

## 14e Forum Cancéropôle Est

**De l'exposition environnementale aux biomarqueurs : les vésicules extracellulaires contenant des mitochondries comme médiatrices de la toxicité des hydrocarbures aromatiques polycycliques**

**Camille CHAUVIN**

*Doctorante en 3ème année*

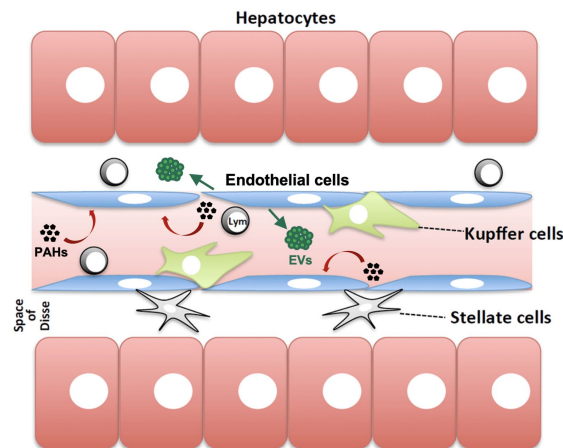
Sous la direction de :

LE FERREC Eric, Maître de conférences

SPARFEL-BERLIVET Lydie, Professeur des universités

Equipe "Stress, Membrane et Signalisation", dir : Sparfel-Berlivet Lydie & Podechard Normand  
Institut de recherche en santé, environnement et travail (Irset) - Inserm UMR\_1085

- Cellules endothéliales : gardiennes de l'homéostasie hépatique



**Structure du lobule hépatique**

(Adapté de Adams and Eksteen, 2006)

Team 3 SMS



Éric Le Ferrec



Céline Élie-Caille

Wilfrid Boireau

Benjamin Brunel

Eugénie Vidal

EXPRES

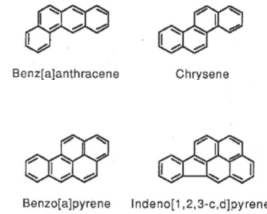


**Les EV, contenant ou non des mitochondries, comme nouveaux biomarqueurs d'exposition et de toxicité aux mélanges d'HAP d'origine alimentaire**

## HMEC-1 EV/MitoEV:

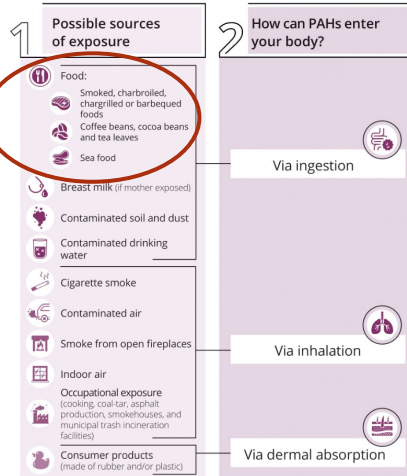
- **Isolement, caractérisation biochimique et fonctionnelle**
- **Communication intercellulaire et impact sur les cellules environnantes**
- **Devenir *in vivo***

## HAP

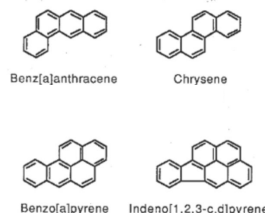


➤ **polluants environnementaux**

➤ 16 HAP : polluants prioritaires (1977, US-EPA)



## HAP



➤ polluants environnementaux

## Composition des mélanges expérimentaux :

### PAH4

PAHs	[PAHs] (nM)
Chrysene	35,43
Benzo[a]anthracene	24,73
Benzo[b]fluoranthene	21,36
Benzo[a]pyrene	18,48

= 100nM

- Mélange simple
- Évaluation du risque lié à une exposition alimentaire (EFSA, ECHA, US-EPA)

### PAH18\*

PAHs	[PAHs] (nM)
Pyrene	18,61
Phenanthrene	14,49
Fluoranthene	9,23
Naphtalene	7,69
Chrysene	7,25
Fluorene	7,11
Benzo[a]anthracene	5,06
Benzo[b]fluoranthene	4,37
Benzo[a]pyrene	3,78
Benzo[g,h,i]fluoranthene	3,70
Indeno[1,2,3-c,d]pyrene	3,15
Benzo[j]fluoranthene	2,77
Acenaphthene	2,71
Dibenzo[a,h]anthracene	2,52
Acenaphthylene	2,45
Anthracene	1,88
Benzo[c]fluorene	1,66
Benzo[k]fluoranthene	1,58

= 100nM

- Contient les HAP alimentaires majeurs (dont les 16 prioritaires)
- **Pertinence environnementale :** reflet de l'exposition alimentaire (EFSA)



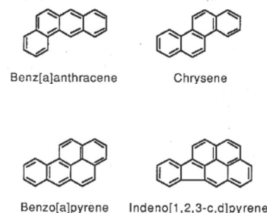
[https://www.hbm4eu.eu/wp-content/uploads/2022/03/HBM4EU\\_INFOGRAPHIC\\_PAHs.pdf](https://www.hbm4eu.eu/wp-content/uploads/2022/03/HBM4EU_INFOGRAPHIC_PAHs.pdf)

