoilent leur fonction fibrinolytique et protéolytique. *médecine/sciences* 25, 37–44. doi:10.1051/medsci/200925137
- Dragovic, R.A., Gardiner, C., Brooks, A.S., Tannetta, D.S., Ferguson, D.J.P., Hole, P., Carr, B., Redman, C.W.G., Harris, A.L., Dobson, P.J., Harrison, P., Sargent, I.L., 2011. Sizing and phenotyping of cellular vesicles using Nanoparticle Tracking Analysis. *Nanomedicine* 7, 780–788. doi:10.1016/j.nano.2011.04.003
- Dubochet, J., Adrian, M., Chang, J.J., Homo, J.C., Lepault, J., McDowell, A.W., Schultz, P., 1988. Cryo-electron microscopy of vitrified specimens. *Q. Rev. Biophys.* 21, 129–228.
- Ellman, G.L., 1959. Tissue sulfhydryl groups. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 82, 70–77. doi:10.1016/0003-9861(59)90090-6

- Enjeti, A.K., Lincz, L.F., Seldon, M., 2007. Detection and measurement of microparticles: an evolving research tool for vascular biology. *Semin. Thromb. Hemost.* 33, 771–779. doi:10.1055/s-2007-1000369
- Erdbrügger, U., Rudy, C.K., Etter, M.E., Dryden, K.A., Yeager, M., Klibanov, A.L., Lannigan, J., 2014. Imaging flow cytometry elucidates limitations of microparticle analysis by conventional flow cytometry. *Cytometry A* 85, 756–770. doi:10.1002/cyto.a.22494
- Escola, J.M., Kleijmeer, M.J., Stoorvogel, W., Griffith, J.M., Yoshie, O., Geuze, H.J., 1998. Selective enrichment of tetraspan proteins on the internal vesicles of multivesicular endosomes and on exosomes secreted by human B-lymphocytes. *J. Biol. Chem.* 273, 20121–20127.
- Faulk, P., Taylor, M., 1971. An immunocolloid method for the electron microscope. *Immunochemistry* 8, 1081–1083. doi:10.1016/0019-2791(71)90496-4
- Frens, G., 1973. Controlled Nucleation for the Regulation of the Particle Size in Monodisperse Gold Suspensions. *Nature* 241, 20–22. doi:10.1038/10.1038/physci241020a0
- Gallagher, S.R., 2008. SDS-Polyacrylamide Gel Electrophoresis (SDS-PAGE), in: *Current Protocols Essential Laboratory Techniques*. John Wiley & Sons, Inc.
- Gardiner, C., Ferreira, Y.J., Dragovic, R.A., Redman, C.W.G., Sargent, I.L., 2013. Extracellular vesicle sizing and enumeration by nanoparticle tracking analysis. *Journal of Extracellular Vesicles* 2. doi:10.3402/jev.v2i0.19671
- Garnier, B., Tan, S., Miraux, S., Bled, E., Brisson, A.R., 2012. Optimized synthesis of 100 nm diameter magnetoliposomes with high content of maghemite particles and high MRI effect. *Contrast Media Mol. Imaging* 7, 231–239. doi:10.1002/cmml.487
- Geddings, J.E., Mackman, N., 2013. Tumor-derived tissue factor–positive microparticles and venous thrombosis in cancer patients. *Blood* 122, 1873–1880. doi:10.1182/blood-2013-04-460139
- Gercel-Taylor, C., Atay, S., Tullis, R.H., Kesimer, M., Taylor, D.D., 2012. Nanoparticle analysis of circulating cell-derived vesicles in ovarian cancer patients. *Anal. Biochem.* 428, 44–53. doi:10.1016/j.ab.2012.06.004
- Geuze, H.J., Slot, J.W., van der Ley, P.A., Scheffer, R.C., 1981. Use of colloidal gold particles in double-labeling immunoelectron microscopy of ultrathin frozen tissue sections. *J. Cell Biol.* 89, 653–665.
- Giusti, I., D’Ascenzo, S., Millimaggi, D., Taraboletti, G., Carta, G., Franceschini, N., Pavan, A., Dolo, V., 2008. Cathepsin B mediates the pH-dependent proinvasive activity of tumor-shed microvesicles. *Neoplasia* 10, 481–488.
- Givan, A., 2001. *Flow Cytometry : First Principles*, John Wiley & Sons Inc. ed.
- Gould, S.J., Raposo, G., 2013. As we wait: coping with an imperfect nomenclature for extracellular vesicles. *Journal of Extracellular Vesicles* 2. doi:10.3402/jev.v2i0.20389
- György, B., 2012. The analysis of pre-analytical and analytical factors that affect the measurement of cell-derived extracellular vesicles.
- György, B., Módos, K., Pállinger, E., Pálóczi, K., Pásztói, M., Misják, P., Deli, M.A., Sipos, A., Szalai, A., Voszka, I., Polgár, A., Tóth, K., Csete, M., Nagy, G., Gay, S., Falus, A., Kittel, A., Buzás, E.I., 2011a. Detection and isolation of cell-derived microparticles are compromised by protein complexes resulting from shared biophysical parameters. *Blood* 117, e39-48. doi:10.1182/blood-2010-09-307595
- György, B., Szabó, T.G., Pásztói, M., Pál, Z., Misják, P., Aradi, B., László, V., Pállinger, E., Pap, E., Kittel, A., Nagy, G., Falus, A., Buzás, E.I., 2011b. Membrane vesicles, current state-of-the-art: emerging role of extracellular vesicles. *Cell. Mol. Life Sci.* 68, 2667–2688. doi:10.1007/s00018-011-0689-3
- György, B., Szabó, T.G., Turiák, L., Wright, M., Herczeg, P., Lédeczi, Z., Kittel, Á., Polgár, A., Tóth, K., Dérfalvi, B., Zelenák, G., Böröcz, I., Carr, B., Nagy, G., Vékey, K., Gay, S., Falus, A., Buzás, E.I., 2012. Improved Flow Cytometric Assessment Reveals Distinct Microvesicle (Cell-Derived Microparticle) Signatures in Joint Diseases. *PLoS ONE* 7, e49726. doi:10.1371/journal.pone.0049726

- Hammond, G.W., Hazelton, P.R., Chuang, I., Klisko, B., 1981. Improved detection of viruses by electron microscopy after direct ultracentrifuge preparation of specimens. *J. Clin. Microbiol.* 14, 210–221.
- Harding, C., Heuser, J., Stahl, P., 1983. Receptor-mediated endocytosis of transferrin and recycling of the transferrin receptor in rat reticulocytes. *J. Cell Biol.* 97, 329–339.
- Harris, D.A., Patel, S.H., Gucek, M., Hendrix, A., Westbroek, W., Taraska, J.W., 2015. Exosomes released from breast cancer carcinomas stimulate cell movement. *PLoS ONE* 10, e0117495. doi:10.1371/journal.pone.0117495
- Hayat, M.A., 1970. Principles and Techniques of Electron Microscopy - Vol. 1- Biological Applications by Hayat, M. A. (Ed): Van Nostrand Reinhold Co., NY 9780442156695 Hardcover, First Edition. - UHR Books.
- Hayat, M.A., Miller, S.E., 1990. Negative Staining. McGraw-Hill Publishing Company.
- Heijnen, H.F., Schiel, A.E., Fijnheer, R., Geuze, H.J., Sixma, J.J., 1999. Activated platelets release two types of membrane vesicles: microvesicles by surface shedding and exosomes derived from exocytosis of multivesicular bodies and alpha-granules. *Blood* 94, 3791–3799.
- Hermanson, G.T., 2013. Bioconjugate Techniques. Academic Press.
- Hess, C., Sadallah, S., Hefti, A., Landmann, R., Schifferli, J.A., 1999. Ectosomes released by human neutrophils are specialized functional units. *J. Immunol.* 163, 4564–4573.
- Hnasko, T., Hnasko, R., 2015. The Western Blot, in: Hnasko, R. (Ed.), ELISA, Methods in Molecular Biology. Springer New York, pp. 87–96.
- Hoen, E.N.M.N.-'t, Vlist, E.J. van der, Aalberts, M., Mertens, H.C.H., Bosch, B.J., Bartelink, W., Mastrobattista, E., Gaal, E.V.B. van, Stoorvogel, W., Arkesteijn, G.J.A., Wauben, M.H.M., 2012. Quantitative and qualitative flow cytometric analysis of nanosized cell-derived membrane vesicles. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine* 8, 712–720. doi:10.1016/j.nano.2011.09.006
- Höög, J.L., Lötvall, J., 2015. Diversity of extracellular vesicles in human ejaculates revealed by cryo-electron microscopy. *Journal of Extracellular Vesicles* 4.
- Horstman, L.L., Jy, W., Minagar, A., Bidot, C.J., Jimenez, J.J., Alexander, J.S., Ahn, Y.S., 2007. Cell-derived microparticles and exosomes in neuroinflammatory disorders. *Int. Rev. Neurobiol.* 79, 227–268. doi:10.1016/S0074-7742(07)79010-4
- Hugel, B., Martínez, M.C., Kunzelmann, C., Freyssinet, J.-M., 2005. Membrane microparticles: two sides of the coin. *Physiology (Bethesda)* 20, 22–27. doi:10.1152/physiol.00029.2004
- Issman, L., Brenner, B., Talmon, Y., Aharon, A., 2013. Cryogenic Transmission Electron Microscopy Nanostructural Study of Shed Microparticles. *PLOS ONE* 8, e83680. doi:10.1371/journal.pone.0083680
- Italiano Jr., J.E., Hartwig, J.H., 2007. CHAPTER 2 - Megakaryocyte Development and Platelet Formation A2 - Michelson, Alan D., in: Platelets (Second Edition). Academic Press, Burlington, pp. 23–44.
- Jandl, J., Greenberg, M., Yonemoto, R., Castel, W., 1956. Clinical Determination of the Sites of Red Cell Sequestration in Hemolytic Anemias. *J. Clin. Invest.* 35, 842–867. doi:10.1172/JCI103338
- Jimenez, J.J., Jy, W., Mauro, L.M., Horstman, L.L., Ahn, Y.S., 2001. Elevated endothelial microparticles in thrombotic thrombocytopenic purpura: findings from brain and renal microvascular cell culture and patients with active disease. *Br. J. Haematol.* 112, 81–90.
- Johnsen, K.B., Gudbergsson, J.M., Skov, M.N., Pilgaard, L., Moos, T., Duroux, M., 2014. A comprehensive overview of exosomes as drug delivery vehicles — Endogenous nanocarriers for targeted cancer therapy. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Reviews on Cancer* 1846, 75–87. doi:10.1016/j.bbcan.2014.04.005
- Johnstone, R.M., 1992. The Jeanne Manery-Fisher Memorial Lecture 1991. Maturation of reticulocytes: formation of exosomes as a mechanism for shedding membrane proteins. *Biochem. Cell Biol.* 70, 179–190.

- Johnstone, R.M., Adam, M., Hammond, J.R., Orr, L., Turbide, C., 1987. Vesicle formation during reticulocyte maturation. Association of plasma membrane activities with released vesicles (exosomes). *J. Biol. Chem.* 262, 9412–9420.
- Joop, K., Berckmans, R.J., Nieuwland, R., Berkhout, J., Romijn, F.P., Hack, C.E., Sturk, A., 2001. Microparticles from patients with multiple organ dysfunction syndrome and sepsis support coagulation through multiple mechanisms. *Thromb. Haemost.* 85, 810–820.
- Jue, R., Lambert, J.M., Pierce, L.R., Traut, R.R., 1978. Addition of sulfhydryl groups of *Escherichia coli* ribosomes by protein modification with 2-iminothiolane (methyl 4-mercaptobutyrimidate). *Biochemistry* 17, 5399–5406. doi:10.1021/bi00618a013
- Kanaras, A.G., Kamounah, F.S., Schaumburg, K., Kiely, C.J., Brust, M., 2002. Thioalkylated tetraethylene glycol: a new ligand for water soluble monolayer protected gold clusters. *Chem. Commun. (Camb.)* 2294–2295.
- Kangro, H., Mahy, B., 1996. *Virology Methods Manual*, 1st Edition | Hillar Kangro, Brian Mahy | ISBN 9780080543581.
- Koedam, J.A., Cramer, E.M., Briend, E., Furie, B., Furie, B.C., Wagner, D.D., 1992. P-selectin, a granule membrane protein of platelets and endothelial cells, follows the regulated secretory pathway in AtT-20 cells. *J. Cell Biol.* 116, 617–625.
- Koopman, G., Reutelingsperger, C.P., Kuijten, G.A., Keehnen, R.M., Pals, S.T., van Oers, M.H., 1994. Annexin V for flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on B cells undergoing apoptosis. *Blood* 84, 1415–1420.
- Kowal, J., Arras, G., Colombo, M., Jouve, M., Morath, J.P., Primdal-Bengtson, B., Dingli, F., Loew, D., Tkach, M., Théry, C., 2016. Proteomic comparison defines novel markers to characterize heterogeneous populations of extracellular vesicle subtypes. *PNAS* 113, E968–E977. doi:10.1073/pnas.1521230113
- Kralj-Iglic, V., Sustar, Bedina-Zavec, Stukelj, Frank, Bobojevic, Jansa, Ogorevc, Kruljc, Mam, Simunic, Mancek-Keber, Jerala, Rozman, Veranic, P., Hagerstrand, Kralj-Iglic, V., 2011. Nanoparticles isolated from blood: a reflection of vesiculability of blood cells during the isolation process. *International Journal of Nanomedicine* 2737. doi:10.2147/IJN.S24537
- Kreimer, S., Belov, A.M., Ghiran, I., Murthy, S.K., Frank, D.A., Ivanov, A.R., 2015. Mass-spectrometry-based molecular characterization of extracellular vesicles: lipidomics and proteomics. *J. Proteome Res.* 14, 2367–2384. doi:10.1021/pr501279t
- Lacroix, R., Judicone, C., Poncelet, P., Robert, S., Arnaud, L., Sampol, J., Dignat-George, F., 2012. Impact of pre-analytical parameters on the measurement of circulating microparticles: towards standardization of protocol. *J. Thromb. Haemost.* 10, 437–446. doi:10.1111/j.1538-7836.2011.04610.x
- Lages, B., Scrutton, M.C., Holmsen, H., 1975. Studies on gel-filtered human platelets: isolation and characterization in a medium containing no added Ca<sup>2+</sup>, Mg<sup>2+</sup>, or K<sup>+</sup>. *J. Lab. Clin. Med.* 85, 811–825.
- Lai, C.P., Kim, E.Y., Badr, C.E., Weissleder, R., Mempel, T.R., Tannous, B.A., Breakefield, X.O., 2015. Visualization and tracking of tumour extracellular vesicle delivery and RNA translation using multiplexed reporters. *Nature Communications* 6, 7029. doi:10.1038/ncomms8029
- Lakhter, A.J., Sims, E.K., 2015. Minireview: Emerging Roles for Extracellular Vesicles in Diabetes and Related Metabolic Disorders. *Molecular Endocrinology* 29, 1535–1548. doi:10.1210/me.2015-1206
- Lamparski, H.G., Metha-Damani, A., Yao, J.-Y., Patel, S., Hsu, D.-H., Ruegg, C., Le Pecq, J.-B., 2002. Production and characterization of clinical grade exosomes derived from dendritic cells. *J. Immunol. Methods* 270, 211–226.
- Lane, R.E., Korbie, D., Anderson, W., Vaidyanathan, R., Trau, M., 2015. Analysis of exosome purification methods using a model liposome system and tunable-resistive pulse sensing. *Scientific Reports* 5, 7639. doi:10.1038/srep07639
- Lässer, C., Eldh, M., Lötvall, J., 2012. Isolation and Characterization of RNA-Containing Exosomes. *J Vis Exp.* doi:10.3791/3037

- Lawrie, A.S., Albany, A., Cardigan, R.A., Mackie, I.J., Harrison, P., 2009. Microparticle sizing by dynamic light scattering in fresh-frozen plasma. *Vox Sanguinis* 96, 206–212. doi:10.1111/j.1423-0410.2008.01151.x
- Lee, K., Shao, H., Weissleder, R., Lee, H., 2015. Acoustic Purification of Extracellular Microvesicles. *ACS Nano* 9, 2321–2327. doi:10.1021/nn506538f
- Lentz, B.R., 2003. Exposure of platelet membrane phosphatidylserine regulates blood coagulation. *Prog. Lipid Res.* 42, 423–438.
- Leroyer, A.S., Tedgui, A., Boulanger, C.M., 2008. Role of microparticles in atherothrombosis. *Journal of Internal Medicine* 263, 528–537. doi:10.1111/j.1365-2796.2008.01957.x
- Linares, R., Tan, S., Gounou, C., Arraud, N., Brisson, A.R., 2015. High-speed centrifugation induces aggregation of extracellular vesicles. *Journal of Extracellular Vesicles* 4. doi:10.3402/jev.v4.29509
- Logozzi, M., Milito, A.D., Lugini, L., Borghi, M., Calabrò, L., Spada, M., Perdicchio, M., Marino, M.L., Federici, C., Iessi, E., Brambilla, D., Venturi, G., Lozupone, F., Santinami, M., Huber, V., Maio, M., Rivoltini, L., Fais, S., 2009. High Levels of Exosomes Expressing CD63 and Caveolin-1 in Plasma of Melanoma Patients. *PLOS ONE* 4, e5219. doi:10.1371/journal.pone.0005219
- Lozano-Ramos, I., Bancu, I., Oliveira-Tercero, A., Armengol, M.P., Menezes-Neto, A., Portillo, H.A.D., Lauzurica-Valdemoros, R., Borràs, F.E., 2015. Size-exclusion chromatography-based enrichment of extracellular vesicles from urine samples. *Journal of Extracellular Vesicles* 4.
- Lynch, S.F., Ludlam, C.A., 2007. Plasma microparticles and vascular disorders. *Br. J. Haematol.* 137, 36–48. doi:10.1111/j.1365-2141.2007.06514.x
- Maas, S.L.N., De Vrij, J., Broekman, M.L.D., 2014. Quantification and Size-profiling of Extracellular Vesicles Using Tunable Resistive Pulse Sensing. *Journal of Visualized Experiments*. doi:10.3791/51623
- Maas, S.L.N., de Vrij, J., van der Vlist, E.J., Geragousian, B., van Bloois, L., Mastrobattista, E., Schiffelers, R.M., Wauben, M.H.M., Broekman, M.L.D., Nolte-'t Hoen, E.N.M., 2015. Possibilities and limitations of current technologies for quantification of biological extracellular vesicles and synthetic mimics. *Journal of Controlled Release* 200, 87–96. doi:10.1016/j.jconrel.2014.12.041
- Manly, D.A., Wang, J., Glover, S.L., Kasthuri, R., Liebman, H.A., Key, N.S., Mackman, N., 2010. Increased microparticle tissue factor activity in cancer patients with Venous Thromboembolism. *Thromb. Res.* 125, 511–512. doi:10.1016/j.thromres.2009.09.019
- Marie, null, Brussaard, null, Thyraug, null, Bratbak, null, Vaultot, null, 1999. Enumeration of marine viruses in culture and natural samples by flow cytometry. *Appl. Environ. Microbiol.* 65, 45–52.
- Massart, R., 1981. Preparation of aqueous magnetic liquids in alkaline and acidic media. *IEEE Transactions on Magnetics* 17, 1247–1248. doi:10.1109/TMAG.1981.1061188
- Mathivanan, S., Ji, H., Simpson, R.J., 2010. Exosomes: Extracellular organelles important in intercellular communication. *Journal of Proteomics* 73, 1907–1920. doi:10.1016/j.jprot.2010.06.006
- Melo, S.A., Luecke, L.B., Kahlert, C., Fernandez, A.F., Gammon, S.T., Kaye, J., LeBleu, V.S., Mittendorf, E.A., Weitz, J., Rahbari, N., Reissfelder, C., Pilarsky, C., Fraga, M.F., Piwnicka-Worms, D., Kalluri, R., 2015. Glypican-1 identifies cancer exosomes and detects early pancreatic cancer. *Nature* 523, 177–182. doi:10.1038/nature14581
- Middleton, J., Americh, L., Gayon, R., Julien, D., Mansat, M., Mansat, P., Anract, P., Cantagrel, A., Cattan, P., Reimund, J.-M., Aguilar, L., Amalric, F., Girard, J.-P., 2005. A comparative study of endothelial cell markers expressed in chronically inflamed human tissues: MECA-79, Duffy antigen receptor for chemokines, von Willebrand factor, CD31, CD34, CD105 and CD146. *J. Pathol.* 206, 260–268. doi:10.1002/path.1788
- Milasan, A., Tessandier, N., Tan, S., Brisson, A., Boilard, E., Martel, C., 2016. Extracellular vesicles are present in mouse lymph and their level differs in atherosclerosis. *Journal of Extracellular Vesicles* 5.

- Moldenhauer, G., Momburg, F., Möller, P., Schwartz, R., Hämmerling, G.J., 1987. Epithelium-specific surface glycoprotein of Mr 34,000 is a widely distributed human carcinoma marker. *Br J Cancer* 56, 714–721. doi:10.1038/bjc.1987.276
- Morel, O., Jesel, L., Freyssinet, J.-M., Toti, F., 2011. Cellular mechanisms underlying the formation of circulating microparticles. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 31, 15–26. doi:10.1161/ATVBAHA.109.200956
- Morel, O., Toti, F., Hugel, B., Bakouboula, B., Camoin-Jau, L., Dignat-George, F., Freyssinet, J.-M., 2006. Procoagulant microparticles: disrupting the vascular homeostasis equation? *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 26, 2594–2604. doi:10.1161/01.ATV.0000246775.14471.26
- Morel, O., Toti, F., Hugel, B., Freyssinet, J.-M., 2004. Cellular microparticles: a disseminated storage pool of bioactive vascular effectors. *Curr. Opin. Hematol.* 11, 156–164.
- Morgenstern, E., 1997. Human Platelet Morphology/Ultrastructure, in: Bruchhausen, P.D.F. von, Walter, P.D. med U. (Eds.), *Platelets and Their Factors*, Handbook of Experimental Pharmacology. Springer Berlin Heidelberg, pp. 27–60.
- Muller, L., Hong, C.-S., Stolz, D.B., Watkins, S.C., Whiteside, T.L., 2014. Isolation of Biologically-Active Exosomes from Human Plasma. *J Immunol Methods* 411, 55–65. doi:10.1016/j.jim.2014.06.007
- Murakami, T., Komiyama, Y., Masuda, M., Kido, H., Nomura, S., Fukuhara, S., Karakawa, M., Iwasaka, T., Takahashi, H., 1996. Flow cytometric analysis of platelet activation markers CD62P and CD63 in patients with coronary artery disease. *Eur. J. Clin. Invest.* 26, 996–1003.
- Muralidharan-Chari, V., Clancy, J.W., Sedgwick, A., D’Souza-Schorey, C., 2010. Microvesicles: mediators of extracellular communication during cancer progression. *J Cell Sci* 123, 1603–1611. doi:10.1242/jcs.064386
- Musante, L., Tataruch, D., Gu, D., Benito-Martin, A., Calzaferri, G., Aherne, S., Holthofer, H., 2014. A Simplified Method to Recover Urinary Vesicles for Clinical Applications, and Sample Banking. *Scientific Reports* 4, 7532. doi:10.1038/srep07532
- Nair, D.P., Podgórski, M., Chatani, S., Gong, T., Xi, W., Fenoli, C.R., Bowman, C.N., 2014. The Thiol-Michael Addition Click Reaction: A Powerful and Widely Used Tool in Materials Chemistry. *Chem. Mater.* 26, 724–744. doi:10.1021/cm402180t
- Nordin, J.Z., Lee, Y., Väder, P., Mäger, I., Johansson, H.J., Heusermann, W., Wiklander, O.P.B., Hällbrink, M., Seow, Y., Bultema, J.J., Gilthorpe, J., Davies, T., Fairchild, P.J., Gabrielsson, S., Meisner-Kober, N.C., Lehtiö, J., Smith, C.I.E., Wood, M.J.A., El Andaloussi, S., 2015. Ultrafiltration with size-exclusion liquid chromatography for high yield isolation of extracellular vesicles preserving intact biophysical and functional properties. *Nanomedicine* 11, 879–883. doi:10.1016/j.nano.2015.01.003
- Obregon, C., Rothen-Rutishauser, B., Gitahi, S.K., Gehr, P., Nicod, L.P., 2006. Exovesicles from human activated dendritic cells fuse with resting dendritic cells, allowing them to present alloantigens. *Am. J. Pathol.* 169, 2127–2136. doi:10.2353/ajpath.2006.060453
- Ogawa, Y., Kanai-Azuma, M., Akimoto, Y., Kawakami, H., Yanoshita, R., 2008. Exosome-like vesicles with dipeptidyl peptidase IV in human saliva. *Biol. Pharm. Bull.* 31, 1059–1062.
- Ogawa, Y., Miura, Y., Harazono, A., Kanai-Azuma, M., Akimoto, Y., Kawakami, H., Yamaguchi, T., Toda, T., Endo, T., Tsubuki, M., Yanoshita, R., 2011. Proteomic analysis of two types of exosomes in human whole saliva. *Biol. Pharm. Bull.* 34, 13–23.
- Pan, B.T., Teng, K., Wu, C., Adam, M., Johnstone, R.M., 1985. Electron microscopic evidence for externalization of the transferrin receptor in vesicular form in sheep reticulocytes. *J. Cell Biol.* 101, 942–948.
- Peinado, H., Alečković, M., Lavotshkin, S., Matei, I., Costa-Silva, B., Moreno-Bueno, G., Hergueta-Redondo, M., Williams, C., García-Santos, G., Ghajar, C., Nitadori-Hoshino, A., Hoffman, C., Badal, K., Garcia, B.A., Callahan, M.K., Yuan, J., Martins, V.R., Skog, J., Kaplan, R.N., Brady, M.S., Wolchok, J.D., Chapman, P.B., Kang, Y., Bromberg, J., Lyden, D., 2012. Melanoma exosomes educate bone marrow progenitor cells toward a pro-metastatic phenotype through MET. *Nat. Med.* 18, 883–891. doi:10.1038/nm.2753

- Pisitkun, T., Shen, R.-F., Knepper, M.A., 2004. Identification and proteomic profiling of exosomes in human urine. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 101, 13368–13373. doi:10.1073/pnas.0403453101
- Pissuwan, D., Valenzuela, S.M., Cortie, M.B., 2006. Therapeutic possibilities of plasmonically heated gold nanoparticles. *Trends Biotechnol.* 24, 62–67. doi:10.1016/j.tibtech.2005.12.004
- Pocsfalvi, G., Stanly, C., Vilasi, A., Fiume, I., Capasso, G., Turiák, L., Buzas, E.I., Vékey, K., 2016. Mass spectrometry of extracellular vesicles. *Mass Spec Rev* 35, 3–21. doi:10.1002/mas.21457
- Poole, J., 2000. Red cell antigens on band 3 and glycophorin A. *Blood Rev.* 14, 31–43. doi:10.1054/blre.1999.0124
- Raposo, G., Nijman, H.W., Stoorvogel, W., Liejendekker, R., Harding, C.V., Melief, C.J., Geuze, H.J., 1996. B lymphocytes secrete antigen-presenting vesicles. *J. Exp. Med.* 183, 1161–1172.
- Raposo, G., Stoorvogel, W., 2013. Extracellular vesicles: exosomes, microvesicles, and friends. *J. Cell Biol.* 200, 373–383. doi:10.1083/jcb.201211138
- Rautou, P.-E., Vion, A.-C., Amabile, N., Chironi, G., Simon, A., Tedgui, A., Boulanger, C.M., 2011. Microparticles, vascular function, and atherothrombosis. *Circ. Res.* 109, 593–606. doi:10.1161/CIRCRESAHA.110.233163
- Reineccius, G.A. (University of M., 1995. Liposomes for controlled release in the food industry.
- Reininger, A.J., Heijnen, H.F.G., Schumann, H., Specht, H.M., Schramm, W., Ruggeri, Z.M., 2006. Mechanism of platelet adhesion to von Willebrand factor and microparticle formation under high shear stress. *Blood* 107, 3537–3545. doi:10.1182/blood-2005-02-0618
- Reth, M., 2013. Matching cellular dimensions with molecular sizes. *Nat Immunol* 14, 765–767. doi:10.1038/ni.2621
- Richter, R.P., Lai Kee Him, J., Tessier, B., Tessier, C., Brisson, A.R., 2005. On the Kinetics of Adsorption and Two-Dimensional Self-Assembly of Annexin A5 on Supported Lipid Bilayers. *Biophys J* 89, 3372–3385. doi:10.1529/biophysj.105.064337
- Rider, M.A., Hurwitz, S.N., Meckes, D.G., 2016. ExtraPEG: A Polyethylene Glycol-Based Method for Enrichment of Extracellular Vesicles. *Sci Rep* 6. doi:10.1038/srep23978
- Robert, S., Lacroix, R., Poncelet, P., Harhour, K., Bouriche, T., Judicone, C., Wischhusen, J., Arnaud, L., Dignat-George, F., 2012. High-sensitivity flow cytometry provides access to standardized measurement of small-size microparticles—brief report. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 32, 1054–1058. doi:10.1161/ATVBAHA.111.244616
- Rodrigues, M.L., Nakayasu, E.S., Oliveira, D.L., Nimrichter, L., Nosanchuk, J.D., Almeida, I.C., Casadevall, A., 2008. Extracellular Vesicles Produced by *Cryptococcus neoformans* Contain Protein Components Associated with Virulence. *Eukaryot Cell* 7, 58–67. doi:10.1128/EC.00370-07
- Roth, J., 1996. The silver anniversary of gold: 25 years of the colloidal gold marker system for immunocytochemistry and histochemistry. *Histochem Cell Biol* 106, 1–8. doi:10.1007/BF02473197
- Rubin, O., Crettaz, D., Tissot, J.-D., Lion, N., 2010. Pre-analytical and methodological challenges in red blood cell microparticle proteomics. *Talanta* 82, 1–8. doi:10.1016/j.talanta.2010.04.025
- Rupert, D.L.M., Shelke, G.V., Emilsson, G., Claudio, V., Block, S., Lässer, C., Dahlin, A.B., Lotvall, J.O., Bally, M., Zhdanov, V.P., Höök, F., 2016. Dual-Wavelength Surface Plasmon Resonance for Determining the Size and Concentration of Sub-Populations of Extracellular Vesicles. *Anal. Chem.* doi:10.1021/acs.analchem.6b01860
- Sapsford, K.E., Algar, W.R., Berti, L., Gemmill, K.B., Casey, B.J., Oh, E., Stewart, M.H., Medintz, I.L., 2013. Functionalizing Nanoparticles with Biological Molecules: Developing Chemistries that Facilitate Nanotechnology. *Chem. Rev.* 113, 1904–2074. doi:10.1021/cr300143v
- Schrier, S.L., Zachowski, A., Hervé, P., Kader, J.C., Devaux, P.F., 1992. Transmembrane redistribution of phospholipids of the human red cell membrane during hypotonic hemolysis. *Biochim. Biophys. Acta* 1105, 170–176.
- Seigneuret, M., Devaux, P.F., 1984. ATP-dependent asymmetric distribution of spin-labeled phospholipids in the erythrocyte membrane: relation to shape changes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 81, 3751–3755.

- Shet, A.S., Aras, O., Gupta, K., Hass, M.J., Rausch, D.J., Saba, N., Koopmeiners, L., Key, N.S., Hebbel, R.P., 2003. Sickle blood contains tissue factor-positive microparticles derived from endothelial cells and monocytes. *Blood* 102, 2678–2683. doi:10.1182/blood-2003-03-0693
- Shih, C.-L., Chong, K.-Y., Hsu, S.-C., Chien, H.-J., Ma, C.-T., Chang, J.W.-C., Yu, C.-J., Chiou, C.-C., 2016. Development of a magnetic bead-based method for the collection of circulating extracellular vesicles. *N Biotechnol* 33, 116–122. doi:10.1016/j.nbt.2015.09.003
- Siedlecki, C.A., Wang, I.W., Higashi, J.M., Kottke-Marchant, K., Marchant, R.E., 1999. Platelet-derived microparticles on synthetic surfaces observed by atomic force microscopy and fluorescence microscopy. *Biomaterials* 20, 1521–1529.
- Simak, J., Gelderman, M.P., 2006. Cell membrane microparticles in blood and blood products: potentially pathogenic agents and diagnostic markers. *Transfus Med Rev* 20, 1–26. doi:10.1016/j.tmr.2005.08.001
- Simons, M., Raposo, G., 2009. Exosomes - vesicular carriers for intercellular communication. *Current Opinion in Cell Biology* 21, 575–581. doi:10.1016/j.ceb.2009.03.007
- Skog, J., Würdinger, T., van Rijn, S., Meijer, D.H., Gainche, L., Sena-Esteves, M., Curry, W.T., Carter, B.S., Krichevsky, A.M., Breakefield, X.O., 2008. Glioblastoma microvesicles transport RNA and proteins that promote tumour growth and provide diagnostic biomarkers. *Nat. Cell Biol.* 10, 1470–1476. doi:10.1038/ncb1800
- Slamon, D.J., Godolphin, W., Jones, L.A., Holt, J.A., Wong, S.G., Keith, D.E., Levin, W.J., Stuart, S.G., Udove, J., Ullrich, A., 1989. Studies of the HER-2/neu proto-oncogene in human breast and ovarian cancer. *Science* 244, 707–712.
- Smalley, D.M., Sheman, N.E., Nelson, K., Theodorescu, D., 2008. Isolation and identification of potential urinary microparticle biomarkers of bladder cancer. *J. Proteome Res.* 7, 2088–2096. doi:10.1021/pr700775x
- Sokolova, V., Ludwig, A.-K., Hornung, S., Rotan, O., Horn, P.A., Epple, M., Giebel, B., 2011. Characterisation of exosomes derived from human cells by nanoparticle tracking analysis and scanning electron microscopy. *Colloids Surf B Biointerfaces* 87, 146–150. doi:10.1016/j.colsurfb.2011.05.013
- Sönnichsen, C., Franzl, T., Wilk, T., von Plessen, G., Feldmann, J., Wilson, O., Mulvaney, P., 2002. Drastic Reduction of Plasmon Damping in Gold Nanorods. *Phys. Rev. Lett.* 88, 77402. doi:10.1103/PhysRevLett.88.077402
- Sperling, R.A., Rivera Gil, P., Zhang, F., Zanella, M., Parak, W.J., 2008. Biological applications of gold nanoparticles. *Chem Soc Rev* 37, 1896–1908. doi:10.1039/b712170a
- Stanisic, D.I., Martin, L.B., Liu, X.Q., Jackson, D., Cooper, J., Good, M.F., 2003. Analysis of immunological nonresponsiveness to the 19-kilodalton fragment of merozoite surface Protein 1 of *Plasmodium yoelii*: rescue by chemical conjugation to diphtheria toxoid (DT) and enhancement of immunogenicity by prior DT vaccination. *Infect. Immun.* 71, 5700–5713.
- Tait, J.F., Gibson, D.F., Smith, C., 2004. Measurement of the affinity and cooperativity of annexin V-membrane binding under conditions of low membrane occupancy. *Anal. Biochem.* 329, 112–119. doi:10.1016/j.ab.2004.02.043
- Tapia, F.J., Varndell, I.M., Probert, L., Mey, J.D., Polak, J.M., 1983. Double immunogold staining method for the simultaneous ultrastructural localization of regulatory peptides. *J Histochem Cytochem* 31, 977–981. doi:10.1177/31.7.6189888
- Tatischeff, I., Larquet, E., Falcón-Pérez, J.M., Turpin, P.-Y., Kruglik, S.G., 2012. Fast characterisation of cell-derived extracellular vesicles by nanoparticles tracking analysis, cryo-electron microscopy, and Raman tweezers microspectroscopy. *Journal of Extracellular Vesicles* 1. doi:10.3402/jev.v1i0.19179
- Tauro, B.J., Greening, D.W., Mathias, R.A., Ji, H., Mathivanan, S., Scott, A.M., Simpson, R.J., 2012. Comparison of ultracentrifugation, density gradient separation, and immunoaffinity capture methods for isolating human colon cancer cell line LIM1863-derived exosomes. *Methods* 56, 293–304. doi:10.1016/j.ymeth.2012.01.002

