

## **Apport de la cytométrie en flux dans l'étude des exosomes placentaires : pré-requis aux études de leurs effets biologiques**

Mathilde Bergamelli (mathilde.bergamelli@gmail.com), Hélène martin, Anne-Laure Iscache, Valérie Duplan-Eche, Fatima F. Lfaqihi, Cécile E malnou, Elsa Suberbielle, Daniel Gonzalez-Dunia

*INSERM UMR 1043, CNRS UMR 5282, Université de Toulouse, Centre de Physiopathologie de Toulouse Purpan, Toulouse, France*

Au cours de la grossesse, le placenta sécrète constamment des petites vésicules extracellulaires (sEV), notamment des exosomes, qui jouent un rôle important dans la communication materno-fœtale. Ces nano-vésicules (50-200nm) sont chargées de molécules participant à l'équilibre physiologique, dans leur organe d'origine comme à distance, et leur sécrétion et leur composition peuvent être altérées au cours des grossesses pathologiques. Notre projet s'intéresse à l'infection congénitale par le Cytomégalovirus humain (hCMV), qui peut entraîner de nombreuses lésions notamment cérébrales et neurosensorielles. Nous cherchons à évaluer l'impact de l'infection à hCMV sur la composition des sEV placentaires ainsi que leurs effets potentiels sur le développement cérébral fœtal.

Nous purifions par ultracentrifugation différentielle des sEV à partir de cellules placentaires infectées ou non par le hCMV. L'utilisation de la cytométrie en flux (CMF) permet d'étudier ces sEV sur plusieurs plans : quantitatif, morphologique, phénotypique et enfin fonctionnel. Un analyseur tel que le Mascquant VYB permet, grâce à une calibration précise, de mesurer la concentration en grosses et petites EV (estimation de la pureté en sEV). Toutes les sEV étant spécifiques de leur tissu d'origine, elles présentent à leur surface des marqueurs distinctifs de leur organe de production, rendant possible des tris par CMF afin de purifier un sous-type de sEV au sein d'une biopsie liquide. La CMF conventionnelle ou la cytométrie en image (CMI) sont des outils incontournables dans l'étude des sEV comme médiateurs biologiques. La CMI permet notamment d'effectuer les mises au point essentielles pour définir les concentrations et les cinétiques de contact de sEV placentaires afin de suivre leur internalisation dans des cellules d'intérêt (ici des cellules fœtales) avec un résultat statistiquement robuste comparé aux techniques de microscopie classiques.

La combinaison de ces techniques nous a permis de : quantifier, estimer la taille, mettre en évidence des marqueurs de surface et comparer l'expression de ces marqueurs entre les sEV placentaires issues de cellules infectées ou non par le hCMV. Après ces validations indispensables nous avons étudié le taux d'internalisation des sEV placentaires dans des cellules fœtales (fibroblastes et cellules souches neurales) dans le but d'analyser leurs effets biologiques dans le compartiment fœtal.

*Mots clés* : Exosomes - Vésicules extracellulaire - Cytomégalovirus - Placenta.