

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

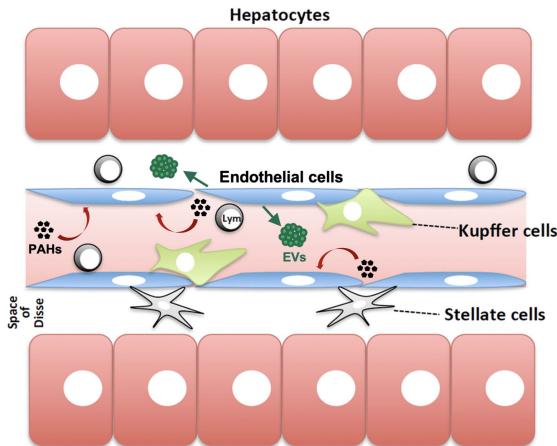
SPARFEL-BERLIVET Lydie, Professeur des universités

Equipe "Stress, Membrane et Signalisation", dir : Sparfel-Berlivet Lydie & Podechard Normand

Institut de recherche en santé, environnement et travail (Irset) - Inserm UMR_1085

Projet ENDOMITOPAH (2023 – 2027)

- 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

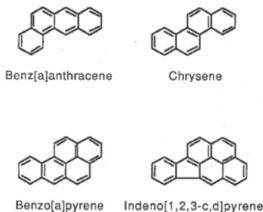


Les EV, contenant ou non des mitochondries, comme nouveaux biomarqueurs d'exposition et de toxicité aux mélanges d'HAP d'origine alimentaire

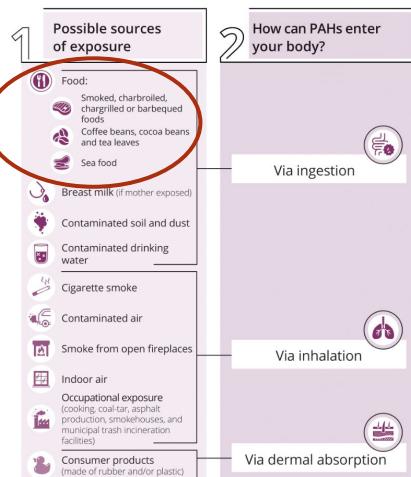
HMEC-1 EV/MitoEV:

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

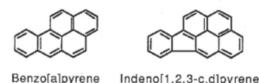
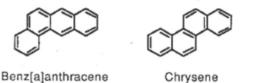
HAP



- 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
Naphthalene	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

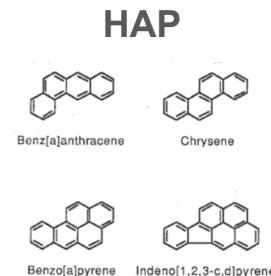
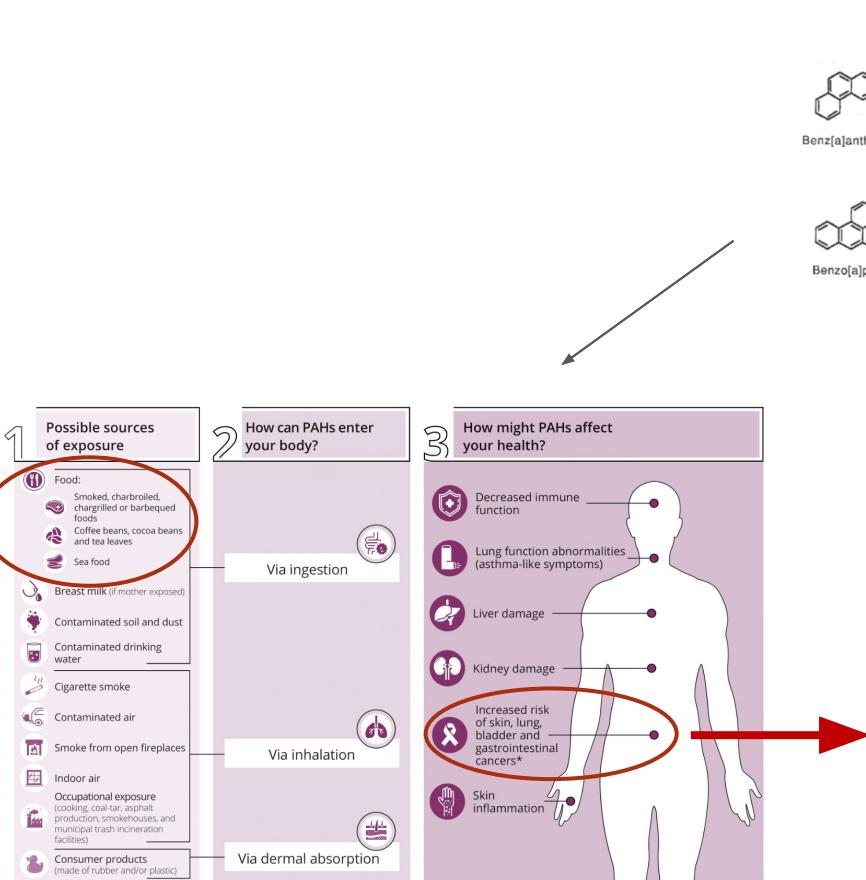
- Contient les HAP alimentaires majeurs (dont les 16 prioritaires)