- Taylor, D.D., Chou, I.N., Black, P.H., 1983. Isolation of plasma membrane fragments from cultured murine melanoma cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 113, 470–476.
- Taylor, D.D., Gercel-Taylor, C., 2008. MicroRNA signatures of tumor-derived exosomes as diagnostic biomarkers of ovarian cancer. *Gynecol. Oncol.* 110, 13–21. doi:10.1016/j.ygyno.2008.04.033
- Théry, C., Amigorena, S., Raposo, G., Clayton, A., 2006. Isolation and characterization of exosomes from cell culture supernatants and biological fluids. *Curr Protoc Cell Biol Chapter 3, Unit 3.22.* doi:10.1002/0471143030.cb0322s30
- Théry, C., Ostrowski, M., Segura, E., 2009. Membrane vesicles as conveyors of immune responses. *Nat. Rev. Immunol.* 9, 581–593. doi:10.1038/nri2567
- Théry, C., Zitvogel, L., Amigorena, S., 2002. Exosomes: composition, biogenesis and function. *Nat. Rev. Immunol.* 2, 569–579. doi:10.1038/nri855
- Tissot, J.-D., Rubin, O., Canellini, G., 2010. Analysis and clinical relevance of microparticles from red blood cells: Current Opinion in Hematology 17, 571–577. doi:10.1097/MOH.0b013e32833ec217
- Tomishige, M., Sako, Y., Kusumi, A., 1998. Regulation mechanism of the lateral diffusion of band 3 in erythrocyte membranes by the membrane skeleton. *J. Cell Biol.* 142, 989–1000.
- Trams, E.G., Lauter, C.J., Norman Salem, J., Heine, U., 1981. Exfoliation of membrane ecto-enzymes in the form of micro-vesicles. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes* 645, 63–70. doi:10.1016/0005-2736(81)90512-5
- Traut, R.R., Bollen, A., Sun, T.-T., Hershey, J.W.B., Sundberg, J., Pierce, L.R., 1973. Methyl 4-mercaptobutyrimidate as a cleavable crosslinking reagent and its application to the Escherichia coli 30S ribosome. *Biochemistry* 12, 3266–3273. doi:10.1021/bi00741a019
- Tsafir, I., Sagi, D., Arzi, T., Guedeau-Boudeville, M.A., Frette, V., Kandel, D., Stavans, J., 2001. Pearling instabilities of membrane tubes with anchored polymers. *Phys. Rev. Lett.* 86, 1138–1141. doi:10.1103/PhysRevLett.86.1138
- Tschoepe, D., Schultheiss, H.P., Kolarov, P., Schwippert, B., Dannehl, K., Nieuwenhuis, H.K., Kehrel, B., Strauer, B., Gries, F.A., 1993. Platelet membrane activation markers are predictive for increased risk of acute ischemic events after PTCA. *Circulation* 88, 37–42.
- Turkevich, J., Stevenson, P.C., Hillier, J., 1951. A study of the nucleation and growth processes in the synthesis of colloidal gold. *Discuss. Faraday Soc.* 11, 55–75. doi:10.1039/DF9511100055
- Umez, T., Ohyashiki, K., Kuroda, M., Ohyashiki, J.H., 2013. Leukemia cell to endothelial cell communication via exosomal miRNAs. *Oncogene* 32, 2747–2755. doi:10.1038/onc.2012.295
- Vajen, T., Mause, S.F., Koenen, R.R., 2015. Microvesicles from platelets: novel drivers of vascular inflammation. *Thromb. Haemost.* 114, 228–236. doi:10.1160/TH14-11-0962
- Valadi, H., Ekström, K., Bossios, A., Sjöstrand, M., Lee, J.J., Lötvall, J.O., 2007. Exosome-mediated transfer of mRNAs and microRNAs is a novel mechanism of genetic exchange between cells. *Nat Cell Biol* 9, 654–659. doi:10.1038/ncb1596
- Valerius, N.H., Stendahl, O., Hartwig, J.H., Stossel, T.P., 1981. Distribution of actin-binding protein and myosin in polymorphonuclear leukocytes during locomotion and phagocytosis. *Cell* 24, 195–202.
- Van der Pol, E., 2010. Detection of extracellular vesicles: size does matter [WWW Document]. URL [http://www.edwinvanderpol.com/publications/theses/size\\_does\\_matter](http://www.edwinvanderpol.com/publications/theses/size_does_matter) (accessed 10.3.16).
- van der Pol, E., Böing, A.N., Harrison, P., Sturk, A., Nieuwland, R., 2012. Classification, functions, and clinical relevance of extracellular vesicles. *Pharmacol. Rev.* 64, 676–705. doi:10.1124/pr.112.005983
- van der Pol, E., Hoekstra, A.G., Sturk, A., Otto, C., van Leeuwen, T.G., Nieuwland, R., 2010. Optical and non-optical methods for detection and characterization of microparticles and exosomes. *J. Thromb. Haemost.* 8, 2596–2607. doi:10.1111/j.1538-7836.2010.04074.x
- van der Vlist, E.J., Nolte-'t Hoen, E.N.M., Stoorvogel, W., Arkesteijn, G.J.A., Wauben, M.H.M., 2012. Fluorescent labeling of nano-sized vesicles released by cells and subsequent quantitative and qualitative analysis by high-resolution flow cytometry. *Nat Protoc* 7, 1311–1326. doi:10.1038/nprot.2012.065

- Van Deun, J., Mestdagh, P., Sormunen, R., Cocquyt, V., Vermaelen, K., Vandesompele, J., Bracke, M., De Wever, O., Hendrix, A., 2014. The impact of disparate isolation methods for extracellular vesicles on downstream RNA profiling. *Journal of Extracellular Vesicles* 3. doi:10.3402/jev.v3.24858
- van Niel, G., 2016. Study of Exosomes Shed New Light on Physiology of Amyloidogenesis. *Cell. Mol. Neurobiol.* 36, 327–342. doi:10.1007/s10571-016-0357-0
- VanWijk, M.J., VanBavel, E., Sturk, A., Nieuwland, R., 2003. Microparticles in cardiovascular diseases. *Cardiovasc. Res.* 59, 277–287.
- Vestweber, D., 2008. VE-cadherin: the major endothelial adhesion molecule controlling cellular junctions and blood vessel formation. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 28, 223–232. doi:10.1161/ATVBAHA.107.158014
- Vingerhoeds, M.H., Haisma, H.J., Belliot, S.O., Smit, R.H., Crommelin, D.J., Storm, G., 1996. Immunoliposomes as enzyme-carriers (immuno-enzymosomes) for antibody-directed enzyme prodrug therapy (ADEPT): optimization of prodrug activating capacity. *Pharm. Res.* 13, 604–610.
- Whelihan, M.F., Mann, K.G., 2013. The role of the red cell membrane in thrombin generation. *Thromb. Res.* 131, 377–382. doi:10.1016/j.thromres.2013.01.023
- White, J.G., 2010. Platelet interior imaging technologies. *Blood* 116, 6150–6151. doi:10.1182/blood-2010-09-305557
- White, J.G., 2007. CHAPTER 3 - Platelet Structure A2 - Michelson, Alan D., in: *Platelets* (Second Edition). Academic Press, Burlington, pp. 45–73.
- Witwer, K.W., Buzás, E.I., Bemis, L.T., Bora, A., Lässer, C., Lötvall, J., Nolte-'t Hoen, E.N., Piper, M.G., Sivaraman, S., Skog, J., Théry, C., Wauben, M.H., Hochberg, F., 2013. Standardization of sample collection, isolation and analysis methods in extracellular vesicle research. *J Extracell Vesicles* 2. doi:10.3402/jev.v2i0.20360
- Wokaun, A., Gordon, J.P., Liao, P.F., 1982. Radiation Damping in Surface-Enhanced Raman Scattering. *Phys. Rev. Lett.* 48, 957–960. doi:10.1103/PhysRevLett.48.957
- Wolf, P., 1967. The Nature and Significance of Platelet Products in Human Plasma. *British Journal of Haematology* 13, 269–288. doi:10.1111/j.1365-2141.1967.tb08741.x
- Wubbolts, R., Leckie, R.S., Veenhuizen, P.T.M., Schwarzmann, G., Möbius, W., Hoernschemeyer, J., Slot, J.-W., Geuze, H.J., Stoorvogel, W., 2003. Proteomic and biochemical analyses of human B cell-derived exosomes. Potential implications for their function and multivesicular body formation. *J. Biol. Chem.* 278, 10963–10972. doi:10.1074/jbc.M207550200
- Yuana, Y., Böing, A.N., Grootemaat, A.E., Pol, E. van der, Hau, C.M., Cizmar, P., Buhr, E., Sturk, A., Nieuwland, R., 2015. Handling and storage of human body fluids for analysis of extracellular vesicles. *Journal of Extracellular Vesicles* 4.
- Yuana, Y., Koning, R.I., Kuil, M.E., Rensen, P.C.N., Koster, A.J., Bertina, R.M., Osanto, S., 2013. Cryo-electron microscopy of extracellular vesicles in fresh plasma. *J Extracell Vesicles* 2. doi:10.3402/jev.v2i0.21494
- Yuana, Y., Levels, J., Grootemaat, A., Sturk, A., Nieuwland, R., 2014. Co-isolation of extracellular vesicles and high-density lipoproteins using density gradient ultracentrifugation. *J Extracell Vesicles* 3. doi:10.3402/jev.v3.23262
- Yuana, Y., Oosterkamp, T.H., Bahatyrova, S., Ashcroft, B., Garcia Rodriguez, P., Bertina, R.M., Osanto, S., 2010. Atomic force microscopy: a novel approach to the detection of nanosized blood microparticles. *J. Thromb. Haemost.* 8, 315–323. doi:10.1111/j.1538-7836.2009.03654.x
- Zahra, S., Anderson, J.A.M., Stirling, D., Ludlam, C.A., 2011. Microparticles, malignancy and thrombosis. *Br. J. Haematol.* 152, 688–700. doi:10.1111/j.1365-2141.2010.08452.x
- Zonneveld, M.I., Brisson, A.R., van Herwijnen, M.J.C., Tan, S., van de Lest, C.H.A., Redegeld, F.A., Garsen, J., Wauben, M.H.M., Nolte-'t Hoen, E.N.M., 2014. Recovery of extracellular vesicles from human breast milk is influenced by sample collection and vesicle isolation procedures. *J Extracell Vesicles* 3. doi:10.3402/jev.v3.24215

- Zwaal, R.F., Schroit, A.J., 1997. Pathophysiologic implications of membrane phospholipid asymmetry in blood cells. *Blood* 89, 1121–1132.
- Zwicker, J.I., Trenor, C.C., Furie, B.C., Furie, B., 2011. Tissue Factor-Bearing Microparticles and Thrombus Formation. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* 31, 728–733. doi:10.1161/ATVBAHA.109.200964



## **F – ANNEXE**

### **Annexe 1 : Liste des protéines conjuguées et applications**

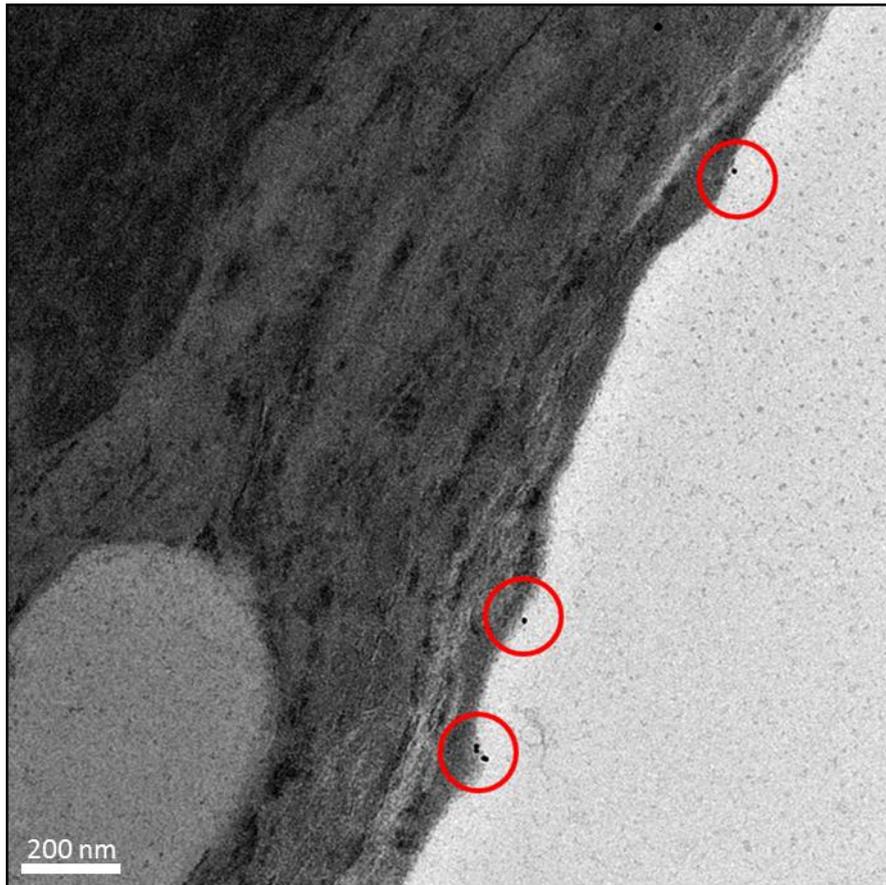
Cette annexe présente la liste des protéines conjuguées aux nanoparticules d'or au cours de ce travail de thèse, ainsi que les éventuelles applications pratiques des NpAu-Protéine correspondantes. Certaines de ces NpAu-Protéine ont été produites dans le cadre de collaborations et n'ont donc pas de lien direct avec ce travail de thèse.

- AnxA5
- Anticorps anti-CD235a
- Anticorps anti-CD41
- Anticorps anti-CD45
- Anticorps anti-CD144
- Anticorps anti-CD62P
- Anticorps anti-CD63
- Anticorps anti-CD9
- Anticorps anti-CD326

Ces huit types de NpAu-Protéine ont été utilisés pour la caractérisation des vésicules extracellulaires du plasma sanguin, traitée en section 2 du chapitre « Résultats et discussions ».

- Anticorps anti-HER2

L'antigène HER2 est un biomarqueur et une cible thérapeutique dans le cas de certains cancers du sein. Les NpAu-anti-HER2 ont été utilisées avec succès pour le marquage de la membrane de cellules BT474 qui surexpriment l'antigène HER2. Elles ont également été utilisées pour tenter d'identifier des VEs d'origine cancéreuse dans le plasma de patientes atteintes de cancer du sein, sans succès pour le moment.



**Image de MET d'une section de cellule BT474 marquées par des NpAu-anti-HER2.** Les nanoparticules sont entourées par des cercles rouges. Considérant que cette image a été réalisée sur une coupe de 70 nm d'épaisseur, la présence de cinq nanoparticules est le signe d'une forte densité de marquage de la membrane par les NpAu-anti-HER2. Image S. Tan.

- Anticorps anti-ApoB48

- Anticorps anti-ApoR

Ces deux types de NpAu-Protéine ont été utilisés pour tenter de marquer des lipoprotéines contenues dans le plasma sanguin, sans succès pour le moment.

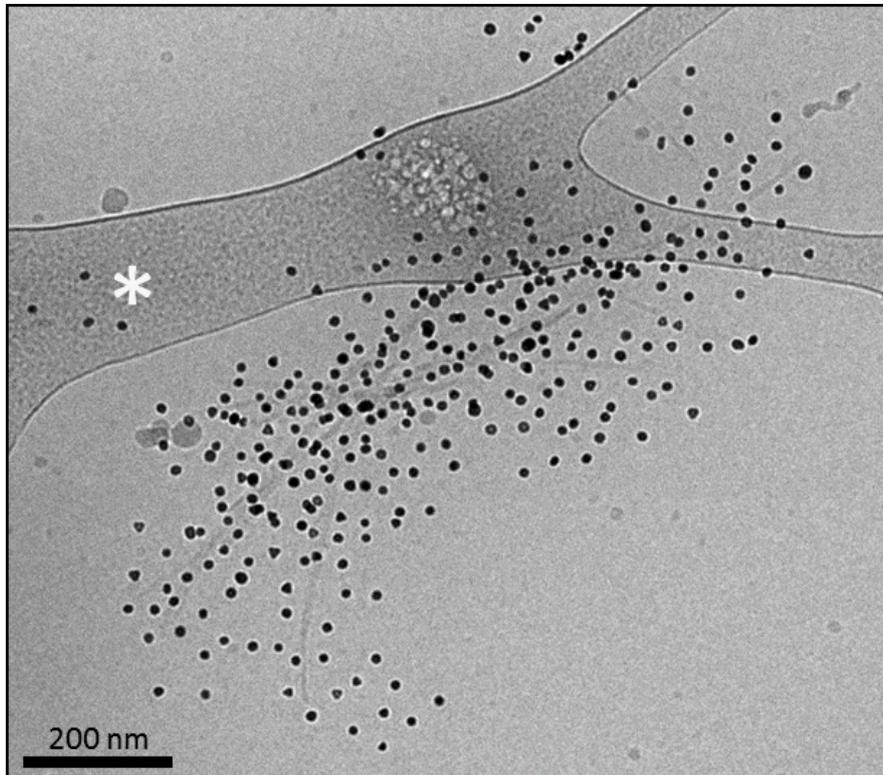
- Anticorps anti-TF (Tissue Factor)

- Anticorps anti-VWF (Von Willebrand Factor)

- Anticorps anti-PC (Phosphatidylcholine)

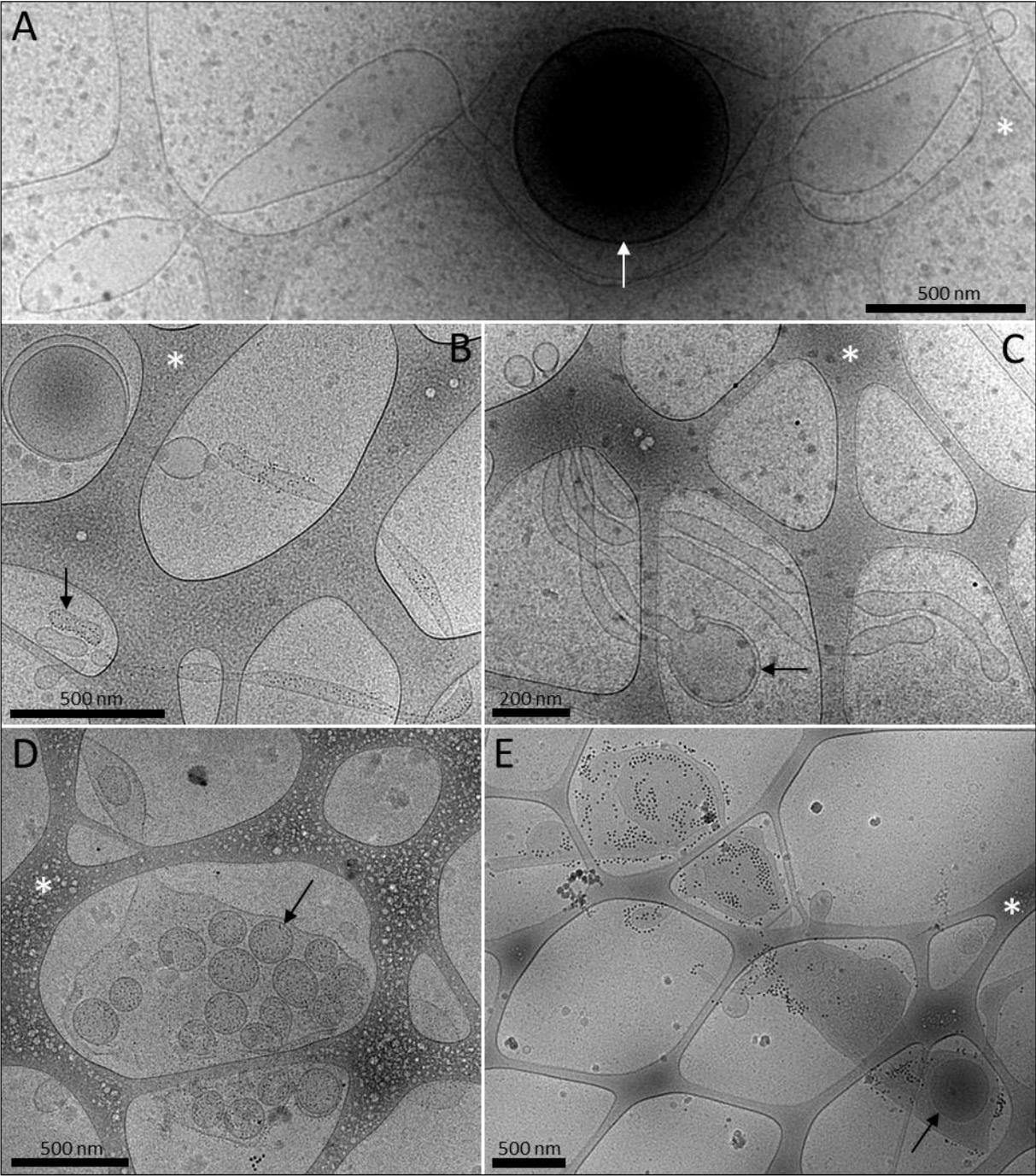
- Facteur VIIa

- Anticorps anti-A $\beta_{40-42}$  : marquage de fibres amyloïdes impliquées dans la maladie d'Alzheimer et composées de peptide A $\beta_{40-42}$ . Collaboration avec le Dr. Sarah Henry et l'équipe de Sophie Lecomte (CBMN-UMR5248).



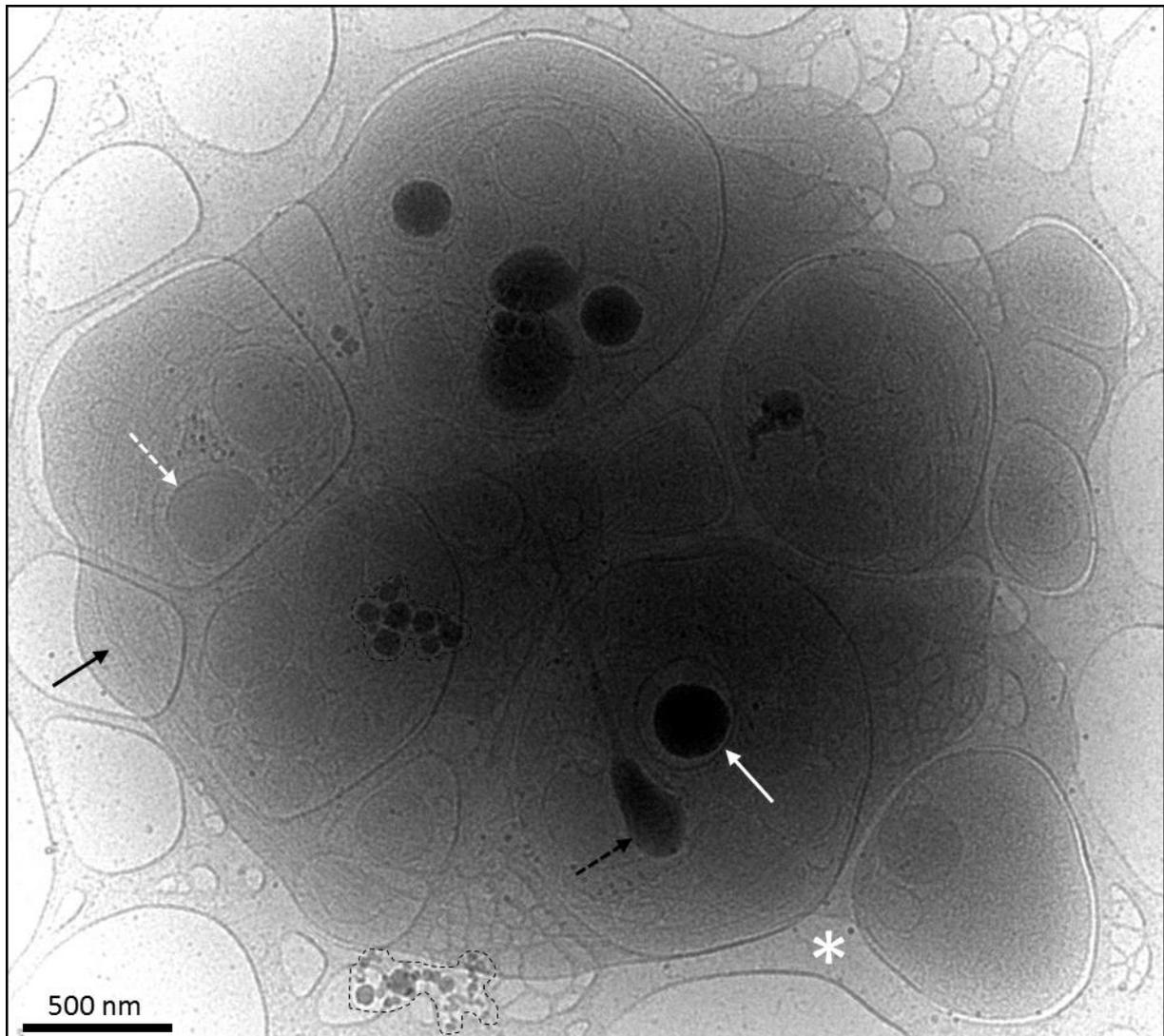
**Image de cryo-MET de fibres amyloïdes marquées par des NpAu-anti-A $\beta_{40-42}$ .** Plusieurs fibres entremêlées sont visibles sur l'image. Le film de carbone perforé est signalé par un astérisque blanc. Image S. Tan.

Annexe 2 : Images de cryo-MET de VEs atypiques du plasma sanguin



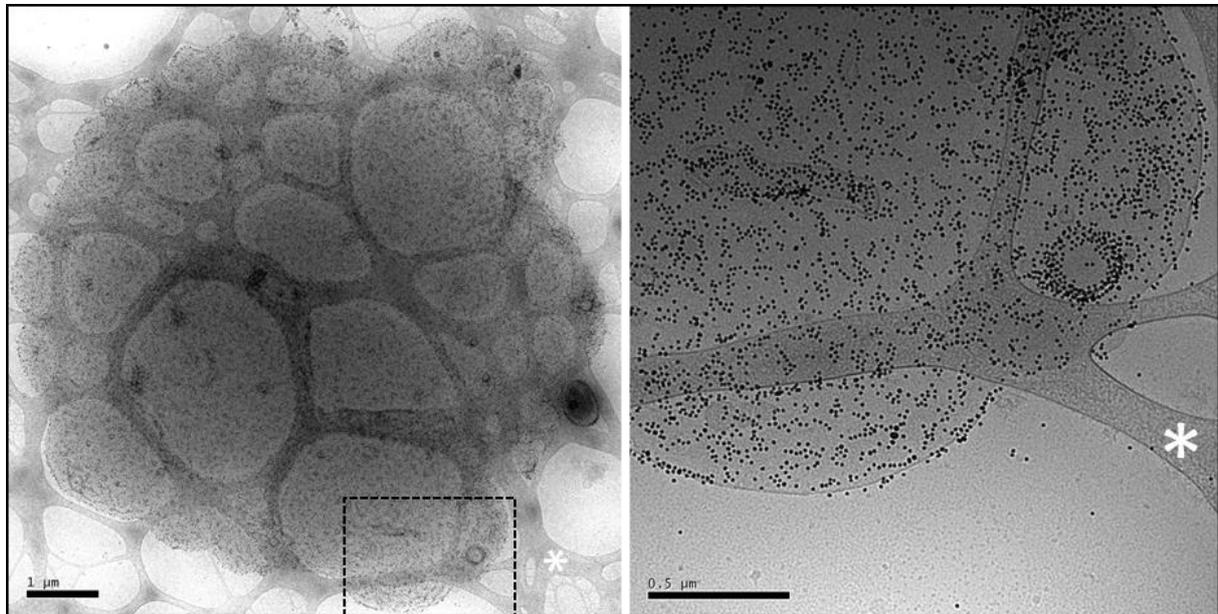
**Images de cryo-MET de VEs atypiques.** (A) VE tubulaire mesurant environ 4.5  $\mu\text{m}$  de long et incluant une sorte de granule sphérique de 700 nm de diamètre très dense aux électrons (flèche blanche). (B) VE tubulaire mesurant environ 3.5  $\mu\text{m}$  de long, partiellement marquée par des NpAu-AnxA5. Le tube est en cours de fragmentation : trois petites vésicules tubulaires nouvellement formées sont visibles en bas à gauche de l'image. Une seule de ces VEs est marquée par les NpAu-AnxA5 (flèche noire), les deux autres étant étonnamment PS-négatives. L'extrémité supérieure de la VE est peut-être un objet indépendant, ne partageant aucune caractéristique avec la VE tubulaire principale. (C) VE tubulaire atypique, présentant un genre de « tête » sphérique et deux tubes parallèles. La flèche noire pointe la présence d'une double bicouche lipidique. (D) Grand fragment membranaire marqué par des NpAu-AnxA5 et contenant de nombreuses VEs sphériques. Ces VEs sphériques semblent elles aussi marquées par les NpAu-AnxA5, peut-être même à l'intérieur de leur membrane. (E) Grand fragment membranaire allongé, marqué par des NpAu-anti-CD41. Il présente une structure interne complexe et possède un granule dense aux électrons à l'intérieur (flèche noire).

**Annexe 3 : Image de cryo-MET d'une plaquette sanguine observée dans un échantillon de plasma sanguin**



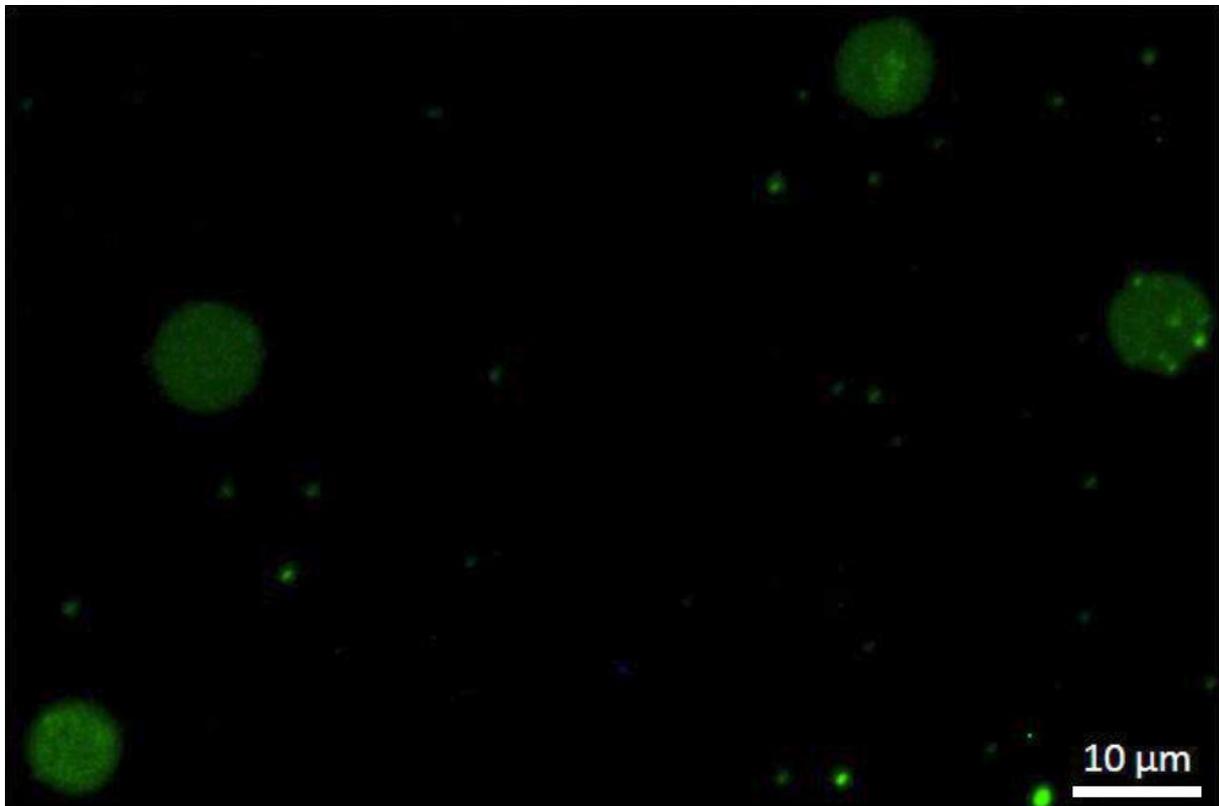
**Image de cryo-MET d'une plaquette sanguine observée dans un échantillon de plasma.** Cette plaquette mesure environ  $3\ \mu\text{m} \times 3\ \mu\text{m}$  et est suspendue sur le film de carbone perforé de la grille de cryo-MET, qui est signalé par un astérisque blanc. Ses composants intracellulaires principaux sont nettement visibles malgré l'épaisseur de l'échantillon: faisceau de microtubules (flèche noire continue), granule tubulaire (flèche noire pointillée), granule dense (flèche blanche continue) et granule alpha (flèche blanche pointillée) (White, 2010).

**Annexe 4 : Images de cryo-MET de globule rouge lysé produit par choc osmotique après marquage par des NpAu-AnxA5**



**Images de cryo-MET d'un GR-L produit par choc osmotique après marquage par des NpAu-AnxA5.** (A) GR-L d'environ 7  $\mu\text{m}$  marqué par des NpAu-AnxA5. (B) Agrandissement de la zone encadrée en noir en (A), illustrant la grande densité et spécificité du marquage par les NpAu-AnxA5. Le film de carbone perforé est indiqué par un astérisque blanc sur les deux images.

**Annexe 5 : Images de microscopie optique de globules rouges lysés produit par choc osmotique après marquage par de l'AnxA5 couplée à de la fluorescéine**



**Image de microscopie optique à fluorescence de GR-L produits par choc osmotique, après marquage par de l'AnxA5 couplée à de la fluorescéine. La taille des GR-L est de  $7.1 \pm 1.1 \mu\text{m}$ , mesurée à partir de 50 GR-L, ce qui est identique à la taille des GR-L et des Ery-G mesurés par MET.**

journal of  
thrombosis and haemostasis

**Extracellular Vesicles from Blood Plasma:  
Determination of their morphology, size, phenotype and  
concentration**

Journal:	<i>Journal of Thrombosis and Haemostasis</i>
Manuscript ID:	JTH-2013-01175.R2
Manuscript Type:	Original Article - Vascular Biology
Date Submitted by the Author:	n/a
Complete List of Authors:	Arraud, Nicolas; University of Bordeaux, UMR-CBMn Linares, Romain; University of Bordeaux, UMR-CBMn Tan, Sisareuth; University of Bordeaux, UMR-CBMn Gounou, Celine; University of Bordeaux, UMR-CBMn Pasquet, Jean-Max; University Bordeaux-Segalen, INSERM-U1035 Mornet, Stephane; UPR-ICMCB, Chimie des Nanomatériaux Brisson, Alain; University of Bordeaux, UMR-CNRS CBMN
Please select Five Mandatory Key Words from the <a href="http://www.nlm.nih.gov/mesh/2014/mesh_browser/MBrowser.html" target="_blank">Medical Subject Headings List</a> :	Blood Plasma, Cryo-Electron Microscopy, Flow Cytometry, Cell-derived Microparticles, Immunogold techniques

**Extracellular Vesicles from Blood Plasma:****Determination of their morphology, size, phenotype and concentration**

Nicolas Arraud<sup>1</sup>, Romain Linares<sup>1</sup>, Sisareuth Tan<sup>1</sup>, Céline Gounou<sup>1</sup>, Jean-Max Pasquet<sup>2</sup>,  
Stéphane Mornet<sup>3</sup>, Alain R. Brisson<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Imagerie Moléculaire et NanoBioTechnologie, UMR-5248-CBMN CNRS-University  
Bordeaux1-IPB, Allée Geoffroy Saint-Hilaire, F-33600 Pessac, France

<sup>2</sup>Hématopoïèse Leucémique et Cibles Thérapeutiques, UMR-U1035, INSERM-University  
Bordeaux Segalen, Bordeaux, F-33076, Bordeaux, France

<sup>3</sup>Chimie des Nanomatériaux, UPR-9048 ICMCB, CNRS, F-33608 Pessac, France

\*Corresponding author:

Alain R. Brisson

UMR-5248-CBMN

Bat. B14, Allée Geoffroy Saint-Hilaire

F-33600 Pessac, France

Tel: +33 (0)5 40006861 / Fax: +33 (0)5 40002200

[a.brisson@cbmn.u-bordeaux.fr](mailto:a.brisson@cbmn.u-bordeaux.fr)

**Short title: Extracellular Vesicles: What is plasma made of?**

## SUMMARY

*Background:* Plasma and other body fluids contain membranous extracellular vesicles (EVs) which are considered to derive from activated or apoptotic cells. EVs participate in physiological and pathological processes and have potential applications in diagnostics or therapeutics. Knowledge on EVs is however limited, mainly due to their sub-micrometer size and to intrinsic limitations in methods applied for their characterization. *Objectives:* Our aim was to provide a comprehensive description of EVs from plasma of healthy subjects. *Methods:* Cryo-Transmission Electron Microscopy combined with receptor-specific gold labeling were used to reveal the morphology, size and phenotype of EVs. An original approach based on sedimentation on Electron Microscopy grids was developed for enumerating EVs. A correlation was performed between conventional Flow Cytometry and Electron Microscopy results. *Results:* We show that platelet free plasma samples contains spherical EVs, 30 nm to 1  $\mu\text{m}$  in diameter, tubular EVs, 1 to 5  $\mu\text{m}$  long, and membrane fragments, 1 to 8  $\mu\text{m}$  large. We show that only a minority of EVs expose the procoagulant lipid phosphatidylserine, in contrast with the classical theory of EV formation. In addition, the concentrations of the main EV sub-populations are determined after sedimentation on EM grids. Finally, we show that conventional Flow Cytometry, the main method of EV characterization, detects only about 1% of them. *Conclusion:* This study brings novel insights on EVs from normal plasma and provides a reference for further studies of EVs in disease situations.

**Keywords:** Blood Plasma/ Cryo-Electron Microscopy/ Flow Cytometry/ Cell-Derived Microparticles/ Immunogold Techniques

## INTRODUCTION

Cells respond to a variety of stimuli by releasing membrane vesicles, which are found in blood and other body fluids [1–4]. Two main types of cell-derived vesicles are commonly distinguished depending on their mechanism of formation and their size, namely the microparticles which originate from cell plasma membranes and range in size from 100 nm to 1  $\mu$ m, and the exosomes which originate from multivesicular endosomes and are smaller, from 50 to 100 nm [3,4]. Here, the term extracellular vesicle (EV) is used for designating all types of sub-cellular particles in plasma which are surrounded by a lipid membrane bilayer [5].

Considered initially as cellular debris or waste particles [6,7], there is now increasing evidence that EVs contribute to many aspects of health and disease [8,9]. In blood, EVs participate in physiological processes of coagulation and inflammation via the presence at their surface of phosphatidylserine (PS), tissue factor and other bioactive molecules [10–12]. In addition, elevated levels of EVs of vascular origin have been found in numerous pathological disorders [13–15], including cardio-vascular diseases, cancer, sepsis and autoimmune diseases [16–19]. Intense research focuses on a better understanding of the mechanisms of EV formation and on their physiopathological roles, as well as on the development of biomedical applications as disease biomarkers, drug delivery vehicles or vaccines [20–24].

