Etude des vésicules extracellulaires endothéliales et autres marqueurs de toxicité du Benzo[a]pyrène : influence d'extraits de microalgues d'origine marine

Manon Le Goff

▶ **To cite this version:**

Manon Le Goff. Etude des vésicules extracellulaires endothéliales et autres marqueurs de toxicité du Benzo[a]pyrène : influence d'extraits de microalgues d'origine marine. Biochimie [q-bio.BM]. Université du Maine, 2020. Français. NNT : 2020LEMA1007 . tel-02933130

HAL Id: tel-02933130
https://theses.hal.science/tel-02933130

Submitted on 8 Sep 2020

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

UNIVERSITE SCIENCES BRETAGNE DE LA MER LOIRE ET DU LITTORAL

Le Mans Université

THESE DE DOCTORAT DE

LE MANS UNIVERSITE
COMUE UNIVERSITE BRETAGNE LOIRE

ECOLE DOCTORALE N° 598
Sciences de la Mer et du littoral
Spécialité : Biologie, Biochimie Cellulaire et Moléculaire

Par
Manon LE GOFF

Etude des vésicules extracellulaires endothéliales et autres marqueurs de toxicité du Benzo[a]pyrène : influence d'extraits de microalgues d'origine marine

Thèse présentée et soutenue à Laval, le 10 Mars 2020
Unité de recherche : Laboratoire Mer, Molécules, Santé (EA 2160) ; Institut de Recherche en Santé Environnement et Travail (UMR INSERM U1085)
Thèse N° : 2020LEMA1007

Rapporteurs avant soutenance :

Soazig LE LAY	Chargée de recherche - HDR, UMR INSERM U1063 (SOPAM), Université d'Angers
Pascal ROUSSEL	Chargé de recherche - HDR, UMR 8251 CNRS (RMCX), Université Paris Diderot

Composition du Jury :

Examinateur :	Sophie GIL	Professeur, INSERM UMR_S1139, Université Paris Descartes
Examinateur :	Christelle MONTEIL	Professeur, UR ABTE EA 4651 (ToxEMAC), Université de Rouen
Examinateur :	Jean-Marie BARD	Professeur, EA 2160 (MMS), Université de Nantes
Examinateur :	Benoît SCHOEFS	Professeur, EA 2160 (MMS), Le Mans Université
Directeur de thèse :	Lionel ULMANN	Maitre de conférence - HDR, EA 2160 (MMS), Le Mans Université
Co-encadrant de thèse :	Eric LE FERREC	Maitre de conférence, UMR INSERM U1085 (IRSET), Université Rennes 1

Remerciements

Je tiens tout d'abord à remercier les membres du jury pour avoir accepté d'évaluer ce travail. Soizig Le Lay et Pascal Roussel pour avoir accepté d'être rapporteurs de cette thèse. J'adresse également mes remerciements aux Professeurs Sophie Gil, Christelle Monteil, Jean-Marie Bard et Benoît Schoefs pour avoir accepté de faire partie de ce jury en tant qu'examinateurs.

Je tiens à remercie mon directeur de thèse, le Dr Lionel Ulmann, pour la confiance et la liberté qu'il ma accordée ainsi que pour sa disponibilité et ses conseils avisés.

Je remercie particulièrement mon encadrant, le Dr Eric Le Ferrec pour m'avoir accompagnée durant mon stage de M2 puis pour ma thèse. Tu m'as donné l'opportunité de réaliser cette thèse dans les meilleures conditions possibles. C'est grâce à ton soutien, ainsi que ta disponibilité que j'ai réussi à réaliser ces travaux. Merci pour ton énergie débordante, ton optimisme à toute épreuve et tes précieux conseils qui m'ont fait surmonter les difficultés que j'ai pu rencontrer.

Je remercie le Dr Nathalie Casse pour son écoute, sa bienveillance et son aide pour la réalisation de cette thèse.

Je remercie très chaleureusement le Dr Dominique Lagadic-Gossmann pour m'avoir accueillie au sein de son unité de recherche lors de mon stage de Master 2 puis pour ma thèse. Merci pour tout ce que vous avez fait pour moi, votre disponibilité, vos précieux conseils et votre soutien tout au long de celle-ci.

Je remercie toutes les personnes avec qui j'ai eu le plaisir de collaborer durant cette thèse. En premier lieu, la société Microphyt avec Vincent Usache, Rémi Pradelles, Antoine Delbrut, Marie Quinton pour la culture et la production des extraits de microalgues. Je remercie également Nathalie Grova et Brice Appenzeller de Luxembourg Institute of Health pour nous avoir fournis les échantillons d'urine de rats. Merci également à Agnès Burel de la plateforme MRic de Rennes pour les expériences de microscopie électronique. Je remercie Fabienne Gauffre, Soizic Chevance et Clément Goubault pour leur accueil et pour nos nombreuses discussions sur le NTA.

Je remercie également Ludovic Le Hegarat de l'Anses et Gaëlle Pencreach pour leurs aides et leurs gentillesses lors dans mes missions d'enseignement.

Je souhaite remercier tout les membres du département GB et de l'IRSET que j'ai pu côtoyer durant cette thèse.

Je tiens à remercier l'ensemble des membres de l'équipe MIMMA « Métabolisme, bio-Ingénierie des Molécules de Micro-algues et Applications » et de l'équipe SMS « Stress, membrane et signalisation » avec qui j'ai eu le plaisir de travailler.

Un très grand merci à Martine, Isabelle, Rose-Marie et Fred de Laval ainsi que Isabelle, Dimitri, Maëlle de Rennes pour leur gentillesse, leur disponibilité, leur bonne humeur qu'ils apportent au labo.

Je tiens à remercier tout les doctorants, post-docs et stagiaires de passage au labo et avec qui j'ai passé de très bons moments. Tout d'abord, Florence pour ton précieux soutien au début de ma thèse et pour tous les bons moments que l'on a passés ensemble. Claire pour ta gentillesse, pour nos nombreuses conversations interminables, et surtout ton soutien jusqu'à la fin. Arnaud, Marie et Bassil, les anciens avec qui j'ai de très beaux souvenirs. Hélène, Nettie et Imran, mes collègues de bureau Rennais. Je remercie également Rémi, Antoine, Alexis, Bing, Taha, Dalal, Simrat et tous les autres avec qui ce fut un plaisir de travailler.

Je souhaite remercier Jean-Luc et Brigitte pour tous les services qu'ils peuvent nous rendre et qui nous facilite grandement la vie au travail. Maryline pour sa gentillesse et son efficacité qui permet le bon fonctionnement du labo à Rennes.

Je remercie Mathilde, Nathan, Alexandra et Florence pour m'avoir hébergé lors de mes nombreux déplacements.

Je remercie toute ma famille et particulièrement mes parents qui m'ont soutenu tout au long de mes études et dans toutes mes démarches depuis le début. Merci à mes sœurs, mon filleul, mes beaux-parents, ma belle-famille et mes amis qui m'ont toujours soutenue tout au long de cette thèse. Merci à Ronan qui a toujours été là pour moi dans les moments difficiles, pour me soutenir, me supporter et m'encourager durant cette thèse.

Pour finir, j'aimerais remercier Laval Agglomération et le Conseil Départemental de la Mayenne qui ont financé cette thèse.

Table des matières

Remerciements **3**

Liste des abréviations **10**

Liste des figures **16**

Liste des tableaux **18**

Avant-propos **19**

Introduction **20**

Chapitre A. Les hydrocarbures aromatiques polycycliques **21**

1. Généralités sur les HAP 21

1.1. Structure chimique 21

1.2. Classification par les autorités 22

1.3. Propriétés physico-chimiques 25

1.4. Sources 27

1.5. Distribution et dégradation dans l'environnement 29

2. Voies d'exposition 31

2.1. Exposition par voie orale 32

2.2. Exposition par voie respiratoire 33

2.2.1. La pollution atmosphérique 33

2.2.2. Le tabagisme 34

2.3. Exposition par voie cutanée 35

3. Toxicocinétique des HAP 35

3.1. Absorption 35

3.1.1. Absorption par les voies respiratoires 35

3.1.2. Absorption par le tractus gastro-intestinal 36

3.1.3. Absorption cutanée 36

3.2. Distribution 37

3.3. Métabolisme 38

3.3.1. Métabolisme des xénobiotiques 38

3.3.2. Les cytochromes P450 39

3.3.3. Métabolisation du B[a]P 41

3.3.3.1. Phase I ou Phase de fonctionnalisation 41
3.3.3.2. Phase II ou Phase de conjugaison 44
3.3.3.3. Phase III ou Phase de transport 44
3.4. Elimination 45
4. Voies de signalisations associées à la toxicité du B[a]P 45
4.1. Récepteur aux hydrocarbures aromatiques (AhR) 45
4.1.1. Structure et partenaires de AhR 45
4.1.2. Ligands de AhR 47
4.1.3. Activation canonique de AhR 49
4.1.4. Activation non-canonique de AhR 50
5. Toxicité du B[a]P 52
5.1. Immunotoxicité 52
5.2. Cardiotoxicité 53
5.3. Cancérogénicité 55
5.3.1. Chez l'animal 55
5.3.2. Chez l'Homme 55
5.3.3. Cancérogenèse et B[a]P 55
5.4. Reprotoxicité et tératogénicité 57
6. Biosurveillance des HAP 58
6.1. Biomarqueurs d'exposition 60
6.1.1. Biomarqueurs de dose interne 61
6.1.1.1. Biomarqueurs du pyrène 61
6.1.1.2. Biomarqueurs du B[a]P 63
6.1.1.3. Biomarqueurs du naphtalène 64
6.1.1.4. Biomarqueurs du phénanthrène 65
6.1.1.5. Biomarqueurs du fluorène 65
6.1.2. Biomarqueurs de dose efficace 65
6.1.2.1. Adduits d'ADN 65
6.1.2.2. 8-oxiGua et 8-oxodG 67
6.1.2.3. Adduits aux protéines 69
6.2. Biomarqueurs d'effets 69
6.3. Biomarqueurs de sensibilité ou de susceptibilité 70

Chapitre B. Les vésicules extracellulaires 72
1. Découverte des vésicules extracellulaires 72
2. Les différentes populations de vésicules extracellulaires 73
3. Biogenèse des vésicules extracellulaires 74
3.1 Biogenèse des exosomes 75
3.1.1. Formation des corps multivésiculaires 76
3.1.1.1. La voie ESCRT 76
3.1.1.2. La voie des lipides et des tétraspanines 77
3.1.1.3. Adressage et libération des exosomes 78
3.2. Biogenèse des microvésicules 78
3.2.1. Mécanismes de formation des microvésicules 78
3.2.2. Libération des microvésicules 79
4. Composition des vésicules extracellulaires 80
5. Interaction des vésicules extracellulaires avec les cellules cibles 83
6. Les vésicules extracellulaires comme biomarqueurs potentiels 84

Chapitre C. Les microalgues 86
1. Généralités sur les microalgues 86
1.1. Présentation des modèles d'étude 89
1.1.1. *Ostreococcus tauri* (OT) 89
1.1.2. *Phaeodactylum tricornutum* (PT) 90
2. Applications des microalgues 91
3. Composés bioactifs produits par les microalgues et activités biologiques 95
3.1. Les pigments 96
3.1.1. Les chlorophylles 96
3.1.2. Effets biologiques des chlorophylles sur la santé 97
3.1.3. Les caroténoïdes 98
3.1.3.1. Les carotènes : β-carotène 100
3.1.3.2. La fucoxanthine 100
3.1.4. Effets biologiques du β-carotène et de la fucoxanthine sur la santé 100
3.1.4.1. Le β-carotène 100
3.1.4.2. La fucoxanthine 101

3.2. Les acides gras polyinsaturés ω3 (AGPI ω3) 102
3.2.1. Effets biologiques du DHA et de l'EPA sur la santé 105
Cadre et objectifs 108
Résultats 111
Article n°1 : 113
Article n°2 : 133
Discussion générale et perspectives 159
Bibliographie 168
Annexes 205
1. Revue 206
2. Publications de thèse 220
3. Communications 221

Liste des abréviations

A

ABC : ATP-Binding Cassette
ADME : Absorption, Distribution, Métabolisme et Excrétion
AGMI : Acides Gras Monoinsaturés
AGPI : Acides Gras Polyinsaturés
AGS : Acides Gras Saturés
AhR : Aryl hydrocarbon Receptor
AIP : AhR Interacting Protein
AKR : Aldo-Kéto Réductases
ALA : Acide α-linoléique
ALIX : ALG-2 interacting protein X
Alix : Apopotosis-Linked gene 2-Interacting protein X
AMS : Spectrométrie de Masse par Accélérateur
ANA : Acénaphtène
α-NF : α–Naphthoflavone
ANT : Anthracène
ANY : Acénaphtylène
AP-1 : Activator Protein-1
APP : Amyloid Precursor Protein
ARF6 : ADP-Ribosylation Factor 6
ARNT : AhR Nuclear Translocator
ATPase : Adenosin TriPhosphatase

B

B[a]A : Benzo[a]anthracène
B[a]P : Benzo[a]pyrene
B[b]F : Benzo[b]fluoranthène
B[c]F : Benzo[c]fluorène
B[ghi]P : Benzo[g,h,i]pérylène
B[j]F : Benzo[j]fluoranthène
B[k]F : Benzo[k]fluoranthène
BCRP : Breast Cancer Resistance Protein
bHLH/PAS : basic helix-loop-helix-PER-ARNT-SIM
BPDE : B[a]P-diol-époxydes
BRCP : Breast Cancer Resistance Protein

C

C[cd]P : Cyclopenta[c,d]pyrene
$[Ca^{2+}]i$: Concentration du calcium intracytosolique
CAR : Constitutif Androstane Receptor
Cav-1 : Cavéoline-1
CCL1 : C-C motif chemokine Ligand 1
Cdc42 : Cell division control protein 42 homolog

CDK : Cyclin-Dependent Kinase
CH223191 : 2-Methyl-2H-pyrazole-3-carboxylic acid (2-methyl-4-o-tolylazo-phenyl)-amide
Chl : Chlorophylles
CHR : Chrysène
CIRC : Centre International de Recherche contre le Cancer
CITEPA : Centre Interprofessionnel Technique d'Etudes de la Pollution Atmosphérique
CLP : Classification, étiquetage et emballage des produits chimiques
CMH : Complexe Majeur d'Histocompatibilité
CMR : Cancérogène, Mutagène, Reprotoxique
COX IV : Cytochrome c oxidase subunit 4
COX2 : Cyclooxygénase 2
c-src : Proto-oncogène tyrosine-protéine kinase src
CXCR4 : CXC-Chemokine Receptor 4
CYP : Cytochrome

D

DB[ae]P : Dibenzo[a,e]pyrène
DB[ah]P : Dibenzo[a,h]pyrène
DB[ai]P : Dibenzo[a,i]pyrène
DB[al]P : Dibenzo[a,l]pyrène
DBA : Dibenz[a,h]anthracène
DCFDA : 2', 7'-dichlorodihydrofluorescéine
DEP : Diesel Exhaust Particles
dGTP : désoxyguanosine triphosphate
DHA : Acide docosahexaénoïque
1,2-DHN : 1,2-dihydroxynaphtalène
DiOH-PYR : Dihydroxypyrènes
DMSO : Diméthysulfoxide

E

EFSA : Autorité Européenne de Sécurité des Aliments
EGF : Epidermal Growth Factor
EGR-1 : Early Growth Response protein 1
EH : Epoxydes Hydrolases
EMT : Transition Epithéliale Mésenchymateuse
EPA : Acide eicosapentaénoïque
ERCC2 : Excision Repair Cross-Complementing rodent repair deficiency, complementation group 2
ERK1/2 : Extracellular signal-Regulated Kinase
ERO : Espèces Réactives de l'Oxygène
ERα : Récepteur aux œstrogènes alpha
ESCRT : Endosomal Sorting Complex Required for Transport
EXO : Exosome

F

FAK : Focal Adhesion Kinase
FAO : Organisation des Nations-Unies pour l'alimentation et l'agriculture
FAS-L : Fatty Acid Synthase-Ligand
FGF : Fibroblast Growth Factor
FICZ : 6-formylindolo[3,2-b]carbazole
FICZ : 6-Formylindolo[3,2-b]carbazole
FLA : Fluoranthène
FLU : Fluorène
FPG : Formamidopyrimidine DNA N-glycosylase
FSEV : Société Française des Vésicules Extracellulaires

G

GAPDH : Glyceraldehyde-3-Phosphate Dehydrogenase
GC-MS : Chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse
GPx : Gluthathion Peroxydase
GST : Glutathion S-transférase

H

HAP : Hydrocarbures Aromatiques Polycycliques
HDL : High Density Lipoprotein
HPLC-FLD : Chromatographie liquide à haute performance avec détection par fluorescence
HPLC-SFS : Chromatographie couplée à la spectrométrie de fluorescence synchrone
HSP : Heat Shock Protein
HSPG : Heparan Sulfate Proteoglycan

I

I[cd]P : Indeno[1,2,3-c-d]pyrene
ICAM : Intercellular Adhesion Molecule
IDL : Intermediate Density Lipoprotein
ILV : Vésicules intraluminales
INERIS : Institut National de l'Environnement industriel et des RISques
iNOS : Inducible Nitric Oxide Synthase
Interleukine : IL
IRNS : Institut National de Recherche et de Sécurité
Irset : Institut de recherche en santé environnement et travail
ISEV : Société Internationale des Vésicules Extracellulaires

J

JECFA : Comité d'experts FAO/OMS sur les additifs alimentaires
JEV : Journal of Extracellular Vesicles

L

LBA : Liquide Broncho Alvéolaire
LBD : Ligand Binding Domain

LBPA : Lysobiphosphatidique
LC/MS/MS : Chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse à triple quadripôles
LC3 : microtubule-associated protein 1 light chain 3
LDL : Low Density Lipoprotein
LFA1 : Lymphocyte Function-Associated antigen 1
LPS : Lipopolysaccharides
L-VE : Grandes Vésicules

M

MAP : Mitogen-Activated Protein
MCV : Maladies cardiovasculaires
MDR1 : Multi Drug Resistance 1
mEH : Epoxyde-Hydroxyde microsomal
MET : Microscopie Electronique à Transmission
MIMMA : Métabolisme, bio-Ingénierie des Molécules de Micro-algues et Applications
MMP : Métalloprotéinases Matricielles
MMR : Mismatch Repair
MMS : Mer, Molécules, Santé
MRP : Multidrug Resistance Protein
MTH1 : MutT Homologue 1
5MT : 5-méthylchrysène
MV : Microvésicules
MVB : Corps multivésiculaires

N

NADPH : Nicotinamide Adénine Dinucléotide Phosphate
NAP : Naphtalène
NER : Nucleotide Excision Repair
NES : Nuclear Export Signal
NF-κB : Nuclear factor-kappa B
NLS : Nuclear Localization Signal
NO : Oxyde Nitrique
NQO1 : NAD(P)H dehydrogenase [quinone] 1
Nrf2 : Nuclear factor erythroid-2-related factor 2
nSMAse-2 : Sphingomyélinase neutre 2
NTA : Nanoparticle tracking analysis

O

OATP : Organic Anion Transporting Polypeptides
OCT : Organic Cation Transporter
OGG1 : Oxoguanine DNA glycosylase 1
9-OH-B[a]P : 9-hydroxy B[a]P
9-OH-FLU : 9-hydroxyfluorènes
1-OH-NAP : 1-naphtols
9-OH-PHE : 9-hydroxyphénanthrènes

1-OH-PYR : 1-hydroxypyrène
3-OH-B[a]P : 3-hydroxy B[a]P
OMS : Organisation Mondiale de la Santé
OT : *Ostreococcus tauri*
8-oxodG : 8-oxo-7,8-dihydro-2'-déoxyguanosine
8-oxodGMP : 8-oxo-7,8-dihydro-2’-deoxyguanosine5’-triphosphate
8-oxo-dGTP : 8-oxo-2’-deoxy-guanosine-5’-triphosphate
8-oxoGua : 8-oxo-7,8-dihydroguanine

P

P16D : 1,6-dione-pyrène
P18D : 1,8-dione-pyrène
P2X7 : P2X purinoceptor 7
PAS : PER-ARNT-SIM
PCB : Polychlorobiphényles
PCB77 : 3,3’4,4’-Tétrachlorobiphényl
PD98059 : 2-(29-amino-39-methoxyphenyl)-oxanaphthalen-4-one
PDCD6IP : Programmed Cell Death 6 Interacting Protein
PECAM1 : Platelet Endothelial Cell Adhesion Molecule
PGE2 : Prostaglandine E2
P-gp : P-glycoprotéine
PHE : Phénanthrène
PHED : phénanthrènes-diols
PKC : Protéine Kinase C
PLA2 : Phospholipase A2
PLD : Phospholipase D
PMPCB : Peptidase, Mitochondrial Processing Beta Subunit
PPARs : Peroxisome Proliferator-Activated Receptor
PrP : Prion Protein
PS : Phosphatidylsérine
PT : *Phaeodactylum tricornutum*
PYR : Pyrène

Q

QI : quotient intellectuel

R

ROCK : RHO-associated protein kinase
RXR/RAR : Retinoid X Receptor/Retinoic Acid Receptor

S

SBEP : surveillance des expositions professionnelles
SCF : Comité scientifique de l’alimentation humaine
siRNA :ARN interférents
Slug : Zinc finger protein SNAI2
SMS : Stress Membrane et Signalisation

SNAIL : Zinc finger protein SNAI1
SNARE : Soluble N-éthylmaleimide-sensitive-factor Attachment protein REceptor
SOD : Superoxyde Dismutase
SOPK : Syndrome des Ovaires Polykystiques
SULT : Sulfotransférases
S-VE : Petites vésicules

T

TAD : Domaine de Transactivation
TAG : Triacylglycérols
TCDD : 2,3,7,8-Tétrachlorodibenzo-p-dioxine
TCR : T Cell Receptor
TDP43 : TAR DNA-binding Protein 43
TFR : Transferrin Receptor
TIMP-1 : Tissue Inhibitor of Metalloproteinases-1
TLR : Toll-Like Receptors
TMF : 6,2',4'-Triméthoxyflavone
TNF-α : Tumor necrosis factor alpha
TOM20 : Mitochondrial import receptor subunit TOM20
TSG101 : Tumour Susceptibility Gene 101 Protein
TSPAN : Tetraspanin

U

U0126 : 1,4-Diamino-2,3-dicyano-1,4-bis[2-aminophenylthio]butadiene
UGT : UDP-Glucuronyl Transférases
US-EPA : Agence de Protection de l'Environnement des États-Unis

V

VAF347 : [4-(3-Chloro-phenyl)-pyrimidin-2-yl]-(4- trifluoromethyl-phenyl)-amine
VAT1 : Vps Twenty Associated 1
VCAM : Vascular Cell Adhesion Molecule
VE : Vésicules Extracellulaires
VEGF : Vascular Endothelial Growth Factor
VLDL : Very Low Density Lipoprotein.
VPS : Vacuolar Protein Sorting-associated protein.
VSP4 : Vacuolar protein Sorting-associated Protein 4

X

XAP2 : X-Associated Protein 2
XIAP : X-linked inhibitor of apoptosis protein
XPD : Xeroderma Pigmentosum complementary group D
XRCC1 : X-Ray Repair Cross Compementing 1
XRE : Xenobiotic Response Element

Liste des figures

Figure 1 *: Disposition moléculaire des hydrocarbures aromatiques polycycliques. 22*

Figure 2 *: Sources naturelles et anthropiques des HAP. 28*

Figure 3 *: Cycle des HAP dans l'environnement. 30*

Figure 4 *: Devenir des HAP dans l'organisme après ingestion et inhalation. 37*

Figure 5 *: Les trois phases du métabolisme des xénobiotiques. 38*

Figure 6 *: Cycle de monooxygénation par les CYP. 40*

Figure 7 *: Voies de transfert des électrons vers le cytochrome P450 dans le réticulum endoplasmique. 41*

Figure 8 *: Les principales voies du métabolisme du B[a]P. 43*

Figure 9 *: Les domaines fonctionnels de la protéine AhR et de son partenaire ARNT. 46*

Figure 10 *: Activation de AhR par le B[a]P. 50*

Figure 11 *: Les voies de signalisation de AhR. 52*

Figure 12 *: Étapes de la cancérogenèse. 56*

Figure 13 *: Biosurveillance de l'exposition à la pathologie avec les trois types de biomarqueurs. 60*

Figure 14 *: Métabolisme du pyrène en 1-hydroxypyrène (1-OH-PYR) et son oxydation ultérieure en pyrène-1,6- et 1,8-quinone par l'intermédiaire du 1,6- et 1,8-dihydroxypyrènes (DiOH-PYR). 63*

Figure 15 *: Formation de 8-oxoGua et de la 8-oxo-dG urinaires. 68*

Figure 16 *: Les différents sous-types de VE et leurs caractéristiques physiques. 74*

Figure 17 *: Représentation schématique de la formation des différents sous-types de VE. 75*

Figure 18 *: Machinerie moléculaire de la biogenèse des exosomes. 77*

Figure 19 *: Biogenèse des microvésicules. 79*

Figure 20 *: Composition moléculaire des vésicules extracellulaires. 81*

Figure 21 *: Internalisation des vésicules extracellulaires pas les cellules cibles. 84*

Figure 22 *: Synthèse de composés bioactifs par les microalgues. 87*

Figure 23 *: Illustration d'une partie de la diversité des microalgues. 88*

Figure 24 *: Taxonomie et ultrastructure d'Ostreococcus tauri. 89*

Figure 25 *: Taxonomie et microscopies des trois morphotypes de Phaeodactylum tricornutum. 90*

Figure 26 *: Domaines d'applications potentiels des microalgues. 92*

Figure 27 *: Formules structurelles des chlorophylles. 97*

Figure 28 *: Structures chimiques du β-carotènes et de la fucoxanthine. 99*

Figure 29 *: Principaux acides gras polyinsaturés ω3 des microalgues. 103*

Figure 30 *: Résumé graphique "PAHs increase the production of extracellular vesicles both in vitro in endothelial cells and in vivo in urines from rats". 116*

Figure 31 *: Résumé graphique "Microalgal carotenoids and phytosterols regulate biochemical mechanisms involved in human health and disease prevention". 206*

Liste des tableaux

Tableau 1 *: Structures moléculaires des HAP évalués par les autorités. 24*

Tableau 2 *: Propriétés physico-chimiques des 16 HAP classés par l'US-EPA. 27*

Tableau 3 *: Émissions atmosphériques en tonnes de huit HAP*. 29*

Tableau 4 *: Concentration moyenne et demi-vie du B[a]P dans les différents compartiments de l'environnement. 31*

Tableau 5 *: Voies d'exposition au B[a]P pour l'Homme en Europe..... 32*

Tableau 6 *: Consommation moyenne en B[a]P et en HAP par catégories d'aliments. 33*

Tableau 7 *: Exemples de ligands de AhR. 48*

Tableau 8 *: Métabolites urinaires utilisés comme biomarqueurs d'expositions aux HAP. 61*

Tableau 9 *: Méthodes de détection des adduits à l'ADN dérivés des HAP. 67*

Tableau 10 : *Microalgues autorisées dans la composition de complément alimentaire en France. 93*

Tableau 11 *: Exemple de la diversité des composés bioactifs présents dans les microalgues et leurs activités biologiques associées. 95*

Tableau 12 *: Teneur totale en lipides, EPA et DHA de certaines espèces de microalgues. 104*

Avant-propos

Les hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP) représentent une classe majeure de polluants de l'environnement. Ces composés toxiques produits de manière naturelle ou anthropique, sont impliqués directement ou indirectement dans la survenue et/ou l'aggravation de pathologies telles que les cancers et les maladies cardiovasculaires. Ainsi, ils constituent une priorité en termes de santé publique. En raison de leur omniprésence dans l'environnement et dans les aliments, l'élimination complète de ces polluants est techniquement irréalisable. Il apparaît donc que l'exposition de l'Homme est inévitable. Ainsi, il est fondamental de trouver de nouveaux marqueurs d'exposition et/ou d'effets précoces de risque de développer des pathologies dues à l'exposition aux HAP, et de proposer de nouvelles stratégies afin de prévenir leurs effets toxiques.

Dans le cadre de la recherche de nouveaux biomarqueurs, nous nous sommes intéressés aux vésicules extracellulaires (VE) produites par les cellules endothéliales en présence d'HAP. Ces nanostructures membranaires, accessibles dans les fluides biologiques (sang, urines…) semblent être des biomarqueurs prometteurs non invasifs. En effet, leur composition et leur production dépendent du type et de l'état physiopathologique de la cellule productrice. Afin de prévenir les effets toxiques des HAP, nous nous sommes intéressés à l'effet de deux extraits de microalgues sur la toxicité induite par le prototype des HAP, le benzo[a]pyrène. De par leur capacité à synthétiser de nombreux composés phytochimiques, connus pour leur bienfait sur la santé, les microalgues apparaissent aujourd'hui comme une nouvelle source de composés bioactifs d'intérêt nutraceutique.

La première partie de ce mémoire présente une synthèse bibliographique sur les HAP, les vésicules extracellulaires et enfin sur les microalgues et leur potentiel nutraceutique. Cette synthèse est suivie par une deuxième partie regroupant les résultats obtenus sous la forme de deux articles. Enfin, la dernière partie est dédiée à la discussion générale sur l'ensemble des résultats obtenus au cours de cette thèse et aux perspectives des travaux à plus long terme.

Introduction

Chapitre A. Les hydrocarbures aromatiques polycycliques

1. Généralités sur les HAP

Les hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP) sont des polluants environnementaux omniprésents générés principalement lors de la combustion incomplète de matières organiques ou par pyrolyse. Ils constituent une famille de plus d'une centaine de molécules organiques composées d'au moins deux cycles aromatiques condensés. Les HAP se présentent généralement sous forme de mélanges complexes, qui peuvent comprendre des centaines de composés.

1.1. Structure chimique

Les HAP sont de structures variables, comprenant au moins deux cycles benzéniques condensés. Ils sont composés uniquement d'atomes d'hydrogène et de carbone. Ces noyaux aromatiques sont accolés soit de façon linéaire, soit angulaire ou en grappe (**Figure 1**). Les HAP sont communément classés en deux catégories : les HAP à bas poids moléculaire, ayant moins de quatre cycles aromatiques et les HAP à haut poids moléculaire, ayant au moins cinq cycles aromatiques (Hussain et al., 2018). Leurs masses moléculaires varient de 128 g/mol ($C_{10}H_8$) à 1792 g/mol ($C_{144}H_{64}$) (Lafleur et al., 1996; Glasier et al., 2001). Le Benzo[a]pyrene (B[a]P), de formule chimique $C_{20}H_{12,}$ le HAP de référence, est composé de 5 cycles aromatiques accolés en grappe. Il est classé dans les HAP à haut poids moléculaire (**Figure 1, Tableau 2**).

Ces molécules sont présentes dans l'environnement sous forme de mélanges complexes et difficiles à caractériser. L'analyse de ces mélanges se réalise généralement par chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse ou par chromatographie en phase liquide à haute performance couplée à des détecteurs UV ou fluorimétrique.

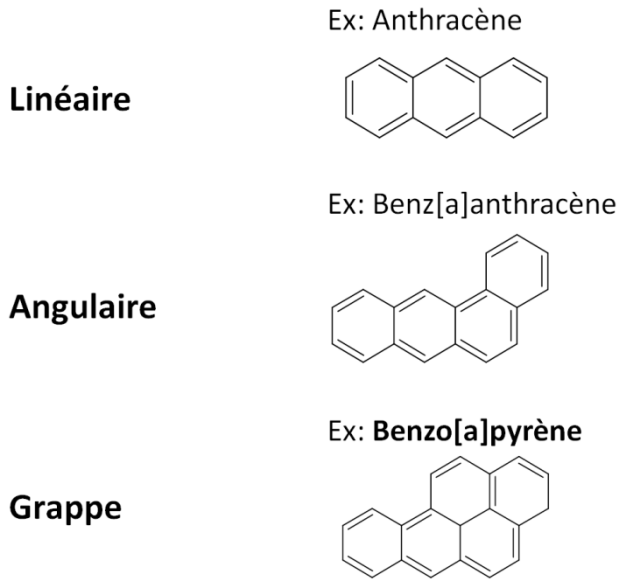


***Figure 1** : Disposition moléculaire des hydrocarbures aromatiques polycycliques. (Adapté de Edwards, 1983; Abdel-Shafy and Mansour, 2016).*

1.2. Classification par les autorités

De nombreuses autorités ont évalué la toxicité et la présence de certains HAP (**Tableau 1**). C'est le cas de l'Agence de Protection de l'Environnement des États-Unis (US-EPA), le Centre International de Recherche contre le Cancer (CIRC), le comité d'experts FAO/OMS (Organisation des Nations-Unies pour l'alimentation et l'agriculture/Organisation Mondiale de la Santé) sur les additifs alimentaires (JECFA), le comité scientifique de l'alimentation humaine (SCF) et l'Autorité Européenne de Sécurité des Aliments (EFSA).

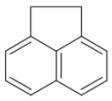
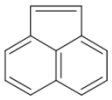
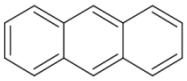
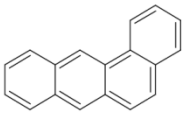
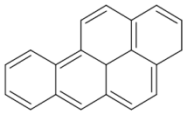
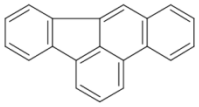
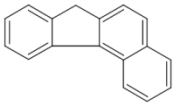
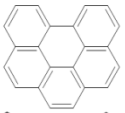
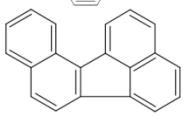
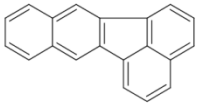
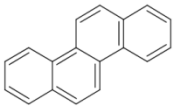
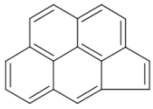
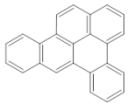
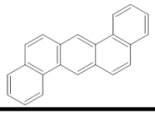
Dès 1976, l'US-EPA a sélectionné 16 HAP par ordre de priorité en fonction de leurs effets potentiels sur la santé humaine et de leur présence dans l'environnement. Le CIRC a classé le B[a]P dans le groupe 1 (IARC, 1987). C'est le seul HAP classé comme cancérogène avéré par le CIRC. Du fait de sa cancérogénicité et de sa présence dans les mélanges auxquels l'Homme est exposé, le B[a]P est la molécule modèle pour l'étude des HAP. De plus, selon le règlement européen CLP (classification, étiquetage et emballage des produits chimiques), le B[a]P est classé CMR (Cancérogène, Mutagène, Reprotoxique). Il est placé dans la catégorie 1B pour sa cancérogénicité, sa mutagénécité sur les cellules germinales et pour sa toxicité pour la reproduction.

Le SCF a évalué l'effet potentiel cancérogène et génotoxique de 33 HAP. Sur la base d'études réalisées *in vivo* chez les animaux, il a recommandé la surveillance de 15 HAP (SCF,

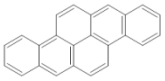
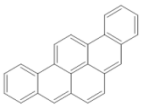
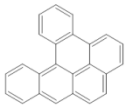
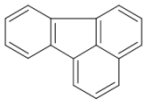
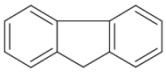
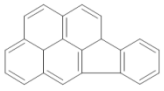
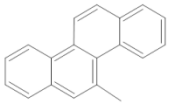
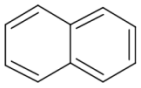
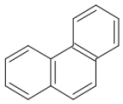
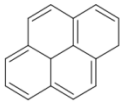
2002). Ce comité a également suggéré d'utiliser le B[a]P comme marqueur de la présence d'HAP cancérogènes dans les aliments. Parmi ces 15 HAP, 8 figurent également dans la liste des HAP prioritaires de l'US-EPA et 13 sont classés par le CIRC comme étant cancérogènes ou potentiellement cancérogènes pour l'être humain. Le JECFA a réévalué les HAP en 2005, en prenant en compte des études plus récentes. Il a conclu que 13 HAP sont clairement génotoxiques et cancérogènes pour les animaux (JECFA, 2006). Ce sont les mêmes HAP que ceux cités par le SCF à l'exception du benzo[g,h,i]pérylène et du cyclopenta[c,d]pyrène.

En 2008, l'EFSA conclut que le B[a]P ne peut être utilisé comme indicateur de la présence d'HAP dans les aliments. En effet, certaines études ont montré la présence de HAP, tels que le chrysène, en l'absence de B[a]P dans les denrées alimentaires. Ainsi, l'utilisation du B[a]P seul, comme indicateur, conduirait à sous-évaluer la quantité de HAP dans les aliments et de leur potentiel toxique (EFSA, 2008). Sur la base des données évaluées et de la toxicité des HAP, l'EFSA a sélectionné 4 HAP (benz[a]anthracène, le benzo[b]fluoranthène, le benzo[a]pyrène et le chrysène) ou 8 HAP (benz[a]anthracène, benzo[b]fluoranthène, benzo[k]fluoranthène, benzo[g,h,i]pérylène, benzo[a]pyrène, chrysène, dibenz[a,h]anthracène et l'indéno[1,2,3-cd]pyrène) comme indicateurs de la contamination des aliments par les HAP.

Tableau 1 *: Structures moléculaires des HAP évalués par les autorités.*

Composé	Abréviation	Structure	US-EPA	JECFA	SCF	UE	CIRC
Acénaphtène	ANA		x				3
Acénaphtylène	ANY		x				ND
Anthracène	ANT		x				3
Benz[a]anthracène	B[a]A		x	x	x	x	2B
Benzo[a]pyrène	**B[a]P**		**x**	**x**	**x**	**x**	**1**
Benzo[b]fluoranthène	B[b]F		x	x	x	x	2B
Benzo[c]fluorène	B[c]F					x	3
Benzo[g,h,i]pérylène	B[ghi]P		x		x	x	3
Benzo[j]fluoranthène	B[j]F			x	x	x	2B
Benzo[k]fluoranthène	B[k]F		x	x	x	x	2B
Chrysène	CHR		x	x	x	x	2B
Cyclopenta[c,d]pyrène	C[cd]P				x	x	2A
Dibenzo[a,e]pyrène	DB[ae]P			x	x	x	3
Dibenz[a,h]anthracène	DBA		x	x	x	x	2A

(Suite page suivante)

Composé	Abréviation	Structure	US-EPA	JECFA	SCF	UE	CIRC
Dibenzo[a,h]pyrène	DB[ah]P			x	x	x	2B
Dibenzo[a,i]pyrène	DB[ai]P			x	x	x	2B
Dibenzo[a,l]pyrène	DB[al]P			x	x	x	2A
Fluoranthène	FLA		x				3
Fluorène	FLU		x				3
Indeno[1,2,3-c,d]pyrène	I[cd]P		x	x	x	x	2B
5-méthylchrysène	5MT			x	x	x	2B
Naphtalène	NAP		x				2B
Phénanthrène	PHE		x				3
Pyrène	PYR		x				3

US-EPA: l'Agence de Protection de l'Environnement des États-Unis ; JECFA : comité d'experts FAO/OMS sur les additifs alimentaires ; SCF : comité scientifique de l'alimentation humaine ; UE: Union Européenne ; Classement par le Centre International de Recherche sur le Cancer (CIRC) : (1) Substance cancérogène, (2A) Substance probablement cancérogène, (2B) Substance possiblement cancérogène, (3) Substance inclassable quant à sa cancérogénicité ; ND : Non déterminé ; X : HAP classés par les autorités. (Adapté de SCF, 2002; JECFA, 2006; EFSA, 2008; IARC, 2010; Zelinkova and Wenzl, 2015).

1.3. Propriétés physico-chimiques

Les propriétés physico-chimiques des HAP varient en fonction de leurs poids moléculaires et de leurs structures (**Tableau 2**). Ce sont des composés lipophiles qui se dissolvent facilement dans les solvants organiques tels que le diméthysulfoxide (DMSO) ou l'acétone (Skupińska et al., 2004). A température ambiante, les HAP sont des solides incolores,

blancs ou jaunes pâles, comme le B[a]P. Ils se caractérisent également par une hydrosolubilité faible et un coefficient de partage octanol/eau (Kow)[1] élevé. Cette caractéristique leur octroie un important potentiel d'adsorption sur les particules en suspension dans l'air ou dans l'eau. Ainsi, ils peuvent être transportés sur de longue distance dans l'environnement. Ce coefficient est également un indicateur de la capacité des polluants à pénétrer les membranes biologiques. Ainsi, une molécule est considérée comme lipophile et potentiellement bioaccumulable dans les tissus organiques riches en lipides lorsque son log Kow est supérieur à 3.

Les HAP sont des molécules chimiquement inactives et stables. Ils sont considérés comme des polluants atmosphériques dangereux dans le groupe des composés organiques non halogénés avec le benzène, les phénols et les aldéhydes. Ils se définissent également par des points de fusion et d'ébullition élevés ainsi qu'une faible pression de vapeur (Achten and Andersson, 2015). Leur solubilité aqueuse et leur pression de vapeur diminuent avec l'augmentation du nombre de cycles aromatiques, rendant les HAP plus résistants à l'oxydation et à la réduction (Hussain et al., 2018). Ils possèdent des spectres d'absorption UV très caractéristiques permettant de les identifier. De plus, la plupart des HAP sont fluorescents et émettent à des longueurs d'onde caractéristiques de la lumière lorsqu'ils sont excités (Abdel-Shafy and Mansour, 2016).

[1] Coefficient de partage octanol/eau (Kow) : Rapport des concentrations d'équilibre d'une substance dissoute dans un système à deux phases composées de deux solvants non miscibles (octanol/eau). Le Kow permet d'appréhender le caractère hydrophile ou hydrophobe d'une molécule. Ainsi, il est utilisé pour évaluer le caractère lipophile d'une molécule.

Tableau 2 *: Propriétés physico-chimiques des 16 HAP classés par l'US-EPA. (Adapté de Harner et al., 2018).*

HAP	Formule chimique	Masse Molaire ($g.mol^{-1}$)	Log Kow	Point de fusion (°C)	Point d'ébullition (°C)	Pression de vapeur (mmHg)	Solubilité dans l'eau à 25°C ($mg.L^{-1}$)
ANA	$C_{12}H_{10}$	154,21	3,92	95,0	279	3,75E - 03	3,8
ANY	$C_{12}H_8$	152,20	3,85	92,0	280	2,90E - 02	16,1
ANT	$C_{14}H_{10}$	178,23	4,45	218,0	342	2,55E - 05	0,045
B[a]P	$C_{18}H_{12}$	228,29	5,91	160,7	435	1,54E - 07	0,011
B[a]P	**$C_{20}H_{12}$**	**252,32**	**6,35**	**179,0**	**495**	**4,89E - 09**	**0,0038**
B[b]F	$C_{20}H_{12}$	252,32	5,78	168,0	481	8,06E - 08	0,0015
B[ghi]P	$C_{20}H_{12}$	276,34	6,90	278,3	500	1,00E - 10	0,00026
B[k]F	$C_{20}H_{12}$	252,32	6,11	215,7	480	9,59E - 11	0,0008
CHR	$C_{18}H_{12}$	228,29	5,79	254,0	448	7,80E - 09	0,0015
DBA	$C_{22}H_{14}$	278,35	6,75	266,0	524	2,10E - 11	0,0005
FLA	$C_{16}H_{10}$	202,26	4,90	108,9	375	8,13E - 06	0,26
FLU	$C_{13}H_{10}$	166,22	4,11	114,6	295	3,24E - 03	1,9
I[cd]P	$C_{12}H_{12}$	276,34	6,70	163,6	536	1,40E - 10	0,062
NAP	$C_{10}H_8$	128,17	3,50	80,0	218	8,89E - 02	31
PHE	$C_{14}H_{10}$	178,23	4,47	98,9	340	6,80E - 04	1,1
PYR	$C_{16}H_{10}$	202,26	5,18	156,0	404	4,25E - 06	0,132

1.4. Sources

Les HAP présents dans l'environnement proviennent de sources naturelles et anthropiques. Ils sont produits lors de phénomènes naturels tels que les feux de forêt, les éruptions volcaniques, les suintements de pétrole ou encore l'érosion des roches sédimentaires contenant des hydrocarbures (**Figure 2**). Néanmoins, la principale source de production des HAP est anthropique (Srogi, 2007). En effet, ces polluants de l'environnement

sont produits lors de procédés industriels (cokeries, sidérurgies…) ou lors d'activités domestiques (chauffage résidentiel, gaz d'échappement des véhicules, fumée de cigarette…).

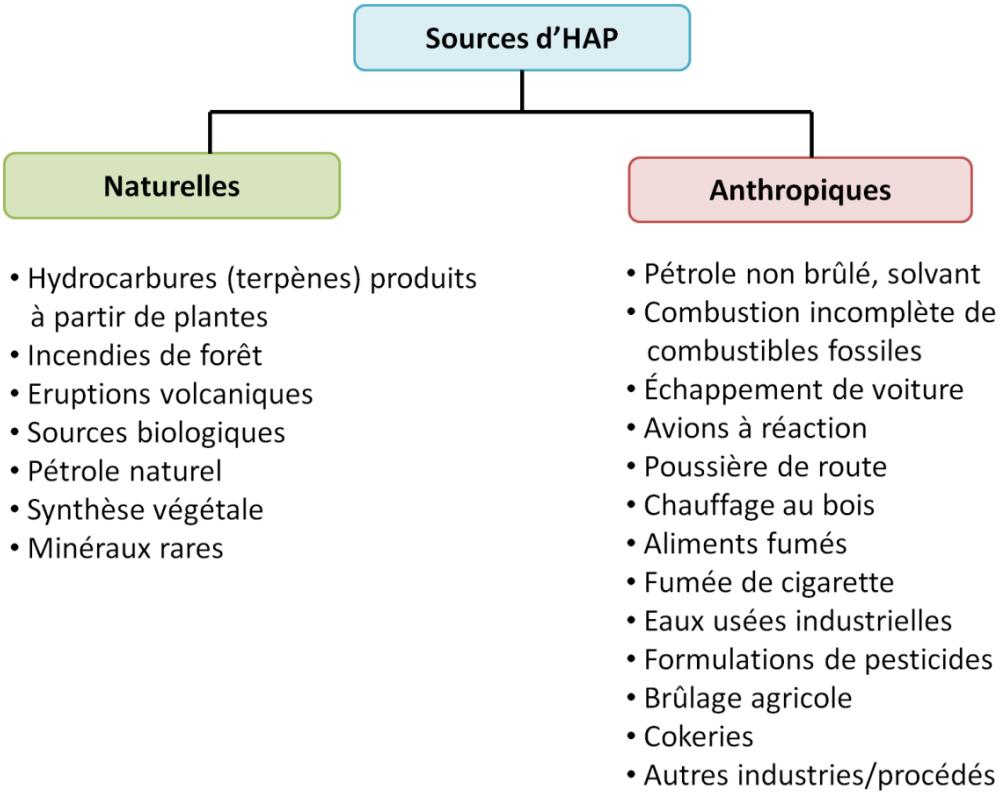


***Figure 2** : Sources naturelles et anthropiques des HAP.*
(Adapté d'Abdel-Shafy and Mansour, 2016; Agrawal et al., 2019).

Les HAP sont essentiellement formés lors de processus pyrolytiques, pétrogéniques ou biologiques (Abdel-Shafy and Mansour, 2016). Les HAP pyrolytiques sont générés durant la combustion incomplète de matières organiques (charbons, bois, huile…) dans des conditions de température élevée (allant de 350°C à plus de 1200°C) et de faible teneur en oxygène. Lors de processus pétrogéniques, les HAP sont générés à partir des produits pétroliers ou de leurs dérivés (déversements d'hydrocarbures océaniques, rejets d'essence, huile moteur…). De plus, les HAP peuvent être produits biologiquement. Ils sont en mesure d'être synthétisés par certaines plantes et bactéries ou être formés lors de la dégradation de la matière végétale (Seo et al., 2007; Ghosal et al., 2016; Chen et al., 2019).

En France depuis les années 90, le secteur résidentiel reste la source majoritaire d'émissions d'HAP dans l'atmosphère (**Tableau 3**). Cependant, les émissions totales des HAP ont diminué de plus de la moitié sur l'ensemble des secteurs qui contribuent aux émissions. La majorité des HAP produits en 2015 sont d'origine anthropique et proviennent du secteur

résidentiel. Depuis 1990, dans ce secteur, les émissions sont passées de 120 tonnes à 42 tonnes en 2015. Les émissions des HAP sont également liées aux conditions climatiques et donc à la consommation du bois de chauffage. Dans certains secteurs, tels que les transports routiers, cette baisse est moins importante. En effet, l'augmentation du trafic routier et de la pénétration des véhicules diesel dans le parc automobile a augmenté les émissions d'HAP jusqu'en 2003 avant de diminuer lentement (CITEPA, 2017).

***Tableau 3** : Émissions atmosphériques en tonnes de huit HAP*.*

Tonnes HAP/an	1990	2010	2015
Transformation énergie	8,8	3,0	3,0
Industrie manufacturière	5,1	4,1	3,9
Résidentiel / tertiaire	120,0	52,0	42,0
Agriculture / sylviculture	4,4	3,9	4,1
Transport routier	17,0	19,0	18,0
Autres transports	1,0	0,8	0,7
Total	**156**	**83**	**72**

**benzo[a]pyrène, benzo[b]fluoranthène, benzo[k]fluoranthène, indeno[1,2,3-cd]pyrène, benzo[g,h,i]pérylène, fluoranthène, dibenz[a,h]anthracène, benzo[a]anthracène par secteur en France. Données issues du CITEPA, 2017 ; (https://www.citepa.org/fr/air-et-climat/polluants/polluants-organiques-persistants/hydrocarbures-aromatiques-polycycliques).*

1.5. Distribution et dégradation dans l'environnement

Les HAP sont retrouvés de manière ubiquitaire dans l'environnement que ce soit dans l'air, le sol et l'eau (**Figure 3**). Ils sont présents sous forme de mélanges, dont la composition dépend de la matière organique d'origine et des procédés de combustion (EFSA, 2008; Nagy and Szabo, 2018).

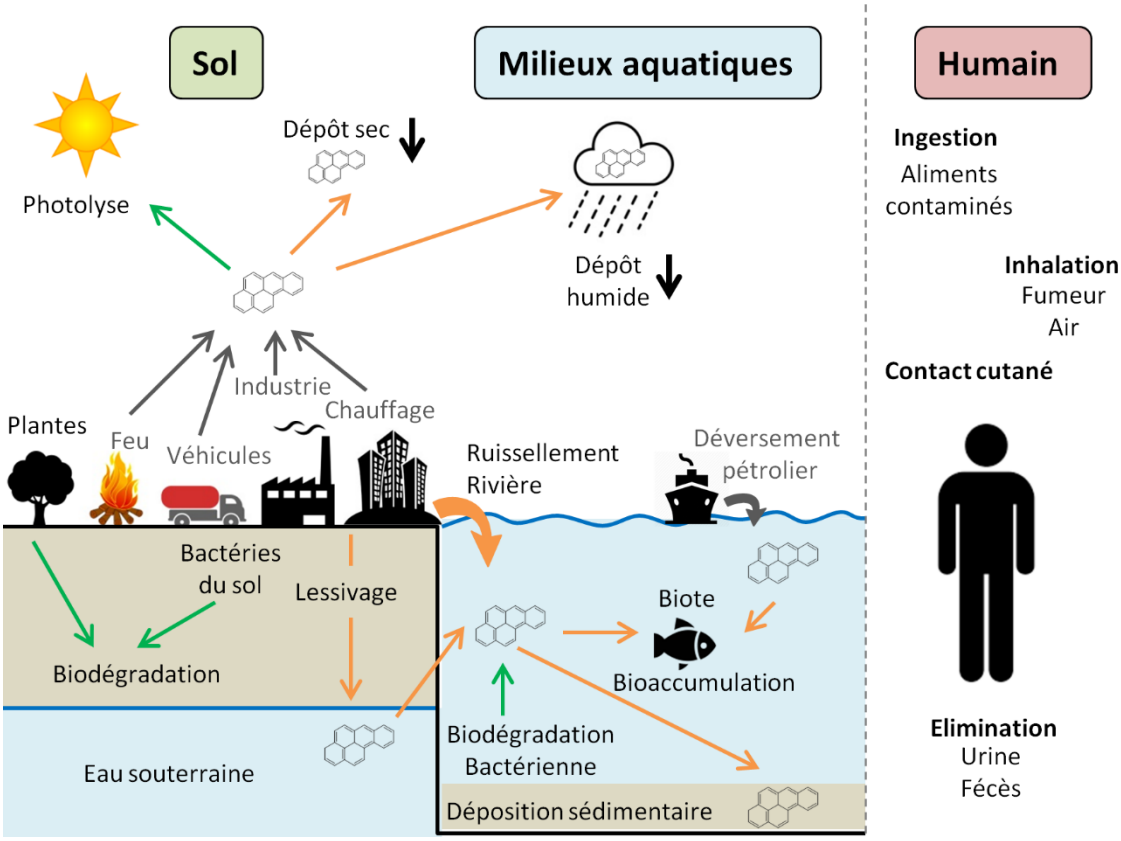


Figure 3 *: Cycle des HAP dans l'environnement.*
(Adapté de Suess, 1976; Abdel-Shafy and Mansour, 2016; Dhar et al., 2019).

Dans l'atmosphère, l'une des voies principales de distribution dans l'environnement, les HAP sont transportés sur de longues distances par les vents. Ils se répartissent entre la phase particulaire et gazeuse. Les HAP légers, ayant une solubilité et une volatilité plus élevées, se retrouvent principalement dans la phase gazeuse. Tandis que ceux de hauts poids moléculaires, se retrouvent dans la phase particulaire, adsorbés sur d'autres particules atmosphériques. Les HAP peuvent être tranférés de l'air au sol, soit par dépôt atmosphérique humide dû aux précipitations, soit par dépôts atmosphériques secs, correspondant aux particules en suspension dans l'atmosphère. Une fois déposés sur les sols, ils sont transférés dans les milieux aquatiques *via* les eaux pluviales et les eaux usées (Skupińska et al., 2004). En raison de leur nature hydrophobe, les HAP présents dans les milieux aquatiques s'accumulent principalement dans les sédiments. Ils peuvent également être absorbés par différents végétaux *via* les feuilles et les racines. Ainsi, ils sont présents dans l'alimentation des animaux et s'accumulent au sein de la chaîne alimentaire (INERIS, 2006).

Les HAP sont dégradés par des réactions photochimiques et par biodégradation dans l'air, l'eau et les sols (Agrawal et al., 2019). Dans l'atmosphère, ils subissent des réactions photochimiques, telles que la photolyse, permettant leur dégradation. Il existe également l'oxydation chimique, qui semble cependant être un mécanisme mineur de dégradation des HAP (Abdel-Shafy and Mansour, 2016). Certains micro-organismes (bactéries), champignons et algues, ont également la capacité de biodégrader les HAP (Agrawal et al., 2019).

Le B[a]P est ainsi retrouvé dans tous les milieux de l'environnement (**Tableau 4**). Dans l'air, exposé au processus de pyrolyse, il possède une demi-vie relativement courte, de l'ordre de quelques heures. Par rapport aux eaux de mers et de rivières, il est présent en forte quantité dans l'eau de pluie. Dans ce milieu et dans les sols, il possède une demi-vie beaucoup plus longue (en jours et années).

***Tableau 4** : Concentration moyenne et demi-vie du B[a]P dans les différents compartiments de l'environnement.*
(Adapaté de van den Berg et al., 2003; INERIS, 2006)

Milieu	Concentration	Demi-vie
Air	< 10 pg/m^3	2,4 h
Eaux :		
Mers et rivières	0,01 à 1 ng/L	5,4 à
Eaux de pluie	≈ 10 ng/L	17,3 ans
Sols	≈ 2 µg/kg	151 jours à 14,6 ans
Sédiments (marins et rivières)	≈ 1 µg/kg	

2. Voies d'exposition

Du fait de la multiplicité des sources d'émissions des HAP, l'Homme est exposé par voies digestive, respiratoire et cutanée (**Figure 3, Tableau 5**). De nombreux facteurs influencent le niveau d'exposition de l'Homme, tel que le lieu d'habitation (urbain ou rural), le mode de cuisson des aliments, le mode de chauffage, le tabagisme et la profession (EFSA, 2008). Certaines expositions peuvent impliquer simultanément plusieurs voies, affectant la dose totale d'absorption (exposition par voie cutanée et par inhalation d'air contaminé) (Rengarajan et al., 2015).

***Tableau 5** : Voies d'exposition au B[a]P pour l'Homme en Europe. (Adapté de EFSA, 2008).*

Voies d'exposition	B[a]P (ng/jour)
Alimentation	185-255
Tabagisme :	
Actif	105
Passif	40
Air inhalé	20
Eau potable	0,2-2

2.1. Exposition par voie orale

Chez les non-fumeurs, la principale voie d'exposition aux HAP est l'alimentation (Duedahl-Olesen, 2013). En effet, jusqu'à 70% de l'exposition humaine peut être associée à l'alimentation (Skupińska et al., 2004). Certains aliments comme les céréales, les légumes et la viande accumulent les HAP (**Tableau 6**). Ainsi, l'apport en HAP dépend du régime alimentaire. Selon les études, l'Homme ingérerait entre 2 et 500 ng/jour de B[a]P (Ramesh et al., 2004). Plus, récemment l'EFSA a estimé que cet apport était de 185 à 255 ng/jour (**Tableau 5**).

Les aliments (céréales/végétaux) sont contaminés dans l'environnement par les sols et/ou par des dépôts atmosphériques. Les animaux d'élevage, quant à eux, sont contaminés par leur alimentation et par les dépôts atmosphériques. Les processus industriels de transformation (cuissons à hautes températures, séchage, fumage, torréfaction) et l'emballage des aliments sont également responsables de la contamination. Certains modes de cuisson, notamment en feu ouvert, tels que le barbecue, favorisent la production d'HAP contrairement à des cuissons plus longues et à plus basses températures (EFSA, 2008; Zelinkova and Wenzl, 2015). L'Homme est également exposé aux HAP *via* l'eau de boisson, avec un apport de 0,2 à 2 ng/jour de B[a]P (**Tableau 5**). Bien que certains types d'aliments accumulent les HAP, la contribution de ces aliments dans les apports quotidiens d'HAP dépend uniquement de leur fréquence dans le régime alimentaire des individus.

***Tableau 6** : Consommation moyenne en B[a]P et en HAP par catégories d'aliments. (Adapté de EFSA, 2008).*

Catégories d'aliments	B[a]P (ng/jour)	HAP 4 (ng/jour)	HAP 8 (ng/jour)
Céréales, produits céréaliers	67	257	393
Légumes, noix, légumineuses	50	221	378
Viandes, produits carnés	42	195	279
Fruits de mer	36	289	421
Graisses (végétales/animales)	26	177	239
Poissons	21	170	210
Café, thé, cacao	21	106	156
Fromage	6	20	30
Fruits	5	75	87
Boissons alcoolisées	4	25	74
Sucre, produits sucrés	5	25	39

HAP 4 et HAP 8 : indicateurs de HAP dans les aliments par l'EFSA ; HAP 4 : benz[a]anthracène, benzo[b]fluoranthène, benzo[a]pyrène et chrysène ; HAP 8 : HAP 4 + benzo[k]fluoranthène, benzo[g,h,i]pérylène, dibenz[a,h]anthracène et l'indéno[1,2,3-cd]pyrène.

2.2. Exposition par voie respiratoire

2.2.1. La pollution atmosphérique

L'exposition humaine par inhalation dépend du lieu d'habitation et du métier exercé. Dans les zones urbaines, compte tenu de la densité de la population, de l'intensité du trafic routier et de la faible dispersion des polluants atmosphériques, l'Homme est exposé à des concentrations de HAP 3 à 5 fois plus élevées que dans les zones rurales (EFSA, 2008). Il a été estimé que l'exposition *via* l'air ambiant était de 10 à 50 ng/jour d'HAP et de 20 ng/jour de B[a]P (Ramesh et al., 2004; EFSA, 2008) (**Tableau 5**). De nombreuses industries (production d'aluminium, de silicium ou de bitume…) génèrent des HAP et surexposent les travailleurs par voies respiratoires, augmentant leur risque de développer des cancers du poumon (Petit et al., 2019). Dans ces industries, la concentration en B[a]P dans l'air peut atteindre 100 µg/m^3 tandis que les concentrations classiques dans l'air ambiant est de l'ordre du ng/m^3 (EFSA, 2008).

2.2.2. Le tabagisme

La consommation de tabac augmente considérablement l'exposition aux HAP d'un individu. Selon les études et les marques de cigarettes, la fumée principale[2] peut contenir entre 118,1 à 2599 ng/cigarette de HAP totaux dont 1,9 à 36,3 ng/cigarette de B[a]P (Lodovici et al., 2004; Ding et al., 2005; Vu et al., 2015). Selon l'EFSA, un individu fumant 20 cigarettes, est exposé à 105 ng/jour de B[a]P (**Tableau 5**), soit 5,25 ng/cigarette.

L'exposition au tabagisme passif[3] influence également l'apport en HAP. En effet, l'apport journalier de B[a]P provenant du tabagisme passif a été estimé à environ 40 ng/jour pour une exposition à 10 ng/m^3 durant 5 heures (**Tableau 5**). Dans la fumée secondaire[4], entre 2,3 à 3,9 µg/cigarette de HAP totaux et 15 à 78 ng/cigarette de B[a]P ont été observés (Lodovici et al., 2004). En plus du tabagisme passif, il a été montré que la fumée de tabac est à l'origine des HAP observés dans les poussières domestiques. Ainsi, la fumée tertiaire[5] entraîne une exposition aux HAP à plus long terme dans les environnements intérieurs (Hoh et al., 2012).

Il existe peu d'étude sur la teneur en B[a]P dans le sérum humain. Dans une cohorte de femmes non-fumeuses et fumeuses régulières, la concentration sérique en B[a]P est passée de 0,22 ± 0,15 ng/mL (soit entre 0,28 et 1,47 nM) chez les non-fumeurs à 0,98 ± 0,56 ng/mL (entre 1,66 et 6,1 nM) chez les fumeuses régulières (Neal et al., 2008). Concernant les femmes exposées au tabagisme passif, l'augmentation de l'apport en B[a]P dans le sérum a doublé par rapport aux individus non-fumeurs avec 0,40 ± 0,13 ng/mL (soit entre 1,07 et 2,1 nM). Dans le sérum de 111 personnes à Hong Kong (Chine), la concentration sérique en B[a]P chez les non-fumeurs était de 7,27 ng/g de lipides et a doublé chez les fumeurs avec 15 ng/g de lipides (Qin et al., 2011). Dans le sérum de 650 personnes décédées de causes diverses aux Etats-Unis, la concentration des 16 HAPs prioritaires de l'US-EPA allait de 3,4 ± 0,78 ng/mL à 12,8 ng/mL (Ramesh et al., 2014).

[2] Fumée primaire ou principale : fumée inhalée par le fumeur
[3] Tabagisme passif : fumée secondaire et tertiaire
[4] Fumée secondaire ou latéral : fumée s'échappant de l'extrémité de la cigarette
[5] Fumée tertiaire : fumée rejetée par le fumeur

2.3. Exposition par voie cutanée

La principale exposition des HAP par voie cutanée est liée au milieu professionnel. Certaines professions et activités industrielles telles que les pompiers, les industries de la cokerie, de l'aluminium, du raffinage du pétrole et la pose de bitumes, ont été associées à l'exposition aux HAP par voie cutanée (Vanrooij et al., 1992; Cherry et al., 2019). L'exposition se fait par contact avec des vêtements ou des outils contaminés mais également par contact cutané direct et par l'exposition aux aérosols.

3. Toxicocinétique des HAP

La toxicocinétique couvre les phénomènes d'absorption, de distribution, de métabolisme et d'excrétion (ADME). Comme tout xénobiotique, le devenir des HAP dans l'organisme est régi par ce système. Ainsi, ils sont absorbés dans l'organisme *via* les poumons, l'intestin et la peau.

3.1. Absorption

3.1.1. Absorption par les voies respiratoires

Le taux d'absorption des HAP par les poumons dépend de la lipophilie et de la nature chimique des particules sur lesquels ils sont adsorbés. Ainsi, plus un composé est lipophile, plus sa vitesse de diffusion à travers l'épithélium trachéobronchique vers la circulation sanguine est faible (Boström et al., 2002). La majorité des HAP liés aux particules traverse en quelques minutes la barrière épithéliale mince des alvéoles pour atteindre la circulation sanguine (Gerde et al., 1993). Cette absorption par l'épithélium alvéolaire est une voie d'entrée importante dans la circulation sanguine des HAP non métabolisés (Gerde, 2001). Ces derniers sont ensuite métabolisés principalement par le foie. Une fraction mineure de HAP se dépose sur l'épithélium bronchique/bronchiolaire, plus épais. Ils sont alors rapidement absorbés par les cellules épithéliales puis métabolisés et transportés lentement vers la circulation sanguine. Ceux liés aux particules, sont également partiellement éliminés dans le tractus gastro-intestinal par l'épuration mucocilliare (Sun et al., 1984; Bevan and Ruggio, 1991).

3.1.2. Absorption par le tractus gastro-intestinal

L'absorption des HAP *via* l'alimentation dépend de la taille et du caractère lipophile de la molécule. Le phénanthrène, plus lipophile que le B[a]P, est retrouvé dans le sang de porc à des concentrations plus élevées que le B[a]P, malgré une dose d'admission trois fois plus faible (Laurent et al., 2001). L'absorption du B[a]P est rapide, les niveaux les plus élevés ayant été observés dans les ganglions lymphatiques thoraciques 3 à 4h après administration par gavage chez le rat (Douglas Rees et al., 1971). Le taux d'absorption des HAP dépend également de l'alimentation et de la présence de sels biliaires (Rahman et al., 1986). L'absorption du B[a]P administré par des aliments riches en graisses est plus importante que lorsque le B[a]P est administré par un régime riche en fibres ou en protéines (Kawamura et al., 1988; O'Neill et al., 1991).

