

Mesures traçables de nanoparticules à disposition des laboratoires médicaux

Dans le futur, l'analyse des microvésicules dans les fluides corporels pourrait devenir un outil de diagnostic précoce en médecine. Pour cela, des méthodes fiables et traçables, pouvant être appliquées facilement dans les hôpitaux, doivent être mises en place. Grâce à la collaboration fructueuse entre des biologistes et des métrologues, une première étape vers la standardisation des mesures de microvésicules a été établie via le développement et l'application de matériaux de référence certifiés.

ANAÏS NICOLET

Une décision médicale est basée principalement sur le résultat d'analyses routinières de certains fluides corporels comme le sang ou l'urine. Les fluides corporels contiennent, outre les cellules, de nombreuses petites vésicules, appelées microvésicules (MVs). Ces dernières sont sécrétées par les cellules et varient entre les personnes saines et les personnes malades ; elles pourraient donc être utilisées comme nouvel outil de diagnostic précoce, améliorant ainsi l'efficacité d'un traitement médical. Ces MVs sont des fragments de cellule entourés d'une membrane, qui endossent diverses fonctions telles que l'activation de la coagulation sanguine ou la croissance des tumeurs et des métastases. Leur analyse est cependant rendue difficile à cause de leur petite taille, comprise entre 30 nm et 1 µm.

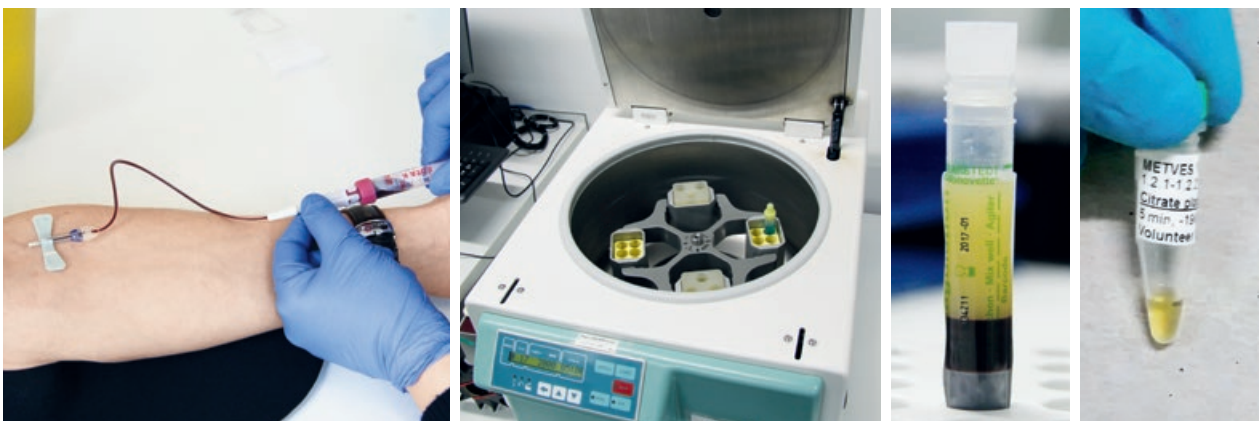
Bien que les MVs soient l'objet d'un large domaine d'études médicales à travers le monde, une meilleure compréhension des résultats ainsi qu'une standardisation des mesures sont nécessaires. En effet, les résultats ne sont souvent pas comparables entre les différentes méthodes de mesure et les laboratoires. Ceci est d'une part dû à un manque de procédure standardisée pour la préparation et la conservation des échantillons. D'autre part, les appareils de mesure utilisés dans les laboratoires cliniques ne sont pas traçables au système international d'unités (SI). Ces derniers doivent souvent être étalonnés à

l'aide de particules de référence qui ne sont elles-mêmes pas forcément certifiées. Une bonne caractérisation de ces particules est donc une étape essentielle vers des mesures fiables de MVs.