Despite a wealth of methods applied for their characterization [25–27], current knowledge on EVs is scarce, so that basic questions concerning their morphology, size, phenotype or concentration remain to be elucidated. This lack of knowledge is mainly due to the sub-micrometer size of EVs [28] and to intrinsic limitations in methods of characterization [25].

1  
2  
3 The aim of this study was to provide a comprehensive description of EVs from plasma  
4 of healthy subjects. We used cryo-Transmission Electron Microscopy (cryo-EM), which  
5 preserves membranes in a close to native state [29], to reveal the morphology and size of EVs,  
6 and cryo-EM combined with receptor-specific gold labeling to phenotype selected EV sub-  
7 populations. This strategy was applied to pure, unprocessed plasma, in order to minimize  
8 artefactual EV formation [30,31]. In addition, a reliable approach was developed for  
9 enumerating EVs after sedimentation on EM grids. Finally, plasma samples were analyzed by  
10 Flow Cytometry (FCM), the main method of EV analysis [32,33], in order to determine which  
11 EVs revealed by EM are detected by FCM.  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60

## METHODS

### Antibodies

Anti-CD235a (glycophorin-A) and CD41 ( $\alpha_{IIb}$  chain of  $\alpha_{IIb}\beta_3$  integrin) monoclonal antibodies (mAb) were from Beckman Coulter and Abcam, respectively.

### Preparation of plasma samples

Blood was collected after written informed consent from five healthy male donors who had fasted for at least 12h [34]. Platelet free plasma (PFP) was prepared within less than one hour after blood collection by two cycles of centrifugation at 2,500g for 15 min [31], as described in Supplemental Methods.

### PFP labeling with protein-conjugated gold nanoparticles

Annexin-5 gold nanoparticles (Anx5-gold-NPs) of either 4 or 10 nm diameter were produced as previously described [35]. Anti-CD235a and anti-CD41 mAbs were conjugated to 10-nm gold NPs as described in Supplemental Methods.

For Anx5 labeling, 7  $\mu$ L fresh PFP were mixed with 1  $\mu$ L 100  $\mu$ M PPACK, 1  $\mu$ L Anx5-gold-NP at  $1-3 \times 10^{16}$  NP/L and 1  $\mu$ L 100 mM  $\text{CaCl}_2$ , incubated for 15 min at ambient temperature, then processed for cryo-EM. The same procedure was applied for anti-CD235a- and anti-CD41-gold-NP labeling, except that PPACK and  $\text{CaCl}_2$  were omitted and incubation time was 30 min. For double labeling experiments, PFP samples were labeled first with mAb-conjugated gold-NPs then with Anx5-gold-NPs.

### Cryo-EM and image recording

1  
2  
3 The preparation of cryo-EM samples was started less than four hours after PFP preparation. A  
4  
5 4- $\mu$ L sample aliquot was deposited onto an EM grid coated with a perforated carbon film  
6  
7 (Ted Pella, USA), the excess liquid was blotted off with a filter paper, the grid was then  
8  
9 quickly plunged into liquid ethane using a Leica EM-CPC cryo-chamber. EM grids were  
10  
11 stored in cryo-boxes under liquid nitrogen until use, then mounted in a Gatan 626 cryo-holder  
12  
13 and transferred in a Tecnai F20 microscope operated at 200 kV. Images were recorded with  
14  
15 an USC1000-SSCCD Gatan camera.  
16

17  
18 Values of EV size, relative amounts and concentrations are expressed as mean  $\pm$   
19  
20 standard deviation (SD), when relevant.  
21  
22

### 23 24 25 **Sedimentation of PFP samples over EM grids**

26  
27 PFP samples were labeled with Anx5-, anti-CD235a- or anti-CD41-gold-NPs, then diluted 25  
28  
29 x with cacodylate buffer and deposited into centrifuge tubes containing four EM grids coated  
30  
31 with a continuous carbon film fixed on a resin support (Supplemental Methods; Fig. S1).  
32  
33 Samples were centrifuged at 100,000 g for 1 h at 20°C, then the liquid above EM grids was  
34  
35 discarded, EM grids were recovered and air dried.  
36  
37

### 38 39 40 41 **Flow Cytometry**

42  
43 Labeling of PFP samples with Anx5-fluorescein (Anx5-Fluo) or/and anti-CD235a-Cy5 mAb,  
44  
45 as well as negative controls, are described in Supplemental Methods. FCM was performed on  
46  
47 a Cytomics FC500 (Beckman Coulter) running CXP software version 2.2. The detection of  
48  
49 EVs was triggered on the forward scatter (FS) parameter, and only EVs labeled with either  
50  
51 Anx5-Fluo (FL1) or anti-CD235a-Cy5 (FL4) were taken into consideration (Supplemental  
52  
53 Methods). EV concentrations, expressed as mean  $\pm$  SD, were calculated by taking into  
54  
55 account the flow rate, acquisition time and sample dilution.  
56  
57  
58  
59  
60

## RESULTS

### Cryo-EM reveals the morphology and size of EVs in pure plasma

Three types of EVs were distinguished on a morphological basis in pure, unprocessed PFP samples by cryo-EM (Fig. 1).

EVs presenting a circular shape in projection, hence a spherical shape in solution and named hereafter spherical EVs, constituted about half of the EVs (Fig. 1A-B). These particles are named membrane vesicles because they are limited by a lipid membrane, as evidenced by the presence at their periphery of two dark lines distant by about 4 nm, which is a characteristic feature of lipid bilayers by cryo-EM [36]. Spherical EVs ranged in diameter from 30 nm to 1  $\mu\text{m}$ , about 80% of them being between 50 and 500 nm (Fig. 1C).

EVs with a tubular morphology constituted also about half of the EVs observed by cryo-EM (Fig. 1D). The term tube is given to objects presenting a ratio between length and width larger than 5. The length of tubular EVs ranged from 600 nm to over 5  $\mu\text{m}$  ( $2.2 \pm 1.3 \mu\text{m}$ ,  $n = 100$ ), while their width ranged from 40 to 500 nm. Tubular vesicles appeared suspended over the supporting carbon net, presenting deformations at contact points with the carbon threads (arrows in Fig. 1D), as expected for soft objects.

The third type of EVs consisted of objects ranging in size from 1 to 8  $\mu\text{m}$ , which were neither circular nor tubular, and are called hereafter large fragments (Fig. 1E-F). They represented about 10% of all EVs. About 30% of them formed a group of objects with an almost circular shape and an overall size of 6 to 8  $\mu\text{m}$  (Fig. 1F).

The relative amount of spherical EVs, tubular EVs and large fragments was  $50 \pm 25\%$ ,  $50 \pm 25\%$  and  $10 \pm 5\%$ , as determined over 500 EV images recorded from 50 PFP samples. Large variations in these values were observed between EM grids, as discussed below.

1  
2  
3 Blood platelets were observed in extremely rare occasions in PFP samples (Fig. S2).  
4  
5 They presented homogeneously distributed organelles and no pseudopod extension, which is  
6  
7 characteristic of non-activated platelets [37,38]. This indicates that the procedures applied  
8  
9 from blood collection to cryo-EM preparation do not induce platelet activation, and therefore  
10  
11 that the various types of EVs observed in PFP do not originate from artefactually activated  
12  
13 cells.  
14

15  
16 In addition, small particles of 10-50 nm size not surrounded by a lipid bilayer were  
17  
18 also observed in plasma samples, which consisted most likely of protein or lipoprotein  
19  
20 complexes (data not shown).  
21  
22

### 23 24 25 **Identification and characterization of PS-exposing EVs**

26  
27 Next, we focused on the sub-population of EVs that expose the procoagulant phospholipid  
28  
29 PS. PS-exposing EVs are of particular interest because, according to classical theory of EV  
30  
31 formation at cells' plasma membranes, the loss of phospholipid asymmetry with exposure of  
32  
33 PS molecules on the outer membrane leaflet is an early step of cell activation processes which  
34  
35 precedes membrane blebbing and shedding of EVs [39,40,10]. Most studies on plasmatic EVs  
36  
37 are in agreement with this theory and consider implicitly that PS-exposing EVs represent the  
38  
39 majority, or even the totality of EVs [41,42,26,43,31].  
40  
41

42  
43 In order to label PS-exposing EVs, gold-NPs were conjugated covalently with Anx5  
44  
45 [35], a high-affinity ligand of PS-exposing membranes [44]. EV labeling with Anx5-gold-NPs  
46  
47 was highly specific (Fig. 2). About half of the spherical EVs were densely covered with  
48  
49 Anx5-gold-NPs, while the other half was unlabeled (Fig. 2A-D). Most of the tubular EVs  
50  
51 were not labeled by Anx5. The finding that only a minority of EVs are labeled by Anx5-gold-  
52  
53 NPs is in marked contrast with the classical theory of EV formation. Finally, we found that all  
54  
55 the large fragments of 6-8  $\mu\text{m}$  size were labeled by Anx5-gold-NPs, with no exception  
56  
57  
58  
59  
60

1  
2  
3 (Fig.2F-G). These images demonstrate that EVs covering the whole range of size and  
4  
5 membrane curvature can be labeled by Anx5, from small (< 100 nm) and highly curved EVs  
6  
7 (Fig. 2C) to large (> 6  $\mu$ m), almost flat, membrane fragments (Fig. 2G). No labeling was  
8  
9 observed in the absence of  $\text{CaCl}_2$ , as expected from the strict  $\text{Ca}^{2+}$ -dependency of Anx5  
10  
11 binding to PS-exposing membranes [45].  
12  
13

### 16 EV phenotyping by immuno-gold labeling

17  
18 Next, EVs derived from erythrocytes (Ery-EVs) and platelets (PLT-EVs), the two largest  
19  
20 blood cell populations, were characterized by immuno-gold labeling, using gold-NPs  
21  
22 conjugated with mAbs raised against CD235a and CD41, respectively.  
23  
24

25 About 20% of spherical EVs and 30% of tubular EVs were labeled with anti- CD235a-  
26  
27 gold-NPs (Fig. 3A-B; Fig. 4). Strikingly, all the 6-8  $\mu$ m-large fragments were labeled with  
28  
29 anti-CD235a-gold-NPs (Fig. 3C). When PFP samples were labeled with both 4-nm Anx5-  
30  
31 gold-NPs and 10-nm anti-CD235a-gold-NPs, all the 6-8  $\mu$ m membrane fragments were  
32  
33 double labeled, establishing that they are of erythrocyte origin and expose PS (Fig. 3D). In  
34  
35 view of their phenotype and size, which is the size of intact erythrocytes, we concluded that  
36  
37 the 6-8  $\mu$ m membrane fragments were empty erythrocytes and call them Ery-ghosts hereafter.  
38  
39 Conversely, we found that (almost) none of the spherical or tubular Ery-EVs were labeled  
40  
41 with Anx5-gold-NPs, which indicates that they do not derive from Ery-ghosts, and that they  
42  
43 are not formed by the same process as Ery-ghosts.  
44  
45  
46

47 In view of the unexpected finding of the presence of Ery-ghosts in PFP samples, we  
48  
49 performed complementary experiments with erythrocytes lysed *in vitro* by osmotic shock.  
50  
51 These experiments demonstrated that erythrocyte ghosts produced *in vitro* are identical in size  
52  
53 and shape to Ery-ghosts from PFP samples, and also that 100% of them exposed PS, in  
54  
55 accordance with Schrier et al. [46] (Fig. S3). Complementary experiments by fluorescence  
56  
57  
58  
59  
60

1  
2  
3 microscopy confirmed that the native size of *in vitro* lysed erythrocytes was about 7  $\mu\text{m}$  (Fig.  
4  
5 S4).  
6

7 Labeling PFP samples with anti-CD41-gold-NPs showed that about 30% of EVs were  
8  
9 CD41-positive, consisting in similar proportions of spherical EVs (Fig. 3E), tubular EVs (Fig.  
10  
11 3F) and large fragments (Fig. 4). When PFP samples were double labeled with Anx5- and  
12  
13 anti-CD41-gold-NPs, less than half of the CD41-positive EVs were found to expose PS (Fig.  
14  
15 3 G). The CD41-positive/PS-negative EVs, as well as the CD235-positive/PS-negative EVs  
16  
17 mentioned above, must therefore originate from cell plasma membranes via a mechanism in  
18  
19 which the membrane lipid asymmetry is maintained.  
20  
21

22 Attempts to identify EVs derived from leukocytes and endothelial cells led to  
23  
24 unsatisfactory results until now, either due to their low level in normal plasma [47] or to an  
25  
26 inappropriate choice of antigens.  
27  
28

29 During this study, a group of tubular EVs was identified, which were characterized by  
30  
31 the absence of labeling with Anx5-, anti-CD235a- or anti-CD41-gold-NPs, and also by the  
32  
33 presence of striations, corresponding probably to internal protein fibers (Fig. 3H-I). These  
34  
35 triple negative tubular EVs of yet unknown cell origin were as frequent as tubular Ery-EVs,  
36  
37 accounting for about 30% of all tubes (Fig. 4).  
38  
39  
40  
41  
42

### 43 Enumeration of EVs by sedimentation on EM grids

44  
45 Next, we attempted to determine the absolute concentrations of EVs in normal plasma. As  
46  
47 indicated above, the relative amounts of the three morphological types of EVs observed by  
48  
49 cryo-EM presented large variations between samples, and also between EM grids from a  
50  
51 given sample. We hypothesized that these variations were due to a bias in the way EVs are  
52  
53 drained through the perforated carbon net covering cryo-EM grids. Our hypothesis was that  
54  
55 EVs larger than the carbon net openings, like tubular EVs or large fragments, have a high  
56  
57  
58  
59  
60

1  
2  
3 probability to be retained by the net, while spherical EVs, which are smaller, are likely to pass  
4 freely through the net (Fig. S5). Consequently, the enumeration of EVs by cryo-EM would be  
5 affected by a systematic error, called “fish-net” artifact hereafter, causing an over-estimation  
6 of the proportion of large EVs.  
7  
8  
9

10  
11 To overcome this problem, we developed a simple approach which consisted in  
12 sedimenting EVs by high-speed centrifugation on EM grids covered with a continuous carbon  
13 film, and then in quantifying EVs by EM after air-drying (Fig. S1). The high salt and protein  
14 content of plasma make specimens prepared in this way almost non amenable to EM analysis.  
15 However, when PFP samples were labeled with protein-conjugated gold-NPs prior to  
16 sedimentation, EVs could be clearly identified due to their homogenous and high-density  
17 decoration with gold-NPs (Fig. 5A-E).  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26

27 The validity of this approach was first evaluated with suspensions of *in vitro* prepared  
28 erythrocyte ghosts of known concentrations. We found that  $75 \pm 15$  % (n=3) of the actual  
29 amount of erythrocyte ghosts were recovered on EM grids after sedimentation. This result  
30 was considered satisfactory, validating the sedimentation approach for quantifying EVs, at  
31 least for large objects like erythrocyte ghosts. On the other hand, attempts to identify control  
32 particles for sub- $\mu\text{m}$  EVs have yet been unsuccessful.  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39

40 The procedure was then applied to PFP samples, starting with the quantification of  
41 Ery-ghosts, which are easily recognizable due to their characteristic shape and strong labeling  
42 with Anx5-gold-NPs (Fig. 5D-E). The absolute concentration of Ery-ghosts was found to be  
43  $60 \pm 30$  per  $\mu\text{L}$  pure PFP. To quantify the other types of EVs, a stringent method of counting  
44 was applied, in which only the objects that presented a high and homogenous gold-NP  
45 labeling with a well-defined near-to-circular or tubular shape were taken into account. EVs  
46 were found to range in size from 80 nm to 8  $\mu\text{m}$  (Fig. 5F). About 95% of EVs were smaller  
47 than 1  $\mu\text{m}$ , with a diameter of  $275 \pm 150$  nm. Considering that a sphere flattens into a disk  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60

1  
2  
3 upon sedimentation, the corresponding sphere would have a diameter of about 200 nm. Table  
4  
5 1 gives the concentrations determined for the various EV sub-populations. Overall, the  
6  
7 number of spherical EVs was about 20 times larger than that of tubular EVs, and more than  
8  
9 200 times larger than that of large fragments. This validates the “fish-net” artefact hypothesis  
10  
11 presented above. It is likely that the concentration of EVs smaller than about 100 nm was  
12  
13 under-estimated in this analysis, due to their weaker labeling and possible shape alterations  
14  
15 induced by sedimentation and/or air-drying.  
16  
17

18  
19 In addition, these experiments showed that the number of residual platelets in PFP  
20  
21 samples was less than one platelet per  $\mu\text{L}$ .  
22  
23

#### 24 25 **Correlation between FCM and EM**

26  
27 Finally, PFP samples were characterized by FCM, the main method used in EV studies  
28  
29 [32,33], in order to find out which EV populations identified by EM were detected by FCM.  
30  
31 In these FCM experiments, the trigger was set on the forward scatter (FS) parameter and the  
32  
33 detection was limited to fluorescently labeled EVs, following standard procedures [31] (Fig.  
34  
35 6; Fig. S6). The concentration of Anx5-positive EVs was found to be  $500 \pm 190$  ( $n=18$ ) per  
36  
37  $\mu\text{L}$  pure PFP, consistently with previous reports [30,31,42]. Consequently, when we compare  
38  
39 this value with the concentration of Anx5-positive EVs determined by the sedimentation  
40  
41 approach, about 30,000 per  $\mu\text{L}$ , we must conclude that conventional FCM detects about 1% of  
42  
43 the EVs.  
44  
45

46  
47 Guided by our EM results, we attempted to identify the Ery-ghosts by FCM, assuming  
48  
49 that they would form a distinct population due to their large size. A cluster of highly  
50  
51 fluorescent EVs was indeed identified in single labeling experiments with either Anx5-Fluo  
52  
53 (Fig. 6A-B) or anti-CD235a-Cy5 (Fig. 6C-D), as well as in double labeling experiments (Fig.  
54  
55 6E-F). This cluster of events must therefore correspond to Ery-ghosts. We must stress that the  
56  
57  
58  
59  
60

1  
2  
3 presence of a well-identified cluster of Ery-ghosts was observed by FCM with each PFP  
4  
5 sample investigated during this study. With the pre-analytical conditions used here, the  
6  
7 concentration of Ery-ghosts in PFP was  $145 \pm 80$  EVs/ $\mu$ L (n=18). This value is close to the  
8  
9 concentration determined by the sedimentation approach, about 60 Ery-ghosts/ $\mu$ L, providing  
10  
11 further evidence of the reliability of the sedimentation approach.  
12

13  
14 A striking result of this study was that 6-8  $\mu$ m-large Ery-ghosts present light scattering  
15  
16 properties similar to 500 nm polystyrene beads with our flow cytometer (Fig. 6, B, D and F).  
17  
18 In view of this unexpected result, hitherto unreported, complementary FCM experiments were  
19  
20 performed with erythrocyte ghosts produced *in vitro*. These experiments confirmed that  
21  
22 erythrocyte ghosts formed a cluster of events scattering light similarly to 500 nm polystyrene  
23  
24 beads (Fig. S6G).  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60

## DISCUSSION

This study provides novel insights on the morphology, size, phenotype and concentration of EVs from plasma of healthy donors.

We show that plasma contains spherical EVs, of about 200 nm diameter, tubular EVs, with a mean length close to 2  $\mu$ m, and large fragments, 1 to 8  $\mu$ m in size. This description is significantly different from the common view that EVs are spherical vesicles ranging in size from 50 to 500 nm, which is mainly based on EM [26,28], Atomic Force Microscopy (AFM) [26,48,49] and Nanoparticle Tracking Analysis (NTA) [50]. Although tubes and large fragments represent only about 5% and 0.5% of EVs, respectively, their total membrane surfaces are of the same order of magnitude as that of spherical EVs, which may be important for functions exerted via surface-exposed receptors.

Our finding that a majority of EVs are not labeled by Anx5 is in contrast with classical models of EV formation [10,43,51] and with most studies on EVs which consider that the majority, or even the totality of plasmatic EVs consist of PS-exposing EVs [41,42,26,43,31]. Although several FCM studies [52–55,30] have reported the presence of Anx5-negative EVs, the fact that FCM detects only a minority of EVs does not allow a direct comparison with our results. Concerning the origin of the Anx5-negative EVs, we considered two main hypotheses: 1) these EVs do not expose PS, 2) these EVs expose PS but either Anx5 binding is prevented by the prior binding of other PS-binding proteins, or the level of PS is insufficient for Anx5 binding [56]. This second hypothesis is considered unlikely, principally because the proportion of Anx5-positive EVs was observed to increase when PFP samples were kept at 4°C for several days or were centrifuged and re-suspended, which suggests a transfer of PS molecules from the inner to the outer membrane leaflet of previously Anx5-negative EVs [57]. PS-negative EVs must therefore form via a mechanism that maintains the

1  
2  
3 plasma membrane phospholipid asymmetry. We propose that tubular EVs, which are PS-  
4  
5 negative for most of them, form by direct fragmentation of vascular cells, in a process  
6  
7 analogous to the formation of platelets from megakaryocytes [58]. By extension, PS-negative  
8  
9 spherical EVs may also form by cell fragmentation, or by scission of PS-negative tubes, as  
10  
11 suggested by the observed tendency of tubes to fragment into vesicles (Fig. 7). Reininger et  
12  
13 al. [59] have shown that tubular membrane tethers several tens of  $\mu\text{m}$ -long form when  
14  
15 platelets interact under high shear conditions to von Willebrand factor-coated surfaces, and  
16  
17 that increasing shear stress led to the formation of EVs. In the case of synthetic lipid tubes, it  
18  
19 is well established that tubes submitted to various physical constraints transform into vesicles,  
20  
21 a phenomenon known as pearling instability [60].  
22  
23

24  
25 Cryo-EM and immuno-gold labeling allowed a detailed characterization of the sub-  
26  
27 populations of Ery-EVs and PLT-EVs, showing that they account for more than 50% of all  
28  
29 EVs. As reported by Heijnen et al. [28], activated platelets produce not only EVs that  
30  
31 originate from the plasma membrane and are CD41-positive, but also exosomes originating  
32  
33 from multi-vesicular endosomes, which are CD41-negative. Consequently, the identification  
34  
35 of the entire population of PLT-EVs will require the use of additional markers. Further work  
36  
37 will also be needed to characterize the sub-populations of EVs deriving from leukocytes and  
38  
39 endothelial cells, as well as to identify the cell origin of the striated tubular EVs (Fig. 3H-I).  
40  
41

42  
43 The unanticipated presence of Ery-ghosts in PFP samples deserves some comments.  
44  
45 Although Ery-ghosts have not been identified until now in PFP samples, it is most likely that  
46  
47 they account for part of Ery-EVs reported in previous FCM studies. An obvious question is  
48  
49 whether Ery-ghosts are present in blood or are created during or after blood collection.  
50  
51 Interestingly, the number of Ery-ghosts found in PFP is close to the number of erythrocytes  
52  
53 that are eliminated from the circulation in several minutes [61]. Ery-ghosts may therefore  
54  
55 correspond to the end stage of red blood cells' life. The question of the genuine existence  
56  
57  
58  
59  
60

1  
2  
3 versus the artefactual creation of Ery-ghosts is of importance because the presence of PS  
4  
5 molecules at their surface may confer them a role *in vivo* in blood coagulation homeostasis  
6  
7 [62] or *in vitro* in the properties of blood bank products [63].  
8

9  
10 By correlating EM and FCM, we found that conventional FCM detects only about 1%  
11  
12 of EVs. In addition, we show that 6-8  $\mu\text{m}$ -large fragments have light scattering properties  
13  
14 comparable to 500 nm polystyrene beads. This result adds up some objective information to a  
15  
16 series of recent discussions questioning the use of polymer beads for size calibration of  
17  
18 biological objects [25,64,65]. Although Ery-ghosts have the same size as intact erythrocytes,  
19  
20 their FS/SS values are considerably different (Fig. S6G-H). This is certainly due to  
21  
22 differences in refractive indices between hemoglobin-full and hemoglobin-empty  
23  
24 erythrocytes.  
25  
26

27  
28 The relative amounts of spherical EVs, tubular EVs and large fragments determined  
29  
30 by the sedimentation approach are about 95%, 5% and 0.5%. We consider that the absolute  
31  
32 concentrations of tubular EVs and large fragments are reliable because these objects are easily  
33  
34 recognizable. On the other hand, it is likely that the concentrations of spherical EVs of small  
35  
36 size, smaller than about 100 nm, is under-estimated, due to their weaker labeling and possible  
37  
38 shape distortion. We estimate therefore that the relative amounts of the three morphological  
39  
40 types of EVs are : >95% spherical EVs, <5% tubular EVs and <0.5% large fragments (Table  
41  
42 1). At this stage of the analysis, a conservative statement is that one microliter of pure plasma  
43  
44 contains at least 50,000 spherical EVs and 2,000 tubular EVs. How do these values compare  
45  
46 to published work? There is little agreement in the literature concerning the concentration of  
47  
48 EVs in plasma, with values ranging from 200 to  $10^9$  EVs/ $\mu\text{L}$  [50,66]. Low EV concentrations  
49  
50 have been consistently obtained by conventional FCM, which is in agreement with our  
51  
52 finding that FCM detects only a minority of EVs. On the other hand, EV concentrations up to  
53  
54  $10^9$  EVs/ $\mu\text{L}$  PFP have been reported by NTA [50,67], hence several orders of magnitude  
55  
56  
57  
58  
59  
60

1  
2  
3 larger than our EM results. It is likely that non-vesicular particles like lipoproteins or  
4  
5 macromolecular complexes contribute to these large values, as shown by Dragovic et al. [50].  
6

7        Important progresses have been made recently in the EV field with the development of  
8  
9 standardized protocols of sample preparation and of EV measurement conditions in FCM  
10  
11 [33,68,30,64]. Further progresses are expected from the development of flow cytometers with  
12  
13 improved detection capabilities [47,64,69], or the application of novel detection strategies,  
14  
15 such as the triggering of small particles by fluorescence in FCM [69,70]. These developments,  
16  
17 together with improved methods of EV purification [69,71,72], sorting [73] and  
18  
19 proteo/genomic analysis [72,74], should lead to a better knowledge and understanding of  
20  
21 EVs' origin, composition and properties. This is critical for evaluating objectively the roles of  
22  
23 EVs in health and disease, as well as their potential biomedical applications.  
24  
25  
26

27        In conclusion, this work improves our basic knowledge on EVs from normal plasma.  
28  
29 We believe it constitutes a reference for further studies of EVs in pathological situations.  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60

**ADDENDUM**

N. Arraud contributed to the supervision of the project and performed the preparation of the blood samples and the FCM studies; R. Linares and S. Tan performed the EM experiments; R. Linares and S. Mornet synthesized the protein-functionalised gold nanoparticles; C. Gounou produced the Anx5 proteins and contributed to the FCM experiments; J.-M. Pasquet contributed to the initial phase of elaboration of the project; A. R. Brisson coordinated the entire project.

**ACKNOWLEDGMENTS**

We thank Ms Guillonet, Chaléat, Tarascon and Mr Le Provost (Laboratoire Mutualiste d'Analyses Médicales de Pessac) for their help with the collection of blood samples. We thank R. Bérat for his participation at the beginning of this study and A. Bouter for his help with fluorescence microscopy experiments. We thank A. Nurden, P. Nurden and P. Bassereau for helpful discussions. This study was supported by ANR (grants EMPB-MP-NPAuA5-2007-021-01 and 11-BSV1-03501-PlacentA5 to AB).

**DISCLOSURE OF CONFLICT OF INTEREST**

The authors declare no conflict of interest.

**SUPPORTING INFORMATION**

Additional Supporting Information may be found in the online version of this article:

## REFERENCES

- 1 Théry C, Ostrowski M, Segura E. Membrane vesicles as conveyors of immune responses. *Nat Rev Immunol* **2009**; 9: 581–93.
- 2 György B, Szabó TG, Pásztói M, Pál Z, Misják P, Aradi B, László V, Pállinger É, Pap E, Kittel Á, Nagy G, Falus A, Buzás EI. Membrane vesicles, current state-of-the-art: emerging role of extracellular vesicles. *Cell Mol Life Sci* **2011**; 68: 2667–88.
- 3 Van der Pol E, Böing AN, Harrison P, Sturk A, Nieuwland R. Classification, Functions, and Clinical Relevance of Extracellular Vesicles. *Pharmacol Rev* **2012**; 64: 676–705.
- 4 Raposo G, Stoorvogel W. Extracellular vesicles: Exosomes, microvesicles, and friends. *J Cell Biol* **2013**; 200: 373–83.
- 5 Gould SJ, Raposo G. As we wait: coping with an imperfect nomenclature for extracellular vesicles. *J Extracell Vesicles* **2013**; 2: 20389.
- 6 Wolf P. The Nature and Significance of Platelet Products in Human Plasma. *Br J Haematol* **1967**; 13: 269–88.
- 7 Pan BT, Teng K, Wu C, Adam M, Johnstone RM. Electron microscopic evidence for externalization of the transferrin receptor in vesicular form in sheep reticulocytes. *J Cell Biol* **1985**; 101: 942–8.
- 8 Valadi H, Ekström K, Bossios A, Sjöstrand M, Lee JJ, Lötvall JO. Exosome-mediated transfer of mRNAs and microRNAs is a novel mechanism of genetic exchange between cells. *Nat Cell Biol* **2007**; 9: 654–9.
- 9 Burger D, Schock S, Thompson CS, Montezano AC, Hakim AM, Touyz RM. Microparticles: biomarkers and beyond. *Clinical Science* **2013**; 124: 423–41.
- 10 Zwaal RFA, Schroit AJ. Pathophysiologic Implications of Membrane Phospholipid Asymmetry in Blood Cells. *Blood* **1997**; 89: 1121–32.
- 11 Morel O, Toti F, Hugel B, Freyssinet J-M. Cellular microparticles: a disseminated storage pool of bioactive vascular effectors. *Curr Opin Hematol* **2004**; 11: 156–64.
- 12 Zwicker JI, Trenor CC, Furie BC, Furie B. Tissue Factor–Bearing Microparticles and Thrombus Formation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **2011**; 31: 728–33.
- 13 Horstman LL, Ahn YS. Platelet microparticles: a wide-angle perspective<sup>1</sup>. *Crit Rev Oncol Hematol* **1999**; 30: 111–42.
- 14 VanWijk MJ, VanBavel E, Sturk A, Nieuwland R. Microparticles in cardiovascular diseases. *Cardiovasc Res* **2003**; 59: 277–87.
- 15 Morel O, Toti F, Hugel B, Bakouboula B, Camoin-Jau L, Dignat-George F, Freyssinet J-M. Procoagulant Microparticles Disrupting the Vascular Homeostasis Equation? *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **2006**; 26: 2594–604.

- 1  
2  
3 16 Wiedmer T, Hall SE, Ortel TL, Kane WH, Rosse WF, Sims PJ. Complement-induced vesiculation  
4 and exposure of membrane prothrombinase sites in platelets of paroxysmal nocturnal  
5 hemoglobinuria. *Blood* **1993**; 82: 1192–6.  
6
- 7 17 Manly DA, Wang J, Glover SL, Kasthuri R, Liebman HA, Key NS, Mackman N. Increased  
8 microparticle tissue factor activity in cancer patients with Venous Thromboembolism. *Thromb*  
9 *Res* **2010**; 125: 511–2.  
10
- 11 18 Boilard E, Nigrovic PA, Larabee K, Watts GFM, Coblyn JS, Weinblatt ME, Massarotti EM, Remold-  
12 O'Donnell E, Farndale RW, Ware J, Lee DM. Platelets Amplify Inflammation in Arthritis via  
13 Collagen-Dependent Microparticle Production. *Science* **2010**; 327: 580–3.  
14
- 15 19 Delabranche X, Boisramé-Helms J, Asfar P, Berger A, Mootien Y, Lavigne T, Grunebaum L, Lanza  
16 F, Gachet C, Freyssinet J-M, Toti F, Meziani F. Microparticles are new biomarkers of septic shock-  
17 induced disseminated intravascular coagulopathy. *Intensive Care Med* **2013**; 39: 1695–703.  
18
- 19 20 Zitvogel L, Regnault A, Lozier A, Wolfers J, Flament C, Tenza D, Ricciardi-Castagnoli P, Raposo G,  
20 Amigorena S. Eradication of established murine tumors using a novel cell-free vaccine: dendritic  
21 cell derived exosomes. *Nat Med* **1998**; 4: 594–600.  
22
- 23 21 Skog J, Würdinger T, van Rijn S, Meijer DH, Gainche L, Curry WT, Carter BS, Krichevsky AM,  
24 Breakefield XO. Glioblastoma microvesicles transport RNA and proteins that promote tumour  
25 growth and provide diagnostic biomarkers. *Nat Cell Biol* **2008**; 10: 1470–6.  
26
- 27 22 Alvarez-Erviti L, Seow Y, Yin H, Betts C, Lakhal S, Wood MJA. Delivery of siRNA to the mouse brain  
28 by systemic injection of targeted exosomes. *Nat Biotech* **2011**; 29: 341–5.  
29
- 30 23 Peinado H, Alečković M, Lavotshkin S, Matei I, Costa-Silva B, Moreno-Bueno G, Hergueta-  
31 Redondo M, Williams C, García-Santos G, Ghajar CM, Nitadori-Hoshino A, Hoffman C, Badal K,  
32 García BA, Callahan MK, Yuan J, Martins VR, Skog J, Kaplan RN, Brady MS, Wolchok JD, Chapman  
33 PB, Kang Y, Bromberg J, Lyden D. Melanoma exosomes educate bone marrow progenitor cells  
34 toward a pro-metastatic phenotype through MET. *Nat Med* **2012**; 18: 883–91.  
35
- 36 24 Zwicker JJ, Liebman HA, Bauer KA, Caughey T, Campigotto F, Rosovsky R, Mantha S, Kessler CM,  
37 Eneman J, Raghavan V, Lenz H-J, Bullock A, Buchbinder E, Neuberg D, Furie B. Prediction and  
38 prevention of thromboembolic events with enoxaparin in cancer patients with elevated tissue  
39 factor-bearing microparticles: a randomized-controlled phase II trial (the Microtec study). *Br J*  
40 *Haematol* **2013**; 160: 530–7.  
41
- 42 25 Van der Pol E, Hoekstra AG, Sturk A, Otto C, van Leeuwen TG, Nieuwland R. Optical and non-  
43 optical methods for detection and characterization of microparticles and exosomes. *J Thromb*  
44 *Haemost* **2010**; 8: 2596–607.  
45
- 46 26 György B, Módos K, Pállinger É, Pálóczi K, Pásztói M, Misják P, Deli MA, Sipos Á, Szalai A, Voszka I,  
47 Polgár A, Tóth K, Csete M, Nagy G, Gay S, Falus A, Kittel Á, Buzás EI. Detection and isolation of  
48 cell-derived microparticles are compromised by protein complexes resulting from shared  
49 biophysical parameters. *Blood* **2011**; 117: e39–e48.  
50
- 51 27 Witwer KW, Buzás EI, Bemis LT, Bora A, Lässer C, Lötvall J, Nolte-'t Hoen EN, Piper MG,  
52 Sivaraman S, Skog J, Théry C, Wauben MH, Hochberg F. Standardization of sample collection,  
53 isolation and analysis methods in extracellular vesicle research. *J Extracell Vesicles* **2013**; 2:  
54 20360.  
55  
56  
57  
58  
59  
60

- 1  
2  
3 28 Heijnen HFG, Schiel AE, Fijnheer R, Geuze HJ, Sixma JJ. Activated Platelets Release Two Types of  
4 Membrane Vesicles: Microvesicles by Surface Shedding and Exosomes Derived From Exocytosis  
5 of Multivesicular Bodies and alpha-Granules. *Blood* **1999**; 94: 3791–9.  
6  
7 29 Dubochet J, Adrian M, Chang JJ, Homo JC, Lepault J, McDowell AW, Schultz P. Cryo-electron  
8 microscopy of vitrified specimens. *Q Rev Biophys* **1988**; 21: 129–228.  
9  
10 30 Ayers L, Kohler M, Harrison P, Sargent I, Dragovic R, Schaap M, Nieuwland R, Brooks SA, Ferry B.  
11 Measurement of circulating cell-derived microparticles by flow cytometry: Sources of variability  
12 within the assay. *Thromb Res* **2011**; 127: 370–7.  
13  
14 31 Lacroix R, Judicone C, Poncelet P, Robert S, Arnaud L, Sampol J, Dignat-George F. Impact of pre-  
15 analytical parameters on the measurement of circulating microparticles: towards standardization  
16 of protocol. *J Thromb Haemost* **2012**; 10: 437–46.  
17  
18 32 Jy W, Horstman LL, Jimenez JJ, Ahn Y s. Measuring circulating cell-derived microparticles. *J*  
19 *Thromb Haemost* **2004**; 2: 1842–3.  
20  
21 33 Robert S, Poncelet P, Lacroix R, Arnaud L, Giraudo L, Hauchard A, Sampol J, Dignat-George F.  
22 Standardization of platelet-derived microparticle counting using calibrated beads and a Cytomics  
23 FC500 routine flow cytometer: a first step towards multicenter studies? *J Thromb Haemost* **2009**;  
24 7: 190–7.  
25  
26 34 Cantero M, Conejo J., Parra T, Jiménez A, Carballo F, de Arriba G. Interference of Chylomicrons in  
27 Analysis of Platelets by Flow Cytometry. *Thromb Res* **1998**; 91: 49–52.  
28  
29 35 Brisson A, Mornet S. Functionalization of Gold Nanoparticles with Oriented Proteins. Application  
30 to the High-Density Labelling of Cell Membranes Patent WO/2007/122259. **2007**.  
31  
32 36 Lambert O, Gerke V, Bader M-F, Porte F, Brisson A. Structural analysis of junctions formed  
33 between lipid membranes and several annexins by cryo-electron microscopy. *J Mol Biol* **1997**;  
34 272: 42–55.  
35  
36 37 Morgenstern E. Human Platelet Morphology/Ultrastructure. In: Bruchhausen PDF von, Walter PD  
37 med U, editors. *Platelets and Their Factors* Springer Berlin Heidelberg; **1997**. p. 27–60.  
38  
39 38 White JG. Chapter 3 - Platelet structure. In: Alan D. Michelson MD, editor. *Platelets (Second*  
40 *Edition)* Burlington: Academic Press; **2007**. p. 45–73.  
41  
42 39 Bevers EM, Comfurius P, Zwaal RFA. Changes in membrane phospholipid distribution during  
43 platelet activation. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes* **1983**; 736: 57–66.  
44  
45 40 Fadok VA, Voelker DR, Campbell PA, Cohen JJ, Bratton DL, Henson PM. Exposure of  
46 phosphatidylserine on the surface of apoptotic lymphocytes triggers specific recognition and  
47 removal by macrophages. *J Immunol* **1992**; 148: 2207–16.  
48  
49 41 Biró E, Sturk-Maquelin KN, Vogel GMT, Meuleman DG, Smit MJ, Hack CE, Sturk A, Nieuwland R.  
50 Human cell-derived microparticles promote thrombus formation in vivo in a tissue factor-  
51 dependent manner. *J Thromb Haemost* **2003**; 1: 2561–8.  
52  
53 42 Aras O, Shet A, Bach RR, Hysjulien JL, Slungaard A, Hebbel RP, Escolar G, Jilma B, Key NS.  
54 Induction of microparticle- and cell-associated intravascular tissue factor in human endotoxemia.  
55 *Blood* **2004**; 103: 4545–53.  
56  
57  
58  
59  
60