3.1.3. Absorption cutanée

L'absorption cutanée des HAP dépend des espèces et de leur âge. Chez le rat et le cochon d'Inde, l'absorption du B[a]P, *in vivo*, est de 95% et 51% respectivement, après 48h. Chez l'Homme, *in vitro*, sur une peau âgée de 32 ans, l'absorption cutanée est de 23% et augmente à 43% sur une peau âgée de 50 ans (Moody, 1995). L'absorption cutanée varie également en fonction de la zone corporelle exposée. Chez l'Homme exposé à du goudron de houille, la constante de vitesse d'absorption des HAP sur la peau de l'avant-bras est environ deux fois plus élevée que celle de la peau de l'épaule et deux fois plus faible que celle de la peau de la cheville et de la face palmaire de la main (VanRooij et al., 1993). L'absorption cutanée est relativement rapide et dépend du véhicule/matrice utilisé. Chez la souris, l'absorption du B[a]P est de 6% après 1h et 40% après 24h (Sanders et al., 1984). Chez l'Homme, *in vitro,* l'absorption cutanée est de 56% lorsque le B[a]P est dissous dans l'acétone et de 15% lorsque la peau est exposée au sol de jardinage enrichi en B[a]P (Moody et al., 2007). De plus, le B[a]P peut être métabolisé au niveau cutané *via* les kératinocytes (Jacques et al., 2010; Brinkmann et al., 2013).

3.2. Distribution

Quelle que soit la voie d'entrée (pulmonaire, orale et cutanée), le B[a]P est rapidement et largement distribué dans l'organisme, particulièrement dans les tissus très vascularisés tels que le foie, les poumons et les reins (Marie et al., 2010) (**Figure 4**). Dans la plupart des organes internes, des taux détectables de B[a]P ont été observés quelques minutes à quelques heures après administration (Moir et al., 1998). Les niveaux détectés les plus élevés sont obtenus dans le foie (Foth et al., 1988). Le tractus gastro-intestinal contient également des niveaux relativement élevés de métabolites, ceci étant dû à l'excrétion hépatobiliaire (Schlede et al., 1970; Wiersma and Roth, 1983). Les métabolites hydrophiles sont excrétés par l'urine et les fèces et les produits lipophiles sont transportés vers l'intestin par la circulation entéro-hépatique. Les tissus riches en lipides (tissus mammaires et tissus adipeux) sont d'importants dépôts de stockage de HAP. Ils sont libérés dans le lait maternel pendant la lactation par l'intermédiaire des triacylglycérols (Harris et al., 2013).

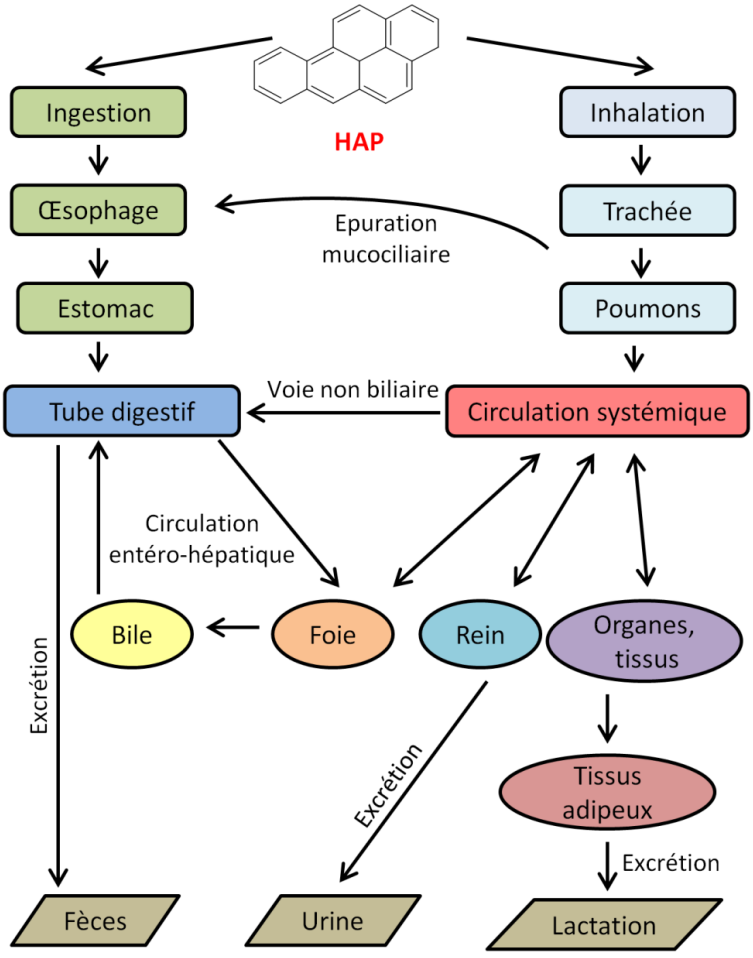


***Figure 4** : Devenir des HAP dans l'organisme après ingestion et inhalation. (Adapté de Ramesh et al., 2004; Harris et al., 2013).*

3.3. Métabolisme

3.3.1. Métabolisme des xénobiotiques

Les xénobiotiques pénètrent dans les cellules par diffusion ou par l'intermédiaire de transporteurs membranaires, appelés pompes d'influx, tels que l'OATP (Organic Anion Transporting Polypeptides) ou l'OCT (Organic Cation Transporter) (**Figure 5**). Ces xénobiotiques sont alors pris en charge par les enzymes du métabolisme des xénobiotiques de phases I et II ou par des transporteurs membranaires, appelés pompes d'efflux, tels que la P-glycoprotéine (P-gp), permettant d'exporter directement la molécule à l'extérieur de la cellule. Lors de la phase I (phase de fonctionnalisation), les xénobiotiques subissent généralement des réactions d'oxydo-réduction, faisant notamment intervenir les cytochromes P450 (CYP). Cette phase a pour objectif de rendre la molécule plus polaire et d'augmenter son hydrophilie facilitant ainsi son excrétion. Lors de la phase de conjugaison, la molécule plus hydrophile est prise en charge par les enzymes de phase II, telles que la Glutathion S-transférase (GST). Ces enzymes ajoutent des groupements hydrophiles aux métabolites permettant de réduire leur niveau d'hydrophobicité, facilitant ainsi leur élimination de la cellule par les pompes d'efflux (ex : Multidrug Resistance Protein (MRP)).

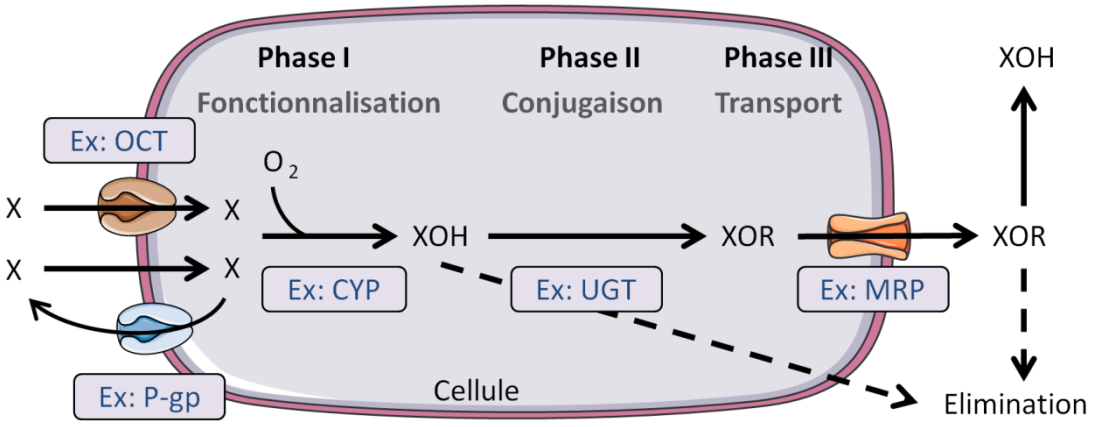


***Figure 5** : Les trois phases du métabolisme des xénobiotiques.*
CYP450 : cytochrome P450; GST : Glutathion S-transférase; MRP : Multi Drug Resistance Proteins; OCT : organic cation transporter; *P-gp : P-glycoprotéine; X : xénobiotique hydrophobe; XOH et XOR : métabolites du xénobiotique plus hydrophiles.*

3.3.2. Les cytochromes P450

Les CYP sont des hémoprotéines formant une famille de métallo-enzymes inductibles, ayant des propriétés d'oxydo-réduction. Cette superfamille d'enzymes inductibles est impliquée dans la bioactivation et la détoxication des xénobiotiques. Elles sont principalement situées au niveau du réticulum endoplasmique et de la mitochondrie (Manikandan and Nagini, 2018). Les CYP agissent comme des mono-oxygénases et utilisent principalement la Nicotinamide Adénine Dinucléotide Phosphate (NADPH) comme donneur d'électrons par l'intermédiaire d'une cytochrome P450 réductase. La réaction d'hydroxylation par le CYP est la suivante :

$$\mathbf{RH + NADPH + H^+ + O_2 \rightarrow ROH + NADP^+ + H_2O}.$$

L'activité de réduction du CYP s'effectue à travers un cycle dit catalytique (**Figure 6**). Le substrat se lie au site actif de l'enzyme, à proximité du groupe hème sous forme ferrique (Fe^{III}) (1). Cette fixation induit un changement dans la conformation du site actif et entraîne le déplacement d'une molécule d'eau (2). Puis, le Fe^{III} est réduit en fer ferreux (Fe^{II}) par un électron provenant du NADPH, un partenaire d'oxydo-réduction (3). L'étape suivante consiste à lier le complexe ferreux, lié au substrat, à l'oxygène moléculaire (4). La liaison à l'oxygène conduit à un réarrangement du complexe $Fe^{II}O_2$ pour former un complexe oxy-P450. Ce complexe peut parfois se dissocier libérant un radical superoxyde réactif, avec un retour de l'enzyme à son état de repos, interrompant ainsi le cycle catalytique (Denisov et al., 2005). Puis, un deuxième électron, fourni par le NADPH, s'introduit dans le complexe et forme un intermédiaire peroxoferrique (5a). Le groupe peroxo formé est rapidement protoné formant un intermédiaire hydroperoxoferrique (5b), qui est protoné une seconde fois, à l'atome d'oxygène distal. C'est alors qu'une hétérolyse de la liaison O-O se produit avec la libération d'une molécule d'eau et la formation d'une espèce de fer (IV)-oxo très réactive (6). Pour finir, le substrat est hydroxylé et libéré dans le cytoplasme (7) *(Denisov et al., 2005).*

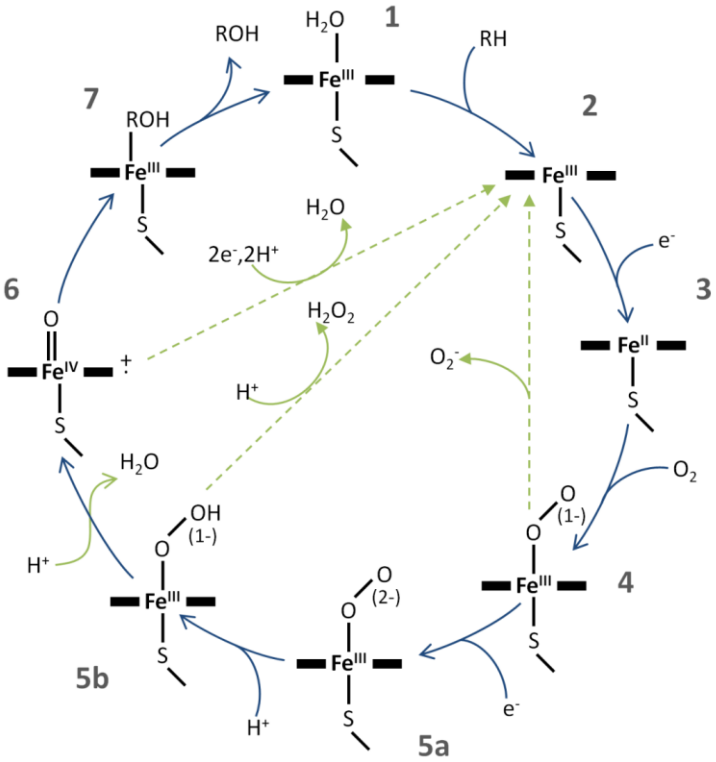


Figure 6 *: Cycle de monooxygénation par les CYP.*
(Adapté de Denisov et al., 2005).

Les CYP450 peuvent également récupérer des électrons par des cytochromes P450 réductases et les cytochromes b5 au niveau du réticulum endoplasmique (**Figure 7**). En effet, le cytochrome b5 est capable de transférer les électrons provenant de la cytochrome P450 réductase ou de la cytochrome b5 réductase, par réduction du NADPH ou du NADH, respectivement, au cytochrome P450 (Porter, 2002). De plus, la cytochrome b5 réductase et le cytochrome b5 peuvent agir comme transporteurs d'électrons, avec le NADH comme donneur au P450 pour l'oxydation notamment du B[a]P, indépendamment de la présence de la cytochrome P450 réductase (Stiborová et al., 2016; Reed et al., 2018).

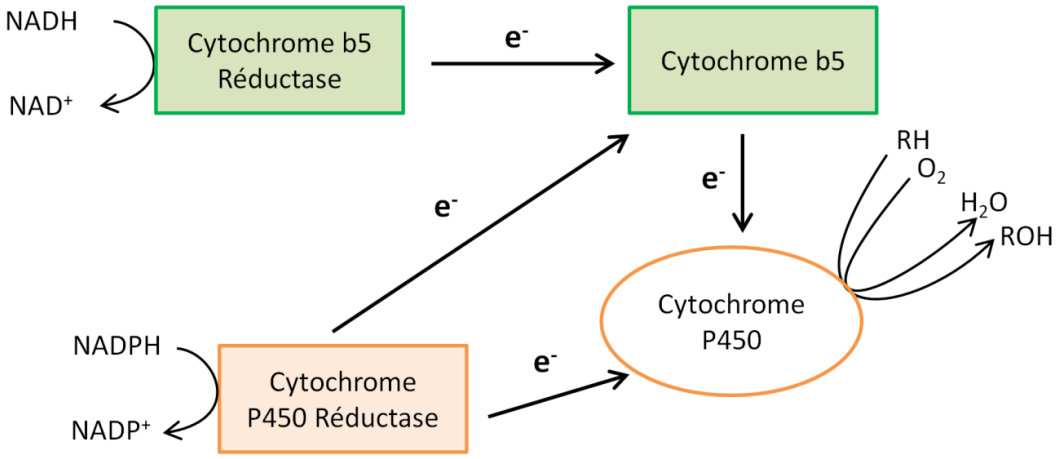


***Figure 7** : Voies de transfert des électrons vers le cytochrome P450 dans le réticulum endoplasmique.*
(Adapté de Porter, 2002; Riddick et al., 2013).

3.3.3. Métabolisation du B[a]P

Le B[a]P, après absorption et distribution dans l'organisme, est métabolisé principalement par le foie. Cependant, il peut être également biotransformé dans les poumons, le tractus gastro-intestinal et la peau. Comme tous les xénobiotiques, le B[a]P suit les trois phases de métabolisation (**Figure 5**). Ces différentes réactions métaboliques impliquent l'action d'enzymes permettant de rendre les molécules plus hydrophiles afin de pouvoir les excréter ensuite par les voies fécale et urinaire. Cependant, ce processus peut conduire à la formation de nombreux métabolites et notamment des métabolites électrophiles ainsi que des Espèces Réactives de l'Oxygène (ERO). Ces molécules réactives étant à l'origine de la cytotoxicité du B[a]P.

3.3.3.1. Phase I ou Phase de fonctionnalisation

Lors de la phase de fonctionnalisation, le B[a]P est oxydé par différentes enzymes et particulièrement les CYP de la famille 1. Le B[a]P est capable d'induire l'expression des CYP qui participent à son propre métabolisme *via* l'activation du récepteur aux hydrocarbures aromatiques (AhR : Aryl hydrocarbon Receptor). L'activation de ce récepteur génère la transcription de gènes cibles codant pour les CYP1A1 et 1B1. Ces deux enzymes sont les plus importantes dans l'activation métabolique du B[a]P (Arlt et al., 2007). D'autres isoformes

telles que le CYP1A2, 2C8, 2C9, 2C19 et 3A4 sont également impliquées dans le métabolisme du B[a]P mais à des niveaux moins importants (Šulc et al., 2016; Shiizaki et al., 2017). Cependant, il semblerait que le CYP1A1 et le CYP1B1 jouent des rôles différents dans le métabolisme du B[a]P. En effet, le CYP1B1 serait impliqué à la fois dans la bioactivation et la détoxification du B[a]P alors que le CYP1A1 serait impliqué majoritairement dans la détoxification (Shiizaki et al., 2017; Reed et al., 2018).

Durant la phase de fonctionnalisation du B[a]P, plusieurs voies de bioactivation et de détoxification sont simultanément activées (Verma et al., 2012). Il existe quatre voies principales entraînant la formation de métabolites réactifs : la voie du 9-hydroxy B[a]P (9-OH-B[a]P), la voie du radical cation, la voie des o-quinones et la voie des diols-époxydes (Gelboin, 1980; Fang et al., 2001; Miller and Ramos, 2001; Sen et al., 2012) (**Figure 8**). Ces voies aboutissent à la formation de métabolites réactifs pouvant induire des dommages cellulaires par la formation d'adduits (ADN et protéines) et des ERO. La cinquième voie est la voie principale de détoxification, formant des composés phénoliques ou dihydrodiols (Miller and Ramos, 2001).

Quelles que soient les voies de bioactivation, le B[a]P est pris en charge par les CYP puis par des Epoxydes Hydrolases (EH) et des Aldo-Kéto Réductases (AKR). Lors de la voie de détoxification, cinq époxydes sont principalement formés : 1,2-oxyde; 2,3-oxyde; 4,5-oxyde; 7,8-oxyde et 9,10-oxyde. Ils subissent un réarrangement spontané non-enzymatique pour former des phénols (Miller and Ramos, 2001). Ainsi, le 3-OH-B[a]P est le métabolite majoritairement formé. C'est un composé non réactif qui est ensuite glucurono-conjugué permettant son élimination. Il est retrouvé dans l'urine humaine et est ainsi utilisé comme biomarqueur d'exposition aux HAP (*cf. Chapitre A.6.1.1.2*). Néanmoins, d'autres composés phénoliques minoritaires peuvent se former : le 1-OH-B[a]P, le 6-OH-B[a]P, le 7-OH-B[a]P et le 9-OH-B[a]P. L'isomère 9-OH-B[a]P, peut être à l'origine de métabolites réactifs (voie du 9-OH-B[a]P). Les époxydes peuvent également subir une hydratation en trans-dihydrodiols par l'action d'époxydes hydrolases et former le B[a]P-9,10-trans dihydrodiol, le B[a]P-4,5-trans dihydrodiol et le B[a]P-7,8-trans dihydrodiol.

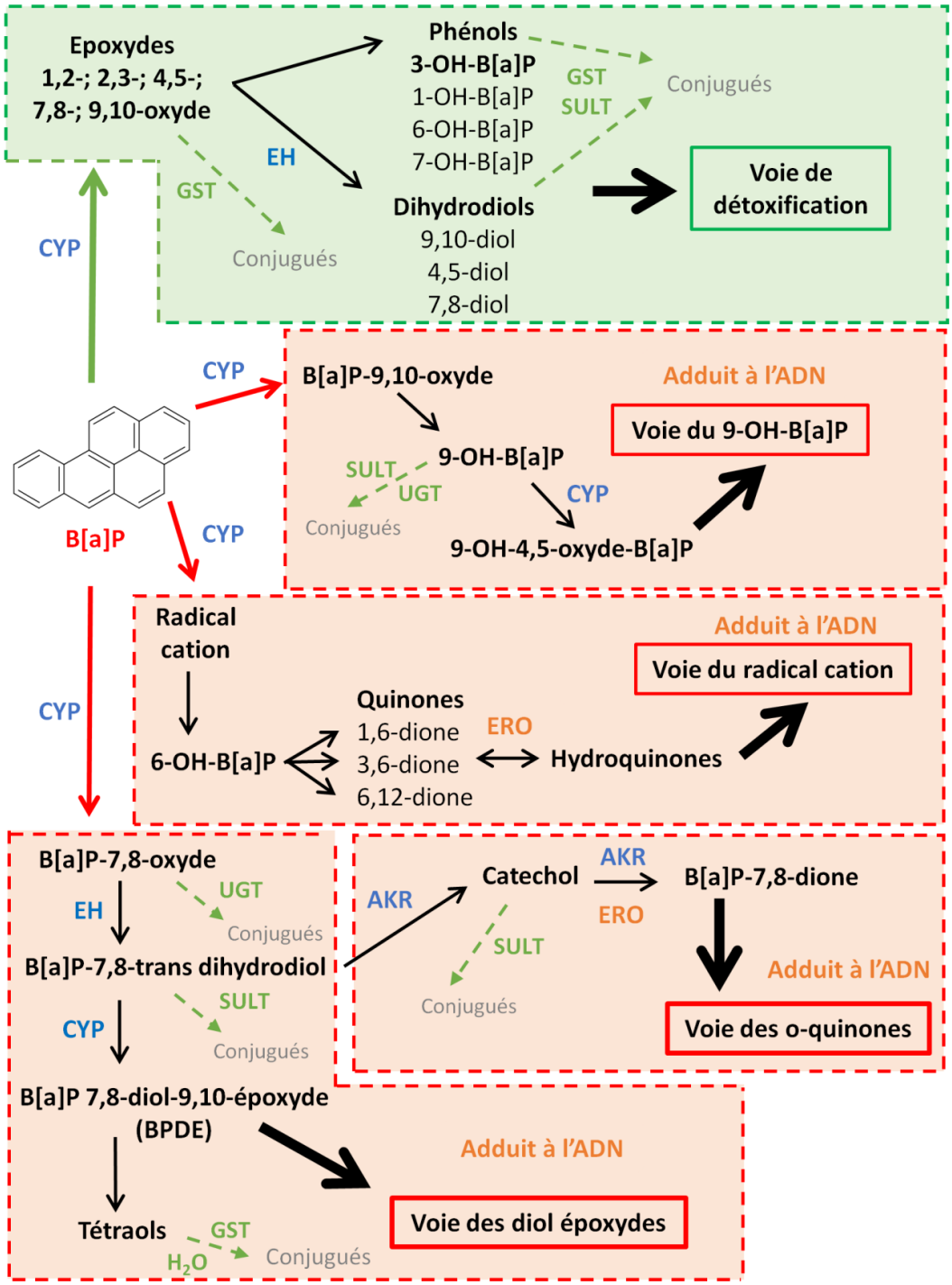


Figure 8 *: Les principales voies du métabolisme du B[a]P.*
AKR : Aldo-Kéto Réductase ; B[a]P : Benzo[a]pyrène ; BPDE : B[a]P-diol-époxydes ; CYP : Cytochrome P450 ; EH : Epoxyde Hydrolase ; GST : Gluthathion S-transférase ; SULT : Sulfotransférase ; UGT : UDT-Glucuronyltransférase. (Adapté de Verma et al., 2012).

Parmi les voies de bioactivation on retrouve celle du 9-OH-B[a]P. L'époxyde B[a]P-9,10-oxyde formé par les CYP, subit une hydroxylation spontanée pour former le 9-OH-B[a]P. Il est ensuite métabolisé par les CYP en B[a]P-9-OH-4,5-oxyde capable d'induire des adduits à l'ADN. Concernant la voie des diol-époxydes, qui est la voie prédominante, le B[a]P-7,8-oxyde, sous

l'action d'EH, forme du B[a]P-7,8-trans dihydrodiol, puis est métabolisé par les CYP en 4 énantiomères de B[a]P-diol-époxydes (BPDE), considéré comme le cancérogène ultime du B[a]P. Par la suite, le BPDE peut être hydrolysé en tétraols inactifs ou conduire à des dommages de l'ADN par la formation d'adduits. Le B[a]P-7,8-trans dihydrodiol peut également conduire à la formation de catéchol (B[a]P-7,8-catéchol) *via* l'action d'AKR qui, par deux oxydations successives, forme du B[a]P-7,8-dione, correspondant à la voie des o-quinones. Pour finir, le radical cation, un composé très instable, est formé par oxydation d'un électron en faisant intervenir des CYP à activité peroxydase (Cavalieri and Rogan, 1992). L'hydrolyse spontanée du radical cation aboutit à la formation de 6-OH-B[a]P qui, par auto-oxydation, va former trois quinones : B[a]P-1,6-dione, B[a]P-3,6-dione, et B[a]P-6,12-dione (Sen et al., 2012). Ces quinones formées peuvent subir des réactions d'oxydo-réductions, ce qui peut conduire à l'apparition d'hydroquinones qui elles-mêmes peuvent être retransformées en quinones.

3.3.3.2. Phase II ou Phase de conjugaison

La phase de conjugaison ou phase II est médiée par les enzymes de phase II ou également appelées enzymes de conjugaison. Parmi ces enzymes, on retrouve les GST, les UDP-Glucuronyl Transférases (UGT) et les Sulfotransférases (SULT) (Gelboin, 1980). Ainsi, ces enzymes ajoutent des groupements polaires endogènes tels que le glutathion pour la GST, l'acide glucuronique pour l'UGT et des groupements sulfates pour la SULT. De façon générale, la SULT prend en charge le catéchol et les GST le BPDE. Tandis que les UGT prennent en charge différents métabolites phénoliques du B[a]P. La conjugaison de ces groupements aux métabolites entraîne une augmentation de leur hydrophilie facilitant leur élimination et ainsi diminuant la formation d'adduits à l'ADN.

3.3.3.3. Phase III ou Phase de transport

Les métabolites formés à l'issue des phases I et II sont éliminés au cours de cette phase *via* des transporteurs d'efflux. Ces transporteurs permettent l'élimination des métabolites de la cellule. Le transport des métabolites est assuré par des transporteurs membranaires de la famille des ATP-Binding Cassette (ABC) tels que la P-gp, les MRP ou les BCRP (Breast Cancer Resistance Protein).

3.4. Elimination

Les B[a]P et ses métabolites sont éliminés par l'organisme principalement par le système hépatobiliaire et le tractus gastro-intestinal indépendamment de la voie d'administration (Foth et al., 1988; Vandewiel et al., 1993). L'excrétion urinaire est une autre voie d'élimination mais reste mineure. Chez le rat, entre 4 et 12% de la dose de B[a]P administré par voie orale est éliminé dans l'urine en 72h (Yamazaki and Kakiuchi, 1989) et 70-75% du B[a]P et de ces métabolites sont éliminés dans les fèces.

4. Voies de signalisations associées à la toxicité du B[a]P

4.1. Récepteur aux hydrocarbures aromatiques (AhR)

L'AhR est un facteur de transcription appartenant à la superfamille de bHLH/PAS (basic helix-loop-helix-PER-ARNT-SIM). Il joue un rôle crucial dans la régulation du métabolisme des xénobiotiques et dans divers processus cellulaires tels que le cycle cellulaire, la fonction de barrière épithéliale, la migration et l'adhésion cellulaires (Murray et al., 2014). AhR est activé par de nombreuses molécules exogènes (B[a]P) mais également des molécules endogènes (Bersten et al., 2013). Chez l'Homme, l'AhR est ubiquitaire et particulièrement exprimé dans les poumons, le placenta, la rate, le pancréas et le foie, ainsi que dans les muscles du cœur, du cerveau et les muscles squelettiques (Yi et al., 2018). En plus de son rôle capital dans la régulation du métabolisme des xénobiotiques, il est connu pour être impliqué dans l'inflammation, l'immunité, la reproduction, le métabolisme énergétique et le développement (Bock, 2019).

4.1.1. Structure et partenaires de AhR

Les structures du gène et de la protéine codants pour AhR sont similaires aux autres membres de la famille bHLH/PAS. Le gène AhR est localisé sur le chromosome 7p21 chez l'Homme. Il est aussi hautement conservé chez les animaux (Formosa and Vassallo, 2017). La protéine AhR est composée de 848 résidus d'acides aminés et de trois domaines fonctionnels : le domaine bHLH, les domaines PAS et le Domaine de Transactivation (TAD) (**Figure 9**).

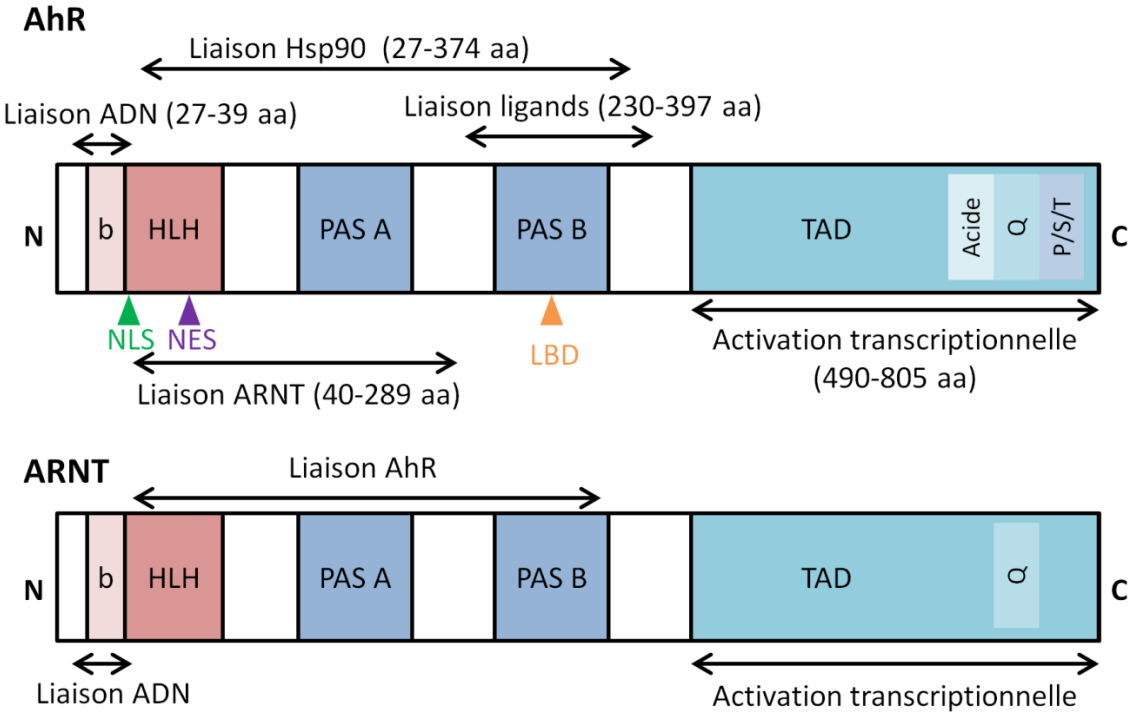


***Figure 9** : Les domaines fonctionnels de la protéine AhR et de son partenaire ARNT.*
Acide : Domaine acide (glutamate/aspartate) ; Ahr : Aryl hydrocabon receptor ; ARNT : AhR Nucleat Translocator ; LBD : Ligand Bonding Domain ; PAS : PER-ARNT-SIM ; Hsp90 : Heat Shock Protein 90 ; NES : Nuclear Export Signal ; NLS : Nuclear Localization Signal ; Q : glutamine ; S/T/P : sérine, thréonine et proline ; TAD : domaine de transactivation. (Adapté de Formosa and Vassallo, 2017; Larigot et al., 2018).

Le domaine b/HLH est situé dans la région N-terminale de la protéine. Il contient les domaines Nuclear Localization Signal (NLS) et Nuclear Export Signal (NES) qui contrôlent la distribution d'AhR entre le cytoplasme et le noyau (Ikuta et al., 2009). Les régions basiques (b) sont impliquées dans la liaison à l'ADN et la partie HLH intervient dans l'hétérodimérisation de AhR avec son translocateur nucléaire, AhR Nuclear Translocator (ARNT). HLH intervient également dans la liaison avec les protéines chaperonnes, Heat Shock Protein 90 (Hsp90) (Antonsson et al., 1995). Le domaine b/HLH est suivi par deux domaines PER-ARNT-SIM (PAS), le domaine PAS A et le domaine PAS B. Le domaine PAS A est impliqué dans l'hétérodimérisation entre AhR et ARNT. Quant au domaine PAS B, il possède un Ligand Binding Domain (LBD) permettant la liaison du ligand sur ce domaine. Il est également impliqué dans la liaison avec les protéines chaperonnes Hsp90. Dans la région C-terminale de la protéine, le TAD joue le rôle de médiateur dans l'activation transcriptionnelle. Il est composé de trois sous-domaines : un sous-domaine enrichi en résidus acides (glutamate/aspartate), un deuxième enrichi en glutamine (Q) et un troisième enrichi en sérine, thréonine et proline (S/T/P). TAD est impliqué dans le recrutement de co-activateurs

participant à la régulation de l'activité transcriptionnelle de AhR (Murray et al., 2014; Larigot et al., 2018).

La forme non activée de AhR est localisée dans le cytoplasme sous la forme d'un complexe avec plusieurs protéines chaperonnes dont deux Hsp90, une co-chaperonne p23 *via* l'Hsp90, X-Associated Protein 2 (XAP2 ou appelé AIP : AhR Interacting Protein) et la tyrosine kinase src (c-src). Ce complexe multiprotéique sert à maintenir la conformation correcte du récepteur, à assurer la capacité de AhR à fixer les ligands et à renforcer son efficacité transcriptionnelle. Les Hsp90 ont pour fonction de masquer l'activité de liaison à l'ADN de AhR et de maintenir le récepteur dans une conformation permettant une affinité élevée de liaison avec les ligands.

XAP2 est impliquée dans la stabilité du complexe entre AhR et les Hsp90. Elle participe également au repliement et à la stabilisation de AhR, facilitant sa localisation cytoplasmique et ainsi, empêchant sa translocation dans le noyau. De plus, elle limite la dégradation de AhR par le protéasome. La co-chaperonne p23 protège AhR contre la dégradation due à l'ubiquitination et assure la localisation cytoplasmique. La protéine kinase c-src (Proto-oncogène tyrosine-protéine kinase src) participe aux premières étapes de l'activation de AhR lors de la liaison au ligand et aux mécanismes non génomiques de sa signalisation (Rothhammer and Quintana, 2019). ARNT a une structure similaire à celle de AhR (**Figure 9**). Les domaines b/HLH et PAS A sont impliqués dans la dimérisation avec AhR et dans la liaison avec l'ADN. Elle possède également un domaine TAD. Cependant, malgré la présence d'un domaine PAS B, ARNT n'est pas capable de fixer des ligands (Larigot et al., 2018).

4.1.2. Ligands de AhR

De nombreux ligands de AhR ont été décrits dans la littérature ayant des effets agonistes ou antagonistes. Les ligands de AhR peuvent être classés en deux catégories : les ligands endogènes et les ligands exogènes (**Tableau 7**). Les ligands exogènes comprennent les polluants de l'environnement tels que les HAP mais également les polychlorobiphényles (PCB) et les dioxines halogénées. La 2,3,7,8-Tétrachlorodibenzo-p-dioxine (TCDD) appelée également dioxine, est considérée comme le ligand prototypique de AhR. La toxicité induite par la TCDD chez l'Homme est notamment médiée par sa capacité à activer AhR. Ce polluant

peut entraîner des lésions cutanées, des atteintes du système immunitaire, hépatiques, neurologiques, des fonctions reproductives et des cancers (White and Birnbaum, 2009). D'autres composés synthétiques tels que des pesticides (propanil) et des médicaments (oméprazole) ainsi que des composés naturels comme les polyphénols (resvératrol), ont été décrits comme ligands de AhR (Yi et al., 2018). Les ligands endogènes comprennent les indigoïdes, les métabolites hémiques, les eicosanoïdes, et des dérivés du tryptophane (**Tableau 7**) (Stejskalova et al., 2011).

***Tableau 7** : Exemples de ligands de AhR.*

Exogènes		**Endogènes**
Composants synthétiques	*Composants naturels*	
Polluants de l'environnement	**Polyphénols**	**Indigoïdes**
HAP	Resvératrol	Indigo
PCB	Diosmine	Indirubine
TCDD	Quercétine	
Médicaments	**Alcaloïdes**	**Métabolites hémiques**
Oméprazole	Berbérine	Bilirubine
Primaquine	Harmane	Biliverdine
		Hémine
Inhibiteurs de kinase	**Caroténoïdes**	**Eicosanoïdes**
PD98059	Astaxanthine	Lipoxine A4
U0126	Canthaxanthine	
Flavonoïdes synthétiques		**Dérivés du tryptophane**
TMF		Tryptamine
α-NF		Acide indole-acétique
		FICZ
Pesticides		
Propanil		
Diuron		
Nouveaux ligands synthétiques		
CH223191		
VAF347		

α-NF : α–Naphthoflavone ; CH223191 : 2-Methyl-2H-pyrazole-3-carboxylic acid (2-methyl-4-o-tolylazo-phenyl)-amide ; FICZ : 6-Formylindolo[3,2-b]carbazole ; HAP : Hydrocarbures Aromatiques Polycycliques ; PCB : Polychlorobiphényles ; PD98059 : 2-(29-amino-39-methoxyphenyl)-oxanaphthalen-4-one ; TCDD : 2,3,7,8-Tétrachlorodibenzo-p-dioxine ; TMF : 6,2',4'-Triméthoxyflavone ; U0126 : 1,4-Diamino-2,3-dicyano-1,4-bis[2-aminophenylthio]butadiene ; VAF347 : [4-(3-Chloro-phenyl)-pyrimidin-2-yl]-(4-trifluoromethyl-phenyl)-amine. (Adapté de Stejskalova et al., 2011; Yi et al., 2018).

4.1.3. Activation canonique de AhR

Une fois entré dans la cellule, le ligand cytoplasmique, tel que le B[a]P, se fixe à AhR au niveau du LBD dans le domaine PAS B. La liaison du ligand modifie la conformation de AhR entraînant l'exposition du site de translocation nucléaire (**Figure 10**). Le complexe cytoplasmique est alors transloqué vers le noyau où il s'hétérodimérise avec ARNT provoquant sa dissociation avec son complexe cytoplasmique. Le dimère ainsi formé, se lie à des séquences d'ADN spécifiques situées dans les régions promotrices de gènes cibles appelées Xenobiotic Response Element (XRE). Cette fixation active le recrutement de divers composants de la machine transcriptionnelle et permet la transcription de nombreux gènes cibles tels que les CYP1A1, 1A2, 1B1, UGT1A1, NAD(P)H dehydrogenase [quinone] 1 (NQO1), Multi Drug Resistance 1 (MDR1) et Breast Cancer Resistance Protein (BRCP) (Beischlag et al., 2008). Puis AhR est exporté hors du noyau, et est rapidement dégradé dans le compartiment cytoplasmique par le protéasome. Parmi les gènes cibles activés par AhR, AhR Repressor (AhRR) est un facteur d'autorégulation de la voie de signalisation associée à AhR. AhRR est induit par les ligands de AhR et en devient un compétiteur pour se fixer à ARNT. Il permet ainsi, en ce liant à ARNT, de moduler la transcription des gènes dépendants de AhR.

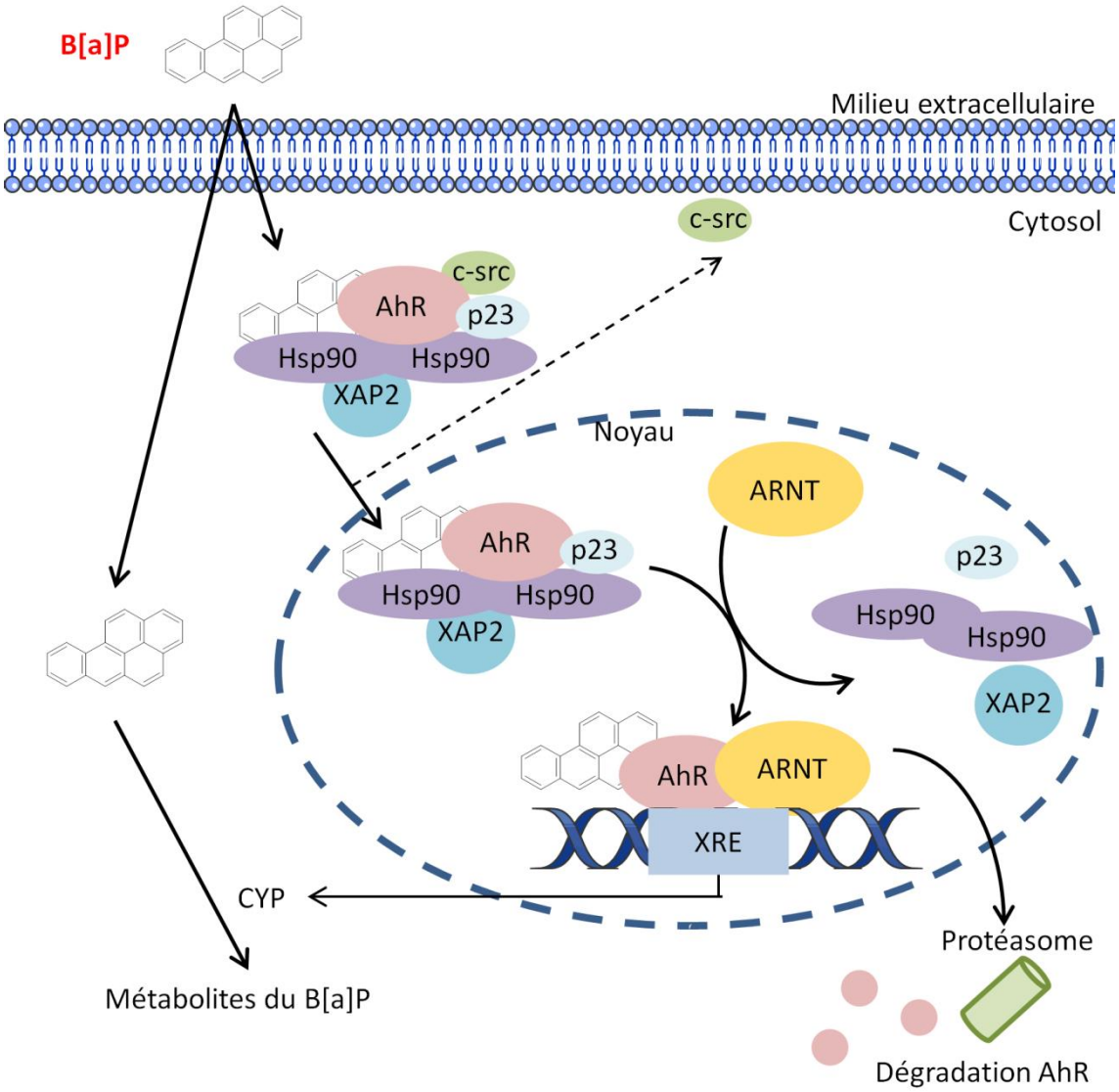


Figure 10 *: Activation de AhR par le B[a]P.*
AhR : Aryl hydrocarbon Receptor ; ARNT : AhR Nuclear translocator ; B[a]P : Benzo[a]pyrène ; CYP : Cytochrome P450 ; Hsp90 : Heat Shock Protein ; c-src : Proto-oncogène tyrosine-protéine kinase src ; XAP2 : X-associated Protein 2 ; XRE : Xenobiotic Response Element. (Adapté de Murray et al., 2014; Rothhammer and Quintana, 2019).

4.1.4. Activation non-canonique de AhR

AhR peut également activer des voies dites non-canoniques. Ces voies sont génomiques ou non-génomiques et indépendantes de l'activation de ARNT (**Figure 11**). Ainsi, AhR peut induire l'expression de gènes par l'intermédiaire d'autres facteurs de transcription tels que Nuclear factor-kappa B (NF-κB) et le récepteur aux œstrogènes alpha (ERα) (Denison et al., 2011; Guyot et al., 2013; Jackson et al., 2015). AhR est capable de se lier avec les sous-unités Re1A et Re1B (appelé également p65) de NF-κB, induisant la transcription de plusieurs

cytokines pro-inflammatoires telles que l'interleukine-6 (IL-) et l'IL-8, et du proto-oncogène c-myc (Vogel and Matsumura, 2009; Chen et al., 2012).

L'activation de AhR peut également conduire à une signalisation non-génomique (Guyot et al., 2013; Larigot et al., 2018). Il a récemment été démontré que ces voies provoquent l'augmentation de la concentration calcique intracytosolique (provenant à la fois du milieu extracellulaire et du réticulum endoplasmique) et l'activation de la tyrosine kinase Src (Matsumura, 2009; Tomkiewicz et al., 2013). L'activation de cette dernière peut également être accompagnée de l'activation de Focal Adhesion Kinase (FAK) qui modifie les propriétés d'adhésion de la cellule par une perturbation des points d'adhésion focaux. L'augmentation du calcium (Ca^{2+}) intracytosolique provoque l'activation de la Protéine Kinase C (PKC), qui phosphoryle la Phospholipase A2 (PLA2) avec la production subséquente d'acide arachidonique. L'activation parallèle des MAP kinases (Mitogen-Activated Protein kinases) par Src entraîne la transcription de la Cyclooxygénase 2 (COX2) *via* le facteur de trancription Activator Protein-1 (AP-1). La COX2 utilise alors l'acide arachidonique pour produire des prostaglandines associées à l'inflammation.

L'activation de AhR semble également affecter la structure de la membrane plasmique. Dans les cellules endothéliales issues des artères pulmonaires porcines, exposé au PCB77 (3,3'4,4'-Tétrachlorobiphényl), il a été démontré que la Cavéoline-1 (Cav-1) peut directement se lier à AhR (Lim et al., 2008; Majkova et al., 2010). Dans les fibroblastes dermiques de souris, l'activation de AhR permettrait le recrutement de la Cav-1 dans les radeaux lipidiques participant ainsi à la migration cellulaire (Rey-Barroso et al., 2014). De plus, il a été démontré que la signalisation non-génomique de AhR implique PAL2/Ca^{2+} intracytosolique et l'activation de Src/FAK (Puga et al., 1997; Dong and Matsumura, 2008; Tomkiewicz et al., 2013), qui interagissent également avec la Cav-1 (Graziani et al., 2004; Patel et al., 2008; Majkova et al., 2010).

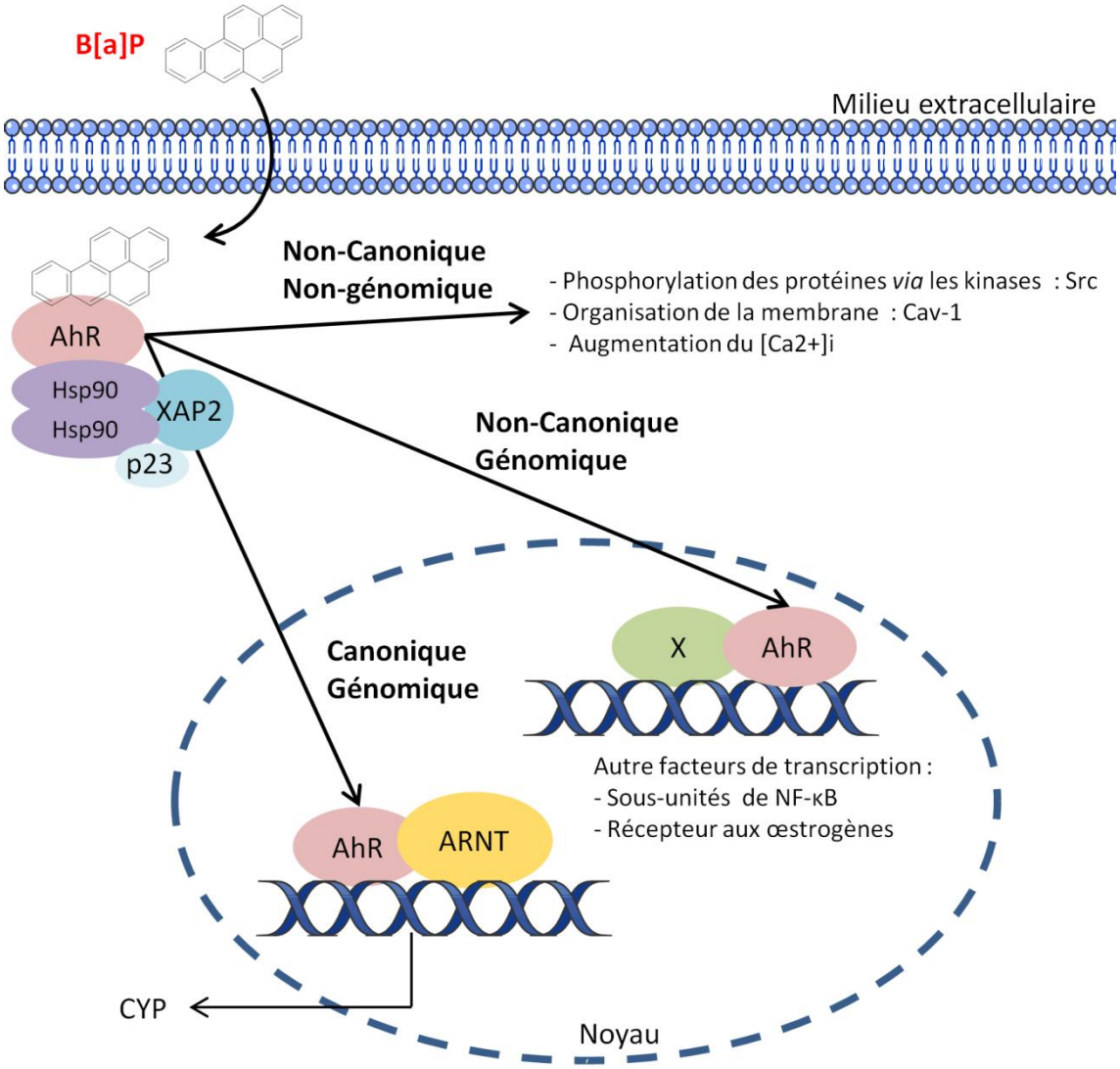


Figure 11 *: Les voies de signalisation de AhR.*
AhR : Aryl Hydrocarbon receptor ; ARNT : AhR Nuclear translocator ; B[a]P : Benzo[a]pyrène ; [Ca $^{2+}$]i : concentration du calcium intracytosolique ; CYP : Cytochrome P450 ; Hsp90 : Heat Shock Protein ; src : Protéine kinases src ; XAP2 : X-associated Protein 2 ; X : Facteurs de transcription. (Adapté de Holme et al., 2019a).

5. Toxicité du B[a]P

5.1. Immunotoxicité

De manière générale, les HAP sont plutôt décrits pour avoir des effets immunosuppresseurs. Ainsi, il a été démontré que les HAP sont capables d'inhiber l'immunité humorale et l'immunité à médiation cellulaire (Burchiel and Luster, 2001). En effet, chez la souris *in vivo* et *in vitro* dans les splénocytes, le B[a]P inhibe la production d'anticorps par les

lymphocytes B (White and Holsapple, 1984; Ladics et al., 1992). Une inhibition de la production d'anticorps (IgG et IgA), a également été observée chez des travailleurs de four à coke exposés de façon chronique aux polluants atmosphériques et notamment aux HAP (Szczeklik et al., 1994). Les HAP sont également capables d'altérer l'immunité innée. Ainsi, chez la souris, le B[a]P inhibe la présentation antigénique par les macrophages ainsi que leur interaction avec les lymphocytes T (Myers et al., 1987, 1988). Chez l'Homme, *in vitro*, à partir de monocytes sanguins, le B[a]P perturbe la différenciation et la maturation des cellules dendritiques et réduit leur activité endocytaire (Laupeze et al., 2002). Le B[a]P pertube également la différenciation des monocytes en macrophages, altère les propriétés fonctionnelles de ce dernier (endocytose, phagocytose, production de Tumor necrosis factor alpha (TNF-α) déclenchée par le Lipopolysaccharides (LPS)) et provoque une apoptose des macrophages humains différenciés (van Grevenynghe et al., 2003, 2004)

Parallèlement à leurs effets immunosuppresseurs, selon les circonstances d'exposition (dose et durée d'exposition), les HAP sont également capables de stimuler la réponse immunitaire. Ainsi, le B[a]P est capable de stimuler le système immunitaire notamment en augmentant la production de certaines cytokines/chimiokines telles que l'IL-8, le TNF-α, le C-C motif chemokine Ligand 1 (CCL1) et l'IL-1β dans les macrophages humains (Lecureur et al., 2005; N'Diaye et al., 2006; Podechard et al., 2008). De plus, les Diesel Exhaust Particles (DEP) connus pour contenir du B[a]P, induisent une augmentation de la quantité d'IgE chez les basophiles humains (Kepley et al., 2003). Ainsi, les HAP par leurs effets immunostimulateurs seraient à l'origine du développement ou de l'aggravation de l'asthme et des troubles allergiques (Pandya et al., 2002; Huang et al., 2018; Jung et al., 2012).

5.2. Cardiotoxicité

Les maladies cardiovasculaires (MCV) représentent la première cause de mortalité dans le monde d'après l'OMS (WHO, 2018). Les principaux facteurs de risques de MCV sont une mauvaise alimentation, un manque d'activité physique, l'usage excessif d'alcool ainsi que le tabagisme et la pollution atmosphérique. Le tabagisme et les polluants atmosphériques ont été associés au développement de MCV. Il se trouve que les HAP font partie de leurs constituants majeurs (Centers for Disease Control and Prevention (US) et al., 2010; Holme et al., 2019b). De plus, une association positive et significative entre l'exposition aux HAP et un

risque accru de MCV a été révélée (Poursafa et al., 2017). Dans certaines circonstances professionnelles, l'exposition aux HAP a également été corrélée positivement à l'apparition de MCV (Friesen et al., 2010; Brucker et al., 2014). Ainsi, un taux élevé de marqueurs du risque de MCV (homocystéine[6], High Density Lipoprotein (HDL)) et cholestérol) a été constaté chez les ramoneurs, connus pour être exposé aux HAP (Alhamdow et al., 2017). Chez des travailleurs du bitume, il a été signalé un lien entre le niveau quantitatif d'exposition à long terme aux HAP et le risque de décès par cardiopathie ischémique (Burstyn et al., 2005). Il a également été démontré qu'une exposition *in utero* au B[a]P, chez la souris, entraîne des malformations cardiovasculaires chez les fœtus (Jules et al., 2012). Les maladies coronariennes, notamment l'athérosclérose, les maladies artérielles périphériques et les infarctus du myocarde sont des MCV qui ont été associées aux HAP (Gustavsson et al., 2001; Curfs et al., 2004; Burstyn et al., 2005; Xu et al., 2013).

Les cellules endothéliales sont des barrières biologiques permettant le maintien de l'homéostasie vasculaire (Gerde, 2001; Boström et al., 2002). Du fait de leur caractère lipophile, les HAP ont la capacité de traverser cette barrière et d'entrer dans la circulation sanguine. Il apparaît donc que les HAP peuvent être présents dans la circulation sanguine sans avoir subi de métabolisation et que les cellules endothéliales sont des cibles privilégiées pour ces molécules.

Il est d'ailleurs reconnu que les HAP favorisent l'apparition de MCV notamment *via* un dysfonctionnement de l'endothélium, favorisant l'apparition de MCV (Ji et al., 2013b; Holme et al., 2019b). Les HAP comme le B[a]P sont considérés comme des facteurs d'initiation de l'athérosclérose et participent à l'augmentation du volume des plaques athéromateuses. Plusieurs mécanismes ont été associés à ces phénomènes notamment : la perturbation de la vasomotricité, le dysfonctionnement endothélial (*via* la production d'ERO), l'augmentation de l'adhésion des monocytes à la surface des cellules endothéliales, l'apparition des macrophages spumeux (ce qui entretient l'état inflammatoire) et la prolifération des cellules musculaires lisses (Ou and Ramos, 1992; Ramos and Parrish, 1995; Yang et al., 2009).

[6] Homocystéine : acide aminé soufré produit au cours du métabolisme de la méthionine. Une augmentation modérée de l'homocystéine plasmatique est associée à l'augmentation du risque de maladies coronariennes.

5.3. Cancérogénicité

5.3.1. Chez l'animal

Le B[a]P est un cancérogène à la fois local et systémique. Il induit des tumeurs chez toutes les espèces étudiées (souris, rat, hamster, cobaye, lapin, canard et triton) quel que soit le mode d'exposition (orale, cutanée, inhalation, intratrachéale, intrabronchique, sous-cutanée, intrapéritonéale, intraveineuse). Il a clairement été établi que le B[a]P induit des tumeurs malignes dans les poumons, la trachée, le larynx, le pré-estomac[7] (rongeurs), le foie, les tissus lymphoïdes, la peau, les glandes mammaires et le sarcome (IARC, 2010).

5.3.2. Chez l'Homme

Chez l'Homme, les HAP augmentent la survenue du cancer du poumon, de la vessie et de la peau (Armstrong et al., 2004; Bolt, 2014; Stenehjem et al., 2017). De nombreuses études épidémiologiques ont montré une association significative entre l'exposition aux HAP en milieu professionnel et ces cancers chez l'Homme. Les tableaux 16 bis et 36 bis des maladies professionnelles établies par l'Institut National de Recherche et de Sécurité (IRNS), listent plusieurs cancers liés à l'exposition aux HAP notamment dans l'industrie des dérivés de la houille, de la suie issue de la combustion du charbon et de certains dérivés pétroliers. Par ailleurs, les HAP sont fortement suspectés de participer à l'incidence d'autres cancers tels que les cancers colorectaux, du larynx, de l'estomac, de l'œsophage, du rein, de la prostate, du pancréas, du sein et du foie (EFSA, 2008; IARC, 2010). Toutefois, des études complémentaires sont nécessaires pour confirmer l'implication des HAP dans la survenue de ces cancers chez l'Homme.

5.3.3. Cancérogenèse et B[a]P

La cancérogenèse est un processus décrit en 3 étapes : la phase d'initiation, la promotion et la progression (**Figure 12**). Le B[a]P, ayant des effets reconnus sur les différentes étapes de ce processus, est un cancérogène complet (Hardonnière et al., 2017).

[7] Partie proximale de l'estomac, site de digestion bactérienne

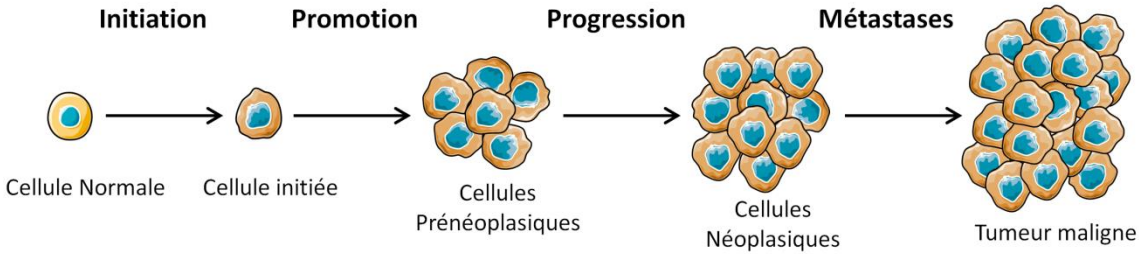


Figure 12 *: Étapes de la cancérogenèse.*
(Adapté de Siddiqui et al., 2015).

La phase d'initiation correspond à l'altération ou à la modification d'une seule cellule induite notamment par un agent génotoxique tel que le B[a]P, et provoque des changements génétiques. Suite au métabolisme du B[a]P, des métabolites hautement réactifs tels que le BPDE sont générés. Ce métabolite électrophile est connu pour réagir avec l'ADN et former des adduits à l'ADN volumineux, principalement le BPDE-N^2-désoxyguanoside. Les espèces réactives issues du métabolisme du B[a]P peuvent entraîner des dommages à l'ADN avec pour conséquences des anomalies chromosomiques, dans le cas où celles-ci ne sont pas pris en charge par les systèmes de réparation de l'ADN ou peuvent bloquer la réplication de l'ADN entraînant la mort cellulaire (Gu et al., 2008; Zhu et al., 2008). Ces changements conduisent à des mutations de gènes pouvant entraîner une dérégulation des voies de signalisation associées à la prolifération cellulaire et l'apoptose.

L'étape de la promotion est considérée comme un processus relativement long où les cellules prénéoplasiques, résistantes à l'apoptose, s'accumulent. Lors de cette étape, des signaux de survie peuvent intervenir. Cependant, l'apoptose peut également participer à la cancérogenèse et favoriser la promotion des cellules. En effet, l'induction de l'apoptose peut aboutir à une prolifération compensatoire des cellules voisines (Ichim and Tait, 2016).

L'étape finale est la progression, où des changements génétiques et phénotypiques supplémentaires peuvent se produire dans les cellules néoplasiques. Ces changements impliquent une augmentation rapide de la taille de la tumeur et permettent aux cellules d'acquérir un potentiel invasif et métastatique. Ces phénomènes sont favorisés par l'angiogenèse tumorale. Les cellules acquièrent la capacité de migrer au travers de la paroi des vaisseaux sanguins ou lymphatiques et atteignent la circulation sanguine conduisant à leur dissémination dans l'organisme. Il est intéressant de constater que le B[a]P a été associé à la

migration, l'invasion des cellules *in vitro* et *in vivo,* et l'angiogenèse tumorale mais également à la Transition Epithéliale Mésenchymateuse (EMT) (Ba et al., 2015; Wang et al., 2018). L'EMT est un processus au cours duquel les cellules acquièrent un potentiel malin, par l'activation des voies de signalisation impliquées dans la migration et l'invasion cellulaires (Huber et al., 2005). L'exposition au B[a]P de cellules de carcinome hépatocellulaire s'accompagne de l'apparition des marqueurs de cette transition : induction de l'expression de Zinc finger protein SNAI1 (SNAIL), de Zinc finger protein SNAI2 (Slug), de la vimentine et de la N-cadhérine et de l'inhibition de l'expression de la d'E-cadhérine.

5.4. Reprotoxicité et tératogénicité

Le B[a]P peut entraîner des atteintes des organes de la reproduction chez les animaux aboutissant à sa classification 1B : reprotoxique selon le règlement européen CLP. Chez l'animal, il a été observé une diminution du poids des testicules, de l'épididyme, des vésicules séminales et de la prostate (Reddy and Reddy, 2016). Il a également été signalé une diminution de la production de spermatozoïdes et des taux sériques de testostérone ainsi qu'une diminution de la fertilité transgénérationnelle chez les souris mâles et femelles (Jurisicova et al., 2007; Mohamed et al., 2010).

Chez les hommes, le B[a]P diminue le nombre de spermatozoïdes, altère leur morphologie, leur motilité, l'intégrité de la chromatine (adduit à l'ADN) et induit un stress oxydatif contribuant à l'infertilité masculine (Ji et al., 2013a; Jeng et al., 2015; Conti et al., 2017; Alamo et al., 2019). Il existe peu d'étude sur l'effet des HAP et la fertilité chez la femme (Bolden et al., 2017). Cependant, des travaux épidémiologiques indiquent que l'exposition à la fumée de cigarette, contenant de nombreux HAP, réduit la fertilité et induit une ménopause plus précoce (Sharma et al., 2013; Oboni et al., 2016). D'autres investigations suggèrent que les HAP ont la capacité d'affecter les systèmes endocriniens et peuvent augmenter la prévalence de maladies de la reproduction telles que le Syndrome des Ovaires Polykystiques[8] (SOPK) et la dysplasie cervicale[9] (Scheurer et al., 2014; Yang et al., 2015; Zhang et al., 2016).

[8]Syndrome des Ovaires Polykystiques (SOPK) : Déséquilibre hormonal pouvant entraîner des troubles de la fertilité, de la pilosité (hirsutine) ainsi que des complications métaboliques (diabètes).
[9] Dysplasie cervicale : modification anormale des cellules présentes au niveau du col de l'utérus.

L'exposition *in utero* aux HAP peut entraîner des malformations fœtales et l'apparition de pathologies chez l'enfant. En effet, le B[a]P est connu pour traverser le placenta quel que soit le mode d'exposition et ainsi atteindre le fœtus (Karttunen et al., 2010). Une exposition *in utero* aux HAP induit une diminution de la taille et du poids de naissance (Duarte-Salles et al., 2010, 2012). L'exposition professionnelle de la mère aux HAP a été associée à l'apparition de gastroschisis[10] et à un risque accru de fente labiale[11] avec ou sans fente palatine[12] chez l'enfant (Lupo et al., 2012; Langlois et al., 2013). De plus, ils sont suspectés d'induire une craniosynostose[13] et auraient des effets néfastes sur le développement cognitif des enfants dès l'âge de 5 ans, dont une diminution de 3,8 points de quotient intellectuel (QI) (Edwards et al., 2010; Perera et al., 2011; O'Brien et al., 2016).

6. Biosurveillance des HAP

La biosurveillance humaine des expositions aux polluants de l'environnement suscite un grand intérêt en santé publique environnementale (Salines, 2012). Cette surveillance permet d'évaluer les risques sanitaires encourus et fournit des bases scientifiques nécessaires à la prévention et à la réduction de l'exposition. Elle repose sur la mesure d'indicateurs appelés biomarqueurs. Chez l'Homme, ces mesures s'effectuent principalement dans les fluides biologiques (urine, sang, lait maternel, air expiré), du fait de leur caractère peu ou non-invasif, mais également dans les cheveux et les ongles.

L'OMS définit les biomarqueurs comme ''toute substance, structure ou processus pouvant être mesuré dans le corps humain ou les matrices biologiques, susceptibles d'influencer ou de prédire l'incidence ou l'apparition d'une maladie'' (WHO, 2001). Elle a proposé de classer les

[10] Gastroschisis ou laparoschisis : Défaut congénital de développement de la paroi abdominale entraînant chez le fœtus une déhiscence plus ou moins étendue en hauteur, entre les muscles droits de l'abdomen, avec éviscération : extériorisation des viscères abdominaux (intestin grêle et foie).

[11] Fente labiale : Malformation congénitale qui atteint le plus souvent la lèvre supérieure latéralement et peut s'accompagner de fente maxillopalatine.

[12] Fente palatine : Malformation de la face résultant d'un défaut de soudure des bourgeons maxillaires supérieurs avec le processus intermaxillaire du bourgeon ethmoïdofrontal au niveau de la gencive et de la lèvre et d'un défaut de réunion des processus palatins des deux bourgeons maxillaires supérieurs qui forment le palais osseux.