➤ **Pertinence environnementale :** reflet de l'exposition alimentaire (EFSA)

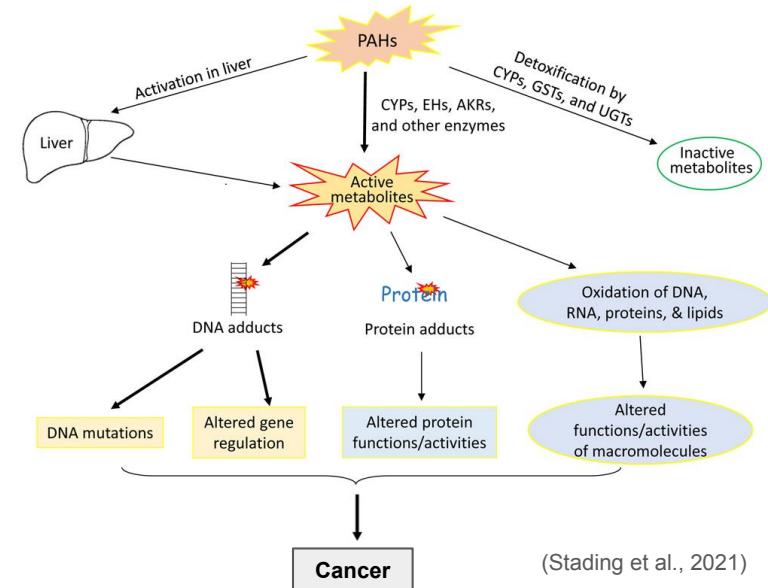


Introduction aux HAP : sources, toxicité cellulaire et dysfonction mitochondriale

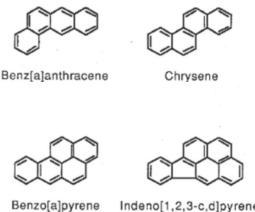
5



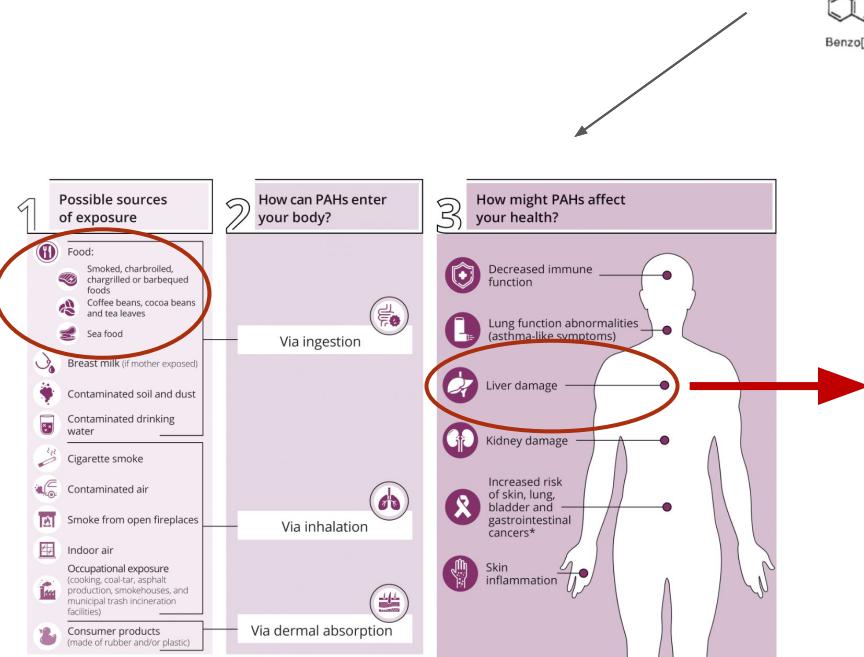
- polluants environnementaux
- Benzo[a]pyrène (B[a]P) : cancérogène de groupe 1 (CIRC)
- **L'apport alimentaire en PAH4 est positivement associé au risque de cancer du sein et de mortalité associée aux cancers de la trachée et des poumons** : cohorte E3N-Generations (Amadou et al., 2025 ; Marques et al., 2022)