- 1  
2  
3 43 Morel O, Jesel L, Freyssinet J-M, Toti F. Cellular Mechanisms Underlying the Formation of  
4 Circulating Microparticles. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **2011**; 31: 15–26.  
5  
6 44 Tait JF, Gibson DF, Smith C. Measurement of the affinity and cooperativity of annexin V–  
7 membrane binding under conditions of low membrane occupancy. *Analytical Biochemistry* **2004**;  
8 329: 112–9.  
9  
10 45 Andree HA, Reutelingsperger CP, Hauptmann R, Hemker HC, Hermens WT, Willems GM. Binding  
11 of vascular anticoagulant alpha (VAC  $\alpha$ ) to planar phospholipid bilayers. *J Biol Chem* **1990**; 265:  
12 4923–8.  
13  
14 46 Schrier SL, Zachowski A, Hervé P, Kader J-C, Devaux PF. Transmembrane redistribution of  
15 phospholipids of the human red cell membrane during hypotonic hemolysis. *Biochimica et*  
16 *Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes* **1992**; 1105: 170–6.  
17  
18 47 Robert S, Lacroix R, Poncelet P, Harhour K, Bouriche T, Judicone C, Wischhusen J, Arnaud L,  
19 Dignat-George F. High-Sensitivity Flow Cytometry Provides Access to Standardized Measurement  
20 of Small-Size Microparticles—Brief Report. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **2012**; 32: 1054–8.  
21  
22 48 Yuana Y, Oosterkamp TH, Bahatyrova S, Ashcroft B, Garcia Rodriguez P, Bertina RM, Osanto S.  
23 Atomic force microscopy: a novel approach to the detection of nanosized blood microparticles. *J*  
24 *Thromb Haemost* **2010**; 8: 315–23.  
25  
26 49 Ashcroft BA, Sonnevile J de, Yuana Y, Osanto S, Bertina R, Kuil ME, Oosterkamp TH.  
27 Determination of the size distribution of blood microparticles directly in plasma using atomic  
28 force microscopy and microfluidics. *Biomed Microdevices* **2012**; 14: 641–9.  
29  
30 50 Dragovic RA, Gardiner C, Brooks AS, Tannetta DS, Ferguson DJP, Hole P, Carr B, Redman CWG,  
31 Harris AL, Dobson PJ, Harrison P, Sargent IL. Sizing and phenotyping of cellular vesicles using  
32 Nanoparticle Tracking Analysis. *Nanomedicine: NBM* **2011**; 7: 780–8.  
33  
34 51 Record M, Carayon K, Poirot M, Silvente-Poirot S. Exosomes as new vesicular lipid transporters  
35 involved in cell-cell communication and various pathophysiologicals. **2014**.  
36  
37 52 Joop K, Berckmans RJ, Nieuwland R, Berkhout J, Romijn FP, Hack CE, Sturk A. Microparticles from  
38 patients with multiple organ dysfunction syndrome and sepsis support coagulation through  
39 multiple mechanisms. *Thromb Haemost* **2001**; 85: 810–20.  
40  
41 53 Jimenez JJ, Jy W, Mauro LM, Horstman LL, Ahn YS. Elevated endothelial microparticles in  
42 thrombotic thrombocytopenic purpura: findings from brain and renal microvascular cell culture  
43 and patients with active disease. *Br J Haematol* **2001**; 112: 81–90.  
44  
45 54 Connor DE, Exner T, Ma DDF, Joseph JE. The majority of circulating platelet-derived  
46 microparticles fail to bind annexin V, lack phospholipid-dependent procoagulant activity and  
47 demonstrate greater expression of glycoprotein Ib. *Thromb Haemost* **2010**; 103: 1044–52.  
48  
49 55 Boulanger CM, Amabile N, Tedgui A. Circulating Microparticles A Potential Prognostic Marker for  
50 Atherosclerotic Vascular Disease. *Hypertension* **2006**; 48: 180–6.  
51  
52 56 Richter RP, Lai Kee Him J, Tessier B, Tessier C, Brisson AR. On the Kinetics of Adsorption and Two-  
53 Dimensional Self-Assembly of Annexin A5 on Supported Lipid Bilayers. *Biophysical Journal* **2005**;  
54 89: 3372–85.  
55  
56  
57  
58  
59  
60

- 1  
2  
3 57 Devaux PF. Protein Involvement in Transmembrane Lipid Asymmetry. *Annu Rev Biophys Biomol Struct* **1992**; 21: 417–39.  
4  
5  
6 58 Italiano Jr. JE, Hartwig JH. Chapter 2 - Megakaryocyte development and platelet formation. In:  
7 Alan D. Michelson MD, editor. *Platelets (Second Edition)* Burlington: Academic Press; **2007**. p.  
8 23–44.  
9  
10 59 Reininger AJ, Heijnen HFG, Schumann H, Specht HM, Schramm W, Ruggeri ZM. Mechanism of  
11 platelet adhesion to von Willebrand factor and microparticle formation under high shear stress.  
12 *Blood* **2006**; 107: 3537–45.  
13  
14 60 Tsafrir I, Sagi D, Arzi T, Guedeau-Boudeville M-A, Frette V, Kandel D, Stavans J. Pearling  
15 Instabilities of Membrane Tubes with Anchored Polymers. *Phys Rev Lett* **2001**; 86: 1138–41.  
16  
17 61 Bratosin D, Mazurier J, Tissier JP, Estaquier J, Huart JJ, Ameisen JC, Aminoff D, Montreuil J.  
18 Cellular and molecular mechanisms of senescent erythrocyte phagocytosis by macrophages. A  
19 review. *Biochimie* **1998**; 80: 173–95.  
20  
21 62 Whelihan MF, Mann KG. The role of the red cell membrane in thrombin generation. *Thrombosis*  
22 *Research* **2013**; 131: 377–82.  
23  
24 63 Simak J, Gelderman MP. Cell Membrane Microparticles in Blood and Blood Products: Potentially  
25 Pathogenic Agents and Diagnostic Markers. *Transfusion Medicine Reviews* **2006**; 20: 1–26.  
26  
27 64 Chandler WL, Yeung W, Tait JF. A new microparticle size calibration standard for use in  
28 measuring smaller microparticles using a new flow cytometer. *J Thromb Haemost* **2011**; 9: 1216–  
29 24.  
30  
31 65 Van der Pol E, van Gemert MJC, Sturk A, Nieuwland R, Van Leeuwen TG. Single vs. swarm  
32 detection of microparticles and exosomes by flow cytometry. *J Thromb Haemost* **2012**; 10: 919–  
33 30.  
34  
35 66 Shet AS, Aras O, Gupta K, Hass MJ, Rausch DJ, Saba N, Koopmeiners L, Key NS, Heibel RP. Sick  
36 blood contains tissue factor–positive microparticles derived from endothelial cells and  
37 monocytes. *Blood* **2003**; 102: 2678–83.  
38  
39 67 Gercel-Taylor C, Atay S, Tullis RH, Kesimer M, Taylor DD. Nanoparticle analysis of circulating cell-  
40 derived vesicles in ovarian cancer patients. *Analytical Biochemistry* **2012**; 428: 44–53.  
41  
42 68 Lacroix R, Robert S, Poncelet P, Dignat-George F. Overcoming Limitations of Microparticle  
43 Measurement by Flow Cytometry. *Semin Thromb Hemost* **2010**; 36: 807–18.  
44  
45 69 Van der Vlist EJ, Nolte-'t Hoen ENM, Stoorvogel W, Arksteijn GJA, Wauben MHM. Fluorescent  
46 labeling of nano-sized vesicles released by cells and subsequent quantitative and qualitative  
47 analysis by high-resolution flow cytometry. *Nat Protocols* **2012**; 7: 1311–26.  
48  
49 70 Nolan JP, Stoner SA. A trigger channel threshold artifact in nanoparticle analysis. *Cytometry Part*  
50 *A* **2013**; 83A: 301–5.  
51  
52 71 Eldh M, Lötvall J, Malmhäll C, Ekström K. Importance of RNA isolation methods for analysis of  
53 exosomal RNA: Evaluation of different methods. *Molecular Immunology* **2012**; 50: 278–86.  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60

- 1  
2  
3 72 Kalra H, Adda CG, Liem M, Ang C-S, Mechler A, Simpson RJ, Hulett MD, Mathivanan S.  
4 Comparative proteomics evaluation of plasma exosome isolation techniques and assessment of  
5 the stability of exosomes in normal human blood plasma. *Proteomics* **2013**; .  
6  
7 73 Leong HS, Podor TJ, Manocha B, Lewis JD. Validation of flow cytometric detection of platelet  
8 microparticles and liposomes by atomic force microscopy. *J Thromb Haemost* **2011**; 9: 2466–76.  
9  
10 74 Noerholm M, Balaj L, Limperg T, Salehi A, Zhu LD, Hochberg FH, Breakefield XO, Carter BS, Skog J.  
11 RNA expression patterns in serum microvesicles from patients with glioblastoma multiforme and  
12 controls. *BMC Cancer* **2012**; 12: 22.  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60

For Peer Review

## TABLES

Table 1

Concentrations of EVs in PFP determined by sedimentation on EM grids

	Spherical EVs	Tubular EVs	Large fragments	
			1-6 $\mu\text{m}$	Ery-ghosts
				6-8 $\mu\text{m}$
PS-positive EVs	<b>28,000 <math>\pm</math> 7,000</b>	220 $\pm$ 100	ND	<b>60 <math>\pm</math> 30</b>
Ery-EVs	2,600 $\pm$ 600	<b>1,800 <math>\pm</math> 800</b>	ND	<b>60 <math>\pm</math> 30</b>
PLT-EVs	11,500 $\pm$ 5,500	220 $\pm$ 100	ND	0
All EVs	<b>&gt; 95%</b>	<b>&lt; 5%</b>	<b>&lt; 0.5%</b>	

PS-positive EVs, Ery-EVs and PLT-EVs were identified by labeling with Anx5-, anti-CD235a- and anti-CD41-gold-NPs, respectively.

The PS-positive spherical EVs\*, tubular Ery-EVs and Ery-ghosts are the most easily recognizable EVs. They are marked in bold here to indicate that their corresponding concentrations are more reliable.

To calculate EV concentrations, the numbers of EVs were counted over at least 100 EM grid squares for Ery-ghosts and at least 5 grid squares for spherical and tubular EVs. The numbers of EVs per grid square (of 2,750  $\mu\text{m}^2$  area) were converted into the total number of EVs sedimented on the entire surface of the epoxy resin support, namely 113  $\text{mm}^2$ , and then

1  
2  
3 divided by the volume of pure PFP used in the sedimentation experiment, namely 150  $\mu\text{L}$ , in  
4  
5 order to obtain EV concentrations per  $\mu\text{L}$  pure PFP.  
6

7 \* EVs smaller than 1  $\mu\text{m}$  are called spherical EVs although their shape after  
8  
9 sedimentation may be slightly distorted.  
10

11 ND : not determined.  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60

For Peer Review

**FIGURE LEGENDS****Figure 1. Cryo-EM of EVs from pure plasma**

(A,B), Spherical EVs embedded in a thin film of frozen PFP. EV diameters are 185 nm in (A), and 45 nm and 60 nm in (B). The lipid bilayer at the periphery of EVs is resolved in two dark lines distant of 4 nm (arrow in A). The granular aspect of the background is due to the high protein content of plasma. Scale bars: 100 nm.

(C), Size histogram determined over 300 spherical EVs, from thirty EM grids prepared from fifteen different PFP samples. The 300 images were randomly separated into 3 sets of 100 images; a size histogram was calculated for each set; error bars correspond to SD between the three histograms. A systematic procedure was applied for EM grid analysis. Grids were scanned first at x 300 magnification over several hundred squares for the detection of large EVs, then at x 5,000 magnification for the detection of sub- $\mu\text{m}$  EVs.

(D), Tubular EV of 3.7  $\mu\text{m}$  in length and 150 nm in average width. For clarity purpose, the carbon net has been painted in light blue. The tube is suspended over the carbon net and is deformed at contact points (arrows). Scale bar: 0.5  $\mu\text{m}$ .

(E,F), Two examples of large fragments observed in normal PFP. (E), Elongated EV containing some internal vesicular material (arrow). Scale bar: 200 nm; (F), Large membrane fragment, of 6.5  $\mu\text{m}$  x 7.5  $\mu\text{m}$  overall size, with rounded edges. For clarity purpose, the EV has been contoured by a white dashed line. Scale bar: 1  $\mu\text{m}$ .

White asterisks in A,B,D and E point to areas of the supporting carbon net.

**Figure 2. Labeling of PS-exposing EVs with Anx5-gold-NPs**

(A-D), Examples of spherical EVs after labeling with Anx5-gold-NPs. Some EVs are densely covered with gold-NPs (A,C,D), while other EVs are not labeled (B,C,D), demonstrating the

1  
2  
3 high specificity of Anx5 labeling. Gold-NPs of 4-nm diameter were used in (A) and (D), and  
4  
5 10-nm diameter in (B) and (C). In (B), the arrow points to a gold-NP adsorbed on the carbon  
6  
7 film.

8  
9  
10 The concentration of gold-NPs used in this study was adjusted to give a strong labeling signal  
11  
12 together with a minimal background signal, so that the number of gold-NPs bound per EV  
13  
14 does not correspond to saturation and should not be taken in consideration.

15  
16 Scale bars: 100 nm.

17  
18 (E), Tubular EV of 3  $\mu\text{m}$  length and 60 nm width, homogenously labeled with Anx5-gold-  
19  
20 NPs. Only few tubular EVs, about 10% of the total expose PS and are labeled with Anx5-  
21  
22 gold-NPs. Scale bar: 0.5  $\mu\text{m}$ .

23  
24 (F,G), Large membrane fragment (F), of 8.6  $\mu\text{m}$  overall width, and (G), enlarged view of the  
25  
26 boxed area from (F). The entire surface of the membrane fragment is homogenously labeled  
27  
28 with Anx5-gold-NPs. Scale bars: (F): 1  $\mu\text{m}$ ; (G): 0.5  $\mu\text{m}$ .

29  
30  
31 White asterisks in E,G point to areas of the carbon net.

### 32 33 34 35 36 **Figure 3. Phenotyping of EVs by immuno-gold labeling**

#### 37 38 **(A-D), Ery-EVs labeled with anti-CD235a-gold-NPs**

39  
40 (A), Ery-EV presenting an oval shape (about 450 nm x 300 nm). Scale bar: 100 nm.

41  
42 (B), Tubular EV, 4  $\mu\text{m}$  long and 140 nm wide. Scale bar: 0.5  $\mu\text{m}$ .

43  
44 (C), (inset), low magnification view of a large membrane fragment of 6  $\mu\text{m}$  overall size,  
45  
46 contoured with a white dashed line. The image represents an enlarged view of the boxed area  
47  
48 in the inset, showing the dense and homogenous labeling with anti-CD235a-gold-NPs. Scale  
49  
50 bar: 200 nm.

51  
52 (D), (inset), low magnification view of a large membrane fragment of 8.75 $\mu\text{m}$  x 7  $\mu\text{m}$  overall  
53  
54 size, contoured with a white dashed line. The image represents an enlarged view of the boxed  
55  
56  
57  
58  
59  
60

1  
2  
3 area in the inset, showing the double labeling with 4-nm Anx5-gold-NPs and 10-nm anti-  
4 CD235a-gold-NPs. Note the significantly higher number of Anx5-gold-NPs compared to anti-  
5 CD235a-gold-NPs. Note the significantly higher number of Anx5-gold-NPs compared to anti-  
6 CD235a-gold-NPs, which indicates qualitatively that the number of PS binding sites is higher  
7 than the number of CD235a molecules on the membrane surface. Scale bar: 100 nm.  
8  
9

#### 10 11 **(E-G), PLT-EVs labeled with anti-CD41-gold-NPs**

12  
13  
14 (E), Two spherical EVs, one labeled with anti-CD41-gold-NPs (top), the other unlabeled  
15 (bottom), which underlines the high specificity of labeling. Most spherical CD41-positive  
16 EVs range in size between 100 and 500 nm. Scale bar: 100 nm.  
17  
18

19  
20  
21 (F), Tubular PLT-EV, of 2,6  $\mu\text{m}$  length and 360 nm width, labeled with anti-CD41-gold-NPs.  
22  
23 Scale bar: 0.5  $\mu\text{m}$ .

24  
25 (G), Spherical PLT-EV of 150 nm diameter double-labeled with 4-nm Anx5-gold-NPs and  
26 10-nm anti-CD41-gold-NPs. The localization of the anti-CD41-gold-NPs at the periphery of  
27 the EV is due to a redistribution of the particles resulting from membrane flattening. The  
28 white arrow points to a contaminating ice crystal. Scale bar: 100 nm.  
29  
30  
31  
32

#### 33 34 **(H,I), Tubular EVs of unknown phenotype**

35  
36 Example of a tubular EV that is non labeled by Anx5-, anti-CD235a- and anti-CD41-gold-  
37 NPs. For clarity purpose, the tube has been contoured with a white dashed line in (H); (I),  
38 enlarged view of the boxed area in (H) revealing longitudinal striations which are likely to  
39 correspond to internal protein fibers. Scale bars: 0.5  $\mu\text{m}$ .  
40  
41  
42  
43  
44

45 White asterisks in (B-F,H-I) point to areas of the supporting carbon net.  
46  
47  
48

#### 49 50 **Figure 4. Relative amounts of the different EV sub-populations determined by cryo-EM**

51  
52 The percentages of PS-negative (plain color) and PS-positive (dashed color) Ery-EVs (pink)  
53 and PLT-EVs (green) are represented for the three morphological families. In addition, the  
54 percentages of PS-negative and PS-positive EVs are represented for the sub-population of  
55  
56  
57  
58  
59  
60

1  
2  
3 striated tubular EVs (blue), considered here as a “negative” phenotype, because these EVs are  
4  
5 CD235a-negative and CD41-negative.  
6

7 The morphological family of large fragments has been divided into two groups, because the  
8  
9 6-8  $\mu\text{m}$  Ery-ghosts constitute a group of unique origin.  
10  
11

### 12 13 14 **Figure 5. EVs sedimented on EM grids after receptor-specific gold labeling**

15  
16 (A,B), Spherical EVs labeled with Anx5-gold-NPs. These EVs are called spherical by  
17  
18 extension of our cryo-EM observations, even though their shape may be distorted due to  
19  
20 sedimentation and/or air-drying. Scale bars: (A), 200 nm; (B), 500 nm.  
21

22  
23 (C), Tubular EV labeled with anti-CD235a-gold-NPs. The tube appears dark, most likely due  
24  
25 to the presence of hemoglobin. Scale bar: 1  $\mu\text{m}$ .  
26

27  
28 (D,E), Ery-ghost, 7  $\mu\text{m}$  in overall size, labeled with Anx5-gold-NPs. In (D), the Ery-ghost has  
29  
30 been contoured with a white dashed line. (E), enlarged view of the red boxed area in (D). Ery-  
31  
32 ghosts are the easiest EVs to recognize after sedimentation on EM grids due to their  
33  
34 characteristic size and their high density labeling with either Anx5- or anti-CD235a-gold-NPs.  
35  
36 Scale bar: 1  $\mu\text{m}$ .  
37

38  
39 (F), Size histogram of all EVs, determined over 500 images of EVs recorded on three EM  
40  
41 grids. Error bars correspond to SD between the three individual data sets.  
42  
43  
44

### 45 **Figure 6. Flow Cytometry analysis of a PFP sample**

46  
47 (A,C,E), Ungated Anx5-Fluo (FL1) versus anti-CD235a-Cy5 (FL4) plots.

48  
49 (B,D,F), Forward Scatter (FS) versus Side Scatter (SS) plots corresponding to (A,C,E),  
50  
51 representing events falling in gates A1 (blue), A2 (green), (A4 - B) (red) and B (purple). The  
52  
53 positions of 500 nm and 1  $\mu\text{m}$  microbeads are indicated.  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60

1  
2  
3 (A,B), Single labeling experiment with Anx5-Fluo. All events labeled with Anx5 present FS  
4 values lower than 1  $\mu\text{m}$  microbeads, as expected for PFP EVs (B). A cluster of highly  
5 fluorescent events, located in gate B (purple), is apparent in FL1 versus FL4 plot (A). These  
6 events have FS/SS values close to those of 500 nm microbeads.  
7  
8

9  
10  
11 (C,D), Single labeling experiment with anti-CD235a-Cy5. Events labeled with anti CD235a-  
12 Cy5 appear as a single cluster in gate A1 (blue) (C). They present FS/SS values close to those  
13 of 500 nm microbeads (D).  
14  
15

16  
17  
18 (E,F), Double labeling experiment with Anx5-Fluo and anti-CD235a-Cy5. A cluster of events  
19 labeled with both Anx5-Fluo and anti-CD235a-Cy5 is observed in gate A2 (green). This  
20 cluster contains most of the events previously located in gates B and A1 in single labeling  
21 experiments with Anx5-Fluo and anti-CD235a-Cy5, respectively (E). Events positive only for  
22 Anx5 are still observed in gate (A4-B) (red). The double labeled events present FS/SS values  
23 close to those of 500 nm microbeads (F). These results indicate that most of the events  
24 presenting a high Anx5 labeling intensity are of erythrocyte origin and therefore correspond  
25 to the Ery-ghosts identified by EM.  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37

### 38 **Figure 7. Fragmentation of tubular EVs into spherical EVs**

39  
40 (A), Tubular EV of 1.45  $\mu\text{m}$  length and 140 nm width. The upper left extremity of the tube is  
41 fragmented into three spherical EVs of about 140 nm diameter. The spherical EV closest to  
42 the tube extremity is still associated with the tubular part by a thin connecting material  
43 (arrow). Note that the diameter of the spherical EVs is close to the diameter of the tubular  
44 portion. We speculate that fragmentation resulted from mechanical constraints associated with  
45 shear effects during thin film formation. This image was recorded from a PFP sample labeled  
46 with Anx5-, anti-CD235a- and anti-CD41-gold-NPs. The lack of labeling with Anx5-gold-  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60

1  
2  
3 NPs indicates that the tube fragmentation into vesicles was not accompanied by the exposure  
4  
5 of PS molecules.  
6

7 (B), Tubular Ery-EV, 2.2  $\mu\text{m}$  long, labeled with anti-CD235a-gold-NPs, which has  
8  
9 fragmented into an ensemble of spherical EVs of 220 nm average diameter. It is likely that  
10  
11 fragmentation was induced by mechanical constraints associated with deposition of the tube  
12  
13 on the underlying carbon net; the tube areas in direct contact with the carbon film are  
14  
15 stretched into thin tubules (arrows), which may break below a size limit and give rise to  
16  
17 spherical vesicles.  
18  
19

20  
21 White asterisks in A,B point to areas of the carbon net.  
22

23 Scale bars: 200 nm.  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60

1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60

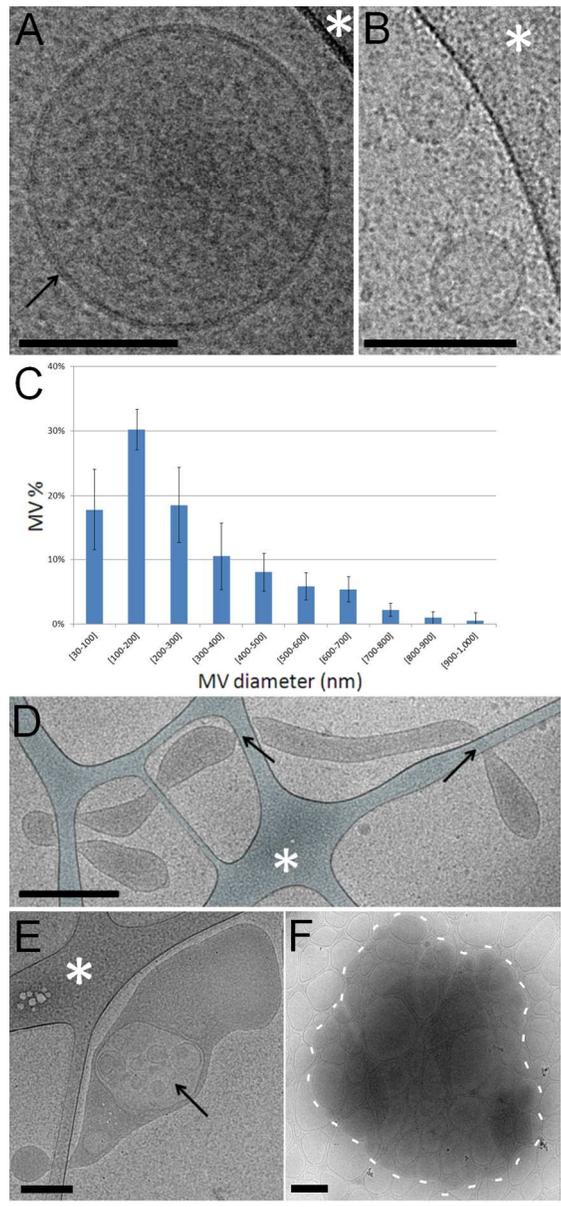


Figure 1  
89x193mm (269 x 269 DPI)

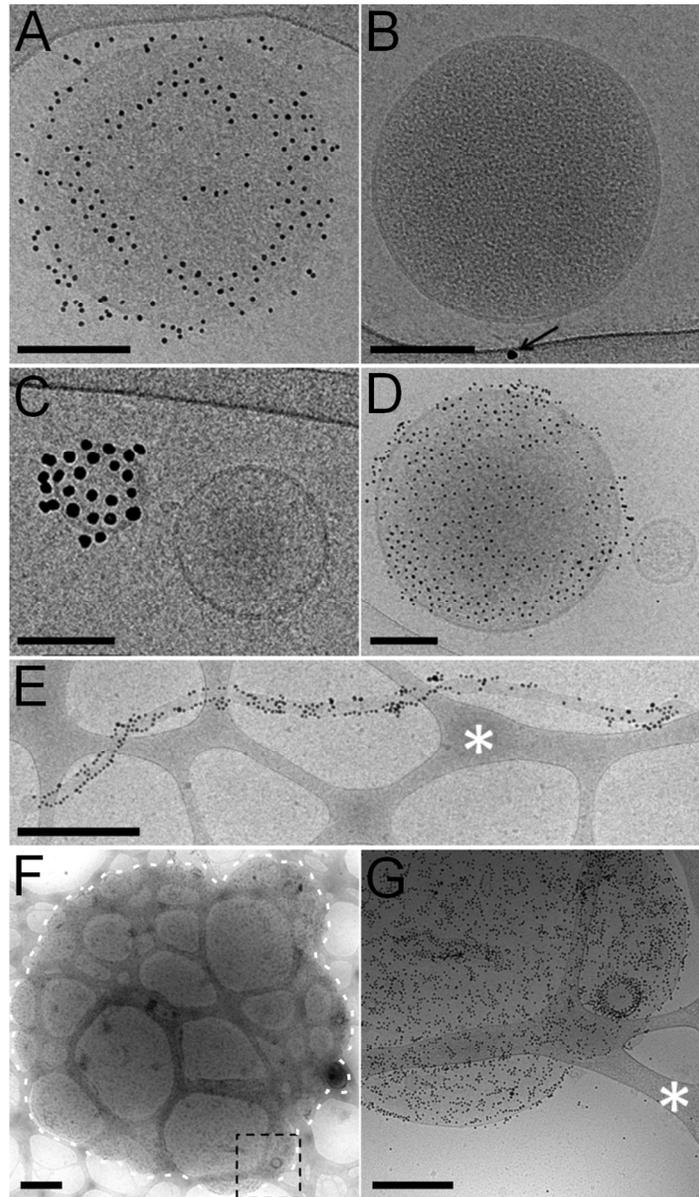


Figure 2  
89x152mm (269 x 269 DPI)

1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60

1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60

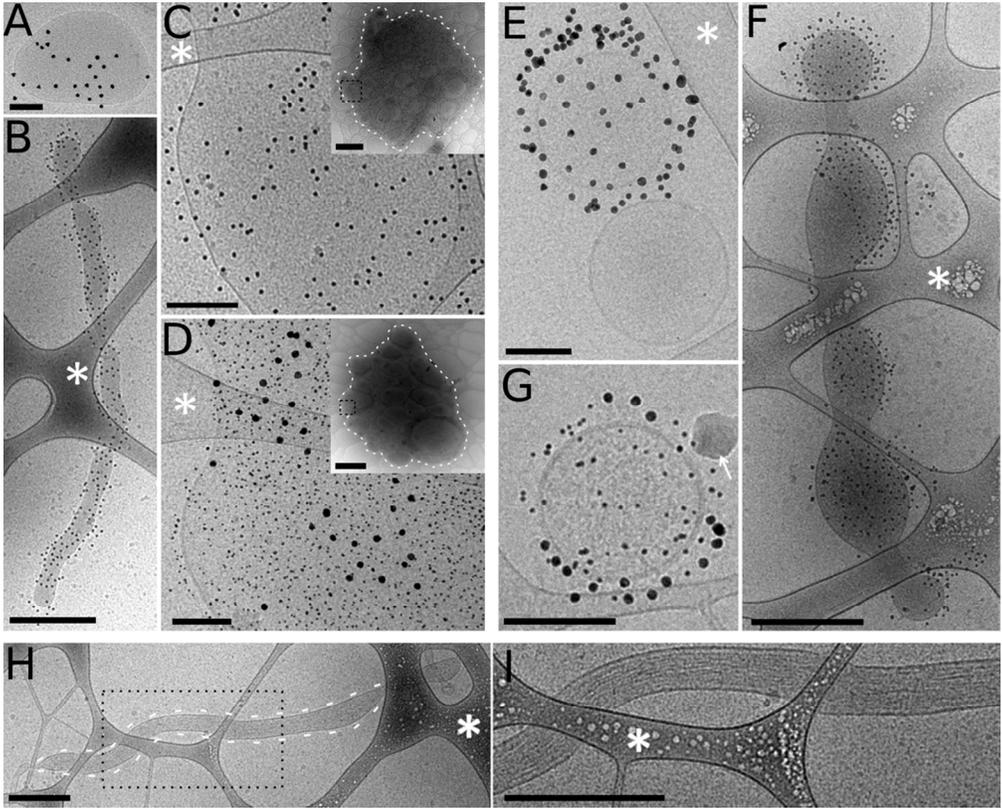


Figure 3  
160x129mm (200 x 200 DPI)

Review

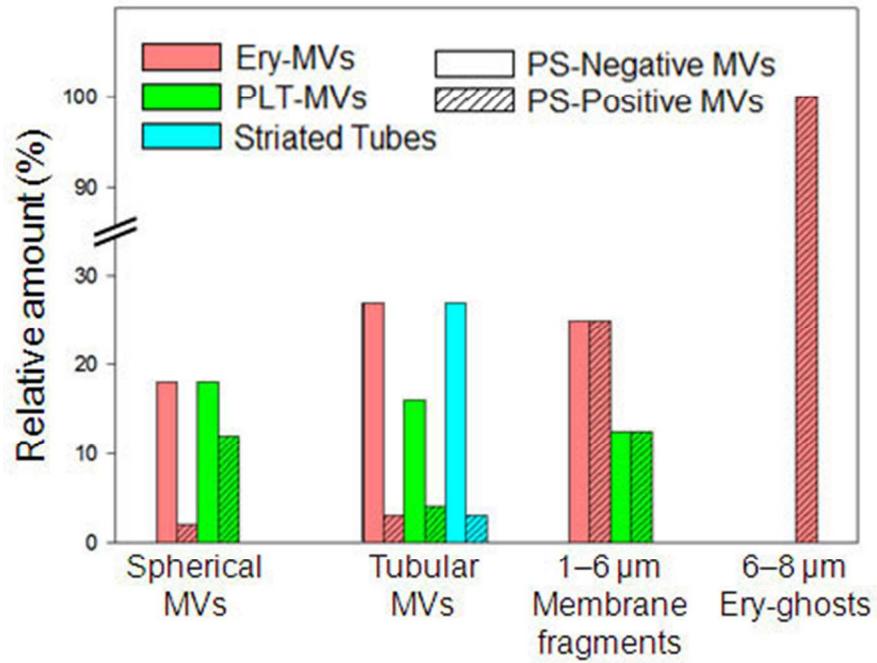


Figure 4  
94x74mm (119 x 119 DPI)

Review

1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60

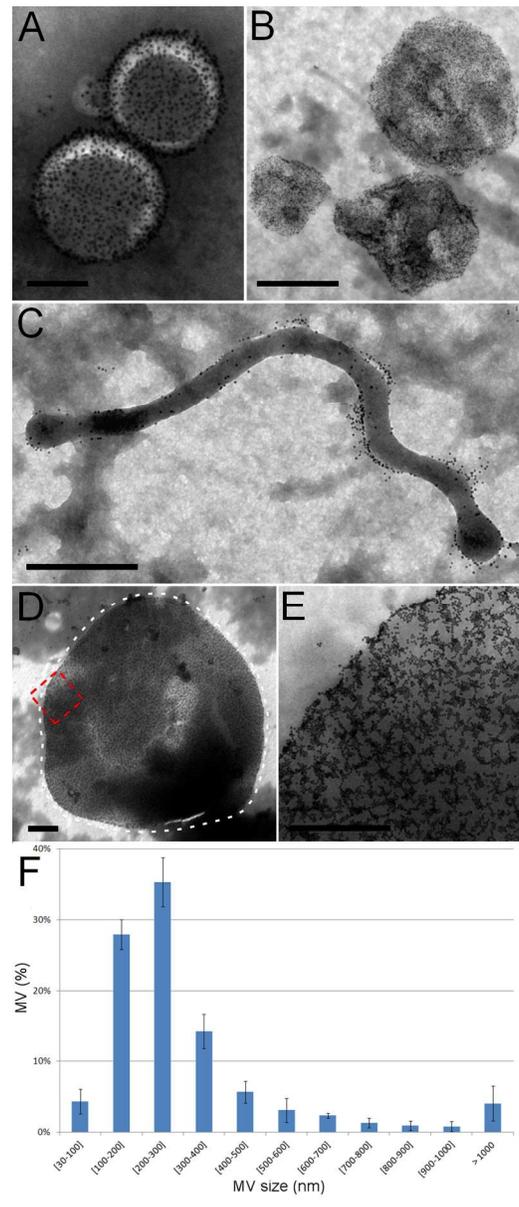


Figure 5  
89x208mm (269 x 269 DPI)

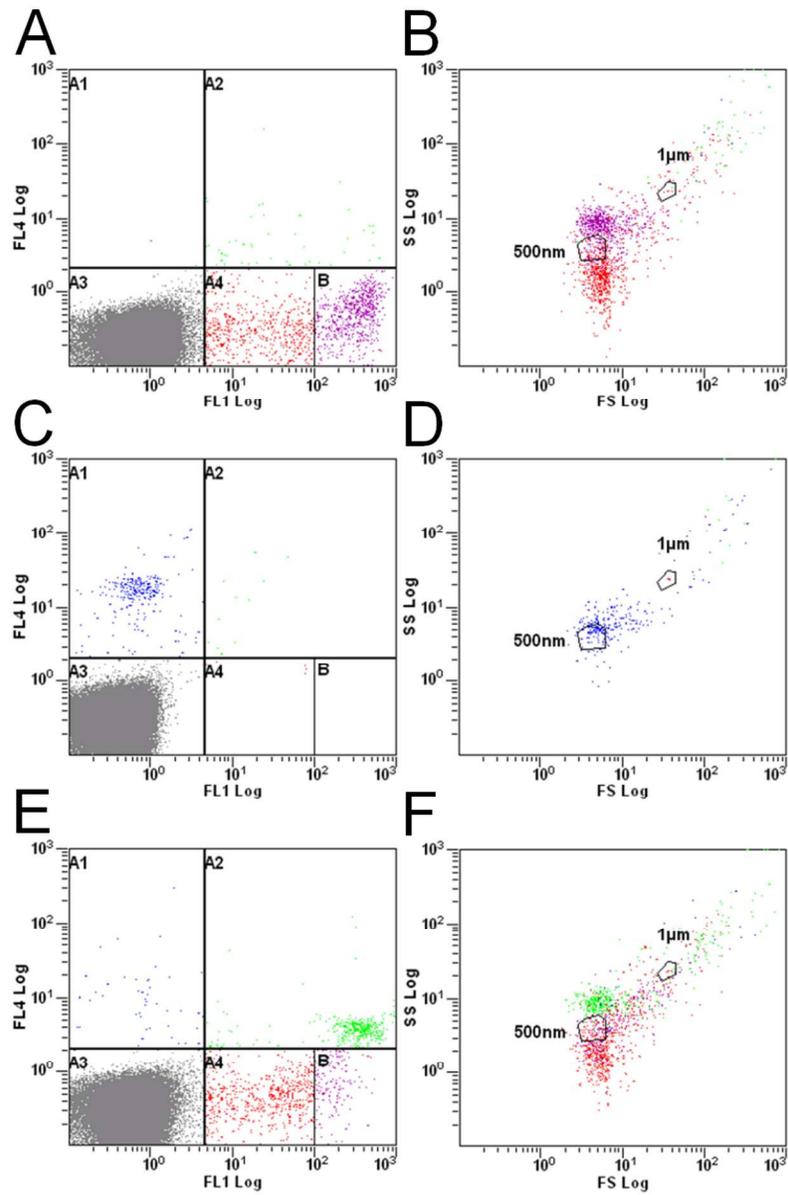


Figure 6  
89x136mm (269 x 269 DPI)