[13] Craniosynostose : Ossification et soudure prématurées des synfibroses du crâne chez le nouveau-né et le nourrisson entraînant des déformations du crâne, d'aspect variées selon les sutures intéressées et leur précocité, et des complications cérébrales et sensorielles par compression cérébrale.

biomarqueurs en trois catégories : biomarqueur d'exposition, biomarqueur d'effet et biomarqueur de sensibilité ou de susceptibilité.

- Un biomarqueur d'exposition est une substance exogène, un métabolite primaire ou la réponse à une interaction entre un xénobiotique et une molécule ou cellule-cible, mesurée dans un compartiment de l'organisme.

- Un biomarqueur d'effet est une altération biochimique, physiologique, comportementale ou autre, mesurable dans un organisme, qui, selon son ampleur, peut être reconnue comme étant associée à une atteinte confirmée ou possible de l'état de santé ou à une maladie

- Un biomarqueur de sensibilité ou de susceptibilité est un indicateur de la capacité innée ou acquise d'un organisme à répondre à l'exposition à un xénobiotique spécifique.

Ces différents biomarqueurs sont utilisés comme indicateurs d'événements susceptibles d'affecter la santé d'un individu. Ils représentent les étapes successives allant d'une exposition à une dose interne, d'une dose interne à une dose biologique efficace (biomarqueurs d'exposition), d'un effet biologique précoce à l'altération d'une fonction biologique pouvant entraîner une pathologie (biomarqueurs d'effets). De plus, certains biomarqueurs permettent d'évaluer la sensibilité de l'individu aux effets d'une exposition (biomarqueurs de sensibilité/susceptibilité) (**Figure 13**).

La recherche et la découverte de biomarqueurs d'exposition et/ou d'effets d'un risque de développer des pathologies, sont des enjeux clés vers le développement d'une médecine préventive et personnalisée. Le développement de ces biomarqueurs est dépendant de l'acquisition de connaissance (génomique, protéomique….), du développement de nouvelles technologies (sensible, spécifique, rapide et économique) nécessaire à leurs identifications et leurs quantifications. Dans cette partie, nous nous focaliserons sur les biomarqueurs des HAP retrouvés chez l'Homme.

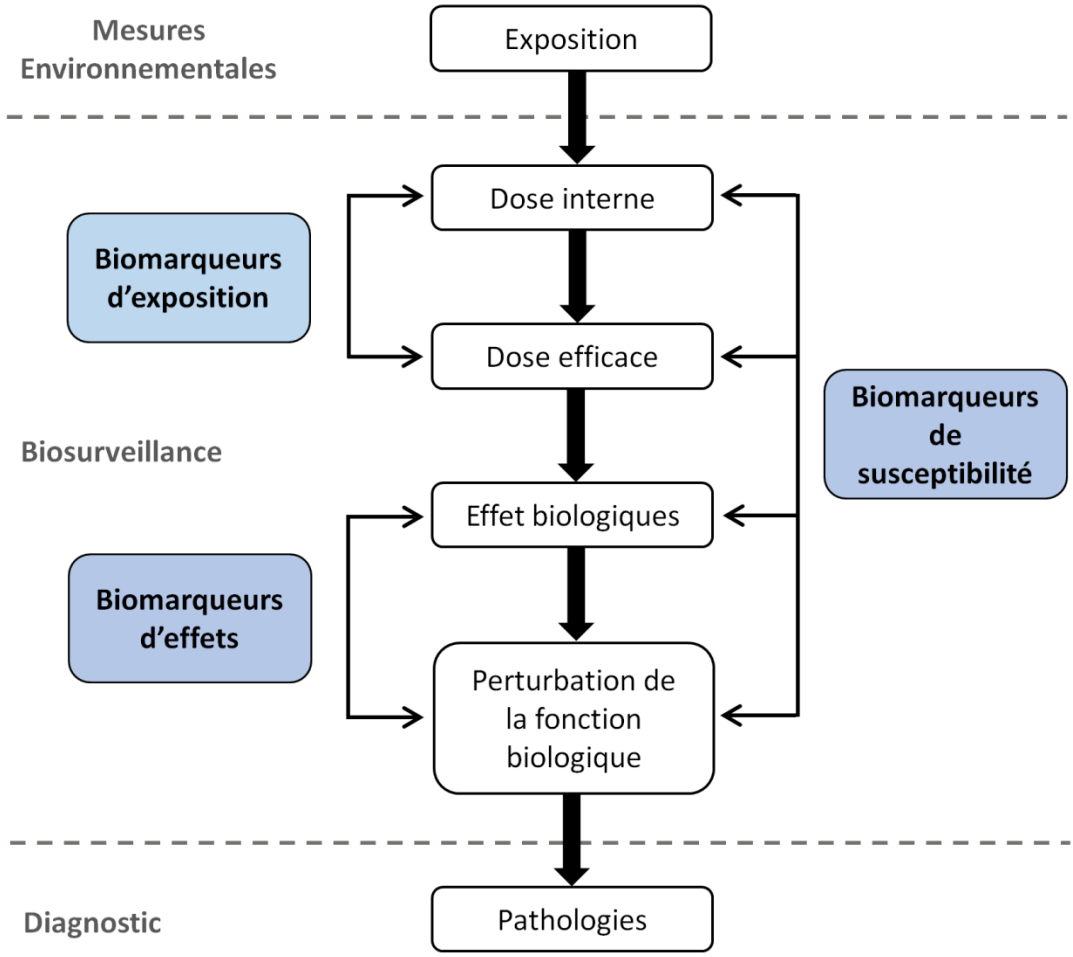


***Figure 13** : Biosurveillance de l'exposition à la pathologie avec les trois types de biomarqueurs. (Adapté d'Angerer et al., 2007; Vicens, 2015).*

6.1. Biomarqueurs d'exposition

Les biomarqueurs d'exposition peuvent être divisés en deux catégories : les biomarqueurs de dose interne et les biomarqueurs de dose efficace (**Figure 13**).

Les biomarqueurs de dose interne indiquent l'exposition d'un composé particulier en mesurant ce composé ou ses métabolites dans l'organisme (Timbrell, 1998). Dans le cadre de la surveillance biologique de l'exposition aux HAP, la dose interne est majoritairement évaluée par le dosage de métabolites urinaires issus de la métabolisation du pyrène, du B[a]P, du naphtalène, du phénanthrène et du fluorène (**Tableau 8**).

En ce qui concerne les biomarqueurs de dose efficace, ils indiquent l'interaction des HAP ou de leurs métabolites avec une cible biologique, tels que l'ADN ou les protéines, ou leur

effet nocif sur une molécule biologique (Timbrell, 1998). Cependant, ils sont également considérés comme des biomarqueurs d'effets, s'ils sont capables d'induire des mutations conduisant à des pathologies telles que le cancer (Miraglia et al., 2004).

***Tableau 8** : Métabolites urinaires utilisés comme biomarqueurs d'expositions aux HAP.*

HAP	Métabolites urinaires	
Pyrène	**1-hydroxypyrène**	**1-OH-PYR**
	1,6-dione-pyrène	P16D
	1,8-dione-pyrène	P18D
Benzo[a]pyrène	**3-hydroxybenzo[a]pyrène**	**3-OH-B[a]P**
	B[a]P-Tétraol	7,8,9,10-OH-B[a]P
Naphtalène	**1-naphtol**	**1-OH-NAP**
	2-naphtol	**2-OH-NAP**
	1,2-dihydroxynaphtalène	1,2-DHN
Phénanthrène	**1-hydroxyphénanthrène**	1-OH-PHE
	2-hydroxyphénanthrène	2-OH-PHE
	3-hydroxyphénanthrène	3-OH-PHE
	4- hydroxyphénanthrène	4-OH-PHE
	9- hydroxyphénanthrène	9-OH-PHE
	1,2-diol-Phénanthrène	1,2-PHED
Fluorène	**1-hydroxyfluorène**	1-OH-FLU
	2-hydroxyfluorène	2-OH-FLU
	3-hydroxyfluorène	3-OH-FLU
	9- hydroxyfluorène	9-OH-FLU

6.1.1. Biomarqueurs de dose interne

6.1.1.1. Biomarqueurs du pyrène

Le pyrène est présent dans la plupart des mélanges de HAP et représente 2 à 10% des HAP totaux (Kim et al., 2013). Le 1-hydroxypyrène (1-OH-PYR) est le principal métabolite urinaire du pyrène (90%). Il possède une demi-vie moyenne d'environ 18 à 20 heures après inhalation du pyrène. C'est le biomarqueur le plus utilisé dans la surveillance des expositions

professionnelles (SBEP) aux HAP. Il est présent en grande quantité dans les urines (de l'ordre du $\mu g.L^{-1}$), ce qui rend sa quantification plus aisée (Castano-Vinyals, 2004; Nikolova-Pavageau and Pillière, 2018). Ce métabolite urinaire est couramment recherché chez les travailleurs exposés aux HAP, chez les fumeurs et dans la population générale exposée à la pollution atmosphérique. Le tabagisme, l'alimentation et le style de vie, influencent la concentration de 1-OH-PYR urinaire. Les fumeurs ont environ deux fois plus de 1-OH-PYR dans les urines que les non-fumeurs (Kim et al., 2013). Il est dosé par chromatographie liquide à haute performance avec détection par fluorescence (HPLC-FLD) et/ou chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (GC-MS). Il reflète l'exposition au pyrène mais également l'exposition aux mélanges de HAP. Cependant, le 1-OH-PYR ne reflète pas l'exposition aux HAP cancérogènes tels que le B[a]P. De plus, le rapport B[a]P/pyrène varie selon la source d'émission (Gendre et al., 2002; Lafontaine et al., 2004). Certaines études ont proposé d'utiliser d'autres métabolites du pyrène comme biomarqueurs chez les professionnels et dans la population en général. En effet, la présence d'autres métabolites urinaires du pyrène chez les animaux a amené à étudier leur potentielle utilisation comme biomarqueur. C'est le cas du 1,6-dione-pyrène (P16D) et du 1,8-dione-pyrène (P18D) (Ruzgyte et al., 2005; Seidel et al., 2008). Ces deux quinones sont formées à partir du 1,6-dihydroxypyrène (1,6-DiOH-PYR) et du 1,8-dihydroxypyrène (1,8-DiOH-PYR) respectivement (Lotz et al., 2016). Ces derniers sont issus d'une oxydation du 1-OH-PYR (**Figure 14**). Ainsi, ils sont suscetibles de fournir des informations supplémentaires sur les voies métaboliques et sur l'exposition interne au PYR. Toutefois, des études supplémentaires sont nécessaires pour confirmer l'utilisation en routine du P16D et du P18D comme biomarqueurs d'exposition.

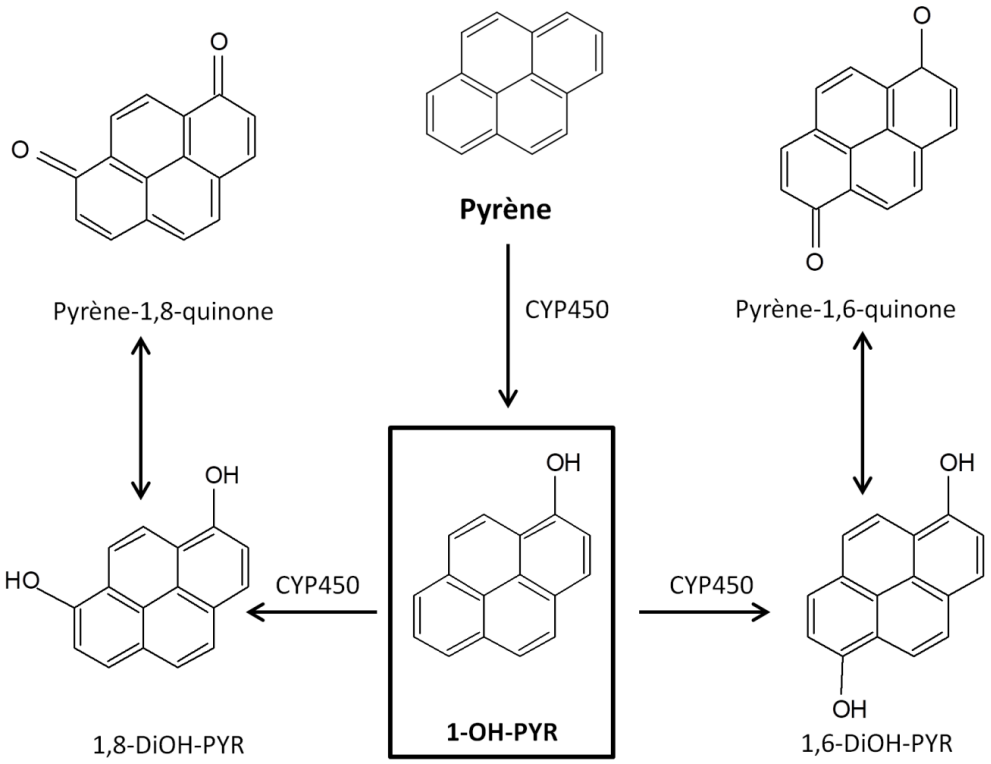


***Figure 14** : Métabolisme du pyrène en 1-hydroxypyrène (1-OH-PYR) et son oxydation ultérieure en pyrène-1,6- et 1,8-quinone par l'intermédiaire du 1,6- et 1,8-dihydroxypyrènes (DiOH-PYR). (Adapté de Lotz et al., 2016).*

6.1.1.2. Biomarqueurs du B[a]P

Dans les années 2000, le dosage du 3-OH-B[a]P, le principal métabolite monohydroxylé du B[a]P a été développé. Le 3-OH-B[a]P présente l'avantage d'être plus représentatif des HAP cancérogènes et permet l'évaluation de l'exposition aux substances cancérogènes chez les travailleurs (Lafontaine et al., 2004; Barbeau et al., 2014). Cependant, ce métabolite est présent en faible quantité dans les urines, de l'ordre du $ng.L^{-1}$, contrairement au 1-OH-PYR, nécessitant des techniques analytiques plus sensibles. La faible teneur de ce métabolite dans les urines est notamment due au métabolisme du B[a]P (*cf. Chapitre A. 3.3.3*) qui produit de nombreux composés (phénols, diols, quinones) mais également de la faible présence du B[a]P en suspension dans l'air et de son élimination hépatobiliaire par l'organisme (Barbeau et al., 2014). Chez le rat, le 3-OH-B[a]P urinaire ne représente que 0,21% de la dose administrée de B[a]P par voie intraveineuse (Marie et al., 2010). L'analyse de ce métabolite s'effectue notamment par chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse à triple quadripôles (LC/MS/MS). Ce biomarqueur présent en faible quantité dans les urines est moins

pertinent pour estimer les faibles expositions, notamment lors d'expositions environnementales où les concentrations urinaires n'ont pas été systématiquement détectées (Leroyer et al., 2010). De plus, le 3-OH-B[a]P représente la voie de détoxification du métabolisme du B[a]P. Ainsi, le dosage des B[a]P-tétraols, dont le (±)trans-anti-7,8,9,10-tétrahydroxy-7,8,9,10-tétrahydrobenzo[a]pyrène (7,8,9,10-OH-B[a]P) issu de l'hydrolyse du BPDE considéré comme le cancérogène ultime du B[a]P, a récemment été proposé pour être utilisé comme biomarqueur (Simpson et al., 2000; Hecht and Hochalter, 2014; Barbeau et al., 2018). Le 7,8,9,10-OH-B[a]P semble être un biomarqueur d'exposition pertinent et serait lié à la proportion de B[a]P impliqué dans la voie du BPDE cancérogène.

6.1.1.3. Biomarqueurs du naphtalène

Le naphtalène est majoritairement retrouvé en phase gazeuse dans l'environnement et fait partie des constituants majeurs des mélanges d'HAP dans l'air. Il est également très bien absorbé par voie cutanée. Ainsi, le dosage des 1- et 2-naphtols (1- et 2-OH-NAP) urinaires, métabolites du naphtalène est l'un des biomarqueurs les plus utilisés. Il permet d'évaluer l'exposition par voie respiratoire et cutanée chez les professionnels, mais également dans la population générale pour des expositions liées à la circulation automobile, domestiques et chez les nourrissons exposés à la naphtaline (Serdar et al., 2004; Orjuela et al., 2012). Les concentrations de 1- et 2-OH-NAP urinaires sont corrélées à l'exposition au naphtalène mesuré dans l'air indépendamment de l'apport en HAP par l'alimentation (Li et al., 2010). Toutefois, le tabagisme est un facteur à prendre en compte. Chez les fumeurs, les concentrations en OH-NAP peuvent être considérablement augmentées. De plus, le niveau de 2-OH-NAP peut être affecté par le polymorphisme génétique notamment du CYP2E1 (Nan, 2001). Dans le but d'améliorer l'évaluation du risque induit par l'exposition au naphtalène chez l'Homme, il a été proposé d'utiliser le 1,2-dihydroxynaphtalène (1,2-DHN) urinaire comme biomarqueur (Klotz et al., 2011). Ce dernier étant le précurseur de la 1,2-naphtoquinone connue pour induire des dommages à l'ADN (Kapuci et al., 2014). Malgré une méthode de dosage qui reste à être améliorée (stabilité des étalons), le 1,2-DHN s'est révélé être un biomarqueur plus sensible que le 1- et 2-OH-NAP pour une exposition interne au naphtalène.

6.1.1.4. Biomarqueurs du phénanthrène

L'exposition au phénanthrène est principalement évaluée par le dosage urinaire de ses métabolites monohydroxylés : le 1-, 2-, 3-, 4- et 9-hydroxyphénanthrènes (1-, 2-, 3-, 4- et 9-OH-PHE). Les teneurs en OH-PHE semblent être influencées par le tabagisme, l'alimentation et soumis à de larges variations individuelles. Cependant, ces teneurs semblent être corrélées à l'exposition du phénanthrène atmosphérique et aux HAP totaux (Forster et al., 2008). Les phénanthrènes-diols (PHED), des métabolites dihydroxylés, dont le 1,2-diol-PHE (1,2-PHED), sont également à l'étude pour être utilisés comme biomarqueurs. Le 1,2-diol-PHE urinaire semble être un biomarqueur de l'exposition atmosphérique au phénanthrène et serait donc potentiellement intéressant pour évaluer les expositions professionnelles (Seidel et al., 2008).

6.1.1.5. Biomarqueurs du fluorène

Le fluorène, comme le phénanthrène, est un HAP gazeux qui est retrouvé dans les mélanges atmosphériques. Ainsi, ses métabolites sont considérés comme de bons biomarqueurs de l'exposition professionnelle aux HAP gazeux (Rossbach et al., 2007; Li et al., 2010; Barbeau et al., 2014; Iamiceli et al., 2019). Les métabolites du fluorène utilisés sont les 1-, 2-, 3- et 9-hydroxyfluorènes (1-, 2-, 3-, et 9-OH-FLU). Ces métabolites semblent être corrélés à l'exposition au fluorène et aux HAP totaux cependant ils sont influencés par le tabagisme.

6.1.2. Biomarqueurs de dose efficace

6.1.2.1. Adduits d'ADN

La biotransformation des HAP génère de nombreux métabolites électrophiles hautement réactifs. Ces métabolites sont capables d'interagir avec l'ADN et forment des adduits à l'ADN pouvant conduire à des mutations à l'origine de la cancérogenèse (*cf Chapitre A. 5.3*.). De nombreuses études épidémiologiques ont associé l'exposition aux HAP et l'augmentation des adduits à l'ADN (Perera, 2000; Perera et al., 2005; Taioli et al., 2007). Dans une population exposée à la pollution atmosphérique à Ostrava (République tchèque), il a été observé que l'exposition au B[a]P augmente considérablement les niveaux d'adduits à l'ADN dans les lymphocytes circulants (Rossner et al., 2013). Cependant, les niveaux d'adduits à

l'ADN peuvent être dépendants d'autres facteurs tels que l'âge, le tabagisme, l'alimentation et les polymorphismes génétiques (Shinozaki et al., 1999; Godschalk et al., 2003).

Parmi les métabolites du B[a]P à l'origine de la formation d'adduits à l'ADN, le BPDE réagit principalement avec l'ADN au niveau de son carbone 10 avec le groupement amine N2 de la désoxyguanoside (dG-N^2-BPDE) et/ou avec le groupement N6 de la désoxyadénosine (dA-N^6-BPDE) (Ewa and Danuta, 2017). Des adduits mineurs peuvent également se former avec le groupement amine d'une désoxycytidine et le groupement N7 de la désoxyguanoside (Xue and Warshawsky, 2005). Le radical cation, quant à lui, se lie à N7 ou au C8 des purines pour former des adduits instables et générer des sites apuriniques dans l'ADN par dépurination spontanée.

La détection et la mesure de ces adduits à l'ADN sont utilisées comme biomarqueurs d'exposition et/ou d'effet des HAP cancérogènes. Les adduits à l'ADN sont évalués et quantifiés dans de nombreux tissus humains. Cependant, la plupart des études privilégient les globules blancs du fait de leur accessibilité et les tissus pulmonaires, une voie d'entrée importante des HAP (Povey, 2000).

Trois approches méthodologiques sont principalement utilisées pour évaluer les adduits à l'ADN causés par les HAP : la spectrométrie de masse (MS et AMS (spectrométrie de masse par accélérateur)), les méthodes immunologiques (ELISA et immunohistochimie) et le marquage au P^{32} (**Tableau 9**). Elles se distinguent par leur sensibilité, leurs spécificités et le coût de l'instrumentation. Le marquage au P^{32} permet de déterminer le profil d'adduit à l'ADN mais ne permet pas de déterminer la structure des adduits et possède une faible spécificité. L'ELISA et l'immunohistochimie sont des méthodes qui utilisent des anticorps pour identifier des adduits d'ADN dans des échantillons d'ADN ou dans des tissus. La détection des différents adduits est limitée par la disponibilité des anticorps spécifiques et ne permettent pas de découvrir de nouveaux adduits. En outre, les anticorps utilisés ne sont pas forcément spécifiques d'un seul type d'adduit. La spectrométrie de masse est la méthode la plus spécifique et permet d'identifier la structure de l'adduit. Cependant, cette technique nécessite une instrumentation complexe et coûteuse. D'autres méthodes d'analyses sont également utilisées pour la détection d'adduits à l'ADN, telles que l'HPLC-FLD, la GC-MS et la chromatographie couplée à la spectrométrie de fluorescence synchrone (HPLC-SFS).

***Tableau 9** : Méthodes de détection des adduits à l'ADN dérivés des HAP. Adapté de Poirier, 2004, 2016; Himmelstein et al., 2009).*

Méthodes	Sensibilité (adduits/ nucléotides)	Quantité d'ADN requise (µg)	Spécificité	Avantages	Limites
Marquage P^{32}	1 /10^9	1 - 5	Faible	Faible quantité d'ADN; sensible et polyvalent; instruments peu coûteux	Radioactivité élevée; spécificité; Absence d'informations structurelles
ELISA	3 /10^9	3 - 25	Modérée	Anticorps dirigés contre un adduit à l'ADN spécifique; quantification par courbe standard; très sensible; haut débit ; économique	Nécessite des anticorps; Risque de réactivité croisée
Immuno-histochimie	1/10^8	Cellules fixées	Modérée	Permet la localisation de l'adduit; robuste et facile; haut débit	Faible identification ; semi-quantitatives ; informations structurelles limitées
Spectrométrie de masse (MS)	0,3 /10^8	5 - 100	Absolue	Identification structurelle; quantification possible	Nécessite des standards; coût de l'appareillage
Spectrométrie de masse par Accélérateur (AMS)	6 /10^{12}	100	Haute	Sensibilité élevée; identification radioactive	Nécessite $^{14}C/^{3}H$; absence d'information structurelles; rareté et coût de l'appareillage

6.1.2.2. 8-oxiGua et 8-oxodG

Outre la formation de métabolites réactifs, l'exposition aux HAP entraine la formation d'ERO (ex : radical hydroxyle). Ces ERO sont capables d'altérer l'ADN par l'oxydation des bases et ainsi générer des mutations lorsque celles-ci ne sont pas prises en charge par les mécanismes de réparation de l'ADN. Le produit de dommage oxydatif le plus couramment retrouvé est l'oxydation de la guanine qui génère la 8-oxo-7,8-dihydroguanine (8-oxoGua) et son désoxynucléoside, la 8-oxo-7,8-dihydro-2'-déoxyguanosine (8-oxodG). Cette lésion provient de l'oxydation directe de la guanine dans l'ADN double brin au niveau du carbone 8 ou indirectement par l'oxydation de la désoxyguanosine triphosphate (dGTP), issue du pool de nucléotides de la cellule, en 8-oxo-2'-deoxy-guanosine-5'-triphosphate (8-oxo-dGTP) (**Figure 15**). La 8-oxo-dGTP peut être incorporée dans l'ADN par une ou plusieurs polymérases lors de la réplication ou de la réparation de l'ADN. Ainsi, la 8-oxoGua et la 8-oxo-dGTP peuvent entraîner des mutations de transversion (GC→TA) lors de la réplication de l'ADN, si elles ne sont pas prises en charge par l'oxoguanine DNA glycosylase 1 (OGG1). De plus, des systèmes de réparation tels que NER (Nucleotide Excision Repair) et MMR (Mismatch Repair), interviennent également dans la libération de la 8-oxoGua. OGG1 est une enzyme qui permet la libération de la 8-oxoGua de l'ADN par excision. La 8-oxoGua est alors éliminée de la cellule

et rejoint la circulation sanguine pour finir par être excrétée dans les urines. Lorsque l'8-oxo-GTP n'est pas incorporée à l'ADN, elle est hydrolysée en 8-oxo-7,8-dihydro-2'-deoxyguanosine5'-triphosphate (8-oxodGMP) par l'enzyme MTH1 (MutT Homologue 1). Sent suit une hydrolyse de la 8-oxodGMP par une activité nucléotidase en 8-oxo-dG permettant son élimnation dans les urines (Evans et al., 2010).

Ainsi, le dosage des bases oxydées telles que la 8-oxodG et la 8-oxoGua, est utilisé comme biomarqueur afin d'évaluer les dommages causés par le stress oxydant. L'exposition de la pollution atmosphérique et de la fumée de tabac a été associée à l'excrétion urinaire de la 8-oxoGua (Loft et al., 2012). Chez les personnes travaillant dans les fours à coke, le taux de 8-oxo-dG urinaire a été corrélé de façon dose-dépendante à l'exposition professionnelle aux HAP (Kuang et al., 2013).

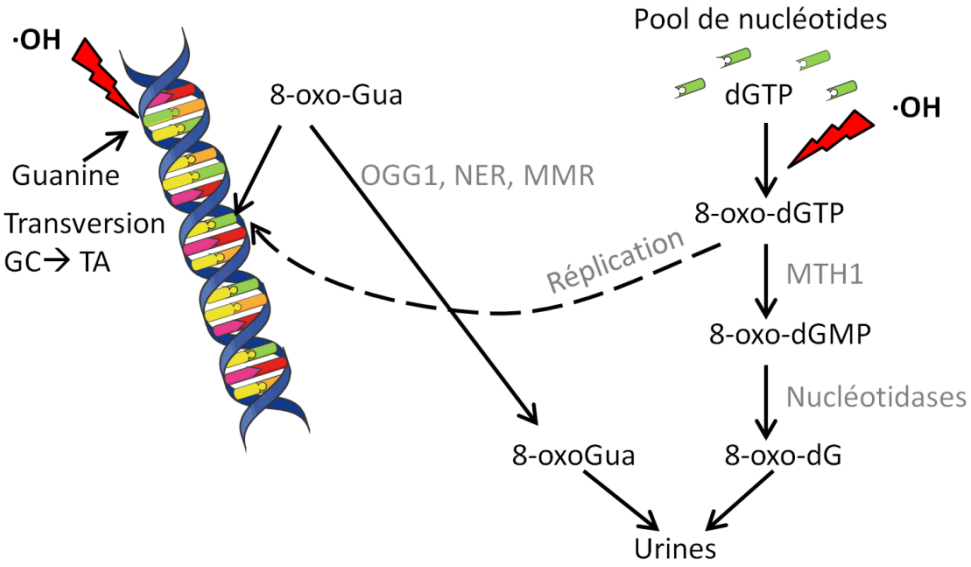


***Figure 15** : Formation de 8-oxoGua et de la 8-oxo-dG urinaires.*
dGTP : désoxyguanosine triphosphate ; MMR : mismatch repair ; MTH1 : MutT Homologue 1 ; NER : nucleotide excision repair ; OGG1 : oxoguanine DNA glycosylase 1 ; ·OH : radical hydroxyle ; 8-oxodG : 8-oxo-7,8-dihydro-2'-déoxyguanosine ; 8-oxodGMP : 8-oxo-7,8-dihydro-2'-deoxyguanosine5'-triphosphate ; 8-oxo-dGTP : 8-oxo-2'-deoxy-guanosine-5'-triphosphate ; 8-oxoGua : 8-oxo-7,8-dihydroguanine. (Adapté de Loft et al., 2012; Kasai, 2016).

Les dosages de la 8-oxoGua et de la 8-oxodG sont effectués dans les urines et dans l'ADN des leucocytes. La détection et l'analyse des produits oxydés par la guanine sont réalisées par des approches chromatographiques (HPLC-détection électrochimique, GC-MS et LC/MS/MS), des méthodes immunologiques (ELISA et immunohistochimie), par le marquage

au P^{32} ou par l'élimination de 8-oxodG à l'aide de la Formamidopyrimidine DNA N-glycosylase[14] (FPG) (Poblete-Naredo and Albores, 2016).

6.1.2.3. Adduits aux protéines

Les métabolites des HAP sont également capables de former des adduits aux protéines. Le BPDE forme une liaison au niveau de son carbone 10 avec l'hémoglobine, au niveau de l'aspartate[47] et avec l'albumine sérique au niveau de l'aspartate[147] et du glutamate[188] (Boysen and Hecht, 2003). Les adduits protéiques ont l'avantage d'être relativement plus stables que les adduits à l'ADN et ne sont pas éliminés par des processus de réparation, les rendant intéressants comme biomarqueurs de dose efficace. Les méthodes d'analyses généralement utilisées pour étudier les adduits protéiques sont la technique ELISA et les techniques chromatographiques (HPLC-FP et GC-MS). Par ailleurs, les adduits protéiques du type B[a]P sont bien corrélés avec le tabagisme, mais les niveaux d'adduits n'ont montré qu'une faible association avec l'exposition environnementale aux HAP (Omland et al., 1994; Scherer et al., 2000).

6.2. Biomarqueurs d'effets

Les marqueurs d'effets associés à l'exposition aux HAP comprennent les aberrations chromosomiques, les micronoyaux et les échanges de chromatides sœurs. Il a été rapporté dans les cancers de la vessie, que le BPDE induisait des aberrations dans la région chromosomique 9p21 des lymphocytes humains circulants. Ainsi, le 9p21 pourrait être envisagé comme biomarqueur des cancers de la vessie induits par les HAP (Gu et al., 2008). Il a également été démontré que le BPDE était impliqué dans les délétions du chromosome 3p et pourrait servir de marqueur de susceptibilité dans les carcinomes rénaux (Zhu et al., 2008). Chez les travailleurs du goudron de houille exposé aux HAP, un nombre accru de micronoyaux a été retrouvé dans les cellules épithéliales buccales (Giri et al., 2012). Chez les travailleurs de l'asphalte (bitume), une augmentation significative des chromatines sœurs et des micronoyaux ont été observés des lymphocytes circulants (Karaman and Pirim, 2009). Une méta-analyse a évalué les échanges de chromatines sœurs, les micronoyaux et les aberrations

[14]FPG (Formamidopyrimidine DNA N-glycosylase) : Enzyme de réparation de l'excision de base qui reconnaît et élimine les purines oxydées, y compris la 8-oxoGua et la 8-oxodG, formant des cassures simple brin de l'ADN.

chromosomiques dans les lymphocytes circulants de professionnels exposés aux HAP. Une augmentation de la fréquence de ces trois indicateurs a été retrouvée chez les professionnels exposés aux HAP, suggérant qu'ils pourraient être utilisés comme indicateurs d'effets génétiques précoces (Wang et al., 2012). Par ailleurs, des mutations des oncogènes (k-ras) et des gènes suppresseurs de tumeurs (p53) ont également été rapportées comme biomarqueurs d'exposition aux HAP (Diergaarde, 2003; Meng et al., 2009; Mordukhovich et al., 2010; Parsons et al., 2010).

6.3. Biomarqueurs de sensibilité ou de susceptibilité

Il est bien établi que les effets nocifs de l'exposition aux polluants de l'environnement sont déterminés par la sensibilité interindividuelle. Cette sensibilité dépend de plusieurs facteurs tels que l'âge, le sexe, l'origine ethnique mais également des prédispositions génétiques (Perera, 1997).

Les polymorphismes génétiques traduisent des variations naturelles d'un gène au sein d'une même espèce. Un gène est dit polymorphe lorsqu'il existe dans la population générale, sous plusieurs formes, chez au moins 1% des individus (Poblete-Naredo and Albores, 2016). Les polymorphismes génétiques sont connus pour affecter l'expression/activité des enzymes liées aux métabolismes, à la détoxification des HAP et aux gènes impliqués dans la réparation des lésions à l'ADN (Sánchez-Guerra et al., 2012). Ainsi, le polymorphisme génétique peut accroître la toxicité des HAP et le risque de développement de pathologies. Les biomarqueurs de susceptibilité les plus fréquemment utilisés sont les polymorphismes génétiques situés dans les gènes codant pour les enzymes du métabolisme des phases I et II telles que les CYP450 et les GST. Des polymorphismes du gène codant une enzyme de bioactivation du B[a]P, le CYP1A1 ont été associés aux dommages génétiques chez des professionnels travaillant dans le secteur du goudron de houille (Giri et al., 2012). D'autres polymorphismes des gènes codant pour l'enzyme CYP1B1 et une enzyme antioxydante, la catalase, ont été liés aux niveaux d'adduits à l'ADN dans des lymphocytes humains exposés au B[a]P (Schults et al., 2013). Il a été observé une augmentation des dommages à l'ADN et de la concentration en 1-OH-PYR urinaire chez des enfants vivant à proximité de zones industrielles pétrochimiques et présentant des polymorphismes du CYP1A1 et de la GSTM1, une enzyme de phase II. Concernant les polymorphismes des enzymes de phase II, autre que la GSTM1, il a été suggéré

qu'un variant de la GSTP1 augmente le risque de cancer de la prostate chez les hommes exposés à des taux élevés de HAP (Rybicki et al., 2006).

Plusieurs études ont également mis en évidence une association entre le polymorphisme d'autres enzymes telles que le CYP1A2, le CYP2E1, l'Epoxyde-Hydroxyde microsomal (mEH) et la GST, impliquées dans le métabolisme des HAP et l'incidence de plusieurs types de pathologies (cancers colorectaux, cancer du poumon et les maladies cardiaques congénitales) (Kiss et al., 2007; Girard et al., 2008; Moorthy et al., 2015; Tao et al., 2019).

Par ailleurs, le polymorphisme des gènes impliqués dans la réparation à l'ADN peut être utilisé comme biomarqueur. Le polymorphisme du gène XPD (Xeroderma Pigmentosum complementary group D), aussi appelé ERCC2 (Excision Repair Cross-Complementing rodent repair deficiency, complementation group 2), un gène impliqué dans la réparation de l'excision des nucléotides, a été associé à une augmentation de 20% du risque de cancer du sein (Terry et al., 2004). Ainsi, les individus présentant ce polymorphisme pourraient être confrontés à un risque accru de cancer du sein dû aux adduits à l'ADN provoqué par l'exposition aux HAP ou au tabagisme. Dans les spermatozoïdes humains, des polymorphismes du gène XRCC1 (X-Ray Repair Cross Compementing 1) codant pour la protéine de réparation de l'ADN XRCC1, ont été reliés à des niveaux élevés d'adduits à l'ADN dûs à l'exposition aux HAP (Ji et al., 2010). Ces différentes études démontrent que le polymorphisme des gènes impliqués dans la réparation de l'ADN pourrait être utilisé comme biomarqueur de susceptibilité due à l'exposition aux HAP.

Chapitre B. Les vésicules extracellulaires

1. Découverte des vésicules extracellulaires

En 1868, Charles Darwin, dans le cadre de la théorie de la Pangenèse, présentait déjà le concept des vésicules extracellulaires (VE). En effet, sa théorie reposait sur l'idée que chaque type de cellule dans le corps génère des petits germes ou gemmules (particules), permettant de communiquer et de transférer des informations héréditaires avec d'autres types de cellules. Il a également suggéré que la composition des gemmules pouvait être modifiée par l'environnement reflétant ainsi l'exposition de l'organisme (Liu and Chen, 2018).

Historiquement, les VE ont été décrites pour la première fois en 1946 par Chargaff et West, puis à la fin des années 60 par Wolf et Anderson *et al*. (Chargaff and West, 1946; Wolf, 1967; Anderson, 1969). Elles ont longtemps été considérées comme des débris cellulaires et compte tenu de leur forte production par les plaquettes, elles ont été surnommées "poussières de plaquette" ayant un rôle procoagulant. Ce n'est que 10 ans plus tard, que des VE produites par diverses lignées cellulaires ont été décrites avec une activité 5'-nucléotidase, suggérant ainsi l'idée d'une fonction physiologique (Trams et al., 1981). Trams et ces collaborateurs sont les premiers à avoir utilisé le terme "exosome" (EXO). Il faudra attendre 1996, pour que les VE soient décrites comme entité fonctionnelle. En effet, Raposo et ces collaborateurs ont montré que les EXO produits pas les lymphocytes B humains et murins contiennent des molécules du Complexe Majeur d'Histocompatibilité (CMH) de type II capable de lier des antigènes, d'effectuer une présentation antigénique et d'induire une réponse des lymphocytes T (Raposo et al., 1996). En 2007, l'intérêt de la recherche sur les VE est relancé par les travaux de Valdi et ces collaborateurs. Ils démontrent pour la première fois, la présence d'ARNm et de microARN fonctionnels dans les EXO issus de mastocytes humains et murins. Lorsque ces ARNm et ces microARN contenus dans les VE sont transférés à une cellule réceptrice, ils restent fonctionnels et modifient le comportement cellulaire (Valadi et al., 2007).

Ce n'est qu'en 2011 que le terme générique "vésicules extracellulaires" a été proposé pour définir toutes les structures extracellulaires délimitées par une bicouche lipidique (György et al., 2011). En 2012, la Société Internationale des Vésicules Extracellulaires (ISEV) dirigée par

Jan Lötvall a été fondée. Elle a notamment mis en place un journal scientifique dédié à la recherche des VE (JEV : Journal of Extracellular Vesicles) (Théry et al., 2019). Aujourd'hui cette société compte plus de 1500 membres. En France, la Société Française des Vésicules Extracellulaires (FSEV) créée en 2018 a pour objectif de stimuler la recherche et de diffuser les progrès dans le domaine des VE.

2. Les différentes populations de vésicules extracellulaires

Durant les dernières décennies, la découverte des VE d'origine cellulaire diverse et de biogenèse différentes a conduit les chercheurs à inventer de nombreux noms pour qualifier les vésicules sécrétées (exosomes, microvésicules, microparticules, ectosomes, oncosomes, corps apoptotiques…), créant ainsi une confusion au niveau de la nomenclature des VE (Gould and Raposo, 2013). Afin de clarifier la nomenclature des VE, l'ISEV a proposé d'utiliser le terme "vésicules extracellulaires" pour toutes les particules naturellement libérées de la cellule, délimitées par une bicouche lipidique ne pouvant pas se répliquer (ne contenant pas de noyau fonctionnel) (Théry et al., 2018).

Actuellement, la plupart des chercheurs divisent les VE en deux grandes catégories : les microvésicules (MV), des vésicules relativement "grosses" et les exosomes (EXO), des vésicules de plus petites tailles (Latifkar et al., 2019) (**Figure 16**). Les MV formées par bourgeonnement de la membrane plasmique ont une taille qui varie environ entre 100 nm à 5 µm de diamètre. Parmi les MV, on peut distinguer les corps apoptotiques ou les petites vésicules apoptotiques produites lors de l'apoptose. Ces dernières sont généralement de plus grandes tailles (>1 000 nm) que les MV produites sans atteintes de la cellule (≈100 à 1 000 nm). De plus, elles sont composées de matériel nucléaire, d'histones et de fragments d'organites cellulaires. Les EXO représentent une population de vésicules de petite taille, comprise entre 50 et 150 nm, relativement homogène. Ils sont formés dans les vésicules intraluminales (ILV) à l'intérieur des corps multivésiculaires (MVB). Les EXO sont libérés dans le milieu extracellulaire par fusion des MVB avec la membrane plasmique, où ils sont appelés EXO. Récemment, d'autres petites vésicules appelées "exomères" (≈30 à 50 nm) ont été découvertes. Ces structures lipidiques ne présentant pas de bicouche lipidique ne sont pas aujourd'hui considérées comme des VE (Zhang et al., 2018). Leur processus de biogenèse est

encore inconnu. Dans ce manuscrit, nous nous sommes principalement intéressés aux EXO et aux MV formés sans destruction cellulaire.

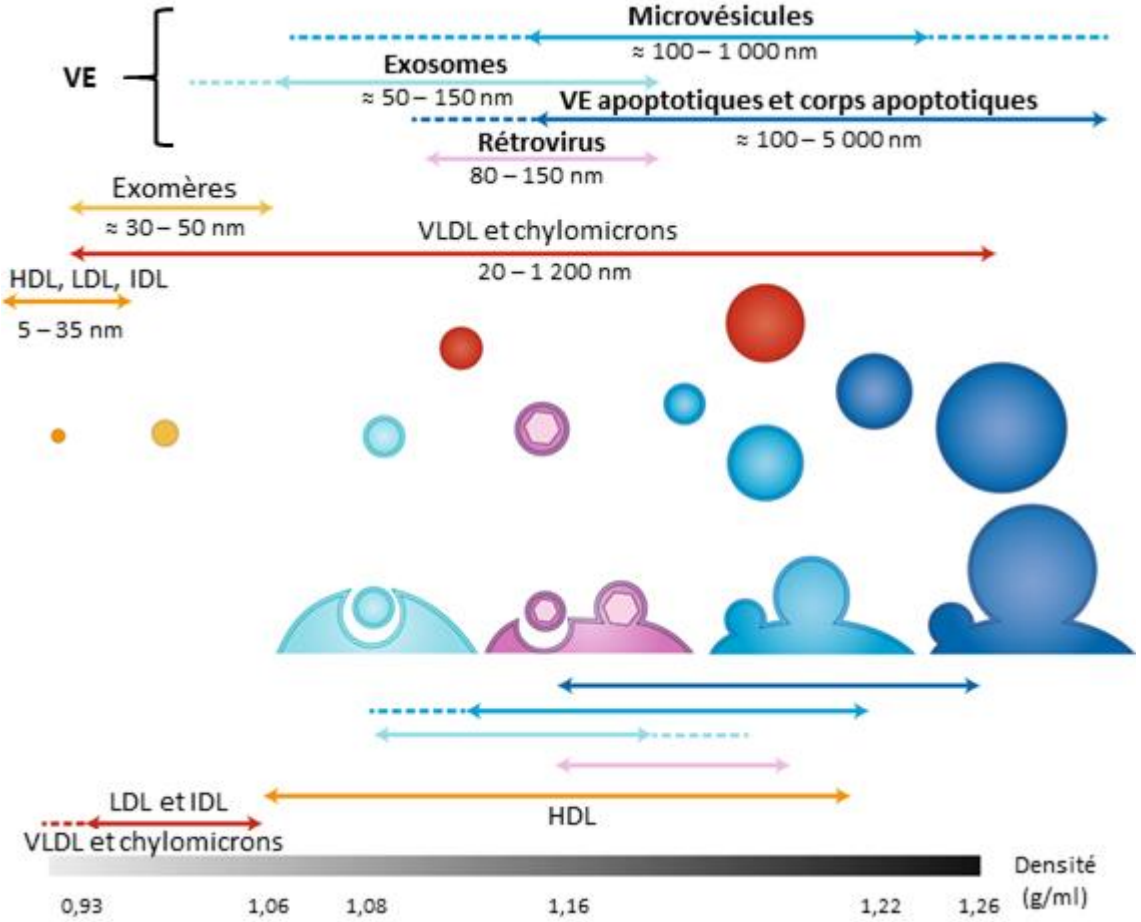


***Figure 16** : Les différents sous-types de VE et leurs caractéristiques physiques.*
IDL : Intermediate Density Lipoprotein; LDL : Low Density Lipoprotein ; VE : vésicules extracellulaires ; VLDL : Very Low Density Lipoprotein. (Adapté de Mathieu et al., 2019).

3. Biogenèse des vésicules extracellulaires

Les EXO et les MV ont différents modes de biogenèse. Les MV proviennent du bourgeonnement de la membrane plasmique tandis que les EXO sont formés dans le système endosomal sous forme d'ILV et libérés lors de la fusion des MVB avec la membrane plasmique (**Figure 17**). Toutefois, même si la formation des EXO et MV se produit à des endroits distincts de la cellule, les mécanismes intracellulaires peuvent être impliqués dans la formation des deux entités et dépendre du type cellulaire (van Niel et al., 2018). Il a été démontré que les

lymphocytes T peuvent former des VE au niveau de la membrane plasmique contenant les caractéristiques des EXO (Booth et al., 2006). Ainsi, les mécanismes intracellulaires impliqués à la fois dans la formation des EXO et des MV altèrent la possibilité de distinguer les différentes sous-populations de VE (Colombo et al., 2014).

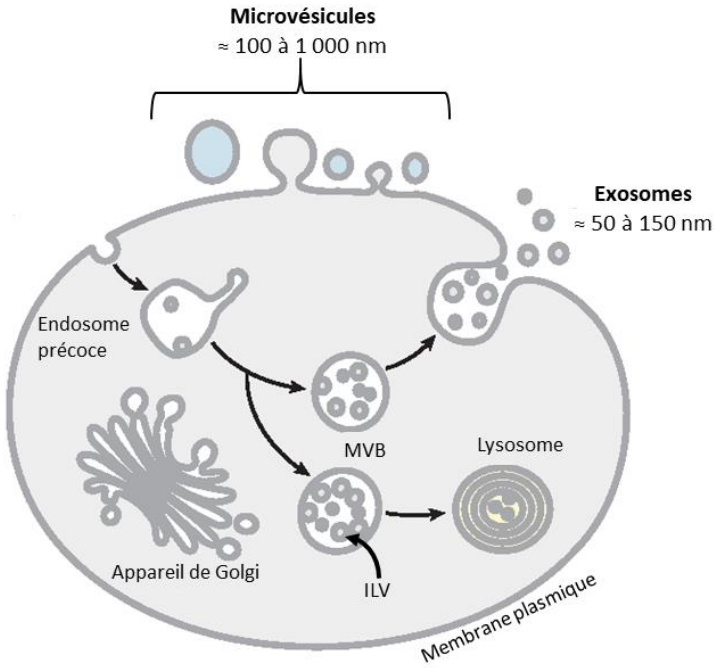


***Figure 17** : Représentation schématique de la formation des différents sous-types de VE. Les VE sont libérées soit par bourgeonnement direct de la membrane plasmique (microvésicules), soit par fusion des corps multivésiculaires (MVB), composés de vésicules intraluminales (ILV) avec la membrane plasmique (exosomes). (Adapté de Colombo et al., 2014).*

3.1 Biogenèse des exosomes

Lors de l'endocytose, les vésicules internalisées fusionnent avec les endosomes précoces. La maturation des endosomes précoces en endosomes tardifs, permet l'accumulation des ILV dans la lumière de l'endosome. En raison de leurs caractéristiques morphologiques, ils sont généralement appelés corps multivésculaires (MVB). La plupart du temps, les MVB vont fusionner avec les lysosomes, contenant des hydrolases lysosomales, particulièrement acides, assurant la dégradation de leur contenu (**Figure 17**). Lors de la formation des EXO, les MVB vont fusionner avec la membrane plasmique, libérant les ILV dans le milieu extracellulaire, où elles seront appelées exosomes (Colombo et al., 2014). Les mécanismes cellulaires déterminant le devenir des MVB au sein de la cellule, c'est-à-dire soit

vers le lysosome ou vers la surface cellulaire, ne sont pas totalement élucidés. Toutefois, il a été démontré que les cellules peuvent contenir différentes populations de MVB et que leur composition influence l'adressage des MVB. Dans les cellules HeLa après stimulation avec l'Epidermal Growth Factor (EGF), au moins deux populations distinctes de MVB ont été décrites (White et al., 2006). Dans les lymphocytes B, les MVB enrichies en acide Lysobiphosphatidique (LBPA) seraient plutôt orientées vers la voie lysosomale et les MVB enrichies en cholestérol vers la voie exocytaire (Möbius et al., 2003; Wubbolts et al., 2003).

3.1.1. Formation des corps multivésiculaires

3.1.1.1. La voie ESCRT

La formation des MVB implique la machinerie Endosomal Sorting Complex Required for Transport (ESCRT) (**Figure 18**). Cette machinerie est constituée d'une trentaine de protéines assemblées en quatre complexes : ESCRT-0, -I, -II et –III. Ces complexes ont des protéines associées telles que VSP4 (Vacuolar protein Sorting-associated Protein 4), Alix (Apopotosis-Linked gene 2-Interacting protein X) appelée aussi PDCD6IP (Programmed Cell Death 6 Interacting Protein), VAT1 (Vps Twenty Associated 1), l'ATPase (Adenosin TriPhosphatase) et TSG101 (Tumour Susceptibility Gene 101 Protein) (Hanson and Cashikar, 2012). Les complexes ESCRT-0 et ESCRT-I sont impliqués dans la reconnaissance et le recrutement des protéines transmembranaires ubiquitinées au sein de microdomaines. ESCRT-III, recruté *via* ESCRT II, serait impliqué à la fois dans l'invagination de la membrane et dans la fission des microdomaines pour former les ILV (Colombo et al., 2014; van Niel et al., 2018). Toutefois, certains éléments indiquent que les MVB et les ILV peuvent se former en l'absence des complexes ESCRT. Dans les cellules HEp-2, l'inactivation des quatre complexes ESCRT n'a pas permis de bloquer la capacité des cellules à former des MVB contenant des ILV (Stuffers et al., 2009).

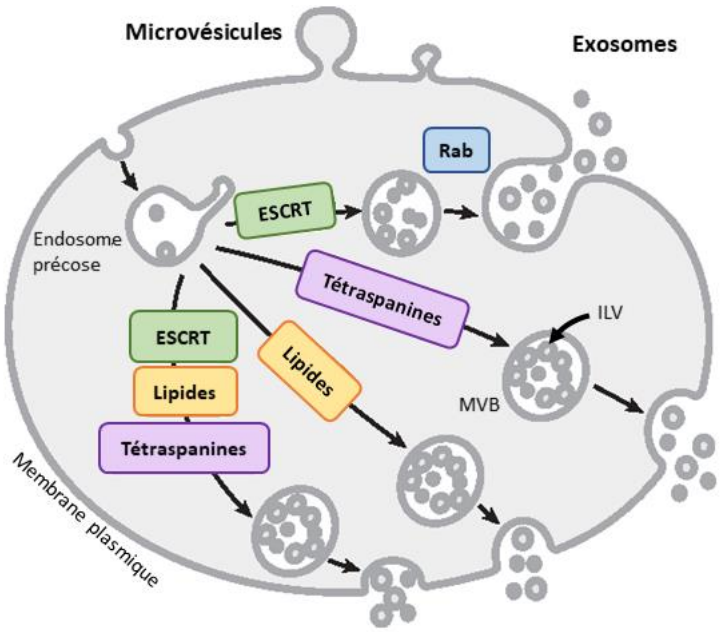


***Figure 18** : Machinerie moléculaire de la biogenèse des exosomes.*
Plusieurs mécanismes sont impliqués dans la formation des ILV et des MVB : les complexes ESCRT, les lipides et les tétraspanines. ESCRT : Endosomal Sorting Complex Required for Transport ; ILV : Vésicules intraluminales ; MVB : corps multivésiculaires.
(Adapté de Colombo et al., 2014).

3.1.1.2. La voie des lipides et des tétraspanines

Récemment, la formation d'EXO indépendamment du complexe ESCRT a été décrite, impliquant la synthèse des céramides. La sphingomyélinase neutre hydrolyse la sphingomyéline en céramide. Ce céramide génère des sous-domaines membranaires qui imposent une courbure négative spontanée à la membrane. Il a été démontré que l'inhibition de la Sphingomyélinase neutre 2 (nSMAse-2) empêche le bourgeonnement des ILV dans les MVB et la libération d'EXO par un mécanisme indépendant de la machinerie ESCRT (Trajkovic et al., 2008). Une troisième voie possible est la voie des tétraspanines. Les tétraspanines ont la capacité d'interagir avec de nombreuses protéines au niveau de la membrane plasmique, formant des microdomaines enrichis en tétraspanines (CD9, CD63, CD81, CD82) (Andreu and Yáñez-Mó, 2014). La formation de ces microdomaines enrichis en tétraspanines permettrait l'invagination de la membrane au niveau de ces microdomaines (Zimmerman et al., 2016). Dans les cellules HEp-2, malgré une inactivation des quatre complexes ESCRT, le CD63, une tétraspanine, s'accumule dans les ILV (Stuffers et al., 2009).

3.1.1.3. Adressage et libération des exosomes

Les mécanismes impliqués dans l'adressage des MVB vers la membrane plasmique, leur fusion avec cette dernière, et la libération des EXO dans le milieu extracellulaire ne sont pas totalement clarifiés. Cependant, l'adressage à la membrane des MVB et la libération des EXO, impliquent des protéines de trafic membranaires de la famille des petites protéines G (GTPases) (Hsu et al., 2010; Ostrowski et al., 2010; Zhen and Stenmark, 2015). Les membres de la famille des Rab GTPases sont connus pour être impliqués dans le transfert des EXO dans les compartiments intracellulaires et dans l'adressage des MVB vers la membrane plasmique. Il a été démontré que l'utilisation d'ARN interférents (siRNA) ciblant Rab27a ou Rab27b modifie la morphologie des MVB et leur fixation près de la membrane plasmique (Ostrowski et al., 2010). Rab27a et Rab27b interviendraient donc dans l'adressage des MVB à la membrane. Rab11a, Rab35 et Rab7 sont également impliqués dans la sécrétion d'EXO (Savina et al., 2005; Hsu et al., 2010; Baietti et al., 2012; Pucci et al., 2016; Messenger et al., 2018). Il semblerait que Rab11 et Rab35 régulent le trafic des vésicules endosomales précoces vers la membrane plasmique. Les protéines de fusions SNARE (Soluble N-éthylmaleimide-sensitive-factor Attachment protein REceptor), telles que YKT6, sont également impliquées et nécessaires à la fusion du MVB avec la membrane plasmique (Gross et al., 2012; Mathieu et al., 2019).

3.2. Biogenèse des microvésicules

3.2.1. Mécanismes de formation des microvésicules

Les connaissances sur les processus de biogenèse des MV produites à partir de cellules saines sont plus récentes (van Niel et al., 2018). La biogenèse des MV résulte d'un remodelage du cytosquelette induit pas une élévation de la concentration Ca^{2+} intracytosolique (Minciacchi et al., 2015) (**Figure 19**). L'augmentation du Ca^{2+} stimule une machinerie enzymatique assurant l'asymétrie des phospholipides membranaires, notamment les translocases des aminophospholipides (flippases et floppases), les scramblases mais également la calpaïne. L'activation de la machinerie enzymatique conduit à l'externalisation de la phosphatidylsérine (PS), du feuillet interne vers le feuillet externe de la membrane plasmique. La perte de l'asymétrie membranaire induit un excès de charge négative à la

surface de la membrane plasmique. Cet excès de charge est responsable de la courbure de la membrane et de la réorganisation du cytosquelette favorisant la libération des MV (Al-Nedawi et al., 2008; Piccin et al., 2007). Il a été démontré que l'inhibition de la scramblase supprime l'externalisation de la PS dans les plaquettes et la production de MV procoagulantes (Piccin et al., 2007). Cependant, même lorsque l'asymétrie des phospholipides membranaires est maintenue, des MV peuvent se former (Jimenez et al., 2003; Connor et al., 2010). Ces observations suggèrent que d'autres lipides, et les domaines qu'ils forment, contribuent à la biogenèse des MV. Un important composant lipidique membranaire est le cholestérol présent abondamment dans les MV. Il a été démontré que l'épuisement en cholestérol membranaire diminue la production de MV par les monocytes THP-1 (del Conde et al., 2005). Outre le remodelage membranaire et le réarrangement du cytosquelette, d'autres régulateurs sont certainement nécessaires pour la biogenèse des MV. L'activité de la famille des petites GTPases RHO et de ROCK (RHO-associated protein kinase), importants régulateurs de la dynamique de l'actine, induit la formation de MV dans différentes cellules tumorales (Li et al., 2012).

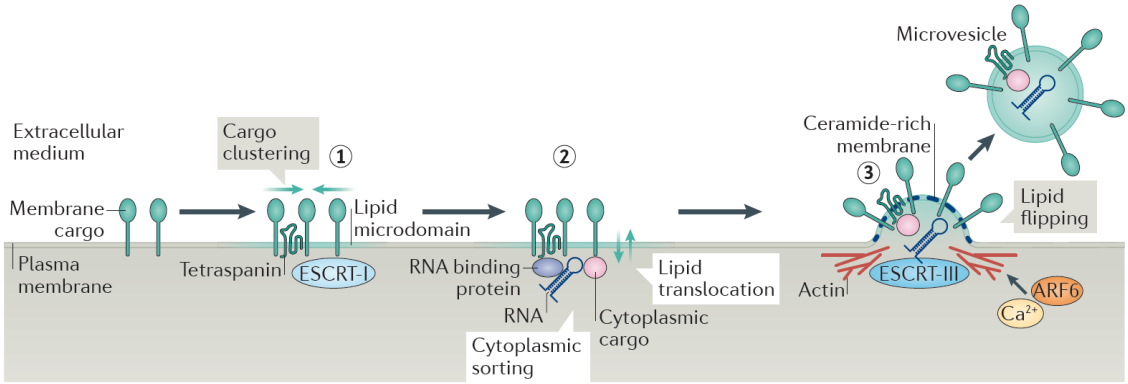


***Figure 19** : Biogenèse des microvésicules.*
ARF6 : ADP-Ribosylation Factor 6 ; ESCRT : Endosomal Sorting Complex Required for Transport. (Issue de van Niel et al., 2018).

3.2.2. Libération des microvésicules

La libération des MV nécessite leur fission à partir de la membrane plasmique. Ce mécanisme dépend de l'interaction de l'actine et de la myosine avec une contraction, dépendante de l'ATP (McConnell et al., 2009; D'Souza-Schorey and Clancy, 2012). Dans des cellules cancéreuses, il a été démontré que l'activation d'ARF6 (ADP-Ribosylation Factor 6) et d'ARF1, des petites protéines de liaison au GTP, entraîne la phosphorylation de la chaîne latérale de la myosine et la contraction de l'actomyosine, permettant au MV de se détacher

de la membrane (Muralidharan-Chari et al., 2009; Schlienger et al., 2014; Sedgwick et al., 2015). Un autre régulateur de la dynamique de l'actine, le Cdc42 (Cell division control protein 42 homolog), est impliqué dans la libération des MV dans les cellules HeLa, cependant le mécanisme est inconnu (Li et al., 2012). Dans une autre étude, le TSG101 (Tumour Susceptibility Gene 101 Protein) et l'ATPase VPS4, qui sont principalement impliqués dans la formation des EXO *via* la machinerie ESCRT, auraient participé à la fission et à la libération de MV (Nabhan et al., 2012). L'implication de la machinerie ESCRT dans la libération des MV a également été démontrée chez des embryons de *C. elegans* (Wehman et al., 2011). Une autre voie possible dans la libération des MV est l'activation du récepteur P2X7 (P2X purinoceptor 7), ATP dépendant. L'activation du récepteur entraîne un réarrangement membranaire influençant la libération de MV (Bianco et al., 2005; Thomas and Salter, 2010). Ce processus est associé à la translocation de la sphingomyélinase acide vers la membrane plasmique, où elle génère un céramide, favorisant ainsi le bourgeonnement de la membrane et la libération des MV (Bianco et al., 2009).

4. Composition des vésicules extracellulaires

Il existe des banques de données telles que ***Vesiclepedia*** (http://microvesicles.org) construites à partir d'études de types « omique » (protéomique, lipidomique et génomique). Ces banques révèlent le très haut niveau de complexité de la composition des VE. Il est donc utopique de tenter de donner une liste exhaustive des composants des VE. Ces nanoparticules closes, caractérisées par la présence d'une bicouche lipidique, possèdent à leur surface, dans leur membrane ou à l'intérieur, un grand nombre de molécules diverses : lipides, acides nucléiques, protéines (membranaires ou solubles). Ces constituants (**Figure 20**) sont dépendant du type cellulaire (et des conditions de cultures dans un modèle *in vitro*), du stimulus, et de l'état physiologique ou physiopathologique de la cellule productrice ainsi que du mode d'isolement sachant que celui-ci influence le type de VE obtenues.

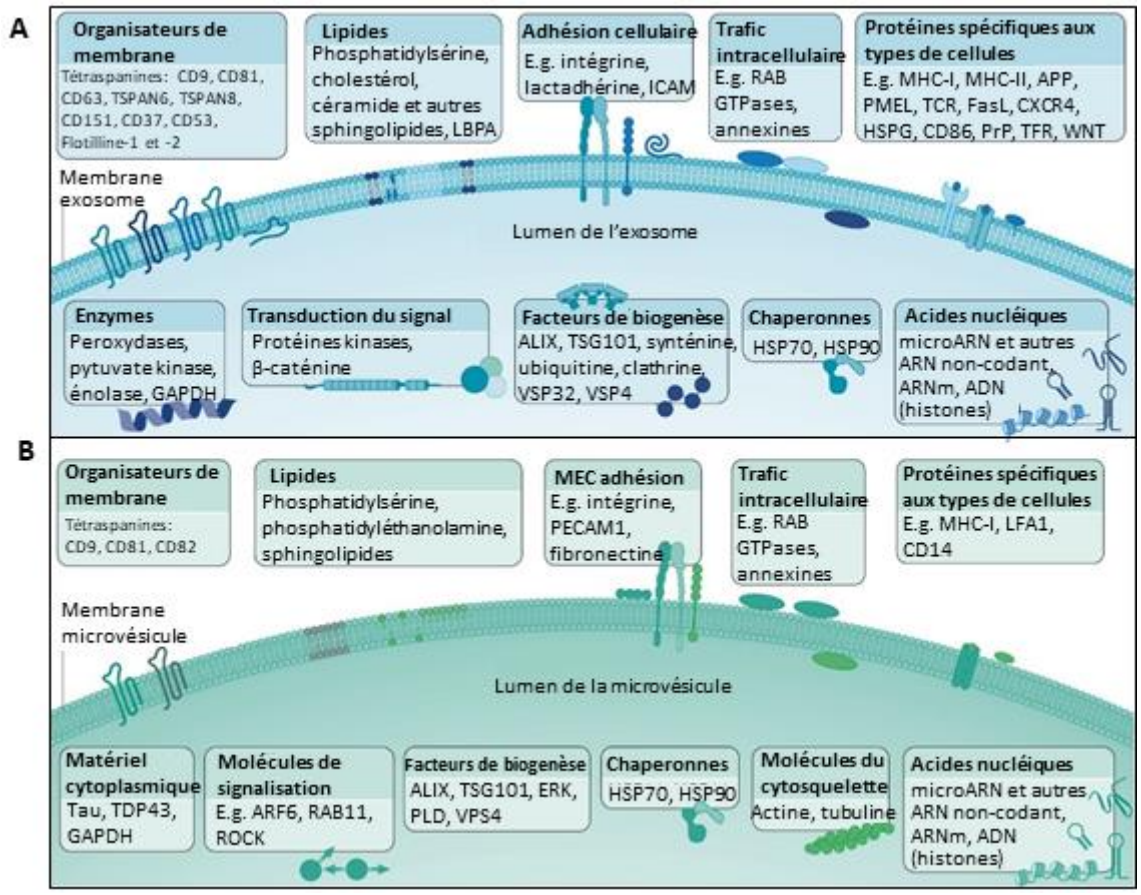


Figure 20 *: Composition moléculaire des vésicules extracellulaires.*
A *: Exosome ;* ***B*** *: Microvésicule. ALIX : ALG-2 interacting protein X ; APP : Amyloid Precursor Protein ; ARF6 : ADP-Ribosylation Factor 6 ; CXCR4 : CXC-Chemokine Receptor 4 ; GAPDH : Glyceraldehyde-3-Phosphate Dehydrogenase ; HSP70: Heat Shock 70 kDa Protein ; HSPG : Heparan Sulfate Proteoglycan ; ICAM : Intercellular Adhesion Molecule ; LBPA : Lyso-Bis-Phosphatidyl Acid ; LFA1 : Lymphocyte Function-Associated antigen 1; MHC : Major Histocompatibility Complex ; PECAM1 : Platelet Endothelial Cell Adhesion Molecule ; PLD : Phospholipase D; PrP : Prion Protein ; ROCK : RHO-associated protein kinase ; TCR : T Cell Receptor ; TDP43 : TAR DNA-binding Protein 43 ; TFR : Transferrin Receptor ; TSG101: Tumour Susceptibility Gene 101 Protein ; TSPAN : Tetraspanin ; VPS : Vacuolar Protein Sorting-associated protein. (Issue de van Niel et al., 2018).*

Outre des constituants cellulaires moléculaires, les VE peuvent aussi contenir des organites entiers. La taille étant dans ce cas un facteur limitant, cette fonction concerne pour le moment uniquement les MV. Si pour certains organites cela reste une hypothèse (lysosomes), cela a été observé dans de nombreuses situations pour les mitochondries (Murray and Krasnodembskaya, 2019). Malgré un mode de biogenèse différent, les EXO et les MV peuvent présenter des aspects similaires tels que des tailles qui se chevauchent et des composants communs. Cela constitue un niveau de difficulté supplémentaire surtout lors de la détermination de la composition de VE isolées à partir de milieux extracellulaires ou de

fluides biologiques. Malgré toute cette complexité, au moins du point de vue protéique, en fonction de la nature des VE, il existe des composants « marqueurs » utilisés pour leur caractérisation. Ainsi, en relation avec leur biogenèse, la composition des EXO est proche de celle des endosomes tandis que la composition des MV se rapproche davantage de celle de la membrane plasmique.