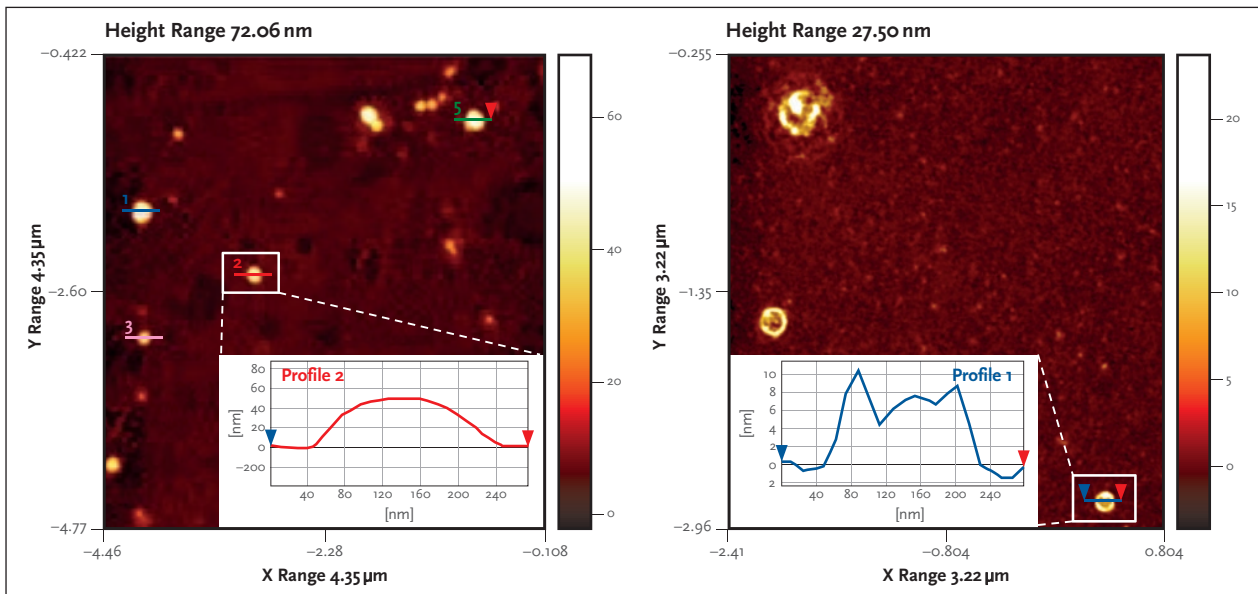
Travail collaboratif entre biologistes et métrologues

Dans le cadre du projet européen EMRP «Metrological characterization of micro-vesicles from body fluids as non-invasive diagnostic biomarkers» (www.metves.eu), quatre instituts nationaux de métrologie (NMIs) et un hôpital ont réuni leurs compétences respectives dans le but de développer des méthodes d'analyses fiables, comparables et quantitatives des MVs. Parmi les principales activités du projet, on peut citer la standardisation de la préparation des échantillons et leur conservation (figure 1), et la caractérisation des MVs. La façon dont un échantillon est traité et conditionné joue un rôle dans les résultats de mesure.

Les MVs peuvent être caractérisées à l'aide de plusieurs critères, comme la taille (et sa distribution), la concentration ou l'origine. L'origine peut, par exemple, être déterminée par une différence de morphologie. La figure 2 illustre cette différence entre une vésicule provenant d'un globule rouge (érythrocyte) et une vésicule sécrétée par une plaquette, toutes deux mesurées à l'aide d'un microscope à force atomique (AFM : Atomic Force Microscope) à METAS.



1: Préparation d'un échantillon de microvésicules (MVs) sécrétées par le plasma sanguin. Prise de sang et centrifugation. Le plasma (en haut) est collecté à l'aide d'une pipette et purifié puis transféré dans un flacon pour être stocké à -80°C .



2: La différence morphologique entre 2 vésicules, de forme sphérique ou toroïdale, peut être utilisée pour distinguer l'origine de microvésicules provenant de globules rouges (à gauche) ou de microvésicules provenant de plaquettes (à droite). Mesures réalisées à l'aide du microscope à force atomique de METAS.