EFSA : Autorité européenne de sécurité des aliments ;  
ECHA : Agence européenne des produits chimiques

(\*Barathon et al., 2025)



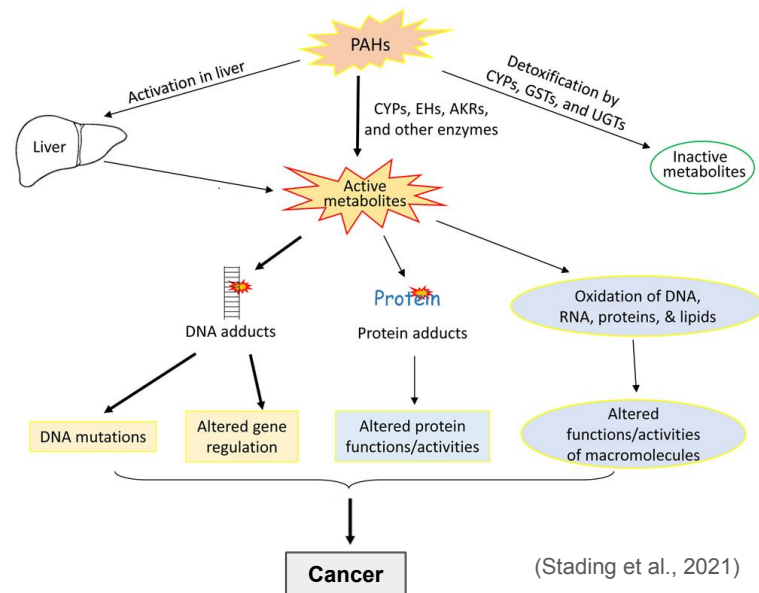
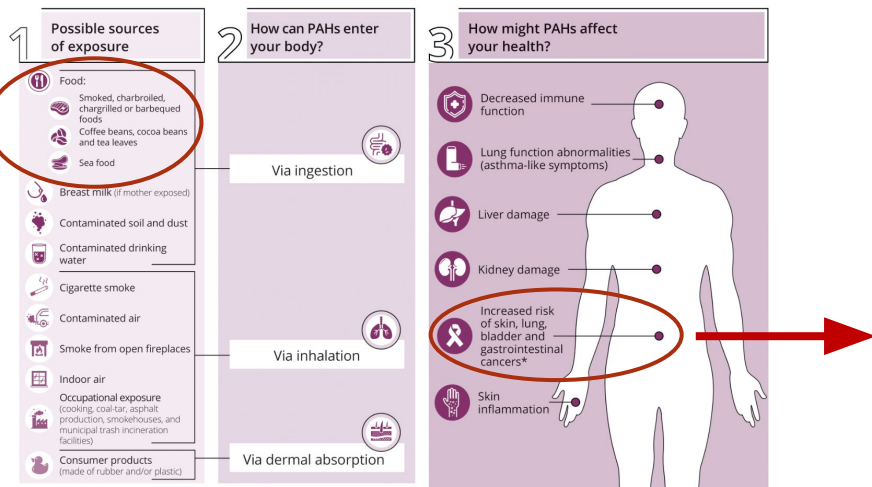
## HAP



### ➤ polluants environnementaux

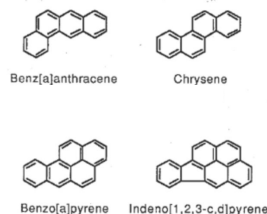
➤ Benzo[a]pyrène (B[a]P) : cancérigène de groupe 1 (CIRC)

➤ **L'apport alimentaire** en PAH4 est positivement associé au risque de **cancer du sein** et de **mortalité associée aux cancers de la trachée et des poumons** : cohorte E3N-Generations (Amadou et al., 2025 ; Marques et al., 2022)

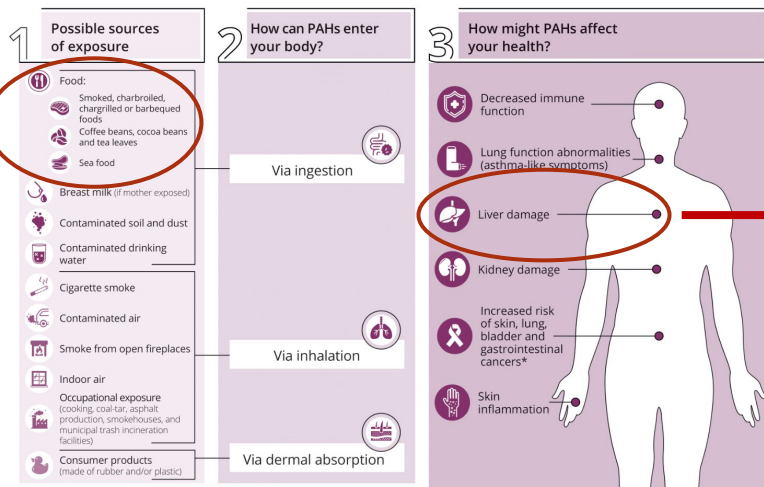


(Stading et al., 2021)