Parmi les protéines observées dans les VE, on retrouve des protéines reliées au mode de production (tétraspanines, protéines du cytosquelette (actine, tubuline), …) ; impliquées dans l'interaction avec la cellule cible (intégrines, molécules d'adhésion cellulaire (VCAM (Vascular Cell Adhesion Molecule)…) ; des récepteurs (TLR : Toll-Like Receptors), EGFR, récepteur couplé aux protéines G) ; des vecteurs de mort (FAS-L : Fatty Acid Synthase-Ligand) ; des enzymes de dégradation de la matrice extracellulaire (MMP9, MMP2 (métalloprotéinases matricielles)), antioxydantes (catalase…), du métabolisme des xénobiotiques (CYPP450…) ; des cytokines (TNF-α,…) et facteurs de croissance (EGF…). En relation avec la situation pathologique, des protéines anormales comme le peptide amyloïde béta (maladie d'Alzheimer), l'alpha-synucléine (maladie de Parkinson), ou des protéines du prion (PrP) ont également été détectées. Le transfert de neurone à neurone, de ces protéines anormales, *via* les EXO, est considéré comme un moyen de propagation de la maladie (Sardar Sinha et al., 2018).

Dans les VE, quel que soit leur type, des acides nucléiques et leurs protéines associées (protéines ribosomales, histones…) sont détectés. Le fait qu'ils soient «encapsulés» dans une vésicule, leur offre une protection efficace contre leur dégradation dans le milieu extracellulaire et dans les fluides biologiques. On retrouve des ARNm, de l'ADN, des ARN non-codant et bien sûr des microARN. C'est d'ailleurs ce qui a suscité un regain d'intérêt pour les VE. En effet, leur transfert aux cellules cibles est à l'origine de modifications épigénétiques des cellules réceptrices. Les acides nucléiques peuvent provenir de la cellule d'origine mais également de mitochondries de la cellule d'origine. Ainsi, il a été démontré la présence notamment dans les EXO d'ADN mitochondrial. Ce transfert a d'ailleurs été relié à l'acquisition de résistance au traitement par les cellules cancéreuses (Sansone et al., 2017).

La composition en lipides des VE, à l'instar de celle des protéines ou des acides nucléiques est très variable. Sachant que les EXO sont issus des compartiments endosomaux et les MV,

issues du bourgeonnement de la membrane plasmique, il n'est pas étonnant que les différents types de VE aient des compositions lipidiques différentes. Durant leurs productions, les VE s'enrichissent ou s'appauvrissent en lipides. Ainsi, les EXO peuvent être enrichies en cholestérol et appauvries en phosphatidylcholine (Laulagnier et al., 2004; Subra et al., 2007). Les lipides, comme les céramides, la phosphatidylsérine, les sphingolipides, le cholestérol, que l'on détecte dans la membrane des VE sont à l'origine des caractéristiques ou des effets des VE. Ainsi, en condition d'hyperlipidémie, les VE produites par les hépatocytes sont enrichies en céramides, ce qui augmente leur toxicité vis-à-vis des macrophages notamment *via* l'apoptose (Hirsova et al., 2019). La présence de cholestérol ou de sphingomyélines, augmente la rigidité des VE en particulier des EXO, augmentant ainsi leur résistance dans les fluides biologiques. Les VE, en particulier les EXO, sont aussi considérées comme un moyen de transfert de lipides entre cellules. C'est le cas du transfert d'acides gras de cellules stromales vers des cellules cancéreuses (Beloribi-Djefaflia et al., 2016).

5. Interaction des vésicules extracellulaires avec les cellules cibles

L'interaction entre les VE et les cellules cibles est un prérequis pour que ces nanostructures influencent les cellules cibles. Plusieurs modes d'interactions et d'entrée dans le milieu intracellulaire des VE ont été décrits (**Figure 21**) : interaction protéines-protéines (suivie ou non de l'intégration dans la cellule cible), fusion des membranes, endocytose (faisant intervenir les cavéolines, les radeaux lipidiques ou la clathrine), phagocytose ou pinocytose. Le mode d'interaction avec la cellule cible dépend à la fois des constituants membranaires de la vésicule, de la cellule cible et conditionnera la réponse de la cellule cible. L'interaction protéines-protéines est classiquement associée à la phase d'interaction. Cette interaction est déjà porteuse d'informations. Ainsi, l'interaction avec les EXO, porteurs du FAS-L, produit par des cellules issues de tumeurs prostatique (LCNaP) conduit à l'apoptose des lymphocytes T CD8+. Il s'agirait d'un moyen de résistance des cellules cancéreuses au système immunitaire (Abusamra et al., 2005). L'interaction peut être suivie de la fusion des membranes. La présence de la tétraspanine CD9 et de syncytine-1 et 2 a été démontrée comme favorisant ce phénomène (Miyado et al., 2008; Meldolesi, 2018).

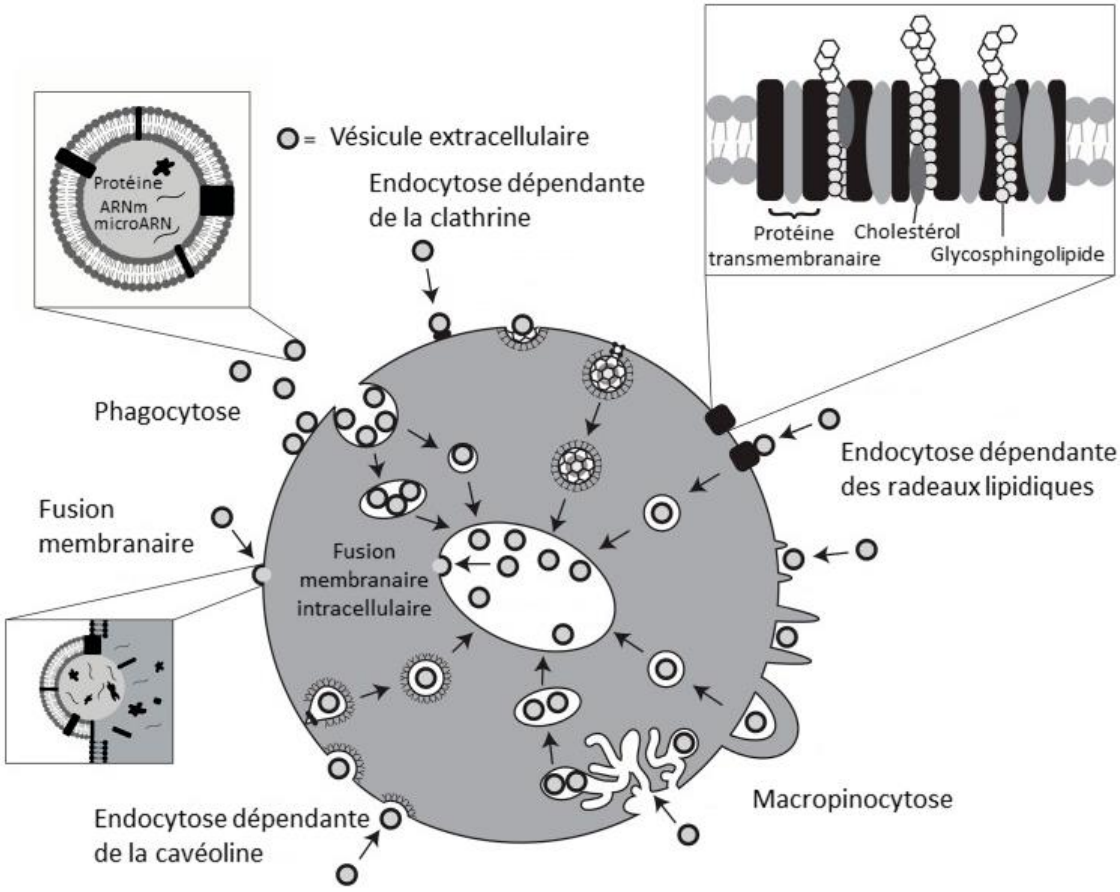


***Figure 21** : Internalisation des vésicules extracellulaires pas les cellules cibles. (Issue de Mulcahy et al., 2014).*

Par ailleurs, certaines VE ont à leur surface (feuillet externe de la membrane) un enrichissement en phosphatydylsérine, en particulier les MV mais également certains EXO. La présence de ce phospholipide facilite la phagocytose des VE par les macrophages et les cellules dendritiques notamment (Mulcahy et al., 2014). Enfin, la présence de radeaux lipidiques, riches en cholestérol, favorise l'endocytose des VE (Svensson et al., 2013).

Il me semble nécessaire de préciser qu'une interaction VE-cellules n'est pas obligatoire pour que les VE aient une fonction. Ainsi, certaines cellules cancéreuses émettent des VE riches en VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor), FGF (Fibroblast Growth Factor), IL-6, TIMP-1 (Tissue Inhibitor of Metalloproteinases-1). Dans le milieu extracellulaire, l'acidité de la tumeur fait éclater les vésicules et libèrant des facteurs, stimulant l'angiogenèse. Ce processus participe à la croissance tumorale et à la survenue de métastases (Spugnini et al., 2018).

6. Les vésicules extracellulaires comme biomarqueurs potentiels

Toutes les cellules sont virtuellement productrices de VE. La nature, la composition et les nombres de ces VE dépendent de la situation physiologique et pathologique dans lesquelles les cellules se trouvent. Cette constatation associée au fait que les VE soient présentes dans les fluides biologiques comme le sang et les urines, et donc facilement accessibles, à très vite conduit à considérer les VE comme des biomarqueurs potentiels. Les cancers (poumon, foie, prostate…) (Xu et al., 2018), les maladies métaboliques (diabète, obésité) (Akbar et al., 2019), cardiovasculaires (maladie athéromateuse) (Chong et al., 2019) ou rénales (Kwon, 2019) s'accompagnent d'une augmentation du nombre de VE dans le sang ou les urines. Cette variation en nombre, s'accompagne également d'un changement de profil, c'est-à-dire un changement dans la proportion entre EXO et MV. Aujourd'hui, de nombreux travaux s'intéressent non seulement au nombre ou aux types de VE produits dans une situation particulière, mais aussi à leur composition. En effet, l'analyse de la composition de ces VE pourrait révéler une signature protéique et/ou lipidique et/ou en acides nucléiques spécifique.

Si les pathologies conduisent à des changements en terme de VE, il en est de même pour l'exposition aux xénobiotiques. L'intérêt de l'étude de la relation entre la production des VE et les xénobiotiques a notamment été suscité par la mise en évidence de la présence d'enzymes du métabolisme des xénobiotiques parmi les composants des VE isolées à partir de plasma humain ou de cultures cellulaires, notamment d'hépatocytes. Dans ces VE, ont été détectées des enzymes de phase I (CYP) et de phase II (GST, UDP-GT) (Conde-Vancells et al., 2010). Cet intérêt a été confirmé par des travaux, restant encore peu nombreux, montrant que les xénobiotiques pouvaient modifier la production cellulaire de VE. Ainsi, l'exposition à d'alcool ou au paracétamol, *in vivo* (chez l'homme) comme *in vitro* (lignée HepaRG) conduit à l'augmentation de la quantité d'EXO dans le plasma ou produits par les hépatocytes enrichies en CYP2E1 (Rahman et al., 2019). Cela constitue, selon les auteurs, un mécanisme d'exacerbation de la toxicité de ces xénobiotiques mais également la marque d'une réponse cellulaire. Récemment, Wu *et.al*. ont démontré une présence accrue de VE dans le Liquide Broncho Alvéolaire (LBA) de fumeurs et de patient souffrant de cancer du poumon (non à petites cellules) (Wu et al., 2019). Ces VE avaient par ailleurs une composition en microARN et en ARNm différente en fonction de la situation.

Chapitre C. Les microalgues

Une partie des informations présentées dans ce chapitre fait référence à l'Annexe 1 : Microalgal carotenoids and phytosterols regulate biochemical mechanisms involved in human health and disease prevention. Biochimie. 2019 Sep, 167 : 106-119. doi : 10.1016/j.biochi.2019.09.012 (Le Goff et al., 2019a).

1. Généralités sur les microalgues

Les microalgues regroupent un ensemble d'organismes photosynthétiques, la plupart du temps unicellulaires, vivant essentiellement en milieu aquatique. Elles constituent un groupe polyphylétique très divers dont la classification est en constante évolution, en raison des nouvelles données génétiques (Villarruel-López et al., 2017). Cependant, elles peuvent être classées en deux domaines, les eucaryotes et les procaryotes formant un ensemble appelé phytoplancton (Borowitzka, 2018). Les microalgues procaryotes sont des cyanobactéries (algue bleu-vert), dont la taxonomie comprend cinq ordres: Chroococcales, Oscillatoriales, Nostocales, Stigonematales et Pleurocapsales. Les microalgues eucaryotes comprennent plusieurs divisions: Chlorophyta (algues vertes); Euglenophyta; Rhodophyta (algues rouges); Cryptophyta; Dinophyta ou Dinoflagellata; Prymnesiophyta ou Haptophyta (algue brunes-dorées); Glaucophyta; Chlorarachniophyta; et Heterokontophyta composé des algues brunes Phaeophyta, des algues jaunes-vertes Eustimatophyta (ou Xanthophyta), des algues brunes-dorées Chrysophyta et Bacillariophyta (ou Diatomée) (Jeffrey et al., 2011; Villarruel-López et al., 2017).

La majorité des microalgues sont des organismes autotrophes. Ces organismes sont capables de convertir l'énergie lumineuse en énergie chimique, d'utiliser le CO_2 et de l'eau, pour produire de l'oxygène et de la matière organique dont de nombreux phytochimiques tels que les lipides, les pigments et les protéines (**Figure 22**). Leur croissance nécessite de la lumière, du dioxyde de carbone, de l'eau et des nutriments notamment du phosphore et de l'azote en tant que nutriments majeurs (Zullaikah et al., 2019).

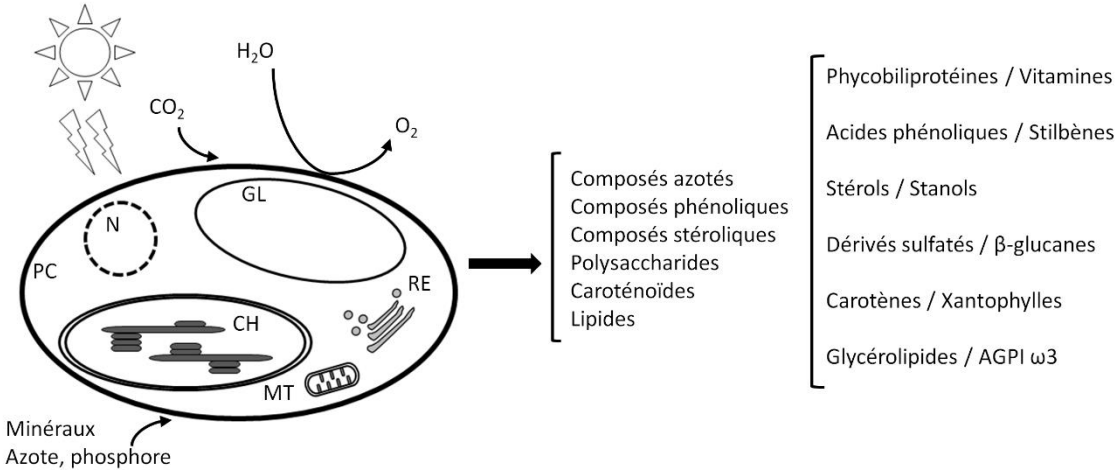


***Figure 22** : Synthèse de composés bioactifs par les microalgues.*
AGPI : acides gras polyinsaturés ; CH : chloroplaste ; PC : paroi cellulaire ; RE : réticulum endoplasmique ; GL : gouttelette lipidique ; MT : mitochondrie; N : noyau. (Issue de Le Goff et al., 2019a).

Le nombre exact d'espèces de microalgues est inconnu. Il est estimé entre 200 000 et 800 000 dont 40 000 à 50 000 espèces sont décrites (Han et al., 2015). Malgré le nombre important de microalgues, seules quelques centaines d'espèces ont fait l'objet d'études approfondies dont plusieurs dizaines seulement sont produites au niveau industriel.

Les microalgues présentent une grande diversité morphologique et peuvent mesurer de quelques microns à plusieurs centaines de microns, la plus petite étant *Ostreococcus tauri* (OT), dont la taille moyenne est de 0,8 µm (Chrétiennot-Dinet et al., 1995). Elles sont généralement unicellulaires mais peuvent être multicellulaires ou coloniales (**Figure 23**). Certaines espèces ne sont pas mobiles alors que d'autres se déplacent en utilisant des flagelles (Bertrand, 2008).

Les microalgues sont surtout présentes dans les environnements aquatiques. Cependant, elles sont retrouvées pratiquement dans tous les habitats terrestres : en suspension dans les eaux douces, salées, saumâtres et dans l'air ou attachées à des substrats tels que des plantes, des macroalgues, des roches, des grains de sable ou encore les édifices architecturaux (Sharma et al., 2007; Macedo et al., 2009). Elles peuvent également former des tapis à la surface des sédiments.

Certaines espèces extrêmophiles colonisent des milieux alcalins ou acides, des sources hydrothermales ou des glaciers. *Coccomyxa onubensis* se développe dans une gamme de pH extrêmement large, allant de 2,5 à 9 (Fuentes et al., 2016), tandis que *Dunalialla acidophila* croît à un pH de 1 (Gimmler and Weis, 1992). Des espèces de microalgues se développent également à des températures extrêmes. *Chloromonas nivalis* et *Raphidonema nivale* sont retrouvées dans la glace et la neige (Leya et al., 2009). A l'inverse, d'autres se développent à des températures supérieures à 70 °C, telles que *Mastigocladus laminosus* et *Synechococcus*, des cyanobactéries (Castenholz, 1969). D'autres microalgues ont la particularité de croître dans des conditions hypersalines proches de la saturation. C'est le cas de l'algue verte, *Dunaliella salina,* pouvant se développer à des salinités allant de 20 à 350 ‰ NaCl et à des températures allant de 0 °C à 48 °C (Borowitzka, 1981). De plus, un certain nombre de microalgues forment une symbiose avec d'autres organismes tels que des bactéries, des coraux et des mollusques (Decelle et al., 2012).

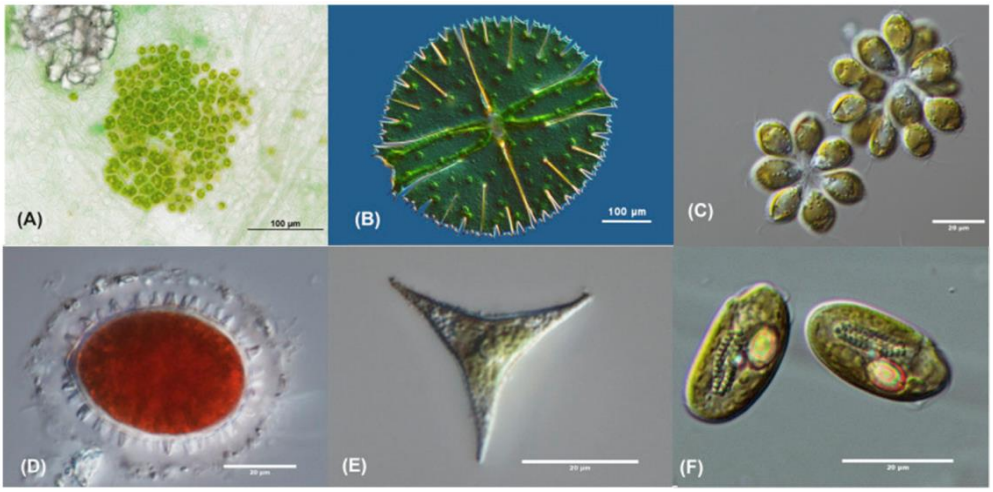


Figure 23 : Illustration d'une partie de la diversité des microalgues.
*(**A**): Colonie de Pediastrum sp.; (**B**): Micrasterias radiosa; (**C**): Synura petersenii; (**D**): Aplanospore; (**E**) Pseudogoniochloris tripus; (**F**) Cryptomonas sp. (Adapté de Borowitzka, 2018).*

Les microalgues ont un rôle essentiel dans le cycle du carbone. Elles participent fortement à la fixation du CO_2 et à la production d'O_2 atmosphérique. Près de 50% de l'oxygène total rejeté dans l'atmosphère est lié à la photosynthèse océanique, majoritairement attribuée aux microalgues. Elles sont également impliquées dans le cycle de l'azote et sont la base de nombreuses chaînes alimentaires (Fowler et al., 2013; Pajares and Ramos, 2019; Sathasivam et al., 2019).

1.1. Présentation des modèles d'étude

1.1.1. *Ostreococcus tauri* (OT)

O. tauri est une microalgue marine, découverte en 1994 par Claude Courties dans l'étang de Thau (France) (Courties et al., 1994). Cette microalgue verte unicellulaire est le plus petit organisme eucaryote décrit à ce jour (≈ 0,8 µm de diamètre). Elle appartient à la classe des Mamiellophyceae (**Figure 24A**), classe majeure dans le phytoplancton picoeukaryote (Marin and Melkonian, 2010). Ce picoeucaryote possède une ultrastructure très simplifiée, une cellule non flagellée, comprenant une seule mitochondrie, un seul chloroplaste et un noyau (**Figure 24C**). Le génome d'OT a été séquencé pour la première fois en 2006 (Derelle et al., 2006) puis entièrement reséquencé en 2014 (Blanc-Mathieu et al., 2014). Elle possède un génome haploïde de petite taille (12,56 Mb), hautement compacté de 7 699 gènes répartis sur 20 chromosomes.

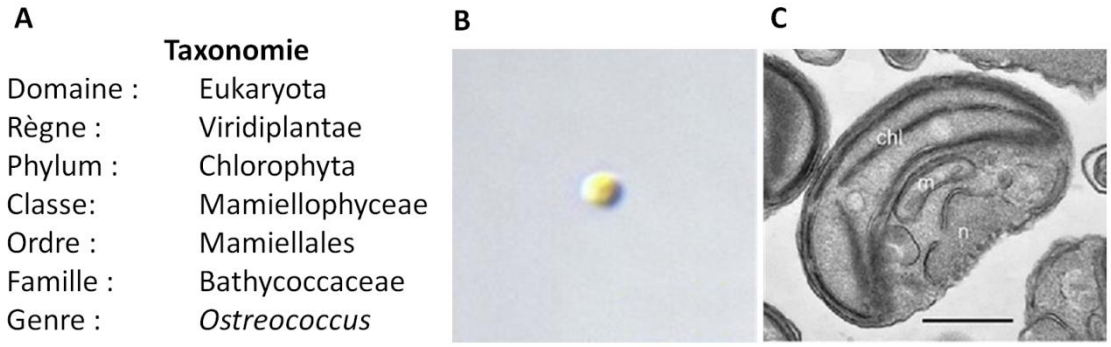


***Figure 24** : Taxonomie et ultrastructure d'Ostreococcus tauri.*
***A :** Taxonomie d'O. tauri. **B-C** Observation en microscopie optique et microscopie électronique à transmission (MET) d'Ostreococcus sp. chl : chloroplaste ; m: mitochondrie et n: noyau (n). Barre d'échelle = 0.5 µm. (Issue de Roscoff Culture Collection; Guillou et al., 2004).*

L'état simplifié de son architecture cellulaire et sa facilité à être cultivée en laboratoire en fait un modèle pour l'étude de nombreux processus biologiques (Corellou et al., 2009; Lozano et al., 2014). Elle est notamment utilisée pour étudier la division cellulaire (Moulager et al., 2010), l'architecture de l'horloge circadienne (O'Neill et al., 2011), l'assimilation de vitamines (Paerl et al., 2017) et le métabolisme du fer (Lelandais et al., 2016; Botebol et al., 2017). Elle représente aussi un biomarqueur en écotoxicologie (Sanchez-Ferandin et al., 2013; Henríquez-Castillo et al., 2018).

Ce picoeucaryote est capable de synthétiser de nombreux acides gras. Notamment l'acide docosahexaénoïque (DHA) représentant environ 13% des acides gras totaux, mais également du 16:4n-3 et du 18:4n-3, qui avec le DHA, représentent les acides gras prédominants (39% d'oméga-3) (Wagner et al., 2010). Par rapport aux autres algues vertes, OT présente une composition pigmentaire complexe et qui n'est pas fermement établie. En effet, elle contient de la chlorophylle *b*, de la Mg-2,4-divinyl phéoporphyrine et des caroténoïdes inhabituels tels que le micromonal, la néoxanthine, la dihydrolutéine, la prasinoxanthine et l'uriolide (Rodríguez et al., 2005; Six et al., 2005).

1.1.2. *Phaeodactylum tricornutum* (PT)

P. tricornutum (PT) est une diatomée pennée marine appartenant à la classe des Bacillariophyceae (**Figure 25A**). Cette diatomée est retrouvée dans les zones côtières. Cependant, elle est capable de s'adapter à des milieux instables tels que les estuaires et les bassins rocheux (Martino et al., 2007). Contrairement à d'autres diatomées, PT est la seule du genre *Phaeodactylum* à présenter trois morphotypes différents : fusiforme, ovale et triradié (Kim et al., 2012) (**Figure 25**). Le changement de sa forme cellulaire est dû à des stimuli environnementaux (De Martino et al., 2011). Seule la forme ovale peut synthétiser un exosquelette de silice (Martin-Jézéquel and Tesson, 2012). La taille de PT est comprise entre 10 et 20 µm de diamètre dont une grande partie de son volume est occupée par un seul chloroplaste.

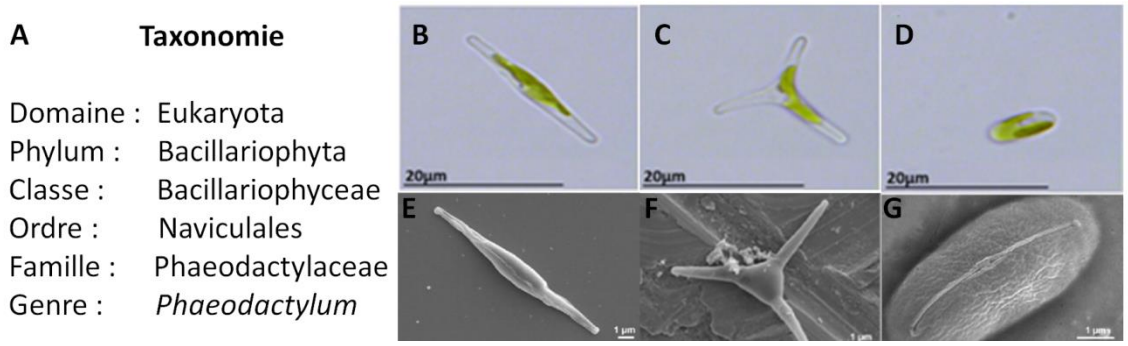


***Figure 25** : Taxonomie et microscopies des trois morphotypes de Phaeodactylum tricornutum. **A :** Taxonomie de P. tricornutum **; B-D :** Observation en microscopie optique ; **E-G** ; microscopie électronique à transmission (MET) de P. tricornutum. **B, E** : morphotype fusifome ; **C, F** : morphotype triradié ; **D, G** morphotype ovale. (Adapté de Francius et al., 2008; Ovide et al., 2018).*

Cette microalgue fait partie des rares diatomées dont le génome a été séquencé. C'est la deuxième diatomée pour laquelle une séquence entière du génome a été générée, la première étant *Thalassiosira pseudonana.* La taille de son génome est d'environ 27,4 Mb avec 10 402 gènes (Bowler et al., 2008). Aujourd'hui, quatre génotypes A, B, C et D, provenant de 10 souches de PT (Pt1-Pt10) ont été découverts et isolés dans différentes zones géographiques (Martino et al., 2007; Rastogi et al., 2019).

Sur la base du poids sec, cette microalgue contient en moyenne 36,4% de protéines, 26,1% de glucides, 18% de lipides et 0,25% de fibres. Elle contient également de nombreux minéraux (calcium, potassium, sodium, soufre, magnésium, zinc, cuivre, et phosphore), avec le calcium, le sodium et le soufre comme minéraux majoritaires (Rebolloso-Fuentes et al., 2001). Cette diatomée est riche en caroténoïdes et particulièrement en fucoxanthine dont la concentration est au moins dix fois supérieure à celle des macroalgues (Kim et al., 2012).

En raison du séquençage de son génome et de sa facilité de culture, PT est utilisée en laboratoire comme organisme modèle. Du fait de sa teneur élevée en acides gras polyinsaturés (AGPI) et plus particulièrement en acide eicosapentaénoïque (EPA), elle est cultivée à l'échelle industrielle pour être utilisée dans l'alimentation aquacole.

2. Applications des microalgues

Depuis des siècles, les microalgues sont utilisées par l'Homme. Les Aztèques et les Mayas récoltaient *Arthrospira sp.* (communément appelée spiruline) pour leur alimentation. Les Kanembous, un peuple d'Afrique (Tchad), utilisent encore aujourd'hui la spiruline dans le lac de Kossorom pour se nourrir quotidiennement (García et al., 2017). Il y a plus de 2 000 ans, en Chine, la cyanobactérie, *Nostoc* a été utilisée pour survivre à une famine. L'augmentation de la population mondiale et les prédictions d'un apport en protéines insuffisant, ont conduit à la recherche de nouvelles protéines alternatives (Becker, 1994). La culture de microalgues a commencé à se développer dans les années 50. Certaines microalgues riches en protéines telles que *Arthrospira sp.*, sont apparues comme de bonnes candidates.

Actuellement, la production mondiale de microalgues est estimée à environ 10 000 tonnes de matière sèche par an, essentiellement pour l'alimentation humaine et animale (Rocca et al., 2015). La diversité des espèces de microalgues ainsi que leurs caractéristiques

biochimiques intéressantes, font d'elles des organismes d'intérêt dans de nombreux secteurs économiques : alimentation, environnement, énergie, agriculture… (**Figure 26**).

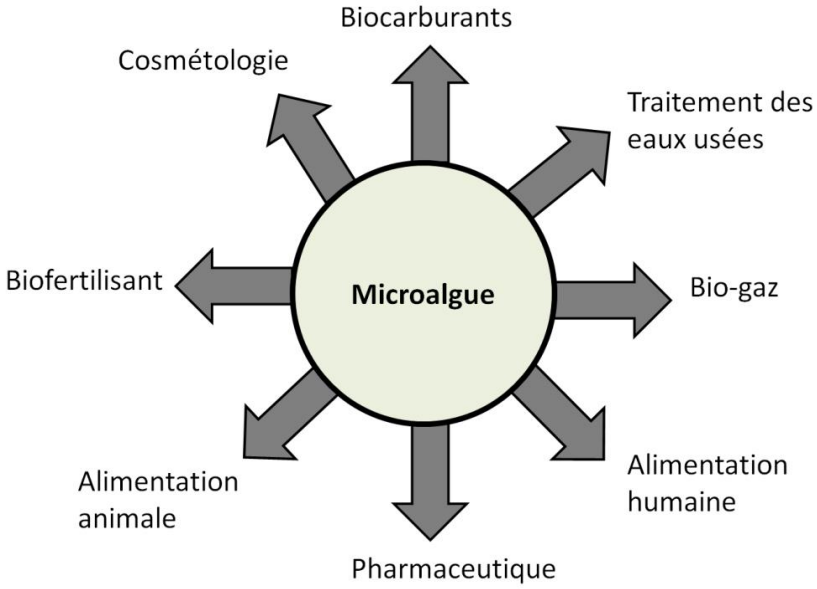


***Figure 26** : Domaines d'applications potentiels des microalgues. (Adapté de Iqbal, 2017).*

Bien que le nombre d'espèces de microalgues soit estimé entre 200 000 et 800 000, seules quelques-unes sont utilisées pour des applications alimentaires. Actuellement, dans l'Union Européenne, seules les microalgues *Odontella aurita*, *Arthrospira sp*., *Chlorella sp.* et *Tetraselmis chuii* sont autorisées comme algues alimentaires. Les huiles extraites de *Schizochytrium sp.* (DHA>22% et EPA>10 %), *Ulkenia sp*. (>32% DHA) et *Haematococcus pluvialis* (riche en astaxanthine, un caroténoïde) ont été approuvées comme nouveaux aliments (novel foods)[15]. D'autres microalgues sont autorisées dans la composition de compléments alimentaires[16] en France, telles que *Dunaliella salina* (riche en β-carotène) (**Tableau 10**). Ainsi, dans l'industrie agroalimentaire, les microalgues sont utilisées comme compléments nutritionnels ou comme colorants alimentaires naturels. Elles sont

[15] Novel foods : Aliments ou ingrédients dont la consommation était négligeable voire inexistantes dans les pays de l'Union Européenne avec le 15 mai 1997. Les novel foods sont définis par le règlement européen CE n°258/97, actuellement en révision.

[16] Complément alimentaire : Denrées alimentaires dont le but est de compléter le régime alimentaire normal et qui constituent une source concentrée de nutriments ou d'autres substances ayant un effet nutritionnel ou physiologique seuls ou combinés, commercialisés sous forme de doses, à savoir les formes de présentation telles que les gélules, les pastilles, les comprimés, les pilules et autres formes similaires, ainsi que les sachets de poudre, les ampoules de liquide, les flacons munis d'un compte-gouttes et les autres formes analogues de préparations liquides ou en poudre destinées à être prises en unités mesurées de faible quantité. (Directive 2002/46/CE du Parlement européen, transposée par le décret n°2006-352 du 20 mars 2006).

commercialisées sous différentes formes : comprimés, gélules, liquides. Elles peuvent également être incorporées dans les pâtes, les friandises et les boissons (Spolaore et al., 2006).

Tableau 10 : *Microalgues autorisées dans la composition de complément alimentaire en France.*
(Issue de DGCCRF, 2019) ;
(https://www2.economie.gouv.fr/files/files/directions_services/dgccrf/securite/produits_alimentaires/Complement_alimentaire/CA_ListeAlgues_Janvier2019.pdf).

Espèces	**Famille**
Aphanizomenon flos aquae	Nostocaceae
Arthrospira fusiformis	Microcoleaceae
Arthrospira indica	Microcoleaceae
Arthrospira maxima	Microcoleaceae
Arthrospira platensis	Microcoleaceae
Auxenochlorella protothecoides	Chlorellaceae
Auxenochlorella pyrenoidosa	Chlorellaceae
Chlorella sorokiniana	Chlorellaceae
Chlorella vulgaris	Chlorellaceae
Dunaliella salina	Dunaliellaceae
Graesiella emersonii	Scotiellocystoidaceae
Haematococcus pluvialis	Haematococcaceae
Heterochlorella luteoviridis	Trebouxiaceae
Nannochloropsis oculata	Monodopsidaceae
Odontella aurita	Eupodiscaceae
Parachlorella kessleri	Chlorellaceae
Scenedesmus vacuolatus	Scenedesmaceae
Schizochytrium	Thraustochytriaceae
Spirulina major	Spirulinaceae
Ulkenia sp.	Thraustochytriaceae

En aquaculture, les microalgues servent d'aliments de base pour la production du zooplancton. Elles sont aussi utilisées comme aliments essentiels pour le développement des mollusques bivalves (huîtres, palourdes, moules, pétoncles), des crustacés (crevettes) et de certains poissons au stade larvaire ou juvénile (Muller-Feuga, 2013).

En cosmétologie, les extraits de microalgues sont principalement utilisés dans la formulation des produits de soin de la peau et des protections solaires (hydratation : AGPI, antioxydant : β-carotène) (Couteau and Coiffard, 2018). *Arthrospira sp*. et *Chlorella sp.* sont les principales microalgues utilisées en cosmétologies (Kim et al., 2008).

Parmi les applications environnementales, les microalgues sont utilisées pour le traitement des eaux usées. Elles sont capables de fixer les métaux lourds, de fournir de l'oxygène dissous aux bactéries et d'assimiler de nombreux nutriments (phosphate, nitrates) nécessaires à leur croissance. Elles permettent ainsi d'éviter l'eutrophisation des cours d'eau. Les microalgues ont également l'avantage d'absorber le CO_2 atmosphérique *via* leur capacité de photosynthèse. Ainsi, l'utilisation des microalgues dans les industries émettrices de CO_2, permettrait de réduire les émissions de gaz à effet de serre, tout en produisant de la biomasse valorisable (Rizwan et al., 2018).

Les microalgues ont un grand potentiel dans le secteur de l'énergie. Certaines microalgues sont capables d'accumuler des taux importants de lipides (jusqu'à 80% de leur poids sec) et principalement sous forme de TAG. Ces TAG, par des réactions de trans-estérification avec un alcool, forment des esters utilisables dans les moteurs à combustion (diesel). D'autres microalgues riches en polysaccharides et en amidon, peuvent être utilisées comme matière première pour la production de bio-éthanol. Les microalgues sont également exploitées pour la production de bio-gaz. Lors de la photosynthèse, certaines microalgues produisent de l'hydrogène, une énergie renouvelable non polluante qui suscite un grand intérêt aujourd'hui. De plus, la biomasse microalgale est utilisée pour produire du méthane par fermentation anaérobie (Aishvarya et al., 2015; Choi et al., 2019b).

En agriculture, les microalgues sont utilisées comme biofertilisants[17] et biostimulants[18] naturels (Ronga et al., 2019). Il a été montré que l'utilisation des cyanobactéries dans les rizières améliorait la germination des semences, la croissance des racines et des pousses, et

[17] Biofertilisants : Produits contenant des micro-organismes vivants ou des substances naturelles capables d'améliorer les propriétés chimiques et biologiques du sol, de stimuler la croissance des plantes et de restaurer la fertilité du sol.

[18] Biostimulants : Produits appliqués à faibles doses sur les semences, les cultures ou le sol, qui sont capables de réguler et d'améliorer les processus physiologiques de la culture. Ils agissent sur la physiologie végétale par différentes voies, améliorant la croissance des cultures, les rendements, la qualité, l'absorption des nutriments, la tolérance aux stress abiotiques et la durée de conservation des produits récoltés.

augmentait la teneur en protéines et le poids des grains de riz. Les cyanobactéries peuvent excréter de l'acide indole 3-acétique (une phytohormone), des acides aminés et d'autres composés favorisant la croissance. Ces composés sont capables de stimuler à la fois la croissance des populations microbiennes du sol et le développement des cultures.

3. Composés bioactifs produits par les microalgues et activités biologiques

Tableau 11 *: Exemple de la diversité des composés bioactifs présents dans les microalgues et leurs activités biologiques associées.*
(Adapaté de Le and Salcedo, 2013; Raposo and de Morais, 2015; Mimouni et al., 2018; Morançais et al., 2018; Le Goff et al., 2019a; Koyande et al., 2019).

Composés bioactifs	phytochimiques	Molécules	Classes ou espèces de microalgues	Activités
Pigments	Caroténoïdes	β-carotène	*Dunaliella salina*	Antioxydant Anticancéreux
		Astaxantine	*Haematoccocus pluvialis*	Antioxydant Anti-inflammatoire Anticancéreux
		Fucoxanthine	*Phaeodactylum tricornutum*	Antioxydant Anti-inflammatoire Antitumoral
	Chlorophylles	*Chl a* *Chl b*	*Toutes les microalgues* *Algues vertes*	Anti-inflammatoire Anticancéreux Antioxydant
	Phycobiliprotéines	Phycocyanine	*Aphanizomenon Flos-Aquae (Spiruline)*	Anti-inflammatoire Antioxydant Antiviral Anticancéreux
Protéines	Acides aminés		*Aphanizomenon Flos-Aquae (Spiruline)*	Nutrition
Lipides	Acides gras oméga-3	DHA EPA	*Schizochytrium sp.* *Ulkenia sp.*	Prévention des MCV Anti-inflammatoire Antioxydant
	Phytostérol	Campestérol	Chlorophyceae Prasinophyceae Bacillariophyceae Prymnesiophyceae	Antiangiogénique Anticancéreux Antioxydant Diminution du cholestérol
		β-sitostérol	Chlorophyceae Prasinophyceae Bacillariophyceae Prymnesiophyceae	Activité analgésique Anticancéreux Anti-inflammatoire Antimutagène
Vitamines	Vitamine E	α-tocophérol	*Dunaliella sp.*	Antioxydant
	Vitamine C	acide ascorbique	*Isochrysis sp.*	Antioxydant
	provitamine A	β-carotène	*Dunaliella salina*	Antioxydant

De par l'augmentation de la population mondiale, de la recherche d'aliments plus sains et de la volonté de réduire et/ou de remplacer les composés synthétiques par des composés naturels, l'Homme a recherché à exploiter de nouvelles ressources alimentaires pouvant apporter les nutriments nécessaires afin de préserver sa santé et de limiter sa détérioration (Naylor, 2016; Molino et al., 2018). Parmi ces ressources naturelles, les microalgues suscitent aujourd'hui un intérêt grandissant. Leur diversité et leur capacité à synthétiser de nombreux composés phytochimiques (lipides, protéines, pigments, vitamines…), connus pour leurs bienfaits sur la santé font d'elles, une source de composés bioactifs d'intérêt nutraceutique (**Tableau 11**).

Les pigments et les lipides font partie des composés majeurs produits par les microalgues (Le Goff et al., 2019a). L'intérêt récent pour ces lipides et ces pigments, particulièrement pour les caroténoïdes et les AGPI n-3 a été encouragé par des études épidémiologiques fournissant des preuves de leurs effets bénéfiques sur la santé (Krinsky and Johnson, 2005; Siriwardhana et al., 2012; Bohn, 2017; Ulmann et al., 2017).

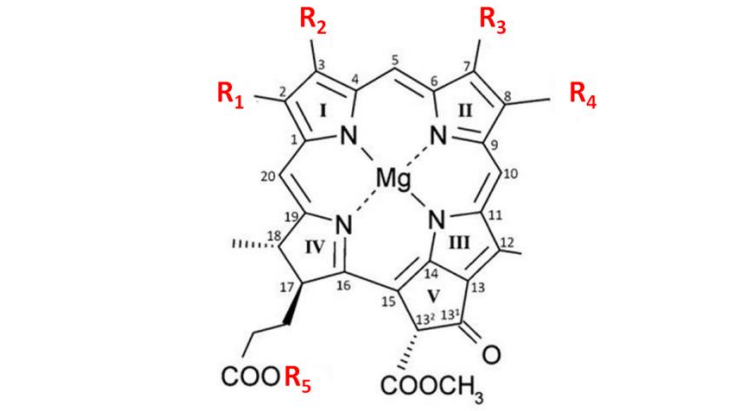
3.1. Les pigments

3.1.1. Les chlorophylles

Les chlorophylles (*Chl*) sont des pigments verdâtres présents dans toutes les plantes supérieures. Ces pigments sont localisés dans les chloroplastes des microalgues eucaryotes et jouent un rôle central dans la photosynthèse en absorbant et en transférant l'énergie lumineuse. Actuellement, cinq types de chlorophylles ont été identifiés: la *chl a*, *b*, *c*, *d* et *f* (**Figure 27**) (Christaki et al., 2015). La *chl a* est la chlorophylle la plus abondante. Elle est présente dans toutes les microalgues contrairement à la chlorophylle *b* qui est retrouvée chez les microalgues vertes. La *chl c* est présente dans les dinoflagellés, les haptophytes, les hétérokontes et les cryptophytes. La *chl d* a été identifiée dans les Rhodophyta et la *chl f* dans les cyanobactéries (da Silva Ferreira and Sant'Anna, 2017).

Les *chl* sont composées d'un cycle de porphyrine similaire à celui de l'hème dans l'hémoglobine, bien que l'atome central de la chlorophylle soit le magnésium (Mg^{2+}) au lieu du fer (**Figure 27**). Les *chl a* et *b* ont une structure de base commune. Elles se différencient par la composition de leur chaîne latérale R3 (*chl a :* –CH3; *chl b* : CHO). La *chl c* n'a pas de chaîne

latérale phytyle. Dans les algues brunes-dorées, il existe deux types de *chl c* : la *chl* c_1 et la *chl* c_2. Leurs structures se différencient par la composition de leur chaîne latérale R4 (*chl* c_1 : $–CH_2-CH_3$; *chl* c_2 : $–CH-CH_2$). En ce qui concerne la structure de la *chl d* et de la *chl f*, elles se distinguent de la *chl a* par la composition de leur chaîne latérale R2 (*chl a* :$-CH-CH_2$; *chl d* : CHO) et R1 (*chl a* :$-CH_3$; *chl f* : CHO) respectivement (Voloshin et al., 2015; Morançais et al., 2018).



Chlorophylle	R1	R2	R3	R4	R5
a	CH_3	$CH=CH_2$	CH_3	CH_2- CH_3	Phytyle
b	CH_3	$CH=CH_2$	CHO	CH_2- CH_3	Phytyle
c_1	CH_3	$CH=CH_2$	CH_3	CH_2- CH_3	H
c_2	CH_3	$CH=CH_2$	CH_3	$CH=CH_2$	H
d	CH_3	CHO	CH_3	CH_2- CH_3	Phytyle
f	CHO	$CH=CH_2$	CH_3	CH_2- CH_3	Phytyle

***Figure 27** : Formules structurelles des chlorophylles.*
(Adapté de Voloshin et al., 2015; Morançais et al., 2018).

3.1.2. Effets biologiques des chlorophylles sur la santé

Il a été rapporté que les chlorophylles et leurs dérivés (ex : phéophytines) pouvaient avoir des effets anti-inflammatoires, antioxydants et anticancéreux. Des extraits de *Spirulina maxima* (une cyanobactérie), riche en chlorophylles, ont inhibé l'expression et la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires (TNF-α, IL-6 et IL-1β) ainsi que la production de médiateurs de l'inflammation (NO : Oxyde Nitrique, PGE2 : Prostaglandine E2) dans les cellules microgliales de souris. Cette activité anti-inflammatoire a été corrélée avec la quantité élevée de

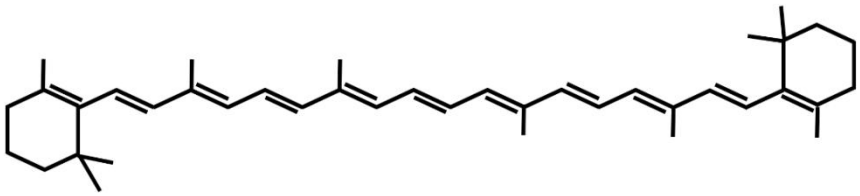
chlorophylle présente dans l'extrait (Choi et al., 2019a). Dans des cellules embryonnaires de rein humain (HEK293), les *chl a* et *b*, extraites de feuilles de *Streblus asper* Lour, un petit arbre tropical, ont inhibé l'expression du TNF-α et l'activation de NF-κB (Subramoniam et al., 2012). La phéophytine *a*, un dérivé de la chlorophylle *a*, extraite des feuilles de *Nelumbo nucifera* Gaertn (un lotus), a inhibé la transcription et la traduction de la COX-2, de iNOS (Inducible Nitric Oxide Synthase) ainsi que la sécrétion de NO, de PGE2 et d'IL-1β dans les macrophages de souris (Lin et al., 2014). Dans des cellules aortiques humaines, les *chl a* et *b,* extraites d'épinards, inhibent l'expression de VCAM1, d'ICAM-1 (InterCellular Adhesion Molecule-1), d'IL-8 et l'adhésion des cellules endothéliales aux monocytes induite par le TNF-α (Lin et al., 2013). Des extraits de la plante *Conyza triloba*, riche en chlorophylles, ont montré une capacité antioxydante ainsi qu'une activité antimutagène induit par l'azoture de sodium et de B[a]P dans *Salmonella typhimurium* (TA1535). De plus, ces extraits ont inhibé la prolifération cellulaire de plusieurs lignées cancéreuses humaines et murines (El-Sayed et al., 2013). Il a également été démontré un rôle de la chlorophylle dans la chimioprotection. Dans la truite arc-en-ciel, la supplémentation en chlorophylle extraite d'épinards, a inhibé la formation d'adduits à l'ADN et l'incidence des tumeurs dans l'estomac et dans le foie, induits par un HAP, le dibenzo[def,p]chrysène (McQuistan et al., 2012).

3.1.3. Les caroténoïdes

Les caroténoïdes appartiennent à la famille des terpénoïdes et comptent plus de 750 membres (Gateau et al., 2017). Ils existent deux types de caroténoïdes : les xanthophylles ou oxycaroténoïdes (ex : fucoxanthine), qui contiennent au moins un atome d'oxygène et les carotènes, dépourvus d'oxygène (ex : β-carotène) (**Figure 28**) (Mulders et al., 2014). Seuls 40 caroténoïdes sont consommés, les plus abondants étant : le β-carotène, le lycopène, la lutéine, la β-cryptoxanthine, l'α-carotène et la zéaxanthine. Les caroténoïdes présents dans les microalgues sont très diversifiés et dans de nombreux cas spécifiques des taxons. En effet, la lutéine, un xanthophylle typique des plantes supérieures, est retrouvée seulement dans Chrysophyta, Euglenophyta, Chlorarachniophyta, Chlorophyta et certains Rhodophyta (Takaichi, 2011; Pfeil et al., 2014). Les caroténoïdes absorbent la lumière visible dans la région violet-vert et sont composés de 30 à 50 carbones. Leur structure est caractérisée par un réseau étendu de doubles liaisons conjuguées formant le chromophore. Une des conséquences de la

présence de doubles liaisons est le nombre abondant d'isomères. Ainsi, les caroténoïdes peuvent adopter plusieurs configurations tridimensionnelles affectant leurs propriétés biologiques. En effet, les isomères *cis* de la fucoxanthine se sont révélés plus efficaces sur l'effet antiprolifératif dans diverses lignées cancéreuses humaines que tous les isomères *trans* (Nakazawa et al., 2009). Une autre conséquence du réseau étendu de doubles liaisons conjuguées réside dans leur capacité à agir comme antioxydants (Schoefs, 2002).

β-carotène



Fucoxanthine

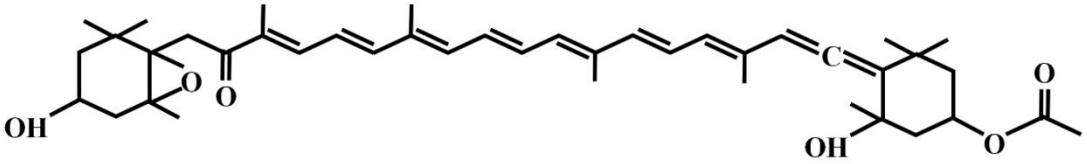


***Figure 28** : Structures chimiques du β-carotènes et de la fucoxanthine.*
(Adapté de Morançais et al., 2018; Le Goff et al., 2019a).

Au cours des dernières décennies, un ensemble de preuves a été accumulé pour soutenir l'association entre l'apport en caroténoïdes *via* l'alimentation et la réduction des risques de maladies telles que les cancers et les MCV (Rao and Rao, 2007). En effet, les caroténoïdes ont montré des effets antioxydants, anti-inflammatoires et anticancéreux. Ainsi, ils peuvent aider à maintenir un bon état sanitaire et prévenir l'apparition des pathologies. L'Homme étant incapable de synthétiser ces composés, ils doivent être acquis *via* l'alimentation. Parmi les caroténoïdes, le β-carotène et la fucoxanthine font partie des composés prometteurs en raison de leurs fonctions antioxydantes et de leur abondance dans les microalgues.

3.1.3.1. Les carotènes : β-carotène

Les carotènes sont des hydrocarbures polyinsaturés contenant 40 atomes de carbone par molécule et un nombre variable d'atomes d'hydrogène (**Figure 28**). Certains carotènes se terminent par des cycles hydrocarbonés sur l'une ou sur les deux extrémités de la molécule. Il existe deux carotènes majoritaires chez les microalgues : α-carotène et le β-carotène. Le β-carotène est présent dans toutes les classes de microalgues tandis que l'α-carotène est présent dans les Cryptophyta et Chlorophyceae (Morançais et al., 2018). Le β-carotène est un pigment liposoluble jaune orangé et un précurseur connu de la vitamine A. L'α-carotène se différencie du β-carotène par la position de doubles liaisons dans le cycle hydrocarboné.

3.1.3.2. La fucoxanthine

La fucoxanthine est un caroténoïde présent dans le chloroplaste de la plupart des algues appartenant aux Heterokontes (**Figure 28**). Dans l'appareil photosynthétique, la fucoxanthine est associée aux pigments et joue un rôle essentiel dans la capture des photons pour la photosynthèse. Comme tout caroténoïde, la fucoxanthine présente une chaîne polyène avec un carbonyle conjugué, un époxyde et un groupe hydroxyle. Cependant, elle est constituée d'une liaison allénique et de six atomes d'oxygène (**Figure 28**). Au total, ces caractéristiques confèrent à la fucoxanthine une forte capacité antioxydante ainsi qu'une couleur kaki, inhabituelle pour un caroténoïde (Le Goff et al., 2019a).

3.1.4. Effets biologiques du β-carotène et de la fucoxanthine sur la santé

3.1.4.1. Le β-carotène

Chez l'Homme, le β-carotène est la plus grande source de provitamine A (rétinol) et donc d'acide rétinoïque. Cette vitamine est essentielle pour le développement embryonnaire, la prolifération cellulaire, le bon fonctionnement du système immunitaire et la vision (Stahl and Sies, 2005). Le rétinol est l'activateur de nombreux facteurs de transcription tels que RXR/RAR (Retinoid X Receptor/Retinoic Acid Receptor) qui s'homodimérise avec d'autres facteurs de transcription comme les récepteurs à la vitamine D, PPARs (Peroxisome Proliferator-Activated Receptors) ou les récepteurs aux estrogènes (Dembinska-Kiec, 2005).

Outre l'intérêt du β-carotène comme source de provitamine A, il est connu pour ses capacités antioxydantes, anticancéreuses et anti-inflammatoires. Dans les macrophages de rat, un extrait de la microalgue *Dunaliella salina*, riche en trans-β-carotène et en 9-, 9'-cis-β-carotène, a inhibé la production de cytokines pro-inflammatoires IL-1β, IL-6 et TNF-α, l'expression des protéines iNOS et COX-2, et la sécrétion de NO et de PGE2 *via* l'inactivation de la voie NF-κB (Yang et al., 2013). Il a également été rapporté que le β-carotène réduisait l'angiogenèse. Des études menées *in vitro* et *in vivo* chez le rat ont montré une inhibition de la formation de nouveaux vaisseaux sanguins, en supprimant la prolifération et la migration cellulaires. De plus, l'expression des MMP-2 et MMP-9 ainsi qu'une diminution des taux d'IL-1β, d'IL-6 et du TNF-α a été observée (Guruvayoorappan and Kuttan, 2007). La supplémentation en poudre de *Dunaliella salina*, riche en β-carotène chez le rat, a protégé du stress oxydatif en augmentant l'activité d'enzymes antioxydantes telles que la catalase, la Superoxyde Dismutase (SOD) et la peroxydase dans le foie. La supplémentation en β-carotène naturel a montré une meilleure protection contre le stress oxydatif par rapport à une supplémentation en β-carotène synthétique (Murthy et al., 2005).

3.1.4.2. La fucoxanthine

Les effets anti-inflammatoires de la fucoxanthine ont été signalés *in vitro* et *in vivo* dans des modèles murins. La fucoxanthine inhibe la production de NO, de PGE2, d'IL-1β, d'IL-6, du TNF-α et l'expression des protéines iNOS et COX-2. Il semblerait que ces effets soient dus à l'inhibition des voies de signalisations NF-κB et MAPK, notamment *in vitro* (Shiratori et al., 2005; Kim et al., 2010). Il a également été rapporté que la fucoxanthine améliore la capacité antioxydante *in vivo* chez le rat. Dans le plasma, elle augmente les activités de la catalase, de la SOD et de la GPx (Gluthathion Peroxydase) ainsi que de l'expression en ARNm de NQO1 et de Nrf2 (Nuclear factor erythroid-2-related factor 2) (Ha et al., 2013).

La fucoxanthine aurait également des propriétés anticancéreuses. Ainsi, dans la lignée cellulaire de leucémie humaine HL-60, la fucoxanthine extraite d'*Undaria pinnatifida*, une algue brune, induit l'apoptose contrairement au β-carotène (Hosokawa et al., 1999). Il a été suggéré que l'induction de l'apoptose par la fucoxanthine serait le résultat d'une atteinte de la perméabilisation de la membrane mitochondriale suivie de l'activation des caspase-3 et -9 (Kotake-Nara et al., 2005). Dans le cancer de la prostate, sur différentes lignées humaines, la

néoxanthine et la fucoxanthine, extraites d'épinard et d'algues brunes respectivement, ont également induit l'apoptose, contrairement à d'autres caroténoïdes tels que la zéaxanthine (Kotake-Nara et al., 2001). De plus, il a été rapporté que la fucoxanthine et son métabolite, le fucoxanthinol[19], provoquent un arrêt du cycle cellulaire dans de nombreuses tumeurs humaines en modulant l'expression de molécules et de voies de signalisation telles que MAPK, AP-1 et NF-κB (Satomi, 2017). Ainsi dans des lignées cellulaires d'ostéosarcome, ils ont provoqué l'arrêt du cycle cellulaire en phase G1, en réduisant l'expression de CDK4, CDK6 (Cyclin-Dependent Kinase) et de la cycline E. La fucoxanthine et le fucoxanthinol ont également induit l'apoptose en réduisant l'expression protéique de la survivine, de XIAP (X-linked inhibitor of apoptosis protein), de Bcl-2 et de Bcl-x_L. L'apoptose qui en résulte a été associée à l'activation des caspase-3, -8 et -9 et à une inhibition de la voie Akt. De plus, le fucoxanthinol inhibe la migration et l'invasion cellulaire en inhibant l'activation d'AP-1 et en réduisant l'expression de MMP-1 (Rokkaku et al., 2013).

Outre l'activité de ce xantophylle et de son métabolite sur la migration et l'invasion cellulaires, il a été rapporté que la fucoxanthine, dans un essai *ex vivo* utilisant un anneau aortique de rat, induisait la suppression de la croissance des microvaisseaux de façon dose-dépendante (Sugawara et al., 2006). L'effet antiangiogénique de la fucoxanthine dans les cellules endothéliales serait dû à la suppression de l'expression en ARNm de FGF-2 et de son récepteur FGFR-1 ainsi que du facteur de transcription EGR-1 (Early Growth Response protein 1). De plus, ce caroténoïde régule négativement la phosphorylation des protéines de signalisation intracellulaires médiées par le FGF-2, telles que ERK1/2 (Extracellular signal-Regulated Kinase) et Akt (Ganesan et al., 2013).

3.2. Les acides gras polyinsaturés ω3 (AGPI ω3)

Les acides gras sont des acides carboxyliques à longues chaînes aliphatiques qui peuvent être linéaires ou ramifiées, saturées ou insaturées. Ils sont des composants structurels des phospholipides, des glycolipides et des TAG. Les acides gras contiennent généralement, un nombre pair de carbones, de 4 à 28 carbones (Mimouni et al., 2018). Leur

[19]Fucoxanthinol : La fucoxanthine ingérée est hydrolysée en fucoxanthinol par des enzymes digestives gastro-intestinales telles que la cholestérol estérase et la lipase. Il pénètre ensuite dans la circulation systémique et est acheminé jusqu'au foie où il est dégradé en amarouciaxanthine A.

classification s'effectue selon le nombre de doubles liaisons : les acides gras saturés (AGS) sans double liaison ; les acides gras monoinsaturés (AGMI) avec une double liaison et les acides gras polyinsaturés (AGPI) avec au moins deux doubles liaisons (**Figure 29**). Les AGPI sont classés en acides gras oméga-3 (ω3) ou oméga-6 (ω6) en fonction de la position de la première double liaison par rapport à l'extrémité méthyle terminale de la chaîne carbonée. Dans les acides gras insaturés, les doubles liaisons sont séparées par des groupes méthylène (Kumari et al., 2013). Cependant, il existe des exceptions chez les microalgues comme l'acide octadécatriénoïque (acide picolinique, $18:3^{\Delta 5,9,12}$) et l'acide octadécatétraénoïque (acide coniféronique, $18:4^{\Delta 5,9,12,15}$) dans *Chlamydomonas reinhardtii* (Kajikawa et al., 2006).

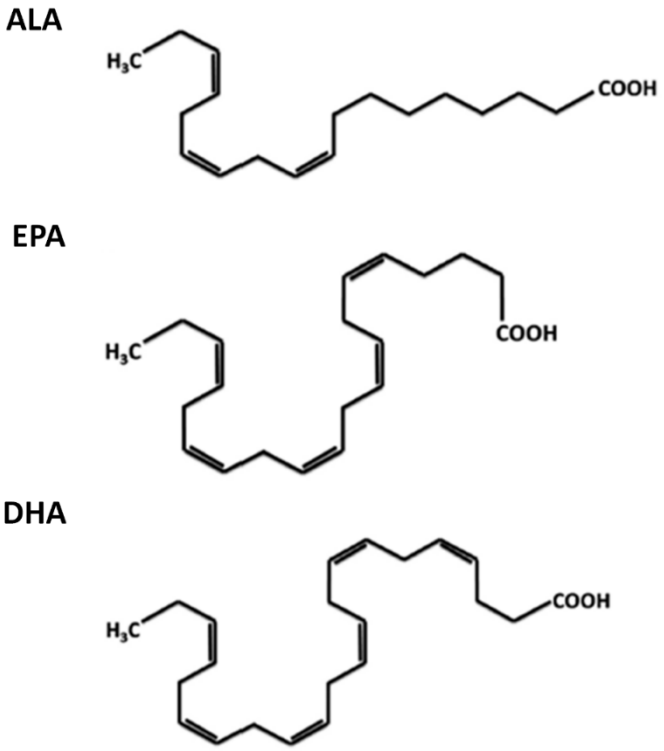


***Figure 29** : Principaux acides gras polyinsaturés ω3 des microalgues.*
ALA : acide α-linolénique (18:3 ω3) ; EPA : acide eicosapentaénoïque (20:5 ω3) ; DHA : acide docosahexaénoïque (22:6 ω3). (Issue de Ulmann et al., 2017).

Les acides gras sont indispensables à tous les organismes vivants qui en ont besoin pour leur santé et leur survie. Chez l'Homme, ils existent deux acides gras dits essentiels : l'acide linoléique (C18:2 ω6) et l'acide α-linoléique (ALA, C18:3 ω3). Ces acides gras essentiels, ne sont pas synthétisés par l'Homme. Ils doivent donc être apportés par son alimentation (huiles végétales, graines, céréales, poissons). L'ALA est le précurseur des acides gras de la famille des ω3, incluant l'EPA (20:5 ω3) et le DHA (22:6 ω3) (**Figure 29**). Chez l'Homme, la

synthèse de ces deux AGPI est trop faible pour couvrir ses besoins. En effet, les désaturases nécessaires à la synthèse de l'EPA et du DHA sont également impliquées dans la synthèse des acides gras de la famille des ω6. Il existe donc une concurrence entre les deux voies de synthèse des acides gras. Le taux de conversion de ALA en EPA est de 5 à 8% et inférieur à 0,5% pour le DHA (Plourde and Cunnane, 2007). Un apport de ces deux AGPI par l'alimentation est donc conseillé. Ces deux molécules sont retrouvées dans les poissons qui accumulent les AGPI en se nourrissant de microalgues riches en lipides (Galasso et al., 2019).

Tableau 12 *: Teneur totale en lipides, EPA et DHA de certaines espèces de microalgues. Teneur totale en lipides : % du poids sec ; Teneur en EPA et DHA : pourcentage molaire. (Adapté de Mimouni et al., 2012).*

Classes	Espèces	Teneur en lipides	EPA	DHA
Chlorophyceae	*Tetraselmis suecica*	15-23	1-5	<1
	Chlorella Chlorophyceae sp.	28-32	1-5	<1
	Dunaliella primolecta	23	<1	<1
Prymnesiophyceae	*Isochrysis sp.*	25-33	<1	10-20
	Pavlova lutheri	20-25	>20	10-20
Bacillariophyceae	*Skeletonema costatum*	13	10-20	1-5
	Thalassiosira pseudonana	24	15	1
	Odontella aurita	7-13	>25	1-2
	Phaeodactylum tricornutum	20-30	26	2
	Nitzschia sp.	45-47	25-30	<1
Dinophyceae	*Crypthecodinium cohnii*	20	45	<1
Rhodophyceae	*Porphyridium cruentum*	10-15	21	<1
Autre	*Schizochytrium sp.*	50-77	>10	>22

Les lipides contenus dans les microalgues représentent jusqu'à 80% de leur poids sec et sont majoritairement sous forme de Triacylglycérols (TAG) (Sun et al., 2018). Les microalgues sont la source primaire d'AGPI. Elles ont l'avantage d'être une source naturelle alternative aux ressources halieutiques qui s'amenuisent avec la pêche intensive. La culture des microalgues peut être contrôlée (en bioréacteur) permettant ainsi d'optimiser leur

production en lipides et d'éviter leur contamination par des métaux lourds (mercure, cuivre) ou par des polluants de l'environnement (TCDD, HAP) retrouvés chez les poissons (Scott D. Doughman et al., 2007). La majorité des microalgues marines contiennent de l'EPA et du DHA contrairement aux microalgues d'eau douce, qui produisent en grande quantité l'ALA, à l'exception de *Monodus subterraneus* qui synthétise de l'EPA (Barnathan, 2007; Bosma et al., 2008). Cependant, la teneur et la composition en acides gras produits par les microalgues dépendent des conditions de culture (température, lumière, nutriment) et de l'espèce (Ulmann et al., 2017; Mimouni et al., 2018). Ainsi, le rapport EPA/DHA est très variable d'une microalgue à l'autre (**Tableau 12**).