Mesure de la taille et particules de référence

Dans ce projet, METAS s'est principalement occupé du développement de particules de référence pour la mesure de la taille. Les méthodes de mesure les plus couramment utilisées dans les laboratoires cliniques sont basées sur le principe de diffusion de la lumière, comme dans le cas du Flow Cytometry (FCM) et du Particle Tracking Analysis (PTA), ou détectent la variation de la résistance électrique en faisant passer un électrolyte contenant les particules à travers un orifice, comme le Resistive Pulse Sensing (RPS) [1]. Un des buts du projet a été d'assurer la fiabilité de ces méthodes de mesure cliniques, qui requièrent un étalonnage avec des particules, à l'aide de matériaux de référence certifiés.

Les particules de référence, dans le cadre de ce projet, se devaient d'obéir à des critères bien précis :

- forme sphérique : c'est la forme la plus facile à mesurer (un seul mesurande, le diamètre)
- taille similaire aux MVs
- distribution monodisperse : meilleure détermination de la précision d'un appareil de mesure
- indice de réfraction proche de celui des MVs : plusieurs méthodes cliniques utilisent des méthodes basées sur la diffusion de la lumière
- pureté des particules : minimum de perturbation dans les mesures

Comparaison inter-laboratoire de nanoparticules de référence

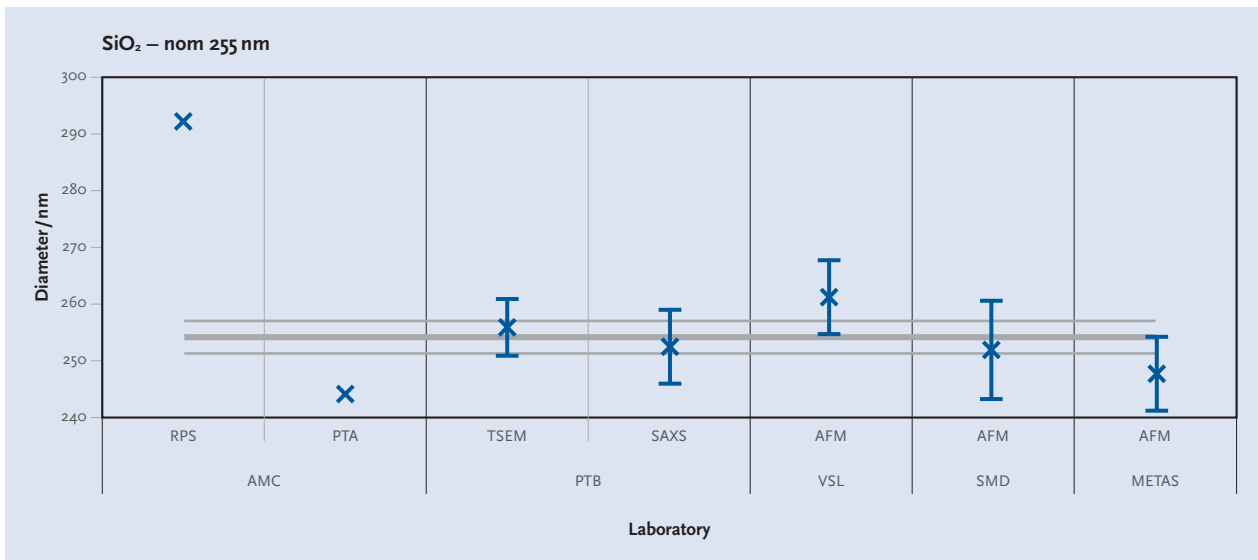
Après avoir évalué les capacités et les besoins de divers partenaires et utilisateurs [2], plusieurs échantillons de nanoparticules ont été évalués et caractérisés, les meilleurs sélectionnés afin de participer à une comparaison inter-laboratoire. Cette comparaison avait pour but l'établissement de valeurs de référence pour la taille, tout en s'affranchissant de la méthode de

mesure : les échantillons sont mesurés à l'aide de différents appareils, fonctionnant certes avec des principes physiques différents mais étant tous traçables au SI. Avec les résultats de chaque participant, il est possible de calculer une valeur moyenne de référence et son incertitude de mesure.