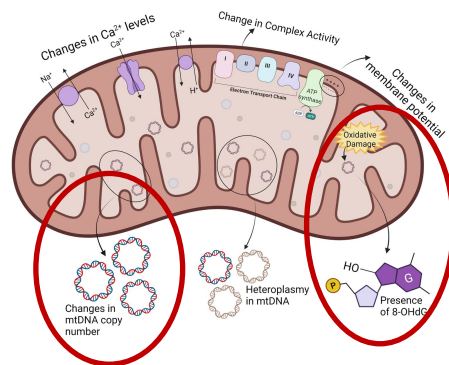
## HAP



➤ polluants environnementaux

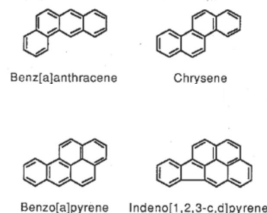


## Dysfonction mitochondriale :



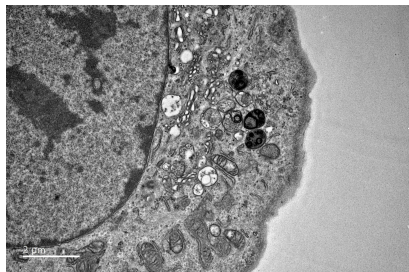
- ➔ Forte liaison à DNAm<sub>t</sub> (40–90× ADNn)
- ➔ Bioactivation CYP450
- ➔ ↑ ERO
- ➔ Altération du nombre de copie d'ADNm<sub>t</sub>

## HAP

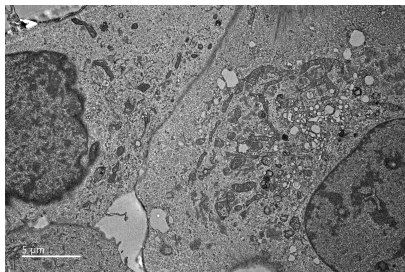


➤ polluants environnementaux

## Altérations mitochondriales des cellules HMEC-1 :



DMSO - 24h



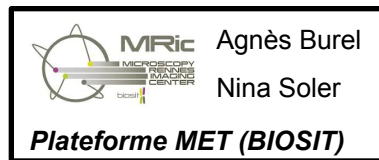
B[a]P 100nM - 24h



PAH4 100nM - 24h



PAH18 100nM - 24h



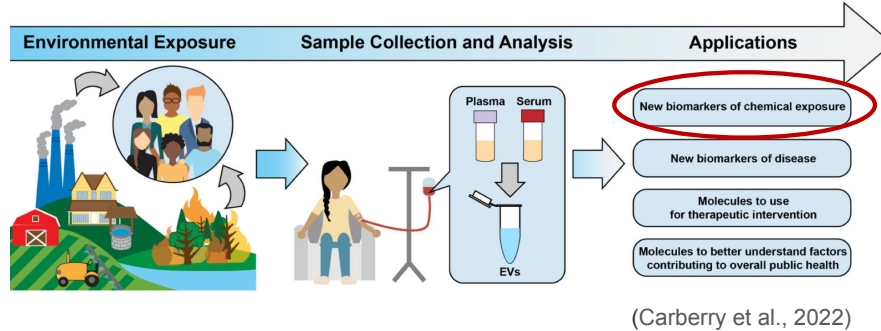
➔ **Réponse SIMH** après une exposition B[a]P 100nM\* :

- Blocage de la mitophagie
- Élongation mitochondriale (diminution DRP1/MFF, fission)
- Augmentation de la concentration d'ATP intracellulaire

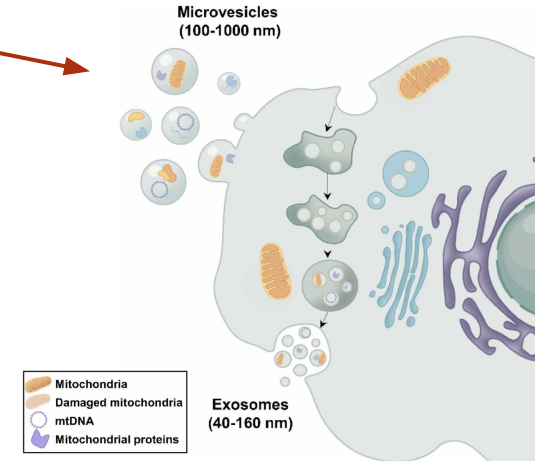
➔ **Témoin de souffrance mitochondriale**

(\*Guillouzoic et al., 2025 - under review)

SIMH : Stress Induced Mitochondrial Hyperfusion ; MET: Microscopie électronique à transmission