3.2.1. Effets biologiques du DHA et de l'EPA sur la santé

Les AGPI exercent de multiples fonctions physiologiques au niveau de l'organisme. Ils jouent notamment un rôle important dans la structure des membranes cellulaires. L'acide arachidonique (C20:4 ω6), l'acide linoléique (C18:2 ω6) et le DHA sont des constituants fondamentaux des phospholipides membranaires. Ainsi, la teneur et la composition en AGPI dans les membranes influencent leurs propriétés physico-chimiques (fluidité, dynamique et perméabilité membranaires). Une modification de la fluidité membranaire par un changement de sa composition en acides gras peut entraîner des changements fonctionnels des protéines membranaires telles que des enzymes, des récepteurs ou des canaux ioniques impliqués dans de nombreuses voies de signalisation cellulaire. L'EPA et le DHA sont également des précurseurs d'eicosanoïdes tels que les prostaglandines (série 3), les leucotriènes (série 5), les thromboxanes (série 3), la neuroprotectine D1 et les résolvines (série E et D). Ces eicosanoïdes présentent des propriétés anti-inflammatoires, antiarythmiques, vasodilatatrices et inhibitrices de l'activation plaquettaire (Schmitz and Ecker, 2008; Wiktorowska-Owczarek et al., 2015).

Les AGPI ω3 et plus particulièrement le DHA, sont des composants structurels importants du cerveau et de la rétine humaine. Dans le cortex cérébral, le DHA représente environ 15 à 20% des acides gras totaux et 30 à 60% dans la rétine (Barnathan, 2007). Au cours du développement du fœtus et du nourrisson, le cerveau et la rétine s'enrichissent en DHA. Dans le cerveau, cette accumulation se déroule essentiellement au cours du troisième trimestre de la grossesse et se poursuit dans les deux premières années de vie de l'enfant. Le

niveau élevé de DHA est alors maintenu dans le cerveau tout au long de la vie (Cetin et al., 2009; Lauritzen et al., 2016). Pendant la grossesse, le placenta transfère les nutriments, y compris le DHA, de la mère au fœtus. La quantité d'AGPI ω3 retrouvée dans le fœtus est corrélée avec la quantité d'AGPI ω3 ingérée par la mère (Dunstan et al., 2008). Il est donc essentiel que l'apport en AGPI ω3 chez la mère soit suffisant pour le bon développement du fœtus. Le DHA et son précurseur l'EPA sont largement reconnus pour leur impact bénéfique sur le développement neurologique du fœtus et du nourrisson.

Chez le rat, le déficit en AGPI ω3 lors de la gestation altère la neurogenèse dans le fœtus. Cette carence modifie la taille des hémisphères cérébraux notamment par réduction de la couche corticale de l'hippocampe et en particulier du gyrus dentelé ainsi qu'une augmentation de l'épaisseur de la zone ventriculaire corticale (Coti Bertrand et al., 2006). Chez le raton une carence en DHA, de la gestation jusqu'à son sevrage, a entraîné une diminution de la taille des neurones dans l'hippocampe, l'hypothalamus et le cortex pariétal ainsi qu'une diminution de près de 88% du DHA dans le cerveau (Ahmad et al., 2002). De plus, une alimentation déficiente en AGPI ω3 entraîne une modification des systèmes de neurotransmissions notamment des systèmes dopaminergiques et sérotoninergiques (Chalon, 2006). Chez l'Homme, il semblerait qu'une supplémentation en DHA pendant la grossesse augmente les fonctions cognitives chez le nourrisson. En effet, une supplémentation en DHA (1,5 g par semaine) pendant la grossesse augmente les performances des nourrissons à l'âge de neuf mois par rapport aux enfants ayant reçu un placebo (Judge et al., 2007). Il a également été montré que la supplémentation en huile de poisson (2200 mg de DHA et 1100 mg d'EPA) à partir de la 20ème semaine de grossesse jusqu'à la naissance, améliore la coordination des mains et des yeux chez les enfants à l'âge de deux ans et demi (Dunstan et al., 2008). Une supplémentation en DHA à raison de 600 mg/jour durant les deux derniers trimestres de la grossesse jusqu'à la naissance, a permis d'augmenter les capacités attentionnelles des nourrissons âgés de 4, 6 et 9 mois (Colombo et al., 2016).

Dans les années 70, un intérêt considérable est apparu pour les AGPI ω3 suite aux résultats d'études épidémiologiques montrant que les Eskimos du Groenland avaient des taux réduits d'infarctus du myocarde par rapport aux individus des pays occidentaux. Il a été observé qu'un apport alimentaire élevé d'AGPI ω3 (poissons gras et mammifères marins) augmentait le taux plasmatique d'AGPI ω3 et réduisait les TAG à jeun (Bang et al., 1971;

Dyerberg et al., 1975; Dyerberg, 1978). De par leur composition riche en AGPI ω3, les microalgues suscitent aujourd'hui un grand intérêt dans la prévention des maladies cardiovasculaires (**Tableau 12**). Le DHA et l'EPA affectent l'hyperlipidémie en abaissant les niveaux de lipides plasmatiques tels que les TAG et le cholestérol total, réduisant ainsi le risque de maladies cardiovasculaires telles que l'athérosclérose. Chez le rat atteint d'une dyslipidémie, une supplémentation de la microalgue *Odontella aurita,* riche en EPA entraîne une diminution de la glycémie, des taux de lipides dans le plasma et le foie. Une diminution de l'agrégation plaquettaire et du stress oxydant par des niveaux de malondialdéhyde plus faibles et une augmentation du glutathion ont également été observés (Haimeur et al., 2012). Une supplémentation de la microalgue *Phaeodactylum tricornutum*, riche en EPA, chez le rat atteint de syndrome métabolique, a conduit à un enrichissement d'AGPI ω3 dans le foie, le plasma et les érythrocytes. Le cholestérol total, les TAG et le taux de cytokines pro-inflammatoires plasmatiques (TNF-α, IL-6) ont été diminués contrairement à la cytokine anti-inflammatoire IL-10 (Mayer et al., 2019). Chez l'Homme, il a été démontré que le DHA contenu dans l'huile extraite d'algues était capable de réduire les TAG sanguins et d'augmenter le cholestérol HDL et le cholestérol LDL (Low Density Lipoprotein). Ces données démontrent que l'utilisation d'huile issue d'algues riches en DHA pourrait réduire le risque de facteurs impliqués dans les maladies cardiovasculaires (Bernstein et al., 2012). Chez l'Homme atteint d'hypertriglycéridémie, une supplémentation durant 45 jours en DHA issue de la microalgue *Crypthecodinium cohnii*, a diminué la concentration des TAG à jeun et du nombre de petites particules denses de LDL (Kelley et al., 2007).

Cadre et objectifs

L'Homme est continuellement exposé à une multitude de xénobiotiques, dont des contaminants de l'environnement. Bon nombre d'entre eux sont impliqués directement ou indirectement dans la survenue et/ou l'aggravation de cancers et de maladies cardiovasculaires. Parmi ces molécules chimiques, les hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP) présents de manière ubiquitaire dans notre environnement, représentent une classe majeure de polluants toxiques. L'élimination complète des expositions à ces polluants environnementaux, produits de manière naturelle ou anthropique, est techniquement irréalisable. L'exposition de l'Homme à ces polluants toxiques est donc inévitable, notamment en raison de la contamination des aliments. Par conséquent, il est fondamental d'identifier de nouveaux biomarqueurs d'exposition et/ou d'effets fiables et de proposer de nouvelles stratégies afin de prévenir les effets toxiques de ces contaminants de l'environnement.

C'est dans ce contexte que l'équipe 3, Stress Membrane et Signalisation (SMS), de l'Irset a développé son axe n°2 de recherche. Cet axe 2 a pour objectif d'identifier des biomarqueurs précoces très faiblement invasifs de risque de cancer hépatique et d'autres maladies, telles que les maladies cardiovasculaires, liées à l'exposition aux polluants de l'environnement. En effet, il est connu que les HAP peuvent entraîner la mort des hépatocytes. Or, la prolifération compensatoire qui en découle et l'agression répétée de ces cellules participent à la genèse de tumeurs hépatiques. Il est donc fondamental d'identifier des biomarqueurs d'un risque accru d'apparition de ces cancers. Ainsi, la première approche de l'Axe 2, est d'étudier l'impact des contaminants environnementaux sur la production de VE par les cellules hépatiques. Cependant, le foie, par ses fonctions d'épuration, de synthèse et de stockage présente une structure complexe et particulière. Les hépatocytes et les cellules parenchymateuses sont organisés en travées autour de capillaires sinusoïdes. Les cellules endothéliales constituant leur paroi sont des cibles privilégiées pour les HAP et sont l'une des sources des VE sanguines. C'est ainsi que la seconde approche de l'Axe 2 a été mise en place, afin d'étudier l'impact des contaminants environnementaux sur la production de VE par les cellules endothéliales.

L'équipe MIMMA du laboratoire Mer, Molécules, Santé (MMS) étudie l'effet d'extraits de microalgues naturelles ou modifiées afin d'évaluer leur potentielle utilisation en nutrition-santé humaine. Ainsi, dans le cadre de la recherche de nouvelles stratégies de prévention des

effets toxiques des contaminants de l'environnement, nous nous sommes intéressés à l'effet protecteur potentiel d'extraits de microalgues. Les microalgues marines sont connues pour être une source de molécules bioactives issues de leur propre métabolisme (AGPI, pigments, lipides). Certains de ces sous-produits ont démontré un intérêt potentiel pour la santé humaine, notamment avec des propriétés anti-inflammatoires, anticancéreuses et préventives des maladies cardiovasculaires (MCV).

Durant cette thèse, j'ai participé à la mise en place et au développement de la seconde approche de l'axe 2, de l'équipe 3 SMS. Le premier objectif a été d'étudier l'influence des HAP et particulièrement, du prototype, le B[a]P sur la production des VE par les cellules endothéliales HMEC-1. Les travaux réalisés dans ce cadre ont été publiés dans un premier article (Le Goff et al., 2019b) montrant que les HAP stimulent à la fois la production des vésicules extracellulaires, *in vitro* dans les cellules endothéliales et *in vivo*, dans les urines de rats.

Le deuxième objectif a été d'explorer les effets potentiels d'extraits de microalgues contre la toxicité induite par les polluants de l'environnement. Les travaux réalisés dans ce cadre ont débouché sur un second article (Le Goff et al., 2019c) montrant les effets protecteurs de deux extraits de microalgues (*Ostreococcus tauri* et *Phaeodactylum tricornutum*) sur la toxicité induite, *in vitro*, par le B[a]P dans les cellules endothéliales.

Cette thèse a été réalisée au laboratoire Mer Molécules Santé (MMS), IUML CNRS 3473 EA 2160, à Laval et à l'Institut de recherche en santé environnement et travail (Irset), UMR INSERM U1085, à Rennes. Elle a été soutenue financièrement par une bourse doctorale des Collectivités Locales Mayennaises et par le programme Environnement-Santé-Travail de l'ANSES avec le financement de l'ITMO cancer dans le cadre du Plan Cancer 2014-2019 (EST-2016/1/31).

Résultats

Les résultats obtenus lors de cette thèse sont présentés sous la forme de deux articles :

- **Article 1** : PAHs increase the production of extracellular vesicles both *in vitro* in endothelial cells and *in vivo* in urines from rats (article publié dans Environmental pollution).

- **Article 2** : Protective Action of Ostreococcus tauri and Phaeodactylum tricornutum Extracts towards Benzo[a]Pyrene-Induced Cytotoxicity in Edothelial Cells (article publié dans Marine Drugs).

Article n°1 :

PAHs increase the production of extracellular vesicles both *in vitro* in endothelial cells and *in vivo* in urines from rats

Manon Le Goff, Dominique Lagadic-Gossmann, Rémi Latour, Normand Podechard, Nathalie Grova, Fabienne Gauffre, Soizic Chevance, Agnès Burel, Brice Appenzeller, Lionel Ulmann, Odile Sergent, Eric Le Ferrec.

Environmental Pollution. 2019 Sep, 255: 113171. doi: 10.1016/j.envpol.2019.113171

Dans le cadre de la recherche de biomarqueurs précoces très faiblement invasifs de risque de pathologies associées à l'exposition aux HAP, nous avons étudié l'influence des HAP et plus particulièrement du B[a]P sur la production de vésicules extracellulaires (VE), par une approche *in vitro*, en utilisant la lignée cellulaire endothéliale humaine HMEC-1 et par une approche *in vivo*, en utilisant des échantillons d'urine de rats exposés aux HAP.

Afin de savoir si le B[a]P est capable de moduler la production des VE par les cellules endothéliales HMEC-1, nous avons exposé les cellules à différentes concentrations de B[a]P de 0 à 10 000 nM durant 24 h et à 100 nM durant 2 h à 24 h. Les VE totales ont été isolées par ultracentrifugation, leur nombre ainsi que leur taille ont été analysés par Nanoparticle tracking analysis (NTA). L'analyse au NTA a révélé que le B[a]P stimulait significativement la production de VE à partir de 100 nM de B[a]P et après 12h de traitement. Sachant que les cellules sont capables de libérer une population hétérogène de diamètres variables et de processus de biogenèse différents, nous avons évalué l'effet du B[a]P à la fois sur la production de grandes vésicules (L-VE) et de petites vésicules (S-VE). Les populations des S-VE et des L-VE obtenues avaient des diamètres moyens de 160,1 nm et de 295,8 nm respectivement. L'exposition au B[a]P (100 nM, 24 h) a augmenté à la fois la production des S-VE et des L-VE. Par la suite, nous avons caractérisé les S-VE et les L-VE isolées afin de déterminer si dans nos conditions expérimentales les sous-populations de VE correspondaient aux exosomes (EXO) et aux microvésicules (MV) respectivement. L'analyse en microcopie électronique à transmission (MET) a révélé que les deux sous-populations ont des diamètres correspondant aux EXO et MV ainsi que des structures caractéristiques en forme de cupules. L'analyse par western-blot a révélé une absence de lamine A/C dans les deux sous-populations excluant ainsi une possible contamination par du matériel nucléaire. En revanche, les protéines traditionnellement observées à la fois dans les EXO et les MV telles que la cavéoline-1, la flotilline-1, la β-actine et la TSG101 ont été détectées dans les S-VE et les L-VE. Le CD63, une protéine décrite comme étant plus spécifique des EXO, a été détecté dans les S-VE. Par cytométrie en flux, le marquage à l'annexine V, une protéine possédant une forte affinité pour la phosphatidylsérine présente au niveau du feuillet externe des MV, a révélé que 70% des L-VE étaient positifs à l'annexine V. Parallèlement à la caractérisation de deux sous-populations de VE, nous avons cherché à savoir si la composition des VE était affectée par l'exposition au B[a]P. L'analyse densitométrique a ainsi révélé que la présence de la cavéoline-1 et de

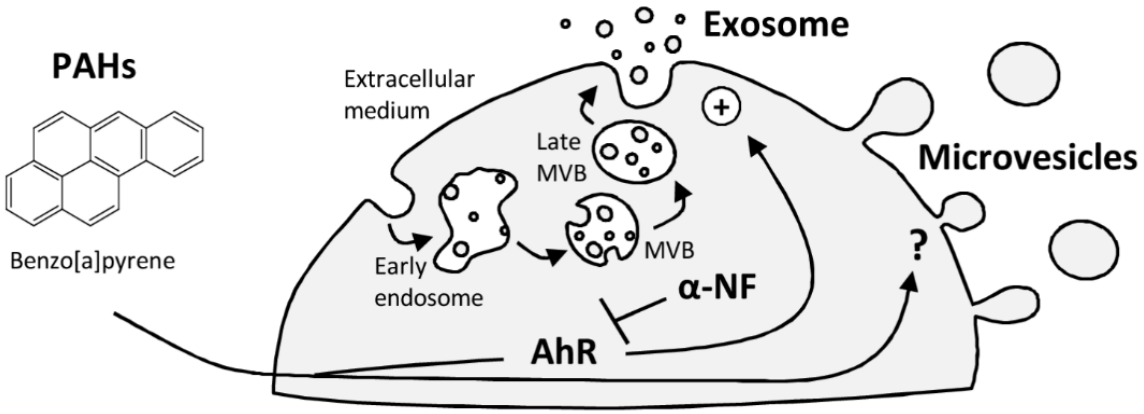
flotilline-1 était augmentée dans les S-VE en présence de B[a]P. Cet effet n'est pas de nature transcriptionnelle car dans les cellules nous n'avons pas observé de variations du taux d'ARNm des protéines étudiées. Dans l'ensemble ces observations indiquent que nos conditions expérimentales ont permis d'isoler les S-VE et L-VE correspondant à des populations enrichies en EXO et MV respectivement et que le B[a]P peut influencer la composition des exosomes produits par les cellules endothéliales.

Afin de déterminer les mécanismes impliqués dans la production de VE après exposition au B[a]P, nous avons décidé de concentrer notre attention sur l'activation de AhR, le signal calcique et l'apoptose. Tout d'abord, nous avons évalué le potentiel d'activation de AhR avec différents HAP (B[a]A, B[a]P, DBA, B[e]P, PYR) en étudiant l'induction de gènes cibles connus de AhR, le CYP1A1 et le CYP1B1. Comme attendu, seuls les B[a]A, B[a]P et DBA (ligands de AhR) ont induit l'expression en ARNm du CYP1A1 et du CY1B1. Les autres HAP testés (B[e]P et PYR), connus pour leur très faible affinité pour AhR, n'ont pas réussi à modifier l'expression des CYP dans notre modèle cellulaire. De plus, seuls les ligands possédant une forte affinité pour AhR ont été capables de stimuler la production de VE. Ceci nous a conduit à émettre l'hypothèse que AhR était impliqué dans la surproduction de VE lors de l'exposition au B[a]P. Pour tester cette hypothèse, nous avons ensuite étudié les effets d'un antagoniste de AhR, l'α-Naphtaflavone (α-NF), sur la production de S-VE et L-VE induit par le B[a]P. L'α-NF a inhibé la production de S-VE, mais pas celle des L-VE, induite par le B[a]P. Il semblerait que l'activation de AhR serait impliquée dans la production des S-VE induite par B[a]P mais pas dans la production des L-VE, suggérant ainsi des mécanismes différents. Concernant l'influence des HAP sur la concentration calcique intracytosolique ($[Ca^{2+}]_i$), nous n'avons pas trouvé de corrélation entre la capacité des HAP à augmenter le $[Ca^{2+}]_i$ et l'augmentation de la production de VE. Par conséquent, le signal calcique précoce induit par les HAP n'est probablement pas impliqué dans la surproduction de VE, quel que soit le type de VE considéré. Au niveau de l'apoptose, seul le B[a]P à faiblement (<5%) augmenté le pourcentage de cellules apoptotiques. Autrement dit, comme pour le signal calcique, il ne semble pas y avoir de corrélation entre la capacité des HAP à induire l'apoptose et leur capacité à augmenter la production de VE par les cellules HMEC-1.

Les VE étant présentes dans tous les fluides biologiques, dont l'urine, nous avons décidé d'étudier l'effet *in vivo* d'un mélange des 16 HAP répertoriés comme «prioritaires» par

l'US-EPA, sur la quantité de VE dans des échantillons d'urine de rats fournis par le Luxembourg Institute of Health (collaboration avec le Dr. Nathalie Grova). Les résultats obtenus *in vivo* ont confirmé nos résultats *in vitro*. En effet, l'exposition des rats, durant 90 jours à 0,8 mg/kg, au mélange de HAP, a entraîné une augmentation du nombre de VE dans les urines sans modification significative des fonctions rénales, déterminées par la mesure de la diurèse et de la filtration glomérulaire (clairance de la créatine).

Au total, nous démontrons que certains HAP provoquent une surproduction de VE. Même si nos résultats *in vivo* corroborent nos résultats *in vitro*, il est important de préciser que l'influence des HAP dépend du type de HAP, du modèle cellulaire et que AhR n'est probablement pas la seule voie de signalisation impliquée. Alors que le PYR n'a aucun effet sur la production de VE par les cellules HMEC-1, il stimule celle les hépatocytes *via* un mécanisme Constitutif Androstane Receptor (CAR)- dépendant. Une analyse par qPCR a révélé que les cellules HMEC-1 ne possédaient pas d'ARNm codant ce récepteur. CAR est donc un élément clé dans la production de VE par les hépatocytes en réponse à une exposition au PYR. Au total, ces résultats suggèrent que les vésicules extracellulaires pourraient être particulièrement utiles pour surveiller l'exposition aux HAP, et plus particulièrement au B[a]P, considéré comme un HAP de référence, et pour détecter la réponse cellulaire précoce associée avant les dommages aux organes cibles.



Résumé graphique :

***Figure 30** : Résumé graphique "PAHs increase the production of extracellular vesicles both in vitro in endothelial cells and in vivo in urines from rats".*
(Issue de Le Goff et al., 2019b).

Environmental Pollution 255 (2019) 113171

Contents lists available at ScienceDirect

Environmental Pollution

journal homepage: www.elsevier.com/locate/envpol

PAHs increase the production of extracellular vesicles both *in vitro* in endothelial cells and *in vivo* in urines from rats

Manon Le Goff [a, b], Dominique Lagadic-Gossmann [a], Remi Latour [a], Normand Podechard [a], Nathalie Grova [e, f], Fabienne Gauffre [c], Soizic Chevance [c], Agnès Burel [d], Brice M.R. Appenzeller [g], Lionel Ulmann [b], Odile Sergent [a], Eric Le Ferrec [a, *]

[a] Univ Rennes, Inserm, EHESP, Irset (Institut de recherche en santé environnement et travail) – UMR_S 1085, F-35000, Rennes, France
[b] EA 2160 Mer Molécules Santé – MIMMA, IUML FR-3473 CNRS, Le Mans Université, Laval, F-53020, France
[c] Univ Rennes, CNRS, ISCR (Institut des Sciences Chimiques de Rennes) – UMR_6226, F-35000, Rennes, France
[d] Univ Rennes, Biosit – UMS 3480, US_S 018, F-35000, Rennes, France
[e] Immune Endocrine Epigenetics Research Group, Department of Infection and Immunity-Luxembourg Institute of Health, 29 rue Henri Koch, L-4354, Esch-sur-Alzette, Luxembourg
[f] Calbinotox, Faculty of Science and Technology-Lorraine University, Campus Aiguillettes, B.P. 70239, F-54506, Vandoeuvre-lès-Nancy, France
[g] Human Biomonitoring Research Unit, Luxembourg Institute of Health, 1 A-B Thomas Edisson, Luxembourg

ARTICLE INFO

Article history:
Received 12 June 2019
Received in revised form
2 September 2019
Accepted 3 September 2019
Available online 10 September 2019

This paper has been recommended for acceptance by Wen Chen

Keywords:
Polycyclic aromatic hydrocarbons
Aryl hydrocarbon receptor
Endothelial cells
Urine
Extracellular vesicles
Exosomes
Microvesicles
Large EVs
Small EVs

ABSTRACT

Environmental contaminants, to which humans are widely exposed, cause or worsen several diseases, like cardiovascular diseases and cancers. Among these molecules, polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) stand out since they are ubiquitous pollutants found in ambient air and diet. Because of their toxic effects, public Health agencies promote development of research studies aiming at increasing the knowledge about PAHs and the discovery of biomarkers of exposure and/or effects.

Extracellular vesicles (EVs), including small extracellular vesicles (S-EVs or exosomes) and large extracellular vesicles (L-EVs or microvesicles), are delivery systems for multimolecular messages related to the nature and status of the originating cells. Because they are produced by all cells and detected within body fluids, EV releases could act as cell responses and thereby serve as biomarkers.

To test whether EVs can serve as biomarkers of PAHs exposure, we evaluate the effects of these pollutants on EV production using an *in vitro* approach (human endothelial cell line, HMEC-1) and an *in vivo* approach (urine samples from PAHs-exposed rats). Our study indicates that, i) PAH exposure increases *in vitro* the EV production by endothelial cells and *in vivo* the release of EVs in urine, and that the stimulating effects of PAHs concern both S-EVs and L-EVs; ii) PAH exposure and more particularly exposure to B[a]P, can influence the composition of exosomes produced by endothelial cells; iii) the aryl hydrocarbon receptor, a cytosolic receptor associated to most deleterious effects of PAHs, would be involved in the PAH effects on the release of S-EVs, but not L-EVs.

These results suggest that EVs may have utility for monitoring exposure to PAHs, and more particularly to B[a]P, considered as reference PAH, and to detect the related early cellular response prior to end-organ damages.

© 2019 Elsevier Ltd. All rights reserved.

Abbreviations: AhR, aryl hydrocarbon receptor; AM, acetoxymethyl ester; Annexin V-PE, Annexin V-phycoerythrin; ARNT, aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator; B[a]A, benz[*a*]anthracene; B[a]P, benzo[*a*]pyrene; B[e]P, benzo[*e*]pyrene; $[Ca^{2+}]_i$, intracellular calcium concentration; CVD, cardiovascular diseases; CYP, cytochrome; DBA, dibenz[*a,h*]anthracene; DMSO, dimethyl sulfoxide; DTT, dithiothreitol; EVs, extracellular vesicles; FBS, fetal bovine serum; HMEC-1, Human microvascular endothelial cell-line 1; L-EVs, large extracellular vesicles; MVB, multivesicular bodies; NTA, nanoparticle tracking analysis; PAHs, polycyclic aromatic hydrocarbons; PBS, phosphate-buffered saline; PFA, paraformaldehyde; PYR, pyrene; RT-PCR, real-time quantitative PCR; SDS-PAGE, sodium dodecyl sulfate–polymerase gel electrophoresis; S-EVs, small extracellular vesicles; TEM, transmission electron microscopy; uEVs, urinary EVs; US-EPA, United States Environmental Protection Agency; WHO, World Health Organization; XREs, xenobiotic responsive elements; α-NF, alpha-naphthoflavone.

* Corresponding author. UMR Inserm U1085 / IRSET, University of Rennes 1, Faculty of Pharmacy, 2 av. Pr. Léon Bernard, 35043, Rennes, France.
E-mail address: eric.leferrec@univ-rennes1.fr (E. Le Ferrec).

https://doi.org/10.1016/j.envpol.2019.113171
0269-7491/© 2019 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

Nowadays, there is broad consensus regarding the fact that our environmental health markedly depends on the impact of environmental contaminants to which humans are widely exposed (Remoundou and Koundouri, 2009), especially *via* diet and ambient air. Most of these chemicals, such as heavy metals, persistent organic pollutants and biocides, come from anthropogenic activities. They are known to cause or worsen several diseases, like cardiovascular diseases (CVD), immune dysfunctions and cancers (Ferronato and Torretta, 2019). Among these molecules, polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) stand out since they are ubiquitous pollutants notably found in ambient air and diet. They are involved in the occurrence of human CVDs, and exhibit immunotoxic, mutagenic, and carcinogenic properties (Bansal and Kim, 2015). Most deleterious effects of PAHs are related to their binding to the aryl hydrocarbon receptor (AhR), a cytosolic ligand-activated transcription factor. PAH binding to this receptor triggers a canonical genomic pathway with the nuclear translocation of AhR followed by its interaction with aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator (ARNT), thus allowing its binding to specific genomic elements termed xenobiotic responsive elements (XREs). XREs are found in the promoter of PAHs-responsive genes, such as cytochromes P-450 (CYP) 1A1 and 1B1, that are known carcinogen bioactivating enzymes. AhR activation also triggers several non-genomic pathways, including intracellular calcium signaling and tyrosine kinase SRC activation (Haarmann-Stemmann et al., 2009; Larigot et al., 2018). The United States Environmental Protection Agency (US-EPA) as well as the World Health Organization (WHO) consider some of PAHs as priority pollutants due to their critical effects on human health (Bruzzoniti et al., 2010). This has led to the development of research studies aiming at increasing the knowledge about these molecules and the discovery of biomarkers of exposure and/or effects.

During the last decade, extracellular vesicles (EVs) have drawn an increasing attention in the field of biomarkers of diseases or exposure to xenobiotics (Benedikter et al., 2018; Conde-Vancells et al., 2010; Rak, 2013; Soekmadji and Nelson, 2015; Wang et al., 2013). Theoretically produced by all cells, EVs, including small extracellular vesicles (S-EVs or exosomes) and large extracellular vesicles (L-EVs or microvesicles), are delivery systems for multimolecular messages closely related to the nature and status of originating cells (Bebelman et al., 2018; Maas et al., 2017). These cellular nanostructures are differentiated by their size (S-EV: less than 200 nm, L-EV: less than 1000 nm), their biogenesis processes (S-EV: generated within endosomal compartments, L-EV: budding from the plasma membrane) and by their components (lipids, proteins, DNAs, mRNAs, miRNAs …) (Hartjes et al., 2019). EVs allow intercellular communication and consequently are involved in many biological processes such as cell maintenance and proliferation, tissue repair, angiogenesis … They have been detected within body fluids (i.e. blood, urine, lymph, saliva …) in healthy humans but also in patients (Bayraktar et al., 2017; Jaiswal and Sedger, 2019). In this latter case, EV production is exacerbated and their content altered. Such alterations notably occur during cancer, metabolic, neurodegenerative or CVDs (Curtis et al., 2013; Martínez and Andriantsitohaina, 2017).

The EV overproduction is also observed during exposure to xenobiotics. Thus, some drugs or toxicants (like acetaminophen, alcohol, diclofenac or cigarette smoke) are able to increase *in vitro* and/or *in vivo* EV production, and to change their composition (Bala et al., 2012; Benedikter et al., 2017; Cesselli et al., 2018; Palomo et al., 2018). As a consequence, EVs could serve as biological markers of cell responses and possibly even susceptibility to toxicity. They also offer the possibility of detecting toxicity at the very early stages of development before irreversible effects occur.

Although the molecular mechanisms still remain to be fully clarified, there is evidence showing that an increase in intracellular calcium concentration ($[Ca^{2+}]_i$), plasma membrane remodeling or oxidative stress are involved in the EV release by cells (Pollet et al., 2018; Turturici et al., 2014). Interestingly, we previously reported that PAHs and more specifically the prototypical PAH, benzo[a]pyrene (B[a]P), can trigger such cellular events. Indeed, our team previously demonstrated that cell exposure to various PAHs can increase the $[Ca^{2+}]_i$, *via* an AhR-independent activation of the β2-adrenergic receptor (Mayati et al., 2012), and that membrane remodeling (characterized by an increase in fluidity and destabilization of lipid rafts), is a key mechanism in the B[a]P-associated toxicity (Tekpli et al., 2010).

Exposures to xenobiotics or lifestyle factors, such as air pollutants (Pergoli et al., 2017) cigarette smoke (Ryu et al., 2018), alcohol (Bala et al., 2012), or high fat diet (Kranendonk et al., 2014), would be able to modify EV trafficking, the amount produced and composition (e.g. proteins, miRNA), notably in biological fluids such as plasma or urine. In this context, circulating EVs might provide information about both exposure level and toxic responses of the organism. EVs in blood plasma of healthy humans mainly originate from platelets. Comparatively, endothelial cells produce few EVs (Iba and Ogura, 2018). However, while the level of EV production by these latter cells is low under physiological conditions, it can considerably increase in pathological situation (Iba and Ogura, 2018). Thus, the amount of endothelium-derived EVs circulating in the blood stream has been shown to correlate with the severity of diverse diseases, eg. sepsis, stroke, atherosclerosis and metabolic syndrome (Curtis et al., 2013). Endothelial cells are also particularly interesting to focus on since they also participate in the production of EVs detected in urine (Barreiro and Holthofer, 2017; Lv et al., 2019). It is within this framework that our study was carried out.

In order to test whether EVs can serve as biomarkers of PAH exposure, the present study was designed to evaluate the effects of these pollutants on EV production. To this aim, two different approaches were applied: i) an *in vitro* approach, using the human endothelial cell line HMEC-1; and ii) an *in vivo* approach, using urine samples obtained from PAH-exposed rats. Urine provides a good alternative to blood in the field of disease biomarkers because this biological fluid can be collected noninvasively and in large amounts (Pisitkun et al., 2004). Our present data demonstrate that PAHs can increase EV production by endothelial cells. This overproduction observed *in vitro* concerns both S-EVs and L-EVs probably involving different molecular mechanisms. Indeed, it seems that only the increase of S-EVs would be AhR-dependent. Moreover, the PAH-related increase in EV production was also observed *in vivo* in urine samples from rats exposed to the 16 PAHs listed as "priority" compounds by US-EPA.

2. Materials and Methods

2.1. Chemicals and reagents

Benzo[*e*]pyrene (B[e]P), pyrene (PYR), benz[*a*]anthracene (B[a]A), benzo[*a*]pyrene (B[a]P), dibenz[*a,h*]anthracene (DBA), chrysene, benzo[b]fluoranthene, benzo[k]fluoranthene, benzo[g,h,i]perylene, indeno[1,2,3-c,d]pyrene, naphthalene, fluorene, acenaphthene, acenaphtylene, anthracene, phenanthrene, fluoranthene, alpha-naphthoflavone (α-NF), dimethyl sulfoxide (DMSO) and monoclonal antibody anti-β-actin were obtained from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA). Antibodies against CD63, lamin A/C and Hsc70 were from Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA, USA), whereas Tsg101 was provided by Abcam and caveolin-1 and flotillin-1 by BD biosciences. All other chemicals used in this study

were purchased from commercial sources at the highest purity available.

2.2. Cell culture

The Human Microvascular Endothelial Cell line (HMEC-1) was obtained from the Center for Disease Control and Prevention (Atlanta, GA). Cells were routinely maintained in MCDB-131 medium containing hydrocortisone (1 μg/mL), epidermal growth factor (10 ng/mL), penicillin (50 unit/mL), streptomycin (50 unit/mL), L-glutamine (10 mM), and supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS). At 90% confluence, before each treatment, cells were cultured overnight in serum-free medium. Chemicals were prepared as stock solutions in DMSO. The final concentration of vehicle did not exceed 0.2% (v/v); control cultures received the same concentration of DMSO. In all experiments using chemical inhibitors, cells were pre-treated 1 h prior to and during exposure.

2.3. Animal experimentation

Long Evans rats (female of 180–200 g, Elevage Janvier, St Berthevin, France) were housed in plastic cages under controlled environment (12 h light/dark cycle, light on at 7 a.m., temperature of 22 ± 2 °C and relative humidity of 40 ± 5%). Food and water were available *ad libitum*. The water, food and oil were tested according to NF ISO 15302 to confirm that all these matrices were PAH-free down to a detection limit of 10 ng/L of water and 1 ng/g of fat. Rats were acclimatized to the animal facility for 2 weeks prior to experiment onset. The mix of PAHs was composed of the 16 compounds pointed out the US-EPA for their toxicity, and prepared in vegetable oil weekly (ISIO4, Lesieur, Neuilly-sur-Seine, France). Treatment of animals has been described in a previous study (Grova et al., 2017). Briefly, four rats were randomly allocated to each of the experimental group receiving 0.8 mg/kg body weight of each compound included in the mix, by oral administration, 3 times per week over a 90-day period. Control rats received only vehicle. At the end of 90 days-experiment, urine fractions were collected after 24 h in refrigerated tubes and storage at −20 °C. All procedures were conducted in accordance with European Communities Council Directive of 22 September 2010 (2010/63/EU) and approved by the Ministry of Agriculture, Grand-Duchy of Luxembourg.

2.4. Isolation of EVs from HMEC-1 cells

Cells were cultured using cell culture petri dishes of 151.9 cm^2 (CorningTM, Thermo Fisher Scientific, France). After PAH exposure, in order to isolate total EVs, L-EV or S-EV, the serum-free conditioned medium was first centrifuged at 3650 x *g* for 10 min to remove cells and cell debris and obtain the cell-cleared supernatants. Total EVs were pelleted by direct ultracentrifugation of the culture media at 100,000 x *g* for 1h45 at 4 °C (Beckman Coulter Optima L-90K Series Ultracentrifuges, rotor Sw 28.1); the pellet was then resuspended in sterile phosphate-buffered saline (PBS), followed by another centrifugation at 100,000 x *g* for 1h45 min at 4 °C. Total EV pellets were finally resuspended in sterile PBS.

L-EVs were recovered from cell-cleared supernatants following centrifugation at 10 000 × *g* for 30 min, followed by one washing step in PBS at 10 000 × *g* for 30 min, and then resuspended in sterile PBS. S-EVs were further isolated from L-EVs-depleted supernatants following filtration at 0.2 μm and a 100 000 x g ultracentrifugation step for 1h45 at 4 °C, followed by one washing step in PBS at 100 000 x *g* for 1h45, and then resuspended in sterile PBS.

2.5. Isolation of urine EVs

About 9 mL of urine were first diluted half in PBS and centrifuged at 300 x *g* for 10 min, then 2000 x *g* for 10 min to remove cells and cell debris. EVs were pelleted by ultracentrifugation at 100 000 × *g* for 2 h at 4 °C (Beckman Coulter Optima L-90K Series Ultracentrifuges, rotor Sw 28.1). The pellet was next resuspended in sterile PBS containing dithiothreitol (DTT; 200 mg/mL) at 37 °C for 10 min in order to dissociate of uromodulin aggregates (Fernández-Llama et al., 2010; Musante et al., 2015), and then resuspended in sterile PBS, followed by another centrifugation at 100 000 × *g* for 2 h at 4 °C. Total EV pellets were finally resuspended in sterile PBS.

2.6. Nanoparticle tracking analysis

EV samples were diluted in sterile PBS before nanoparticle tracking analysis (NTA). Size distribution and vesicle concentration were determined by NTA using a NanoSight LM14 (Malvern Instruments, Malvern, UK). A 405 nm laser beam is used to highlight the samples. Three 30 s captures per sample were recorded at 25 °C. Videos were analyzed using NanoSight NTA 3.1 software (Malvern, UK) using a detection threshold set to 3. The presented results correspond at least to an average from three videos for each of three independent samples of EVs, S-EVs and L-EVs. EV concentrations and distributions were then normalized to the cell count and expressed as number of EVs released per cell.

2.7. Electron microscopy

Transmission electron microscopy (TEM) was performed as described by Théry et al. (2006). Briefly, S-EVs and L-EVs were resuspended in 2% paraformaldehyde (PFA). Formvar-carbon coated copper grids (Agar Scientific, Stansted, UK) were placed on 5 μL S-EVs or L-EVs suspension for 20 min and washed with PBS. Vesicles were fixed in 1% glutaraldehyde in PBS for 5 min. After washing with distilled water, grids were placed on a drop of uranyl-oxalate for 5 min and of ice-cold 2% methyl cellulose/4% uranyl acetate (1/9; v/v) for 10 min. EVs were visualized using a JEOL JEM-1400 transmission electron microscope (JEOL, Japan).

2.8. Annexin V binding analysis

Staining by Annexin V-phycoerythrin (annexin V-PE, BD PharmingenTM) has been used to detect phosphatidylserine at the L-EV surfaces. An analysis window was defined using beads (Megamix, Stago) of diameters 0.5 μm, 0.9 μm and 3 μm. To determine the Annexin V positivity, L-EVs were incubated with Annexin V-PE, counting beads (Flow-Count™ Fluorospheres, Beckman) and buffer (14 mM NaCl, 10 mM Hepes, 2.5 mM calcium). Labelling in the absence of calcium was used as negative control. L-EVs stained with annexin V-PE were then analyzed by a BD FACSCanto™ III cytometer. Data have been exported using BD FACSDiva TM software.

2.9. Western blotting

Total cellular, S-EV and L-EV protein amounts were estimated by a BCA Protein Assay Kit (Thermo Fisher Scientific, UK), using BSA as a standard. 5 μg proteins were separated by sodium dodecyl sulfate–polymerase gel electrophoresis (SDS–PAGE), and electrophoretically transferred onto nitrocellulose membranes (Merck Millipore). After blocking with a Tris-buffered saline solution supplemented with 2% bovine serum albumin for 2 h, membranes were hybridized with primary antibodies overnight at 4 °C. Membranes were then incubated with horseradish peroxidase-

conjugated secondary antibodies for 1 h. Immunolabeled proteins were visualized by chemiluminescence using the LAS-3000 analyzer (Fujifilm) or Molecular Imager ChemiDoc™ XRS+ (Bio-Rad). Image processing was performed using Multi Gauge software (Fujifilm) or Image Lab™ software (Bio-Rad). For protein loading evaluation, a primary antibody against HSC70 was used.

2.10. Intracellular calcium concentration measurements

Cells used for intracellular calcium concentration ($[Ca^{2+}]_i$) measurements were grown on glass coverslips. The glass coverslips were sterilized in ethanol of increasing concentrations from 70 to 99%, and then coated with serum proteins using pure FBS prior to cell culture. Variations in $[Ca^{2+}]_i$ were analyzed in PAH-exposed HMEC-1 cells by real time fluorescence imaging, using Ca^{2+}-sensitive probe Fura-2-AM, as previously reported (Mayati et al., 2012; Brinchmann et al., 2018a). Briefly, cells were incubated at 37 °C (30 min) in cell suspension buffer supplemented with 1.5 μM Fura-2AM and 0.006% pluronic acid. Changes in $[Ca^{2+}]_i$ were monitored using a DMIRB (Leica, Wetzlar, Germany) inverted microscope-based imaging system equipped with a 40 × /1.35 UApo N340 high UV light transmittance oil immersion objective (Olympus, Waltham, MA, USA), a CoolSnapHQ fast-cooled monochromatic digital camera (Princeton instrument), a DG-4 Ultra High Speed Wavelength Switcher (Sutter Instruments, Novato, CA, USA) for fluorophore excitation, and METAFLUOR software (Universal Imaging, Downingtown, PA, USA) for image acquisition and analysis. The $[Ca^{2+}]_i$ imaging involved data acquisition every 10 s (emission at 510 nm) at 340- and 380-nm excitation wavelengths. The ratio of fluorescence intensities recorded after excitation at 340 nm (F340) and 380 nm (F380) was used to estimate intracellular calcium concentrations. $[Ca^{2+}]_i$ data were expressed as normalized maximum delta ratio, i.e., the difference between the basal level of $[Ca^{2+}]_i$ – related fluorescence ratios (F340/F380) before DMSO or PAH treatment and the maximum level of $[Ca^{2+}]_i$ – related fluorescence ratios (F340/F380) obtained during DMSO or PAH treatment.

2.11. Apoptosis

Cells used for apoptosis analysis were cultivated in 6-well plates. Hoechst 33342/Sytox green staining was carried out to observe apoptotic cells by fluorescence microscopy. After PAH exposure, cells were stained with 50 μg/mL Hoechst 33342 and 93.5 nM Sytox green in the dark at 37 °C for 30 min. More than 300 cells in randomly selected microscopic fields were analyzed and were scored under ZEISS Axio Scope A1 microscope. Cells with condensed or fragmented chromatin were counted as apoptotic.

2.12. RNA isolation and analysis

Total RNA was isolated from cells using the TRIzol® reagent (Invitrogen, Cergy Pontoise, France) and then reverse-transcribed using the High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Life Technologies, Carlsbad, CA, USA). Real-time quantitative PCR (RT-PCR) was performed using SYBR Green PCR Master Mix on the CFX384 Touch™ Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad, Hercules, CA, USA). The mRNA expressions were normalized by means of 18s mRNA levels. The $2^{-\Delta\Delta ct}$ method was used to express the relative expression of each selected gene. Primers were as follows: CYP1A1-forwards: 5′- CCCACAGCACAACAAGAGACA-3′; CYP1A1-reverse: 5′-CATCAGGGGTGAGAAACCGT-3′; CYP1B1-forwards: 5′-AGCCAGGACACCCTTTCC-3′; CYP1B1-reverse: 5′-GAGTTGGACCAGGTTGTG-3′; 18S-forwards: 5′-CGCCGCTAGAGGTGAAATTC-3′; 18S-reverse: 5′-TTGGCAAATGCTTTCGCTC-3′.

2.13. Statistical analysis

All values were presented as means ± SEM from at least 3 independent experiments. Statistical analysis was performed using Student's *t*-test and the one-way ANOVA with Dunnett's post hoc test (GraphPad Prism5, GraphPad Software, Inc, San Diego, California, USA). Significance was accepted at $p < 0.05$.

3. Results

3.1. B[a]P stimulates the production of EVs by endothelial HMEC-1 cells

Endothelial cells constitute a well-known target for PAHs (Mayati et al., 2012; Brinchmann et al., 2018b), and are part of the cells mainly producing EVs under physiological conditions (Iba and Ogura, 2018). We therefore decided to explore effects of B[a]P on EV production by the endothelial HMEC-1 cells using different concentrations and times of treatment. NTA revealed that B[a]P significantly stimulated EV production by HMEC-1 cells from 100 nM (Fig. 1A) and after 12 h of treatment (Fig. 1B). After 24 h of treatment with 100 nM B[a]P, observation by NTA of the size distribution profile of EVs (Fig. 1C) showed that they exhibited diameters ranging from 50 nm to 600 nm, and that B[a]P stimulated the production of the entire population of EVs (regardless of EV size).

3.2. B[a]P stimulates the production of both S-EVs and L-EVs by endothelial HMEC-1 cells

It is known that cells can release an heterogeneous population of vesicles with variable diameters and different biogenesis processes, including small EVs (i.e. exosomes) formed inside endosomal compartments and larger EVs (i.e. microvesicles) budding from the plasma membrane. To get more insight into the characterization of the EV overproduction in treated HMEC-1 cells, we next evaluated the B[a]P effect by looking at both small (diameter <200 nm) and large (diameter >200 nm) EVs, following differential ultracentrifugation and filtration through 0.22 μm filters. Thus, our experimental procedure allowed us to isolate two populations of EVs: the small EV population (S-EVs) corresponding to EVs with average diameter of 160.1 ± 12.6 nm, and the large EV population (L-EVs) corresponding to EVs with average diameter of 295.8 ± 13.2 nm. Whereas B[a]P exposure (100 nM, 24 h) did not change EV diameters (Fig. S1), it nonetheless increased the production of both S-EVs and L-EVs (Fig. 2A and B respectively), to the same extent (by about 2 fold) as for total EVs (Fig. 1B).

3.3. S-EV and L-EV populations isolated from HMEC-1 cells correspond respectively to exosomes and microvesicles

In order to test whether S-EVs and L-EVs isolated under our experimental conditions correspond respectively to exosomes or microvesicles, we next examined their morphology and composition. As expected, TEM images revealed structures with expected cup-shaped appearance and diameters (Fig. 3A). By western blotting (Fig. 3B), using total cell lysates as positive controls, we failed to detect any lamin A/C in isolated S-EVs and L-EVs, thus ruling out a possible contamination of our EV samples by nucleus material. In contrast, proteins traditionally observed in both exosomes and microvesicles such as caveolin-1, flotillin-1, β-actin, Tsg101 and HSC70 (used as loading control), were detected in both S-EVs and L-

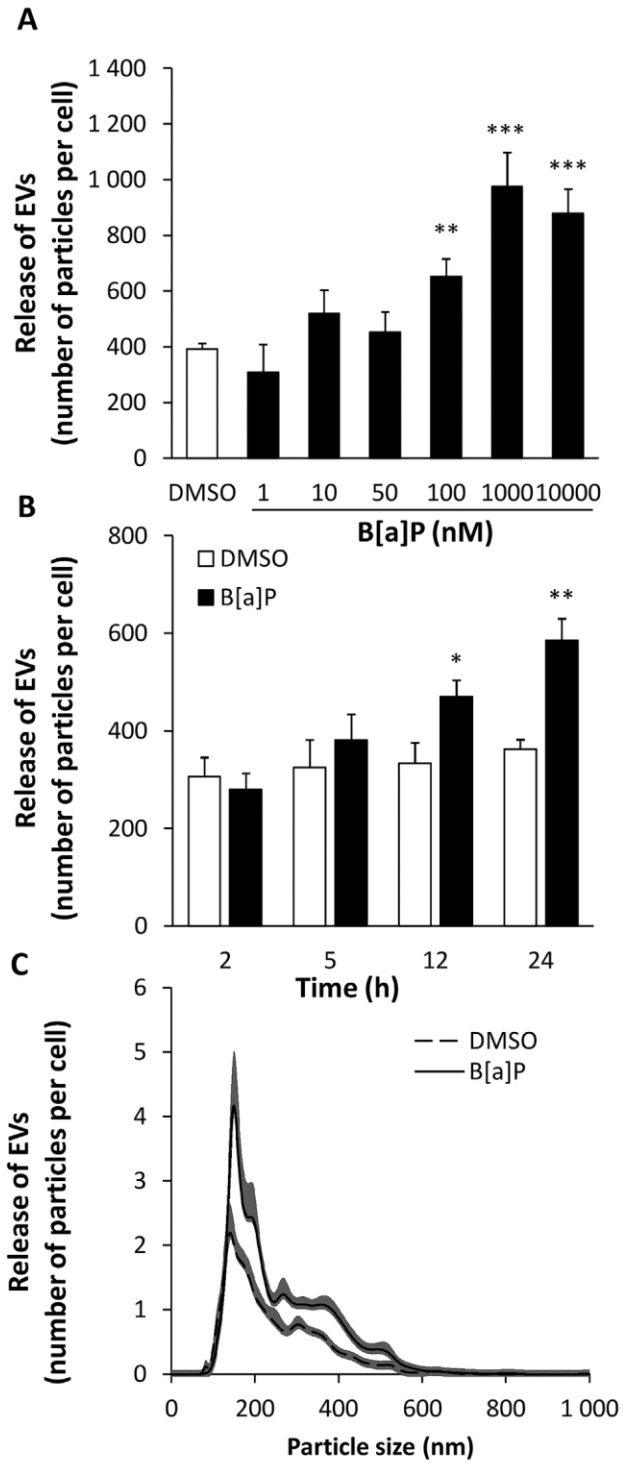


Fig. 1. B[a]P stimulates the extracellular vesicle release from endothelial HMEC-1 cells. Total EVs were isolated by ultracentrifugation and analyzed by Nanoparticle Tracking Analysis (NTA). (**A**) EVs released per HMEC-1 cells exposed to vehicle (DMSO) or 1 nM to 10 000 nM B[a]P for 24 h, and (**B**) exposed to 100 nM B[a]P from 2 h to 24 h. (**C**) Size distribution profile by NTA of EVs produced by endothelial cells during 24 h at 100 nM B[a]P. Data are the means ± SEM of three or more independent assays. *$p < 0.05$; **$p < 0.01$; ***$p < 0.001$ significantly different from unexposed control.

EVs. Finally, a protein described to be more specific to exosome, that is CD63, was only detected in S-EVs (Fig. 3B) and cell lysates. It is known that microvesicles expose phosphatidylserine on their outer leaflet of the membrane (Head et al., 2014; Record et al., 2018); therefore we next used the fluorescently labeled annexin V to analyze its presence in L-EVs (Fig. 3C). By flow cytometry, we found that 69 ± 3.6% of isolated L-EVs were annexin-V positive.

Altogether, these observations indicated that our technical procedure allowed the isolation of S-EVs and L-EVs corresponding respectively to exosome- and microvesicle-enriched populations produced by HMEC-1 cells.

3.4. B[a]P would modify the protein cargoes of EVs produced by HMEC-1

In parallel to the characterization of S-EVs et L-EVs produced by HMEC-1 cells, we also investigated whether the EV composition and characteristics studied were affected by B[a]P exposure. At first, we found that no significant modification was observed in presence of B[a]P when looking at EV morphologies (Fig. 3A) or annexin V labeling (Fig. 3C). To analyze the protein cargoes of EVs, 5 μg of total proteins were subjected to SDS-PAGE western blotting to compare protein composition of S-EV or L-EVs produced by cells in presence or not of B[a]P (Fig. 3B). Cell lysates were used as positive control. Among the studied proteins, the levels of caveolin-1, flotillin-1 or β-actin appeared to be increased in EVs produced upon B[a]P exposure, especially in S-EVs. The densitometric analysis thus revealed that caveolin-1 and flotillin-1 inductions were significant in the presence of this PAH (Fig. S2).

3.5. The increased production of S-EVs, but not L-EVs, upon B[a]P exposure would be AhR-dependent and calcium-independent

PAHs are known to trigger numerous interconnected cellular phenomena, associated or not to AhR activation, among them the induction of xenobiotic-metabolism enzymes, intracellular calcium signaling, membrane remodeling or apoptotic signaling (Larigot et al., 2018; Holme et al., 2019; Tekpli et al., 2013). Interestingly, several of them are also implicated in the production of EVs by cells. Thus, upon cell activation or apoptosis, the increase of $[Ca^{2+}]_i$ underlies the initiation of cell signaling pathways, remodeling of cytoskeleton and the redistribution of membrane phospholipids associated to the intracellular processing for exosome and/or microvesicles release (Yáñez-Mó et al., 2015). To get further insight into the possible mechanisms involved in the EV production upon B[a]P exposure, we decided to focus our attention on AhR activation, calcium signal and apoptosis.

3.5.1. Only AhR ligands can increase EV production by HMEC-1 cells

In order to test the possible involvement of AhR, we first decided to evaluate the potential of several PAHs with different AhR affinities, to increase EV production in HMEC-1 cells. To this aim, benzo[e]pyrene (B[e]P), pyrene (PYR), benz[a]anthracene (B[a]A) and dibenzo[a,h]anthracene (DBA) were chosen because they are part of the 16 U.S EPA priority pollutant PAH compounds; they are present in diet and possess different levels of affinity for AhR, therefore resulting in different potencies in terms of genomic AhR activation as compared to B[a]P (Fig. S3). The amount and size distribution of EVs produced by HMEC-1 cells were thus studied after 24 h of treatment with 100 nM of each PAH. Before focusing on EVs, we first evaluated the potential for AhR activation of our PAHs by studying the induction of known AhR-target genes, i.e. CYP1A1 and 1B1 (Fig. 4A). As expected, only B[a]A, B[a]P, and DBA (AhR ligands) induced CYP1A1 and 1B1 mRNA levels. The other PAHs tested (B[e]P and PYR), known to exhibit a very low affinity for AhR, failed to modify the expression of CYP1A1 and 1B1 in our cell model. Interestingly, like B[a]P, B[a]A and DBA were both capable of increasing the EV production by HMEC-1 cells in contrast to B[e]P

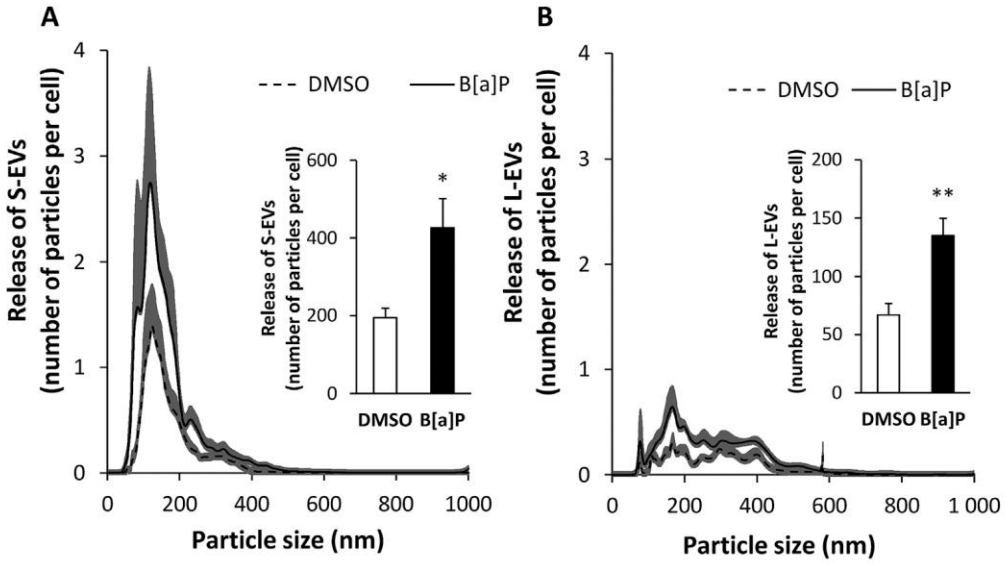


Fig. 2. B[a]P stimulates the production of both small vesicles (S-EVs) and large (L-EVs) vesicles from endothelial HMEC-1 cells. HMEC-1 cells were exposed to vehicle (DMSO) or 100 nM B[a]P for 24 h. S-EVs and L-EVs were isolated by differential ultracentrifugation, as described in Material and Methods section. Size distribution profile, determined by Nanoparticle Tracking Analysis (NTA) and amount (inserts) of S-EVs (**A**) and L-EVs (**B**) released per endothelial cell. Data are the means ± SEM of three or more independent assays. *$p < 0.05$; **$p < 0.01$ significantly different from unexposed control.

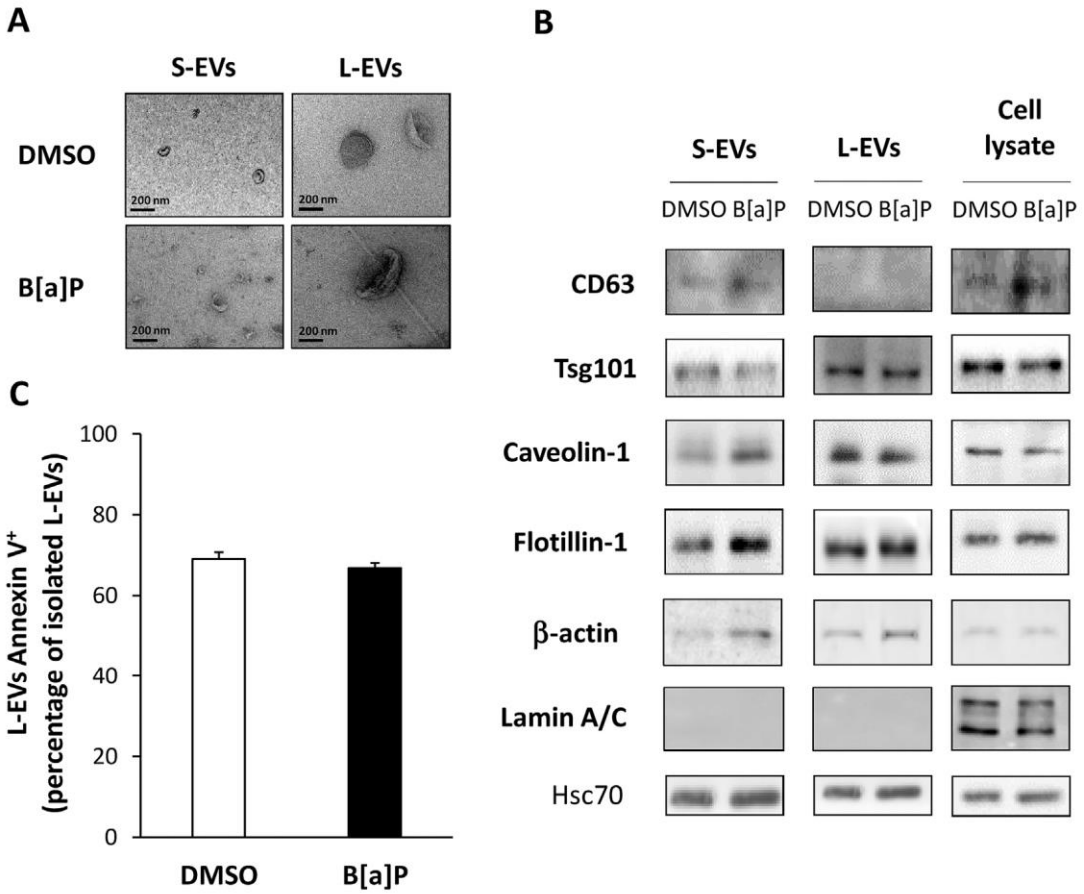


Fig. 3. Characterization of S-EV and L-EV populations isolated from endothelial HMEC-1 cells. HMEC-1 cells were exposed to vehicle (DMSO) or 100 nM B[a]P for 24 h. S-EVs and L-EVs were isolated by differential ultracentrifugation, as described in Material and Methods section. (**A**) Transmission electron microscopy pictures of S-EV and L-EV pellets (scale bars = 200 nm). (**B**) Western blot analysis of EV markers in S-EVs and L-EVs obtained from HMEC-1. Cell lysates were used as positive control for each marker studied. Lamin A/C was used to evaluate nuclear sample contamination; caveolin-1, flotillin-1, TSG101 and β-actin were used as markers of both S-EVs and L-EVs. CD63 was used as S-EV specific markers, and Hsc70 was used as loading control. (**C**) Measurement of annexin V positivity of L-EVs by flow cytometry. Annexin V was used as marker for phosphatidylserine. Results are expressed as a percentage of isolated L-EVs.

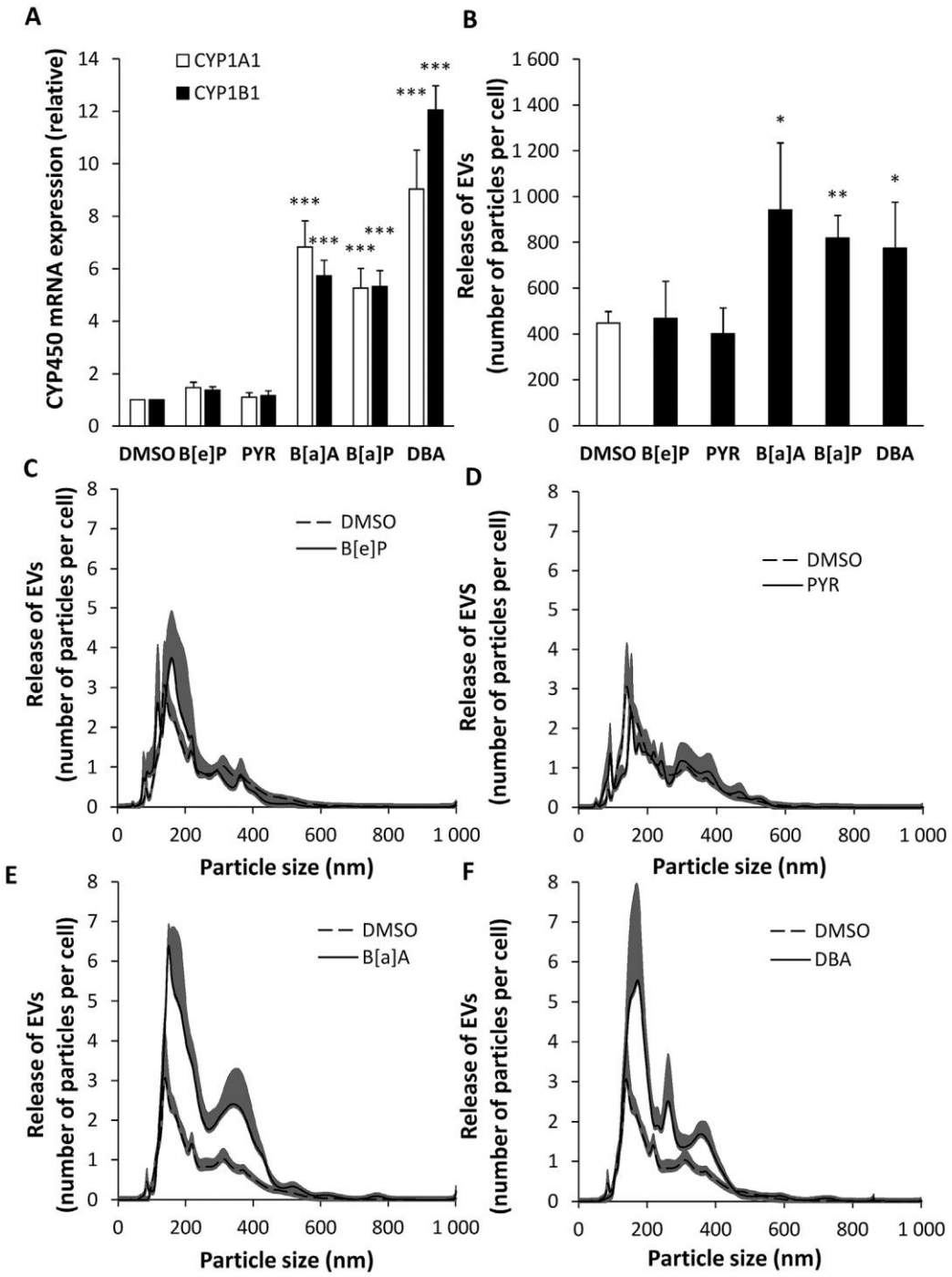


Fig. 4. Effects of PAHs on the EVs released from endothelial HMEC-1 cells. (**A**–**F**) HMEC-1 cells were exposed to vehicle (DMSO) or 100 nM of B[e]P, PYR, B[a]A, B[a]P or DBA for 24 h. (**A**) mRNA expression of CYP1A1 and CYP1B1 was analyzed using RT-qPCR. Data are expressed relatively to mRNA levels of CYP1A1 and CYP1B1 found in corresponding control cells (DMSO), arbitrarily set to 1 unit. (**B**–**F**) Total EVs were isolated by ultracentrifugation and analyzed by Nanoparticle Tracking Analysis (NTA). (**B**) EV production released per HMEC-1 cells exposed to different PAHs for 24 h. (**C**–**F**) Size distribution profile by NTA of EVs produced by endothelial cells during a 24 h exposure with different PAHs compared to control (DMSO). Data are the means ± SEM of three or more independent assays. *$p < 0.05$; **$p < 0.01$; ***$p < 0.001$ significantly different from unexposed control.

and PYR which were ineffective (Fig. 4B). Note that, whatever the PAH tested, analysis of the size distribution profile of EVs (Fig. 4C–F) indicated that isolated EVs had diameters ranging from 50 to 600 nm and that, when PAHs exhibited an effect on EV production, this concerned the entire population of EVs (whatever the size of EVs) (Fig. 4E and F). To determine if a higher concentration of PAHs with low affinity for AhR was able to stimulate EV production by HMEC-1 cells, we decided to expose cells to 1 μM of PYR for 24 h. Even at this high concentration, PYR failed to modify the EV production by HMEC-1 cells (Fig. S4A). This result thus confirms our data with 100 nM, and is concordant with recent publication from our group (van Meteren et al., 2019). Indeed, we have recently demonstrated that PYR was able to increase S-EV production by hepatocytes independently of AhR, and through a Constitutive Androstane Receptor (CAR)-dependent mechanism. Interestingly, unlike hepatocytes, mRNAs of CAR were not detected in HMEC-

1 cells (Fig. S4B).