1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60

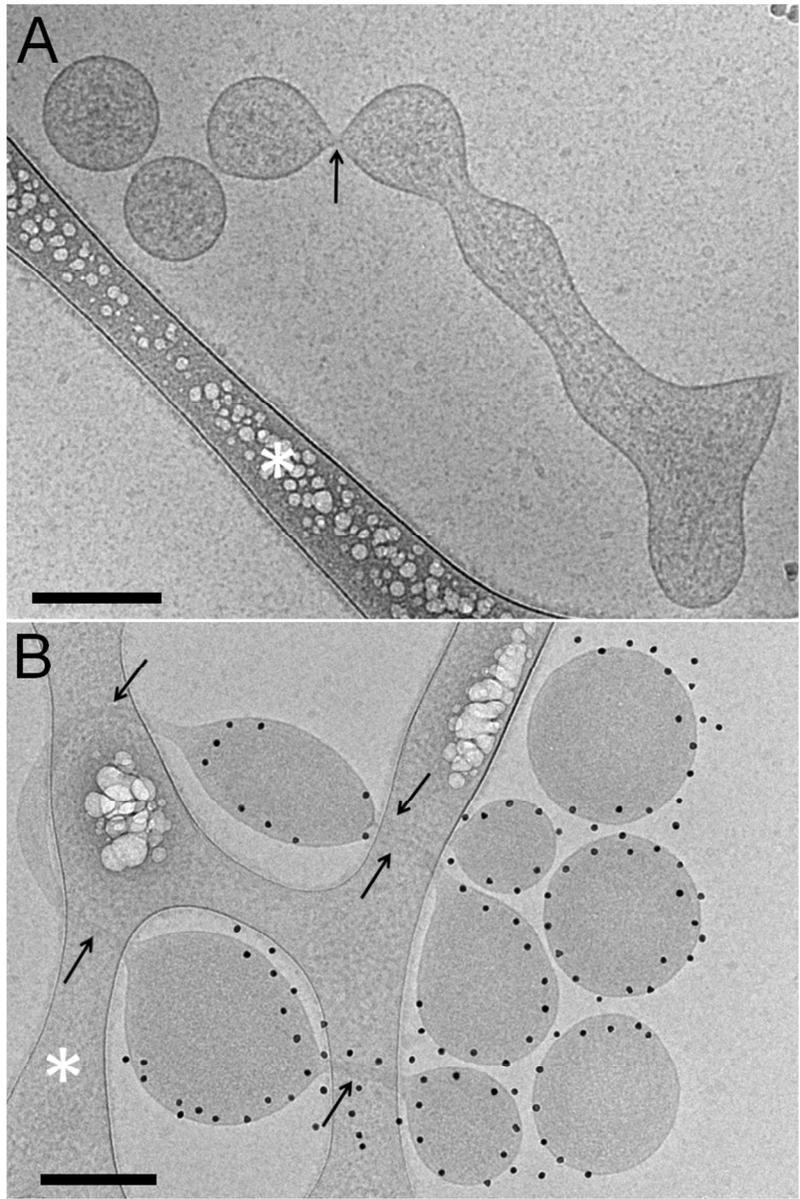


Figure 7  
89x134mm (269 x 269 DPI)

journal of  
thrombosis and haemostasis

## A Simple Flow Cytometry Method Improves the Detection of Phosphatidylserine-Exposing Extracellular Vesicles

Journal:	<i>Journal of Thrombosis and Haemostasis</i>
Manuscript ID:	JTH-2014-00439.R3
Manuscript Type:	Original Article - Vascular Biology
Date Submitted by the Author:	n/a
Complete List of Authors:	Brisson, Alain; University of Bordeaux, UMR-CNRS CBMN Arraud, Nicolas; University of Bordeaux, UMR-CBMn Gounou, Celine; University of Bordeaux, UMR-CBMn Linares, Romain; University of Bordeaux, UMR-CBMn
Please select Five Mandatory Key Words from the <a href="http://www.nlm.nih.gov/mesh/2015/mesh_browser/MBrowser.html" target="_blank">Medical Subject Headings List</a> :	blood plasma, cell-derived microparticles, electron microscopy, flow cytometry, phosphatidylserines

1  
2  
3 **A Simple Flow Cytometry Method Improves the Detection of**  
4 **Phosphatidylserine-Exposing Extracellular Vesicles**  
5  
6  
7

8  
9 Nicolas Arraud, Céline Gounou, Romain Linares, Alain R. Brisson

10  
11  
12 Molecular Imaging and NanoBioTechnology, UMR-5248-CBMN CNRS-University of  
13 Bordeaux-IPB, Allée Geoffroy Saint-Hilaire, F-33600 Pessac, France  
14  
15

16  
17 \*Corresponding author:

18  
19 Alain R. Brisson

20  
21 UMR-5248-CBMN

22  
23 Bat. B14, Allée Geoffroy Saint-Hilaire

24  
25 F-33600 Pessac, France

26  
27 Tel: +33 (0)5 40006861 / Fax: +33 (0)5 40002200

28  
29  
30 [a.brisson@cbmn.u-bordeaux.fr](mailto:a.brisson@cbmn.u-bordeaux.fr)  
31  
32

33  
34 **Short title: Detection of Annexin-5 positive EVs in plasma**  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60

## SUMMARY

*Background:* Plasma contains cell-derived extracellular vesicles (EVs) which participate in physiopathological processes and have potential applications as disease biomarker. However, the enumeration of EVs faces major problems, due to their sub-micrometer size and to intrinsic limitations in methods of characterization, mainly flow cytometry (FCM).

*Objectives:* Our objective is to enumerate EVs in plasma, by taking as prototype the population of phosphatidylserine (PS)-exposing EVs, which constitute one of the major EV populations and are responsible for thrombotic disorders.

*Methods:* The concentration of PS-exposing EVs in platelet free plasma (PFP) of healthy subjects was measured by FCM using either light scattering or fluorescence as trigger and fluorescent Annexin-5 (Anx5) as specific label. In addition, PS-exposing EVs were enumerated by electron microscopy (EM) after labeling with Anx5 gold nanoparticles and sedimentation on EM grids.

*Results:* We show that about 50 x more Anx5-positive EVs are detected by FCM when detection is triggered on fluorescence as compared to light scattering. By fluorescence triggering, concentrations of 22,000 - 30,000 Anx5-positive EVs per  $\mu\text{L}$  PFP were determined, using two different flow cytometers. The limit of detection of the fluorescence triggering method was estimated at about 1,000 - 2,500 Anx5 molecules. Results from EM suggest that EVs down to 100-150 nm diameter are detected by fluorescence triggering.

*Conclusion:* This study presents a simple method for enumerating EVs. We believe that this method, of general application, will improve our understanding on the roles of EVs in physiopathological situations and open avenues for the development of EV-based diagnosis assays.

1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60

Keywords: Blood Plasma/ Cell-Derived Microparticles/ Electron Microscopy /Flow cytometry/ Phosphatidylserines

For Peer Review

## INTRODUCTION

Blood and other body fluids contain cell-derived extracellular vesicles (EVs) that consist of small pieces of cytoplasm surrounded by a lipid membrane. EVs are commonly classified according to their formation mechanism and their size [1,2]. EVs called microparticles or microvesicles are sub-micrometer vesicles that are shed from the cell plasma membrane, while exosomes are 50 to 100 nm vesicles that are secreted by cells via exocytosis of multivesicular bodies. In this paper, the term EV will be used to designate all types of cell-derived vesicles that are found in plasma [3,4].

Considered initially as cellular debris or waste particles [5,6], there is now increasing evidence that EVs are involved in numerous functions [7,8]. In blood, EVs participate in physiological processes of coagulation, inflammation or intercellular communication, while elevated EV levels have been reported in numerous diseases [9–11], including cardio-vascular diseases, cancer, sepsis and auto-immune diseases [12–15]. EVs exposing the pro-coagulant lipid phosphatidylserine (PS) have attracted major interest for several reasons. According to the classical theory of EV formation at cells' plasma membranes, the exposure of PS molecules on the outer membrane leaflet constitutes an early step of cell activation processes, which precedes membrane blebbing and EV shedding [16–18]. Most studies on plasmatic EVs are in keeping with this theory and consider that PS-exposing EVs represent the majority, or even the totality of EVs [19–23]. In addition, PS and tissue factor-exposing EVs have been implicated in thrombotic events associated with various pathologies [11,24,25]. Furthermore, the physiological importance of PS-exposing EVs in haemostasis is underlined by the fact that two bleeding disorders, the Scott syndrome and the Castaman's defect [26,27], are characterized by an impairment to generate PS-exposing EVs.

1  
2  
3 However, despite intense research, current knowledge on EVs is still limited. This is  
4 mainly due to the small size of EVs, most of them being smaller than 500 nm [20,21,28] , and  
5 to intrinsic limitations of methods applied for their characterization. Over the last two  
6 decades, flow cytometry (FCM) has been the main method used for characterizing EVs  
7 [1,2,29]. In the classical FCM approach, referred to hereafter as conventional FCM, objects  
8 are detected in a two-step process, first on the basis of their light scattering intensity which  
9 must exceed a threshold value, and second on the basis of their specific labeling with  
10 fluorescent ligands. This approach has established the existence of EVs from different cellular  
11 origins in various body fluids [1,2,4,30–32]. However, major issues have emerged concerning  
12 the actual size and amount of EVs detected by FCM. In particular, it is now well established  
13 that polymer particles initially used as size calibrators do not constitute proper references for  
14 sizing EVs, due to their different light scattering properties [33,34]. Recent theoretical studies  
15 have reported that 500-nm polymer particles scatter light similarly to 800-nm EVs on a  
16 standard flow cytometer [35]. Also, we have recently shown experimentally that only 1 or few  
17 % of the PS-exposing EVs observed by quantitative electron microscopy (EM) were detected  
18 by conventional FCM [28].  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38

39 Other methods have been applied to the detection and quantification of EVs, including  
40 EM, atomic force microscopy (AFM), dynamic light scattering (DLS), nanoparticle tracking  
41 analysis (NTA), or resistive pulse sensing (RPS). These methods present specific advantages,  
42 as recently reviewed in [36]. However, FCM remains the method of choice for phenotyping  
43 large numbers of samples as required in a bio-medical context. It is worth noting that the  
44 detection of small objects is not a new issue in FCM. More than 30 years ago, dedicated flow  
45 cytometers were developed which were able to detect 100-nm viruses based on their light  
46 scattering properties [37,38]. More recently, Marie et al. [39,40] pioneered an alternative  
47 strategy which consisted in triggering detection of viruses on a fluorescence parameter instead  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60

1  
2  
3 of a light scattering parameter. In the EV field, this approach has been rarely applied [12,41],  
4  
5 yet its power was recently illustrated with the detection of cell culture EVs using a high-end  
6  
7 flow cytometer and an original labeling strategy in which a lipophilic fluorophore was  
8  
9 incorporated in EV membranes [42].  
10

11  
12 Here, we present a simple method for detecting PS-exposing EVs from plasma  
13  
14 samples by fluorescence (FL) triggering. In addition, we compare results obtained by this  
15  
16 method and by a quantitative EM approach recently introduced for enumerating EVs [28].  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60

For Peer Review

## METHODS

### Materials

Phe-Pro-Arg chloromethyl ketone (PPACK) was from Haematologic Technologies (Cryo pep, Montpellier, France). Fluorescein-5-maleimide (Fluo-Mal) and cyanine-5-maleimide (Cy5-Mal) were from Invitrogen (Saint Aubin, France) and GE Healthcare (Velizy-Villacoublay, France), respectively. Size calibration fluorescent particles Estapor® F-XC100 (1- $\mu$ m) and F-XC050 (500-nm) were from Merck Chemicals (Fontenay-sous-Bois, France). Fluorescence calibration particles Quantum™ FITC-5 MESF were from Bangs Laboratories (Polysciences, Eppelheim, Germany). Sphero™ 1- $\mu$ m Ultra Rainbow, 240-nm yellow fluorescent particles (YFP 240) and 2- $\mu$ m AccuCount particles were from Spherotech (Interchim, Montluçon, France).

All other chemicals were of ultrapure grade (Sigma-Aldrich, Lyon, France). Ultrapure water with a resistivity of 18.2 M $\Omega$ .cm was produced by a RiOs5-Synergy system (Millipore, Molsheim, France).

### Preparation of plasma samples

Blood was collected after written informed consent from five healthy male donors who had fasted for at least 12h [43]. Blood was drawn from an antecubital vein using a 21-Gauge needle. A light tourniquet was applied during collection of the first tube, which was discarded, then the tourniquet was released and blood was collected in 4.5 mL BD Vacutainer® tubes containing 0.1 volume of 105 mM sodium citrate. The preparation of platelet free plasma (PFP) was started less than one hour after blood collection and consisted of two cycles of

1  
2  
3 centrifugation at 2,500g for 15 min at 25°C in an Eppendorf 5804 R centrifuge equipped with  
4  
5 an A-4-44 swinging bucket rotor [23].  
6  
7  
8  
9

### 10 **Production of fluorescently labeled Annexin-5 (Anx5-F\*)**

11  
12 An Annexin-5 (Anx5) mutant containing a single cystein residue was produced and  
13  
14 conjugated with Fluo-Mal or Cy5-Mal, as previously described [44].  
15  
16  
17

### 18 **Flow cytometry**

19  
20 PFP samples were diluted 10 x in a buffer made of 150 mM NaCl, 2 mM NaN<sub>3</sub>, 10 μM  
21  
22 PPACK, 10 mM HEPES, pH 7.4 (HBS buffer), then Anx5-F\* was added at 2.8 nM final  
23  
24 concentration, unless otherwise stated. Re-calcification was achieved by adding 10 mM  
25  
26 CaCl<sub>2</sub>. FCM was performed after at least 30 min incubation at ambient temperature. As  
27  
28 negative controls, PFP samples were prepared as above in the absence of Ca<sup>2+</sup>.  
29  
30  
31  
32

33 The majority of FCM experiments were performed with a Beckman Coulter FC 500  
34  
35 (Villepinte, France) equipped with an additional solid phase 635 nm laser and running CXP  
36  
37 Acquisition 2.2. Few experiments were performed with a Beckman Coulter Gallios in a 3  
38  
39 laser/10 color configuration and running Gallios cytometer 1.2.  
40  
41

42 A detailed description of the FCM operating conditions, data acquisition and analysis  
43  
44 protocol is provided in Supplementary Methods.  
45  
46  
47

### 48 **Quantification of Anx5-positive-EVs by EM**

49  
50 Anx5-positive EVs were enumerated by EM after sedimentation on EM grids as previously  
51  
52 described [28]. Briefly, PFP samples were labeled with Anx5-conjugated gold nanoparticles  
53  
54 (Anx5-gold-NPs) [45] as follows: 100 μL PFP were mixed with 1 μL 1 mM PPACK, 1 μL  
55  
56 Anx5-gold-NPs at 1-3 x 10<sup>16</sup> NP/L, supplemented with 10 mM Ca<sup>2+</sup> and incubated for 30 min  
57  
58  
59  
60

1  
2  
3 at ambient temperature. Samples were then diluted 30 x with 100 mM cacodylate buffer, pH  
4  
5 7.4, containing 2 mM  $\text{Ca}^{2+}$ , and deposited into 4.5 mL polyallomer centrifuge tubes  
6  
7 containing at the bottom a 12-mm diameter hemispherical epoxy resin support onto which  
8  
9 four EM grids coated with a continuous carbon film had been fixed (Fig. S1). Samples were  
10  
11 centrifuged in an Optima™ MAX-E Ultracentrifuge equipped with a MLS50 rotor at 100,000  
12  
13 g for 1 h at 20°C, after which the liquid above EM grids was discarded, EM grids were  
14  
15 recovered and air dried.  
16

17  
18 Grids were observed with a CM120 microscope (FEI, France) operated at 120 kV.  
19  
20 Images were recorded with an USC1000-SSCCD camera (Gatan, Warrandale, PA, USA).  
21

22  
23 A stringent method was applied for counting Anx5-positive EVs, in which only  
24  
25 objects that presented a high and homogenous gold-NP labeling with a well-defined shape  
26  
27 were taken into account.  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60

## RESULTS

### 1- Detection of Anx5-positive EVs in PFP samples by FS triggering

PS-exposing EVs were identified via specific labeling with fluorescent Anx5, a protein binding with high affinity to PS-exposing membranes in the presence of  $\text{Ca}^{2+}$  [46–48].

PFP samples were first analyzed by a conventional FCM approach, in which the trigger was set on the FS parameter and the detection was limited to events labeled by Anx5-F\* (Fig. 1A-B). The concentration of Anx5-positive EVs detected by this approach was  $457 \pm 178$  (n=10) per  $\mu\text{L}$  pure PFP. This value is consistent with previous reports on EVs from normal PFP [20,23,28,30]. Displayed on a FS vs. SS color dot plot, most of the Anx5-positive EVs are superposed with the background from the buffer (Fig. 1A-B). On a FL1 vs. SS plot, two populations of Anx5-positive EVs can be distinguished. About 30% of them ( $134 \pm 91$  per  $\mu\text{L}$ ) form a distinct cluster of high fluorescence intensity events (colored blue in Fig. 1B). As previously reported [28], these objects, which are characterized by a high fluorescence intensity and scattering properties similar to 500-nm polymer particles (Fig. 1B left), correspond to empty erythrocytes and are called hereafter erythrocyte ghosts. The rest of the Anx5-positive EVs are colored red in Figure 1B.

### 2- Detection of Anx5-positive EVs by FL triggering

Figure 1C,D presents the results obtained when the same PFP sample was analyzed with the trigger set on the FL1 parameter, in the absence of  $\text{Ca}^{2+}$  (Fig. 1C) and in the presence of  $\text{Ca}^{2+}$  (Fig. 1D). After re-calcification, a large number of Anx5-positive EVs were detected, namely  $22,326 \pm 206$  / $\mu\text{L}$  PFP for this sample. Most of these Anx5-positive EVs formed a compact cluster, with a minimal fluorescence intensity of 2 arbitrary units (colored red in Fig. 1D). The

erythrocyte ghosts, identified by their high fluorescence intensity, formed a minor group of objects (colored blue in Fig. 1D). Their number, namely  $249 \pm 208$  ( $n=10$ ) per  $\mu\text{L}$  PFP, was larger than the number measured by FS triggering, which is likely due to the weak scattering intensity of some of them.

Using this approach, referred to hereafter as FL triggering, we determined an average concentration of  $22,245 \pm 3,664$  ( $n=10$ ) Anx5-positive EVs per  $\mu\text{L}$  PFP. Similar values were obtained with either Anx5-Fluo or Anx5-Cy5 (Table S1), hence Anx5-Fluo and Anx5-Cy5 were used interchangeably in the rest of this study. It is important to note that the numbers of Anx5-positive EVs measured by FL triggering are highly reproducible, with less than 5% difference between replicates.

By comparing the concentrations of Anx5-positive EVs detected by FL and FS triggering in ten PFP samples, we conclude that the FL triggering approach enables to detect  $55 \pm 24$  ( $n=10$ ) more EVs than the conventional FS triggering approach.

The values reported above were obtained from ten PFP samples which were selected because they were prepared and analyzed in the same experimental conditions. During this study, 30 additional PFPs from healthy subjects were also analyzed, although with slightly different conditions of preparation or FCM analysis. The concentrations of Anx5-positive EVs detected by FL and FS triggering were determined for these 30 PFPs, giving an average ratio of  $51 \pm 24$  more EVs detected by FL than by FS.

Chelation of  $\text{Ca}^{2+}$  with EDTA resulted in a near total disappearance of the Anx5-positive EVs, as expected from the  $\text{Ca}^{2+}$ -dependency of Anx5 binding to PS-exposing membranes (Fig. S3C) [47]. Similarly, a near total reversion of the signal was observed after addition of 0.5% Triton X-100 (Fig. S3D), confirming the lipidic nature of EVs. In addition, we found that after sedimentation of PFP samples at 20,000 g, most of the Anx5-positive EVs disappeared from the supernatants (Fig. S3E) and were recovered in the re-suspended pellets

(Fig. S3F). This ensemble of data allow us to conclude that the Anx5-positive objects detected by FL triggering are genuine Anx5-positive EVs.

The  $\text{Ca}^{2+}$  concentration of 10 mM used for re-calcifying PFP samples was selected because it corresponds to the plateau value of  $\text{Ca}^{2+}$  concentration curves (Fig. S4). Furthermore, we verified with synthetic large unilamellar vesicles (LUVs) that, in the conditions used here, Anx5 binding is specific of PS-exposing membranes, with no detectable binding to phosphatidylethanolamine-exposing liposomes (Fig. S5).

### 3- Influence of Anx5-F\* concentration on the detection of Anx5-positive EVs

Next, we investigated the influence of Anx5-F\* concentration on the detection of Anx5-positive EVs. For both FS and FL triggering, the number of Anx5-positive EVs detected was found to increase with increasing Anx5-F\* concentration, until a plateau value was reached (Fig. 2). In the conditions used here, namely 10 x-diluted PFP, the plateau was reached at 0.8 nM Anx5-F\*. Most experiments reported in this paper were performed with 2.8 nM Anx5-F\*, therefore in saturating conditions.

For the two PFP samples analyzed in Figure 2, the concentrations of Anx5-positive EVs detected by FL triggering were respectively 58 (circles) and 75 (squares) x larger than the concentrations detected by FS triggering.

### 4- Influence of PFP dilution on the detection of Anx5-positive EVs

In order to evaluate the possible occurrence of coincidence effects on the detection of Anx5-positive EVs [36,49], we determined the concentration of Anx5-positive EVs for serial two-fold dilutions of PFP samples, using a fixed concentration of 2.8 nM Anx5-F\*.

Figure 3 shows the results of two independent experiments in which Anx5-positive EVs were detected using either FS triggering (blue symbols) or FL triggering (red symbols),

1  
2  
3 for dilution factors ranging from 4 x to 128 x. The concentration of Anx5-positive EVs in  
4  
5 diluted PFP samples is observed to decrease linearly with the reciprocal dilution factor. In  
6  
7 addition, the mean fluorescence intensity of EVs detected by FL triggering remains constant  
8  
9 over the entire dilution range (Fig. S6). These results indicate the absence of coincidence  
10  
11 effects on the detection of Anx5-positive EVs. Therefore, as the experiments reported here  
12  
13 were performed with 10 x-diluted PFP samples, we conclude that the 22,000 Anx5-positive  
14  
15 EVs determined by FL triggering correspond to individual EVs.  
16  
17

18  
19 In the two independent experiments presented in Figure 3, the numbers of Anx5-  
20  
21 positive EVs detected by FL triggering were respectively 45 (squares) and 79 (circles) x  
22  
23 larger than the values measured by FS triggering.  
24  
25

## 26 27 **5- Determination of the number of Anx5-F\* molecules required for detecting single** 28 29 **Anx5-positive EVs by FL triggering** 30

31  
32 Next, we focused on the determination of the sensitivity of the FL triggering approach, which  
33  
34 can be defined as the minimal number of Anx5-F\* molecules needed for detecting one single  
35  
36 Anx5-positive EV. The fluorescence intensities of a mixture of MESF-FITC calibration  
37  
38 particles containing from 0 to 756,000 MESF were measured by FS triggering (Fig. 4A-B),  
39  
40 from which a calibration curve relating the number of fluorophores of the particles to their  
41  
42 fluorescence intensity was drawn (Fig. 4C).  
43  
44

45  
46 Based on this calibration curve, the minimal fluorescence intensity measured by FL  
47  
48 triggering, which is equal to 2 fluorescence arbitrary units, is found to correspond to about  
49  
50 2,500 MESF. As the Anx5-F\* molecules used in this study bear one single fluorophore per  
51  
52 protein [44], we conclude that the sensitivity of the FL triggering approach corresponds to  
53  
54 2,500 Anx5-F\* (Fig. 4D).  
55  
56  
57  
58  
59  
60

1  
2  
3 This result was further confirmed by analyzing the mixture of MESF-FITC calibration  
4 particles by FL triggering (Fig. 4E). Indeed, only four populations of particles were detected,  
5 those containing 9,828 fluorophores and above. The 1,484 MESF particles, of 1.34 mean  
6 fluorescence intensity, were not detected by FL triggering.  
7  
8  
9  
10

## 11 12 13 14 **6- Enumeration of Anx5-positive EVs by EM**

15  
16 In order to determine the minimal size of Anx5-positive EVs detected by FL triggering, we  
17 analyzed the same PFP samples by EM. As we reported recently [28], Anx5-positive EVs can  
18 be enumerated reliably by EM after labeling with Anx5-gold-NPs and high-speed  
19 sedimentation on EM grids (Fig. S1).  
20  
21  
22  
23

24  
25 A gallery of EV images obtained by this procedure is presented in Figure 5. Most EVs  
26 (Fig. 5A-D) present a near-circular shape, as expected from spherical EVs projected on a flat  
27 support. Some EVs present a tubular morphology (Fig. 5C-D), while a minor number consists  
28 of large fragments and erythrocyte ghosts (Fig. 5E).  
29  
30  
31  
32

33  
34 The concentration of Anx5-positive EVs determined by EM was  $30,615 \pm 10,243$   
35 (n=11) per  $\mu\text{L}$  PFP. Although we lack of a proper control for evaluating the yield of the  
36 sedimentation procedure, two independent results suggest strongly that most of the EVs  
37 present in centrifugation tubes are recuperated on EM grids. First, when a PFP sample is  
38 centrifuged a 1<sup>st</sup> time and its supernatant is submitted to a second centrifugation, basically no  
39 EVs are observed on EM grids. Second, the sedimentation conditions are sufficient to  
40 sediment EVs of small size, as demonstrated by the observation of such EVs on EM grids,  
41 e.g. in Fig. 5B two unlabeled EVs of about 50 nm diameter (arrows). We consider therefore  
42 that the value of about 30,000 Anx5-positive EVs per  $\mu\text{L}$  PFP corresponds to the large  
43 majority of this EV population. Yet, due to the stringent method of EV counting and the  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60

possible deformation of small EVs upon sedimentation, we consider likely that EVs smaller than about 100-150 nm diameter are under-estimated in this analysis.

The number of Anx5-positive EVs observed by EM is larger than the number determined by FL triggering (about 22,000 per  $\mu\text{L}$ ). As about 1/3rd of Anx5-positive EVs measured by EM range from 100 to 200 nm (Fig. 5F), we estimate that EVs down to about 200 nm diameter were detected by FL triggering with the flow cytometer settings used here. This point will be further discussed below.

### 7- Application of the FL triggering approach to another flow cytometer

At a later stage of this study, we applied the FL triggering approach to another flow cytometer, namely a Gallios instrument. The concentration of Anx5-positive EVs detected by FL triggering was measured in five PFP samples and found to be  $31,975 \pm 13,306$  per  $\mu\text{L}$  PFP (n=5). The absolute number of Anx5-positive EVs detected with the Gallios is therefore higher than with the FC 500, as expected from the respective sensitivity of these instruments [50] (Fig. S7).

We determined the sensitivity of the FL triggering approach with this flow cytometer, as described above, and found that about 1,000 Anx5-F\* were required to detect individual Anx5-positive EVs (Fig. S8).

As the number of Anx5-positive EVs detected by FL triggering on the Gallios is almost equal to the number observed by EM, we conclude that EVs down to about 100-150 nm diameter were detected by FL triggering on this instrument.

### 8- Phenotyping of Anx5-positive EVs

Finally, we attempted to phenotype the Anx5-positive EVs detected by FL triggering. We focused on the populations of EVs derived from platelets and erythrocytes, which were

1  
2  
3 identified by labeling with anti-CD41-mAb-PE and anti-CD235a-mAb-PE, respectively. As  
4  
5 shown in Figure 6, when PFP was double labeled with Anx5-Cy5 and either anti-CD41-PE  
6  
7 (Figure 6B) or anti-CD235a-PE (Figure 6C), a population of events positive for both markers  
8  
9 was observed in the FL6 vs. FL2 color dot plots. We found that, for this PFP sample, 23%  
10  
11 and 8% of the Anx5-positive EVs detected by FL triggering derived from platelets and  
12  
13 erythrocytes, respectively.  
14  
15

16 These results provide a proof of principle of the phenotyping of PFP EVs by FL  
17  
18 triggering. A complete study will be described elsewhere.  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60

## DISCUSSION

In this paper, we present a simple FCM method that improves the detection of PS-exposing EVs in plasma samples. In this method, the detection of EVs is based on their fluorescence signal, instead of their scattering intensity as in conventional FCM. Although the detection of small objects by FCM based on their fluorescence is a strategy that has been introduced more than ten years ago [12,39–41], this strategy has only been applied recently in the EV field [42,49,51].

In this study, we focused on PS-exposing EVs, which are considered to constitute a major population of cell-derived EVs and have been the subject of most FCM studies on EVs [18–23]. The main result of our work is that about 50 x more Anx5-positive EVs are detected by the FL triggering approach as compared to a conventional FS triggering approach. Since several years, it has been recognized that only a fraction of EVs were detected by FCM, yet their exact amount remained unclear. This study is therefore in agreement with our previous EM study, which concluded that conventional FCM detects only a few % of EVs, as further discussed below [28].

The FL triggering method presents several advantages: i) its simplicity, as it can be performed with most commercial flow cytometers; ii) its reproducibility, as intra-sample variation coefficients of less than 5% were observed; iii) its speed, as it requires only several minutes per sample; iv) its cost effectiveness, as it requires only about one hundred nanograms Anx5-F\* per sample, together with small sample volumes, e.g. less than 100  $\mu$ L plasma; v) this method is applicable to unprocessed plasma samples, thus avoiding potential artifacts from filtration or sedimentation. In addition, the fact that Anx5 binding to PS-exposing membranes can be induced by simple addition of  $\text{Ca}^{2+}$  constitutes a further advantage, because highly reliable negative controls can be obtained by analyzing the same samples in the absence of  $\text{Ca}^{2+}$ . In comparison, negative controls in FCM involve in general

1  
2  
3 the use of isotypic antibodies, often of unknown fluorophore to antibody ratio, which may  
4  
5 lead to unsatisfactory results.  
6

7  
8 Using two different flow cytometers, we determined concentrations of Anx5-positive  
9  
10 EVs of about 22,000 and 30,000 per  $\mu\text{L}$  normal PFP. Both values are of the same order of  
11  
12 magnitude when compared to values previously reported from FS triggering studies, namely  
13  
14 around 500 EVs per  $\mu\text{L}$  [20,23,28,30]. The additional fact that the values obtained  
15  
16 independently by EM are close to those from FL triggering constitutes a strong support for the  
17  
18 validity of both methods.  
19

20  
21 It is logical to wonder which percentage of the whole population of Anx5-positive  
22  
23 EVs are detected by FL triggering and what is the smallest size of EVs detected by this  
24  
25 method. Two independent sets of results provide some answer to these questions. First, using  
26  
27 fluorescence calibration particles, we determined the number of Anx5-F\* molecules necessary  
28  
29 for detecting individual Anx5-positive EVs, namely about 2,500 and 1,000 Anx5-F\*  
30  
31 molecules for the FC 500 and Gallios, respectively. Considering that an Anx5 molecule  
32  
33 covers a surface of  $30 \text{ nm}^2$  on synthetic PS-exposing membranes [52–54] and approximating  
34  
35 EVs to spheres made of pure lipids, 1,000 and 2,500 Anx5 molecules would cover vesicles of  
36  
37 100 and 150-nm diameter, respectively. These values must be considered with caution,  
38  
39 because EVs are not pure liposomes and it is most likely that the presence of membrane  
40  
41 proteins reduces the membrane surface accessible for Anx5 binding. Second, we found that  
42  
43 the concentrations of Anx5-positive EVs detected by EM and by FL triggering with the  
44  
45 Gallios were almost identical. As EM detects Anx5-positive EVs down to 100-150 nm in  
46  
47 diameter, we conclude that the Anx5-positive EVs detected with the Gallios have similar size,  
48  
49 while slightly larger EVs are detected with the FC 500. These two independent sets of results  
50  
51 lead therefore to the same conclusion, which is that FL triggering allows detecting EVs of  
52  
53 100-150 nm diameter.  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60

1  
2  
3 In principle, the FL triggering approach should be applicable to the quantification of  
4 EVs of other phenotypes. The pre-requisites are that EVs present a sufficient number of  
5 receptors, that bright fluorescent ligands are available, and that reliable negative controls are  
6 designed.  
7  
8  
9

10  
11 This study presents the proof of concept of the quantification of EVs by the FL  
12 triggering method, demonstrated here in the case of PS-exposing EVs from plasma. As shown  
13 here, the use of different flow cytometers leads to different results. Therefore, in order to be  
14 able to compare results from different laboratories, standardized procedures will have to be  
15 established, including the use of fluorescent calibration particles, of well-controlled  
16 fluorescent proteins, and sample preparation methods [23].  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25

26 We foresee that applying the FL triggering detection strategy on flow cytometers with  
27 improved optics and detector sensitivity [34,42,50,55] should allow an efficient identification  
28 and enumeration of all EVs, including the smallest ones. This is mandatory for a better  
29 understanding of the diversity of EVs' functions, and also for the development of EV-based  
30 biomarker assays.  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60

**ADDENDUM**

N. Arraud supervised and performed the FCM studies; C. Gounou produced the Anx5 proteins and performed part of the FCM studies; R. Linares performed the EM experiments and synthesised the Anx5-conjugated gold nanoparticles; A. R. Brisson coordinated the entire project.

**ACKNOWLEDGMENTS**

We thank Mrs Guillonet and Drs. Le Provost, Chaléat and Tarascon (Laboratoire Mutualiste d'Analyse Médicales de Pessac) for their help with the collection of blood samples. This study was supported by ANR (grants EMPB-MP-NPAuA5-2007-021-01 and 11-BSV1-03501-PlacentA5 to AB).

**DISCLOSURE OF CONFLICT OF INTEREST**

The authors declare no conflict of interest.