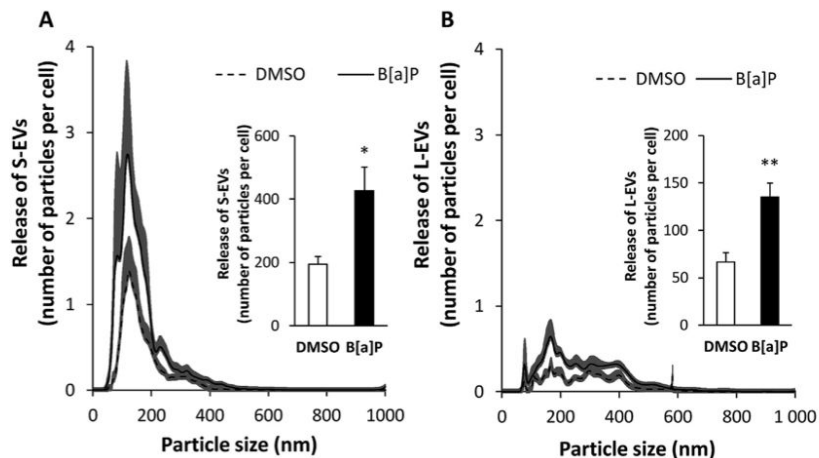
**EV = reflet cellulaire**  
**Mito-EV = reflet mitochondrial ?**



**Influence des HAP sur la production, le contenu et les caractéristiques des EV mitochondriales (MitoEVs) ?**

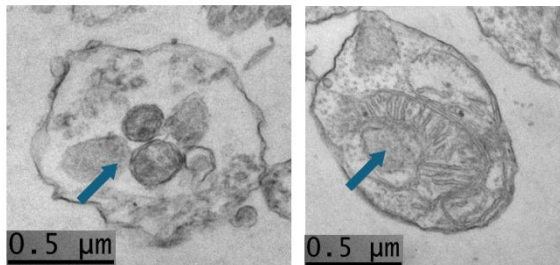


**Identifier des marqueurs protéiques, lipidiques et/ou mitochondriaux caractéristiques d'une exposition aux HAP**



B[a]P induit la libération d'EV par les cellules HMEC-1<sup>#</sup>

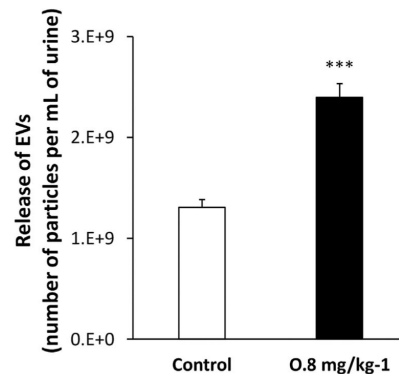
- **Surproduction** de S- and L- EV



Images de MitoEVs<sup>##</sup>

- **MitoEV libérées** par les cellules HMEC-1

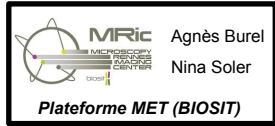
Passer d'expositions à un polluant unique à des expositions plus réalistes :



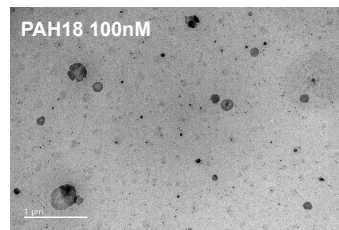
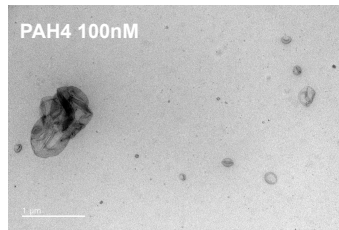
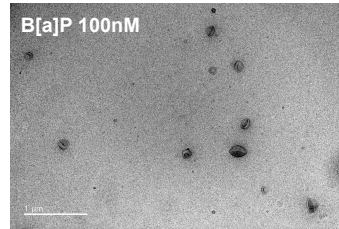
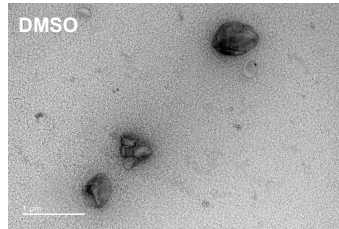
- Exposition au PAH16 *in vivo* augmente les niveaux d'EV dans l'urine<sup>#</sup>