3.5.2. An AhR antagonist (alpha-naphthoflavone) inhibits the production of S-EVs but not that of L-EVs induced by B[a]P

It is noteworthy that the PAH capacity to increase the mRNA levels of CYP1A1 and 1B1 dovetail with their capacity to increase the EV production by HMEC-1 cells. These observations led us to hypothesize an implication of AhR in the increased EV production upon B[a]P exposure. To test this hypothesis, we next investigated the effects of α-NF (antagonist of AhR and inhibitor of CYP1) on the B[a]P-triggered induction of S-EVs or L-EVs. As shown in Fig. 5, α-NF (10 μM) counteracted the up-regulation of S-EVs observed in presence of B[a]P (Fig. 5A), while it failed to reduce the L-EV production (Fig. 5B). Interestingly, treatment by 6-formylindolo[3,2-b] carbazole (FICZ, 100 nM, 24 h), a potent high affinity ligand of AhR, further supported this finding. Indeed, FICZ was able to increase the production of S-EVs but not that of L-EVs (Fig. S5). Therefore, AhR activation would be involved in the B[a]P-induced production of S-EVs but not of L-EVs, thus suggesting differential mechanisms.

3.5.3. PAH capacities to induce intracellular calcium concentration do not overlap their capacities to induce EV production

Knowing that calcium can be involved in EV production (Martínez and Andriantsitohaina, 2017; Yáñez-Mó et al., 2015) and that B[a]P can increase $[Ca^{2+}]_i$ in HMEC-1 cells (Mayati et al., 2012), we next decided to monitor the early $[Ca^{2+}]_i$ changes in response to our test PAHs. To do so, we used a real-time-fluorescence imaging method and the calcium-sensitive probe Fura2-AM. As previously described (Mayati et al., 2012), B[a]P (100 nM) was able to increase $[Ca^{2+}]_i$ in HMEC-1 cells (Fig. 6A). The maximum of increase occurred after about 20 min of exposure to B[a]P (Fig. S6). We then analyzed the effects of 100 nM of all other tested PAHs, on $[Ca^{2+}]_i$ in order to determine the maximum level of $[Ca^{2+}]_i$ increase upon exposure to each molecule. Except for DBA, despite differences in terms of kinetics (Fig. S6), all PAHs were able to increase $[Ca^{2+}]_i$ in HMEC-1 cells, to the same extent as B[a]P (Fig. 6A). It is noteworthy that there was no correlation between PAH capacities to elevate $[Ca^{2+}]_i$ and those to increase EV production (Fig. 4B). Thus, B[e]P and PYR were found to induce $[Ca^{2+}]_i$ but failed to modify EV production by HMEC-1 cells; DBA stimulates EV production but did not modify $[Ca^{2+}]_i$; and B[a]P or B[a]A induced both $[Ca^{2+}]_i$ and EV production. Therefore, the early calcium signal triggered by PAHs would likely not be involved in the increased EV production, whatever the type of EVs considered.

3.5.4. PAH capacities to induce apoptosis do not overlap their capacities to induce EV production

As induction of CYP1A1 et 1B1 following AhR activation by PAHs could lead to apoptotic signaling (Hardonnière et al., 2017), we then decided to evaluate apoptosis following PAH exposures (100 nM, 24 h). This was performed using fluorescence microscopy and Hoechst/Sytox green staining (Fig. 6B). Consistent with literature, 100 nM B[a]P slightly (around 5%) but significantly increased the percentage of apoptotic cells. In contrast, the other tested PAHs, i.e. B[e]P, PYR, B[a]A and DBA, did not affect the apoptosis level. As for $[Ca^{2+}]_i$ induction, we therefore noted that there was no correlation between PAH capacities to induce apoptosis and PAH capacities to increase EV production by HMEC-1 cells.

3.6. In vivo exposure to a mixture of PAHs increases urinary EV amount

EVs are widely found in all body fluids including blood, saliva or urine (Yáñez-Mó et al., 2015). Urine appears as non-invasive source for information reflecting the physio-pathological state of urinary system but also of other physiological systems. Based upon the fact that endothelial cells are part of kidney intrinsic cells producing urinary EVs (uEVs) and that humans are widely exposed to PAH mixture, we finally decided to test the *in vivo* effect of a mixture of the 16 PAHs listed as "priority" compounds by US-EPA, on the amount of EVs in rat urine samples. Thus, we evaluated uEVs amounts in urines collected during 24 h from rats exposed through diet for 90 days to 0.8 mg/kg of PAH mixture in comparison to control rats receiving only vehicle (vegetal oil). After isolation, uEV amounts were analyzed by NTA. As shown in Fig. 7A, rat exposure to PAH mixture led to an increase of uEVs number ($2.39.10^9$/mL *vs* $1.30.10^9$/mL) without any significant modification of renal functions, as determined by measuring urinary creatinine concentration and urinary volume (Fig. 7B and C).

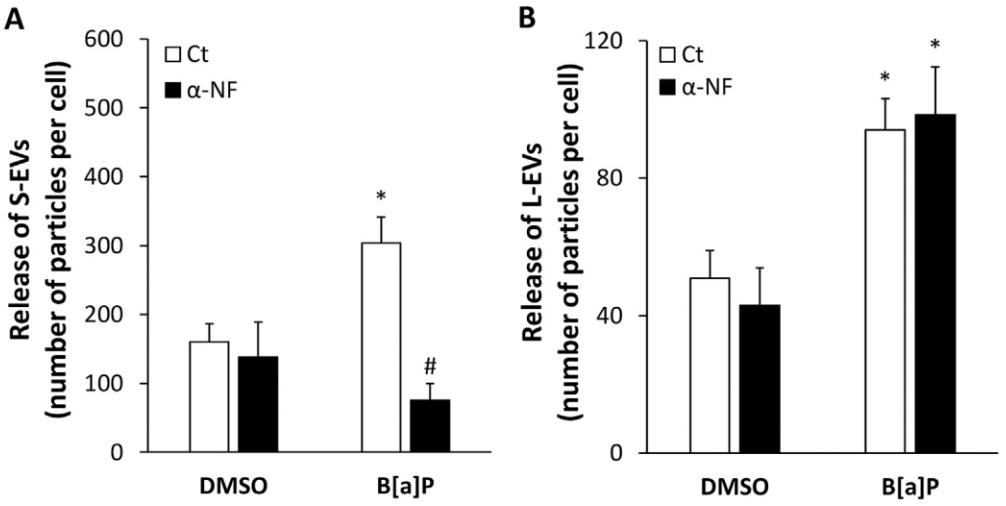


Fig. 5. Involvement of AhR in the production of S-EVs, but not of L-EVs, produced upon B[a]P exposure of endothelial HMEC-1 cells. HMEC-1 cells were exposed to vehicle (DMSO) or 100 nM B[a]P in presence or not to AhR antagonist α-NF (10 μM). S-EVs and L-EVs were isolated by differential ultracentrifugation, as described in Material and Methods section. S-EV (**A**) and L-EV (**B**) concentrations released per endothelial cell were determined by Nanoparticle Tracking Analysis (NTA). Data are the means ± SEM of three or more independent assays. *$p < 0.05$ significantly different from unexposed control. #$p < 0.05$ significantly different from B[a]P-treated cells.

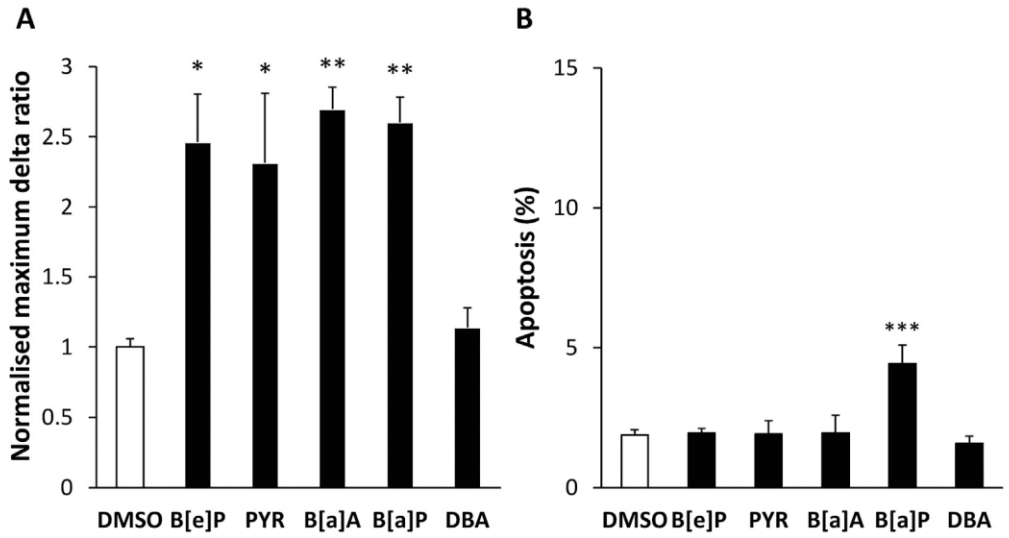


Fig. 6. PAH effects on intracellular Ca^{2+} concentrations ($[Ca^{2+}]_i$) and on the apoptosis in HMEC-1 cells. HMEC-1 cells were exposed to vehicle (DMSO) or 100 nM of B[e]P, PYR, B[a]A, B[a]P or DBA. (**A**) $[Ca^{2+}]_i$ in cells was analyzed by real time fluorescence imaging, using Ca^{2+} -sensitive probe Fura2-AM (acetoxymethyl ester). Data were expressed as normalized maximum delta ratio as described in Materials and Methods. HMEC-1 cells were treated by B[e]P, PYR, B[a]A, B[a]P or DBA at 100 nM or untreated (DMSO) during 24 h for the evaluation of cytotoxicity by (**B**) counting apoptotic cells. Data are the means ± SEM of three or more independent assays. *p < 0.05; **p < 0.01; ***p < 0.001 significantly different from unexposed control.

4. Discussion

The growing interest for EVs originates (1)-from works demonstrating that EVs carry a plethora of bioactive molecules (i.e. nucleic acid, lipids, carbohydrates, proteins …) that play roles in cell-to-cell communication, and (2)-from works revealing the clinical interest of EVs as non-invasive diagnostic biomarkers in some human pathologies including cancer (Nawaz et al., 2017). In this context, our study was performed in order to evaluate the capacity of PAHs to increase EV production both *in vitro* and *in vivo* with the aim of determining if these entities could represent potential biomarkers of exposure and/or effects of PAHs.

The present study highlights for the first time the capacity of PAHs to increase *in vitro* the EV production by endothelial HMEC-1 cells. Interestingly, only PAH ligands for AhR (i.e. B[a]P, B[a]A, DBA) led to this EV overproduction. Indeed, B[e]P and PYR, that are known weak AhR ligands, failed to modify such a production. Besides AhR activation, several PAHs can induce an intracellular calcium signaling (Mayati et al., 2012) and trigger apoptosis (Tekpli et al., 2010), two cellular phenomena previously related to EV biogenesis (Pollet et al., 2018; Turturici et al., 2014). Regarding influence of B[e]P, PYR, B[a]P, B[a]A, or DBA on intracellular calcium concentration, cell apoptosis and CYP1A1/1B1 mRNA levels, our results do support an AhR implication. Indeed, in contrast to the capacities to trigger an early $[Ca^{2+}]_i$ increase (as observed in presence of B[e]P, PYR, B[a]P, B[a]A) and apoptosis (as observed only in presence of B[a]P), the PAH capacity to induce mRNA levels of CY1A1 and 1B1 overlaps that to increase the EV production. These metabolism enzymes are well recognized as being under AhR control (Larigot et al., 2018) and key actors in B[a]P induced apoptosis (Tekpli et al., 2010), and, like EVs, are induced in our cell model only by strong AhR ligands. Interestingly, only the increase of S-EV production was significantly counteracted by α−NF (AhR antagonist and inhibitor of CYP1), thus indicating that only the S-EV overproduction by B[a]P-treated HMEC-1 cells would be AhR dependent. These results therefore strengthen the fact that S-EV and L-EV biogenesis processes would differ, as previously proposed by other groups (Abels and Breakefield, 2016). It remains to determine the precise role for AhR in the S-EV production by HMEC-1 cells, notably in presence of B[a]P. Many hypotheses could be considered. Thus, a possible involvement of the sphingolipid pathway would be particularly interesting to evaluate since, in epithelial cells, several AhR ligands, including PAHs, are able to promote the generation of sphingosine-1-phosphate, a bioactive intermediate of sphingolipid metabolism (Reiners and Clift, 1999; Wang et al., 2018). Indeed, sphingolipids and the enzymes related to their biosynthesis have been associated to EV biogenesis and release, especially by shaping membrane curvature (Verderio et al., 2018). Another hypothesis might involve a change in the physico-chemical characteristics of lipid raft microdomains. Indeed, these entities, that are detected in EV membranes (Pollet et al., 2018), represent assemblies of proteins and lipids within the plasma membrane that are notably enriched in cholesterol and sphingolipids (Head et al., 2014); most interestingly, they are elements of the regulatory mechanisms associated to the vesicle formation and structure (Pollet et al., 2018). As we have previously demonstrated that B[a]P alters the composition of the plasma membrane lipid microdomains notably through AhR activation (Tekpli et al., 2010), it could be interesting to test a role for such a membrane remodeling in the production of S-EVs by HMEC-1 cells. Of note, the present results indicate that B[a]P exposure could modify EV protein cargoes, notably leading to an enrichment of caveolin-1 and flotillin-1 contents in S-EVs. Interestingly, caveolin-1 and flotillin-1 are well-known markers of lipid rafts. Although studies of greater extent (i.e. proteomics) are needed to conclude, besides stimulating EV production, it seems that PAHs would moreover be able to modify the messages carried by the vesicles by modifying the composition of EVs.

Stimulating effects of PAHs, and more particularly B[a]P, towards EV production, concern the two main populations, namely S-EVs and L-EVs, as demonstrated by our EV characterization. As described in the literature, L-EV population (presently observed whatever the treatment applied), is relatively heterogonous as compared to the S-EV population. Looking only at their amount, L-

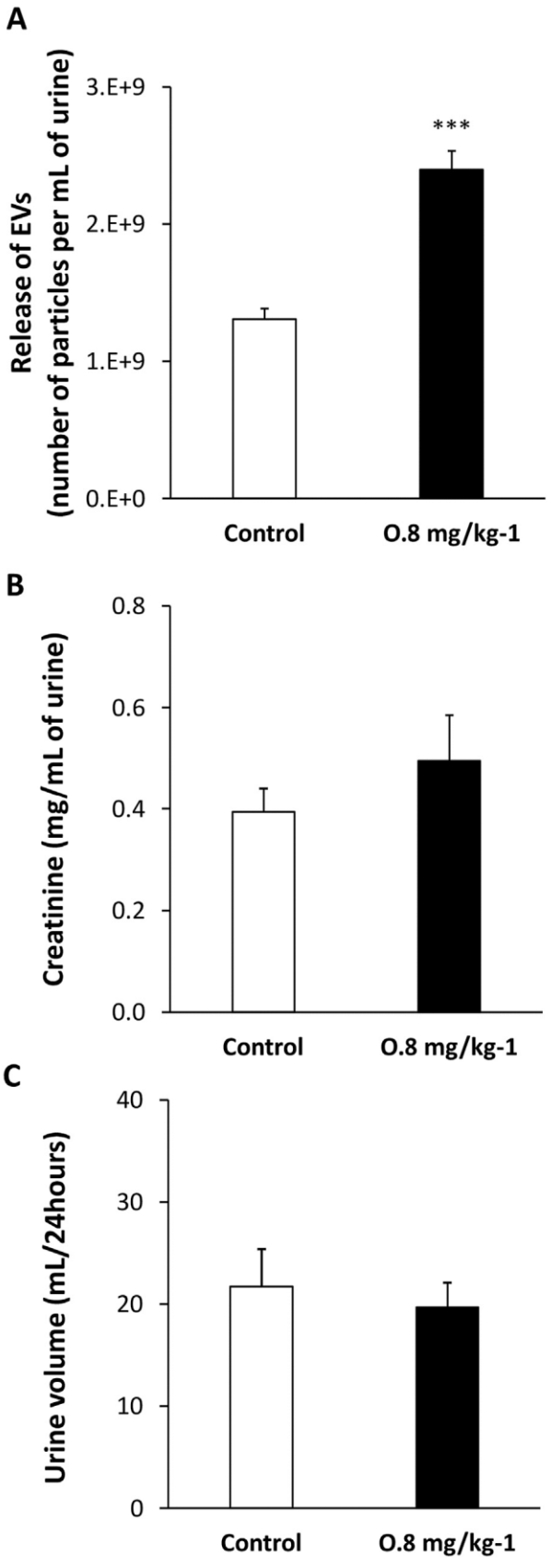


Fig. 7. *In vivo* PAH exposure increases EV amount in urine. Rats received 0.8 mg/kg of a 16 PAH mixture or only vehicle for control rats during 90 days. At the end of 90 days-experiment, urine fractions were collected over a 24 h period. EVs were isolated by differential ultracentrifugation. (**A**) EV concentrations released per mL of urine were assessed by Nanoparticle Tracking Analysis. (**B**) Creatinine concentration (mg/mL) in urine of rats. (**C**) Urinary volume produced during the last 24 h of PAH exposure. Data are the means ± SEM of four rats. ***$p < 0.001$ significantly different from unexposed control.

EVs represent less than 20% of total EVs produced by HMEC-1 cells, whereas S-EVs represent more than 50%. Note that B[a]P treatment did not significantly affect this distribution (data not shown). Thus in terms of amount, S-EVs would represent the main type of EVs produced by HMEC-1 cells. Nevertheless, considering averaged diameters (160 nm versus 300 nm for S-EVs and L-EVs respectively) and the corresponding averaged membrane surface area (0.08 μm (Ferronato and Torretta, 2019) and 0.28 μm (Ferronato and Torretta, 2019) for S-EVs and L-EVs respectively), it seems that L-EVs would not be a marginal population considering all EVs produced by HMEC-1. Since PAHs are environmental contaminants with numerous toxic effects on human cells, it could be interesting to determine if the observed L-EV overproduction is an attempt of exposed cells to remove B[a]P. Indeed, the microvesicle trafficking has been previously proposed as a biological process that helps cells to extrude potentially toxic xenobiotics (Jorfi and Inal, 2013), thus affording them a means of protection against an intracellular stress. This phenomenon is notably exploited by cancers cells as a mechanism of resistance. Indeed, microvesicles released from cancer cells, after drug treatment (i.e. doxorubicin), contain high levels of the chemotherapeutic agent (Shedden et al., 2003). Regarding the mechanisms involved in L-EV biogenesis upon B[a]P exposure, they yet remain to be determined. However, it seems that neither early calcium signal triggered by PAHs, neither AhR would be involved in their production.

Regarding the effects, notably carcinogenic, of PAHs on human health, the monitoring of the populations likely exposed to these pollutants is currently performed through the measurement of urinary PAH metabolites (i.e. 1-hydroxy pyrene, 3-hydroxy B[a]P), or by evaluation of DNA-adducts in blood cells (Srogi, 2007). The use of these biomarkers is difficult since their presence does not necessarily reflect the level of PAH mixture humans are exposed to (Srogi, 2007). Moreover, these biomarkers are related to the capacity of cells to metabolize PAHs but not to the cellular reaction towards these pollutants. Considering these aspects, it therefore seems that studying EVs in body fluids as urine would be a good alternative. Indeed, EV production can be correlated to cellular response, to disease, to drug exposure (Martínez and Andriantsitohaina, 2017). Our present results indicate that B[a]P, B[a]A and DBA are each able to up-regulate production of EVs from endothelial cells. This induction effect was also observed *in vivo* upon exposure to a mixture of PAHs. Thus, our data show that rat exposure (90 days) to the mixture of 16 US-EPA PAHs, was capable of increasing the EV disposal from urine without influencing renal activity. These results therefore suggest that EVs in urine may have particular utility for monitoring exposure to toxicants and to detect the related early cellular response prior to end-organ damages.

5. Conclusion

Taken together, our data indicates that, i) PAH exposure increases *in vitro* the EV production by endothelial cells and *in vivo* the release of EVs in urine, and that the stimulating effects of PAHs concern both S-EVs (or exosomes) and L-EVs (or microvesicles); ii) PAH exposure and more particularly, exposure to B[a]P, might influence the composition of the S-EVs produced by endothelial cells; and finally, iii) AhR would be involved in the PAH effects on the release of S-EVs, but not L-EVs. The inability of AhR weak ligands, like PYR or B[e]P, to increase the EV production in HMEC-1 cells, along with the inhibitory effects of α–NF, an AhR antagonist,

towards the B[a]P effect on the S-EV production strongly support this assumption. In total, our results therefore point to EVs as possibly useful biomarkers of exposure for PAHs.

Acknowledgements

We first wish to thank Dr Carmen Martinez (UMR Inserm 1063, Angers, France) for valuable discussion on EVs at the beginning of this project. We are also very grateful to the MRiC platform (UMS BIOSIT, Rennes, France), notably Stéphanie Dutertre for training us on calcium measurements. This study was financially supported by the "Programme Environnement-Santé-Travail" of Anses with the funding from ITMO cancer in the context of the Cancer Plan 2014–2019 (EST-2016/1/31), and by the Cancéropôle Grand-Ouest/Région Bretagne (Concerto project). Manon Le Goff was a recipient of a PhD fellowship from the Collectivités Locales Mayennaises.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data to this article can be found online at https://doi.org/10.1016/j.envpol.2019.113171.

References

Abels, E.R., Breakefield, X.O., 2016. Introduction to extracellular vesicles: biogenesis, RNA cargo selection, content, release, and uptake. Cell. Mol. Neurobiol. 36, 301–312.
Bala, S., et al., 2012. Circulating microRNAs in exosomes indicate hepatocyte injury and inflammation in alcoholic, drug-induced, and inflammatory liver diseases. Hepatology 56, 1946–1957.
Bansal, V., Kim, K.-H., 2015. Review of PAH contamination in food products and their health hazards. Environ. Int. 84, 26–38.
Barreiro, K., Holthofer, H., 2017. Urinary extracellular vesicles. A promising shortcut to novel biomarker discoveries. Cell Tissue Res. 369, 217–227.
Bayraktar, R., Van Roosbroeck, K., Calin, G.A., 2017. Cell-to-cell communication: microRNAs as hormones. Mol. Oncol. 11, 1673–1686.
Bebelman, M.P., Smit, M.J., Pegtel, D.M., Baglio, S.R., 2018. Biogenesis and function of extracellular vesicles in cancer. Pharmacol. Ther. 188, 1–11.
Benedikter, B.J., et al., 2017. Cigarette smoke extract induced exosome release is mediated by depletion of exofacial thiols and can be inhibited by thiol-antioxidants. Free Radic. Biol. Med. 108, 334–344.
Benedikter, B.J., Wouters, E.F.M., Savelkoul, P.H.M., Rohde, G.G.U., Stassen, F.R.M., 2018. Extracellular vesicles released in response to respiratory exposures: implications for chronic disease. J. Toxicol. Environ. Health Part B 21, 142–160.
Brinchmann, B., et al., 2018. Lipophilic chemicals from diesel exhaust particles trigger calcium response in human endothelial cells via aryl hydrocarbon receptor non-genomic signalling. Int. J. Mol. Sci. 19, 1429.
Brinchmann, B.C., et al., 2018. Lipophilic components of diesel exhaust particles induce pro-inflammatory responses in human endothelial cells through AhR dependent pathway(s). Part. Fibre Toxicol. 15, 21.
Bruzzoniti, M.C., Fungi, M., Sarzanini, C., 2010. Determination of EPA's priority pollutant polycyclic aromatic hydrocarbons in drinking waters by solid phase extraction-HPLC. Anal. Methods 2, 739.
Cesselli, D., et al., 2018. Extracellular vesicles: how drug and pathology interfere with their biogenesis and function. Front. Physiol. 9.
Conde-Vancells, J., Gonzalez, E., Lu, S.C., Mato, J.M., Falcon-Perez, J.M., 2010. Overview of extracellular microvesicles in drug metabolism. Expert Opin. Drug Metabol. Toxicol. 6, 543–554.
Curtis, A.M., et al., 2013. Endothelial microparticles: sophisticated vesicles modulating vascular function. Vasc. Med. 18, 204–214.
Fernández-Llama, P., et al., 2010. Tamm-Horsfall protein and urinary exosome isolation. Kidney Int. 77, 736–742.
Ferronato, N., Torretta, V., 2019. Waste mismanagement in developing countries: a review of global issues. Int. J. Environ. Res. Public Health 16, 1060.
Grova, N., Faÿs, F., Hardy, E.M., Appenzeller, B.M.R., 2017. New insights into urine-based assessment of polycyclic aromatic hydrocarbon-exposure from a rat model: identification of relevant metabolites and influence of elimination kinetics. Environ. Pollut. 228, 484–495.
Haarmann-Stemmann, T., Bothe, H., Abel, J., 2009. Growth factors, cytokines and their receptors as downstream targets of arylhydrocarbon receptor (AhR) signaling pathways. Biochem. Pharmacol. 77, 508–520.
Hardonnière, K., Huc, L., Sergent, O., Holme, J.A., Lagadic-Gossmann, D., 2017. Environmental carcinogenesis and pH homeostasis: not only a matter of dysregulated metabolism. Semin. Cancer Biol. 43, 49–65.
Hartjes, T., Mytnyk, S., Jenster, G., van Steijn, V., van Royen, M., 2019. Extracellular vesicle quantification and characterization: common methods and emerging approaches. Bioengineering 6, 7.
Head, B.P., Patel, H.H., Insel, P.A., 2014. Interaction of membrane/lipid rafts with the cytoskeleton: impact on signaling and function. Biochim. Biophys. Acta BBA - Biomembr. 1838, 532–545.
Holme, J.A., Brinchmann, B.C., Le Ferrec, E., Lagadic-Gossmann, D., Øvrevik, J., 2019. Combustion particle-induced changes in calcium homeostasis: a contributing factor to vascular disease? Cardiovasc. Toxicol. 19, 198–209.
Iba, T., Ogura, H., 2018. Role of extracellular vesicles in the development of sepsis-induced coagulopathy. J. Intensive Care 6.
Jaiswal, R., Sedger, L.M., 2019. Intercellular vesicular transfer by exosomes, microparticles and oncosomes - implications for cancer biology and treatments. Front. Oncol. 9.
Jorfi, S., Inal, J.M., 2013. The role of microvesicles in cancer progression and drug resistance. Biochem. Soc. Trans. 41, 293–298.
Kranendonk, M.E., et al., 2014. Extracellular vesicle markers in relation to obesity and metabolic complications in patients with manifest cardiovascular disease. Cardiovasc. Diabetol. 13, 37.
Larigot, L., Juricek, L., Dairou, J., Coumoul, X., 2018. AhR signaling pathways and regulatory functions. Biochim. Open 7, 1–9.
Lv, L.-L., Feng, Y., Tang, T.-T., Liu, B.-C., 2019. New insight into the role of extracellular vesicles in kidney disease. J. Cell Mol. Med. 23, 731–739.
Maas, S.L.N., Breakefield, X.O., Weaver, A.M., 2017. Extracellular vesicles: unique intercellular delivery vehicles. Trends Cell Biol. 27, 172–188.
Martínez, M.C., Andriantsitohaina, R., 2017. Extracellular vesicles in metabolic syndrome. Circ. Res. 120, 1674–1686.
Mayati, A., et al., 2012. Induction of intracellular calcium concentration by environmental benzo(*a*)pyrene involves a β2-adrenergic receptor/adenylyl cyclase/epac-1/inositol 1,4,5-trisphosphate pathway in endothelial cells. J. Biol. Chem. 287, 4041–4052.
Musante, L., et al., 2015. A simplified method to recover urinary vesicles for clinical applications and sample banking. Sci. Rep. 4, 7532.
Nawaz, M., Fatima, F., Squire, J.A., 2017. Mining extracellular vesicles for clinically relevant noninvasive diagnostic biomarkers in cancer. In: Wang, J. (Ed.), Novel Implications of Exosomes in Diagnosis and Treatment of Cancer and Infectious Diseases. InTech. https://doi.org/10.5772/intechopen.69406.
Palomo, L., et al., 2018. Abundance of cytochromes in hepatic extracellular vesicles is altered by drugs related with drug-induced liver injury. Hepatol. Commun. 2, 1064–1079.
Pergoli, L., et al., 2017. Extracellular vesicle-packaged miRNA release after short-term exposure to particulate matter is associated with increased coagulation. Part. Fibre Toxicol. 14.
Pisitkun, T., Shen, R.-F., Knepper, M.A., 2004. Identification and proteomic profiling of exosomes in human urine. Proc. Natl. Acad. Sci. 101, 13368–13373.
Pollet, H., Conrard, L., Cloos, A.-S., Tyteca, D., 2018. Plasma membrane lipid domains as platforms for vesicle biogenesis and shedding? Biomolecules 8, 94.
Rak, J., 2013. Extracellular vesicles – biomarkers and effectors of the cellular interactome in cancer. Front. Pharmacol. 4.
Record, M., Silvente-Poirot, S., Poirot, M., Wakelam, M.J.O., 2018. Extracellular vesicles: lipids as key components of their biogenesis and functions. J. Lipid Res. 59, 1316–1324.
Reiners, J.J., Clift, R.E., 1999. Aryl hydrocarbon receptor regulation of ceramide-induced apoptosis in murine hepatoma 1c1c7 cells: a function independent of aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator. J. Biol. Chem. 274, 2502–2510.
Remoundou, K., Koundouri, P., 2009. Environmental effects on public health: an economic perspective. Int. J. Environ. Res. Public Health 6, 2160–2178.
Ryu, A.-R., Kim, D.H., Kim, E., Lee, M.Y., 2018. The potential roles of extracellular vesicles in cigarette smoke-associated diseases. Oxid. Med. Cell. Longev. 2018, 1–8.
Shedden, K., Xie, X.T., Chandaroy, P., Chang, Y.T., Rosania, G.R., 2003. Expulsion of small molecules in vesicles shed by cancer cells: association with gene expression and chemosensitivity Profiles1,2. Cancer Res. 63, 4331–4337.
Soekmadji, C., Nelson, C.C., 2015. The emerging role of extracellular vesicle-mediated drug resistance in cancers: implications in advanced prostate cancer. BioMed Res. Int. 2015, 1–13.
Srogi, K., 2007. Monitoring of environmental exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons: a review. Environ. Chem. Lett. 5, 169–195.
Tekpli, X., et al., 2010. Membrane remodeling, an early event in benzo[α]pyrene-induced apoptosis. Toxicol. Appl. Pharmacol. 243, 68–76.
Tekpli, X., Holme, J.A., Sergent, O., Lagadic-Gossmann, D., 2013. Role for membrane remodeling in cell death: implication for health and disease. Toxicology 304, 141–157.
Théry, C., Amigorena, S., Raposo, G., Clayton, A., 2006. Isolation and characterization of exosomes from cell culture supernatants and biological fluids. Curr. Protoc. Cell Biol. 30, 3.22.1-3.22.29.
Turturici, G., Tinnirello, R., Sconzo, G., Geraci, F., 2014. Extracellular membrane vesicles as a mechanism of cell-to-cell communication: advantages and disadvantages. Am. J. Physiol. Cell Physiol. 306, C621–C633.
van Meteren, N., et al., 2019. Polycyclic aromatic hydrocarbons can trigger a hepatocyte release of extracellular vesicles by various mechanisms of action depending on their affinity for aryl hydrocarbon receptor. Toxicol. Sci. https://doi.org/10.1093/toxsci/kfz157.
Verderio, C., Gabrielli, M., Giussani, P., 2018. Role of sphingolipids in the biogenesis and biological activity of extracellular vesicles. J. Lipid Res. 59, 1325–1340.
Wang, J.W., et al., 2013. Plasma extracellular vesicle protein content for diagnosis and prognosis of global cardiovascular disease. Neth. Heart J. 21, 467–471.

Wang, H.-C., et al., 2018. Aryl hydrocarbon receptor signaling promotes ORMDL3-dependent generation of sphingosine-1-phosphate by inhibiting sphingosine-1-phosphate lyase. Cell. Mol. Immunol. https://doi.org/10.1038/s41423-018-0022-2.

Yáñez-Mó, M., et al., 2015. Biological properties of extracellular vesicles and their physiological functions. J. Extracell. Vesicles 4, 27066.

Supplementary data

Average diameter	S-EVs	L-EVs
DMSO	160.1 ± 12.6	295.8 ± 13.2
B[a]P	159.4 ± 20.7	301.2 ± 19

Figure S1: Average diameter of both S-EVs and L-EVs produced by endothelial HMEC-1 cells treated with B[a]P or vehicle (DMSO) for 24h. Results are means ± SEM for at least three independent experiments.

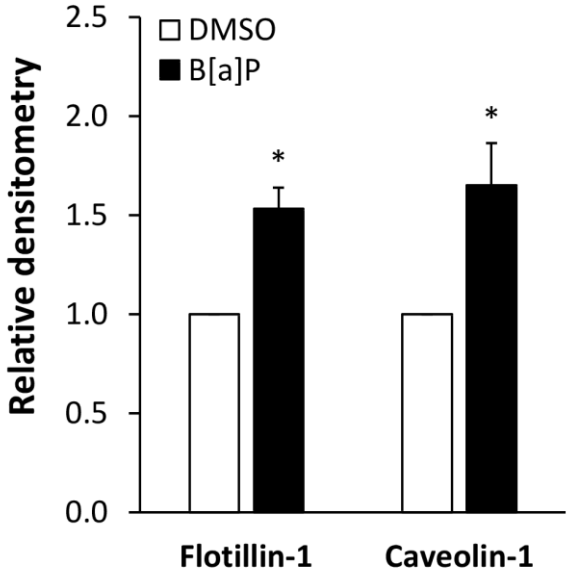


Figure S2: Densitometric analysis of Western blot assays for the induction of flotillin-1 and caveolin-1 detected in S-EVs in presence of B[a]P. HMEC-1 cells were exposed to vehicle (DMSO) or 100 nM B[a]P for 24h. S-EVs were isolated by differential ultracentrifugation. Data are expressed relative to protein expression level, arbitrarily set at 1 unit, and are shown as means ± SEM of three or more independent assays. *$p < 0.05$ significantly different from unexposed control.

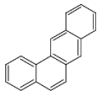
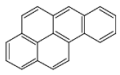
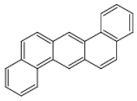
	B[e]P	PYR	B[a]A	B[a]P	DBA
Chemical Structure					
Genomic AhR activation potency. XRE dependant. relative to B(a)P[a]	0.002	0.08	0.4	1	11.5
Genotoxicity[b]	equivocal	no	yes	yes	yes
Carcinogenicity[c] (IARC classification)	3	3	2B	1	2A
Estimate of the mean intake through food (adulte non-smoker) ng/day/person (range of mean values)[d]	200	600-1090	<20-410	50-290	<10-80

Figure S3: List of the tested PAHs, including chemical structures, genomic AhR activation potency, genotoxicity, carcinogenicity and the mean intake through food. a, Machala M, Vondrácek J, Bláha L, Ciganek M, Neca JV. Aryl hydrocarbon receptor-mediated activity of mutagenic polycyclic aromatic hydrocarbons determined using in vitro reporter gene assay. Mutat Res. 2001 Oct 18;497(1-2):49-62. b, US-EPA, 2010. Development of a Relative Potency Factor (RPF) Approach for Polycyclic Aromatic Hydrocarbon (PAH) Mixtures (External Review Draft). U.S. Environmental Protection Agency, Washington, DC. EPA/635/R-08/012A. c, IARC, 2010. Some non-heterocyclic polycyclic aromatic hydrocarbons and some related exposures. IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risksto Humans, V92. IARC Monogr Eval Carcinog Risks Hum 2010;92:1-853. d, Choi H, Harrison R, Komulainen H, et al. Polycyclic aromatic hydrocarbons. In: WHO Guidelines for Indoor Air Quality: Selected Pollutants. Geneva: World Health Organization; 2010. 6. Available from: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK138709/.

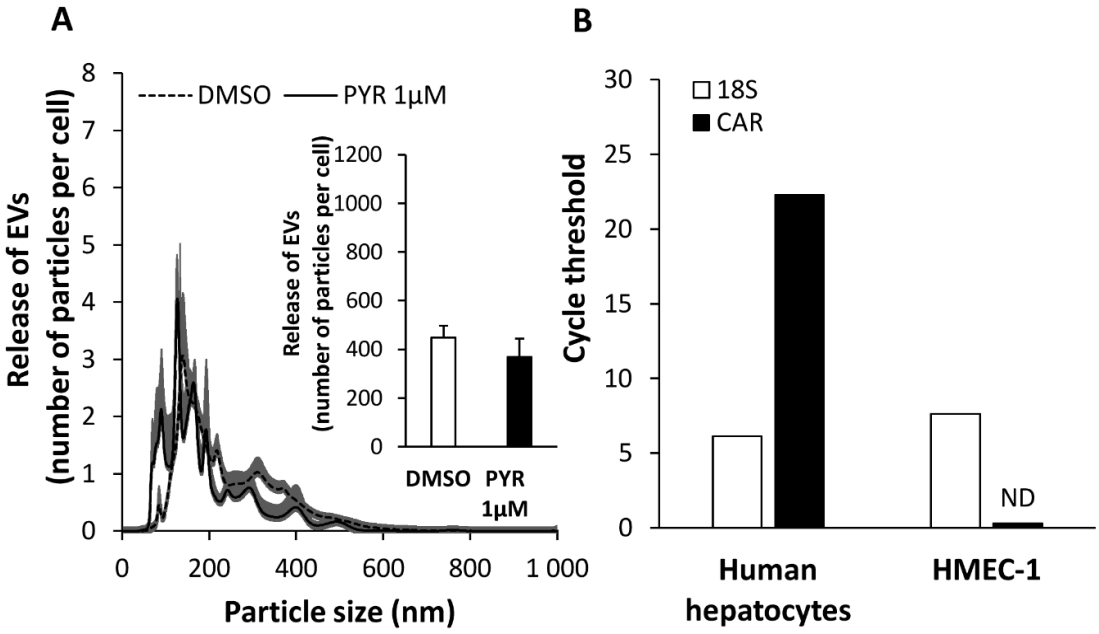


Figure S4: Effect of a high concentration (1 µM) of pyrene on EV production by HMEC-1 cells. Total EVs were isolated by ultracentrifugation and analyzed by Nanoparticle Tracking Analysis (NTA). (**A**) Size distribution profile by NTA of EVs produced by endothelial cells during 24h at 1 µM PYR. Inserts: amount of EVs released per endothelial cell. Data are the means ± SEM of three independent assays. (**B**) mRNA level of Constitutive Androstane Receptor (CAR) determined by RT-qPCR (mRNA extract of human hepatocytes were used as positive control).

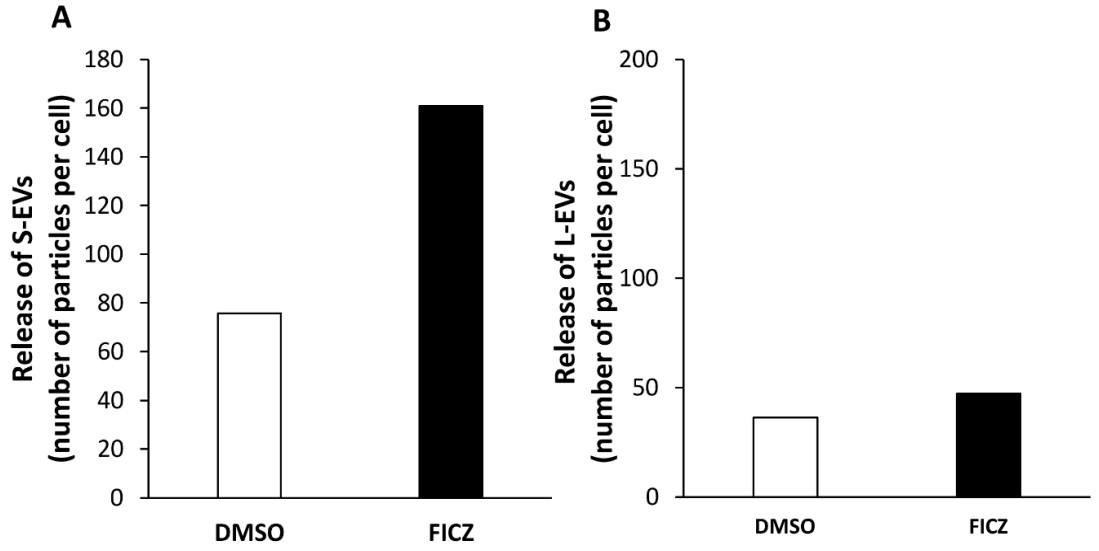


Figure S5: Effect of 6-formylindolo[3,2-b]carbazole (FICZ, 100nM, 24h) on EV production by HMEC-1 cells. Amounts of (A) S-EVs and (B) L-EVs released per endothelial cell were analyzed by Nanoparticle Tracking Analysis (NTA). Data are the means of two independent experiments.

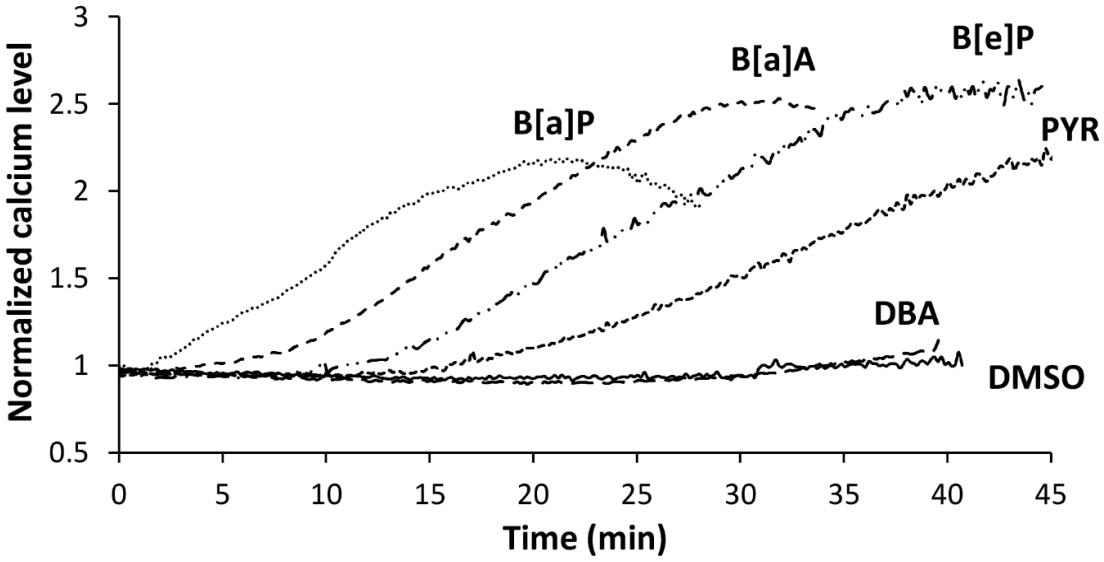


Figure S6: PAH effect on intracellular Ca^{2+} concentrations ($[Ca^{2+}]_i$) in endothelial HMEC-1 cells. HMEC-1 cells were exposed to vehicle (DMSO) or 100 nM of B[e]P, PYR, B[A]A, B[a]P or DBA. $[Ca^{2+}]_i$ was measured as described in Materials and Methods. The figure displays continuous recordings (from 0 to 45 min), of the mean normalized calcium level of three independent experiments.

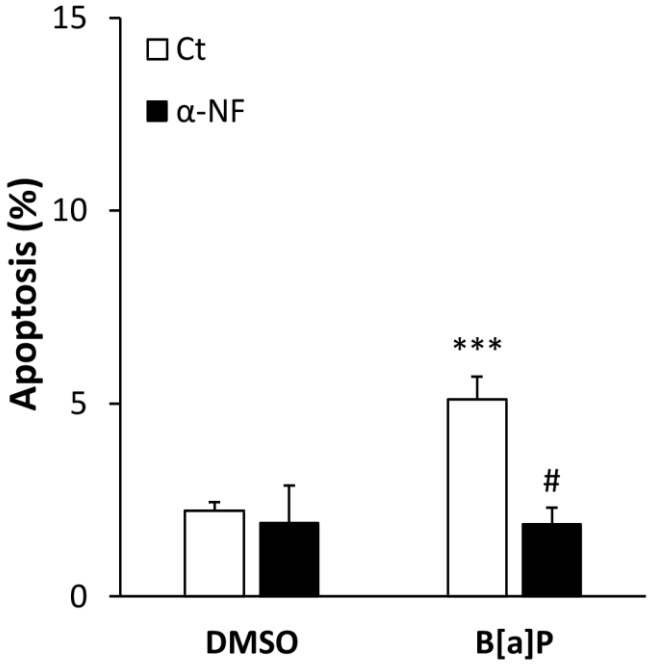


Figure S7: Effect of α-NF on apoptosis induced by B[a]P in HMEC-1 cells. HMEC-1 cells were exposed to vehicle (DMSO) or 100 nM of B[a]P during 24 h in presence or not of α-NF at 10 µM. Apoptosis evaluation was performed using fluorescence microscopy and Hoechst/Sytox green staining as described in Materials and Methods. Data are the means ± SEM of three independent assays. ***$p < 0.001$ significantly different from unexposed control. $^{\#}p < 0.05$ significantly different from B[a]P-treated cells.

Article n°2 :

Protective Action of *Ostreococcus tauri* and *Phaeodactylum tricornutum* Extracts towards Benzo[a]Pyrene-Induced Cytotoxicity in Edothelial Cells

Manon Le Goff, Antoine Delbrut, Marie Quinton, Rémi Pradelles, Maelle Bescher, Agnès Burel, Benoît Schoefs, Odile Sergent, Dominique Lagadic-Gossmann, Eric Le Ferrec* et Lionel Ulmann*.
** : Contributions équivalentes*

Marine Drugs. 2020, 18, 3. doi : 10.3390/md18010003

Les microalgues marines sont des microorganismes photosynthétiques de plus en plus utilisées comme compléments alimentaires pour la nutrition humaine. Elles sont connues pour être une source de molécules bioactives issues de leur propre métabolisme (AGPI, caroténoïdes,…). Certains de ces sous-produits ont démontré un intérêt potentiel pour la santé humaine, notamment des propriétés anti-inflammatoires, anticancéreuses et préventives des maladies cardiovasculaires (MCV). Le B[a]P connu pour exercer un large éventail d'effets toxiques sur la santé, contribue au développement et/ou à l'aggravation des MCV et des cancers. Le fait que certains sous-produits présents dans les microalgues sont connus pour moduler la pharmacocinétique des xénobiotiques et ainsi prévenir et/ou réduire leurs effets nocifs, rend les microalgues attrayantes dans la prévention des effets toxiques induits par ces xénobiotiques. Dans ce contexte, nous nous sommes intéressés à l'effet protecteur potentiel de deux extraits de microalgues d'origines marines sur la toxicité induite par le B[a]P dans les cellules endothéliales HMEC-1.

Les extraits de microalgues fournis par la société Microphyt (Baillargues, France) sont des extraits éthanoliques bruts d'*Ostreoccocus tauri* (OT) et de *Phaeodactylum tricornutum* (PT), renfermant la totalité des molécules organiques d'intérêt (acides gras, caroténoïdes…). Nous avons analysé la composition en pigments (chlorophylles et caroténoïdes) et en acides gras dans nos extraits par spectrophotométrie UV-Vis et par chromatographie en phase gazeuse, respectivement. Le pigment principal détecté dans les deux extraits de microalgues est la chlorophylle *a*. D'autres chlorophylles ont été identifiées dans les extraits : la chlorophylle *c* pour l'extrait PT et la chlorophylle *b* pour l'extrait OT. La teneur en caroténoïdes totaux dans l'extrait PT s'est révélée deux fois plus élevée que dans l'extrait OT. Le caroténoïde majoritairement présent dans l'extrait PT est la fucoxanthine alors qu'il s'agit du β-carotène pour l'extrait OT. D'autres caroténoïdes inhabituels ont été détectés dans l'extrait OT dont la dihydrolutéine, le micromonal, la prasinoxanthine et la néoxanthine. En ce qui concerne la composition en acides gras, l'extrait PT s'est révélé riche en EPA (C20:5 ω3) avec un pourcentage molaire de 40% des acides gras totaux. L'extrait OT a montré des teneurs en DHA (C22:6 ω3) de 7,7% des acides gras totaux.

Afin de déterminer les concentrations de travail pour les extraits et le B[a]P, et pour vérifier que la coexposition (microalgues + B[a]P) n'induisait pas de surmortalité, nous avons mesuré la viabilité cellulaire par un test MTT sur les cellules HMEC-1. Nous avons choisi, pour

la suite des expériences, la concentration de 2 µM de B[a]P et les concentrations de 0,1, 1 et 5 µg/mL d'extrait de microalgues dans le but de déterminer si les extraits pouvaient influencer la toxicité induite par le B[a]P. Nous avons focalisé notre attention sur quatre phénomènes cellulaires reliés à la toxicité du B[a]P. Nous avons donc étudié les effets des deux extraits sur 1) le taux d'ARNm codant des cytokines pro-inflammatoires (IL-8, IL-1β) ; 2) le taux d'ARNm codant une enzyme de bioactivation du B[a]P, le CYP1A1 ; 3) l'apoptose des cellules HMEC-1 et 4) la production de vésicules extracellulaires par ces cellules. Des deux extraits, l'extrait OT semble le plus efficace. En effet, nous avons observé qu'il pouvait réduire l'ensemble des effets du B[a]P étudié à savoir : l'induction de l'expression des cytokines pro-inflammatoires (IL-8, IL1-β), de l'apoptose, de l'expression du CYP1A1, et la production de vésicules extracellulaires. En ce qui concerne l'extrait PT, en dehors de l'inhibition de l'induction de l'expression de la cytokine IL-8 par la B[a]P, nous n'avons pas observé d'effet significatif sur les marqueurs de toxicité du B[a]P étudiés.

Cette première étude qui devra être complétée semblent indiquer que l'extrait OT peut être envisagé comme élément de protection vis-à-vis de la toxicité dépendante du B[a]P. A plus long terme, dans le cadre d'une chimiopropylaxie (prévention de certaines maladie par l'administration d'une ou plusieurs molécules naturelles ou synthétiques), il pourrait être intéressant d'envisager son utilisation dans la prévention des MCV ou des cancers induits par l'exposition à ce contaminant de l'environnement, dans la mesure ou l'exposition des individus est inévitable.

marine drugs

MDPI

Article

Protective Action of *Ostreococcus Tauri* and *Phaeodactylum Tricornutum* Extracts towards Benzo[a]Pyrene-Induced Cytotoxicity in Endothelial Cells

Manon Le Goff [1,2], Antoine Delbrut [3], Marie Quinton [3], Rémi Pradelles [3], Maelle Bescher [2], Agnès Burel [4], Benoît Schoefs [5], Odile Sergent [2], Dominique Lagadic-Gossmann [2], Eric Le Ferrec [2,*,†] and Lionel Ulmann [1,*,†]

1 EA 2160 Mer Molécules Santé—MIMMA, IUML FR-3473 CNRS, Le Mans Université, F-53020 Laval, France; manon.le_goff@univ-lemans.fr (M.L.G.)
2 Univ Rennes, Inserm, EHESP, Irset (Institut de recherche en santé, environnement et travail)—UMR_S 1085, F-35000 Rennes, France; maelle.bescher@univ-rennes1.fr (M.B.); odile.sergent@univ-rennes1.fr (O.S.); dominique.lagadic@univ-rennes1.fr (D.L.-G.)
3 Microphyt, 713 Route de Mudaison, 34630 Baillargues, France; antoine.delbrut@microphyt.eu (A.D.); marie.quinton@microphyt.eu (M.Q.); remi.pradelles@microphyt.eu (R.P.)
4 Univ Rennes, Biosit–UMS 3480, US_S 018, F-35000 Rennes, France; agnes.burel@univ-rennes1.fr (A.B.)
5 EA 2160 Mer Molécules Santé—MIMMA, IUML FR-3473 CNRS, Le Mans Université, F-72000 Le Mans, France; benoit.schoefs@univ-lemans.fr (B.S.)
* Correspondence: eric.leferrec@univ-rennes1.fr (E.L.F.); lionel.ulmann@univ-lemans.fr (L.U.); Tel.: +33-(0)223-236-205 (E.L.F.); +33-(0)244-022-473 (L.U.)
† Equal supervision.

Received: 4 November 2019; Accepted: 14 December 2019; Published: 18 December 2019

Abstract: Marine microalgae are known to be a source of bioactive molecules of interest to human health, such as *n*-3 polyunsaturated fatty acids (*n*-3 PUFAs) and carotenoids. The fact that some of these natural compounds are known to exhibit anti-inflammatory, antioxidant, anti-proliferative, and apoptosis-inducing effects, demonstrates their potential use in preventing cancers and cardiovascular diseases (CVDs). Benzo[a]pyrene (B[a]P), a polycyclic aromatic hydrocarbon (PAH), is an ubiquitous environmental pollutant known to contribute to the development or aggravation of human diseases, such as cancer, CVDs, and immune dysfunction. Most of these deleterious effects are related to the activation of the polycyclic aromatic hydrocarbon receptor (AhR). In this context, two ethanolic microalgal extracts with concentrations of 0.1 to 5 µg/mL are tested, *Ostreoccoccus tauri* (OT) and *Phaeodactylum tricornutum* (PT), in order to evaluate and compare their potential effects towards B[a]P-induced toxicity in endothelial HMEC-1 cells. Our results indicate that the OT extract can influence the toxicity of B[a]P. Indeed, apoptosis and the production of extracellular vesicles were decreased, likely through the reduction of the expression of CYP1A1, a B[a]P bioactivation enzyme. Furthermore, the B[a]P-induced expression of the inflammatory cytokines IL-8 and IL1-β was reduced. The PT extract only inhibited the expression of the B[a]P-induced cytokine IL-8 expression. The OT extract therefore seems to be a good candidate for counteracting the B[a]P toxicity.

Keywords: *Ostreococcus tauri*; *Phaeodactylum tricornutum*; benzo[a]pyrene; endothelial cells; cell protection; cytokines; cell viability; mRNA expression; extracellular vesicles; aryl hydrocarbon receptor

1. Introduction

Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs), generated during the incomplete combustion of organic matter, constitute an ubiquitous family of environmental contaminants. Humans are exposed to PAHs through various sources, including water and skin contact but mainly through ambient air and food [1]. PAHs are known to contribute to the development or aggravation of human diseases, such as cardiovascular diseases (CVDs), cancer, and immune dysfunction [2–4]. Benzo[a]pyrene (B[a]P), the prototype of polycyclic aromatic hydrocarbons, is classified into group 1, i.e., carcinogenic to humans, by the International Agency for Research on Cancer (IARC), and is among the priority toxic substances according to the US Environmental Protection Agency (US-EPA) as well as the World Health Organization (WHO) [5,6]. B[a]P exerts a wide range of toxic effects, including carcinogenic, pro-inflammatory, and apoptotic effects [7,8]. Most of these deleterious effects are related to the activation of the polycyclic aromatic hydrocarbon receptor (AhR) [9]. The binding and activation of AhR by B[a]P induces the transcription of many genes involved in its own metabolism, including enzymes that metabolize xenobiotics, such as cytochrome P450s (e.g. CYP1A1).

Numerous studies have shown that diet can modulate the response of organisms to the absorption, distribution, metabolism, and excretion of xenobiotics [10,11]. Furthermore, some diets containing pigments (carotenoids: astaxanthin, fucoxanthin, and so forth) and long-chain polyunsaturated fatty acids (eicosapentaenoic acid [EPA] and docosahexaenoic acid [DHA]), also present in microalgae, have shown their effectiveness in preventing CDVs and modulating carcinogenesis [12–14]. Moreover, numerous studies have suggested that many natural dietary compounds are able to prevent or reduce the adverse effects of xenobiotics on human health [15]. Indeed, it has been shown that polyunsaturated fatty acids (PUFAs) played a protective role in B[a]P-induced carcinogenesis by significantly reducing DNA adduct levels [16]. It has also been reported that the green alga *Chlorococcum humiloca*, rich in carotenoids, inhibits the genotoxicity of B[a]P in human lymphocytes [17]. Thus, these studies support the hypothesis that microalgae can be used as a protective agent. The prevention of food of a chemically related toxicity is an attractive strategy to counteract the development of diseases and promote health [18,19]. Although microalgae have desirable biological activities to control diseases like CVDs, information on the effectiveness of their protective action towards toxicity induced by environmental pollutants is still lacking.

Microalgae are photosynthetic microorganisms living mainly in aquatic environments. They are used for the production of biofuel, for the biomerization of polluted environments, in aquaculture, and cosmetology, but also as food supplements for animal and human nutrition [20–23]. Although the number of microalgal species is estimated between 200,000 and 800,000, only a few are used for food applications [21]. At present, in the European Union, the microalgae *Odontella aurita*, *Arthrospira sp.*, *Chlorella sp.*, and *Tetraselmis chuii* are authorized as food algae and the oils extracted from *Schizochytrium*, *Ulkenia*, and *Haematococcus pluvialis* have been approved as novel food ingredients [24]. Hence, there is a real major issue to study new microalgal species with a view to their potential exploitation as new human food products. Microalgal culture has also several advantages. Indeed, these microorganisms have a high growth rate, their cultivation does not use arable land, and they already are considered an interesting alternative source to fishery resources [25].

In addition, the composition of microalgae was revealed to be an excellent source of useful by-products such as PUFAs, pigments, antioxidants, lipids, and vitamins from their own metabolism [26]. Moreover, some of these metabolites have shown biological activities for human health, including antiviral, antimicrobial, antioxidant, anti-inflammatory, anticancer, and CVD prevention properties [26–28].

The green microalga *Ostreococcus tauri* (OT) belongs to the *Mamiellophyceae* that is the major class in the picoeukaryotic phytoplankton [29]. In this microalga, genes involved in the omega-3 PUFA synthesis, with front-end delta-6 and delta-4 desaturases [30] and elongases involved in C18 and C20 PUFAs conversion, have been identified and characterized [31]. According to these metabolic pathways, OT is able to synthesize 16:4*n*-3, 18:4*n*-3, and 22:6*n*-3 that are the most predominant fatty

acids, representing more than 39% of total fatty acids with about 13% of 22:6*n*-3 [32]. This microalga is also rich in pigments such as chlorophyll b, Mg-2,4-divinyl pheoporphyrin, and unusual carotenoids, the composition of which being not firmly established as micromonal, neoxanthin, dihydrolutein, prasinoxanthin, and uriolide [33,34]. Among these, neoxanthin has been shown to reduce cell viability through apoptosis induction in human prostate cancer cells [35] and extracts containing prasinoxanthin were reported to have antioxidant properties [36].

Phaeodactylum tricornutum (PT) is a marine pennate diatom belonging to the class of the *Bacillariophyceae*. This microalga is used on an industrial scale in aquaculture feed because of its high content of PUFAs, and specifically EPA [37–39]. PT is also rich in carotenoids, mainly fucoxanthin, whose concentration is at least ten times higher than that of macroalgae compared to dry matter [40]. Many studies have shown that fucoxanthin has antioxidant, anti-tumor, anti-inflammatory, and anti-obesity effects [41]. Fucoxanthin extract from PT has been reported to have anti-inflammatory, antioxidant and anti-proliferative effects on blood mononuclear cells and on different cell lines [42]. The fact that OT and PT contain several metabolites known to have effects on human health, such as PUFAs and carotenoids, makes them of interest for disease prevention. Moreover, the presence of a mixture of these metabolites could have synergistic effects in regulating the parameters involved notably in CVDs or cancers [43].

Actually, no study has been reported on the use of extracts from the microalgae *O. tauri* and *P. tricornutum* in the prevention of CVDs induced by environmental pollutants. Thus, in this study, an endothelial cell model (HMEC-1) is used to study the potential chemopreventive effects of OT and PT extracts against adverse effects induced by B[a]P. We choose endothelial cells because they are present in multiple homeostatic functions, including the formation of blood vessels, the regulation of blood coagulation, platelet function, vascular tone, inflammatory reactions, and neoangiogenesis, in addition to their barrier function [44]. Endothelial dysfunction is associated with serious human pathologies, such as inflammation and atherosclerosis pathologies, which are themselves associated with exposure to environmental pollutants [4,45–49], and they are a well-known target of B[a]P.

The results of this study provide a better understanding of the chemopreventive effects of these two microalgal extracts on B[a]P-induced toxicity, thus supporting the use of new candidates for the prevention of diseases like CVDs induced by B[a]P exposure.

2. Results

2.1. Carotenoid and Fatty Acid Contents in P. tricornutum and O. tauri Extracts

Total chlorophylls and carotenoids contents in PT and OT ethanol extracts were determined by UV-Vis spectrophotometer (Tables 1 and 2). The main pigment detected in the two microalgal extracts is chlorophyll *a* with 5.08 g/L for PT extract and 2.51 g/L for OT extract, respectively. The presence of other chlorophylls have been identified in the extracts, chlorophyll c at 0.47 g/L for PT extract and chlorophyll b at 1.64 g/L for OT extract. The total carotenoid content in the PT extract is twice that found in the OT extract. The carotenoid composition of both extracts agrees with the algal carotenoid composition reported in the literature [50,51]. They differ between the extracts both qualitatively and quantitively. Indeed, the PT extract contains a high concentration (2.13 g/L) of fucoxanthin, the main carotenoid in this microalga. The presence of β-carotene was also detected (at 0.03 g/L) in the PT extract. In the OT extract, β-carotene at a higher concentration (0.05 g/L) than in the PT extract was also detected. Other carotenoids were detected in the OT extract but not quantified because their molar extinction coefficients in acetone were not reported [50,52]. Thus dihydrolutein, micromonal, prasinoxanthin, and neochrome were detected. Neochrome is an artifact formed from neoxanthin that is present in the OT extract by the acid-catalyzed rearrangement during isolation [52].

The total fatty acids composition of *P. tricornutum* and *O. tauri* extracts were determined by gas chromatography (Table 3). As expected, the PT extract showed a higher content of C20:5*n*-3 (EPA) representing 40 mol % of total fatty acids in the extract. The second major fatty acid found in this

extract was palmitoleic acid (C16:1*n*-7, PAL), hexadecatetraenoic acid (C16:4) and palmitic acid (C16:0) with 18, 11, and 7 mol % of total fatty acids, respectively. For the OT extract, the predominant fatty acid was oleic acid (C18:1, OA) with 23 mol % of total fatty acids. Unlike in the PT extract, the levels of stearidonic acid (C18:4*n*-3, SDA), stearic acid (C18:0), α-linolenic acid (C18:3*n*-3, ALA), and DHA (C22:6*n*-3) were of 11.5, 11, 8.5, and 7.7 mol %, respectively, in the OT extract.

Table 1. Chlorophyll contents *of P. tricornutum* and *O. tauri* extracts. Results are represented for an independent experiment. * Concentrations are calculated according to the literature.

Chlorophylls	Pigment Concentration (g/L)	
	PT	OT
Chlorophyll a	5.08	2.51
Chorophyll b *	-	1.64
Chorophyll c *	0.47	-

Table 2. Carotenoid contents *of P. tricornutum* and *O. tauri* extracts. Results are represented for an independent experiment.

Carotenoids	Absorbance Maxima (nm)	Absorbance Maxima in Literature (nm)	Pigment Concentration (g/L)	
			PT	OT
Total carotenoids			2.47	1.00
β-carotene	424,454,484	(429),454,480	0.03	0.05
Fucoxanthin	(415),443,472	(420),447,468	2.13	-
Other carotenoids				
Dihydrolutein	(−),432,462	408,428,453	-	0.08
Micromonal	422,451,477	(423),449,(472)	-	0.43
Prasinoxanthin	420,449,(−)	(426),459,(473)	-	0.10
Neochrome	(−),414,442	398,421,448	-	0.10

Table 3. Fatty acid composition of *P. tricornutum* and *O. tauri*. Results are represented as mean values ± SD for at least 3 independent experiments. ND: not detected.

Fatty Acids (mol %)	*P. tricornutum*		*O. tauri*	
	Mean	**SD**	**Mean**	**SD**
C14:0	1.18	0.43	4.20	2.80
C16:0	7.68	0.20	14.64	0.53
C16:1*n*-7	18.27	0.96	8.68	0.91
C16:2	5.28	0.29	ND	-
C16:4	11.23	1.38	ND	-
C18:0	1.88	0.32	10.91	2.69
C18:1	1.87	0.35	23.06	3.01
C18:2*n*-6	2.97	0.11	4.40	0.43
C18:3*n*-3	ND	-	8.56	0.86
C18:4*n*-3	ND	-	11.56	0.82
C20:1	ND	-	0.83	0.07
C20:2	2.08	0.26	ND	-
C20:4	3.34	0.16	0.97	0.26
C20:5*n*-3	39.91	2.91	1.16	0.18
C22:6*n*-3	1.72	0.11	7.69	1.26

2.2. Cytotoxic Effects of B[a]P and Microalgal Extracts on Endothelial HMEC-1 Cells

The next set of experiments was carried out in order to determine the cytotoxic effects of B[a]P and PT and OT extracts on endothelial HMEC-1 cells. After treatment for 24 h with various concentrations of B[a]P (0.1, 2, 5, 10 µM) and microalgal extracts (0.1, 1, 5, 10, 25, 50 µg/mL), cell viability was measured by MTT assay in HMEC-1 cells. As shown in Figure 1a, B[a]P at 2 µM significantly decreased the cell viability by 29% (Figure 1a). For microalgal extracts alone, beyond 10 µg/mL of PT and OT extracts, a significant decrease in cell viability was observed (Figure 1b,c). Following this experiment, we chose, for the rest of the experiments, the concentration of 2µM B[a]P, which allows us to determine whether microalgal extracts influenced the toxicity induced by B[a]P. For microalgal extracts, concentrations at 0.1, 1 and 5 µg/mL that do not have a significant toxic effect, were chosen to study the potential protective action of the extracts.