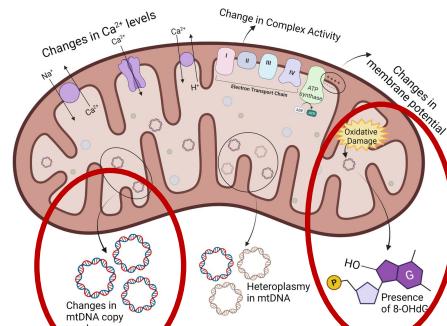
HAP



➤ polluants environnementaux

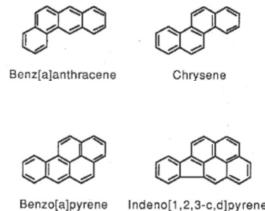


Dysfonction mitochondriale :



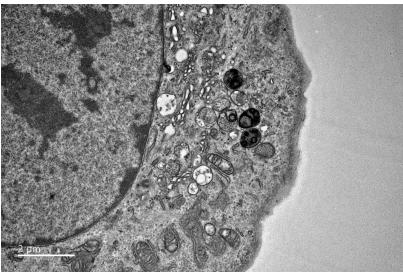
- Forte liaison à DNAmt (40–90× ADNn)
- Bioactivation CYP450
- ↑ ERO
- Altération du nombre de copie d'ADNmt

HAP

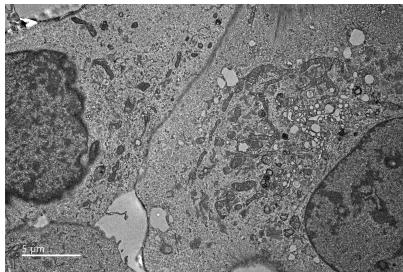


➤ polluants environnementaux

Altérations mitochondrielles des cellules HMEC-1 :



DMSO - 24h



B[a]P 100nM - 24h



PAH4 100nM - 24h



PAH18 100nM - 24h



MRic Agnès Burel

Nina Soler

Plateforme MET (BIOSIT)

→ 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

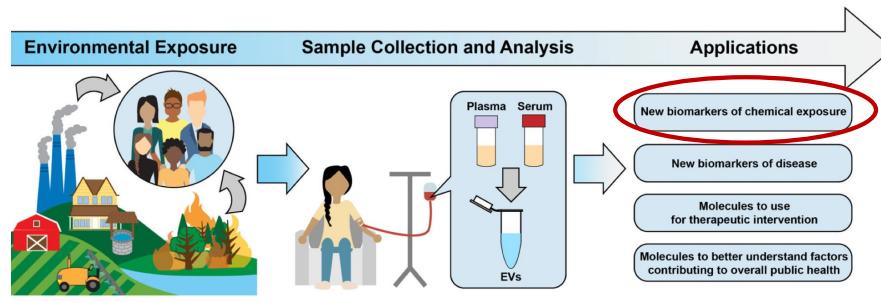
→ Témoin de souffrance mitochondriale

(*Guillouzouic et al., 2025 - under review)

