

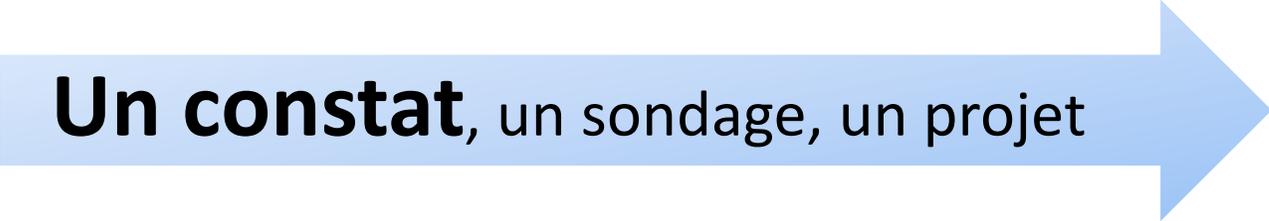
# Standardisation de la métrologie des EVs en milieu complexe

*Un constat, un sondage, un projet*



**Céline Elie-Caille,**  
Besançon, France

# Un constat, un sondage, un projet



## Manque de standardisation des méthodes métrologiques des Evs en milieu complexe

- Un même échantillon biologique : plusieurs résultats différents



Technique ?  
Protocole employé ?  
Etape préanalytique ?  
Purifié ? Enrichi ?

- Selon l'échantillon et l'objectif d'étude : pas la même exigence métrologique



Contrôle qualité / bioproduction ?  
Approche diagnostic ?  
Application thérapeutique ?

- Calibration, calibrants, référentiels ?



Calibrant biomimétique ?  
Référentiel & contrôle négatif ?  
Signal / bruit ?

# Un constat, un sondage, un projet

## Guidelines MISEV 2018 / JEV 2019 :

- Characterization of single vesicles: use two different but complementary techniques, NTA or TRPS + EM or AFM

Mais...

Quid du référentiel en NTA ? Refractive index ?

Quid de la déformabilité des Evs sur substrats pour EM ou AFM

Quid du mode et conditions d'imagerie AFM ?

Quid de la méthodologie d'acquisition ?

Normalisation par rapport à référentiel ?

Quid de la méthode utilisée pour le traitement des datas ?

Table 2. Steps of EV characterization.