# Images représentatives d'EV (coloration négative)



Agnès Burel  
Nina Soler

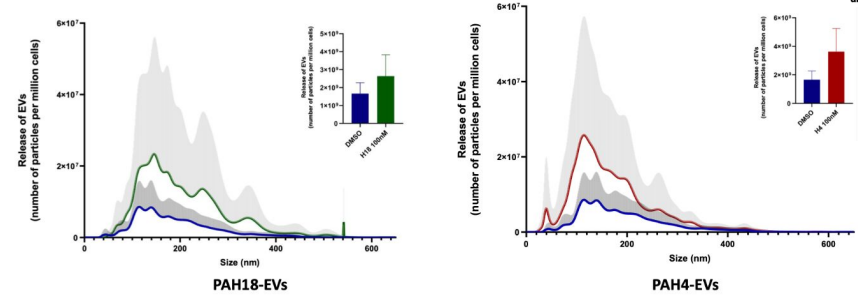


## PAH4 et PAH18 augmentent la libération d'EV, y compris les MitoEVs

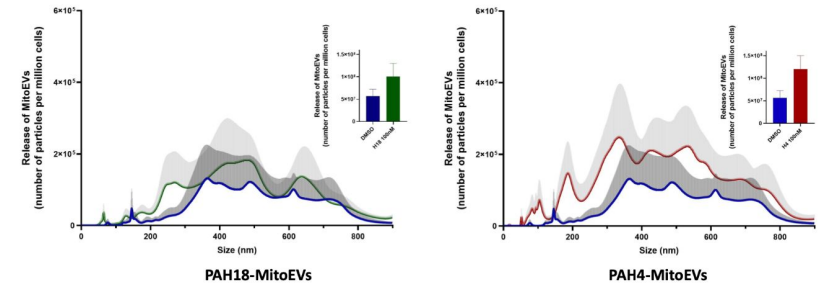


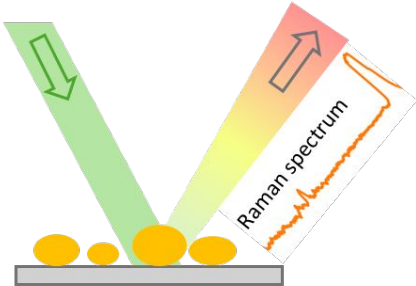
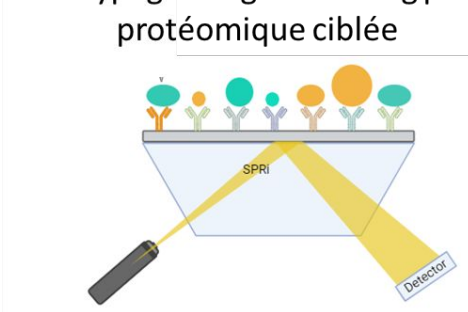
Nanoparticle tracking  
analysis (NTA)

### 1 – Augmentation de la production d'EV totales par les cellules HMEC-1



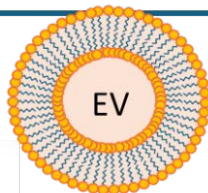
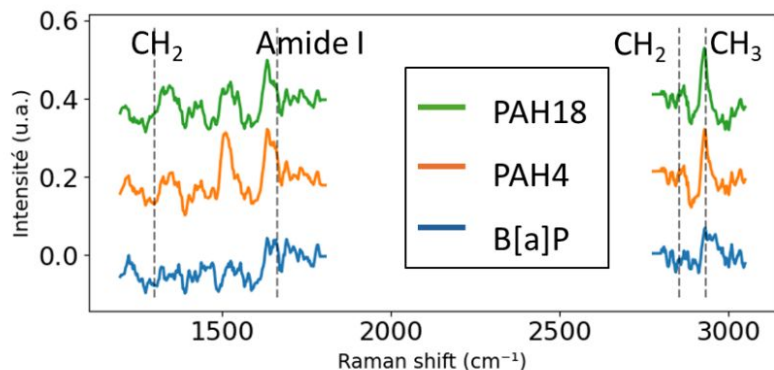
### 2 – Augmentation de la production de MitoEV par les cellules HMEC-1



Echantillon :	EVs isolées	Sécrétome
Substrat :	Wafer de silicium	Puce d'or
Technique :	Spectroscopie Raman	SPRI
Caractéristiques :	<p>Signature moléculaire : ratio lipides/protéines, saturation des lipides, structure secondaire des protéines.</p>  <p>The diagram illustrates the Raman spectroscopy setup. A green laser beam is directed at a substrate with yellow circular spots. A red arrow indicates the scattered light, which is then analyzed to produce a Raman spectrum graph shown on the right.</p>	<p>Signature phénotypique : Détection et dosages en temps réel et sans marquage des sous-populations EVs par immunopuce en <math>\mu</math>-arrays. Phénotypage et ligand-fishing pour la protéomique ciblée</p>  <p>The diagram illustrates the SPRI (Surface Plasmon Resonance Interferometry) setup. A yellow laser beam is directed at a gold chip (puce d'or) which has various colored spots representing different EV subpopulations. The scattered light is detected by a detector, and the setup is labeled with 'SPRI' and 'Detector'.</p>

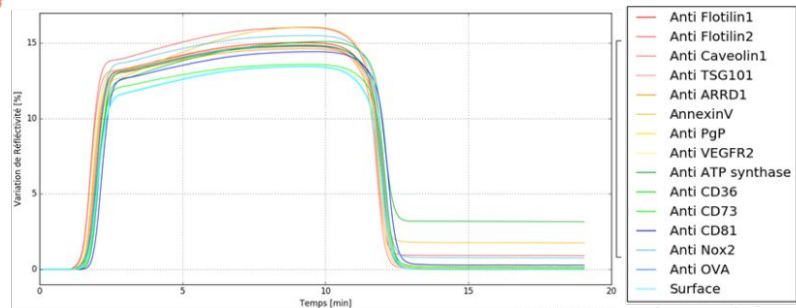
## Spectroscopie Raman

Spectres Raman de différence par rapport au contrôle :