**SUPPORTING INFORMATION**

Additional Supporting Information may be found in the online version of this article:

Supplementary Methods

Table S1. Comparison of the concentrations of Anx5-positive EVs detected by FS and FL triggering with either Anx5-Fluo or Anx5-Cy5 labeling

Fig. S1: Scheme of the procedure of sedimentation of EVs on EM grids

Fig. S2. Characterization of the FC 500 (A,B) and the Gallios (C,D) flow cytometers used in this study by means of size calibration fluorescent particles

1  
2  
3 Fig. S3. Effect of  $\text{Ca}^{2+}$  chelation, Triton X-100 and centrifugation on the detection of Anx5-  
4  
5 positive EVs by FL triggering  
6

7 Fig. S4. Influence of the  $\text{Ca}^{2+}$  concentration on the number of Anx5-EVs detected by FL  
8  
9 triggering  
10

11 Fig. S5. Binding of Anx5-F\* to 200 nm liposomes, by FL triggering

12 Fig. S6. Effect of PFP dilution on the mean fluorescence intensity of Anx5-positive EVs

13  
14 Fig. S7. Comparative analysis of a PFP sample with either a FC 500 or a Gallios flow  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60  
cytometers, by FS and FL triggering

Fig. S8. Determination of the limit of detection of the Gallios by FL triggering,  
using fluorescence calibration particles

## REFERENCES

- 1 György B, Szabó TG, Pásztói M, Pál Z, Misják P, Aradi B, László V, Pállinger É, Pap E, Kittel Á, Nagy G, Falus A, Buzás EI. Membrane vesicles, current state-of-the-art: emerging role of extracellular vesicles. *Cell Mol Life Sci* **2011**; 68: 2667–88.
- 2 Van der Pol E, Böing AN, Harrison P, Sturk A, Nieuwland R. Classification, Functions, and Clinical Relevance of Extracellular Vesicles. *Pharmacol Rev* **2012**; 64: 676–705.
- 3 Gould SJ, Raposo G. As we wait: coping with an imperfect nomenclature for extracellular vesicles. *J Extracell Vesicles* **2013**; 2: 20389.
- 4 Witwer KW, Buzás EI, Bemis LT, Bora A, Lässer C, Lötvall J, Nolte-’t Hoen EN, Piper MG, Sivaraman S, Skog J, Théry C, Wauben MH, Hochberg F. Standardization of sample collection, isolation and analysis methods in extracellular vesicle research. *J Extracell Vesicles* **2013**; 2: 20360.
- 5 Wolf P. The Nature and Significance of Platelet Products in Human Plasma. *Br J Haematol* **1967**; 13: 269–88.
- 6 Pan BT, Teng K, Wu C, Adam M, Johnstone RM. Electron microscopic evidence for externalization of the transferrin receptor in vesicular form in sheep reticulocytes. *J Cell Biol* **1985**; 101: 942–8.
- 7 Valadi H, Ekström K, Bossios A, Sjöstrand M, Lee JJ, Lötvall JO. Exosome-mediated transfer of mRNAs and microRNAs is a novel mechanism of genetic exchange between cells. *Nat Cell Biol* **2007**; 9: 654–9.
- 8 Burger D, Schock S, Thompson CS, Montezano AC, Hakim AM, Touyz RM. Microparticles: biomarkers and beyond. *Clinical Science* **2013**; 124: 423–41.
- 9 Horstman LL, Ahn YS. Platelet microparticles: a wide-angle perspective. *Crit Rev Oncol Hematol* **1999**; 30: 111–42.
- 10 VanWijk MJ, VanBavel E, Sturk A, Nieuwland R. Microparticles in cardiovascular diseases. *Cardiovasc Res* **2003**; 59: 277–87.
- 11 Morel O, Toti F, Hugel B, Bakouboula B, Camoin-Jau L, Dignat-George F, Freyssinet J-M. Procoagulant Microparticles Disrupting the Vascular Homeostasis Equation? *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **2006**; 26: 2594–604.
- 12 Wiedmer T, Hall SE, Ortel TL, Kane WH, Rosse WF, Sims PJ. Complement-induced vesiculation and exposure of membrane prothrombinase sites in platelets of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *Blood* **1993**; 82: 1192–6.
- 13 Manly DA, Wang J, Glover SL, Kasthuri R, Liebman HA, Key NS, Mackman N. Increased microparticle tissue factor activity in cancer patients with Venous Thromboembolism. *Thromb Res* **2010**; 125: 511–2.
- 14 Boilard E, Nigrovic PA, Larabee K, Watts GFM, Coblyn JS, Weinblatt ME, Massarotti EM, Remold-O’Donnell E, Farndale RW, Ware J, Lee DM. Platelets Amplify Inflammation in Arthritis via Collagen-Dependent Microparticle Production. *Science* **2010**; 327: 580–3.
- 15 Delabranche X, Boisramé-Helms J, Asfar P, Berger A, Mootien Y, Lavigne T, Grunebaum L, Lanza F, Gachet C, Freyssinet J-M, Toti F, Meziani F. Microparticles are new biomarkers of septic shock-induced disseminated intravascular coagulopathy. *Intensive Care Med* **2013**; 39: 1695–703.
- 16 Bevers EM, Comfurius P, Zwaal RFA. Changes in membrane phospholipid distribution during platelet activation. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes* **1983**; 736: 57–66.
- 17 Fadok VA, Voelker DR, Campbell PA, Cohen JJ, Bratton DL, Henson PM. Exposure of phosphatidylserine on the surface of apoptotic lymphocytes triggers specific recognition and removal by macrophages. *J Immunol* **1992**; 148: 2207–16.
- 18 Zwaal RFA, Schroit AJ. Pathophysiologic Implications of Membrane Phospholipid Asymmetry in Blood Cells. *Blood* **1997**; 89: 1121–32.

- 1  
2  
3 19 Biró E, Sturk-Maquelin KN, Vogel GMT, Meuleman DG, Smit MJ, Hack CE, Sturk A, Nieuwland  
4 R. Human cell-derived microparticles promote thrombus formation in vivo in a tissue factor-  
5 dependent manner. *J Thromb Haemost* **2003**; 1: 2561–8.
- 6 20 Aras O, Shet A, Bach RR, Hysjulien JL, Slungaard A, Hebbel RP, Escolar G, Jilma B, Key NS.  
7 Induction of microparticle- and cell-associated intravascular tissue factor in human  
8 endotoxemia. *Blood* **2004**; 103: 4545–53.
- 9 21 György B, Módos K, Pállinger É, Pálóczi K, Pásztói M, Misják P, Deli MA, Sipos Á, Szalai A,  
10 Voszka I, Polgár A, Tóth K, Csete M, Nagy G, Gay S, Falus A, Kittel Á, Buzás EI. Detection and  
11 isolation of cell-derived microparticles are compromised by protein complexes resulting from  
12 shared biophysical parameters. *Blood* **2011**; 117: e39–e48.
- 13 22 Morel O, Jesel L, Freyssinet J-M, Toti F. Cellular Mechanisms Underlying the Formation of  
14 Circulating Microparticles. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **2011**; 31: 15–26.
- 15 23 Lacroix R, Judicone C, Poncelet P, Robert S, Arnaud L, Sampol J, Dignat-George F. Impact of  
16 pre-analytical parameters on the measurement of circulating microparticles: towards  
17 standardization of protocol. *J Thromb Haemost* **2012**; 10: 437–46.
- 18 24 Owens AP 3rd, Mackman N. Microparticles in hemostasis and thrombosis. *Circ Res* **2011**; 108:  
19 1284–97.
- 20 25 Rubin O, Crettaz D, Canellini G, Tissot J-D, Lion N. Microparticles in stored red blood cells: an  
21 approach using flow cytometry and proteomic tools. *Vox Sanguinis* **2008**; 95: 288–97.
- 22 26 Zwaal RFA, Comfurius P, Bevers EM. Scott syndrome, a bleeding disorder caused by defective  
23 scrambling of membrane phospholipids. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and*  
24 *Cell Biology of Lipids* **2004**; 1636: 119–28.
- 25 27 Castaman G, Yu-Feng L, Battistin E, Rodeghiero F. Characterization of a novel bleeding  
26 disorder with isolated prolonged bleeding time and deficiency of platelet microvesicle  
27 generation. *British Journal of Haematology* **1997**; 96: 458–63.
- 28 28 Arraud N, Linares R, Tan S, Gounou C, Pasquet J-M, Mornet S, Brisson AR. Extracellular  
29 vesicles from blood plasma: Determination of their morphology, size, phenotype and  
30 concentration. *Journal of Thrombosis and Haemostasis* **2014**; 12: 614–27.
- 31 29 Jy W, Horstman LL, Jimenez JJ, Ahn Y s. Measuring circulating cell-derived microparticles. *J*  
32 *Thromb Haemost* **2004**; 2: 1842–3.
- 33 30 Ayers L, Kohler M, Harrison P, Sargent I, Dragovic R, Schaap M, Nieuwland R, Brooks SA, Ferry  
34 B. Measurement of circulating cell-derived microparticles by flow cytometry: Sources of  
35 variability within the assay. *Thromb Res* **2011**; 127: 370–7.
- 36 31 Horstman LL, Jy W, Minagar A, Bidot CJ, Jimenez JJ, Alexander JS, Ahn YS. Cell-Derived  
37 Microparticles and Exosomes in Neuroinflammatory Disorders. **2007**.
- 38 32 Chironi GN, Boulanger CM, Simon A, Dignat-George F, Freyssinet J-M, Tedgui A. Endothelial  
39 microparticles in diseases. *Cell Tissue Res* **2009**; 335: 143–51.
- 40 33 Van der Pol E, Hoekstra AG, Sturk A, Otto C, van Leeuwen TG, Nieuwland R. Optical and non-  
41 optical methods for detection and characterization of microparticles and exosomes. *J*  
42 *Thromb Haemost* **2010**; 8: 2596–607.
- 43 34 Chandler WL, Yeung W, Tait JF. A new microparticle size calibration standard for use in  
44 measuring smaller microparticles using a new flow cytometer. *J Thromb Haemost* **2011**; 9:  
45 1216–24.
- 46 35 Van der Pol E, van Gemert MJC, Sturk A, Nieuwland R, Van Leeuwen TG. Single vs. swarm  
47 detection of microparticles and exosomes by flow cytometry. *J Thromb Haemost* **2012**; 10:  
48 919–30.
- 49 36 Van der Pol E, Coumans F, Varga Z, Krumrey M, Nieuwland R. Innovation in detection of  
50 microparticles and exosomes. *J Thromb Haemost* **2013**; 11: 36–45.
- 51 37 Hercher M, Mueller W, Shapiro HM. Detection and discrimination of individual viruses by  
52 flow cytometry. *J Histochem Cytochem* **1979**; 27: 350–2.
- 53 38 Steen HB. Flow cytometer for measurement of the light scattering of viral and other  
54 submicroscopic particles. *Cytometry* **2004**; 57A: 94–9.
- 55  
56  
57  
58  
59  
60

- 1  
2  
3 39 Marie D, Brussaard CPD, Thyraug R, Bratbak G, Vaultot D. Enumeration of Marine Viruses in  
4 Culture and Natural Samples by Flow Cytometry. *Appl Environ Microbiol* **1999**; 65: 45–52.  
5 40 Brussaard CPD, Marie D, Bratbak G. Flow cytometric detection of viruses. *Journal of*  
6 *Virological Methods* **2000**; 85: 175–82.  
7 41 Bevers EM, Wiedmer T, Comfurius P, Shattil SJ, Weiss HJ, Zwaal RFA, Sims PJ. Defective Ca<sup>2+</sup>-  
8 induced microvesiculation and deficient expression of procoagulant activity in erythrocytes  
9 from a patient with a bleeding disorder: A study of the red blood cells of Scott syndrome.  
10 *Blood* **1992**; 79: 380–8.  
11 42 Van der Vlist EJ, Nolte-'t Hoen ENM, Stoorvogel W, Arkesteijn GJA, Wauben MHM.  
12 Fluorescent labeling of nano-sized vesicles released by cells and subsequent quantitative and  
13 qualitative analysis by high-resolution flow cytometry. *Nat Protocols* **2012**; 7: 1311–26.  
14 43 Cantero M, Conejo J., Parra T, Jiménez A, Carballo F, de Arriba G. Interference of  
15 Chylomicrons in Analysis of Platelets by Flow Cytometry. *Thromb Res* **1998**; 91: 49–52.  
16 44 Bouter A, Gounou C, Bérat R, Tan S, Gallois B, Granier T, d' Estaintot BL, Pöschl E, Brachvogel  
17 B, Brisson AR. Annexin-A5 assembled into two-dimensional arrays promotes cell membrane  
18 repair. *Nat Commun* **2011**; 2: 270.  
19 45 Brisson A, Mornet S. Functionalization of Gold Nanoparticles with Oriented Proteins.  
20 Application to the High-Density Labelling of Cell Membranes Patent WO/2007/122259. **2007**.  
21 46 Andree HA, Reutelingsperger CP, Hauptmann R, Hemker HC, Hermens WT, Willems GM.  
22 Binding of vascular anticoagulant alpha (VAC  $\alpha$ ) to planar phospholipid bilayers. *J Biol Chem*  
23 **1990**; 265: 4923–8.  
24 47 Tait JF, Gibson DF, Smith C. Measurement of the affinity and cooperativity of annexin V–  
25 membrane binding under conditions of low membrane occupancy. *Analytical Biochemistry*  
26 **2004**; 329: 112–9.  
27 48 Richter RP, Lai Kee Him J, Tessier B, Tessier C, Brisson AR. On the Kinetics of Adsorption and  
28 Two-Dimensional Self-Assembly of Annexin A5 on Supported Lipid Bilayers. *Biophysical*  
29 *Journal* **2005**; 89: 3372–85.  
30 49 Nolan JP, Stoner SA. A trigger channel threshold artifact in nanoparticle analysis. *Cytometry*  
31 *Part A* **2013**; 83A: 301–5.  
32 50 Robert S, Lacroix R, Poncelet P, Harhoury K, Bouriche T, Judicone C, Wischhusen J, Arnaud L,  
33 Dignat-George F. High-Sensitivity Flow Cytometry Provides Access to Standardized  
34 Measurement of Small-Size Microparticles—Brief Report. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **2012**;  
35 32: 1054–8.  
36 51 Stoner S, Nolan J. Flow Cytometric Analysis of Single Lipid Membrane Vesicles. *CYTO 2013*  
37 San Diego; **2013**; Abstract n°85.  
38 52 Pigault C, Follenius-Wund A, Schmutz M, Freyssinet J-M, Brisson A. Formation of two-  
39 dimensional arrays of annexin V on phosphatidylserine-containing liposomes. *Journal of*  
40 *Molecular Biology* **1994**; 236: 199–208.  
41 53 Reviakine I, Bergsma-Schutter W, Mazères-Dubut C, Govorukhina N, Brisson A. Surface  
42 Topography of the p3 and p6 Annexin V Crystal Forms Determined by Atomic Force  
43 Microscopy. *Journal of Structural Biology* **2000**; 131: 234–9.  
44 54 Oling F, Bergsma-Schutter W, Brisson A. Trimers, Dimers of Trimers, and Trimers of Trimers  
45 Are Common Building Blocks of Annexin A5 Two-Dimensional Crystals. *Journal of Structural*  
46 *Biology* **2001**; 133: 55–63.  
47 55 Hjuler Nielsen M, Beck-Nielsen H, Nørgaard Andersen M, Handberg A. A flow cytometric  
48 method for characterization of circulating cell-derived microparticles in plasma. *Journal of*  
49 *Extracellular Vesicles* **2014**; 3: 20795–807.  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60

**FIGURE LEGENDS****Figure 1. Detection of Anx5-positive EVs by FS triggering (A,B) and FL triggering (C,D)**

FCM analysis of a PFP sample by FS triggering (A,B) and FL triggering (C,D), in the absence of  $\text{Ca}^{2+}$  (A, C) and in the presence of  $\text{Ca}^{2+}$  (B, D).

(A-D), Each of the four panels presents on the left a FS vs. SS color dot plot and on the right a FL1 vs. SS color dot plot. Thresholds are represented by a solid blue line, while fluorescence positivity gates are represented by a dashed blue line.

The positions of 500-nm and 1- $\mu\text{m}$  polystyrene particles are indicated in each FS vs. SS plot (Fig. S2).

(A,B), FS triggering analysis. The acquisition time was 10 min. Events labeled with Anx5-Fluo are separated in two groups: events of high fluorescence intensity forming a well-defined cluster are colored blue, and all the other Anx5-positive events are colored red.

(C,D), FL triggering analysis. The acquisition time was 1 min, which explains that the cluster of erythrocyte ghosts (colored blue) contains less events than in (B).

**Figure 2. Influence of Anx5-F\* concentration on the concentrations of Anx5-positive EVs detected by FS and FL triggering**

Curves representing the concentrations of Anx5-positive EVs (expressed per  $\mu\text{L}$  of pure PFP) detected by FS (blue curves) and FL triggering (red curves) at various Anx5-F\* concentrations, for two PFP samples (represented by squares and circles, respectively). The concentrations of Anx5-F\* range from 0 to 2.8 nM.

Each point represents the mean  $\pm$  S.D of two independent aliquots measured in duplicate.

**Figure 3. Influence of PFP dilution on the detection of Anx5-positive EVs**

Curves representing the concentrations of Anx5-positive EVs in diluted PFP samples detected either by FS (blue curves) or FL triggering (red curves) vs. the reciprocal dilution factor, for two PFP samples (represented by squares and circles, respectively).

Solid lines represent the calculated linear regression lines.  $R^2$  values higher than 0.96 were obtained for all regression lines.

By extrapolating the regression lines to pure PFP (dilution factor 1 x), Anx5-positive EVs concentrations of 35,666 (squares) and 50,239 (circles) are obtained.

Each point represents the mean  $\pm$  S.D of two independent aliquots measured in duplicate.

**Figure 4. Determination of the number of Anx5-F\* molecules needed to detect individual EVs by FL triggering**

(A-C), FS triggering analysis of a mixture of Quantum™ FITC-5 MESF particles made of 6 particle populations containing respectively 0; 1,484; 9,828; 47,640; 188,438 and 756,101 MESF.

(A), The 7.7- $\mu$ m fluorescent particles form a homogeneous cluster, located in the upper right corner of the FS vs. SS color dot plot.

(B), Histogram of fluorescence intensities, showing 4 resolved peaks (A,B,C,D) corresponding to particles containing 9,828 fluorophores and above, while the 1,484 MESF particles form a peak (E) overlapping with the blank particles (F), which present some auto-fluorescence.

(C), Calibration curve correlating the MESF-FITC of the particles to their mean fluorescence intensity, taken from (B).

(D), Enlarged view from the low-fluorescence values of the calibration curve (C). The minimal fluorescence intensity of 2 arbitrary units which measured by FL triggering is indicated (horizontal arrow), together with its corresponding MESF value, namely 2,500 MESF (vertical arrow).

(E), FL1 triggering analysis of the Quantum™ FITC-5 MESF particles. Four peaks (A,B,C,D) corresponding to particles containing 9,828 MESF and above are detected, while the population of 1,484 MESF particles is not detected. The threshold is represented by a solid blue line.

**Figure 5: Gallery of Anx5-positive EVs observed by EM**

(A-E), Representative images of Anx5-positive EVs observed on EM grids after sedimentation. Most EVs present a near-circular shape. Very rare gold-NPs are present in the background, illustrating the high specificity of Anx5-gold-NP labeling. Some EVs devoid of Anx5-gold-NPs are also visible (arrows).

The size of the Anx5-positive EVs is indicated on the images (in nm). Considering that a spherical EV, of radius R and area  $4\pi R^2$ , transforms upon sedimentation into a flattened

1  
2  
3 circular pancake, of radius  $R'$  and area  $2\pi R'^2$ , the radius of the flattened pancake is related to  
4  
5 the radius of the original sphere by the relationship  $R = R'\sqrt{2}$ . The size indicated in the  
6  
7 images for the circular EVs is the diameter of the equivalent spheres.  
8  
9

10 Scale bars: (A-D), 200 nm; (E), 2  $\mu$ m.

11  
12  
13 (F), Size histogram of Anx5-positive EVs. About 80% Anx5-positive EVs are comprised  
14  
15 between 100 and 400 nm. Histogram determined over 500 images of EVs recorded on three  
16  
17 EM grids. Error bars correspond to S.D between the three individual data sets [28].  
18  
19  
20  
21

### 22 **Figure 6: Phenotyping of Anx5-positive EVs detected by FL triggering**

23  
24 A PFP sample was double labeled with Anx5-Cy5 and either anti-mouse-IgG-PE (A), anti-  
25  
26 CD41-mAb-PE (B) or anti-CD235a-mAb-PE (C). FL6 fluorescence was used as a trigger,  
27  
28 which means that all the detected events are Anx5-positive EVs. Anti-mouse-IgG-PE was  
29  
30 used as an isotypic antibody to create a PE positivity gate on the FL6 vs. FL2 color dot plots.  
31  
32 Events positive for only Anx5 are colored blue, while events positive for both Anx5 and a PE-  
33  
34 conjugated mAb are colored red. On the bottom row, events labeled with Anx5 and/or a PE-  
35  
36 conjugated antibody are backgated and displayed on FS vs. SS color dot plots.  
37  
38  
39  
40

41 (C, top row): A small population of erythrocyte ghosts (EG) is observed on the top right  
42  
43 corner (colored green). EG are characterized by their high intensity for both Anx5 and anti-  
44  
45 CD235a labeling.  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60

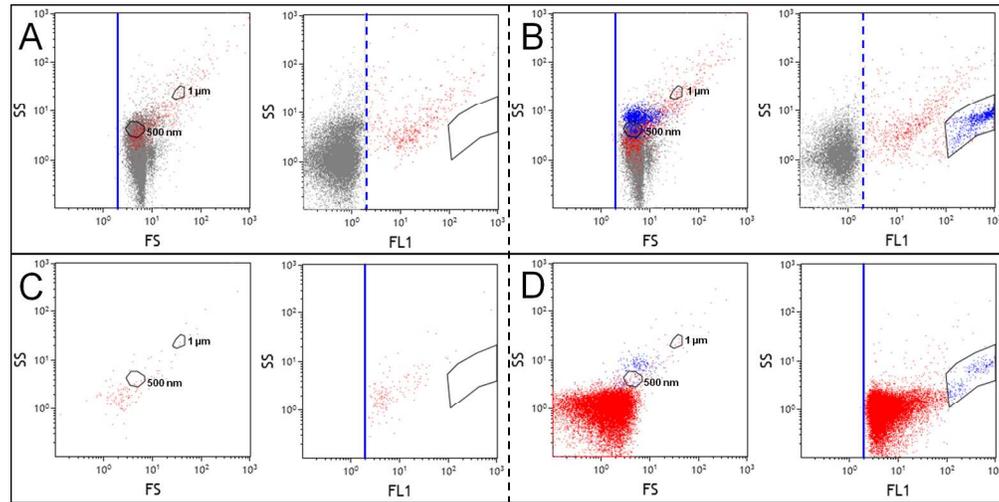


Figure 1  
172x86mm (300 x 300 DPI)

Peer Review

1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60

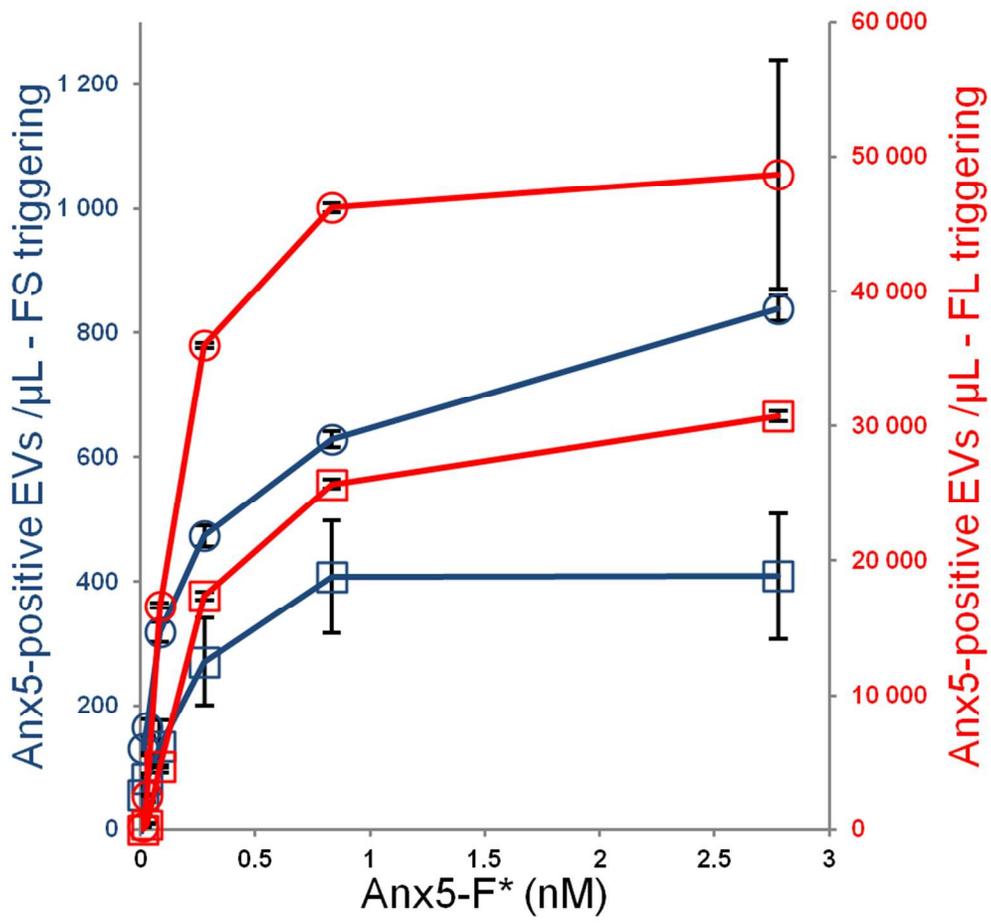


Figure 2  
83x79mm (300 x 300 DPI)



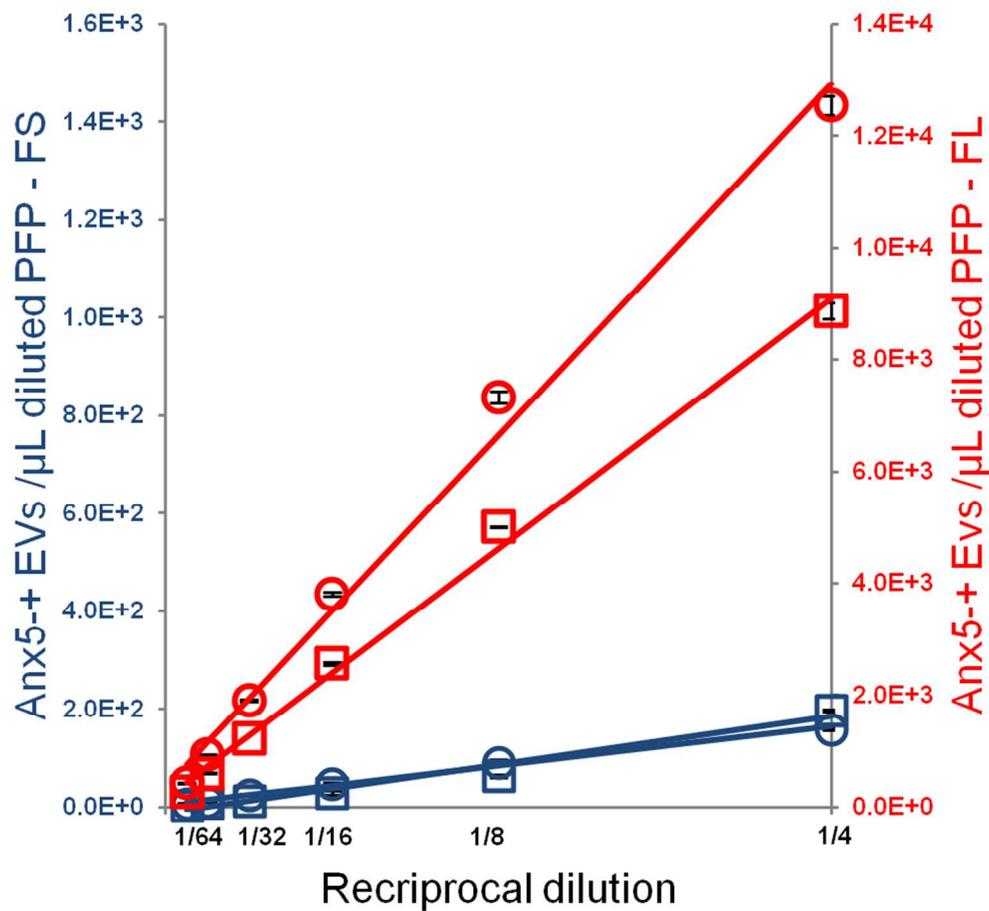


Figure 3  
83x79mm (300 x 300 DPI)

1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60

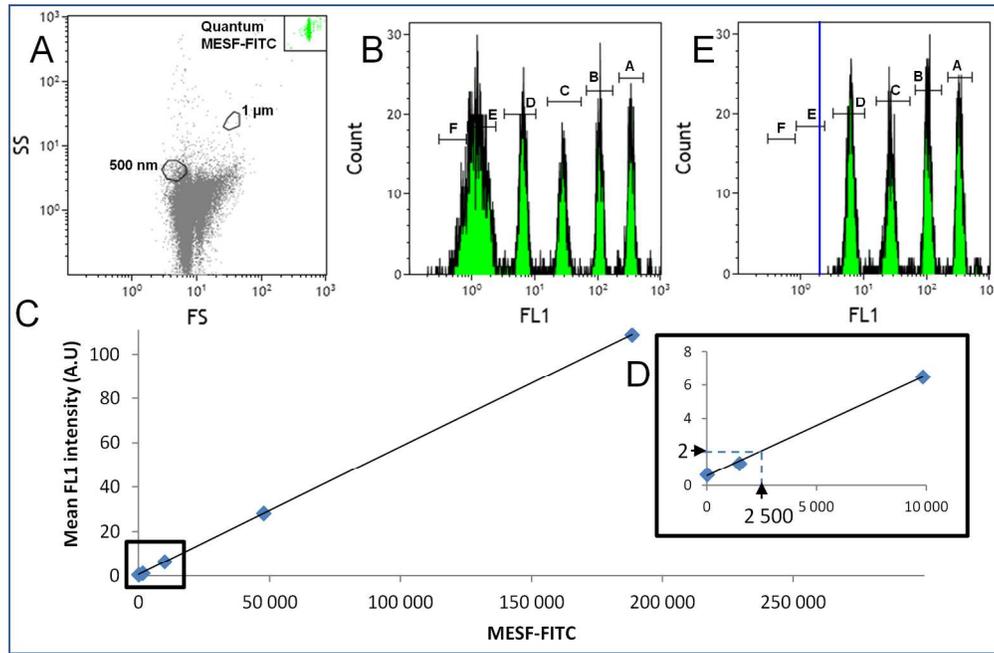


Figure 4  
172x112mm (300 x 300 DPI)

Review

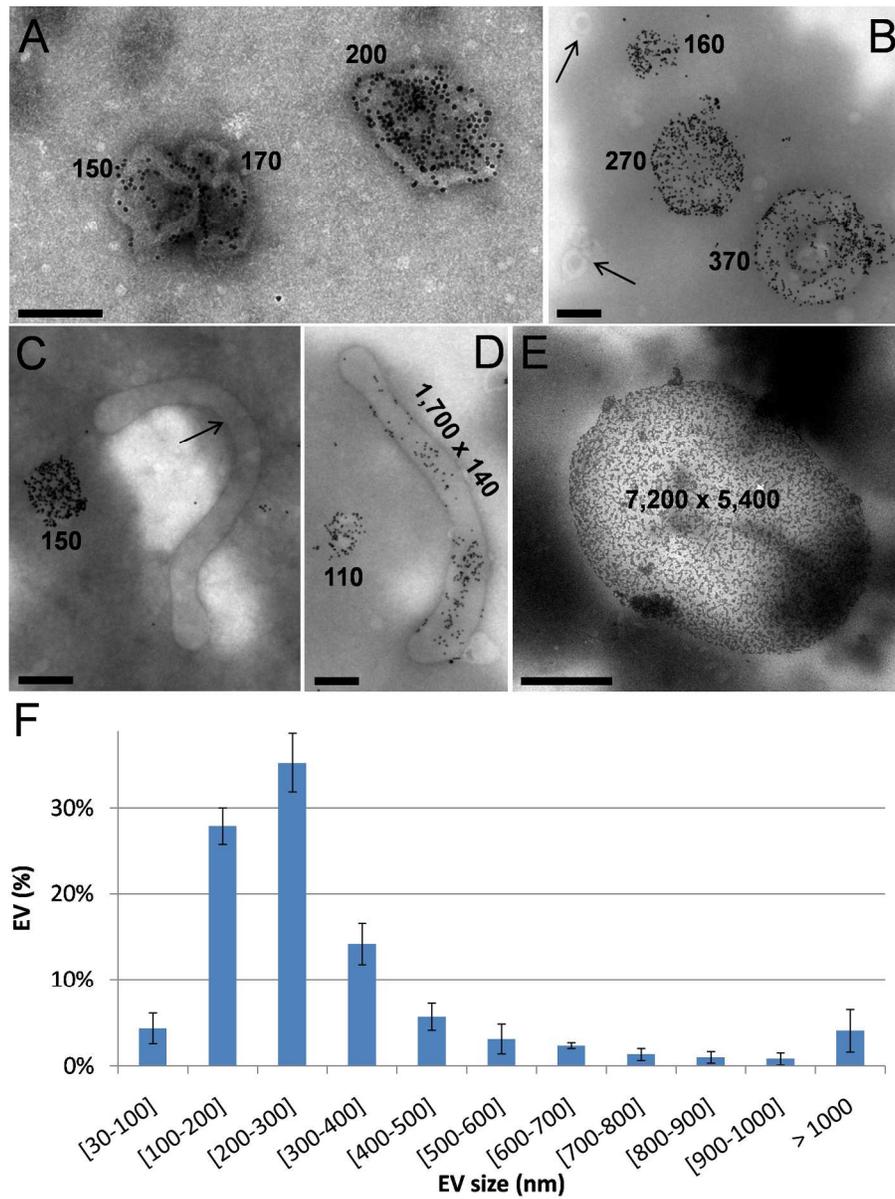
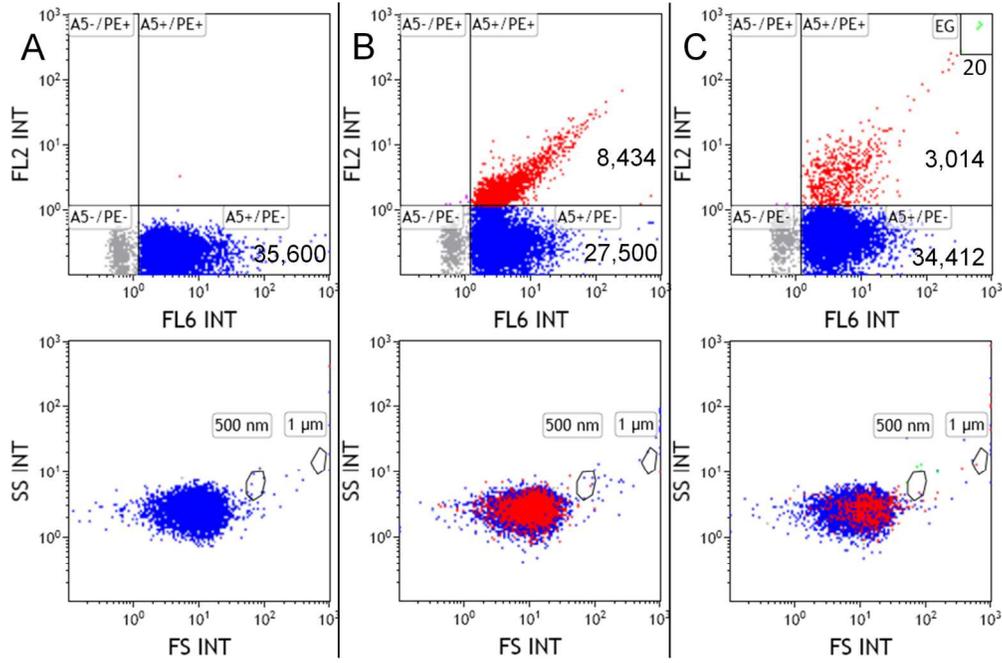


Figure 5  
172x230mm (300 x 300 DPI)

1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60



172x113mm (300 x 300 DPI)

Review

SHORT COMMUNICATION

## High-speed centrifugation induces aggregation of extracellular vesicles

Romain Linares<sup>1</sup>, Sisareuth Tan<sup>1</sup>, Céline Gounou<sup>1</sup>, Nicolas Arraud<sup>1</sup> and Alain R. Brisson<sup>1,2\*</sup>

<sup>1</sup>Molecular Imaging and NanoBioTechnology, University of Bordeaux, Pessac, France; <sup>2</sup>Institut Universitaire de France, Paris, France

Plasma and other body fluids contain cell-derived extracellular vesicles (EVs), which participate in physiological processes and have potential biomedical applications. In order to isolate, concentrate and purify EVs, high-speed centrifugation is often used. We show here, using electron microscopy, receptor-specific gold labelling and flow cytometry, that high-speed centrifugation induces the formation of EV aggregates composed of a mixture of EVs of various phenotypes and morphologies. The presence of aggregates made of EVs of different phenotypes may lead to erroneous interpretation concerning the existence of EVs harbouring surface antigens from different cell origins.

**Keywords:** *extracellular vesicles; blood plasma; cryo-electron microscopy; immuno-gold electron microscopy; flow cytometry; vesicle aggregation; centrifugation*

Responsible Editor: Edit Buzás, Semmelweis University, Hungary.

\*Correspondence to: Alain R. Brisson, UMR-5248-CBMN, Bat. B14, Allée Geoffroy Saint-Hilaire, FR-33600 Pessac, France, Email: a.brisson@cbmn.u-bordeaux.fr

To access the supplementary material to this article, please see [Supplementary files](#) under 'Article Tools'.

Received: 28 August 2015; Revised: 2 November 2015; Accepted: 7 December 2015; Published: 23 December 2015

**B**lood and other body fluids contain membrane vesicles that are released by cells upon activation or apoptosis (1–3). According to current hypotheses, cell-derived vesicles either form by blebbing and shedding of plasma membrane pieces or they are secreted by cells after fusion of multivesicular endosomes with the plasma membrane. Here, the term *extracellular vesicle* (EV) will refer to all types of vesicles present in blood plasma (4,5). EVs are objects of low abundance suspended in biological fluids that are highly enriched in proteins and other components; thus purification and concentration are often required for EV analysis. Centrifugation is the most popular method of EV isolation, as indicated by its use in a large number of studies (6–20). Centrifugation enables not only separation of EVs from proteins and most other soluble components, but also concentration of EVs or elimination of unbound probes in labelling studies. However, several studies have reported that centrifugation may cause aggregation or morphological changes of EVs (11,21,22), which could cause artefacts and lead to erroneous conclusions about EV composition or phenotype.

In order to further address this question, we decided to use cryo-electron microscopy (EM) combined with immuno-gold labelling. Using this approach, we were recently able to reveal in detail the diversity of EVs in pure plasma, showing in particular that EVs from the plasma of healthy subjects are isolated, with a total absence of aggregates (23). In addition, we used flow cytometry (FCM), which is the main method of EV characterization (24–26), to compare plasma samples before and after high-speed centrifugation.

### Materials and methods

#### Reagents

Anti-CD235a (glycophorin-A) and CD41 ( $\alpha_{IIb}\beta_3$  chain of  $\alpha_{IIb}\beta_3$  integrin) monoclonal antibodies (mAb) either unlabelled or conjugated to PE were from Beckman Coulter (Villepinte, France). Phe-Pro-Arg chloromethyl ketone (PPACK) was from Haematologic Technologies (Cryo pep, Montpellier, France). SPHERO Ultra Rainbow beads (1  $\mu$ m) were from Spherotech (Interchim, Montluçon, France). F-XC100 (1  $\mu$ m) and F-XC040 (400 nm) were from ESTAPOR (Merck Chimie SAS, Fontenay-sous-Bois, France).