Major recommendations of MISEV2014	Validity and/or Update in 2018
a) No recommendation on quantification	<p>New in MISEV2018: As a rule, both the source of EVs and the EV preparation must be described quantitatively. Sources: Number of cultured cells (possibly an estimate, if adherent, as well as intervals of harvest; tissue approx; not be</p> <p>16 C. THÉRY AND K. W. WITWER</p> <p>proteins (usually the tetraspanins CD9, CD63 and/or CD81, but sometimes tumor-specific proteins or other molecules such as lipids [139]) and can be used to estimate the amount of EVs containing this particular component, rather than total EVs. These methods provide additional information to the above methods and are in line with characterization recommended in part 4b (p.16).</p> <p>Still valid: Table 3 (least 3 protein subtyr; a func</p> <p>1. All EV cells), the pr GPI-ar protei expre: 2. In all bacter demoi one c) showr other 3. Purity prepar (lipop 4. Protei endos 5. Solubl extrac a spec d), be</p> <p>still valid EVs. Techni and re micro: intercd and w ii. Single techni field c high r field-flow fractionation (FFF), or fluorescence correlation spectroscopy (FCS), high-resolution flow cytometry). Chemical composition measured by Raman spectroscopy.</p>
b) General characterization. Show: i. At least three positive protein markers of EVs, including at least one -transmembrane/lipid-bound protein -cytosolic protein ii. At least one negative protein marker	<p>separate large microvesicles retained by 0.65 micron filters, and small "exosomes" passing through 0.1 micron filters [209]. Others further separated the high speed pellet to identify subpopulations of small EVs bearing different surface markers such as A33 antigen (GPA33) vs EPCAM [19], lipid moieties binding Cholera Toxin, Annexin-V or Shiga Toxin [139], or tetraspanins CD63, CD9, and/or CD81 [208]. EVs were also separated by floating at different densities within a sucrose gradient (defined as high density "HD-exo" vs low density "LD-exo") [210] or eluting at different time points in asymmetric flow field-flow fractionation (AF4) (small "exo-S" vs large "exo-L") [112]. These studies together provide a rich source of potential EV subtype-specific markers. However, since they were performed with different separation approaches and with different cellular sources of EVs, it is still not possible to propose specific and universal markers of one or the other type of EVs, let alone of MVB-derived "exosomes" as compared with other small EVs.</p> <p>Consequently, MISEV2018 does not propose molecular markers that could characterize specifically each EV subtype. Of note, although the ISEV board tried in MISEV2014 to propose general rules applying to all EVs, some suggestions of MISEV2014 were still biased by an "exosome-oriented" view of EVs. Specifically, Table 1 of MISEV2014 listed, as primary components to analyze in EVs, 2 categories of proteins present or enriched in EVs/exosomes (membrane bound and cytosolic proteins), plus another global category of proteins « not expected in EVs/exosomes » (such as mitochondria, Golgi, or nuclear proteins), and a last category of « contaminants ». In this updated version, MISEV2018, reference to exosomes and the proteins expected or not in them (the previously called "negative controls" of "exosome" preparations) have been deleted, reflecting an evolving understanding of the subtypes of EVs and their associations with other entities. Incorporation of any given component of the cytoplasm or other cellular compartment into an EV</p> <p>Single and multiple measures and implications for purity. Quantification methods are the most informative for EVs recovered by separation methods with the highest expected specificity (Table 1a-category 3), and for these preparations, one quantification method may suffice; in contrast, more than one quantification should be used for EVs recovered from low-specificity methods. Importantly, ratios of the different quantification methods may provide useful measures of purity. For example, protein:particle ratio [198,199], protein:lipid ratio [186,188,200] and RNA:particle [201] have been proposed as possible purity metrics, although their applicability across protein, lipid, RNA and particle quantification methods remains to be established. Techniques that measure multiple parameters at once, such as colloidal nanoplasmonic assays or infrared (IR) spectroscopy [188,199] may be good optional methods, despite the need for specific sensors or other</p> <p>Absolute EV sizing and counting methods are currently imperfect and will require further improvement, aided by appropriate EV reference standards that are now in development [202]. Nevertheless, current methods can provide a reasonable indication of particles per volume and particle size distributions that are best interpreted when combined with general (Table 2b) and single-particle (Table 2c) characterization.</p> <p>Characterization of EVs by their protein composition Selection of proteins for use as EV markers. Since MISEV2014, the growing recognition of the existence</p>
c) Characterization of single vesicles: use two different but complementary techniques, for example: i. electron or atomic force microscopy (and show both close-up and wide-field) ii. single particle analyzers (not electron microscope-based)	<p>For the I perfect total f compi can be protei quanti meas.</p>

# Un constat, un sondage, un projet

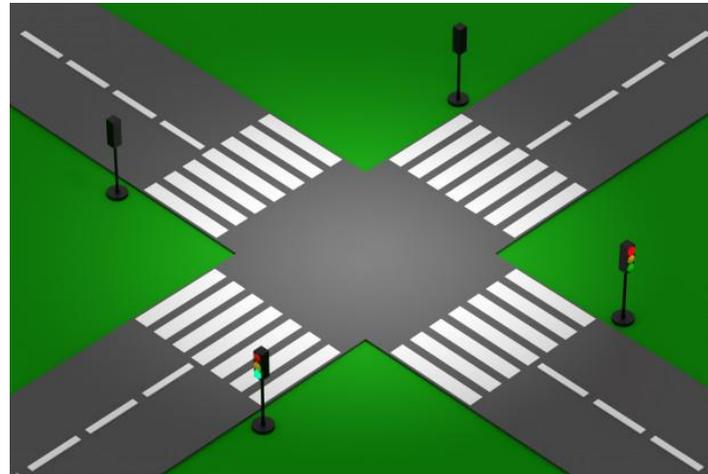
Un positionnement au carrefour des disciplines