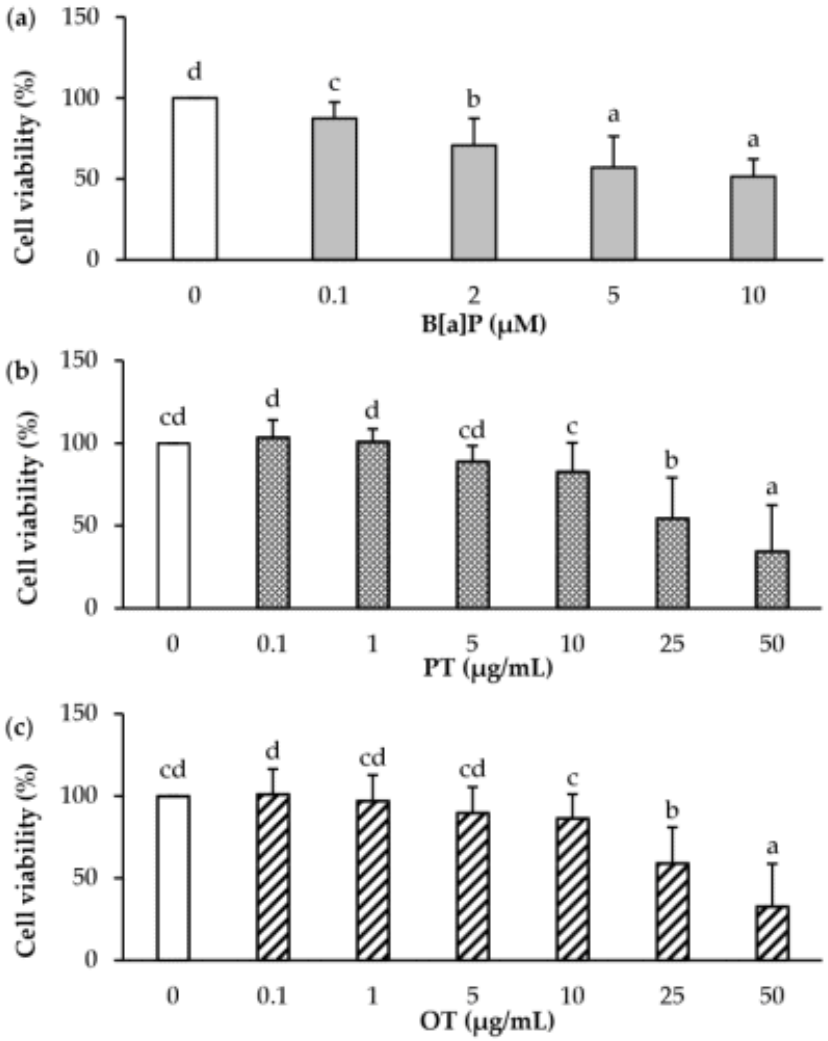


Figure 1. Cytotoxicity of B[a]P, *P. tricornutum*, and *O. tauri* extracts in endothelial HMEC-1 cells. HMEC-1 cells were exposed to vehicle (DMSO) or different concentrations of (**a**) B[a]P 0.1 μM to 10 μM or (**b**) *P. tricornutum* (PT) extract and (**c**) *O. tauri* (OT) extract at 0.1 to 50 μg/mL for 24 h. Results are represented as mean values ± SD from at least 3 independent experiments. Mean values assigned with different letters are significantly different ($p < 0.05$) with a < b < c < d.

2.3. Effect of Co-Exposure to B[a]P and Extracts of P. tricornutum or O. tauri on the Viability of Endothelial HMEC-1 Cells

To verify whether microalgal extracts could influence the cytotoxicity of B[a]P, HMEC-1 cell viability after co-exposure to 2 μM B[a]P and each extract (0.1, 1 and 5 μg/mL) for 24 h was compared to that of cells exposed to 2 μM B[a]P alone. PT and OT extracts, at any tested concentration, did not significantly influence the cytotoxicity of B[a]P (Figure 2a,b).

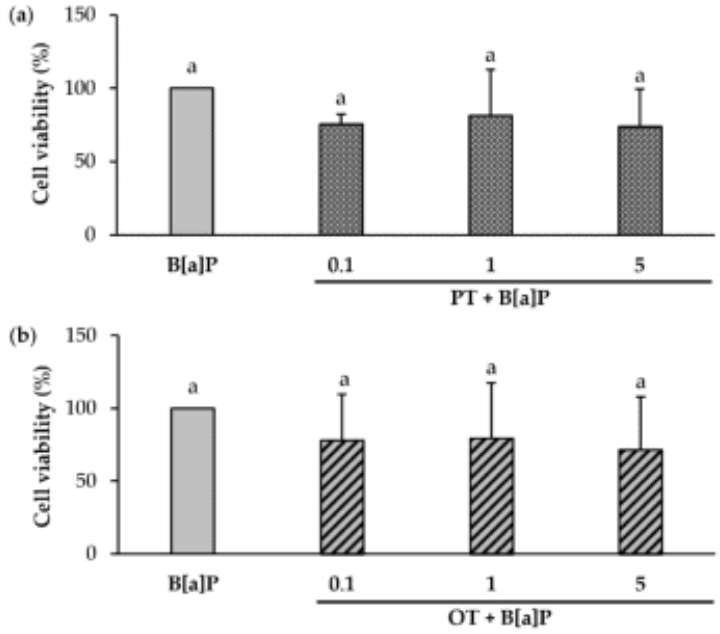


Figure 2. Effect of co-exposure to B[a]P and extracts of *P. tricornutum* or *O. tauri* on cytotoxicity in endothelial HMEC-1 cells. HMEC-1 cells were exposed to 2 µM B[a]P and (**a**) *P. tricornutum* (PT) extract and (**b**) *O. tauri* (OT) extract at 0.1 to 5 µg/mL for 24 h. Cell viability upon B[a]P treatment was set at 100% and then compared with HMEC-1 cells co-exposed with microalgal extracts. Results are represented as mean values ± SD from at least 3 independent experiments. Mean values assigned with the same letters are not significantly different ($p < 0.05$).

2.4. Effect of P. tricornutum or O. tauri Extracts on Gene Expression of Pro-Inflammatory Cytokines Induced by B[a]P

It has been reported that B[a]P is able to induce the expression of pro-inflammatory cytokines, notably in endothelial cells [53–56], and that some extracts of microalgae may have anti-inflammatory properties [57,58]. It was therefore decided to study the effects of B[a]P at 2 µM and microalgal extracts on the gene expression of several pro-inflammatory cytokines (TNF-α, IL-6, IL-8 and IL-1β) and cyclooxygenase COX-2. In endothelial HMEC-1 cells, 2 µM B[a]P did not induce COX-2, TNF-alpha, and IL-6 mRNA expressions (data not shown), unlike IL-8 and IL-1β (Figures 3 and 4).

Microalgal extracts (0.1, 1 and 5 µg/mL) were evaluated for their ability to affect the increased IL-8 and IL-1β mRNA transcription induced by 2 µM B[a]P. PT extract alone in a range of 0.1 to 5 µg/mL (Figure 3a) did not induce the expression of IL-8 mRNA compared to the control (DMSO). With regard to co-exposure with B[a]P, the PT extract significantly inhibited B[a]P-induced IL-8 mRNA expression whatever the concentration tested. Concerning the OT extract alone (Figure 3b), no induction of IL-8 mRNA expression was found. As for the PT, in combination with B[a]P, the OT extract decreased the B[a]P-induced IL-8 mRNA expression.

Regarding IL-1β mRNA expression, both microalgal extracts (0.1, 1 and 5 µg/mL) did not induce IL-1β mRNA expression compared with the control (Figure 4a,b). However, in the presence of co-exposure, the PT extract (Figure 4a) did not influence the mRNA expression of IL-1β induced by B[a]P, whatever the concentration tested. In contrast, the OT extract at 0.1 and 1 µg/mL decreased this expression (Figure 4b). However, the OT extract at 5 µg/mL did not affect the increased IL1-β mRNA transcription induced by 2 µM B[a]P. These results showed that the microalgal extracts could inhibit the gene expression of several pro-inflammatory cytokines induced by B[a]P in endothelial cells.

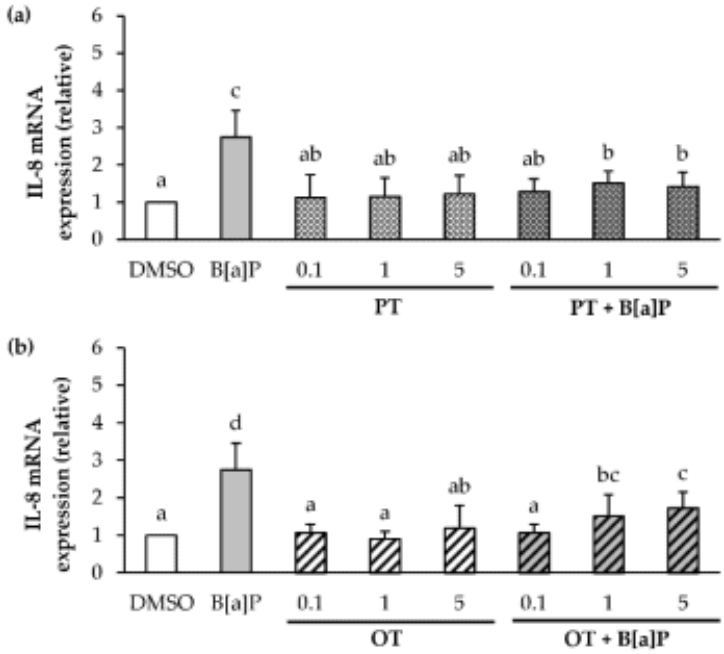


Figure 3. Effects of *P. tricornutum* and *O. tauri* extracts on B[a]P-induced IL-8 mRNA expression. mRNA expression of IL-8 was analyzed using RT-qPCR. Data are expressed relatively to mRNA levels of IL-8 found in corresponding control cells (DMSO), arbitrarily set to 1 unit. HMEC-1 cells were exposed to vehicle (DMSO) or treated with 2 µM B[a]P, or with 0.1, 1 and 5 µg/mL *P. tricornutum* (PT) extract (**a**) or *O. tauri* (OT) extract (**b**), or with a combination of the toxicant and the extract for 24 h. Results are represented as mean values ± SD from at least 3 independent experiments. Mean values assigned with different letters are significantly different ($p < 0.05$) with a < b < c < d.

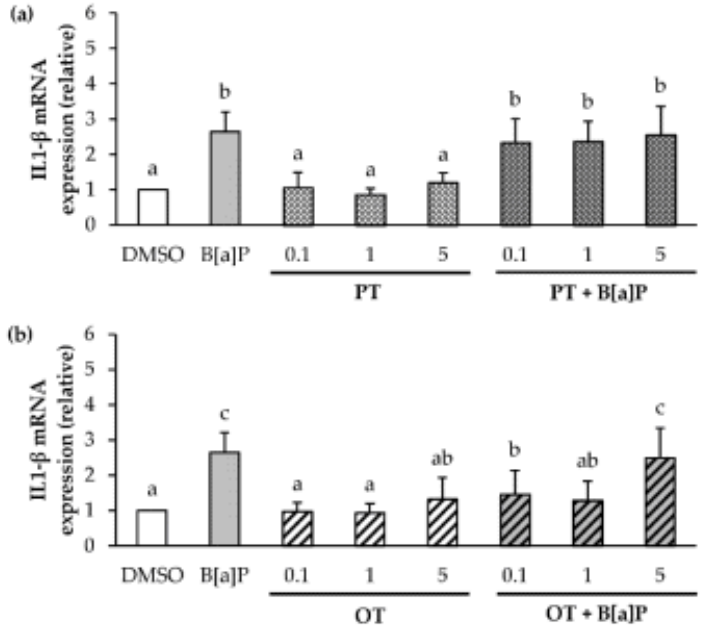


Figure 4. Effects of *P. tricornutum* and *O. tauri* extracts on mRNA expression of IL1-β in endothelial HMEC-1 cells. mRNA expression of IL1-β was analyzed using RT-qPCR. Data are expressed relatively to mRNA levels of IL1-β found in corresponding control cells (DMSO), arbitrarily set to 1 unit. HMEC-1 cells were exposed to vehicle (DMSO) or treated with 2 µM B[a]P, or 0.1, 1 and 5 µg/mL *P. tricornutum* (PT) extract (**a**) or *O. tauri* (OT) extract (**b**), or with a combination of the toxicant and the extract for 24 h. Results are represented as mean values ± SD from at least 3 independent experiments. Mean values assigned with different letters are significantly different ($p < 0.05$) with a < b < c.

2.5. Only the *O. tauri* Extract Inhibits the B[a]P-Induced Apoptosis

Since B[a]P is known to induce apoptosis [59,60], and it is also known that microalgal extracts can inhibit apoptosis in cancerous cells [61], we therefore decided to evaluate apoptosis after exposure for 24 h to B[a]P or microalgal extracts (0.1 and 5 µg/mL) alone or in co-exposure. This was performed by using fluorescence microscopy after Hoechst staining (Figure 5). Consistent with the literature, 2 µM B[a]P slightly increased the percentage of apoptotic cells by 3-fold compared with control. In contrast, the PT extract alone did not affect the apoptosis level (Figure 5a). Interestingly, the PT extract had no effect on B[a]P-induced apoptosis whatever the extract concentration used. Concerning the OT extract (Figure 5b), no induction of apoptosis was observed, whatever the concentration used. However, an inhibition of B[a]P-induced apoptosis with the OT extract at 0.1 and 5 µg/mL was observed. These results suggested that the OT extract, unlike the PT extract, could inhibit B[a]P-induced apoptosis in HMEC-1 cells.

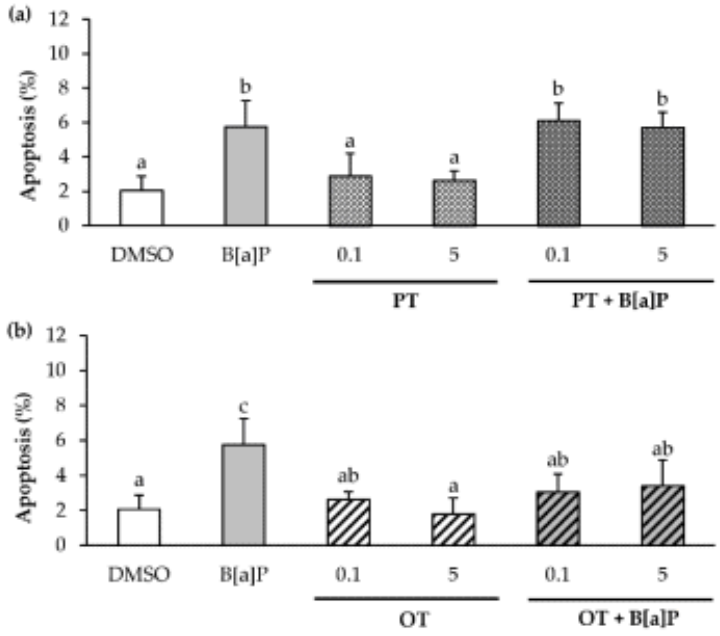


Figure 5. Effects of *P. tricornutum* and *O. tauri* extracts on B[a]P-induced apoptosis in endothelial HMEC-1 cells. HMEC-1 cells were exposed to vehicle (DMSO) or treated with 2 µM B[a]P, or with 0.1, 1 and 5 µg/mL *P. tricornutum* (PT) extract (**a**) or *O. tauri* (OT) extract (**b**), or with a combination of the toxicant and the extract for 24 h. Apoptotic nuclei were analyzed by fluorescence microscopy after staining with Hoechst 33342. Results are represented as mean values ± SD from at least 3 independent experiments. Mean values assigned with different letters are significantly different ($p < 0.05$) with a < b < c.

2.6. Effect of P. tricornutum or O. tauri Extracts on the Induction of CYP1A1 by B[a]P

Since B[a]P is metabolized by cytochrome P450 enzymes, such as CYP1A1, resulting in the formation of several metabolites, and is partly responsible for its apoptotic effects [8] and its carcinogenicity [62,63]. The effects of B[a]P or microalgal extracts (0.1, 1 and 5 µg/mL) alone or in co-exposure were investigated on CYP1A1 mRNA expression in endothelial cells exposed during 24 h (Figure 6). As expected, B[a]P at 2 µM induced the expression of CYP1A1 in endothelial HMEC-1 cells compared to the DMSO control (Figure 6). As shown in Figure 6a, the levels of CYP1A1 mRNA were markedly increased in endothelial cells treated with PT extract alone or in co-exposure when compared with their DMSO counterpart. In addition, co-exposure is more inductive than exposure to the PT extract alone. For the OT extract alone (Figure 6b), no change in CYP1A1 mRNA level compared to DMSO control was observed. However, in co-exposure, the OT extract at 0.1 µg/mL inhibited the induction of B[a]P-induced CYP1A1 mRNA. This effect was no longer observed with the

highest concentrations of extracts (1 and 5 µg/mL). Thus, the OT extract at a concentration of 0.1 µg/mL would appear to be able to inhibit the expression of CYP1A1 to mRNA unlike the PT extract.

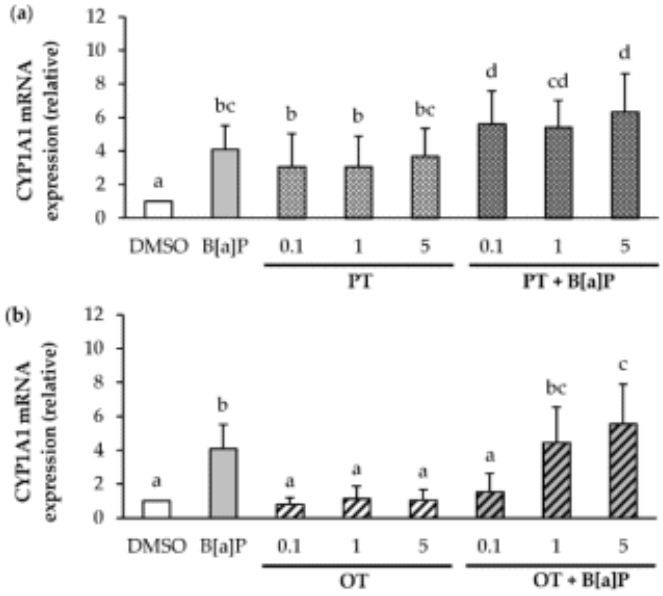


Figure 6. Effects of *P. tricornutum* and *O. tauri* extracts on B[a]P-induced CYP1A1 mRNA expression. mRNA expression of CYP1A1 was analyzed using RT-qPCR. Data are expressed relatively to mRNA levels of CYP1A1 found in corresponding control cells (DMSO), arbitrarily set to 1 unit. HMEC-1 cells were exposed to vehicle (DMSO) or treated with 2 µM B[a]P, or with 0.1, 1 and 5 µg/mL *P. tricornutum* (PT) extract (**a**) or *O. tauri* (OT) extract (**b**), or with a combination of the toxicant and the extract for 24 h. Results are represented as mean values ± SD from at least 3 independent experiments. Mean values assigned with different letters are significantly different ($p < 0.05$) with a < b < c < d.

2.7. *O. tauri* Extract Inhibits the Release of Extracellular Vesicles

According to the above results, such as IL-8, IL-1B, CYP1A1 mRNA expression and apoptosis, the 0.1 µg/mL OT extract seems to be more prone to regulate the adverse effects from B[a]P. Therefore, our work finally focused on the effect of this extract at 0.1 µg/mL to study the production of extracellular vesicles (EVs). It is known that B[a]P is responsible for endothelial dysfunction [54,64]. In addition, it has been observed that endothelial dysfunction can cause an increased shedding of endothelial extracellular vesicles that are markers of the pathophysiological state of the producing cells [65,66]. Thus the effects of B[a]P and the OT extract on EV production by the endothelial cells were investigated following a 24 h treatment. As expected from our previous work [67], NTA revealed that 2 µM B[a]P significantly stimulated EV production, unlike the OT extract used at 0.1 µg/mL (Figure 7a). In the co-exposure, an inhibition of the production of EVs induced by B[a]P was observed. NTA observation of EVs size distribution pattern (Figure 7b) showed that they had a diameter ranging from 100 nm to 600 nm, and that the OT inhibited the production of the entire EV population induced by the B[a]P regardless of their size.

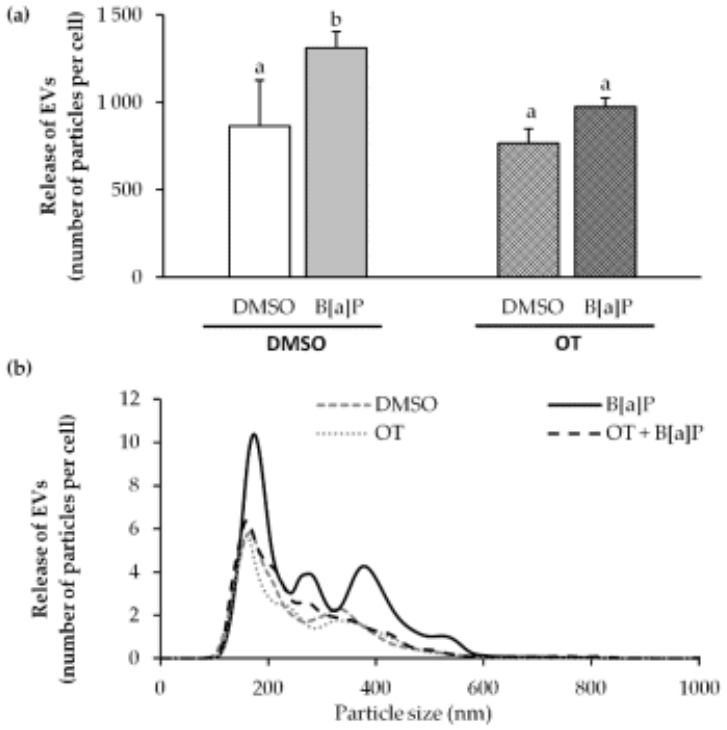


Figure 7. Effects of B[a]P and *O. tauri* extracts on the EVs released by endothelial HMEC-1 cells. HMEC-1 cells were exposed to vehicle (DMSO), 2 µM of B[a]P, 0.1 µM/mL of *O. tauri* (OT) extracts or with a combination of the toxicant and the extract for 24 h. Total EVs were isolated by ultracentrifugation and analyzed by Nanoparticle Tracking Analysis (NTA). (**a**) EV production released per HMEC-1 cells exposed with B[a]P or/and OT. (**b**) Representative size distribution profile by NTA of EVs produced by endothelial cells. Results are represented as mean values ± SD from at least 3 independent experiments. Mean values assigned with different letters are significantly different ($p < 0.05$) with a < b.

3. Discussion

Food supplementation is a promising strategy to use natural protective agents that can offer health benefits. Among these promising agents, microalgae are becoming increasingly important. Indeed, the growing interest in the use of microalgae in human health comes from their composition that is rich in molecules of interest (lipids, polysaccharides, carotenoids) known to have beneficial effects on health [27]. In addition, many studies reveal the pharmacological interest of microalgae as natural products that can offer significant benefits in CVDs, inflammation, and cancer [68–72]. In this context, our study aimed at evaluating the capacity of two microalgal extracts from the green alga *Ostreococcus tauri* (OT) and the diatom *Phaeodactylum tricornutum* (PT), to prevent harmful effects induced by an environmental pollutant, B[a]P, known to contribute to the development or aggravation of human pathologies notably CVDs [2,3]. To do so, we used a human endothelial cell model.

The two microalgal compositions tested differ in their pigment, particularly carotenoids, and fatty acid compositions. The PT extract was shown to be rich in fucoxanthin and EPA, while the OT extract is found to be rich in neoxanthin and ALA, SDA, OA, and DHA, all molecules of interest for human health [33,34,37,38,40,73].

To assess the protective effects of the OT and PT extracts on B[a]P-induced toxicity, extracts at non-toxic concentrations had to be used. When cells were exposed to the extracts alone, a cytotoxic effect was observed only at high concentrations (25–50 µg/mL). Previous in vitro studies have shown that *n*-3 PUFAs at micromolar concentrations are toxic to several cell lines [74,75]. Moreover, it has also been reported that stearic acid and palmitic acid induces cytotoxicity in human aortic endothelial cells (HAEC) [76]. Since our extracts were rich in n-3 PUFAs, DHA for OT, and EPA for PT, but also in saturated fatty acids, and even if the fatty acid concentrations were not calculated, it might be

hypothesized that the cytotoxicity observed at the highest concentrations could be attributed to these fatty acids present in both microalgal extracts.

We also verified that co-exposure to B[a]P and either extract did not induce further loss of viability as estimated by MTT test (a measure of mitochondrial activity; cf. Materials and Methods), thus validating our experimental conditions.

Since B[a]P is known to induce immune dysfunctions and microalgal extracts are involved in anti-inflammatory activities, their influence was next studied on the expression of several pro-inflammatory cytokines such as IL-8 and IL-1β. Both extracts inhibited the mRNA expression of B[a]P-induced IL-8 in HMEC-1 cells. Moreover, only the OT extract inhibited IL-1β expression induced by B[a]P. Under our test conditions, these results suggest that the OT and PT extracts have a potential to suppress inflammation by inhibiting the expression of pro-inflammatory cytokines. Despite the presence of several studies showing that microalgal extracts are anti-inflammatory, their extremely diversified composition, particularly in pigments and fatty acids, makes it difficult to attribute the biological effects observed to a single bioactive molecule contained in the extracts. However, pigments present in our extracts, such as chlorophyll α, β-carotene, and fucoxanthin have already shown anti-inflammatory activity [77–80]. Furthermore, previous studies have shown that PUFAs, such as DHA, ALA, and PAL can inhibit the expression of IL-6, IL-8, and IL-1β in many cellular models [81–84]. Since OT and PT extracts contain these pigments and these fatty acids, it is likely that there are synergistic effects between these bioactive molecules that can contribute to anti-inflammatory effects. It is interesting to note that many studies have linked the anti-inflammatory effects of compounds contained in microalgae with the inhibition of the NF-κB signaling pathway. A study on human bronchial epithelial cells also showed that EPA, by inhibiting MAPKs/NF-κB signaling, inhibits IL-8 induced by cigarette smoke extracts [85]. In another study, fucoxanthin was reported to reduce pro-inflammatory mediator levels via the inhibition of NF-κB pathway activation in murine macrophages [69]. Knowing that B[a]P is known to activate the NF-κB pathway via the production of reactive oxygen species (ROS), leading to the induction of pro-inflammatory cytokines such as IL-8 and IL-1β [54,86], it is also likely that the anti-inflammatory effects observed with our microalgal extracts might be due to an inhibition of the NF-κB pathway via the presence of PUFAs and carotenoids in our extracts.

Cytochromes P450 and in particular CYP1A1 are of crucial importance for the metabolic activation and detoxification of many xenobiotics, such as PAHs, including through the ARNT pathway (AHR/aryl hydrocarbon nuclear translocator). Modulating the expression of this bioactivation enzyme may be an appropriate strategy to prevent toxic effects and the development of CVDs, inflammation, and cancer [87,88]. In this context, we investigated the influence of microalgal extracts on the metabolism of B[a]P and, in particular, the expression of CYP1A1. Only the PT extract alone induced CYP1A1 mRNA expression but did not influence B[a]P-induced CYP1A1 induction. The induction of CYP1A1 expression could be related to the presence of carotenoids and in particular the presence of high fucoxanthin in the PT extract. Indeed, in previous studies, Satomi et al. [89], showed that fucoxanthin significantly induced CYP1A1 mRNA in the hepatocellular carcinoma cell line HepG2. Concerning the OT extract, an inhibition of the B[a]P-induced CYP1A1 mRNA expression was observed in our endothelial cell model, at a concentration of 0.1 µg/mL only. It has previously been demonstrated that co-treatment of DHA and B[a]P resulted in an increase in CYP1A1 and CYP1B1 mRNA expression and B[a]P metabolism, resulting in increased DNA adduct levels in rat liver epithelial F258 cells [90]. However, it was also found in HUVEC cells, another endothelial cell model, that supplementation with DHA significantly decreased the B[a]P-induced CYP1A1 mRNA expression [91]. The fact that studies show that co-exposure to DHA and B[a]P could exert opposite effects on B[a]P-induced CYP1A1 mRNA expression thus could be cell-type dependent.

Moreover, an inhibitory effect has been observed only at the lowest concentration of OT. Molecules other than lipids and pigments are present in microalgae and in particular flavonoids [92]. These molecules can act as AhR agonists and effectively induce AhR activation and CYP1A1

production [93]. Although the flavonoid composition has not been investigated in our microalgal extracts, it can thus be hypothesized that since CYP1A1 is regulated by AhR activation, the flavonoids present in the OT extract, at higher concentrations, might become competitors for AhR activation and CYP1A1 induction with regard to B[a]P.

It has already been shown that B[a]P induces death in many cell models [94,95]. We therefore decided to study the effect of microalgal extracts on B[a]P-induced apoptosis in our endothelial model. B[a]P induced apoptosis in HMEC-1 cells unlike cells exposed to microalgal extracts alone. We have shown that only the OT extract protected against B[a]P-induced apoptosis. Interestingly, it is well known that the activation of AhR and CYP1A1 plays an important role in B[a]P-induced apoptosis [95]. Moreover, the fact that only the OT extract and not the PT one was able to inhibit CYP1A1 expression is consistent with the inhibition of B[a]P-induced apoptosis. Thus, the inhibition of CYP1A1 expression and apoptosis induced by the OT extract may be due to its high DHA content, as previously demonstrated [16]. In addition, the OT extract contains other fatty acids, such as ALA and OA, not present or weakly present in the PT extract. These fatty acids have already shown protective effects against apoptosis. Indeed, ALA offered a protective effect of H_2O_2-induced apoptosis by inhibiting the NF-κB signaling pathway in HAECS endothelial cells [96]. OA also showed an inhibitory effect of stearic acid-induced apoptosis in these same cells [97]. Thus, the presence of these fatty acids in the OT extract may contribute with DHA to the anti-apoptotic effect observed with the OT extract.

Several studies have shown that damage to endothelial cells can lead to an increase in the release of extracellular vesicles (EVs) that are markers of the pathophysiological state of the producing cells [98]. Moreover, we have recently demonstrated that B[a]P is able to stimulate the production of EVs from endothelial cells [67] and to increase membrane fluidity by cholesterol-depletion involved in the release of EVs in B[a]P-treated hepatocytes [99]. The fact that the OT extract seems more inclined to regulate the harmful effects of B[a]P, the production of EVs under the influence of this extract was then studied. We found that it inhibited such a production. The influence of *n*-3 PUFAs on the production of EVs has already been reported. Indeed, it has previously been described by Wu et al. [100] that fish oil supplementation (rich in EPA and DHA) reduces the number of circulating endothelial extracellular vesicles. The inhibition of EVs by the OT extract could be due to the presence of high levels of *n*-3 PUFAs, among which is DHA, as has been reported with fish oil supplementation [79]. These results suggest that the OT extract is able to reduce endothelial damage induced by B[a]P. Interestingly, it has previously been demonstrated that DHA can interfere with B[a]P-induced membrane remodeling [90]. Since membrane remodeling is a key element in EV production, it is possible that the DHA present in our OT extract inhibited the B[a]P-induced membrane remodeling and hence the related release of EVs.

Overall, our data indicate that the OT extract can reduce the toxicity of B[a]P by decreasing the expression of the inflammatory cytokine (IL-8, IL1-β), apoptosis, the B[a]P bioactivation enzyme CYP1A1, and extracellular vesicle production. The PT extract inhibited only the B[a]P-increased expression of the pro-inflammatory cytokine IL-8. According to our data, the OT extract seems to be a good candidate as a dietary component that can reduce B[a]P-induced toxicity, making it of interest for the prevention of diseases, such as CVDs, induced by exposure to this environmental pollutant. However, further research is needed to determine whether the observed effects are mainly due to fatty acids (e.g. PUFAs *n*-3) or to carotenoids present in OT extract, or whether it is due to a synergistic effect of these molecules. Although the objective of this study was not to conduct an in vivo study, this would be necessary to complete this work. Indeed, an in vivo study would allow us to get closer to human nutritional protocols. In addition, these protocols would allow us to evaluate the bioavailability and bio accessibility of pigments and PUFAs provided by our microalgal extracts. These two steps are important factors to know and understand the real biological role of these molecules.

4. Materials and Methods

4.1. Chemicals and Reagents

Benzo[a]pyrene (B[a]P), dimethyl sulfoxide (DMSO) were obtained from Sigma-Aldrich (Saint-Quentin Fallavier, France), and MTT (Thiazolyl Blue tetrazolium bromide) was provided from Interchim (Montluçon, Fance). All other chemicals used in this study were purchased from commercial sources at the highest purity available. Chemicals were prepared as stock solutions in DMSO. The final concentration of vehicle did not exceed 0.2% (*v*/*v*); control cultures received the same concentration of DMSO.

4.2. Microalgal Cultivation

The marine microalgae PT and OT were grown by Microphyt (Baillargues, France) in 5000 L photobioreactors (PBR) consisting of 1.2 km of glass tubes with co-circulation of liquid medium and CO_2 enriched air [101,102]. The PBR was set under a greenhouse in order to control the temperature (between 20 °C and 30 °C) and the intensity of the natural light by using curtains. The pH set point of 7.5 was automatically controlled by CO_2 injection and monitored by an inline Fermprobe F-235 pH probe from Broadley James (Silsoe, United Kingdom). Air was injected continuously at a rate of 20 L·min^{-1}. The culture medium used is a marine type medium, corresponding to a modified *f*/2 medium. Cells were harvested by bowl centrifugation at 6,000 rpm at room temperature (maximum reachable temperature of 35 °C) using a KG 8006 centrifuge from GEA (Oelde, Germany) and concentrated at the rate of around 15%–20% dry weight. The biomass was frozen at −20 °C in polyethylene bags, and stored at −20 °C before freeze-drying.

4.3. Preparation of Ethanolic Extracts

The extractions were carried out in a dark room, at a temperature of 25 °C, under nitrogen and with agitation for 24 h. The solvent used is absolute ethanol at a ratio of 10:1 (*v*:*w*). The suspension was then centrifuged at 4000 rpm for 5 min, and the supernatant was filtered through a membrane with a porosity of 0.22 µm. The filtrate was recovered and the ethanol evaporated under nitrogen away from light at 35 °C. This crude extract was diluted in absolute ethanol to obtain a final crude extract concentration of 55.9 and 75.5 mg/mL for the extract of PT and OT, respectively. The solutions thus obtained were stored at 4 °C in the dark after inserting the head space with nitrogen. For the treatment of endothelial cells, the ethanol contained in the microalgal extracts was evaporated using a Concentrator plus from Eppendorf. After sonication on the ice, 50 mg of ethanolic extract was evaporated and centrifuged during 10 min. The extract was collected in DMSO in order to obtain an extract concentration of 50 mg/mL. The extracts were closed under argon and stored at −20 °C protected from light.

4.4. Fatty Acid Composition Analyses

Total fatty acid compositions were analyzed by gas chromatography coupled with a flame ionization detection (GC-FID). After the evaporation of the solvent from the microalgal extracts, 1 mL of 0.5 mol/L NaOH was added to the samples. The lipids were saponified by incubating the samples for 20 min at 80 °C under nitrogen. The transesterification process was carried out using 2 mL of 14% boron trifluoride in methanol (MeOH-BF_3) at 80 °C for 20 min under nitrogen. Then 1 mL of isooctane and 1 mL of 35% NaCl were added and, after shaking, the samples were centrifuged. The upper phase was carefully transferred to the anhydrous sodium sulphate column for drying samples. Fatty acid methyl esters (FAMEs) were analyzed by using a FOCUS gas chromatography instrument (Thermo Electron Corporation, Les Ulis, France) equipped with a capillary column CP Sil-88 25 m × 0.25 mm (Varian, Les Ulis, France) and a flame-ionization detector (FID). Chromatograms were analyzed using the Azur version 4.6.0.0 software package (DATALYS, France). Each fatty acid was identified from

an authentic fatty methyl ester standard (Sigma-Aldrich, Saint-Quentin Fallavier, France) and results were expressed as a molar percentage (mol%).

4.5. Pigment Composition

The total pigment amount was determined spectroscopically using a double beam Lambda 25 UV/VIS spectrometer (PerkinElmer). The concentration of chlorophyll (Chl) a, Chl c and total carotenoids in the PT were calculated according to Heydarizadeh et al. [103], whereas the Chl a, Chl b and total carotenoids in the OT were calculated according to Lichtenthaler et al. [104].

The separation of the pigments present in the microalgal extracts was carried out by thin-layer chromatography (TLC). Five microliters of OT and PT extracts were applied 1 cm from the base of a pre-coated TLC-plate silica G-25 (Macherey-Nagel, Germany, 20 cm × 20 cm) and allowed to dry for a few minutes in the dark. Then, the plates were developed in a closed glass chamber in the dark using acetone/petroleum ether (30%/70%) (*v*/*v*) as the mobile phase [105]. Individual bands were scrapped from the TLC plate, eluted into 1 mL acetone and then centrifuged (10,000× *g* for 10 min at 4 °C). The absorption spectra of the pigments extracted from individual bands were determined by spectrophotometry between 400–800 nm using a double beam Lambda 25 UV-Vis spectrometer (PerkinElmer, Villebon-sur-Yvette, France). The reference was acetone. The positions of the absorbance maxima were determined after the calculation of the second derivative absorbance spectrum according to Schoefs and Franck [106]. Pigment identification was based on the comparison of the absorption maxima found in this study and in the literature (see Tables 1 and 2) [52,107].

4.6. Cell Culture

The human Microvascular Endothelial Cell line (HMEC-1) was obtained from the Center for Disease Control and Prevention (Atlanta, GA, USA). Cells were maintained in MCDB-131 medium containing 10% fetal bovine serum (FBS), L-glutamine (10 mM), hydrocortisone (1 µg/mL), penicillin (50 unit/mL), streptomycin (50 unit/mL), and epidermal growth factor (10 ng/mL). At 90% confluence, cells were cultured overnight in serum-free medium before treatment the day after.

4.7. Cell Viability Assay

The cell viability was performed by MTT assay. MTT cell-viability assay measures the reduction of a tetrazolium component into an insoluble formazan product by the mitochondria of viable cells. Cells were incubated with different concentrations of microalgal extracts (0.1 to 50 µg/mL), B[a]P (0.1 to 10 µM) alone or in co-exposure with B[a]P at 2 µM and microalgal extracts at 0.1 to 5 for 24 h. Cells were rinsed with PBS and incubated for 2 h at 37 °C with an MTT solution (0.5 mg/mL in a serum-free medium). After washing, cells were lysed with DMSO. The absorbance was measured by using the SPECTROstar Nano BMG LABTECH at 560 nm with a reference wavelength of 670 nm.

4.8. RNA Isolation and Analysis

Total RNA was isolated from HMEC-1 cells using TRIzol method (Invitrogen, Cergy-Pontoise, France). RNA samples (1 µg) was reverse transcribed into cDNA using the High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Life Technologies, Carlsbad, CA, USA). Quantitative PCR (qPCR) assays were next performed using SYBR Green PCR Master Mix on the CFX384 Touch™ Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad, Hercules, CA, USA). The mRNA expressions were normalized by means of 18 s mRNA levels. The $2^{-\Delta\Delta ct}$ method was used to express the relative expression of each selected gene. Sequences of the tested primers are reported in Table 4.

Table 4. Primer sequences for RT-qPCR.

Gene Symbol	Forward Sequence	Reverse Sequence
CYP1A1	CCCACAGCACAACAAGAGACA	CATCAGGGGTGAGAAACCGT
IL-8	ACTCCAAACCTTTCCACCCC	TCTCAGCCCTCTTCAAAAACTTC
IL1-β	CTCTGGGATTCTCTTCAGCCA	AGGAGCACTTCATCTGTTTAGGG
18S	CGCCGCTAGAGGTGAAATTC	TTGGCAAATGCTTTCGCTC

4.9. Apoptosis

Apoptotic death in HMEC-1 cells was assessed by the visualization of chromatin condensation after nuclear staining. Cells used for apoptosis analysis were cultured in 6-well plates. After exposure to B[a]P and/or microalgal extracts, the cells were stained with 50 µg/mL Hoechst 33,342 in the dark at 37 °C for 30 min; cells were then examined by fluorescence microscopy (ZEISS Axio Scope A1 microscope). Over 300 cells in randomly selected microscopic fields were analyzed per condition of treatment.

4.10. Isolation of Extracellular Vesicles

Cells were cultured in 151.9 cm^2 cell culture Petri dishes (Corning ™, Thermo Fisher Scientific, France). After treatment with 2 µM B[a]P and/or 0.1 µg/mL OT extract for 24 h, culture supernatants were recovered to isolate the EVs. Cell debris present in conditioned medium was removed by centrifugation at 3650× *g* for 10 min. EVs were pelleted by direct ultracentrifugation of the culture medium at 100,000× *g* for 1 h 45 min at 4 °C (Beckman Coulter Optima L-90K Series Ultracentifuges, rotor Sw 28.1). The EV pellet was then resuspended and washed with sterile phosphate-buffered saline (PBS). The EVs were then centrifuged at 100,000× *g* for 1 h 45 min at 4 °C and the EV pellet was recovered in sterile PBS.

4.11. Nanoparticle Tracking Analysis

The number and size distribution of EVs were performed using Nanoparticle Tracking Analysis (NTA). EV samples were diluted in sterile PBS before analysis with NanoSight LM10 HS (Malvern Instruments, Malvern, UK). All samples were measured in triplicate at 25 °C and used the same instrument settings. Three videos of 30 s per sample were analyzed with NanoSight NTA 3.1 software (Malvern, UK) setting the detection threshold at 3. The results presented are the average of the three videos and three independent EV samples. Concentrations and distributions of EVs were then normalized to cell counts and expressed as numbers of EVs released per cell.

4.12. Electron Microscopy

Transmission electron microscopy (TEM) was performed as described by Théry et al., 2006 [108]. In summary, formvar carbon-coated copper grids (Agar Scientific, Stansted, UK) were placed for 20 min on a 5 µL EVs suspension previously resuspended in 2% paraformaldehyde (PFA). After washing with PBS, EVs were fixed in 1% glutaraldehyde in PBS for 5 min. After washing with distilled water, grids were placed on a drop of uranyl oxalate for 5 min, then on a drop of 2% methylcellulose/4% uranyl acetate (1/9; *v*/*v*) on ice for 10 min. EVs were visualized using a JEOL JEM-1400 transmission electron microscope (JEOL, Japan).

4.13. Characterization of Extracellular Vesicles

The culture supernatant was collected after 24 h of treatment with the vehicle (DMSO), and the EVs produced by HMEC-1 were isolated. In line with current knowledge in the field of EVs [109], two approaches have been used to confirm the presence and isolation of EVs in samples. After isolation, transmission electron microscopy (TEM) analysis confirmed the presence of EVs in the culture supernatant (Figure 8a). The characteristic morphology of EVs, cup-shaped, was observed. In addition

to morphology, the number and size distribution of EVs was determined by NTA (Figure 8b). The population of EVs has been found to range from 100 nm to 600 nm with an average size of 257 ± 16 nm. The size and morphology characteristics of EVs suggested that endothelial cells HMEC-1 were able to produce EVs and that the developed method for isolated EVs was effective.

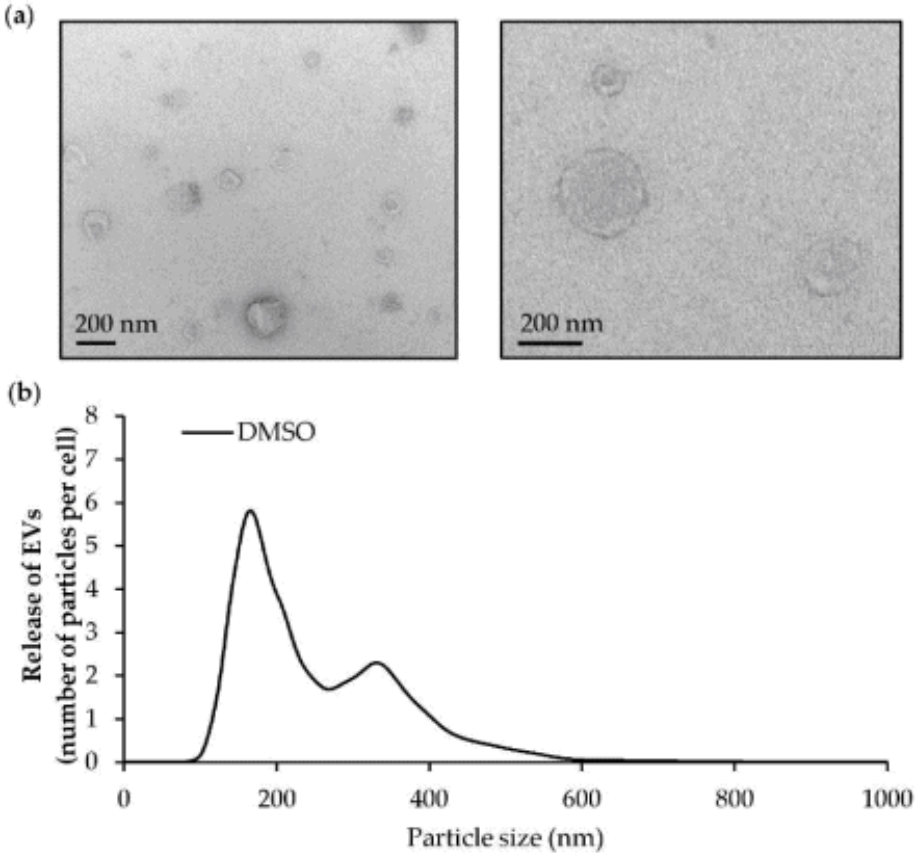


Figure 8. Characterization of extracellular vesicles (EVs) released by endothelial HMEC-1 cells. HMEC-1 cells were exposed to DMSO for 24 h. EVs were isolated by differential ultracentrifugation. (**a**) Transmission electron microscopy pictures of EV pellets (scale bars = 200 nm). (**b**) Representative size distribution profile by nanoparticle tracking analysis (NTA) of EVs produced by endothelial cells.

4.14. Statistical Analysis

All values were presented as means ± standard deviation (SD) from at least three independent experiments. After the analysis of variance by one-way ANOVA, the mean values were compared using Fisher's least significant difference post hoc test (LSD). All statistical analyses were performed using Statgraphics Plus 5.1 (Manugistics Inc., Rockville, MD, USA).

Author Contributions: Conceptualization, M.L.G., A.D., M.Q., R.P., O.S., D.L.-G., E.L.F., and L.U.; formal analysis, M.L.G., B.S., E.L.F., and L.U.; funding acquisition, O.S. and D.L.-G.; investigation, M.L.G., A.D., M.Q, R.P., M.B., A.B., and E.L-.F.; methodology, M.L.G., A.D., M.Q., R.P., A.B., and B.S.; supervision, E.L.F. and L.U.; writing—original draft, M.L.G., A.D., R.P., B.S., O.S., D.L.-G., E.L.F., and L.U.; writing—review and editing, M.L.G., A.D., R.P., B.S., O.S., D.L.-G., E.L.F., and L.U. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This study was financially supported by the "Programme Environnement-Santé-Travail" of ANSES with the funding from ITMO cancer in the context of the Cancer Plan 2014-2019 (EST-2016/1/31) and by the Cancéropôle Grand-Ouest/Région Bretagne (Concerto project). Manon Le Goff was a recipient of a PhD fellowship from the Collectivités Locales Mayennaises.

Acknowledgments: We are very grateful to Fabienne Gauffre (UMR_6226, CNRS, Rennes, France) for the valuable discussion on EVs and on the use of NTA. We also wish to thank Brigitte Veidl (EA 2160 Mer Molécules Santé–MIMMA, IUML FR-3473 CNRS, Le Mans, France) for pigment analysis.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

References

1. Rengarajan, T.; Rajendran, P.; Nandakumar, N.; Lokeshkumar, B.; Rajendran, P.; Nishigaki, I. Exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons with special focus on cancer. *Asian Pac. J. Trop. Biomed.* **2015**, *5*, 182–189. [CrossRef]
2. Abdel-Shafy, H.I.; Mansour, M.S.M. A review on polycyclic aromatic hydrocarbons: Source, environmental impact, effect on human health and remediation. *Egypt. J. Pet.* **2016**, *25*, 107–123. [CrossRef]
3. Poursafa, P.; Moosazadeh, M.; Abedini, E.; Hajizadeh, Y.; Mansourian, M.; Pourzamani, H.; Amin, M.-M. A systematic review on the effects of polycyclic aromatic hydrocarbons on cardiometabolic impairment. *Int. J. Prev. Med.* **2017**, *8*, 19.
4. Holme, J.A.; Brinchmann, B.C.; Refsnes, M.; Låg, M.; Øvrevik, J. Potential role of polycyclic aromatic hydrocarbons as mediators of cardiovascular effects from combustion particles. *Environ. Health* **2019**, *18*, 74. [CrossRef]
5. Bruzzoniti, M.C.; Fungi, M.; Sarzanini, C. Determination of EPA's priority pollutant polycyclic aromatic hydrocarbons in drinking waters by solid phase extraction-HPLC. *Anal. Methods* **2010**, *2*, 739. [CrossRef]
6. *IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans, Volume 92, Some non-Heterocyclic Polycyclic Aromatic Hydrocarbons and Some Related Exposures: This Publication Represents the Views and Expert Opinions of an IARC Working Group on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans, Which Met in Lyon, 11–18 October 2005*; International Agency for Research on Cancer (Ed.) WHO: Lyon, France, 2010; ISBN 978-92-832-1292-8.
7. Das, D.N.; Bhutia, S.K. Inevitable dietary exposure of Benzo[a]pyrene: Carcinogenic risk assessment an emerging issues and concerns. *Curr. Opin. Food Sci.* **2018**, *24*, 16–25. [CrossRef]
8. Hardonnière, K.; Huc, L.; Sergent, O.; Holme, J.A.; Lagadic-Gossmann, D. Environmental carcinogenesis and pH homeostasis: Not only a matter of dysregulated metabolism. *Semin. Cancer Biol.* **2017**, *43*, 49–65. [CrossRef] [PubMed]
9. Larigot, L.; Juricek, L.; Dairou, J.; Coumoul, X. AhR signaling pathways and regulatory functions. *Biochim. Open* **2018**, *7*, 1–9. [CrossRef]
10. Yang, C.S. Influences of Dietary and Other Factors on Xenobiotic Metabolism and Carcinogenesis—A Review Article in Memory of Dr. Allan H. Conney (1930–2013). *Nutr. Cancer* **2015**, *67*, 1209–1215. [CrossRef]
11. Mandlekar, S.; Hong, J.-L.; Kong, A.-N.T. Modulation of metabolic enzymes by dietary phytochemicals: A review of mechanisms underlying beneficial versus unfavorable effects. *Curr. Drug Metab.* **2006**, *7*, 661–675. [CrossRef]
12. Azrad, M.; Turgeon, C.; Demark-Wahnefried, W. Current Evidence Linking Polyunsaturated Fatty Acids with Cancer Risk and Progression. *Front. Oncol.* **2013**, *3*, 224. [CrossRef] [PubMed]
13. Riccioni, G.; D'Orazio, N.; Franceschelli, S.; Speranza, L. Marine Carotenoids and Cardiovascular Risk Markers. *Mar. Drugs* **2011**, *9*, 1166–1175. [CrossRef] [PubMed]
14. Le Goff, M.; Le Ferrec, E.; Mayer, C.; Mimouni, V.; Lagadic-Gossmann, D.; Schoefs, B.; Ulmann, L. Microalgal carotenoids and phytosterols regulate biochemical mechanisms involved in human health and disease prevention. *Biochimie* **2019**, *167*, 106–118. [CrossRef]
15. Wu, J.-C.; Lai, C.-S.; Tsai, M.-L.; Ho, C.-T.; Wang, Y.-J.; Pan, M.-H. Chemopreventive effect of natural dietary compounds on xenobiotic-induced toxicity. *J. Food Drug Anal.* **2017**, *25*, 176–186. [CrossRef] [PubMed]
16. Tylichová, Z.; Neča, J.; Topinka, J.; Milcová, A.; Hofmanová, J.; Kozubík, A.; Machala, M.; Vondráček, J. n-3 Polyunsaturated fatty acids alter benzo[a]pyrene metabolism and genotoxicity in human colon epithelial cell models. *Food Chem. Toxicol.* **2019**, *124*, 374–384. [CrossRef] [PubMed]
17. Bhagavathy, S.; Sumathi, P. Evaluation of antigenotoxic effects of carotenoids from green algae *Chlorococcum humicola* using human lymphocytes. *Asian Pac. J. Trop. Biomed.* **2012**, *2*, 109–117. [CrossRef]
18. Hoffman, J.B.; Hennig, B. Protective influence of healthful nutrition on mechanisms of environmental pollutant toxicity and disease risks: Nutritional protection and environmental insults. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **2017**, *1398*, 99–107. [CrossRef]
19. Hennig, B.; Petriello, M.C.; Gamble, M.V.; Surh, Y.-J.; Kresty, L.A.; Frank, N.; Rangkadilok, N.; Ruchirawat, M.; Suk, W.A. The role of nutrition in influencing mechanisms involved in environmentally mediated diseases. *Rev. Environ. Health* **2018**, *33*, 87–97. [CrossRef]
20. Spolaore, P.; Joannis-Cassan, C.; Duran, E.; Isambert, A. Commercial applications of microalgae. *J. Biosci. Bioeng.* **2006**, *101*, 87–96. [CrossRef]

21. Odjadjare, E.C.; Mutanda, T.; Olaniran, A.O. Potential biotechnological application of microalgae: A critical review. *Crit. Rev. Biotechnol.* **2017**, *37*, 37–52. [CrossRef]
22. Kothari, R.; Pandey, A.; Ahmad, S.; Kumar, A.; Pathak, V.V.; Tyagi, V.V. Microalgal cultivation for value-added products: A critical enviro-economical assessment. *3 Biotech* **2017**, *7*, 243. [CrossRef] [PubMed]
23. Mimouni, V.; Ulmann, L.; Pasquet, V.; Mathieu, M.; Picot, L.; Bougaran, G.; Cadoret, J.-P.; Morant-Manceau, A.; Schoefs, B. The Potential of Microalgae for the Production of Bioactive Molecules of Pharmaceutical Interest. *Curr. Pharm. Biotechnol.* **2012**, *13*, 2733–2750. [CrossRef] [PubMed]
24. García, J.L.; de Vicente, M.; Galán, B. Microalgae, old sustainable food and fashion nutraceuticals. *Microb. Biotechnol.* **2017**, *10*, 1017–1024. [CrossRef] [PubMed]
25. Khan, M.I.; Shin, J.H.; Kim, J.D. The promising future of microalgae: Current status, challenges, and optimization of a sustainable and renewable industry for biofuels, feed, and other products. *Microb. Cell Factories* **2018**, *17*, 36. [CrossRef]
26. Sathasivam, R.; Radhakrishnan, R.; Hashem, A.; Abd_Allah, E.F. Microalgae metabolites: A rich source for food and medicine. *Saudi J. Biol. Sci.* **2019**, *26*, 709–722. [CrossRef]
27. Galasso, C.; Gentile, A.; Orefice, I.; Ianora, A.; Bruno, A.; Noonan, D.M.; Sansone, C.; Albini, A.; Brunet, C. Microalgal Derivatives as Potential Nutraceutical and Food Supplements for Human Health: A Focus on Cancer Prevention and Interception. *Nutrients* **2019**, *11*, 1226. [CrossRef]
28. Nazih, H.; Bard, J.-M. Microalgae in Human Health. In *Microalgae in Health and Disease Prevention*; An Imprint of Elsevier; Academic Press: New York, NY, USA, 2018; pp. 211–226. ISBN 978-0-12-811405-6.
29. Marin, B.; Melkonian, M. Molecular Phylogeny and Classification of the Mamiellophyceae class. nov. (Chlorophyta) based on Sequence Comparisons of the Nuclear- and Plastid-encoded rRNA Operons. *Protist* **2010**, *161*, 304–336. [CrossRef]
30. Vaezi, R.; Napier, J.; Sayanova, O. Identification and Functional Characterization of Genes Encoding Omega-3 Polyunsaturated Fatty Acid Biosynthetic Activities from Unicellular Microalgae. *Mar. Drugs* **2013**, *11*, 5116–5129. [CrossRef]
31. Meyer, A.; Kirsch, H.; Domergue, F.; Abbadi, A.; Sperling, P.; Bauer, J.; Cirpus, P.; Zank, T.K.; Moreau, H.; Roscoe, T.J.; et al. Novel fatty acid elongases and their use for the reconstitution of docosahexaenoic acid biosynthesis. *J. Lipid Res.* **2004**, *45*, 1899–1909. [CrossRef]
32. Wagner, M.; Hoppe, K.; Czabany, T.; Heilmann, M.; Daum, G.; Feussner, I.; Fulda, M. Identification and characterization of an acyl-CoA:diacylglycerol acyltransferase 2 (DGAT2) gene from the microalga *O. tauri*. *Plant Physiol. Biochem.* **2010**, *48*, 407–416. [CrossRef]
33. Six, C.; Worden, A.Z.; Rodríguez, F.; Moreau, H.; Partensky, F. New Insights into the Nature and Phylogeny of Prasinophyte Antenna Proteins: *Ostreococcus tauri*, a Case Study. *Mol. Biol. Evol.* **2005**, *22*, 2217–2230. [CrossRef] [PubMed]
34. Rodríguez, F.; Derelle, E.; Guillou, L.; Le Gall, F.; Vaulot, D.; Moreau, H. Ecotype diversity in the marine picoeukaryote *Ostreococcus* (Chlorophyta, Prasinophyceae). *Environ. Microbiol.* **2005**, *7*, 853–859. [CrossRef] [PubMed]
35. Kotake-Nara, E.; Kushiro, M.; Zhang, H.; Sugawara, T.; Miyashita, K.; Nagao, A. Carotenoids Affect Proliferation of Human Prostate Cancer Cells. *J. Nutr.* **2001**, *131*, 3303–3306. [CrossRef] [PubMed]
36. Honold, P.J.; Jacobsen, C.; Jónsdóttir, R.; Kristinsson, H.G.; Hermund, D.B. Potential seaweed-based food ingredients to inhibit lipid oxidation in fish-oil-enriched mayonnaise. *Eur. Food Res. Technol.* **2016**, *242*, 571–584. [CrossRef]
37. Yang, Y.-H.; Du, L.; Hosokawa, M.; Miyashita, K.; Kokubun, Y.; Arai, H.; Taroda, H. Fatty Acid and Lipid Class Composition of the Microalga *Phaeodactylum tricornutum*. *J. Oleo Sci.* **2017**, *66*, 363–368. [CrossRef]
38. Hamilton, M.L.; Haslam, R.P.; Napier, J.A.; Sayanova, O. Metabolic engineering of *Phaeodactylum tricornutum* for the enhanced accumulation of omega-3 long chain polyunsaturated fatty acids. *Metab. Eng.* **2014**, *22*, 3–9. [CrossRef]
39. Sayanova, O.; Mimouni, V.; Ulmann, L.; Morant-Manceau, A.; Pasquet, V.; Schoefs, B.; Napier, J.A. Modulation of lipid biosynthesis by stress in diatoms. *Philos. Trans. R. Soc. B Biol. Sci.* **2017**, *372*, 20160407. [CrossRef]
40. Kim, S.M.; Jung, Y.-J.; Kwon, O.-N.; Cha, K.H.; Um, B.-H.; Chung, D.; Pan, C.-H. A Potential Commercial Source of Fucoxanthin Extracted from the Microalga *Phaeodactylum tricornutum*. *Appl. Biochem. Biotechnol.* **2012**, *166*, 1843–1855. [CrossRef]

41. Zarekarizi, A.; Hoffmann, L.; Burritt, D. Approaches for the sustainable production of fucoxanthin, a xanthophyll with potential health benefits. *J. Appl. Phycol.* **2019**, *31*, 281–299. [CrossRef]
42. Neumann, U.; Derwenskus, F.; Flaiz Flister, V.; Schmid-Staiger, U.; Hirth, T.; Bischoff, S. Fucoxanthin, A Carotenoid Derived from *Phaeodactylum tricornutum* Exerts Antiproliferative and Antioxidant Activities In Vitro. *Antioxidants* **2019**, *8*, 183. [CrossRef]
43. Gateau, H.; Solymosi, K.; Marchand, J.; Schoefs, B. Carotenoids of Microalgae Used in Food Industry and Medicine. *Mini-Rev. Med. Chem.* **2017**, *17*, 1140–1172. [CrossRef] [PubMed]
44. Michiels, C. Endothelial cell functions. *J. Cell. Physiol.* **2003**, *196*, 430–443. [CrossRef] [PubMed]
45. Rajendran, P.; Rengarajan, T.; Thangavel, J.; Nishigaki, Y.; Sakthisekaran, D.; Sethi, G.; Nishigaki, I. The Vascular Endothelium and Human Diseases. *Int. J. Biol. Sci.* **2013**, *9*, 1057–1069. [CrossRef] [PubMed]
46. Hu, C.; Hou, J.; Zhou, Y.; Sun, H.; Yin, W.; Zhang, Y.; Wang, X.; Wang, G.; Chen, W.; Yuan, J. Association of polycyclic aromatic hydrocarbons exposure with atherosclerotic cardiovascular disease risk: A role of mean platelet volume or club cell secretory protein. *Environ. Pollut.* **2018**, *233*, 45–53. [CrossRef]
47. He, X.; Chen, Y.; Zhang, C.; Gong, W.; Zhang, X.; Nie, S. Polycyclic Aromatic Hydrocarbons from Particulate Matter 2.5 (PM2.5) in Polluted Air Changes miRNA Profile Related to Cardiovascular Disease. *Med. Sci. Monit.* **2018**, *24*, 5925–5934. [CrossRef]
48. Franses, J.W.; Drosu, N.C.; Gibson, W.J.; Chitalia, V.C.; Edelman, E.R. Dysfunctional endothelial cells directly stimulate cancer inflammation and metastasis: Dysfunctional endothelium stimulates metastasis. *Int. J. Cancer* **2013**, *133*, 1334–1344. [CrossRef]
49. Ba, Q.; Li, J.; Huang, C.; Qiu, H.; Li, J.; Chu, R.; Zhang, W.; Xie, D.; Wu, Y.; Wang, H. Effects of Benzo[*a*]pyrene Exposure on Human Hepatocellular Carcinoma Cell Angiogenesis, Metastasis, and NF- κ B Signaling. *Environ. Health Perspect.* **2015**, *123*, 246–254. [CrossRef]
50. Jeffrey, S.W.; Mantoura, R.F.C.; Wright, S.W. (Eds.) *Phytoplankton Pigments in Oceanography: Guidelines to Modern Methods*; Monographs on Oceanographic Methodology; UNESCO Pub: Paris, France, 1997; ISBN 978-92-3-103275-2.
51. Latasa, M.; Scharek, R.; Gall, F.L.; Guillou, L. Pigments suites and taxonomic groups in prasinophyceae. *J. Phycol.* **2004**, *40*, 1149–1155. [CrossRef]
52. Britton, G.; Liaaen-Jensen, S.; Pfander, H. (Eds.) *Carotenoids Handbook*; Birkhäuser Verlag: Basel, Switzerland; Boston, MA, USA, 2004; ISBN 978-3-7643-6180-8.
53. Ajayi, B.O.; Adedara, I.A.; Farombi, E.O. Benzo(a)pyrene induces oxidative stress, pro-inflammatory cytokines, expression of nuclear factor-kappa B and deregulation of wnt/beta-catenin signaling in colons of BALB/c mice. *Food Chem. Toxicol.* **2016**, *95*, 42–51. [CrossRef]
54. Ji, K.; Xing, C.; Jiang, F.; Wang, X.; Guo, H.; Nan, J.; Qian, L.; Yang, P.; Lin, J.; Li, M.; et al. Benzo[a]pyrene induces oxidative stress and endothelial progenitor cell dysfunction via the activation of the NF-κB pathway. *Int. J. Mol. Med.* **2013**, *31*, 922–930. [CrossRef]
55. Podechard, N.; Lecureur, V.; Le Ferrec, E.; Guenon, I.; Sparfel, L.; Gilot, D.; Gordon, J.R.; Lagente, V.; Fardel, O. Interleukin-8 induction by the environmental contaminant benzo(a)pyrene is aryl hydrocarbon receptor-dependent and leads to lung inflammation. *Toxicol. Lett.* **2008**, *177*, 130–137. [CrossRef] [PubMed]
56. Brinchmann, B.C.; Skuland, T.; Rambøl, M.H.; Szoke, K.; Brinchmann, J.E.; Gutleb, A.C.; Moschini, E.; Kubátová, A.; Kukowski, K.; Le Ferrec, E.; et al. Lipophilic components of diesel exhaust particles induce pro-inflammatory responses in human endothelial cells through AhR dependent pathway(s). *Part. Fibre Toxicol.* **2018**, *15*, 21. [CrossRef] [PubMed]
57. Neumann, U.; Louis, S.; Gille, A.; Derwenskus, F.; Schmid-Staiger, U.; Briviba, K.; Bischoff, S.C. Anti-inflammatory effects of *Phaeodactylum tricornutum* extracts on human blood mononuclear cells and murine macrophages. *J. Appl. Phycol.* **2018**, *30*, 2837–2846. [CrossRef]
58. Calder, P.C. Marine omega-3 fatty acids and inflammatory processes: Effects, mechanisms and clinical relevance. *Biochim. Biophys. Acta BBA—Mol. Cell Biol. Lipids* **2015**, *1851*, 469–484. [CrossRef] [PubMed]
59. Lin, S.; Ren, A.; Wang, L.; Huang, Y.; Wang, Y.; Wang, C.; Greene, N.D. Oxidative Stress and Apoptosis in Benzo[a]pyrene-Induced Neural Tube Defects. *Free Radic. Biol. Med.* **2018**, *116*, 149–158. [CrossRef] [PubMed]
60. Tekpli, X.; Rissel, M.; Huc, L.; Catheline, D.; Sergent, O.; Rioux, V.; Legrand, P.; Holme, J.A.; Dimanche-Boitrel, M.-T.; Lagadic-Gossmann, D. Membrane remodeling, an early event in benzo[α]pyrene-induced apoptosis. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **2010**, *243*, 68–76. [CrossRef]