### Preparation of plasma samples

Blood was collected after written informed consent from 4 healthy donors who had fasted for at least 12 h. Blood was drawn in 4.5 mL BD Vacutainer® tubes containing 0.5 mL of 129 mM sodium citrate (BD, Le Pont de Claix, France). The preparation of platelet-free plasma (PFP) was started within less than 1 h after blood collection and consisted of 2 consecutive cycles of centrifugation at 2,500 g for 15 min (27).

### High-speed centrifugation of PFP samples

Fresh PFP (1.5 mL) was mixed with 3 mL HEPES-buffered saline (HBS) containing 10 mM HEPES pH 7.4, 150 mM NaCl and 2 mM NaN<sub>3</sub> as a preservative. The mixture was centrifuged at 100,000 g for 1 h at 20°C with a low brake in a Beckman Coulter Optima Max-E ultracentrifuge using a MLS 50 rotor and polyallomer tubes. After centrifugation, 3.8 mL of supernatant were discarded and the pellet, which is not visible, was homogenized at least 10 times by gentle pipetting with a 200- $\mu$ L pipette. The volume of the pelleted suspension was then adjusted to 1.5 mL with HBS containing 0.1% BSA and 10  $\mu$ M PPACK as anticoagulant (28) (HBS-BSA). This resuspended pellet is referred to hereafter as *100k-PFP*.

### Sample preparation and observation for cryo-EM experiments

Annexin-A5 conjugated to 4-nm gold nanoparticles (Anx5-gold-NPs) and anti-CD235a or anti-CD41 mAbs conjugated to 10-nm gold-NPs (anti-CD41-, anti-CD235a-gold-NPs) were produced as previously described (23).

Samples were labelled as follows. Either PFP or 100k-PFP (6  $\mu$ L) was mixed with 1  $\mu$ L anti-CD235a- or anti-CD41-gold-NPs at  $1-3 \times 10^{16}$  NP/L and incubated for 30 min at ambient temperature. Next, 1  $\mu$ L 100  $\mu$ M PPACK, 1  $\mu$ L Anx5-gold-NPs at  $1-3 \times 10^{16}$  NP/L and 1  $\mu$ L 100 mM CaCl<sub>2</sub> were added, then samples were further incubated for 15 min and processed for cryo-EM.

A 4- $\mu$ L sample aliquot was deposited onto an EM grid coated with a perforated carbon film (Ted Pella, Eloïse SAS, Roissy-en-France, France), the excess liquid was blotted off with a filter paper and the grid was then quickly plunged into liquid ethane using a Leica EM-CPC cryo-chamber (Leica Microsystems SAS, Nanterre, France). EM grids were stored in cryo-boxes under liquid nitrogen until use, then mounted in a Gatan 626 cryo-holder (Gatan, Warrandale, PA, USA) and transferred to a Tecnai F20 microscope operated at 200 kV (FEI Company, Eindhoven, Netherlands). Images were recorded with an USC1000-SSCCD Gatan camera.

### Preparation and observation of samples sedimented onto EM grids

PFP and 100k-PFP were labelled using 10-nm Anx5-gold-NPs as follows: 100  $\mu$ L PFP or 100k-PFP were mixed with 1  $\mu$ L 1 mM PPACK, 1  $\mu$ L Anx5-gold-NPs at

$1-3 \times 10^{16}$  NP/L, supplemented with 10 mM CaCl<sub>2</sub> for PFP or 2 mM CaCl<sub>2</sub> for 100k-PFP and incubated for 30 min at ambient temperature.

Samples were then diluted 30 times with a buffer containing 100 mM sodium cacodylate (2 mM CaCl<sub>2</sub>, pH 7.4) and deposited into polyallomer centrifuge tubes containing 4 EM grids coated with a continuous carbon film (Electron Microscopy Sciences, LFG-Distribution, Lyon, France), fixed on a resin support (23). Samples were centrifuged at  $100,000 \times g$  for 1 h at 20°C as described above, after which the liquid above the EM grids was carefully removed, and the EM grids were recovered and air-dried.

Grids were observed with an FEI CM120 microscope operated at 120 kV. Images were recorded with a USC1000-SSCCD Gatan camera.

This method, referred to as the *on-grid sedimentation method*, was previously described (see Supplementary Fig. 1 in (23)).

### Flow cytometry

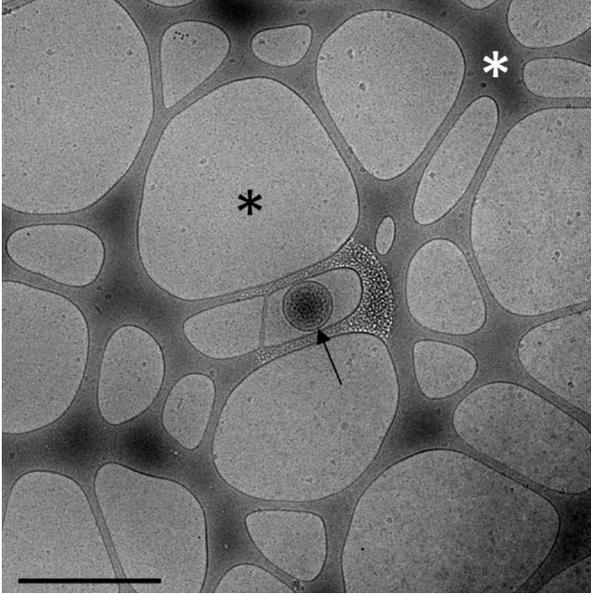
Samples were labelled as follows: 50  $\mu$ L PFP or 100k-PFP were mixed with either 10  $\mu$ L pure anti-CD41-mAb-PE or 20  $\mu$ L anti-CD235a-mAb-PE diluted  $10 \times$  with HBS-BSA; then samples were incubated for 2 h in the dark prior to dilution to 500  $\mu$ L with HBS-BSA. Next, 20 ng/mL Anx5-Cy5 and 10 mM CaCl<sub>2</sub> were added and samples were incubated for an additional 1 h prior to analysis. Before FCM analysis, 1  $\mu$ m Ultra Rainbow beads were added to each tube at  $5 \times 10^4$ /mL to measure the acquired volume.

FCM was performed with a Gallios flow cytometer (Beckman Coulter) and data were analysed using Kaluza 1.2. The detection of EVs was triggered on the forward scatter (FS) parameter, and only EVs labelled with either Anx5-Cy5 (FL6) or mAb-PE (FL2) were taken into consideration. FS detection sensitivity was tested daily using a mixture of 1  $\mu$ m and 400 nm FL1 fluorescent beads, ensuring an FS detection efficiency of  $98 \pm 2\%$  of the 400 nm beads. Each tube was measured twice and EV concentrations, expressed as mean  $\pm$  SD, were calculated by taking into account the number of 1  $\mu$ m Ultra Rainbow beads acquired and the sample dilution.

## Results

### 1) EM analysis of PFP samples after high-speed centrifugation

Cryo-EM analysis shows that pure, unprocessed PFP samples consist of isolated EVs (Fig. 1). On the other hand 100k-PFP samples show EV aggregates (Fig. 2), together with isolated EVs. Figure 2 shows 3 representative examples of EV aggregates, in order to appreciate the variety of structures induced by high-speed sedimentation. Figure 2a presents an EV aggregate from a 100k-PFP sample labelled by both 4-nm Anx5-gold-NPs and 10-nm anti-CD41-gold-NPs. In this aggregate, several EVs are



**Fig. 1.** Cryo-electron microscopy image of a pure, unprocessed PFP sample. A single EV is observed (arrow), self-supported in a nanodroplet of frozen PFP (black asterisk), suspended on a perforated carbon net (white asterisk). Scale bar: 1  $\mu\text{m}$ .

labelled with anti-CD41-gold-NPs, thus are of platelet origin and are associated with unlabelled EVs. As previously described (23), EVs present various morphologies, principally spherical and tubular. In addition, some non-vesicular, amorphous material is present near the centre of the aggregate (white asterisk). Such material is frequently associated with EV aggregates and is likely to correspond to protein aggregate of unknown nature forming a glue linking EVs together. Figure 2b and c presents an EV aggregate from a 100k-PFP sample labelled by both 4-nm Anx5-gold-NPs and 10-nm anti-CD235a-gold-NPs. The aggregate gathers more than 20 EVs of various morphologies, together with some amorphous material (white asterisk in C). Two EVs are specifically labelled with 10-nm anti-CD235a-gold-NPs; they are thus of erythrocyte origin, although they are entirely devoid of 4-nm Anx5-gold-NPs. In this EV aggregate, only 1 EV is labelled with Anx5-gold-NPs. In Fig. 2d and e, the EV aggregate presents, on the left, a single EV double labelled with anti-CD41-gold-NPs and Anx5-gold-NPs. In addition to this platelet-derived EV, the aggregate contains several spherical EVs labelled with Anx5-gold-NPs but not with anti-CD41-gold-NPs, as well as a large number of unlabelled EVs.

These examples illustrate the fact that EV aggregates are highly heterogeneous, containing a variable number of EVs of various phenotypes and morphologies. By cryo-EM, EV aggregates have an overall size ranging from about 500 nm to several micrometres, whereas isolated EVs range mostly from 50 to 500 nm in diameter, as previously described (23).

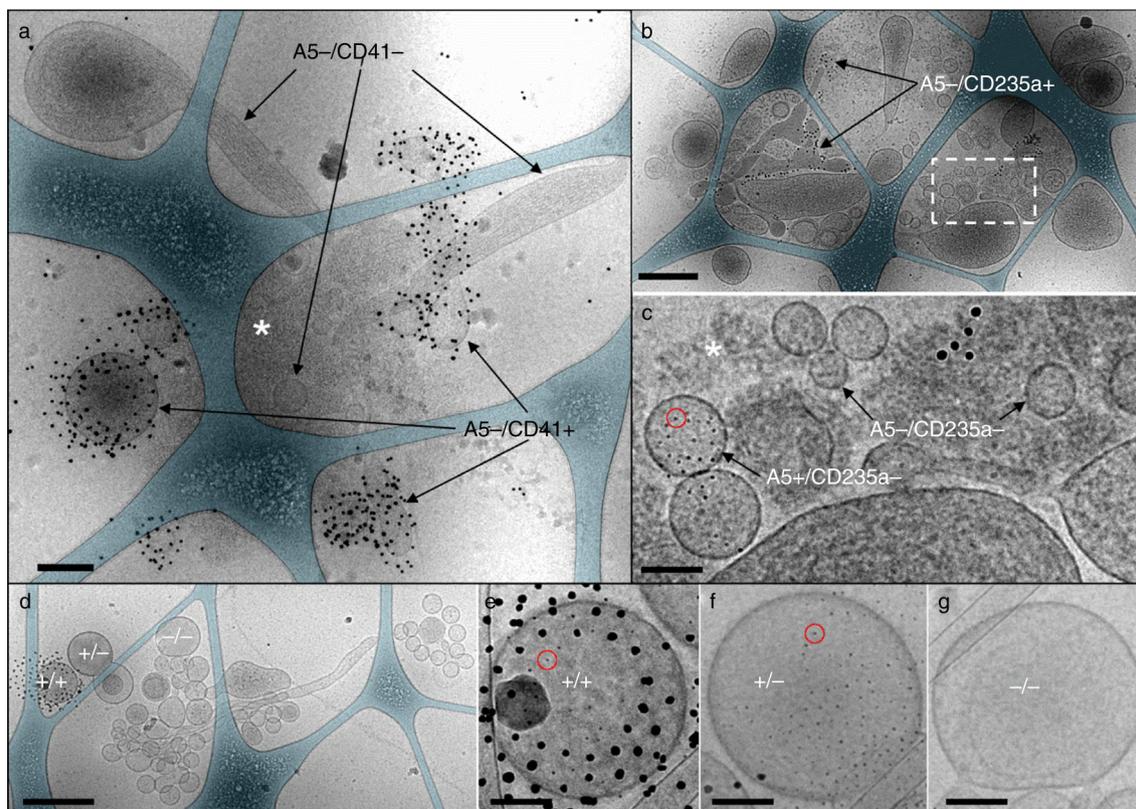
It must be stressed that we did not observe EV aggregates in non-centrifuged PFPs from healthy donors, over more than 100 PFP samples analysed by cryo-EM. This is easily explained by the low concentration of EVs present in normal PFP. Indeed, for a concentration of about 100,000 EVs/ $\mu\text{L}$  (29), each EV occupies a cube of about 50  $\mu\text{m}$  edge length. Therefore, the probability of EV collision within a PFP suspension or during the draining process on an EM grid is extremely low. The formation of EV aggregates must therefore result from the fact that, upon high-speed centrifugation, all the EVs contained in a centrifuge tube are concentrated in a small volume, promoting their interaction.

What are the relative amounts of EV aggregates and isolated EVs in 100k-PFPs? This question cannot be addressed by cryo-EM, because an artefact referred to as *fish-net artefact* occurs during the preparation of cryo-EM specimens (23). Indeed, while draining a small droplet of PFP through the perforated carbon net covering cryo-EM grids, the largest objects have a high probability of being retained by the net while isolated EVs, which are smaller, pass freely through the net, as previously reported (see Supplementary Fig. 5 in (23)). Due to this artefact, the proportion of large objects, thus the EV aggregates here, is overestimated. Therefore, in order to determine the relative amounts of isolated EVs and EV aggregates in 100k-PFP samples we used another EM approach, called *on-grid sedimentation*, which has already been applied successfully to the enumeration of EVs in unprocessed PFP samples (29,30). Figure 3 shows representative images of a PFP (A) and a 100k-PFP (B,C) sedimented onto an EM grid after labelling with Anx5-gold-NPs. With the PFP sample isolated EVs are observed, homogeneously distributed, with no EV aggregates (Fig. 3a). In contrast, the 100k-PFP shows isolated EVs (arrows) together with an EV aggregate (Fig. 3b and c). Two independent experiments were performed, in which we measured the numbers of isolated EVs and EV aggregates before and after high-speed sedimentation. We found that, after high-speed sedimentation, the concentration of isolated EVs decreased from  $29,500 \pm 500$  to  $11,500 \pm 500$  (expressed per microlitre pure PFP), whereas  $3,000 \pm 1,000$  EV aggregates were found in 100k-PFP. These values must be taken as only indicative, because several parameters, principally the conditions used for resuspending the pellets, are likely to affect the aggregate size and concentration.

Similar results of EV aggregation were obtained when PFP centrifugation was performed at  $20,000 \times g$  (data not shown). In addition, similar results of EV aggregation were observed when pellets were resuspended in PFP depleted of EVs instead of HBS-BSA (data not shown).

## 2) FCM analysis of 100k-PFP samples

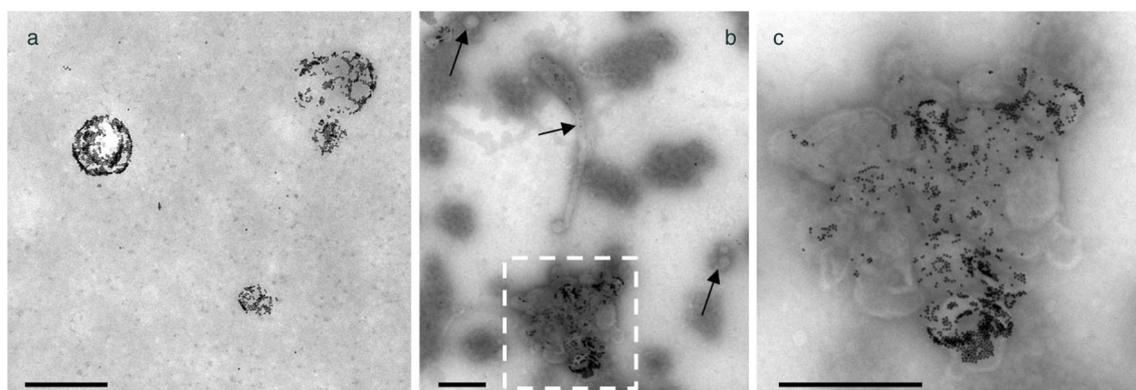
As FCM is the most common method used for characterizing EVs, we investigated the impact of EV aggregation



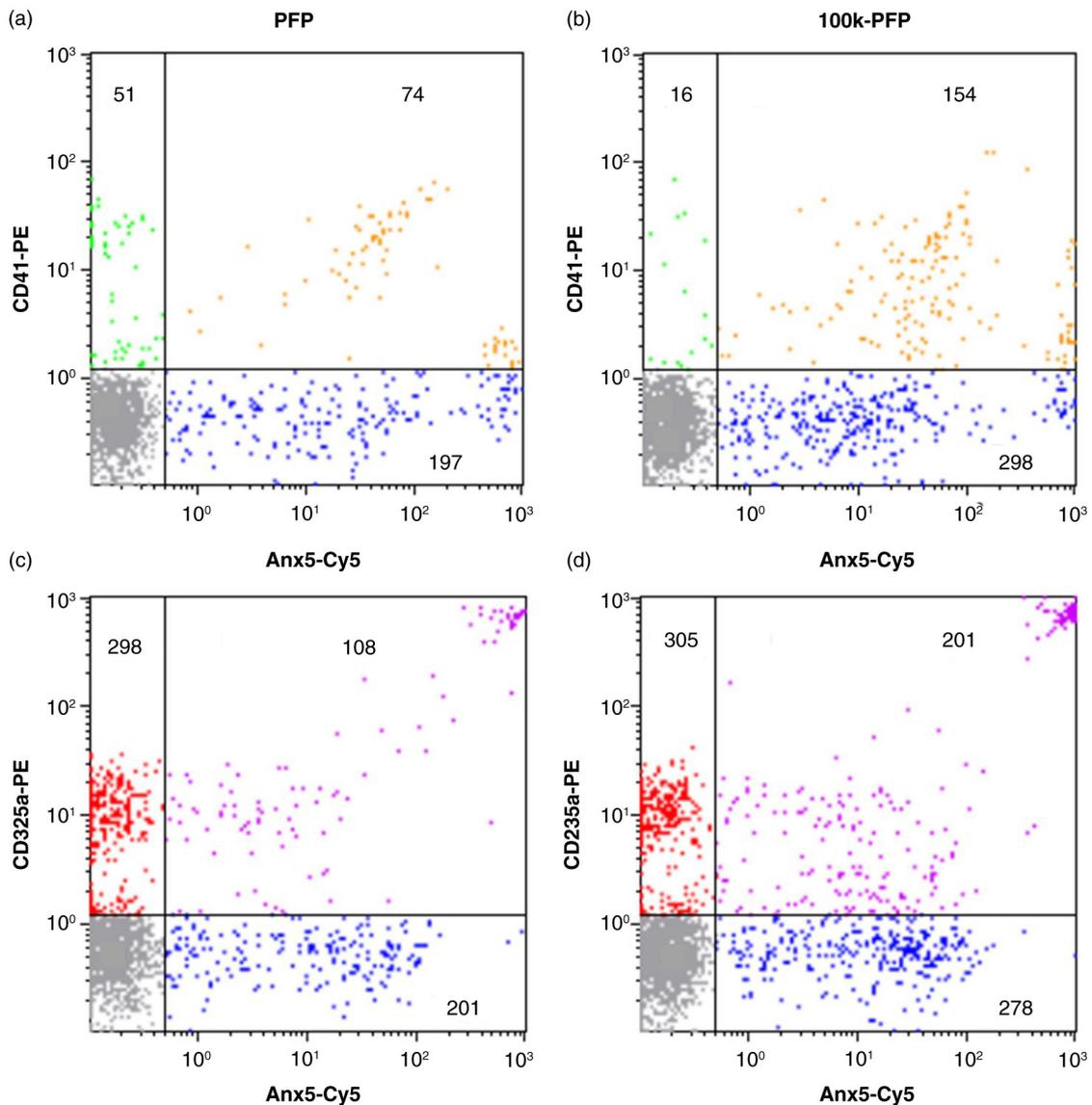
**Fig. 2.** Representative cryo-electron microscopy images of EV aggregates in 100k-PFP samples. (a, d–g), double labelling with 10 nm anti-CD41-gold-NPs and 4 nm Anx5-gold-NPs; (b, c), double labelling with 10 nm anti-CD235a-gold-NPs and 4 nm Anx5-gold-NPs. In (a), several A5–/CD41+ EVs and A5–/CD41– EVs are indicated, associated with some amorphous material (white asterisk). (b), Aggregate associating several 10s of EVs, including several A5–/CD235a+ EVs. (c), High magnification view of the dashed box from (b), allowing one to distinguish between A5+/CD235a– EVs and A5–/CD235a– EVs. One Anx5-gold-NP is circled in red. The white asterisk points to amorphous material. (e–g), High magnification views of the EVs from (d) labelled +/- (for A5+/CD41+), +/- (for A5+/CD41–) and -/- (for A5–/CD41–), respectively. One Anx5-gold-NP is circled in red in (e) and (f). For the sake of clarity, the carbon net has been overlaid in turquoise in (a, b, d). Scale bars: a, b, d: 500 nm; c, e–g: 100 nm.

on FCM data. In this study, we used light scattering for triggering detection, because the focus is on the formation of EV aggregates and light scattering is best adapted for detecting large objects (31,32). Figure 4 shows the

FCM analysis of a PFP and its counterpart 100k-PFP, after double labelling with Anx5-Cy5/anti-CD41-PE or Anx5-Cy5/anti-CD235a-PE. Concentrations expressed as EVs/ $\mu$ L sample are summarized in Table I. High-speed



**Fig. 3.** Representative images of EVs from (a) PFP and (b, c) 100k-PFP sedimented onto electron microscopy grids after Anx5-gold labelling. (a) Isolated Anx5-positive EVs are observed, with no EV aggregates. (b) An EV aggregate, about 800 nm in overall size, is observed, together with isolated EVs (arrows). (c) High magnification view of the dashed box from b; the EV aggregate contains Anx5-positive and Anx5-negative EVs. Scale bars: 500 nm.



**Fig. 4.** Flow cytometry analysis of a PFP (left column) and the corresponding 100k-PFP (right column) after double labelling with Anx5 – Cy5/CD41 – PE (a, b) or Anx5 – Cy5/CD235a – PE (c, d). EV concentrations (expressed as EV/ $\mu$ L sample) are indicated for each EV population. Colour code for the dot plots: Anx5+/CD41 – or Anx5+/CD235a –, blue; Anx5 –/CD41 +, green; Anx5 +/CD41 +, orange; Anx5 –/CD235a +, red; Anx5 +/CD235a +, purple; background noise, grey.

centrifugation was found to induce an increase in the total amount of EVs, in the number of Anx5-positive EVs and in the number of double labelled EVs. The increase of the amount of double labelled EVs, both Anx5+/CD41+ and Anx5+/CD235a+, strongly suggests the formation of EV aggregates. However, it is not possible to distinguish genuine double-positive isolated EVs from EV aggregates within these EV populations.

As indicated in the Materials and methods section, the 100k-PFP was obtained after repeated gentle homogenization with a 200- $\mu$ L pipette. As the pellet itself is too

small to be visible, we questioned the efficiency and reproducibility of this procedure. When the same treatment of centrifugation and resuspension was applied in triplicate to a PFP sample, the results from FCM were found to be reproducible, with CVs < 10%.

### Discussion

Altogether, the results presented here lead to the conclusion that high-speed centrifugation induces the formation of EV aggregates composed of a mixture of EVs of various phenotypes. EV aggregates are highly heterogeneous in size and in the number of EVs associated.

**Table 1.** Extracellular vesicle (EV) concentrations measured by flow cytometry in platelet-free plasma (PFP) and 100k-PFP after double labelling with Anx5/CD41 or Anx5/CD235a

Labelling	EV Phenotype	PFP	100k-PFP
Anx5/CD41	Anx5+/CD41 –	239 ± 23	373 ± 18
	Anx5 –/CD41 +	45 ± 24	13 ± 21
	Anx5+/CD41 +	84 ± 17	166 ± 18
Anx5/CD235a	Anx5+/CD235a –	233 ± 17	379 ± 30
	Anx5 –/CD235a +	319 ± 23	297 ± 35
	Anx5+/CD235a +	108 ± 13	187 ± 29

EV concentrations per microlitre are expressed as mean values ± SD for 2 independent experiments and 6 phenotypes: Anx5 –/CD41 +; Anx5+/CD41 –; Anx5+/CD41 +; Anx5 –/CD235a +; Anx5+/CD235a – and Anx5+/CD235a +.

Most importantly, the formation of EV aggregates of various phenotypes may lead to erroneous interpretation concerning the existence of EVs harbouring surface antigens from different cell origins. By FCM and also by immunofluorescence, EVs are considered to present a double or multiple positive phenotypes simply based on the presence of 2 or more markers on a given object. Yet FCM, like most optical methods, does not allow distinguishing between a single large EV and an aggregate of several small EVs. One may therefore question the validity of conclusions from previous studies, mainly by FCM, concerning the unexpected co-localization of CD markers from different cell origin on EVs. Such conclusions include, for example, TF-positive EVs harbouring platelet (CD61) and granulocyte (CD66e) markers in patients with type 2 diabetes (33), the presence of Anx5-positive EVs co-stained with platelet (CD41) and endothelial (CD62e) markers in essential thrombocytopenia (34) or the presence by immuno-fluorescence microscopy of objects co-stained by platelet antigen CD61 and MUC1, a protein originating from breast cancer epithelial cells (35,36).

Based on the results presented here, we recommend the use of double labelling EM as a definitive proof of fusion between EVs of different cell origin or transfer of membrane-bound antigens between EVs. Imaging FCM may constitute an alternative to EM for revealing the presence of false double positive EVs, as clearly demonstrated by Erdbrügger et al. (22).

Although many studies use high-speed centrifugation to purify, concentrate or wash EVs, it is surprising that the presence of EV aggregates is rarely discussed (21,22). A simple explanation could be that the presence of aggregates is not detected by some methods used for characterizing resuspended pellets, for example nanoparticle tracking analysis (NTA) (37,38) or tunable resistive pulse sensing (tRPS) (19,38). In the case of NTA, it is possible that the settings optimal for detecting 100-nm-large exosomes are not compatible for tracking micrometre-large aggregates or/and that the scattering intensity of EV

aggregates is so intense that they are considered as noise and eliminated from the analysis. For tRPS, the pore size used for detecting small EVs may not detect large EV aggregates, which in addition may lead to clogging effects.

The formation of EV aggregates after high-speed centrifugation is not limited to plasma samples and was also observed with samples from synovial liquid, breast milk, perfused placenta and cell culture supernatants (data not shown).

The key message of this study is that the interpretation of data obtained after high-speed centrifugation must be taken with caution, as centrifugation will affect either the concentration of EVs, their size or biochemical composition through the formation of EV aggregates. Alternative EV preparation and purification methods have recently been proposed, involving membrane filtration (39), size exclusion chromatography (40) or magnetic separation (41). It will be important to develop optimized procedures for EV analysis and investigate whether these methods are free of artefactual effects.

### Conflicts of interests and funding

The authors declare no conflict of interest. This study was supported by ANR (grant 11-BSV1-03501-PlacentA5 to ARB), Canceropole-GSO (grant 2013-E07 to ARB) and IUF (grant to ARB).

### Acknowledgements

We thank Mrs. Chaléat (Laboratoire Mutualiste d'Analyses Médicales, Pessac, France) for her help with the collection of blood samples. We thank Dr. Chris Gardiner (University College London, UK) for helpful discussions.

### References

- Raposo G, Stoorvogel W. Extracellular vesicles: exosomes, microvesicles, and friends. *J Cell Biol.* 2013;200:373–83.
- Yuana Y, Sturk A, Nieuwland R. Extracellular vesicles in physiological and pathological conditions. *Blood Rev.* 2013;27:31–9.
- Kowal J, Tkach M, Théry C. Biogenesis and secretion of exosomes. *Curr Opin Cell Biol.* 2014;29:116–25.
- Gould SJ, Raposo G. As we wait: coping with an imperfect nomenclature for extracellular vesicles. *J Extracell Vesicles.* 2013;2:20309. doi: <http://dx.doi.org/10.3402/jev.v2i0.20389>
- Witwer KW, Buzás EI, Bemis LT, Bora A, Lässer C, Lötvall J, et al. Standardization of sample collection, isolation and analysis methods in extracellular vesicle research. *J Extracell Vesicles.* 2013;2:20360. doi: <http://dx.doi.org/10.3402/jev.v2i0.20360>
- Raposo G, Nijman HW, Stoorvogel W, Liejendekker R, Harding CV, Melief CJ, et al. B lymphocytes secrete antigen-presenting vesicles. *J Exp Med.* 1996;1161–72.
- Pasquet JM, Toti F, Nurden AT, Dachary-Prigent J. Procoagulant activity and active calpain in platelet-derived microparticles. *Thromb Res.* 1996;87:509–22.
- Nieuwland R, Berckmans RJ, Rotteveel-Eijkman RC, Maquelin KN, Roozendaal KJ, Jansen PGM, et al. Cell-derived microparticles generated in patients during cardiopulmonary bypass are highly procoagulant. *Circulation.* 1997;96:35, 34–41.

9. Shet AS, Aras O, Gupta K, Hass MJ, Rausch DJ, Saba N, et al. Sick blood contains tissue factor-positive microparticles derived from endothelial cells and monocytes. *Blood*. 2003;102:2678–83.
10. Shet AS, Key NS, Hebbel RP. Measuring circulating cell-derived microparticles. *J Thromb Haemost*. 2004;2:1848–50.
11. Théry C, Amigorena S, Raposo G, Clayton A. Isolation and characterization of exosomes from cell culture supernatants and biological fluids. *Curr Protoc Cell Biol*. 2006;Chapter 3:1–29.
12. Valadi H, Ekström K, Bossios A, Sjöstrand M, Lee JJ, Lötvall JO. Exosome-mediated transfer of mRNAs and microRNAs is a novel mechanism of genetic exchange between cells. *Nat Cell Biol*. 2007;9:654–9.
13. Leroyer AS, Isobe H, Leseche G, Castier Y, Wassef M, Mallat Z, et al. Cellular origins and thrombogenic activity of microparticles isolated from human atherosclerotic plaques. *J Am Coll Cardiol*. 2007;49:772–7.
14. Dasgupta SK, Abdel-Monem H, Niravath P, Le A, Bellera RV, Langlois K, et al. Lactadherin and clearance of platelet-derived microvesicles. *Blood*. 2009;113:1332–9.
15. György B, Módos K, Pállinger É, Pálóczi K, Pásztói M, Misják P, et al. Detection and isolation of cell-derived microparticles are compromised by protein complexes resulting from shared biophysical parameters. *Blood*. 2011;117:e39–48.
16. Peinado H, Alečković M, Lavotshkin S, Matei I, Costa-Silva B, Moreno-Bueno G, et al. Melanoma exosomes educate bone marrow progenitor cells toward a pro-metastatic phenotype through MET. *Nat Med*. 2012;18:883–91.
17. Tushuizen ME, Diamant M, Peypers EG, Hoek FJ, Heine RJ, Sturk A, et al. Postprandial changes in the phospholipid composition of circulating microparticles are not associated with coagulation activation. *Thromb Res*. 2012;130:115–21.
18. Yuana Y, Koning RI, Kuil ME, Rensen PCN, Koster AJ, Bertina RM, et al. Cryo-electron microscopy of extracellular vesicles in fresh plasma. *J Extracell Vesicles*. 2013;2:21494. doi: <http://dx.doi.org/10.3402/jev.v2i0.21494>
19. Varga Z, Yuana Y, Grootemaat AE, van der Pol E, Gollwitzer C, Krumrey M, et al. Towards traceable size determination of extracellular vesicles. *J Extracell Vesicles*. 2014;3:23298. doi: <http://dx.doi.org/10.3402/jev.v3.23298>
20. Melo SA, Luecke LB, Kahlert C, Fernandez AF, Gammon ST, Kaye J, et al. Glypican-1 identifies cancer exosomes and detects early pancreatic cancer. *Nature*. 2015;523:177–82.
21. Issman L, Brenner B, Talmon Y, Aharon A. Cryogenic transmission electron microscopy nanostructural study of shed microparticles. *PLoS One*. 2013;8:e83680.
22. Erdbrügger U, Rudy CK, E Etter M, Dryden KA, Yeager M, Klibanov AL, et al. Imaging flow cytometry elucidates limitations of microparticle analysis by conventional flow cytometry. *Cytometry A*. 2014;85:756–70.
23. Arraud N, Linares R, Tan S, Gounou C, Pasquet J-M, Mornet S, et al. Extracellular vesicles from blood plasma: determination of their morphology, size, phenotype and concentration. *J Thromb Haemost*. 2014;12:614–27.
24. György B, Szabó TG, Pásztói M, Pál Z, Misják P, Aradi B, et al. Membrane vesicles, current state-of-the-art: emerging role of extracellular vesicles. *Cell Mol Life Sci*. 2011;68:2667–88.
25. Van der Pol E, Böing AN, Harrison P, Sturk A, Nieuwland R. Classification, functions, and clinical relevance of extracellular vesicles. *Pharmacol Rev*. 2012;64:676–705.
26. Jy W, Horstman LL, Jimenez JJ, Ahn YS, Biró E, Nieuwland R, et al. Measuring circulating cell-derived microparticles. *J Thromb Haemost*. 2004;2:1842–51.
27. Lacroix R, Judicone C, Poncelet P, Robert S, Arnaud L, Sampol J, et al. Impact of pre-analytical parameters on the measurement of circulating microparticles: towards standardization of protocol. *J Thromb Haemost*. 2012;10:437–46.
28. Lyon ME, Fine JS, Henderson PJ, Lyon AW. D-phenylalanyl-L-prolyl-L-arginine chloromethyl ketone (PPACK): alternative anticoagulant to heparin salts for blood gas and electrolyte specimens. *Clin Chem*. 1995;41:1038–41.
29. Arraud N, Gounou C, Turpin D, Brisson AR. Fluorescence triggering: a general strategy for enumerating and phenotyping extracellular vesicles by flow cytometry. *Cytometry A*. 2015. doi: <http://dx.doi.org/10.1002/cyto.a.22669>. [Epub ahead of print].
30. Arraud N, Gounou C, Linares R, Brisson AR. A simple flow cytometry method improves the detection of phosphatidylserine-exposing extracellular vesicles. *J Thromb Haemost*. 2015;13:237–47.
31. Van der Pol E, Hoekstra AG, Sturk A, Otto C, van Leeuwen TG, Nieuwland R. Optical and non-optical methods for detection and characterization of microparticles and exosomes. *J Thromb Haemost*. 2010;8:2596–607.
32. 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;9:1216–24.
33. 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;106:2442–7.
34. Trappenburg MC, van Schilfgaarde M, Marchetti M, Spronk HM, ten Cate H, Leyte A, et al. Elevated procoagulant microparticles expressing endothelial and platelet markers in essential thrombocythemia. *Haematologica*. 2009;94:911–8.
35. Tesselaar MET, Romijn FPHTM, Van Der Linden IK, Prins FA, Bertina RM, Osanto S. Microparticle-associated tissue factor activity: a link between cancer and thrombosis? *J Thromb Haemost*. 2007;5:520–7.
36. Nieuwland R. Cellular origin of microparticles exposing tissue factor in cancer: a mixed double? *J Thromb Haemost*. 2008;6:1514–6.
37. Van Deun J, Mestdagh P, Sormunen R, Cocquyt V, Vermaelen K, Vandesompele J, et al. The impact of disparate isolation methods for extracellular vesicles on downstream RNA profiling. *J Extracell Vesicles*. 2014;3:24858. doi: <http://dx.doi.org/10.3402/jev.v3.24858>
38. Maas SLN, de Vrij J, van der Vlist EJ, Geragousian B, van Bloois L, Mastrobattista E, et al. Possibilities and limitations of current technologies for quantification of biological extracellular vesicles and synthetic mimics. *J Control Release*. 2015;200:87–96.
39. Momen-Heravi F, Balaj L, Alian S, Mantel P-Y, Halleck AE, Trachtenberg AJ, et al. Current methods for the isolation of extracellular vesicles. *Biol Chem*. 2013;394:1253–62.
40. 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;3:23430. doi: <http://dx.doi.org/10.3402/jev.v3.23430>
41. Arakelyan A, Ivanova O, Vasilieva E, Grivel J-C, Margolis L. Antigenic composition of single nano-sized extracellular blood vesicles. *Nanomedicine*. 2015;11:489–98.

**Imaging and quantification of extracellular vesicles  
by transmission electron microscopy**

Romain Linares, Sisareuth Tan, Céline Gounou and Alain R. Brisson\*

Molecular Imaging and NanoBioTechnology, UMR-5248-CBMN CNRS-University of  
Bordeaux-IPB, Allée Geoffroy Saint-Hilaire, F-33600 Pessac, France

\*Corresponding author:

Alain R. Brisson

UMR-5248-CBMN

Bat. B14, Allée Geoffroy Saint-Hilaire

F-33600 Pessac, France

Tel: +33 (0)5 40006861 / Fax: +33 (0)5 40002200

[a.brisson@cbmn.u-bordeaux.fr](mailto:a.brisson@cbmn.u-bordeaux.fr)

**Short title: EV imaging and quantification by TEM**

## Summary

Extracellular vesicles (EVs) are cell-derived vesicles that are present in blood and other body fluids. EVs raise major interest for their diverse physiopathological roles and their potential biomedical applications. However, the characterization and quantification of EVs constitute major challenges, mainly due to their small size and the lack of methods adapted for their study. Electron microscopy has made significant contributions to the EV field since their initial discovery. Here, we describe the use of two transmission electron microscopy (TEM) techniques for imaging and quantifying EVs. Cryo-TEM combined with receptor-specific gold labeling is applied to reveal the morphology, size and phenotype of EVs, while their enumeration is achieved after high-speed sedimentation on EM grids.

**Key Words** : Blood Plasma; Extracellular vesicles (EVs); Transmission Electron Microscopy (TEM); Cryo-TEM; Immuno-gold labeling; Annexin-A5 (Anx5); Phosphatidylserine (PS); Antibodies (Abs); Erythrocytes; Platelets.