Membre,  
coauteur position paper JEV 2018 (MISEV)  
doi: 10.1080/20013078.2018.1535750



Membre,  
coauteur position paper ADRR 2021 (soumis)  
« Development of EVs-based medicinal products: a  
position paper of the group “Extracellular Vesicle  
translatiOn to clinical perspectives – EVOLVE France”



Normalisation (LNE)  
Guides et procédures techniques  
Etudes intercomparatives

Création et animation d'un axe  
« vésicules extracellulaires »



Correspondante NanoMétrologie Est

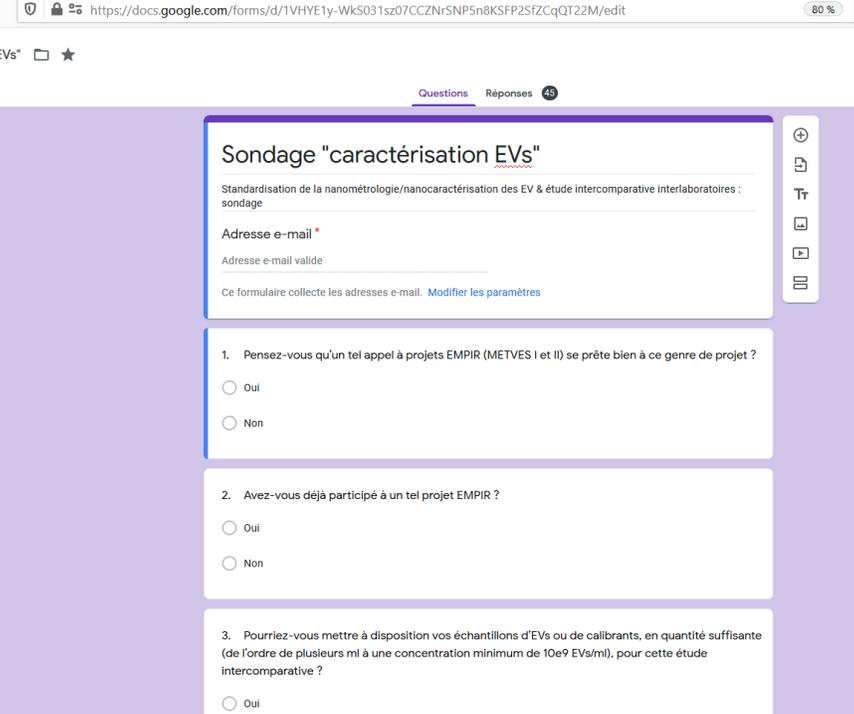
# Un constat, **un sondage**, un projet

## Les questions :

- Mise à disposition d'expertise ?
- Mise à disposition de techniques, analytique ou préanalytique ?
- Fourniture en échantillons ?
- Fourniture en calibrants ?
- Traitement de données

## Communication:

- Newsletters FSEV, Club Nanométrie, C'Nano
- École d'été SFNano/FSEV, Septembre 2021