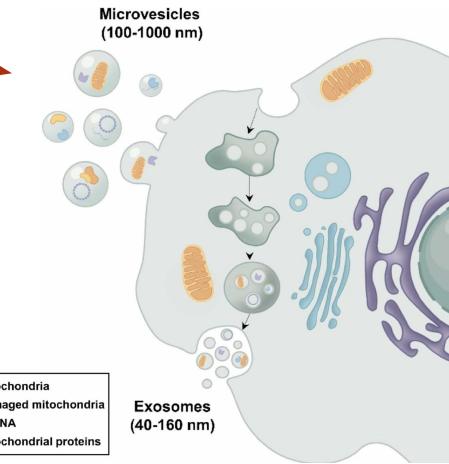
SIMH : Stress Induced Mitochondrial Hyperfusion ; MET: Microscopie électronique à transmission

Rôle émergent des EV pour l'étude d'expositions environnementales

8



(Carberry et al., 2022)



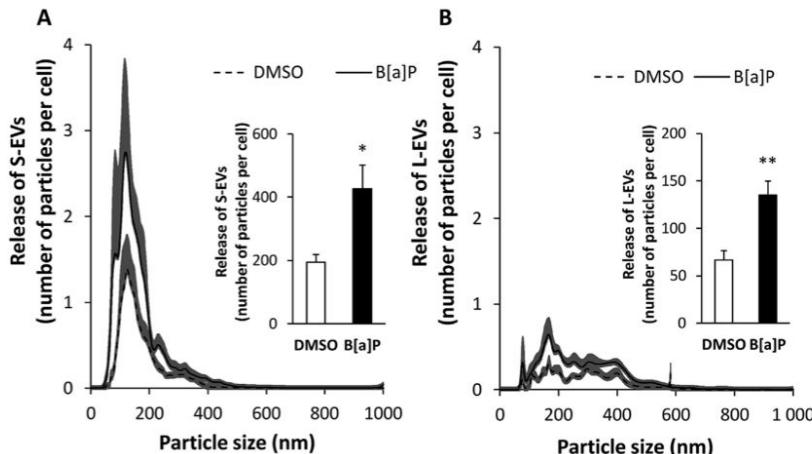
(Heyn and al., 2023)

EV = reflet cellulaire
Mito-EV = reflet mitochondrial ?

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

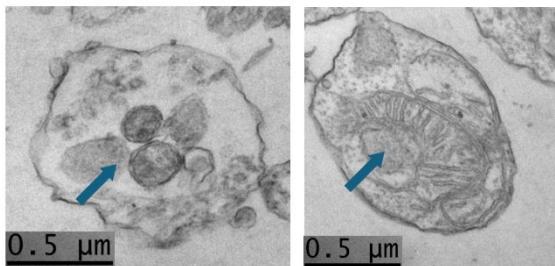
Identifier des marqueurs protéiques, lipidiques et/ou mitochondriaux caractéristiques d'une exposition aux HAP

Travaux antérieures : le B[a]P, exemple type d'HAP cancérogène



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

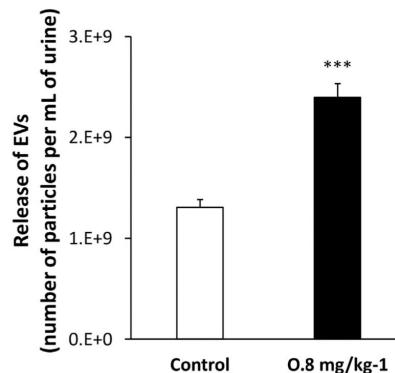
- Surproduction de S- and L- EV



Images de MitoEVs^{##}

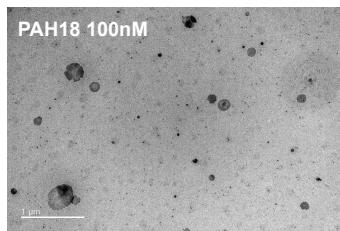
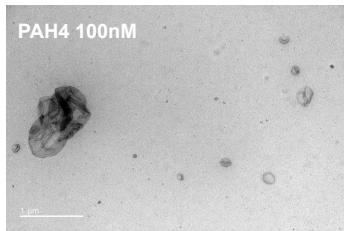
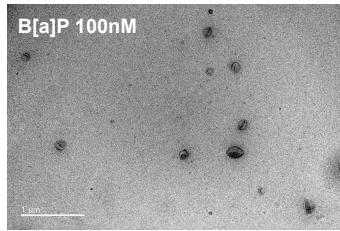
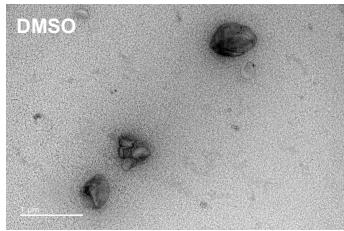
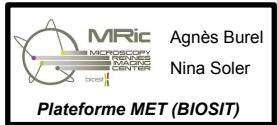
- MitoEV libérées par les cellules HMEC-1