Cinq échantillons avec une distribution monodisperse (figure 3) et deux échantillons avec une distribution bimodale (un mélange de deux populations avec distribution monodisperse ; voir encadré), faits de silice ou de polystyrène, ont été mesurés lors de cette comparaison. Ces sept échantillons ont été mesurés par quatre NMIs ainsi qu'un hôpital, ce qui représentait cinq méthodes de mesure différentes, incluant des mesures en solution (PTA, RPS, SAXS), sous vide (TSEM) ou dans l'air (AFM).



3: Echantillons de nanoparticules en solution avec une population monodisperse utilisés pour la comparaison inter-laboratoire.



4: Résultats de la comparaison inter-laboratoire sur un échantillon monodisperse de silice. Les valeurs des NMI (PTB, VSL, SMD et METAS) sont en accord, alors que les valeurs obtenues par l'hôpital (AMC) sont plus éloignées. Cependant ces valeurs sont évaluées sans incertitude de mesure.

La méthode SAXS (Small Angle X-ray Scattering) analyse la dispersion élastique des photons du faisceau incident monochromatique de rayons X d'un synchrotron par les électrons des particules en solution. On obtient une information sur la taille de l'ensemble des particules en évaluant l'interférence des photons dispersés, le principe étant similaire à celui de la diffraction par fente. Dans le cas du TSEM (Scanning Electron Microscope in Transmission), un faisceau d'électrons est focalisé sur un échantillon mince et balaie ligne par ligne un champ déterminé. En analysant l'image ainsi formée et en appliquant des modèles obtenus par simulation, on peut évaluer la taille des particules. L'AFM est un «nano-profilomètre», où une pointe très fine, positionnée à l'extrémité d'un cantilever flexible vient interagir avec l'échantillon. La mesure de la déflexion du cantilever permet d'obtenir une information quantitative de topographie. En balayant une surface plane sur laquelle sont déposées des nanoparticules, on obtient une information sur leur hauteur équivalente au mesurande recherché.

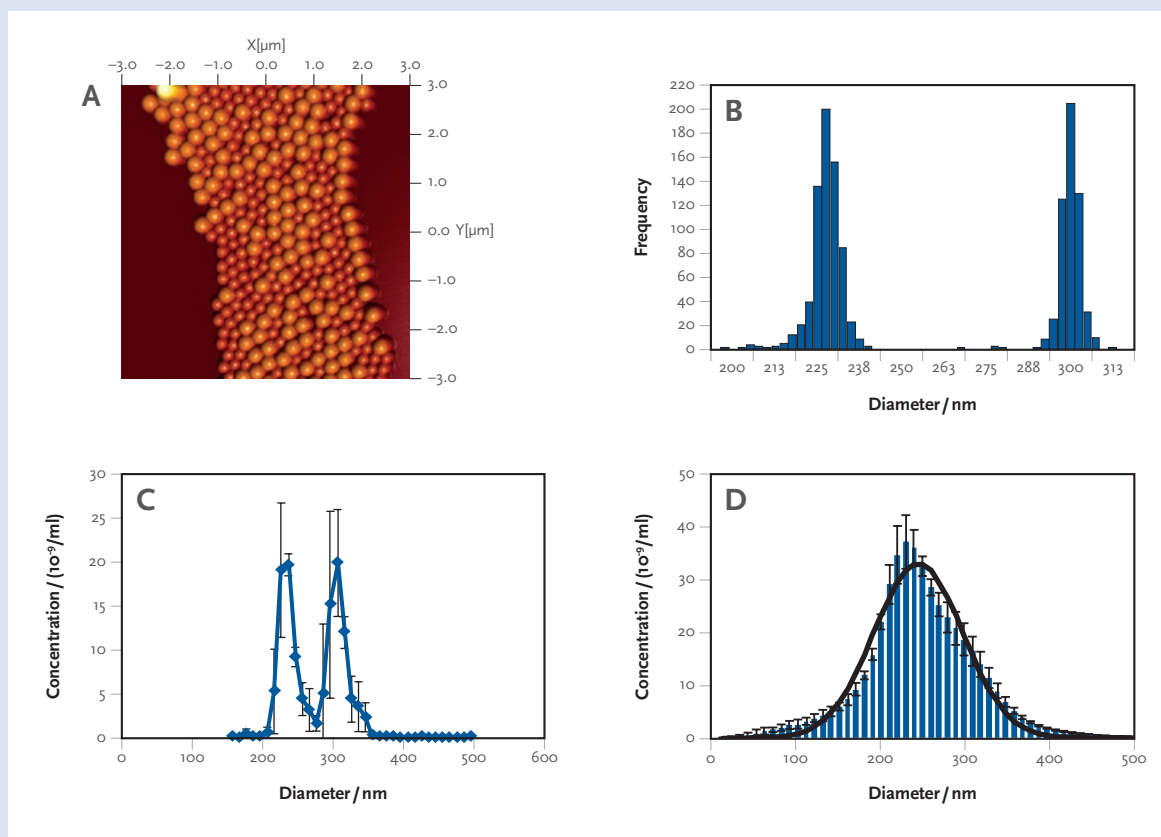
Tous les résultats de ces mesures ont été récoltés et analysés dans les détails par METAS. Les valeurs obtenues par les NMIs avec des méthodes traçables au SI sont majoritairement comprises dans l'incertitude de mesure, comme l'illustre la figure 4. La précision des méthodes des laboratoires cliniques a été évaluée en comparant leurs valeurs avec les valeurs moyennes obtenues par les NMIs. Pour les échantillons avec une distribution bimodale, les limitations actuelles de détection des appareils de mesure ont pu être mises en évidence. En effet les deux méthodes cliniques utilisées pour la comparaison n'ont pas été capables de distinguer clairement les deux sous-populations de particules (voir encadré). Les principaux résultats des analyses menées par METAS ont été publiés récemment [3].