## 1. Introduction

Extracellular vesicles (EVs) are cell fragments enclosed within a lipid membrane, which are released by cells under various stimuli and are found in blood and other body fluids [1–4]. EVs, also called microvesicles, microparticles or exosomes, have been proposed to participate in diverse functions in health and disease, which explains the intense research activity focusing on EVs. In blood, EVs participate in physiological processes of coagulation, inflammation and intercellular communication [5–7], while elevated EV levels have been reported in various diseases [8–11]. Other studies have stressed the potential biomedical applications of EVs as disease biomarkers, drug delivery vehicles or vaccines [12–15]. Our current understanding on EVs - what they are and what they do - remains however limited, mainly because EVs are small objects, most of them being comprised between 100 and 500 nm diameter [16], which renders difficult their characterization and their isolation. In addition, EVs originate from different cell types, hence are heterogeneous in composition, and they are present only at low concentration in unprocessed body fluids [17]. The difficulty of characterizing EVs is well recognized and is reflected by diverging results from the literature, e.g. on the size or the concentration of EVs in blood.

Many methods have been applied to the characterization of the structure or phenotype of EVs, including flow cytometry, transmission electron microscopy (TEM), atomic force microscopy, dynamic light scattering, nanoparticle tracking analysis and resistive pulse sensing [18–20]. EM techniques used in combination with immuno-gold labeling have made significant contribution in the EV field, from the initial demonstration of their existence more than thirty years ago [21–23] to the recent description of their detailed structure [16, 17]. EVs have been analyzed extensively by classical electron microscopy (EM) techniques like negative staining [24, 25], thin sectioning [19], cryo-sectioning [26] or scanning-EM [27]. EV imaging by cryo-TEM has recently become popular [16, 28, 29], allowing the observation of EVs in their hydrated near-native state [30].

Using cryo-TEM together with receptor-specific gold labeling, we have been able to provide a detailed description of the morphology, size distribution and phenotypes of the main EV populations present in platelet free plasma (PFP) from healthy donors [16]. This approach, which presents the major advantage to be applicable to complex media such as unprocessed plasma, presents an intrinsic limitation for quantifying EVs. Indeed, as EVs are drained through a perforated carbon film covering EM grids, EVs larger than the carbon film

openings, like tubular EVs and large fragments, are preferentially retained by the carbon net, while spherical EVs, which are smaller, pass freely through the net. Consequently, the enumeration of EVs by this approach is affected by a systematic error, called “fish-net” artifact, causing an over-estimation of the proportion of large EVs (Fig. 1). This problem could be overcome by using a simple method in which EVs were sedimented on EM grids covered with a continuous carbon film and quantified by TEM after air-drying. This method, previously used for the enumeration of viruses [31], allowed us to determine EV concentrations in PFP samples (Fig. 2).

We present here step-by-step application protocols of these two complementary TEM methods in the case of blood plasma samples (*see Note 1*).

## 2. Materials

Prepare all solutions using ultrapure water (prepared by purifying deionized water to a resistivity of 18.2 MΩ.cm with a tandem RiOs5-Synergy system (Millipore, Molsheim, France)) and analytical grade reagents (purchased from Sigma-Aldrich (Lyon, France) except when otherwise stated).

### 2.1. Blood collection and PFP preparation equipments

1. 21-gauge needle.
2. 4.5 mL BD Vacutainer® tubes containing 0.1 volume of 129 mM sodium citrate (Becton Dickinson, Le Pont de Claix, France).
3. Eppendorf 5804-R centrifuge equipped with an A-4-44 swinging bucket rotor (Eppendorf, Montesson, France).

### 2.2. Sample preparation components and equipments

1. Phe-Pro-Arg-Chloromethyl ketone (PPACK) (Haematologic Technologies, Cryopep, Montpellier, France).
2. Gold nanoparticles conjugated [32] with:
  - a. annexin-A5 (Anx5),
  - b. anti-CD235a-mAb (clone 11E4B-7-6, Beckman Coulter, Villepinte, France),
  - c. anti-CD41-mAb (clone P2, Beckman Coulter).
3. Cacodylate buffer (*see Note 2*): 100 mM sodium cacodylate, 0.02% sodium azide, pH 7.4. Add about 900 mL water to a 1-L glass beaker. Weigh 21.4 g sodium cacodylate and transfer to the glass beaker. Add 2 mL of 10% sodium azide and adjust pH to 7.4 with 1M HCl. Make up to 1 L with water. Store at 4°C.
4. Cacodylate buffer supplemented with Ca<sup>2+</sup>: 100 mM sodium cacodylate, 2 mM CaCl<sub>2</sub>, 0.02% sodium azide, pH 7.4. Prepare as in (3), except adding 400 µL of a 5 M CaCl<sub>2</sub> solution to the beaker before pH adjustment.
5. Polyallomer 4.5 mL centrifuge tubes (Beckman Coulter).
6. Standard razor blades.
7. Standard coarse (P80) and fine (P1200) sandpapers.
8. Home-made 12-mm diameter hemispherical piece of Epon-Araldite resin. Resin components (*see Note 3*) (Agar Scientific, Stansted, UK):

- a. Agar 100 (exchangeable with Epon 812) and Araldite CY212 resins.
  - b. Hardener: DDSA (dodecenylsuccinic anhydride).
  - c. Accelerator: DMP-30 (2,4,6-tris dimethylaminomethyl phenol), exchangeable with BDMA (benzyl dimethylamine).
9. Drying oven.
  10. Standard thin (less than 0.5 mm) double sided tape (Tesa, Lieusaint, France).
  11. 300 mesh copper EM grids coated with a continuous carbon film (Ted Pella, Eloise, Tremblay-en-France, France).
  12. Optima™ MAX-E ultracentrifuge equipped with a MLS50 rotor (Beckman Coulter).
  13. 300 mesh copper EM grids coated with a perforated carbon film (Ted Pella).
  14. UV/Ozone device (BHK, Claremont, CA, USA).
  15. Leica EM-CPC cryo-chamber (Leica Microsystems SAS, Nanterre, France).
  16. Whatman filter paper n°4/5 (Whatman, Versailles, France).
  17. Cryo grid boxes (Eloise).
  18. Liquid nitrogen cryo container (Dutscher, Brumath, France).
  19. Gatan 626 cryo holder (Gatan, CA, USA).

### 3. Methods

Carry out all procedures at room temperature.

#### 3.1. Fabrication of resin support for EM grids (Fig. 3)

1. Mix 2.9 g Agar 100 resin, 2.35 g Araldite CY212 resin, 6.2 g DDSA and add 375  $\mu$ L DMP-30.
2. Gently agitate the mix with a magnetic stirrer until homogeneity whilst avoiding the formation of bubbles (the mix is highly viscous).
3. Pour the mix with a syringe into 4.5 mL polyallomer centrifuge tubes, up to about 1 cm height.
4. Place the tubes in upright position in an oven at 60°C for overnight polymerization.
5. Cut the tube wall with a razor blade and recover the solid resin pieces (*see Note 4*).
6. Sand their flat top surface successively with a coarse and a fine sandpaper (*see Note 5*).
7. If some of the resin mix is left over, it can be stored for several months at -20°C and used later. Thaw frozen resin samples at room temperature, then follow steps 3.1.3 to 3.1.6.

#### 3.2. Blood collection and preparation of PFP samples

1. Peripheral venous blood is drawn from donors after written informed consent. Blood is collected using a 21-Gauge needle in 4.5 mL tubes containing 0.1 volume of 129 mM sodium citrate.
2. Discard the first tube, handle blood tubes with care and start the preparation of PFP within less than 1h after blood collection [33].
3. Centrifuge blood tubes at 2,500 g for 15 min at 25°C in a centrifuge equipped with a swinging bucket rotor, with a low deceleration setting. Transfer the upper 1.8 mL of each tube in a 2-mL Eppendorf tube.
4. Centrifuge the 2-mL Eppendorf tubes at 2,500 g for 15 min at 25°C. Harvest and pool the upper 1.3 mL of each tube, which constitutes the PFP.

### 3.3. Preparation of PFP samples for cryo-TEM

#### 3.3.1 Preparation of pure PFP samples

1. Expose EM grids coated with a perforated carbon film for 10 minutes to UV/ozone in order to render them hydrophilic [34] (*see Note 6*).
2. Deposit a 4  $\mu\text{L}$  droplet of pure PFP onto an EM grid (*see Note 7*).
3. Remove the excess of liquid by blotting from the back side of the grid with a filter paper (*see Note 8*) and quickly plunge the grid into liquid ethane cooled down by liquid nitrogen (*see Note 9*) using a LEICA EM-CPC cryo-chamber.
4. Maintain EM grids prepared this way under liquid nitrogen and store them in cryo grid boxes in a cryo container until use (*see Note 10*).
5. For cryo-TEM observation, mount a grid in a cryo-holder and insert it in the electron microscope.

#### 3.3.2 Preparation of PFP samples labeled with gold nanoparticles conjugated with proteins

1. Deposit 7  $\mu\text{L}$  of fresh PFP in an Eppendorf tube, add 1  $\mu\text{L}$  of 100  $\mu\text{M}$  PPACK solution prepared in water and homogenize gently with a micropipette.
2. For labeling PS-exposing EVs, add 1  $\mu\text{L}$  of Anx5-conjugated gold nanoparticles (Anx5-gold-NPs) at a concentration of  $2 \times 10^{16}$  particles/L, 1  $\mu\text{L}$  of 100 mM  $\text{CaCl}_2$  and homogenize gently with a micropipette (*see Note 11*).
3. Incubate for 15 minutes.
4. For labeling EVs by means of specific antibody-conjugated gold nanoparticles (Ab-gold-NPs), apply the same procedure, except that PPACK and  $\text{CaCl}_2$  are omitted and substituted by 2  $\mu\text{L}$  PFP and incubation time is 1 h (*see Note 12*).
5. For double labeling experiments, label first PFP samples with 10 nm Ab-gold-NPs for 45 minutes, then with 4 nm Anx5-gold-NPs for an additional 15 minutes.
6. Then, follow steps described in 3.3.1.1 to 3.3.1.5.

### 3.4. Sedimentation of PFP samples on EM grids

1. For labeling PS-exposing EVs, deposit 100  $\mu\text{L}$  of fresh PFP (*see Note 7*) in an Eppendorf tube, add 1  $\mu\text{L}$  of 1 mM PPACK, 1  $\mu\text{L}$  of Anx5-gold-NPs at  $2 \times 10^{16}$  particles/L and 5  $\mu\text{L}$  of 200 mM  $\text{CaCl}_2$ . Homogenize gently with a pipette.
2. Incubate for 15 minutes.
3. For labeling EVs with specific Ab-gold-NPs, apply the same procedure except that PPACK and  $\text{CaCl}_2$  are omitted and incubation time is 1 h (*see Note 13*).
4. Take a 12-mm diameter resin support, adhere a thin piece of double-sided tape and fix two to four EM grids coated with a continuous carbon film. Only the grid edges should contact the tape in order to recover them easily (*see Fig.3*).
5. Deposit the resin support with the EM grids at the bottom of a 4.5 mL polyallomer centrifuge tube.
6. Transfer the volume from the Eppendorf tube over the resin support.
7. Add gently 3 mL of 100 mM cacodylate buffer, pH 7.4, supplemented with 2 mM  $\text{CaCl}_2$  in the case of Anx5 labeling.
8. Centrifuge in an ultracentrifuge equipped with a swinging-bucket rotor at 100,000 g for 1 hour at 20°C.
9. Remove carefully the liquid above the EM grids and discard it.
10. Recover the EM grids by cutting the centrifuge tube with a razor blade, let them dry in air and store them in a EM-grid box (*see Note 14*).

### 3.4. Transmission electron microscopy observation and EV quantification

TEM observation of PFP samples is carried out similarly for both cryo samples and samples sedimented on EM grids. However, distinct procedures are applied due to large differences in the overall number of EVs per grid square.

#### 3.4.1. Cryo-TEM observation

1. Scan the grid first at 300 x magnification over several hundred squares (*see Note 15*). This step allows the detection and quantification of large (over 1  $\mu\text{m}$ ) EVs.

2. Second, scan the grid at 5,000 x magnification (*see Note 16*). This is required for the detection of sub- $\mu\text{m}$  EVs.

#### 3.4.2. TEM observation after on-grid sedimentation and EV quantification

1. Scan the grid first at 300 x magnification over several hundred squares (*see Note 15*). This step allows the detection and quantification of large (over 1  $\mu\text{m}$ ) EVs.
2. Second, scan five grid squares (*see Note 17*) at 5,000 x magnification (*see Note 18*). This is required for the detection of sub- $\mu\text{m}$  EVs. As this step is more time-consuming, a manual cell-counter is handy and limits operator-induced bias in EV quantification.
3. Apply a stringent method for enumerating EVs, in which only the objects that present a high and homogenous gold-NP labeling with a well-defined near-to-circular or tubular shape are taken into account (see Fig. 2).
4. Calculate the EV concentration in pure PFP, by taking into account the number (N) of EVs counted per  $\mu\text{m}^2$ , the total area of sedimentation (A in  $\mu\text{m}^2$ ) the nominal volume (V in  $\mu\text{L}$ ) of PFP used for centrifugation. The EV concentration per  $\mu\text{L}$  pure PFP is equal to  $(N \times A) / V$ .

## 4. Notes

1. The methods described here for PFP samples are in principle applicable with other body fluids, as already established for cryo-TEM with synovial liquid [35], milk [36], pleural liquid (Ms submitted) or cerebrospinal fluid [37], as well as for cell culture EVs. Each type of material requires specific conditions of preparation, principally for eliminating cells, cell debris and large aggregates contained in the original sample.
2. Cacodylate buffer contains arsenic and sodium azide, which are toxic compounds. Wear recommended protection equipments (gloves and mask for weighting and gloves for use).
3. Wear gloves for weighting and using resin components which can be harmful or corrosive.
4. Be careful when using razor blades.
5. Wear a mask when sanding resin supports, to avoid inhaling resin dust.
6. Glow discharge devices can also be used.
7. Homogenize PFP before use by gentle pipetting.
8. This step requires some practice. The duration of the blotting step is critical and depends on the viscosity of the liquid medium.
9. Wear gloves, protection glasses and long-sleeved clothes, as liquid ethane may cause severe burnings.
10. Maintenance of the cold chain is mandatory, as vitreous ice only exists at T below  $-130^{\circ}\text{C}$ . A temperature around  $-170^{\circ}\text{C}$  is ideal.
11. A final volume of  $10\ \mu\text{L}$  allows preparing two cryo-EM grids per sample, which is highly recommended because the success rate in the preparation of cryo-EM grids of good quality is variable.
12. Incubation time must be optimized with each other type of Ab-conjugated gold-NPs.
13. Although double labeling can in principle be performed with the on-grid sedimentation approach by using gold-NPs of two distinct sizes, e.g. 10 and 4 nm as described in cryo-TEM in 3.3.2.4, the detection of small ( $<10\ \text{nm}$ ) gold-NPs requires the use of a higher magnification (e.g. 13,000 x for 4 nm particles), which makes the scanning operation much longer.
14. We noticed a variable ageing of EM grids prepared this way, probably due to environmental storage conditions, principally humidity level. We recommend observing shortly after preparation, ideally within a week.

15. With PFP from healthy donors, about one to five large EVs are observed over a total of one hundred grid squares.
16. Absolute quantification cannot be achieved by cryo-TEM due to the “fish-net” artifact described in Fig.1 and also because the overall EV concentration in PFP is low, of the order of 100,000 EVs per  $\mu\text{L}$  [17]. On average, less than one EV per grid square is observed with PFP from healthy donors. Increasing EV concentration for example by ultracentrifugation is possible [25]. However this may lead to modifications of the original material, such as vesicle aggregation, fragmentation of large objects or activation of residual platelets.
17. As the repartition of EVs over the grid may be heterogeneous, it is recommended to select squares at different places over the grid, in order to obtain representative data.
18. With PFP from healthy donors, about one hundred EVs are observed per grid square with the on-grid sedimentation method.

## **Acknowledgment**

This study was supported by ANR (grant 11-BSV1-03501-PlacentA5 to AB).

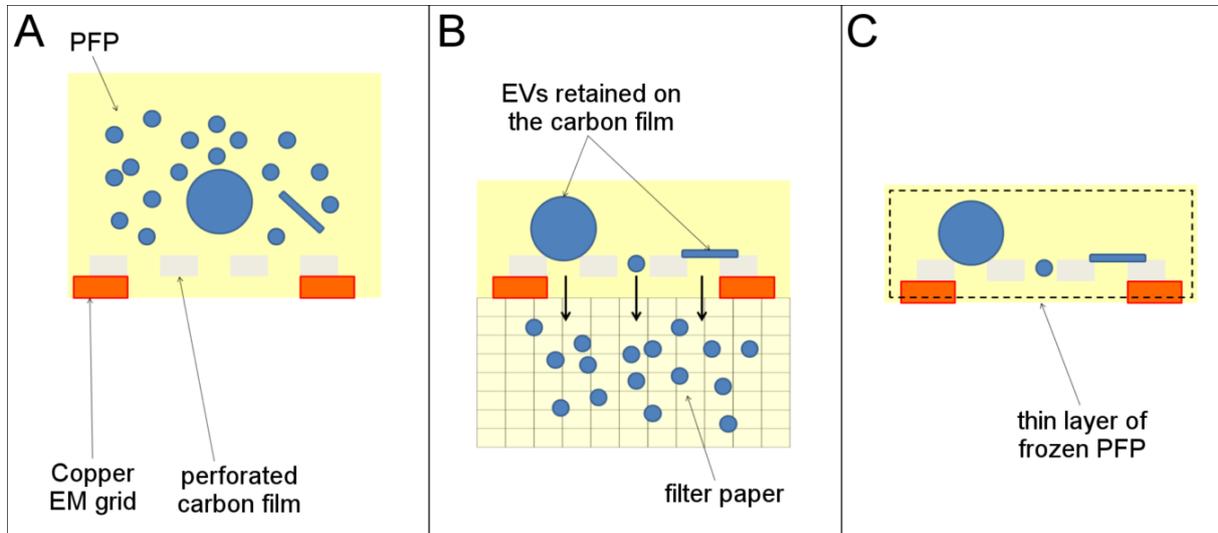
## References

1. Théry C, Ostrowski M, Segura E (2009) Membrane vesicles as conveyors of immune responses. *Nat Rev Immunol* 9:581–593.
2. György B, Szabó TG, Pásztói M, Pál Z, Misják P, Aradi B, László V, Pállinger E, Pap E, Kittel A, Nagy G, Falus A, Buzás EI (2011) Membrane vesicles, current state-of-the-art: emerging role of extracellular vesicles. *Cell Mol Life Sci CMLS* 68:2667–2688.
3. Van der Pol E, Böing AN, Harrison P, Sturk A, Nieuwland R (2012) Classification, functions, and clinical relevance of extracellular vesicles. *Pharmacol Rev* 64:676–705.
4. Raposo G, Stoorvogel W (2013) Extracellular vesicles: exosomes, microvesicles, and friends. *J Cell Biol* 200:373–383.
5. Zwicker JJ, Trenor CC, Furie BC, Furie B (2011) Tissue Factor-Bearing Microparticles and Thrombus Formation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 31:728–733.
6. Morel O, Toti F, Hugel B, Bakouboula B, Camoin-Jau L, Dignat-George F, Freyssinet J-M (2006) Procoagulant microparticles: disrupting the vascular homeostasis equation? *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 26:2594–2604.
7. Valadi H, Ekström K, Bossios A, Sjöstrand M, Lee JJ, Lötvall JO (2007) Exosome-mediated transfer of mRNAs and microRNAs is a novel mechanism of genetic exchange between cells. *Nat Cell Biol* 9:654–659.
8. VanWijk MJ, VanBavel E, Sturk A, Nieuwland R (2003) Microparticles in cardiovascular diseases. *Cardiovasc Res* 59:277–287.
9. Boilard E, Nigrovic PA, Larabee K, Watts GFM, Coblyn JS, Weinblatt ME, Massarotti EM, Remold-O'Donnell E, Farndale RW, Ware J, Lee DM (2010) Platelets amplify inflammation in arthritis via collagen-dependent microparticle production. *Science* 327:580–583.
10. Delabranche X, Boisramé-Helms J, Asfar P, Berger A, Mootien Y, Lavigne T, Grunebaum L, Lanza F, Gachet C, Freyssinet J-M, Toti F, Meziani F (2013) Microparticles are new biomarkers of septic shock-induced disseminated intravascular coagulopathy. *Intensive Care Med* 39:1695–1703.
11. Manly DA, Wang J, Glover SL, Kasthuri R, Liebman HA, Key NS, Mackman N (2010) Increased microparticle tissue factor activity in cancer patients with Venous Thromboembolism. *Thromb Res* 125:511–512.
12. Skog J, Würdinger T, van Rijn S, Meijer DH, Gainche L, Sena-Esteves M, Curry WT, Carter BS, Krichevsky AM, Breakefield XO (2008) Glioblastoma microvesicles transport RNA and proteins that promote tumour growth and provide diagnostic biomarkers. *Nat Cell Biol* 10:1470–1476.
13. Burger D, Schock S, Thompson CS, Montezano AC, Hakim AM, Touyz RM (2013) Microparticles: biomarkers and beyond. *Clin Sci Lond Engl* 1979 124:423–441.

14. Alvarez-Erviti L, Seow Y, Yin H, Betts C, Lakhali S, Wood MJA (2011) Delivery of siRNA to the mouse brain by systemic injection of targeted exosomes. *Nat Biotechnol* 29:341–345.
15. Zitvogel L, Regnault A, Lozier A, Wolfers J, Flament C, Tenza D, Ricciardi-Castagnoli P, Raposo G, Amigorena S (1998) Eradication of established murine tumors using a novel cell-free vaccine: dendritic cell derived exosomes. *Nat Med* 4:594–600.
16. Arraud N, Linares R, Tan S, Gounou C, Pasquet J-M, Mornet S, Brisson AR (2014) Extracellular vesicles from blood plasma: determination of their morphology, size, phenotype and concentration. *J Thromb Haemost JTH* 12:614–627.
17. Arraud N, Gounou C, Linares R, Brisson AR (2014) A simple flow cytometry method improves the detection of phosphatidylserine-exposing extracellular vesicles. *J Thromb Haemost JTH*. doi: 10.1111/jth.12767
18. Van der Pol E, Hoekstra AG, Sturk A, Otto C, van Leeuwen TG, Nieuwland R (2010) Optical and non-optical methods for detection and characterization of microparticles and exosomes. *J Thromb Haemost JTH* 8:2596–2607.
19. György B, Szabó TG, Turiák L, Wright M, Herczeg P, Lédeczi Z, Kittel Á, Polgár A, Tóth K, Dérfalvi B, Zelenák G, Böröcz I, Carr B, Nagy G, Vékey K, Gay S, Falus A, Buzás EI (2012) Improved Flow Cytometric Assessment Reveals Distinct Microvesicle (Cell-Derived Microparticle) Signatures in Joint Diseases. *PLoS ONE* 7:e49726.
20. Witwer KW, Buzás EI, Bemis LT, Bora A, Lässer C, Lötvald J, Nolte-’t Hoen EN, Piper MG, Sivaraman S, Skog J, Théry C, Wauben MH, Hochberg F (2013) Standardization of sample collection, isolation and analysis methods in extracellular vesicle research. *J Extracell Vesicles*. doi: 10.3402/jev.v2i0.20360
21. Wolf P (1967) The Nature and Significance of Platelet Products in Human Plasma. *Br J Haematol* 13:269–288.
22. Harding C, Heuser J, Stahl P (1983) Receptor-mediated endocytosis of transferrin and recycling of the transferrin receptor in rat reticulocytes. *J Cell Biol* 97:329–339.
23. Pan BT, Teng K, Wu C, Adam M, Johnstone RM (1985) Electron microscopic evidence for externalization of the transferrin receptor in vesicular form in sheep reticulocytes. *J Cell Biol* 101:942–948.
24. Heijnen HF, Schiel AE, Fijnheer R, Geuze HJ, Sixma JJ (1999) Activated platelets release two types of membrane vesicles: microvesicles by surface shedding and exosomes derived from exocytosis of multivesicular bodies and alpha-granules. *Blood* 94:3791–3799.
25. Böing AN, van der Pol E, Grootemaat AE, Coumans FAW, Sturk A, Nieuwland R (2014) Single-step isolation of extracellular vesicles by size-exclusion chromatography. *J Extracell Vesicles*. doi: 10.3402/jev.v3.23430
26. Théry C, Amigorena S, Raposo G, Clayton A (2006) Isolation and characterization of exosomes from cell culture supernatants and biological fluids. *Curr Protoc Cell Biol* Editor Board Juan Bonifacino AI Chapter 3:Unit 3.22.

27. Kralj-Iglic V, Sustar, Bedina-Zavec, Stukelj, Frank, Bobojevic, Jansa, Ogorevc, Kruljc, Mam, Simunic, Mancek-Keber, Jerala, Rozman, Veranic P, Hagerstrand, Kralj-Iglic V (2011) Nanoparticles isolated from blood: a reflection of vesiculability of blood cells during the isolation process. *Int J Nanomedicine* 2737.
28. Tatischeff I, Larquet E, Falcón-Pérez JM, Turpin P-Y, Kruglik SG (2012) Fast characterisation of cell-derived extracellular vesicles by nanoparticles tracking analysis, cryo-electron microscopy, and Raman tweezers microspectroscopy. *J Extracell Vesicles*. doi: 10.3402/jev.v1i0.19179
29. Yuana Y, Koning RI, Kuil ME, Rensen PCN, Koster AJ, Bertina RM, Osanto S (2013) Cryo-electron microscopy of extracellular vesicles in fresh plasma. *J Extracell Vesicles*. doi: 10.3402/jev.v2i0.21494
30. Dubochet J, Adrian M, Chang JJ, Homo JC, Lepault J, McDowell AW, Schultz P (1988) Cryo-electron microscopy of vitrified specimens. *Q Rev Biophys* 21:129–228.
31. Miller MF (1974) *Principles and Techniques of Electron Microscopy: Biological Applications*. 89–128.
32. Brisson AR, Mornet S (2007) Patent WO/2007/122259.
33. Lacroix R, Judicone C, Poncelet P, Robert S, Arnaud L, Sampol J, Dignat-George F (2012) Impact of pre-analytical parameters on the measurement of circulating microparticles: towards standardization of protocol. *J Thromb Haemost JTH* 10:437–446.
34. Richter R, Mukhopadhyay A, Brisson A (2003) Pathways of Lipid Vesicle Deposition on Solid Surfaces: A Combined QCM-D and AFM Study. *Biophys J* 85:3035–3047.
35. Cloutier N, Tan S, Boudreau LH, Cramb C, Subbaiah R, Lahey L, Albert A, Shnyder R, Gobezie R, Nigrovic PA, Farndale RW, Robinson WH, Brisson A, Lee DM, Boilard E (2013) The exposure of autoantigens by microparticles underlies the formation of potent inflammatory components: the microparticle-associated immune complexes. *EMBO Mol Med* 5:235–249.
36. Zonneveld MI, Brisson AR, van Herwijnen MJC, Tan S, van de Lest CHA, Redegeld FA, Garssen J, Wauben MHM, Nolte-'t Hoen ENM (2014) Recovery of extracellular vesicles from human breast milk is influenced by sample collection and vesicle isolation procedures. *J Extracell Vesicles*. doi: 10.3402/jev.v3.24215
37. Chen WW, Balaj L, Liao LM, Samuels ML, Kotsopoulos SK, Maguire CA, LoGuidice L, Soto H, Garrett M, Zhu LD, Sivaraman S, Chen C, Wong ET, Carter BS, Hochberg FH, Breakefield XO, Skog J (2013) BEAMing and Droplet Digital PCR Analysis of Mutant IDH1 mRNA in Glioma Patient Serum and Cerebrospinal Fluid Extracellular Vesicles. *Mol Ther-Nucleic Acids* 2:e109.

## Figures



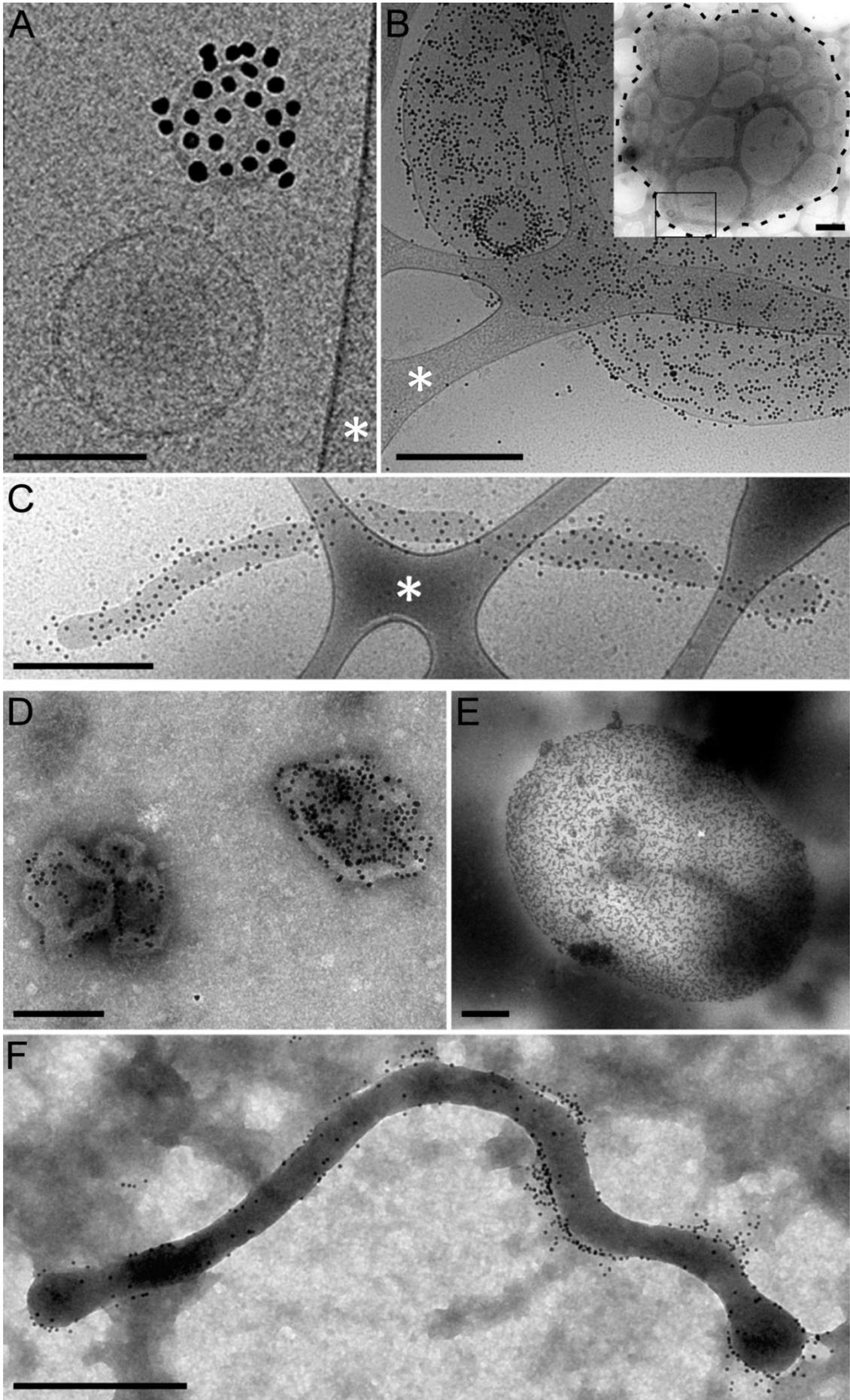
**Fig. 1 - Scheme of the “fish-net” artefact of cryo-TEM analysis of PFP samples**

(A), PFP suspension layered over an EM grid coated with a perforated carbon net. The PFP contains EVs of various sizes. The scheme is not drawn to scale, as the distance between two copper bars is about 50  $\mu\text{m}$ , the size of the holes in the carbon film varies from few hundred nm to several  $\mu\text{m}$  and the size of the EVs varies from 30 nm to 8  $\mu\text{m}$ .

(B), Upon draining the liquid with a filter paper from the bottom or back side of the EM grid, the large EVs are retained by the net, while the smaller EVs pass freely through the net.

(C), Ultimately, a thin liquid layer of PFP of few hundred nm thickness is quickly frozen and observed in the microscope. Due to this “fish-net” artefact, the proportion of large EVs is over-estimated by cryo-TEM.

Adapted from [16].



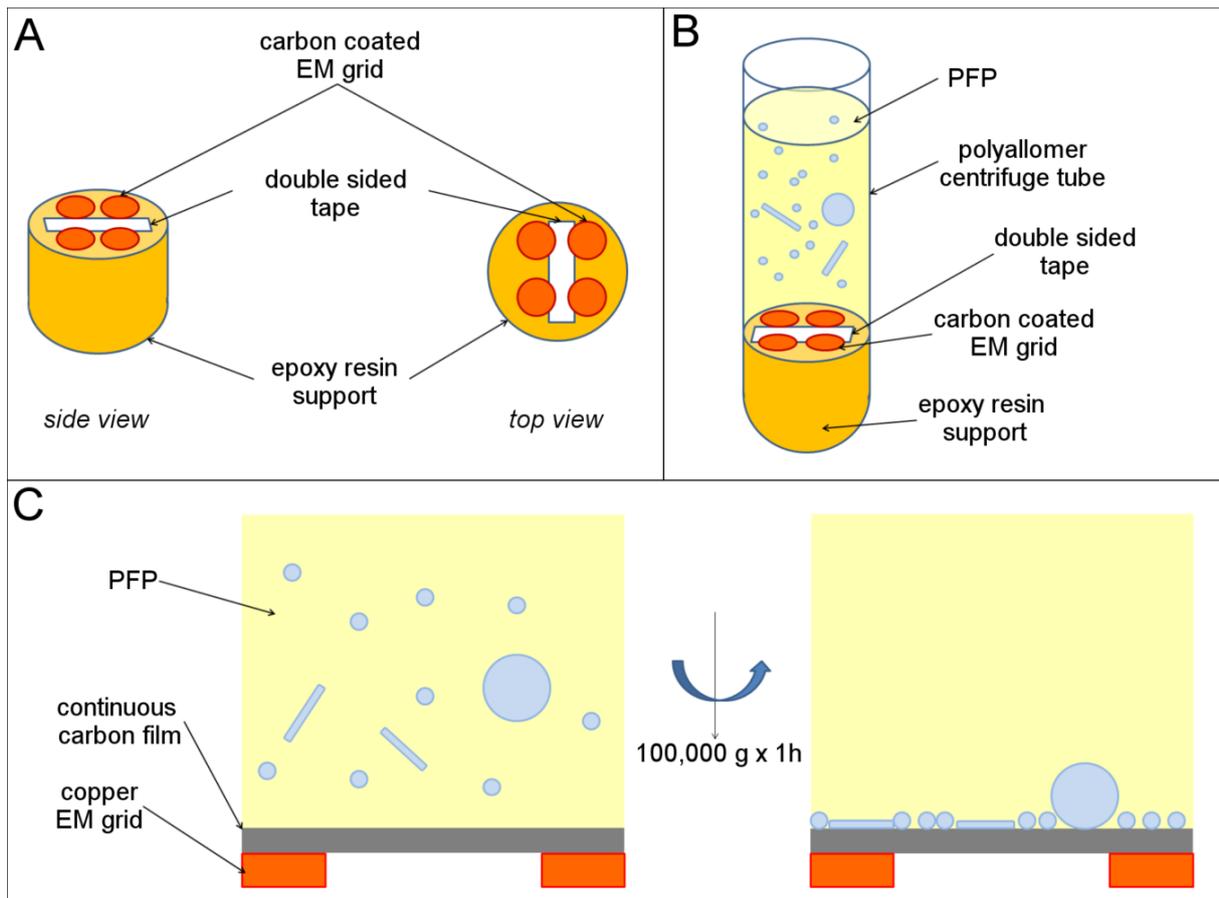
## **Fig. 2 - Gallery of TEM images of EVs from PFP samples**

(A-C), EVs imaged by Cryo-TEM after gold-labeling. (A), Spherical EVs after labeling with Anx5-gold-NPs, illustrating the high labeling specificity. Scale bar: 100 nm. (B), (inset), low magnification view of a large membrane fragment (contoured with a back dashed line). Scale bar: 1  $\mu\text{m}$ . The image represents an enlarged view of the boxed area in the inset, showing the dense and homogenous labeling with Anx5-gold-NPs. Scale bar: 0.5  $\mu\text{m}$ . C, Tubular EV labeled with anti-CD235a-gold-NPs. Scale bar: 0.5  $\mu\text{m}$ . White asterisks in A-C point to areas of the carbon film.

(D-F), Images of EVs observed on EM grids after sedimentation. (D), EVs presenting a near-circular shape, covered with Anx5-gold-NPs. Scale bar: 200 nm. (E), Large fragment homogeneously labeled with Anx5-gold-NPs. Scale bar: 1  $\mu\text{m}$ . (F), Tubular EV labeled with anti-CD235a-gold-NPs. Scale bar: 0.5  $\mu\text{m}$ .

In (A-F), very rare gold-NPs are present in the background, illustrating the high specificity of labeling.

Adapted from [16] and [17].



**Fig. 3 - Scheme of the procedure of EV sedimentation on EM grids**

(A), Side and top views of an epoxy resin support with a hemispherical end on one side and a flat surface on the other side. A thin piece of double-sided tape is fixed on the flat surface and four EM grids coated with a continuous carbon film are deposited on the tape edges.

(B), The epoxy support with four attached EM grids is inserted in a centrifuge tube before filling the tube with a PFP suspension.

(C), Scheme of an EM grid coated with a continuous carbon film with an overlying PFP suspension before (left) and after (right) centrifugation.

Adapted from [16].