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[#]

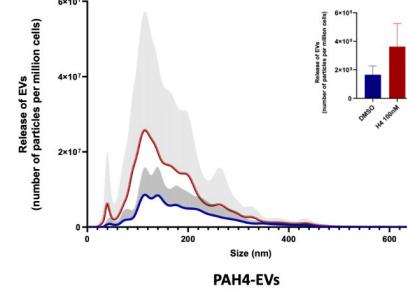
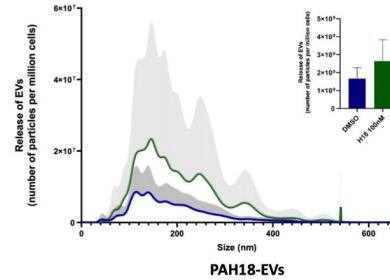
Images représentatives d'EV (coloration négative)



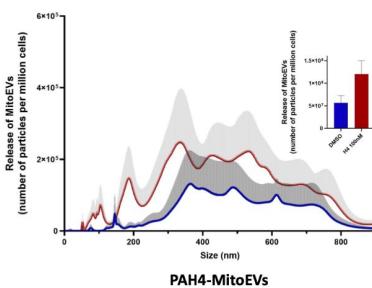
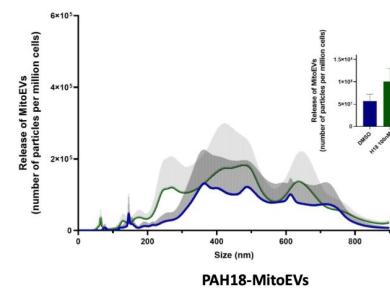
PAH4 et PAH18 augmentent la libération d'EV, y compris les MitoEVs



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



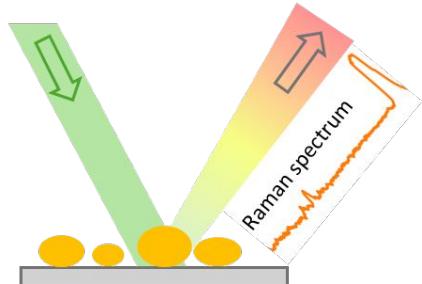
Caractérisation biochimique

Besançon

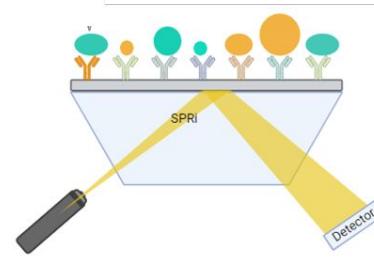
femto-st
SCIENCES &
TECHNOLOGIES



Echantillon :	EVs isolées	Sécrétome
Substrat :	Wafer de silicium	Puce d'or
Technique :	Spectroscopie Raman	SPRI
Caractéristiques :	Signature moléculaire : ratio lipides/protéines, saturation des lipides, structure secondaire des protéines.	



Signature phénotypique :
Détection et dosages en temps réel et sans
marquage des sous-populations EVs par
immunopuce en μ -arrays.
Phénotypage et ligand-fishing pour la
protéomique ciblée