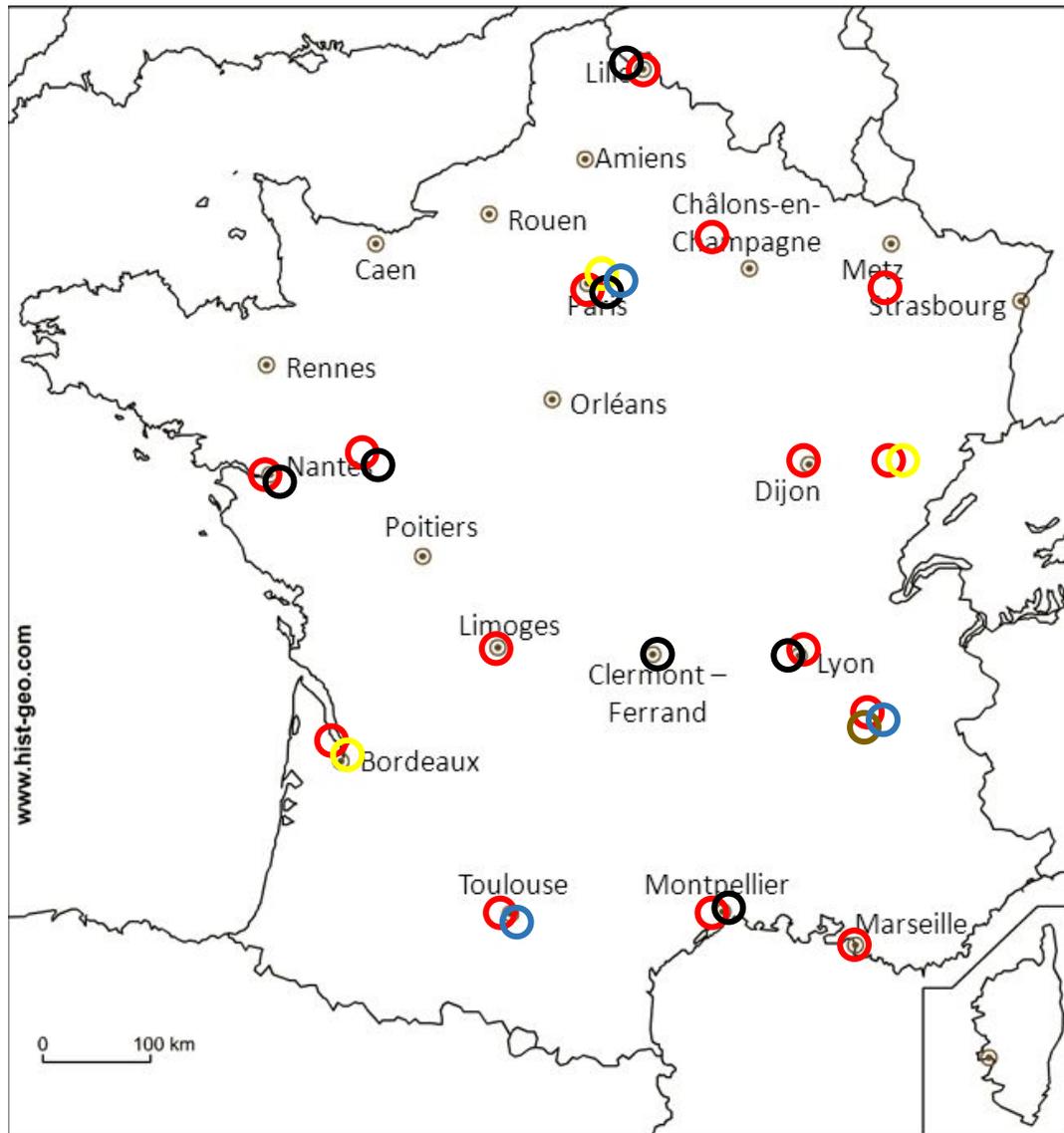


The image shows a screenshot of a Google Forms survey. The browser address bar at the top displays the URL: <https://docs.google.com/forms/d/1VHYE1y-WkS031sz07CCZnrSNP5n8KSP2SfZCqQT22M/edit>. The survey title is "Sondage \"caractérisation EVs\"". Below the title, the subtitle reads "Standardisation de la nanométrie/nanocaractérisation des EV & étude intercomparative interlaboratoires : sondage". There is a required text field for "Adresse e-mail" with a red asterisk and a validation message "Adresse e-mail valide". A note states "Ce formulaire collecte les adresses e-mail. [Modifier les paramètres](#)". The survey contains three multiple-choice questions:

1. Pensez-vous qu'un tel appel à projets EMPIR (METVES I et II) se prête bien à ce genre de projet ?  
 Oui  
 Non
2. Avez-vous déjà participé à un tel projet EMPIR ?  
 Oui  
 Non
3. Pourriez-vous mettre à disposition vos échantillons d'EVs ou de calibrants, en quantité suffisante (de l'ordre de plusieurs ml à une concentration minimum de 10e9 EVs/ml), pour cette étude intercomparative ?  
 Oui