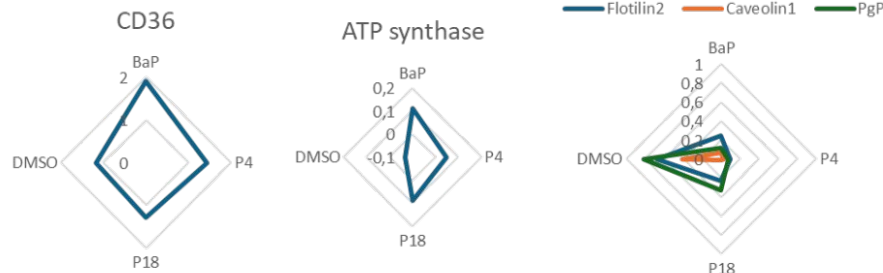


## Surface Plasmon Resonance Imaging

Sensorgrammes de détection multiplex des cibles EVs :



Marqueurs différenciants du contrôle :

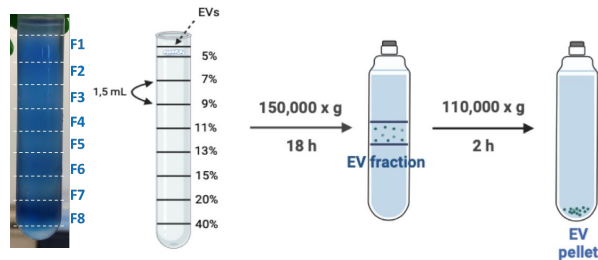


➤ Sur-expression

➤ Sous-expression

Conclusion : identifications de marqueurs (spectraux et antigènes) de l'exposition à différents hydrocarbures

## Tri des EV/Mito-EV endothéliales par DGUC

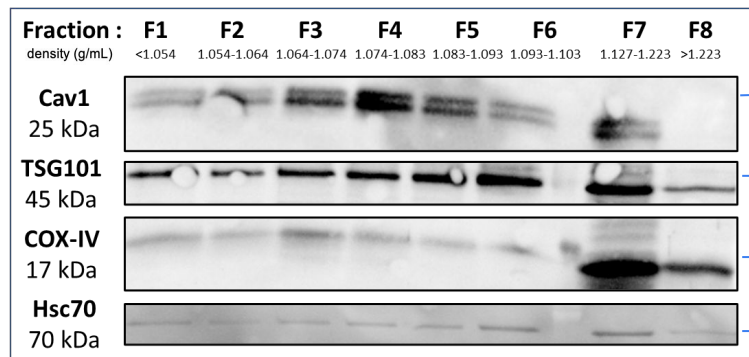


F1	<1.054
F2	1.054-1.064
F3	1.064-1.074
F4	1.074-1.083
F5	1.083-1.093
F6	1.093-1.103
F7	1.103-1.127
F8	1.127-1.223

Gradient density (g/mL)

## Validation du tri :

### Caractéristiques protéiques des fractions d'EV



Protéine membranaire

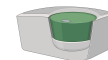
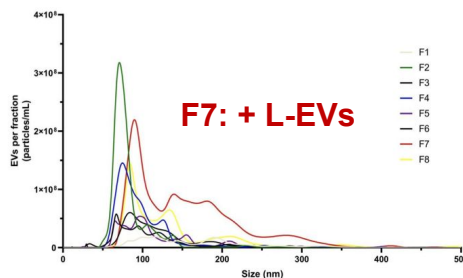
Protéine spécifique d'EV