Caractérisation biochimique

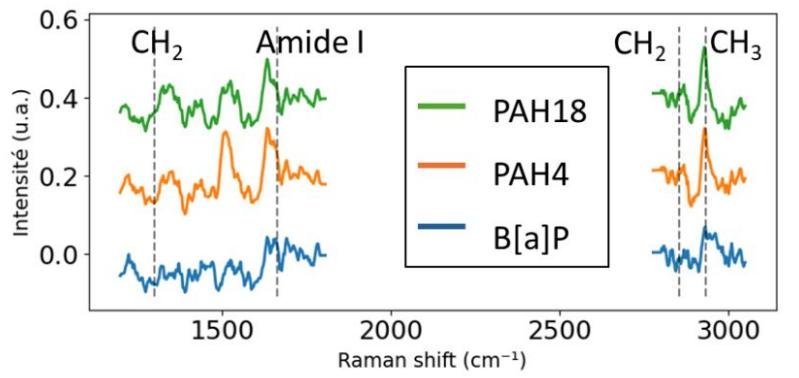
Besançon

femto-st
SCIENCES &
TECHNOLOGIES



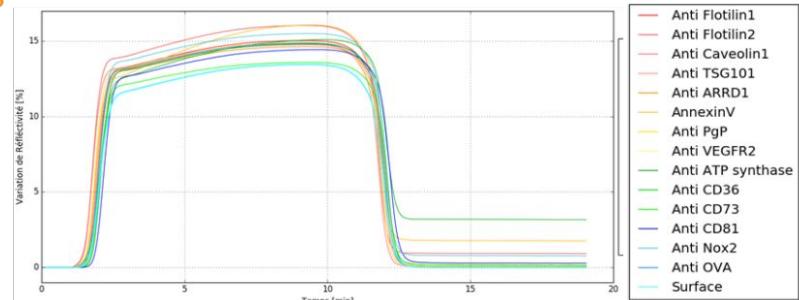
Spectroscopie Raman

Spectres Raman de différence par rapport au contrôle :



Surface Plasmon Resonance Imaging

Sensorgrammes de détection multiplex des cibles EVs :

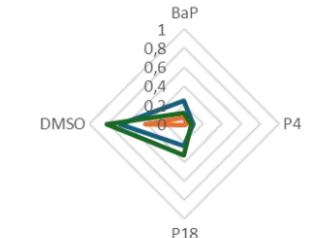


Marqueurs différenciant du contrôle :

CD36



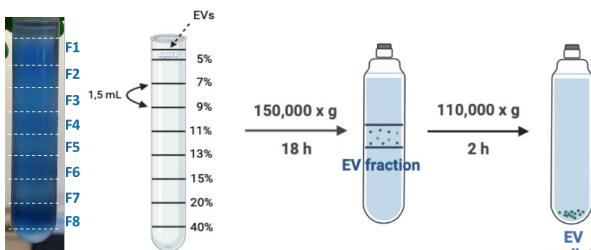
ATP synthase



➤ 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

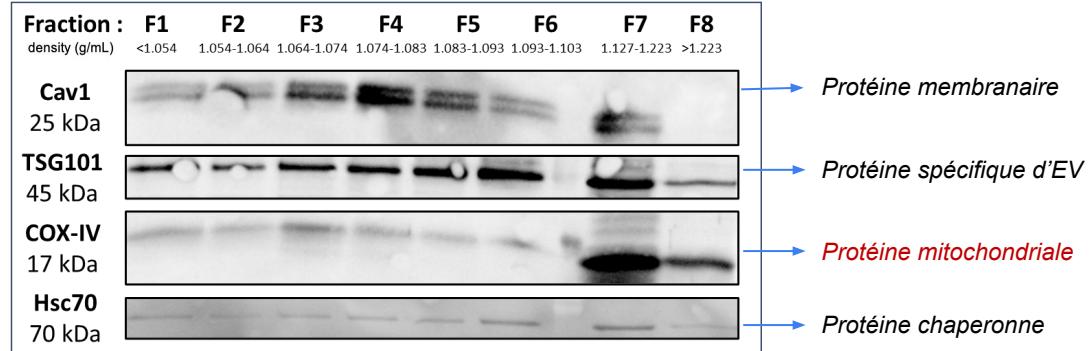
F1	<1.054
F2	1.054-1.064
F3	1.064-1.074
F4	1.074-1.083
F5	1.083-1.093
F6	1.093-1.103
F7	1.103-1.127
F8	1.127-1.223

Gradient density (g/mL)

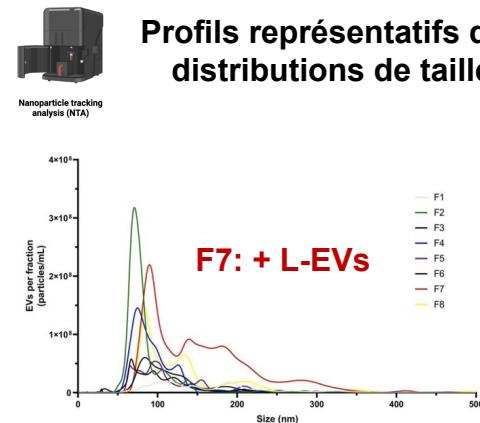
(DGUC: density gradient ultracentrifugation)