# Résultats du sondage « Caractérisation de la métrologie de Evs en milieu complexe » / vers un projet METVES III

Par Celine Elie-Caille (FEMTO-ST, Besancon)



## Sur env 50 réponses

	%
personnes ayant déjà participé a un projet EMPIR	7
personnes pouvant mettre a disposition ech ou calibrants	67
personnes pouvant mettre a disposition technique	95

- Techniques Préanalytiques
- Techniques analytiques
- Ressources biologiques
- Traitement données / bioinformatique
- Tests fonctionnels sur cellules

# Résultats du sondage « Caractérisation de la métrologie de Evs en milieu complexe » / vers un projet METVES III

Par Celine Elie-Caille (FEMTO-ST, Besancon)

Analyse quantitative et structurale	informations obtenues
qnano nanosight DLS potentiel zeta TRPS videodrop	taille, concentration, potentiel zeta
elisa cytometry HS FC FACS Lyric Raman spectroscopy	phénotypage
optical microscopy electronic microscopy cryo-EM AFM* confocal microscopy at high resolution TIRF Advanced Photonic microscopy	observation, taille et morphologie
AFM-IR AFM-SERS exoanalysis exoview	approches combinées "taille,morpho,signature"
BLI SPR & SPRi QCM-D techno SMR/SNR	Biodetection, phénotypages et piégeage des sous-populations

Analyses fonctionnelles	
fonctionnal tests on cells microRNA WB cell insight	Tests fonctionnels
Méthodes pré-analytiques	
A4F DLD qEVs UC	Pré-analytique : tri
Traitement de données	
logiciel image treatment (mountains SPIP) informatics tools (Biomane?)	traitement de données
type d'échantillons biologiques	
HUVEC EVs EVs diverses origines EVs issues de Biobanques (LCS, sang, cerveau)  EVs dérivés de tissu cardiaque murin EVs d'adipocytes, lymphocytes, cellules dendritiques, cellules endothéliales EV bioproduction Customised EVs EVs d'épididymosomes de souris	<i>Pourriez-vous mettre à disposition vos échantillons d'EVs ou de calibrants, en quantité suffisante (de l'ordre de plusieurs ml à une concentration minimum de 10e9 EVs/ml), pour cette étude intercomparative ?</i>

industriels

# Un constat, un sondage, **un projet**

## METVES III ?

- Standardisation des méthodes de mesures métrologiques et morphomécaniques, en milieu complexe
- Utilisation des standards (reference materials) du METVES II

**METVES II** Standardisation of concentration measurements of extracellular vesicles for medical diagnoses EURAMET

News Project Output People Contact Links

### METVES II overview

#### METVES II

Extracellular vesicles (EVs) are cell-derived particles in body fluids, which have excellent potential as next generation biomarkers for the early diagnosis of common diseases, such as cancer and thrombosis. This project aims to tap into the clinical potential of EVs by developing traceable measurements of number concentration, size distribution, refractive index (RI) and fluorescence intensity of cell-specific EVs in human blood and urine.

To realise our aims, we will develop synthetic reference materials with physical properties resembling EVs ([work package 1](#)), instrumentation and procedures to standardise EV measurements in clinical laboratories ([work package 2](#)), and ready-to-use biological test samples ([work package 3](#)). These will then be evaluated in an inter-laboratory comparison study across a range (>20) of standard flow cytometers in clinical labs ([work package 4](#)).

#### Publishable summary

[Publishable Summary for 18HLT01 METVES II Standardisation of concentration measurements of extracellular vesicles for medical diagnoses](#) (pdf, <1 MB)  
EURAMET, Brunswick, Germany  
June 2019

#### Workpackages

**WP1 Development of reference materials**

- Hollow organosilica beads
- Liposomes
- Low-RI solid particles

**WP2 Development of reference methods to characterise reference materials**

- Number concentration
- Size
- Refractive index
- Fluorescence intensity

**WP3 Development and characterisation of biological test samples**

- Questionnaire
- Ready-to-use EV samples

**WP4 Creating impact**

- Inter-laboratory comparison study: reproducible measurements of EV concentration in biological test samples (**WP3**) by reference materials (**WP1, WP2**)
- Dissemination of technology and infrastructure

**WP5 Management and coordination**

Overview of the work packages (WPs) of METVES II. EV: extracellular vesicles; RI: refractive index.