Protéine mitochondriale

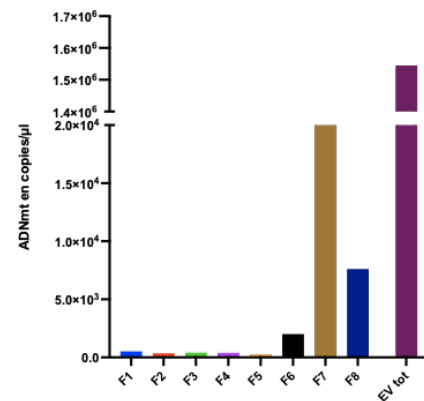
Protéine chaperonne

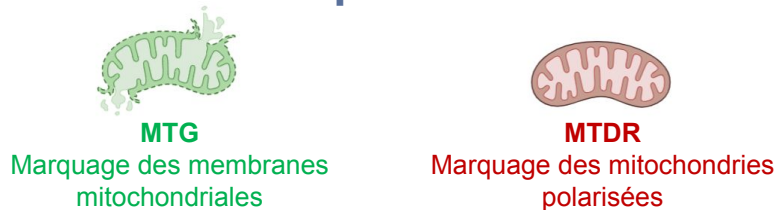


### Profils représentatifs des distributions de taille



### Quantification de l'ADNmt

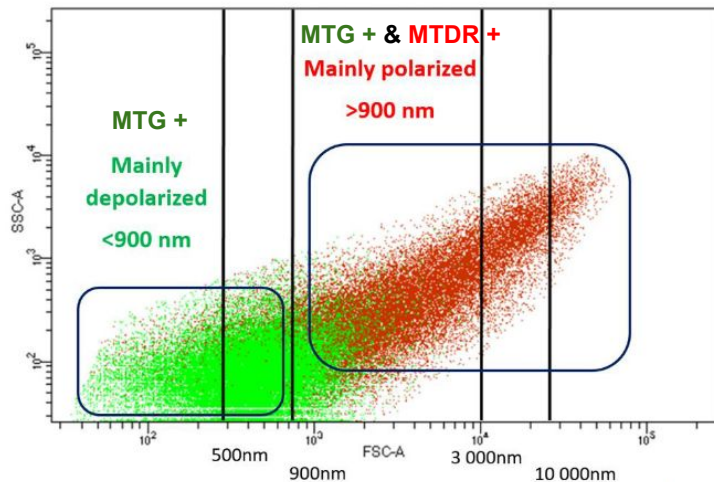




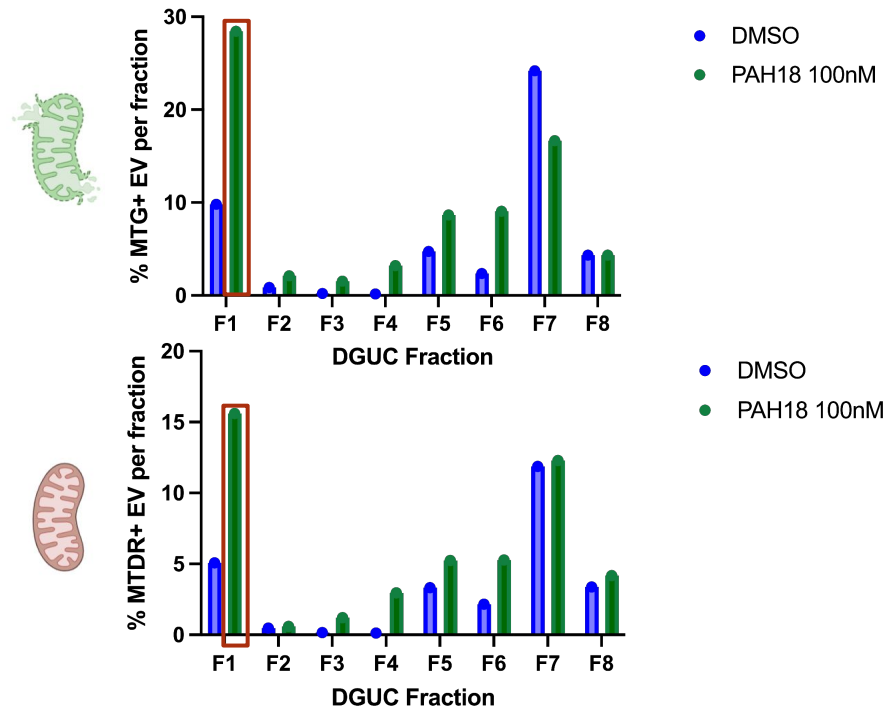
Ratio de fluorescence **MTDR/MTG**:

Indicateur de potentiel de membrane mitochondriale

Représentation du marquage MTDR/MTG pour B[a]P\_EVs (\*):



(\*) Travaux de Joan Guillouizouic



- Contrôle : Majorité des MTDR/MTG EV en F7
- PAH18 : ↑ **MTG/MTDR EV, majorité en F1**



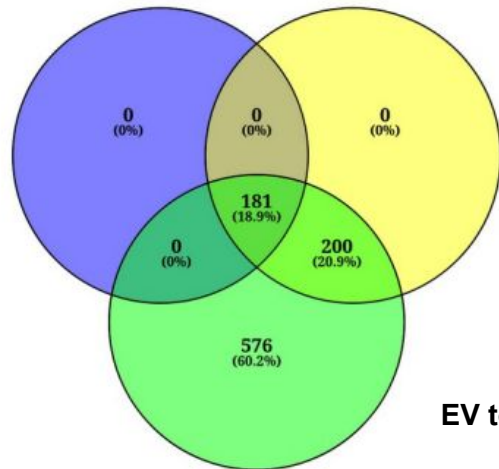
## Protéome des DMSO\_EVs

Diagramme de Venn selon les groupes protéiques :

EV sans mitochondrie

EV avec  
mitochondrie  
Fractions F6-F8

Fractions F1-F5



EV totales

EV totales : 1 057 groupes protéiques identifiés

DGUC\_EV : 381 groupes protéiques identifiés

Fractions F6–F8: 200 exclusifs → validation du tri par DGUC



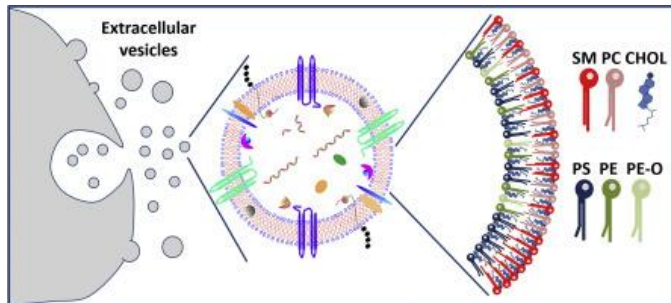
Classification fonctionnelle et de localisation subcellulaire (DAVID) :