Conclusion et perspective

Ce projet a remporté un franc succès. Le développement de procédures standardisées pour la collecte et la préparation des échantillons a été une réussite, puisque ces procédures sont déjà largement utilisées à travers le monde. Le projet a permis à METAS d'approfondir son expertise sur la mesure de taille de nanoparticules à l'aide d'un AFM pour des populations monodisperses et bimodales. D'ailleurs une première prestation d'étalonnage de nanoparticules pour un client a été réalisée en 2015. De plus, l'expertise de METAS dans ce domaine est reconnue par l'IRMM (Institute for Reference Materials and Measurements), un centre commun de recherche de l'Union Européenne.

Des matériaux de référence certifiés sont maintenant à disposition des laboratoires cliniques pour valider la mesure de la taille de leurs appareils (PTA, RPS et FCM). L'information sur la taille est également nécessaire pour déterminer la concentration, à l'aide de la densité massique par exemple. Enfin, ce projet a renforcé la collaboration entre biologistes et métrologues, puisque les métrologues sont maintenant appelés à étalonner les particules de référence, utilisées comme matériaux de référence dans les laboratoires cliniques.

Qu'est-ce qu'une distribution bimodale?



5: En statistique, une distribution bimodale est une distribution de probabilité avec deux modes (sommets) distincts. Dans le cadre du projet, un échantillon avec une distribution bimodale a été préparé en mélangeant deux populations distinctes de particules, chacune ayant une distribution monodisperse. Les échantillons bimodaux permettent non seulement de tester la sensibilité mais aussi la dépendance de la sensibilité à la taille d'une méthode de mesure. A) L'échantillon est composé de particules de polystyrène avec des tailles nominales de 248 nm et 315 nm. Sur cette image, les particules ont été mesurées à l'aide du microscope à force atomique (AFM) de METAS. B), C) et D) La distribution de taille des particules a été évaluée par les diverses méthodes de mesure des NMIs et d'un hôpital. Alors qu'avec l'AFM de METAS, les 2 populations de particules sont clairement séparées l'une de l'autre (B), la technique mesurant la variation de la résistance (RPS) est juste parvenue à distinguer les 2 populations (C). La méthode utilisant la diffusion de la lumière (PTA) n'a pas été capable de distinguer les 2 populations (D).