Validation du tri :

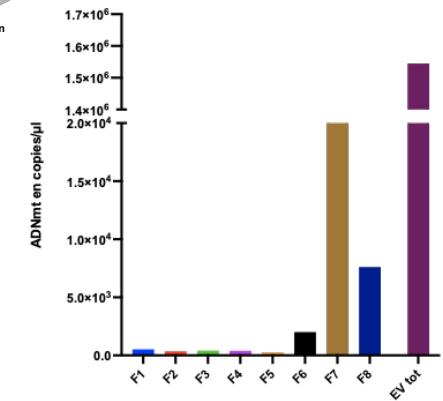
Caractéristiques protéiques des fractions d'EV



Profils représentatifs des distributions de taille



Quantification de l'ADNmt



Caractérisation fonctionnelle :

Évaluation de la polarité mitochondriale des DGUC_EVs



MTG
Marquage des membranes mitochondrielles

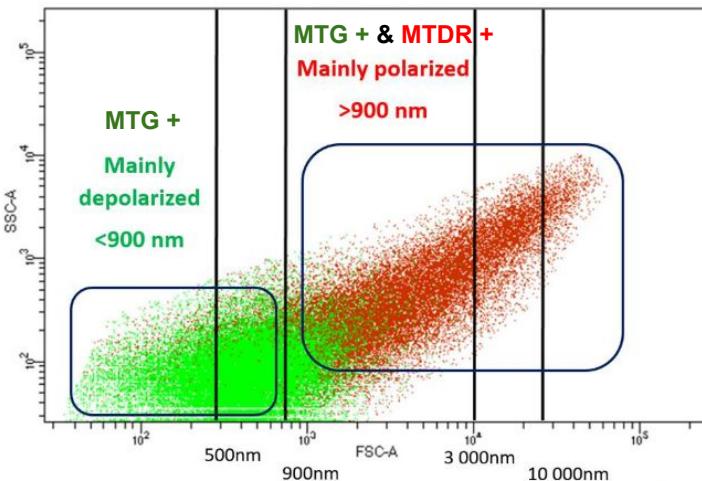


MTDR
Marquage des mitochondries polarisées

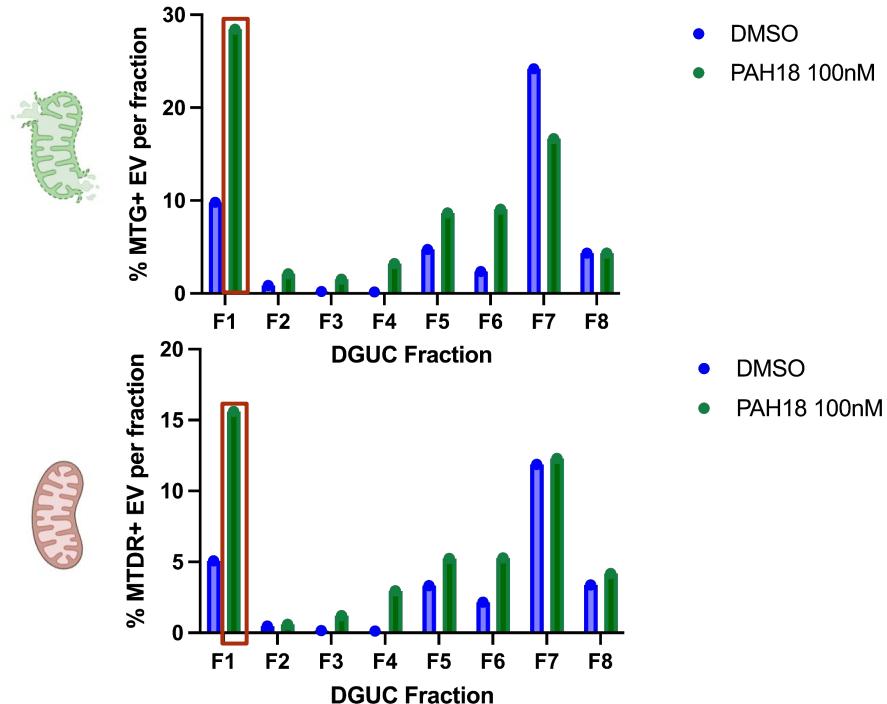
Ratio de fluorescence MTDR/MTG:

Indicateur de potentiel de membrane mitochondriale

Représentation du marquage MTDR/MTG pour B[a]P_EVs (*):



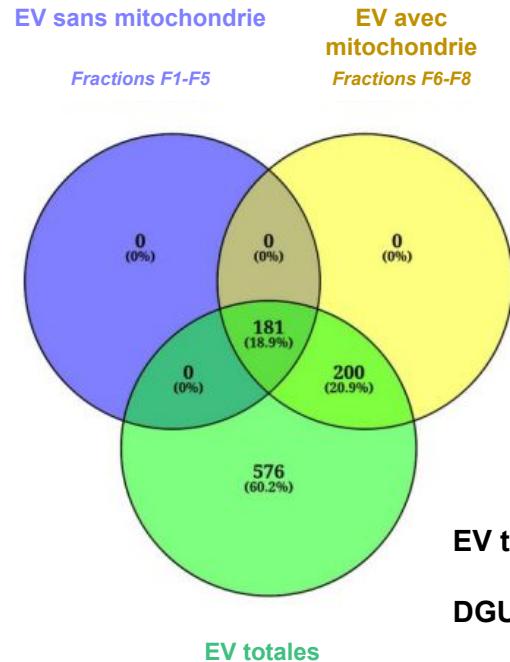
(*) Travaux de Joan Guillouzouic



- 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 totales : 1 057 groupes protéiques identifiés

DGUC_EV : 381 groupes protéiques identifiés

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



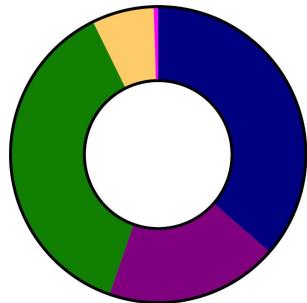
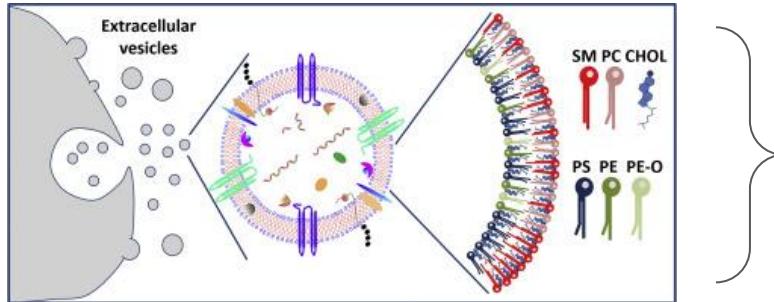
Classification fonctionnelle et de localisation subcellulaire (DAVID) :

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%
GOTERM_CC_DIRECT	mitochondrion	13%
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 :

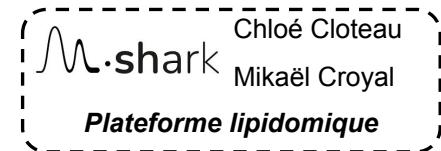
Lipidome des DMSO_EVs



Total=206

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

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



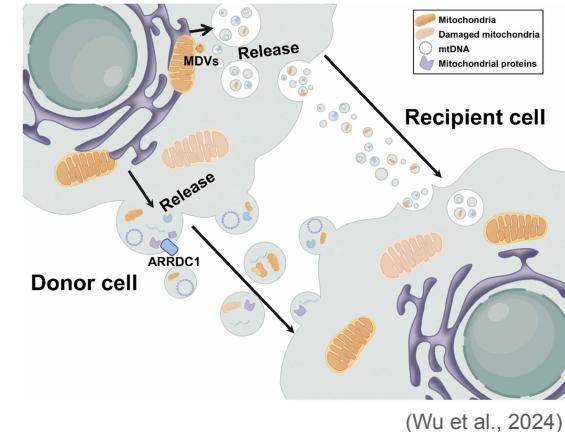
Conclusion

- 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 mitochondrielles
(potentiel de membrane, synthèse d'ATP et consommation d'O₂)
- 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 ENDOMITOAH :



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