Copyright © 2021 VSL info@vsl.nl CMS: MODx Powered by Earrebarre.com

# Un constat, un sondage, **un projet**

UNE mesure métrologique, mais différents objectifs, différents contextes...

## Mesurande

- Diamètre moyen ?
- Volume moyen ?
- EVs globales ou sous-populations ?

## EVs

- Pour le diagnostic ?
- Comme vecteur thérapeutique ?
- Pour du contrôle qualité / bioproduction

## Objectif de l'étude des EVs

- Purement analytique
- Analytique puis récupération/recovery
- Analyse fonctionnelle

## Dans les méthodes analytiques

- Avec ou sans marquage ?
- En 1 ou plusieurs étapes ?

## Evs, isolées ou en milieu complexe :

- Isolées (par UC, A4F, SEC, DLD, ...)
- En milieu complexe : discrimination
  - Phénotype ?
  - Elasticité ?
  - Contraste/indice de refraction ?

## Calibrants

- Nature
- Compatibilité technique analytique
- Biomimetisme
- Qualitatif ?
- Qualitatif et quantitatif ?

# Vers une échelle de maturité métrologique ?

**Rendements et  
caractérisation**

**Contrôle qualité /  
bioproduction**

**Ciblage & études  
fonctionnelles**

**Comme vecteur  
thérapeutique ?**

**Pour le diagnostic ?**

- Sur milieu brut ?
- Sur milieu prétraité ?
- Analyse en 1 ou plusieurs étapes ?
- Analyse sans ou avec marquage ?

- Jusqu'à la discrimination de sous-populations
- Jusqu'à la co-caractérisation de facteurs solubles
- Jusqu'à l'étude d'une cohorte
- Préanalytique (prélèvement, stockage, ...)

**Discrimination,  
pré-analytique**





## Workshop “standardization in EVs metrology”

Organisé par le club nanométrie

### Announce Workshop

25 Juin 2021

(mixte présentiel et visio)

#### Programme :

Introduction Celine & Paola (10 min)

Invite d’honneur : Rienk Nieuwland (resp METVES II) (20min)

**Jessica Gobbo** (chargée de recherches cliniques, CGFL, Dijon) : EVs en clinique, biomarqueurs en cancerologie / rech CLINIQUE

**Marie Morille** (associate professor, Montpellier) : EVs pour le délivrement de principes thérapeutiques / rech THERAPEUTIQUE

**Jeanne volatron** (Everzoom) : rech BIOPRODUCTION & THERAPEUTIQUE

**Collaborateur** /rech TRI, PREANALYTIQUE

**Collaborateur** / microscopie EM, cryoTEM, PREM, AFM / rech CHARACTERISATION

**Georges Favre** (LNE) : VAMAS, normalisation et standardisation de méthodes / rech NORMALISATION



# Du preanALytique, à la qualifiCAtion des sous-populations d'EVs , jusque la cLINique

## « ALCALIN »@EV



**Pascal COLOSETTI (Engineer)**  
*Inserm U1060-INRAe 1397-  
Université Lyon 1-CarMeN3*

European School for the Study of  
Extracellular Vesicles (ESSEV,  
@EV\_School\_ESSEV)

**Céline ELIE-CAILLE  
(Associate professor)**  
*Institut FEMTO-ST,  
UMR6174-CNRS, BESANCON*

**Jessica GOBBO (Clinical  
Research Scientist)**  
*INSERM 1231 « HSP-pathies  
», Centre Georges-François  
Leclerc, Dijon*

- Soutien par la Cancéropole Est
- Collaboration ac Suisse ? Interreg ? (HUG Geneve, Others ?...)
- Emilie Chalayer (Hématologie, St Etienne) ?
- Boite pharma ?