Contact:
Anaïs Nicolet,
collaboratrice scientifique
Longueur, nano- et microtechnologie
anaïs.nicolet@metas.ch
+41 58 387 06 47

Références

- [1] E van der Pol et al., J. Thromb. Haemost. 2014, 12(7).
- [2] A Nicolet et F Meli, http://www.metves.eu/downloads/reports/METVES_Report_Nicolet_2012_Reference_materials.pdf
- [3] A Nicolet et al., Meas. Sci. Technol. 2016, 27(3)

Rückführbare Messungen von Nanopartikeln für Medizinlabors

Die Analyse von Mikrovesikeln in Körperflüssigkeiten könnte in der medizinischen Frühdiagnose zukünftig eine wegweisende Rolle spielen. Dazu gilt es jedoch Methoden zu entwickeln, die nicht nur zuverlässig und rückführbar sind, sondern in den Spitälern auch einfach umgesetzt werden können. Als Referenzmaterial wurden folglich Referenzpartikel mit bestimmten Eigenschaften bezüglich Grösse entwickelt, mit denen die Zuverlässigkeit der Messmethoden sichergestellt wird.

Dank diesem Projekt konnte das METAS sein Know-how in der Messung von Nanopartikeln mithilfe eines Rasterkraftmikroskops für monodisperse und bimodale Populationen verbessern.

Das METAS bietet klinischen Labors die Zertifizierung von Referenzpartikeln an, um Grössenmessungen ihrer Geräte (PTA, RPS und FCM) zu validieren. Grösseninformationen sind wichtig, sie helfen auch bei der Messung von Konzentrationen, beispielsweise über die Massendichte.

Dank der erfolgreichen Zusammenarbeit zwischen Biologen und Metrologen existieren nun zertifizierte Referenzmaterialien, ein erster Schritt in Richtung Standardisierung der Messungen von Mikrovesikeln.

Misurazioni tracciabili di nanoparticelle a disposizione dei laboratori medici

In futuro l'analisi delle microvesicole nei fluidi corporei potrebbe diventare uno strumento della diagnostica precoce in medicina. Per questo devono essere creati dei metodi affidabili e tracciabili che possano essere facilmente applicati negli ospedali. Per assicurare l'affidabilità di questi metodi sono state quindi sviluppate delle particelle di riferimento caratterizzate sotto il profilo delle dimensioni in modo da fungere da materiali di riferimento.

Il progetto ha consentito a METAS di approfondire la sua competenza nella misura delle dimensioni di nanoparticelle con l'ausilio di un AFM per popolazioni monodisperse e bimodali.

Sono ora a disposizione dei laboratori clinici dei materiali di riferimento certificati per validare la misura della dimensione effettuata con i loro apparecchi (PTA, RPS e FCM). L'informazione sulla dimensione è necessaria anche per determinare la concentrazione, ad esempio con l'ausilio della densità di massa.

Grazie alla collaborazione proficua tra biologi e metrologi è stata raggiunta una prima tappa verso la standardizzazione delle misurazioni delle microvesicole mediante lo sviluppo e l'applicazione di materiali di riferimento certificati.

Traceable measurements of nanoparticles available to medical laboratories

In the future, analysing microvesicles in bodily fluids could become a valuable tool for early medical diagnosis. It will need reliable, traceable methods, which are easy to implement in hospitals, to be put in place. Reference particles have therefore been developed and characterised by size to use as baseline materials to check the reliability of these methods.

The project has given METAS the opportunity to strengthen its expertise in measuring the size of nanoparticles using an AFM for monodisperse and bimodal populations.

Certified reference materials are now available to clinical laboratories to check the size measurement capabilities of their equipment (PTA, RPS and FCM). Size information is also important in determining concentration, for example using mass density.

Thanks to the positive collaboration between biologists and metrologists, a first step has been taken towards standardising measurements for microvesicles by developing and applying certified reference materials.