Category	Term	Genes
GOTERM_CC_DIRECT	cytosol	62%
GOTERM_CC_DIRECT	extracellular exosome	55%
GOTERM_CC_DIRECT	cytoplasm	55%
GOTERM_CC_DIRECT	membrane	48%
GOTERM_CC_DIRECT	nucleus	42%
GOTERM_CC_DIRECT	plasma membrane	37%
GOTERM_CC_DIRECT	nucleoplasm	31%
GOTERM_CC_DIRECT	extracellular region	18%
GOTERM_CC_DIRECT	focal adhesion	16%
<b>GOTERM_CC_DIRECT</b>	<b>mitochondrion</b>	<b>13%</b>
GOTERM_CC_DIRECT	extracellular space	12%
GOTERM_CC_DIRECT	endoplasmic reticulum	12%
GOTERM_CC_DIRECT	protein-containing complex	11%
GOTERM_CC_DIRECT	perinuclear region of cytoplasm	10%

<https://davidbioinformatics.nih.gov/>

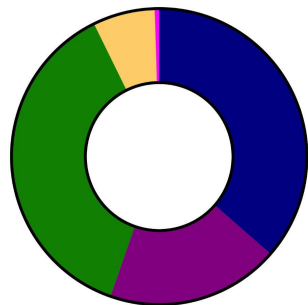
# Analyses multi-omiques :

## Lipidome des DMSO\_EVs



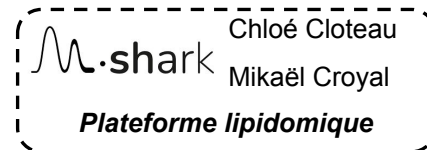
Enrichissement en sphingolipides

Nombreux phospholipides (PC, PE, PS...)



- 75 Glycerophospholipides
- 39 Sphingolipides
- 77 Glycerolipides
- 14 Fatty acyls
- 1 Sterol lipides

Total=206



- **EV totales et DGUC\_EV** : 206 espèces identifiées
- **GPL d'origine mitochondriale** : cardiolipine (6)
- **FA impliqués dans le métabolisme mitochondrial** : cartinine (3)

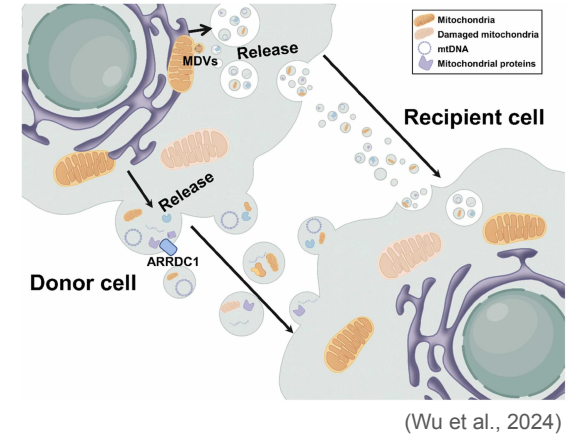
## Conclusion

- Mélanges PAH18 & PAH4 : surproduction d'EV & MitoEV par les cellules HMEC-1
- **Raman et SPRI** : identification de marqueurs selon l'exposition aux mélanges d'HAP ou B[a]P seul
- ➔ **Tri des sous-populations d'EV:**
  - *Fractions riches en MitoEV* vs. *fractions sans MitoEV*
  - Validation du protocole de tri par une approche multi-analytique
- Les premières analyses omiques et moléculaires révèlent des **compositions spécifiques aux MitoEVs** (cardiolipines, protéines mitochondriales, ADNmt)
- ★ **Résultats encourageants démontrant l'intérêt des EV en toxicologie environnementale et dans l'évaluation de l'exposome**



## Travaux en cours

- Caractérisation du **cargo des MitoEVs après exposition aux HAP** :
  - **Études protéomiques et lipidomiques**
  - **Composants (ADNmt) et activité mitochondriales**  
(potentiel de membrane, synthèse d'ATP et consommation d'O<sub>2</sub>)
- Exploration du **transfert intercellulaire des MitoEVs** et des **réponses des cellules cibles** :
  - **Impact sur cellules immunitaires (PBMC), hépatocytes et cellules étoilées**



## Perspectives à long terme

**Pertinence toxicologique** : préciser si les MitoEVs agissent comme des outils d'adaptation au stress et/ou comme des médiateurs de toxicité

**Vers des biomarqueurs** : évaluer les MitoEVs dans les fluides biologiques pour surveiller l'exposition environnementale aux HAP et mesurer les conséquences au niveau cellulaire

# Remerciements



Irset – Equipe 3

**Éric Le Ferrec**

**Lydie Sparfel-Berlivet**

Joan Guillouzouic

Valentine Brouard

**Partenaires ENDOMITOPAH :**



**Céline Élie-Caille**

**Wilfrid Boireau**

**Benjamin Brunel**

**Eugénie Vidal**

Anne Corlu

Caroline Aninat

Abol Zekri



Chloé Cloteau

Mikaël Croyal

**Plateforme lipidomique**



Lucile Guéno

**Plateforme cytométrie**



Agnès Burel

Nina Soler

**Plateforme MET (Biosit)**



Céline Henry

Marilina Fernandez

**Plateforme protéomique**