61. Lee, J.; Park, A.; Kim, M.; Lim, H.-J.; Rha, Y.-A.; Kang, H.-G. Spirulina Extract Enhanced a Protective Effect in Type 1 Diabetes by Anti-Apoptosis and Anti-ROS Production. *Nutrients* **2017**, *9*, 1363. [CrossRef]
62. Reed, L.; Arlt, V.M.; Phillips, D.H. The role of cytochrome P450 enzymes in carcinogen activation and detoxication: An *in vivo–in vitro* paradox. *Carcinogenesis* **2018**, *39*, 851–859. [CrossRef]
63. Shimada, T. Xenobiotic-metabolizing enzymes involved in activation and detoxification of carcinogenic polycyclic aromatic hydrocarbons. *Drug Metab. Pharmacokinet.* **2006**, *21*, 257–276. [CrossRef]
64. Oesterling, E.; Toborek, M.; Hennig, B. Benzo[a]pyrene induces intercellular adhesion molecule-1 through a caveolae and aryl hydrocarbon receptor mediated pathway. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **2008**, *232*, 309–316. [CrossRef]
65. Jansen, F.; Nickenig, G.; Werner, N. Extracellular Vesicles in Cardiovascular Disease: Potential Applications in Diagnosis, Prognosis, and Epidemiology. *Circ. Res.* **2017**, *120*, 1649–1657. [CrossRef] [PubMed]
66. Yuana, Y.; Sturk, A.; Nieuwland, R. Extracellular vesicles in physiological and pathological conditions. *Blood Rev.* **2013**, *27*, 31–39. [CrossRef] [PubMed]
67. Le Goff, M.; Lagadic-Gossmann, D.; Latour, R.; Podechard, N.; Grova, N.; Gauffre, F.; Chevance, S.; Burel, A.; Appenzeller, B.M.R.; Ulmann, L.; et al. PAHs increase the production of extracellular vesicles both in vitro in endothelial cells and in vivo in urines from rats. *Environ. Pollut.* **2019**, *255*, 113171. [CrossRef] [PubMed]
68. Talero, E.; García-Mauriño, S.; Ávila-Román, J.; Rodríguez-Luna, A.; Alcaide, A.; Motilva, V. Bioactive Compounds Isolated from Microalgae in Chronic Inflammation and Cancer. *Mar. Drugs* **2015**, *13*, 6152–6209. [CrossRef] [PubMed]
69. Montero-Lobato, Z.; Vázquez, M.; Navarro, F.; Fuentes, J.; Bermejo, E.; Garbayo, I.; Vílchez, C.; Cuaresma, M. Chemically-Induced Production of Anti-Inflammatory Molecules in Microalgae. *Mar. Drugs* **2018**, *16*, 478. [CrossRef] [PubMed]
70. Martínez Andrade, K.; Lauritano, C.; Romano, G.; Ianora, A. Marine Microalgae with Anti-Cancer Properties. *Mar. Drugs* **2018**, *16*, 165. [CrossRef]
71. De Jesus Raposo, M.F.; de Morais, A.M. Microalgae for the prevention of cardiovascular disease and stroke. *Life Sci.* **2015**, *125*, 32–41. [CrossRef]
72. Abd El-Hack, M.E.; Abdelnour, S.; Alagawany, M.; Abdo, M.; Sakr, M.A.; Khafaga, A.F.; Mahgoub, S.A.; Elnesr, S.S.; Gebriel, M.G. Microalgae in modern cancer therapy: Current knowledge. *Biomed. Pharmacother.* **2019**, *111*, 42–50. [CrossRef]
73. Degraeve-Guilbault, C.; Bréhélin, C.; Haslam, R.; Sayanova, O.; Marie-Luce, G.; Jouhet, J.; Corellou, F. Glycerolipid Characterization and Nutrient Deprivation-Associated Changes in the Green Picoalga *Ostreococcus tauri*. *Plant Physiol.* **2017**, *173*, 2060–2080. [CrossRef]
74. Di Nunzio, M.; Valli, V.; Tomás-Cobos, L.; Tomás-Chisbert, T.; Murgui-Bosch, L.; Danesi, F.; Bordoni, A. Is cytotoxicity a determinant of the different in vitro and in vivo effects of bioactives? *BMC Complement. Altern. Med.* **2017**, *17*, 453. [CrossRef]
75. De Sousa Andrade, L.N.; de Lima, T.M.; Curi, R.; de Lauro Castrucci, A.M. Toxicity of fatty acids on murine and human melanoma cell lines. *Toxicol. In Vitro* **2005**, *19*, 553–560. [CrossRef] [PubMed]
76. Harvey, K.A.; Walker, C.L.; Pavlina, T.M.; Xu, Z.; Zaloga, G.P.; Siddiqui, R.A. Long-chain saturated fatty acids induce pro-inflammatory responses and impact endothelial cell growth. *Clin. Nutr.* **2010**, *29*, 492–500. [CrossRef] [PubMed]
77. Ucci, M.; Di Tomo, P.; Tritschler, F.; Cordone, V.G.P.; Lanuti, P.; Bologna, G.; Di Silvestre, S.; Di Pietro, N.; Pipino, C.; Mandatori, D.; et al. Anti-inflammatory Role of Carotenoids in Endothelial Cells Derived from Umbilical Cord of Women Affected by Gestational Diabetes Mellitus. *Oxid. Med. Cell. Longev.* **2019**, *2019*, 1–11. [CrossRef] [PubMed]
78. Subramoniam, A.; Asha, V.V.; Nair, S.A.; Sasidharan, S.P.; Sureshkumar, P.K.; Rajendran, K.N.; Karunagaran, D.; Ramalingam, K. Chlorophyll Revisited: Anti-inflammatory Activities of Chlorophyll a and Inhibition of Expression of TNF-α Gene by the Same. *Inflammation* **2012**, *35*, 959–966. [CrossRef] [PubMed]
79. Kim, K.-N.; Heo, S.-J.; Yoon, W.-J.; Kang, S.-M.; Ahn, G.; Yi, T.-H.; Jeon, Y.-J. Fucoxanthin inhibits the inflammatory response by suppressing the activation of NF-κB and MAPKs in lipopolysaccharide-induced RAW 264.7 macrophages. *Eur. J. Pharmacol.* **2010**, *649*, 369–375. [CrossRef] [PubMed]
80. Soontornchaiboon, W.; Joo, S.S.; Kim, S.M. Anti-inflammatory Effects of Violaxanthin Isolated from Microalga *Chlorella ellipsoidea* in RAW 264.7 Macrophages. *Biol. Pharm. Bull.* **2012**, *35*, 1137–1144. [CrossRef] [PubMed]

81. De Caterina, R.; Cybulsky, M.I.; Clinton, S.K.; Gimbrone, M.A.; Libby, P. The omega-3 fatty acid docosahexaenoate reduces cytokine-induced expression of proatherogenic and proinflammatory proteins in human endothelial cells. *Arterioscler. Thromb. J. Vasc. Biol.* **1994**, *14*, 1829–1836. [CrossRef]
82. Solanki, P.; Aminoshariae, A.; Jin, G.; Montagnese, T.A.; Mickel, A. The effect of docosahexaenoic acid (DHA) on expression of IL-1ß, IL-6, IL-8, and TNF-α in normal and lipopolysaccharide (LPS)-stimulated macrophages. *Quintessence Int.* **2013**, *44*, 393.
83. De Souza, C.O.; Valenzuela, C.A.; Baker, E.J.; Miles, E.A.; Rosa Neto, J.C.; Calder, P.C. Palmitoleic Acid has Stronger Anti-Inflammatory Potential in Human Endothelial Cells Compared to Oleic and Palmitic Acids. *Mol. Nutr. Food Res.* **2018**, *62*, 1800322. [CrossRef]
84. Erdinest, N.; Shmueli, O.; Grossman, Y.; Ovadia, H.; Solomon, A. Anti-Inflammatory Effects of Alpha Linolenic Acid on Human Corneal Epithelial Cells. *Investig. Opthalmol. Vis. Sci.* **2012**, *53*, 4396. [CrossRef]
85. Liu, M.-H.; Lin, A.-H.; Lu, S.-H.; Peng, R.-Y.; Lee, T.-S.; Kou, Y.R. Eicosapentaenoic acid attenuates cigarette smoke-induced lung inflammation by inhibiting ROS-sensitive inflammatory signaling. *Front. Physiol.* **2014**, *5*, 440. [CrossRef] [PubMed]
86. Pei, X.-H.; Nakanishi, Y.; Inoue, H.; Takayama, K.; Bai, F.; Hara, N. Polycyclic aromatic hydrocarbons induce IL-8 expression through nuclear factor κB activation in A549 cell line. *Cytokine* **2002**, *19*, 236–241. [CrossRef] [PubMed]
87. Badal, S.; Delgoda, R. Role of the modulation of CYP1A1 expression and activity in chemoprevention: Modulation of CYP1A1 expression and activity in chemoprevention. *J. Appl. Toxicol.* **2014**, *34*, 743–753. [CrossRef] [PubMed]
88. Yi, T.; Wang, J.; Zhu, K.; Tang, Y.; Huang, S.; Shui, X.; Ding, Y.; Chen, C.; Lei, W. Aryl Hydrocarbon Receptor: A New Player of Pathogenesis and Therapy in Cardiovascular Diseases. *BioMed Res. Int.* **2018**, *2018*, 1–11. [CrossRef]
89. Satomi, Y.; Nishino, H. Inhibition of the enzyme activity of cytochrome P450 1A1, 1A2 and 3A4 by fucoxanthin, a marine carotenoid. *Oncol. Lett.* **2013**, *6*, 860–864. [CrossRef]
90. Dendelé, B.; Tekpli, X.; Hardonnière, K.; Holme, J.A.; Debure, L.; Catheline, D.; Arlt, V.M.; Nagy, E.; Phillips, D.H.; Øvrebø, S.; et al. Protective action of n-3 fatty acids on benzo[a]pyrene-induced apoptosis through the plasma membrane remodeling-dependent NHE1 pathway. *Chem. Biol. Interact.* **2014**, *207*, 41–51. [CrossRef]
91. Gdula-Argasińska, J.; Czepiel, J.; Totoń-Żurańska, J.; Jurczyszyn, A.; Perucki, W.; Wołkow, P. Docosahexaenoic acid regulates gene expression in HUVEC cells treated with polycyclic aromatic hydrocarbons. *Toxicol. Lett.* **2015**, *236*, 75–81. [CrossRef]
92. Goiris, K.; Muylaert, K.; Voorspoels, S.; Noten, B.; De Paepe, D.; E Baart, G.J.; De Cooman, L. Detection of flavonoids in microalgae from different evolutionary lineages. *J. Phycol.* **2014**, *50*, 483–492. [CrossRef]
93. Denison, M.S.; Nagy, S.R. Activation of the Aryl Hydrocarbon Receptor by Structural Diverse Exogenous and Endogenous Chemicals. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **2003**, *43*, 309–334. [CrossRef]
94. Holme, J.A.; Gorria, M.; Arlt, V.M.; Øvrebø, S.; Solhaug, A.; Tekpli, X.; Landvik, N.E.; Huc, L.; Fardel, O.; Lagadic-Gossmann, D. Different mechanisms involved in apoptosis following exposure to benzo[a]pyrene in F258 and Hepa1c1c7 cells. *Chem. Biol. Interact.* **2007**, *167*, 41–55. [CrossRef]
95. Chung, J.; Kim, J.; Kim, W.; Lee, S.; Kim, Y.; Park, J.; Hong, Y.; Chun, Y.; Park, Y.; Oh, S. Abundance of aryl hydrocarbon receptor potentiates benzo[a]pyrene-induced apoptosis in Hepa1c1c7 cells via CYP1A1 activation. *Toxicology* **2007**, *235*, 62–72. [CrossRef] [PubMed]
96. Shen, D.; Tian, L.; Shen, T.; Sun, H.; Liu, P. Alpha-Lipoic Acid Protects Human Aortic Endothelial Cells Against H_2O_2-Induced Injury and Inhibits Atherosclerosis in Ovariectomized Low Density Lipoprotein Receptor Knock-Out Mice. *Cell. Physiol. Biochem.* **2018**, *47*, 2261–2277. [CrossRef] [PubMed]
97. Harvey, K.A.; Walker, C.L.; Xu, Z.; Whitley, P.; Pavlina, T.M.; Hise, M.; Zaloga, G.P.; Siddiqui, R.A. Oleic acid inhibits stearic acid-induced inhibition of cell growth and pro-inflammatory responses in human aortic endothelial cells. *J. Lipid Res.* **2010**, *51*, 3470–3480. [CrossRef] [PubMed]
98. Jansen, F.; Li, Q.; Pfeifer, A.; Werner, N. Endothelial- and Immune Cell-Derived Extracellular Vesicles in the Regulation of Cardiovascular Health and Disease. *JACC Basic Transl. Sci.* **2017**, *2*, 790–807. [CrossRef]

99. Van Meteren, N.; Lagadic-Gossmann, D.; Chevanne, M.; Gallais, I.; Gobart, D.; Burel, A.; Bucher, S.; Grova, N.; Fromenty, B.; Appenzeller, B.M.R.; et al. Polycyclic Aromatic Hydrocarbons Can Trigger Hepatocyte Release of Extracellular Vesicles by Various Mechanisms of Action Depending on Their Affinity for the Aryl Hydrocarbon Receptor. *Toxicol. Sci.* **2019**, *171*, 443–462. [CrossRef]
100. Wu, S.-Y.; Mayneris-Perxachs, J.; Lovegrove, J.A.; Todd, S.; Yaqoob, P. Fish-oil supplementation alters numbers of circulating endothelial progenitor cells and microparticles independently of eNOS genotype. *Am. J. Clin. Nutr.* **2014**, *100*, 1232–1243. [CrossRef]
101. Muller-Feuga, A.; Lemar, M.; Vermel, E.; Pradelles, R.; Rimbaud, L.; Valiorgue, P. Appraisal of a horizontal two-phase flow photobioreactor for industrial production of delicate microalgae species. *J. Appl. Phycol.* **2012**, *24*, 349–355. [CrossRef]
102. Muller-Feuga, A. Réacteur Photosynthétique Pour la Culture de Microorganismes et Procédé de Culture de Microorganismes. Patent No. WO/2010/109108, 30 September 2010.
103. Heydarizadeh, P.; Boureba, W.; Zahedi, M.; Huang, B.; Moreau, B.; Lukomska, E.; Couzinet-Mossion, A.; Wielgosz-Collin, G.; Martin-Jézéquel, V.; Bougaran, G.; et al. Response of CO2-starved diatom *Phaeodactylum tricornutum* to light intensity transition. *Philos. Trans. R. Soc. B Biol. Sci.* **2017**, *372*, 20160396. [CrossRef]
104. Lichtenthaler, H.K. [34] Chlorophylls and carotenoids: Pigments of photosynthetic biomembranes. In *Methods in Enzymology*; Elsevier: Amsterdam, The Netherlands, 1987; Volume 148, pp. 350–382. ISBN 978-0-12-182048-0.
105. Schoefs, B. Determination of pigments in vegetables. *J. Chromatogr. A* **2004**, *1054*, 217–226. [CrossRef]
106. Schoefs, B.; Franck, F. Chlorophyll Synthesis in Dark-Grown Pine Primary Needles. *Plant Physiol.* **1998**, *118*, 1159–1168. [CrossRef]
107. Jeffrey, S.W. (Ed.) *Phytoplankton Pigments in Oceanography: Guidelines to Modern Methods*, 2nd ed.; Monographs on Oceanographic Methodology; Unesco Publ: Paris, France, 2005; ISBN 978-92-3-103275-2.
108. Théry, C.; Amigorena, S.; Raposo, G.; Clayton, A. Isolation and Characterization of Exosomes from Cell Culture Supernatants and Biological Fluids. *Curr. Protoc. Cell Biol.* **2006**, *30*, 3.22.1–3.22.29. [CrossRef] [PubMed]
109. Lötvall, J.; Hill, A.F.; Hochberg, F.; Buzás, E.I.; Di Vizio, D.; Gardiner, C.; Gho, Y.S.; Kurochkin, I.V.; Mathivanan, S.; Quesenberry, P.; et al. Minimal experimental requirements for definition of extracellular vesicles and their functions: A position statement from the International Society for Extracellular Vesicles. *J. Extracell. Vesicles* **2014**, *3*, 26913. [CrossRef] [PubMed]

© 2019 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/).

Discussion générale et perspectives

L'Homme est continuellement exposé à une multitude de xénobiotiques, dont des contaminants de l'environnement. Parmi ces xénobiotiques, les HAP représentent une classe majeure de polluants toxiques. Ces polluants produits de manière naturelle ou anthropique sont principalement retrouvés dans les aliments et l'air ambiant. Ils sont impliqués directement ou indirectement dans la survenue et/ou l'aggravation de pathologies telles que les cancers et les maladies cardiovasculaires (Bansal and Kim, 2015). Devant l'importance en termes de santé publique, il est essentiel de surveiller l'exposition à ces polluants et les risques associés. A l'heure actuelle, les biomarqueurs d'expositions utilisés ne sont pas suffisamment fiables, sensibles ou spécifiques pour permettre d'évaluer l'exposition aux mélanges d'HAP et pour détecter une réponse cellulaire précoce associée avant l'apparition des dommages aux organes cibles (Castano-Vinyals, 2004; Srogi, 2007). Dans la recherche de nouveaux biomarqueurs plus fiables, des études récentes mettent en lumière tout l'intérêt potentiel des VE, susceptibles d'être libérées dans le milieu extracellulaire par les cellules agressées (Dickhout and Koenen, 2018; Lane et al., 2018). Ces VE peuvent également présenter des caractéristiques physicochimiques spécifiques du type d'agression et de l'organe atteint (de Jong et al., 2012). La quantité de VE produite peut également refléter la gravité de certaines pathologies. En effet, la production de VE circulantes dans le sang, dérivées de l'endothélium, a été associée à la gravité de la septicémie, d'accident vasculaire cérébral, de l'athérosclérose et du syndrome métabolique (Curtis et al., 2013).

Les résultats obtenus durant cette thèse, ont permis de démontrer que certains HAP (B[a]P, DBA, B[a]P) provoquent une surproduction de VE par les cellules endothéliales. Nous avons également observé cet effet *in vivo* dans des échantillons d'urine de rat exposé à un mélange des 16 HAP répertoriés comme «prioritaires» par l'US-EPA. Ces résultats suggèrent que les VE pourraient être particulièrement utiles afin de surveiller l'exposition aux HAP, et plus spécifiquement au B[a]P, considéré comme un HAP de référence, et pour détecter la réponse cellulaire précoce associée avant l'apparition de dommages aux organes cibles.

Néanmoins, de nombreux points restent à approfondir, notamment la caractérisation des populations, les mécanismes impliqués dans la formation des VE sous l'influence du B[a]P ainsi que leurs rôles physiologiques.

Nous avons démontré que le B[a]P stimule la production des S-VE et des L-VE, à savoir les exosomes et les microvésicules. D'après les distributions en taille obtenues par le NTA, nos deux populations de S-VE et de L-VE semblent être composées de plusieurs sous-populations. Il a déjà été rapporté que les populations de VE peuvent être composées de sous-populations ayant des caractéristiques différentes (taille, densité….) (Willms et al., 2016; Lässer et al., 2018). Dans le but de mieux caractériser les S-VE et les L-VE, nous avons essayé, par une approche théorique, d'examiner les différentes sous population de S-VE et de L-VE obtenues par NTA. Nous avons émis l'hypothèse que le profil de distribution en taille des S-VE ou des L-VE enregistré par le NTA était la somme des différentes sous-populations (somme des courbes de Gauss), suivant une distribution normale : $f(x) = a * \exp [-1/2((x-\mu)/ \sigma)^2]$ (a représentant la hauteur du pic (c'est-à-dire une sous-population de S-VE ou de L-VE) ; μ : le nombre moyen de S-VE ou de L-VE ; σ2 : la variance et x : les diamètres des S-VE ou L-VE). A partir de l'observation de nos courbes, nous avons isolé théoriquement des sous-populations puis calculé un profil théorique pour le S-VE et les L-VE. Nous avons considéré que le profil théorique était représentatif du profil observé quand le facteur ERF (fonction erreur, erf(x), permet d'exprimer la marge d'erreur des évaluations statistiques) était inférieur à 0.01. (**Erf** = $\Sigma [y(i)obs – y(i)theo]^2 / \Sigma y(i)^2obs$ ou y(i)obs : données observées et y(i)theo : données théorique).

D'après cette approche purement théorique et préliminaire, les S-VE produites par les cellules HMEC-1 contiennent trois sous-populations dont le diamètre moyen est estimé à environ 140 nm, 200 nm ou 310 nm. Le B[a]P ne semble pas modifier le diamètre moyen des S-VE. Cependant, il apparaît que la première sous-population, qui est la population majoritaire dans les S-VE, avec un diamètre d'environ 140 nm, soit induite par le B[a]P, contrairement aux deux autres sous-populations. Concernant les L-VE, il semblerait qu'elles soient composées de quatre sous-populations dont le diamètre moyen est estimé environ à 170 nm, 240 nm, 380 nm ou 560 nm. Parmi celles-ci, la troisième sous-population, qui est la population majoritaire dans les L-VE, avec un diamètre de 380 nm serait particulièrement sensible au B[a]P. Cette approche théorique préliminaire suggère que les populations de S-VE et de L-VE seraient composées de différentes sous-populations présentant une sensibilité différentielle au B[a]P. Ainsi, il pourrait être intéressant de les isoler en fonction de leur densité par ultracentrifugation sur gradient de saccharose ou d'iodixanol. Des fractions d'environ un millitre devront être recueillies puis lavées par ultracentrifugation avant analyse au NTA. Cette

analyse permettra de distinguer les sous-populations présentes en fonction de leur densité, de leur taille et de leur nombre. Une analyse plus approfondie nécessiterait l'analyse de marqueurs protéiques dans les différentes sous-populations (Willms et al., 2016; Colombo et al., 2014).

Concernant les mécanismes moléculaires mis en jeu, nous avons montré que seuls les ligands (B[a]P, DBA, B[a]P) possédant une forte affinité pour AhR, stimulent la production de VE. L'utilisation d'un antagoniste de AhR, l'α-NF, sur la production de S-VE et L-VE, nous a permis de démontrer que seule la production des S-VE induite par B[a]P était dépendante de l'activation de AhR. Il reste cependant à déterminer le rôle précis de AhR dans la production de S-VE par les cellules HMEC-1, notamment en présence de B[a]P. Une des hypothèses éventuelles est l'implication des sphingolipides. En effet, dans les cellules épithéliales, plusieurs ligands de AhR, y compris les HAP, sont capables de stimuler la production de sphingosine-1-phosphate, un intermédiaire bioactif du métabolisme des sphingolipides (Reiners and Clift, 1999; Wang et al., 2019). Les sphingolipides et les enzymes liées à leur biosynthèse, particulièrement la nSMAse-2, ont été associées à la biogenèse des EXO. Ils participeraient à la formation des ILV dans les corps multivésiculaires et façonneraient la courbure de la membrane (Trajkovic et al., 2008; Verderio et al., 2018). En ce qui concerne les L-VE, il a été démontré que l'activation du récepteur P2X7, ATP dépendant, entraîne un réarrangement membranaire influençant la libération des MV (Bianco et al., 2005; Thomas and Salter, 2010). L'activation de ce récepteur entraînerait la translocation de la sphingomyélinase acide vers la membrane plasmique, qui génère du céramide, favorisant ainsi le bourgeonnement de la membrane et la libération des MV (Bianco et al., 2009). Il est intéressant de noter que ce récepteur, retrouvé dans les cellules HMEC-1, est surexprimé en présence de B[a]P dans la lignée cellulaire de trophoblaste JEG-3 (Seiffert et al., 2006; Wakx et al., 2016). Il est donc possible que ce récepteur soit impliqué dans la production de L-VE dans les cellules HMEC-1.

Une autre hypothèse possible est la modification des caractéristiques physicochimiques des radeaux lipidiques. Ces microdomaines membranaires, riches en cholestérol et en sphingolipides, sont présents dans les membranes des MV et EXO (de Gassart et al., 2003; Pollet et al., 2018). Ces microdomaines sont à la fois impliqués dans la formation et dans la composition des VE. Il a déjà été démontré que le B[a]P modifie la composition de ces

microdomaines, notamment *via* l'activation de AhR (Tekpli et al., 2010). De plus, le récepteur P2X7 est également associé aux radeaux lipidiques riches en cholestérol (Robinson et al., 2014). Il pourrait donc être intéressant de tester le rôle du remodelage membranaire dans la production de S-VE et L-VE par les cellules HMEC-1 induit par le B[a]P.

Si les effets du B[a]P que nous observons sur la production de VE par les cellules endothéliales sont originaux, la capacité d'une cellule à produire des VE lors d'une agression chimique est déjà connue. Ainsi, d'autres xénobiotiques tels que des médicaments (nifédipine, ionomycine) augmentent la production et la libération de VE (Cesselli et al., 2018). Ces réactions, considérées comme une défense contre une agression, sont décrites par certains auteurs comme un moyen mis en place par la cellule pour évacuer rapidement des composés potentiellement toxiques (Jorfi and Inal, 2013). Il a été démontré que les cellules cancéreuses après un traitement médicamenteux, par exemple à la doxorubicine, étaient en mesure d'utiliser ce système afin d'éliminer des molécules anticancéreuses (Shedden et al., 2003). Sachant que les HAP sont des molécules lipophiles s'accumulant dans les membranes et déclenchant de nombreuses réactions cellulaires, nous pouvons émettre l'hypothèse que l'augmentation de la production de VE, suite à l'exposition au B[a]P, est une réponse mise en place par les cellules pour évacuer le toxique. Pour répondre à cette hypothèse, il serait envisageable de doser le B[a]P et ses métabolites dans les VE par spectrométrie de masse (Wakx et al., 2016). Pour cela, les concentrations en B[a]P présentes dans les VE et dans le milieu intracellulaire seront comparées entre elles, mais aussi avec la concentration initiale en B[a]P du milieu de culture. Une concentration supérieure dans les VE en comparaison à la concentration intracellulaire pourrait être le signe d'une accumulation du toxique dans les VE. Cependant, nous risquons d'être limités par la sensibilité des techniques actuelles concernant le dosage du B[a]P et de ses métabolites dans les VE.

Nous avons également observé que les HAP stimulent *in vivo* la production des VE plasmatique et urinaire chez le rat (Le Goff et al., 2019b; van Meteren et al., 2019). Sachant que les VE contiennent des lipides, des acides nucléiques et des protéines et que le B[a]P est capable d'affecter la composition en protéines des VE (cavéoline-1 et flotilline-1), il serait possible de réaliser une analyse « omique » à moyen terme. Cette analyse permettrait de déterminer si la composition en VE plasmatique et urinaire après exposition aux HAP, révèle une signature protéique et/ou lipidique et/ou en acides nucléiques spécifique. Cette signature

pouvant être utile pour surveiller l'exposition aux substances toxiques et pour détecter les réponses cellulaires précoces avant l'apparition de dommages aux organes cibles.

Récemment, il a été démontré que les MV peuvent contenir des organites entiers tels que des mitochondries (Murray and Krasnodembskaya, 2019). Ce système peut être utilisé par la cellule pour éliminer les mitochondries dysfonctionnelles, mais également pour améliorer le métabolisme énergétique des cellules cibles. Phinney *et al.* ont démontré que l'élimination des mitochondries après inclusion dans le VE se fait par une mitophagie inachevée (Phinney et al., 2015). En effet, au lieu d'une fusion avec les lysosomes et d'une dégradation dans l'autophagosome lors de la mitophagie, des vésicules LC3 (microtubule-associated protein 1 Light Chain 3) positives contenant des mitochondries ont été incorporées dans les bourgeons extérieurs de la membrane plasmique et rejetées dans l'espace extracellulaire. Les auteurs ont émis l'hypothèse que ce processus était un moyen pour la cellule de survivre et de contrer le dysfonctionnement mitochondrial induit par le stress oxydatif (Phinney et al., 2015).

Lors d'une étude préliminaire sur la composition des L-VE, nous avons mis en évidence la présence de protéines mitochondriales localisées à des niveaux différents de la mitochondrie : TOM20 (Mitochondrial import receptor subunit TOM20), protéine de la membrane externe de la mitochondrie ; PMPCB (Peptidase, Mitochondrial Processing Beta Subunit) protéine de la matrice mitochondriale, sous unité béta d'une peptidase mitochondriale impliquée dans la maturation protéique ; et COX IV (Cytochrome c oxidase subunit 4), une protéine du complexe IV de la membrane interne de la mitochondrie en charge du transfert d'électron entre le cytochrome c et l'oxygène moléculaire. Nous avons également mis en évidence l'induction de la LC3, une protéine utilisée comme marqueur de l'autophagie, par le B[a]P dans les cellules HMEC-1. L'observation par microscopie électronique a révélé des L-VE compatibles avec la taille des mitochondries et contenant des structures morphologiquement proches des mitochondries.

Fait intéressant, il a été démontré que le B[a]P induit des dysfonctionnements mitochondriaux, en particulier l'hyperpolarisation des membranes, et déclenche des processus autophagiques dont la mitophagie (Hardonnière et al., 2015; Yuan et al., 2017; Das et al., 2017). La présence de protéines mitochondriales dans les L-VE et l'induction du taux de protéine LC3 en présence de B[a]P dans les cellules HMEC-1, nous conduisent à émettre

l'hypothèse que les cellules HMEC-1 utilisent une mitophagie inachevée et les L-VE, afin d'éliminer les mitochondries dysfonctionnelles, après exposition au B[a]P pour maintenir leur survie. Pour déterminer l'état fonctionnel des mitochondries libérées dans les L-VE, il est envisageable d'utiliser des marqueurs fluorescents s'accumulant dans les mitochondries tels que le MitoTracker© et Red CMXRos, permettent de mettre en évidence par cytométrie en flux, la présence de mitochondries fonctionnelles. Cette analyse nous permettrait également de distinguer si une sous-population de L-VE est riche en mitochondrie. De plus, la fonctionnalité de ces mitochondries présentes dans les L-VE pourra être étudiée par la technique du Seahorse qui évalue la consommation mitochondriale d'oxygène (Phinney et al., 2015). Une autre question importante est le devenir des mitochondries émises *via* les L-VE une fois transmises à des cellules réceptrices telles que des hépatocytes et la réponse de ces cellules cibles. Pour étudier les effets des L-VE sur les hépatocytes, nous envisageons de mesurer le taux de consommation d'oxygène mitochondriale, la production d'ATP, la production d'ERO et l'apoptose.

Il est certain que la première stratégie à adopter afin de prévenir l'apparition de pathologies associées à l'exposition aux polluants de l'environnement est de réduire les sources d'émissions. En 2015, l'OMS a publié un rapport contenant quatre recommandations permettant de diminuer les risques sanitaires liés aux polluants atmosphériques dont les HAP font partie (WHO and Scovronick, 2015). Ils préconisent de réduire les émissions des véhicules par des normes plus strictes, de privilégier les transports en commun, d'utiliser des combustibles plus propres pour limiter le chauffage au bois et d'encourager la consommation d'aliments nutritifs d'origine végétale. Malgré les moyens pouvant être mis en place afin de diminuer l'exposition aux HAP, leurs élimination complète est techniquement irréalisable, notamment de par notre mode de vie moderne et de leur présence dans les aliments. Ainsi, l'utilisation d'aliments nutritifs d'origine végétale apparaît être une stratégie intéressante dans la prévention des pathologies associées à l'exposition aux contaminants de l'environnement. Plusieurs études nutritionnelles et épidémiologiques ont montré l'implication des caroténoïdes et des AGPI ω3 dans la prévention des maladies cardiovasculaires et des cancers (Voutilainen et al., 2006; Stahl and Sies, 2005; Casas et al., 2018). Certaines de ces molécules bioactives sont retrouvées en grande quantité dans les microalgues marines notamment chez *Ostreococcus tauri* et *Phaeodactylum tricornutum*.

Au cours de cette thèse, nous avons démontré l'effet protecteur d'extraits de ces deux microalgues sur la toxicité induite par le B[a]P dans les cellules endothéliales HMEC-1. Nos données indiquent que l'extrait OT, riche en DHA et en néoxanthine, peut réduire la toxicité du B[a]P en diminuant l'expression des cytokines pro-inflammatoires IL-8 et Il-1β ; une enzyme de bioactivation du B[a]P, le CYP1A1 ; l'apoptose ; et la production des VE induite par le B[a]P. L'extrait PT, riche en EPA et en fucoxanthine, n'a inhibé que l'expression de la cytokine pro-inflammatoire IL-8 induite par la B[a]P. Ainsi, nos travaux semblent indiquer que l'extrait OT pourrait être envisagé comme élément de protection vis-à-vis de la toxicité induite par le B[a]P.

Malgré la présence de plusieurs études montrant les effets bénéfiques d'extraits de microalgues sur la santé, leur composition extrêmement diversifiée (caroténoïdes, acides gras, vitamines…) rend pour ainsi dire impossible l'attribution des effets protecteurs à une seule molécule bioactive. De plus, il est probable qu'il existe des effets synergiques entre ces molécules.

Cependant, la plupart des effets délétères du B[a]P (apoptose, induction de cytokines pro-inflammatoires, CYP450) sont médiés par l'activation de AhR. Nous avons démontré que l'extrait OT inhibe à la fois l'apoptose, l'expression du CYP1A1 et des cytokines IL-1β et IL-8 induit par le B[a]P. Nous pouvons émettre l'hypothèse que l'effet protecteur de l'extrait OT serait en partie médié par l'inhibition de AhR activé par le B[a]P. L'utilisation d'un agoniste d'AhR, tel que le FICZ en présence de l'extrait OT, nous permettrait de confirmer l'implication de AhR.

Nous avons observé que l'extrait OT à des concentrations plus élevées et l'extrait PT induisent l'expression du CYP1A1. Il a été démontré que les microalgues contiennent d'autres molécules et en particulier des flavonoïdes (Goiris et al., 2014). Ces molécules telles que la génistéine, peuvent agir comme des agonistes de AhR et induire efficacement le CYP1A1 (Denison and Nagy, 2003). Bien que la composition des flavonoïdes n'ait pas été étudiée dans nos extraits de microalgues, nous pouvons émettre l'hypothèse que les flavonoïdes présents dans l'extrait OT et PT, à des concentrations plus élevées, deviennent des compétiteurs pour l'activation de AhR et donc induisent le CYP1A1.

L'EPA, le DHA et certains caroténoïdes telles que la fucoxanthine présents dans nos extraits sont connus pour leurs effets anti-inflammatoires *via* l'inhibition de la voie NF-κB. Sachant que le B[a]P active cette voie de signalisation *via* la production d'ERO, il serait également probable que les effets anti-inflammatoires observés soient dus à une inhibition de la voie NF-κB. La translocation nucléaire de NF-κB devra être étudiée notamment par l'utilisation de kits tels que NF-κB p65 Transcription Factor Assay Kit en présence des extraits et d'un contrôle positif comme le TNF-α.

Des recherches supplémentaires sont également nécessaires pour déterminer si les effets observés dans les cellules HMEC-1 sont principalement dus aux acides gras ou aux pigments (caroténoïdes et chlorophylles) présents dans l'extrait OT. Ainsi, il est possible d'extraire les lipides totaux ou les pigments totaux à partir de l'extrait OT à l'aide de mélanges de solvants organiques, nous permettant d'étudier les effets des deux fractions sur la toxicité induite par le B[a]P.

A plus long terme, il sera nécessaire de mener une étude *in vivo* pour nous rapprocher des protocoles nutritionnels humains. Ainsi, ces protocoles nous permettraient d'évaluer la biodisponibilité et la bioaccessibilité des molécules bioactives présents dans notre extrait et de comprendre le rôle biologique de ces molécules.

Bibliographie

Abdel-Shafy, H.I., and Mansour, M.S.M. (2016). A review on polycyclic aromatic hydrocarbons: Source, environmental impact, effect on human health and remediation. Egypt. J. Pet. *25*, 107–123.

Abusamra, A.J., Zhong, Z., Zheng, X., Li, M., Ichim, T.E., Chin, J.L., and Min, W.-P. (2005). Tumor exosomes expressing Fas ligand mediate CD8+ T-cell apoptosis. Blood Cells. Mol. Dis. *35*, 169–173.

Achten, C., and Andersson, J.T. (2015). Overview of Polycyclic Aromatic Compounds (PAC). Polycycl. Aromat. Compd. *35*, 177–186.

Agrawal, P.K., Shrivastava, R., and Verma, J. (2019). Bioremediation Approaches for Degradation and Detoxification of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons. In Emerging and Eco-Friendly Approaches for Waste Management, R.N. Bharagava, and P. Chowdhary, eds. (Singapore: Springer Singapore), pp. 99–119.

Ahmad, A., Moriguchi, T., and Salem, N. (2002). Decrease in neuron size in docosahexaenoic acid-deficient brain. Pediatr. Neurol. *26*, 210–218.

Aishvarya, V., Jena, J., Pradhan, N., Panda, P.K., and Sukla, L.B. (2015). Microalgae: Cultivation and Application. In Environmental Microbial Biotechnology, L.B. Sukla, N. Pradhan, S. Panda, and B.K. Mishra, eds. (Cham: Springer International Publishing), pp. 289–311.

Akbar, N., Azzimato, V., Choudhury, R.P., and Aouadi, M. (2019). Extracellular vesicles in metabolic disease. Diabetologia *62*, 2179–2187.

Alamo, A., Condorelli, R.A., Mongioì, L.M., Cannarella, R., Giacone, F., Calabrese, V., La Vignera, S., and Calogero, A.E. (2019). Environment and Male Fertility: Effects of Benzo-α-Pyrene and Resveratrol on Human Sperm Function In Vitro. J. Clin. Med. *8*, 561.

Alhamdow, A., Lindh, C., Albin, M., Gustavsson, P., Tinnerberg, H., and Broberg, K. (2017). Early markers of cardiovascular disease are associated with occupational exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons. Sci. Rep. *7*, 9426.

Al-Nedawi, K., Meehan, B., Micallef, J., Lhotak, V., May, L., Guha, A., and Rak, J. (2008). Intercellular transfer of the oncogenic receptor EGFRvIII by microvesicles derived from tumour cells. Nat. Cell Biol. *10*, 619–624.

Anderson, H.C. (1969). Vesicles associated with calcification in the matrix of epiphyseal cartilage. J. Cell Biol. *41*, 59–72.

Andreu, Z., and Yáñez-Mó, M. (2014). Tetraspanins in Extracellular Vesicle Formation and Function. Front. Immunol. *5*.

Angerer, J., Ewers, U., and Wilhelm, M. (2007). Human biomonitoring: State of the art. Int. J. Hyg. Environ. Health *210*, 201–228.

Antonsson, C., Whitelaw, M.L., McGuire, J., Gustafsson, J.A., and Poellinger, L. (1995). Distinct roles of the molecular chaperone hsp90 in modulating dioxin receptor function via the basic helix-loop-helix and PAS domains. Mol. Cell. Biol. *15*, 756–765.

Arlt, V.M., Stiborova, M., Henderson, C.J., Thiemann, M., Frei, E., Aimova, D., Singh, R., Gamboa da Costa, G., Schmitz, O.J., Farmer, P.B., et al. (2007). Metabolic activation of benzo[a]pyrene in vitro by hepatic cytochrome P450 contrasts with detoxification in vivo: experiments with hepatic cytochrome P450 reductase null mice. Carcinogenesis *29*, 656–665.

Armstrong, B., Hutchinson, E., Unwin, J., and Fletcher, T. (2004). Lung Cancer Risk after Exposure to Polycyclic Aromatic Hydrocarbons: A Review and Meta-Analysis. Environ. Health Perspect. *112*, 970–978.

Ba, Q., Li, J., Huang, C., Qiu, H., Li, J., Chu, R., Zhang, W., Xie, D., Wu, Y., and Wang, H. (2015). Effects of Benzo[a]pyrene Exposure on Human Hepatocellular Carcinoma Cell Angiogenesis, Metastasis, and NF-κB Signaling. Environ. Health Perspect. *123*, 246–254.

Baietti, M.F., Zhang, Z., Mortier, E., Melchior, A., Degeest, G., Geeraerts, A., Ivarsson, Y., Depoortere, F., Coomans, C., Vermeiren, E., et al. (2012). Syndecan–syntenin–ALIX regulates the biogenesis of exosomes. Nat. Cell Biol. *14*, 677–685.

Bang, H.O., Dyerberg, J., and Nielsen, A.B. (1971). Plasma lipid and lipoprotein pattern in Greenlandic West-coast Eskimos. The Lancet *297*, 1143–1146.

Bansal, V., and Kim, K.-H. (2015). Review of PAH contamination in food products and their health hazards. Environ. Int. *84*, 26–38.

Barbeau, D., Persoons, R., Marques, M., Hervé, C., Laffitte-Rigaud, G., and Maitre, A. (2014). Relevance of urinary 3-hydroxybenzo(a)pyrene and 1-hydroxypyrene to assess exposure to carcinogenic polycyclic aromatic hydrocarbon mixtures in metallurgy workers. Ann. Occup. Hyg. *58*, 579–590.

Barbeau, D., Lutier, S., Choisnard, L., Marques, M., Persoons, R., and Maitre, A. (2018). Urinary trans-anti-7,8,9,10-tetrahydroxy-7,8,9,10-tetrahydrobenzo(a)pyrene as the most relevant biomarker for assessing carcinogenic polycyclic aromatic hydrocarbons exposure. Environ. Int. *112*, 147–155.

Barnathan, G. (2007). Sources connues et potentielles de DHA pour les besoins de l'homme. Ol. Corps Gras Lipides *14*, 35–43.

Becker, E.W. (1994). Microalgae: biotechnology and microbiology (Cambridge ; New York: Cambridge University Press).

Beischlag, T.V., Luis Morales, J., Hollingshead, B.D., and Perdew, G.H. (2008). The aryl hydrocarbon receptor complex and the control of gene expression. Crit. Rev. Eukaryot. Gene Expr. *18*, 207–250.

Beloribi-Djefaflia, S., Vasseur, S., and Guillaumond, F. (2016). Conde-Vancells. Oncogenesis *5*, e189–e189.

van den Berg, M., Sanderson, T., Kurihara, N., and Katayama, A. (2003). Role of metabolism in the endocrine-disrupting effects of chemicals in aquatic and terrestrial systems. Pure Appl. Chem. *75*, 1917–1932.

Bernstein, A.M., Ding, E.L., Willett, W.C., and Rimm, E.B. (2012). A Meta-Analysis Shows That Docosahexaenoic Acid from Algal Oil Reduces Serum Triglycerides and Increases HDL-Cholesterol and LDL-Cholesterol in Persons without Coronary Heart Disease. J. Nutr. *142*, 99–104.

Bersten, D.C., Sullivan, A.E., Peet, D.J., and Whitelaw, M.L. (2013). bHLH–PAS proteins in cancer. Nat. Rev. Cancer *13*, 827–841.

Bertrand, J. (2008). Mouvements des diatomées VIII: synthèse et hypothèse. Diatom Res. *23*, 19–29.

Bevan, D.R., and Ruggio, D.M. (1991). Bioavailability in Vivo of Benzo[a]Pyrene Adsorbed to Diesel Particulate. Toxicol. Ind. Health *7*, 125–139.

Bianco, F., Pravettoni, E., Colombo, A., Schenk, U., Möller, T., Matteoli, M., and Verderio, C. (2005). Astrocyte-Derived ATP Induces Vesicle Shedding and IL-1β Release from Microglia. J. Immunol. *174*, 7268–7277.

Bianco, F., Perrotta, C., Novellino, L., Francolini, M., Riganti, L., Menna, E., Saglietti, L., Schuchman, E.H., Furlan, R., Clementi, E., et al. (2009). Acid sphingomyelinase activity triggers microparticle release from glial cells. EMBO J. *28*, 1043–1054.

Blanc-Mathieu, R., Verhelst, B., Derelle, E., Rombauts, S., Bouget, F.-Y., Carré, I., Château, A., Eyre-Walker, A., Grimsley, N., Moreau, H., et al. (2014). An improved genome of the model marine alga Ostreococcus tauri unfolds by assessing Illumina de novo assemblies. BMC Genomics *15*, 1103.

Bock, K.W. (2019). Aryl hydrocarbon receptor (AHR): From selected human target genes and crosstalk with transcription factors to multiple AHR functions. Biochem. Pharmacol. *168*, 65–70.

Bohn, T. (2017). Carotenoids, Chronic Disease Prevention and Dietary Recommendations. Int. J. Vitam. Nutr. Res. *87*, 121–130.

Bolden, A.L., Rochester, J.R., Schultz, K., and Kwiatkowski, C.F. (2017). Polycyclic aromatic hydrocarbons and female reproductive health: A scoping review. Reprod. Toxicol. *73*, 61–74.

Bolt, H.M. (2014). Causation of human urothelial cancer: there are challenging new data! Arch. Toxicol. *88*, 1769–1770.

Booth, A.M., Fang, Y., Fallon, J.K., Yang, J.-M., Hildreth, J.E.K., and Gould, S.J. (2006). Exosomes and HIV Gag bud from endosome-like domains of the T cell plasma membrane. J. Cell Biol. *172*, 923–935.

Borowitzka, L.J. (1981). The microflora. In Salt Lakes, W.D. Williams, ed. (Dordrecht: Springer Netherlands), pp. 33–46.

Borowitzka, M.A. (2018). Biology of Microalgae. In Microalgae in Health and Disease Prevention, (Elsevier), pp. 23–72.

Bosma, R., Miazek, K., Willemsen, S.M., Vermuë, M.H., and Wijffels, R.H. (2008). Growth inhibition of *Monodus subterraneus* by free fatty acids. Biotechnol. Bioeng. *101*, 1108–1114.

Boström, C.-E., Gerde, P., Hanberg, A., Jernström, B., Johansson, C., Kyrklund, T., Rannug, A., Törnqvist, M., Victorin, K., and Westerholm, R. (2002). Cancer risk assessment, indicators, and guidelines for polycyclic aromatic hydrocarbons in the ambient air. Environ. Health Perspect. *110*, 451–488.

Botebol, H., Lelandais, G., Six, C., Lesuisse, E., Meng, A., Bittner, L., Lecrom, S., Sutak, R., Lozano, J.-C., Schatt, P., et al. (2017). Acclimation of a low iron adapted Ostreococcus strain to iron limitation through cell biomass lowering. Sci. Rep. *7*, 327.

Bowler, C., Allen, A.E., Badger, J.H., Grimwood, J., Jabbari, K., Kuo, A., Maheswari, U., Martens, C., Maumus, F., Otillar, R.P., et al. (2008). The Phaeodactylum genome reveals the evolutionary history of diatom genomes. Nature *456*, 239–244.

Boysen, G., and Hecht, S.S. (2003). Analysis of DNA and protein adducts of benzo[a]pyrene in human tissues using structure-specific methods. Mutat. Res. Mutat. Res. *543*, 17–30.

Brinkmann, J., Stolpmann, K., Trappe, S., Otter, T., Genkinger, D., Bock, U., Liebsch, M., Henkler, F., Hutzler, C., and Luch, A. (2013). Metabolically Competent Human Skin Models: Activation and Genotoxicity of Benzo[a]pyrene. Toxicol. Sci. *131*, 351–359.

Brucker, N., Charão, M.F., Moro, A.M., Ferrari, P., Bubols, G., Sauer, E., Fracasso, R., Durgante, J., Thiesen, F.V., Duarte, M.M., et al. (2014). Atherosclerotic process in taxi drivers occupationally exposed to air pollution and co-morbidities. Environ. Res. *131*, 31–38.

Burchiel, S.W., and Luster, M.I. (2001). Signaling by Environmental Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in Human Lymphocytes. Clin. Immunol. *98*, 2–10.

Burstyn, I., Kromhout, H., Partanen, T., Svane, O., Langard, S., Ahrens, W., Kauppinen, T., Stucker, I., Shaham, J., Heederik, D., et al. (2005). Polycyclic Aromatic Hydrocarbons and Fatal Ischemic Heart Disease: Epidemiology *16*, 744–750.

Casas, R., Castro-Barquero, S., Estruch, R., and Sacanella, E. (2018). Nutrition and Cardiovascular Health. Int. J. Mol. Sci. *19*.

Castano-Vinyals, G. (2004). Biomarkers of exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons from environmental air pollution. Occup. Environ. Med. *61*, 12e–112.

Castenholz, R.W. (1969). Thermophilic blue-green algae and the thermal environment. Bacteriol. Rev. *33*, 476–504.

Cavalieri, E.L., and Rogan, E.G. (1992). The approach to understanding aromatic hydrocarbon carcinogenesis. The central role of radical cations in metabolic activation. Pharmacol. Ther. *55*, 183–199.

Centers for Disease Control and Prevention (US), National Center for Chronic Disease Prevention and Health Promotion (US), and Office on Smoking and Health (US) (2010). How Tobacco Smoke Causes Disease: The Biology and Behavioral Basis for Smoking-Attributable

Disease: A Report of the Surgeon General (Atlanta (GA): Centers for Disease Control and Prevention (US)).

Cesselli, D., Parisse, P., Aleksova, A., Veneziano, C., Cervellin, C., Zanello, A., and Beltrami, A.P. (2018). Extracellular Vesicles: How Drug and Pathology Interfere With Their Biogenesis and Function. Front. Physiol. *9*, 1394.

Cetin, I., Alvino, G., and Cardellicchio, M. (2009). Long chain fatty acids and dietary fats in fetal nutrition: Long chain fatty acids and dietary fats in fetal nutrition. J. Physiol. *587*, 3441–3451.

Chalon, S. (2006). Omega-3 fatty acids and monoamine neurotransmission. Prostaglandins Leukot. Essent. Fatty Acids *75*, 259–269.

Chargaff, E., and West, R. (1946). The biological significance of the thromboplastic protein of blood. J. Biol. Chem. *166*, 189–197.

Chen, P.-H., Chang, H., Chang, J.T., and Lin, P. (2012). Aryl hydrocarbon receptor in association with RelA modulates IL-6 expression in non-smoking lung cancer. Oncogene *31*, 2555–2565.

Chen, S., Ma, Z., Li, S., Waigi, M.G., Jiang, J., Liu, J., and Ling, W. (2019). Colonization of polycyclic aromatic hydrocarbon-degrading bacteria on roots reduces the risk of PAH contamination in vegetables. Environ. Int. *132*, 105081.

Cherry, N., Aklilu, Y., Beach, J., Britz-McKibbin, P., Elbourne, R., Galarneau, J.-M., Gill, B., Kinniburgh, D., and Zhang, X. (2019). Urinary 1-hydroxypyrene and Skin Contamination in Firefighters Deployed to the Fort McMurray Fire. Ann. Work Expo. Health *63*, 448–458.

Choi, W.Y., Sim, J.-H., Lee, J.-Y., Kang, D.H., and Lee, H.Y. (2019a). Increased Anti-Inflammatory Effects on LPS-Induced Microglia Cells by Spirulina maxima Extract from Ultrasonic Process. Appl. Sci. *9*, 2144.

Choi, Y.Y., Patel, A.K., Hong, M.E., Chang, W.S., and Sim, S.J. (2019b). Microalgae Bioenergy with Carbon Capture and Storage (BECCS): An emerging sustainable bioprocess for reduced CO2 emission and biofuel production. Bioresour. Technol. Rep. *7*, 100270.

Chong, S.Y., Lee, C.K., Huang, C., Ou, Y.H., Charles, C.J., Richards, A.M., Neupane, Y.R., Pavon, M.V., Zharkova, O., Pastorin, G., et al. (2019). Extracellular Vesicles in Cardiovascular Diseases: Alternative Biomarker Sources, Therapeutic Agents, and Drug Delivery Carriers. Int. J. Mol. Sci. *20*, 3272.

Chrétiennot-Dinet, M.-J., Courties, C., Vaquer, A., Neveux, J., Claustre, H., Lautier, J., and Machado, M.C. (1995). A new marine picoeucaryote: Ostreococcus tauri gen. et sp. nov. (Chlorophyta, Prasinophyceae). Phycologia *34*, 285–292.

Christaki, E., Bonos, E., and Florou-Paneri, P. (2015). Innovative Microalgae Pigments as Functional Ingredients in Nutrition. In Handbook of Marine Microalgae, (Elsevier), pp. 233–243.

CITEPA (2017). Centre Interprofessionnel Technique d'Etudes de la Pollution Atmosphérique. https://www.citepa.org/fr/air-et-climat/polluants/polluants-organiques-persistants/hydrocarbures-aromatiques-polycycliques.

Colombo, J., Gustafson, K.M., Gajewski, B.J., Shaddy, D.J., Kerling, E.H., Thodosoff, J.M., Doty, T., Brez, C.C., and Carlson, S.E. (2016). Prenatal DHA supplementation and infant attention. Pediatr. Res. *80*, 656–662.

Colombo, M., Raposo, G., and Théry, C. (2014). Biogenesis, Secretion, and Intercellular Interactions of Exosomes and Other Extracellular Vesicles. Annu. Rev. Cell Dev. Biol. *30*, 255–289.

del Conde, I., Shrimpton, C.N., Thiagarajan, P., and López, J.A. (2005). Tissue-factor–bearing microvesicles arise from lipid rafts and fuse with activated platelets to initiate coagulation. Blood *106*, 1604–1611.

Conde-Vancells, J., Gonzalez, E., Lu, S.C., Mato, J.M., and Falcon-Perez, J.M. (2010). Overview of extracellular microvesicles in drug metabolism. Expert Opin. Drug Metab. Toxicol. *6*, 543–554.

Connor, D.E., Exner, T., Ma, D.D.F., and Joseph, J.E. (2010). The majority of circulating platelet-derived microparticles fail to bind annexin V, lack phospholipid-dependent procoagulant activity and demonstrate greater expression of glycoprotein Ib. Thromb. Haemost. *103*, 1044–1052.

Conti, G.O., Calogero, A.E., Giacone, F., Fiore, M., Barchitta, M., Agodi, A., and Ferrante, M. (2017). B(a)P adduct levels and fertility: A cross-sectional study in a Sicilian population. Mol. Med. Rep. *15*, 3398–3404.

Corellou, F., Schwartz, C., Motta, J.-P., Djouani-Tahri, E.B., Sanchez, F., and Bouget, F.-Y. (2009). Clocks in the Green Lineage: Comparative Functional Analysis of the Circadian Architecture of the Picoeukaryote *Ostreococcus*. Plant Cell *21*, 3436–3449.

Coti Bertrand, P., O'Kusky, J.R., and Innis, S.M. (2006). Maternal Dietary (n-3) Fatty Acid Deficiency Alters Neurogenesis in the Embryonic Rat Brain. J. Nutr. *136*, 1570–1575.

Courties, C., Vaquer, A., Troussellier, M., Lautier, J., Chrétiennot-Dinet, M.J., Neveux, J., Machado, C., and Claustre, H. (1994). Smallest eukaryotic organism. Nature *370*, 255–255.

Couteau, C., and Coiffard, L. (2018). Microalgal Application in Cosmetics. In Microalgae in Health and Disease Prevention, (Elsevier), pp. 317–323.

Curfs, D.M.J., Lutgens, E., Gijbels, M.J.J., Kockx, M.M., Daemen, M.J.A.P., and van Schooten, F.J. (2004). Chronic Exposure to the Carcinogenic Compound Benzo[a]Pyrene Induces Larger and Phenotypically Different Atherosclerotic Plaques in ApoE-Knockout Mice. Am. J. Pathol. *164*, 101–108.

Curtis, A.M., Edelberg, J., Jonas, R., Rogers, W.T., Moore, J.S., Syed, W., and Mohler, E.R. (2013). Endothelial microparticles: Sophisticated vesicles modulating vascular function. Vasc. Med. *18*, 204–214.

Das, D.N., Naik, P.P., Mukhopadhyay, S., Panda, P.K., Sinha, N., Meher, B.R., and Bhutia, S.K. (2017). Elimination of dysfunctional mitochondria through mitophagy suppresses benzo[a]pyrene-induced apoptosis. Free Radic. Biol. Med. *112*, 452–463.

De Martino, A., Bartual, A., Willis, A., Meichenin, A., Villazán, B., Maheswari, U., and Bowler, C. (2011). Physiological and Molecular Evidence that Environmental Changes Elicit Morphological Interconversion in the Model Diatom Phaeodactylum tricornutum. Protist *162*, 462–481.

Decelle, J., Probert, I., Bittner, L., Desdevises, Y., Colin, S., de Vargas, C., Gali, M., Simo, R., and Not, F. (2012). An original mode of symbiosis in open ocean plankton. Proc. Natl. Acad. Sci. *109*, 18000–18005.

Dembinska-Kiec, A. (2005). Carotenoids: risk or benefit for health. Biochim. Biophys. Acta BBA - Mol. Basis Dis. *1740*, 93–94.

Denison, M.S., and Nagy, S.R. (2003). Activation of the Aryl Hydrocarbon Receptor by Structural Diverse Exogenous and Endogenous Chemicals. Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol. *43*, 309–334.

Denison, M.S., Soshilov, A.A., He, G., DeGroot, D.E., and Zhao, B. (2011). Exactly the Same but Different: Promiscuity and Diversity in the Molecular Mechanisms of Action of the Aryl Hydrocarbon (Dioxin) Receptor. Toxicol. Sci. *124*, 1–22.

Denisov, I.G., Makris, T.M., Sligar, S.G., and Schlichting, I. (2005). Structure and Chemistry of Cytochrome P450. Chem. Rev. *105*, 2253–2278.

Derelle, E., Ferraz, C., Rombauts, S., Rouze, P., Worden, A.Z., Robbens, S., Partensky, F., Degroeve, S., Echeynie, S., Cooke, R., et al. (2006). Genome analysis of the smallest free-living eukaryote Ostreococcus tauri unveils many unique features. Proc. Natl. Acad. Sci. *103*, 11647–11652.

DGCCRF (2019). ALGUES Liste des algues pouvant être employées dans les compléments alimentaires.

Dhar, K., Subashchandrabose, S.R., Venkateswarlu, K., Krishnan, K., and Megharaj, M. (2019). Anaerobic Microbial Degradation of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons: A Comprehensive Review. In Reviews of Environmental Contamination and Toxicology Volume 251, P. de Voogt, ed. (Cham: Springer International Publishing), pp. 25–108.

Dickhout, A., and Koenen, R.R. (2018). Extracellular Vesicles as Biomarkers in Cardiovascular Disease; Chances and Risks. Front. Cardiovasc. Med. *5*, 113.

Diergaarde, B. (2003). Cigarette smoking and genetic alterations in sporadic colon carcinomas. Carcinogenesis *24*, 565–571.

Ding, Y.S., Trommel, J.S., Yan, X.J., Ashley, D., and Watson, C.H. (2005). Determination of 14 Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in Mainstream Smoke from Domestic Cigarettes. Environ. Sci. Technol. *39*, 471–478.

Dong, B., and Matsumura, F. (2008). Roles of Cytosolic Phospholipase A2 and Src Kinase in the Early Action of 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo- *p* -dioxin through a Nongenomic Pathway in MCF10A Cells. Mol. Pharmacol. *74*, 255–263.

Douglas Rees, E., Mandelstam, P., Lowry, J.Q., and Lipscomb, H. (1971). A study of the mechanism of intestinal absorption of benzo(a)pyrene. Biochim. Biophys. Acta BBA - Biomembr. *225*, 96–107.

D'Souza-Schorey, C., and Clancy, J.W. (2012). Tumor-derived microvesicles: shedding light on novel microenvironment modulators and prospective cancer biomarkers. Genes Dev. *26*, 1287–1299.

Duarte-Salles, T., Mendez, M.A., Pessoa, V., Guxens, M., Aguilera, I., Kogevinas, M., and Sunyer, J. (2010). Smoking during pregnancy is associated with higher dietary intake of polycyclic aromatic hydrocarbons and poor diet quality. Public Health Nutr. *13*, 2034–2043.

Duarte-Salles, T., Mendez, M.A., Morales, E., Bustamante, M., Rodríguez-Vicente, A., Kogevinas, M., and Sunyer, J. (2012). Dietary benzo(a)pyrene and fetal growth: Effect modification by vitamin C intake and glutathione S-transferase P1 polymorphism. Environ. Int. *45*, 1–8.

Duedahl-Olesen, L. (2013). Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in foods. In Persistent Organic Pollutants and Toxic Metals in Foods, (Elsevier), pp. 308–333.

Dunstan, J.A., Simmer, K., Dixon, G., and Prescott, S.L. (2008). Cognitive assessment of children at age 21/2 years after maternal fish oil supplementation in pregnancy: a randomised controlled trial. Arch. Dis. Child. - Fetal Neonatal Ed. *93*, F45–F50.

Dyerberg, J. (1978). Eicosapentaenoic acid and prevention of thrombosis and atherosclerosis? The Lancet *312*, 117–119.

Dyerberg, J., Bang, H.O., and Hjørne, N. (1975). Fatty acid composition of the plasma lipids in Greenland Eskimos. Am. J. Clin. Nutr. *28*, 958–966.

Edwards, N.T. (1983). Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAH's) in the Terrestrial Environment—A Review1. J. Environ. Qual. *12*, 427.

Edwards, S.C., Jedrychowski, W., Butscher, M., Camann, D., Kieltyka, A., Mroz, E., Flak, E., Li, Z., Wang, S., Rauh, V., et al. (2010). Prenatal Exposure to Airborne Polycyclic Aromatic Hydrocarbons and Children's Intelligence at 5 Years of Age in a Prospective Cohort Study in Poland. Environ. Health Perspect. *118*, 1326–1331.

EFSA (2008). Scientific Opinion of the Panel on Contaminants in the Food Chain.

El-Sayed, W.M., Hussin, W.A., Mahmoud, A.A., and AlFredan, M.A. (2013). The *Conyza triloba* Extracts with High Chlorophyll Content and Free Radical Scavenging Activity Had Anticancer Activity in Cell Lines. BioMed Res. Int. *2013*, 1–11.

Evans, M.D., Saparbaev, M., and Cooke, M.S. (2010). DNA repair and the origins of urinary oxidized 2'-deoxyribonucleosides. Mutagenesis *25*, 433–442.

Ewa, B., and Danuta, M.-Š. (2017). Polycyclic aromatic hydrocarbons and PAH-related DNA adducts. J. Appl. Genet. *58*, 321–330.

Fang, A.H., Smith, W.A., Vouros, P., and Gupta, R.C. (2001). Identification and Characterization of a Novel Benzo[a]pyrene-Derived DNA Adduct. Biochem. Biophys. Res. Commun. *281*, 383–389.

Formosa, R., and Vassallo, J. (2017). The Complex Biology of the Aryl Hydrocarbon Receptor and Its Role in the Pituitary Gland. Horm. Cancer *8*, 197–210.

Forster, K., Preuss, R., Rossbach, B., Bruning, T., Angerer, J., and Simon, P. (2008). 3-Hydroxybenzo[a]pyrene in the urine of workers with occupational exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons in different industries. Occup. Environ. Med. *65*, 224–229.

Foth, H., Kahl, R., and Kahl, G.F. (1988). Pharmacokinetics of low doses of benzo[a]pyrene in the rat. Food Chem. Toxicol. *26*, 45–51.

Fowler, D., Coyle, M., Skiba, U., Sutton, M.A., Cape, J.N., Reis, S., Sheppard, L.J., Jenkins, A., Grizzetti, B., Galloway, J.N., et al. (2013). The global nitrogen cycle in the twenty-first century. Philos. Trans. R. Soc. B Biol. Sci. *368*, 20130164.

Francius, G., Tesson, B., Dague, E., Martin-Jézéquel, V., and Dufrêne, Y.F. (2008). Nanostructure and nanomechanics of live Phaeodactylum tricornutum morphotypes. Environ. Microbiol. *10*, 1344–1356.

Friesen, M.C., Demers, P.A., Spinelli, J.J., Eisen, E.A., Lorenzi, M.F., and Le, N.D. (2010). Chronic and Acute Effects of Coal Tar Pitch Exposure and Cardiopulmonary Mortality Among Aluminum Smelter Workers. Am. J. Epidemiol. *172*, 790–799.

Fuentes, J.L., Huss, V.A.R., Montero, Z., Torronteras, R., Cuaresma, M., Garbayo, I., and Vílchez, C. (2016). Phylogenetic characterization and morphological and physiological aspects of a novel acidotolerant and halotolerant microalga Coccomyxa onubensis sp. nov. (Chlorophyta, Trebouxiophyceae). J. Appl. Phycol. *28*, 3269–3279.

Galasso, C., Gentile, A., Orefice, I., Ianora, A., Bruno, A., Noonan, D.M., Sansone, C., Albini, A., and Brunet, C. (2019). Microalgal Derivatives as Potential Nutraceutical and Food Supplements for Human Health: A Focus on Cancer Prevention and Interception. Nutrients *11*, 1226.

Ganesan, P., Matsubara, K., Sugawara, T., and Hirata, T. (2013). Marine algal carotenoids inhibit angiogenesis by down-regulating FGF-2-mediated intracellular signals in vascular endothelial cells. Mol. Cell. Biochem. *380*, 1–9.

García, J.L., de Vicente, M., and Galán, B. (2017). Microalgae, old sustainable food and fashion nutraceuticals. Microb. Biotechnol. *10*, 1017–1024.

de Gassart, A., Géminard, C., Février, B., Raposo, G., and Vidal, M. (2003). Lipid raft-associated protein sorting in exosomes. Blood *102*, 4336–4344.

Gateau, H., Solymosi, K., Marchand, J., and Schoefs, B. (2017). Carotenoids of Microalgae Used in Food Industry and Medicine. Mini-Rev. Med. Chem. *17*.

Gelboin, H.V. (1980). Benzo[alpha]pyrene metabolism, activation and carcinogenesis: role and regulation of mixed-function oxidases and related enzymes. Physiol. Rev. *60*, 1107–1166.

Gendre, C., Lafontaine, M., Morele, Y., Payan, J.-P., and Simon, P. (2002). Relationship Between Urinary Levels of 1-Hydroxypyrene and 3-Hydroxybenzo[a]pyrene for Workers Exposed to Polycyclic Aromatic Hydrocarbons. Polycycl. Aromat. Compd. *22*, 761–769.

Gerde, P. (2001). The rapid alveolar absorption of diesel soot-adsorbed benzo[a]pyrene: bioavailability, metabolism and dosimetry of an inhaled particle-borne carcinogen. Carcinogenesis *22*, 741–749.

Gerde, P., Muggenburg, B.A., Hoover, M.D., and Henderson, R.F. (1993). Disposition of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in the Respiratory Tract of the Beagle Dog. Toxicol. Appl. Pharmacol. *121*, 313–318.

Ghosal, D., Ghosh, S., Dutta, T.K., and Ahn, Y. (2016). Current State of Knowledge in Microbial Degradation of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAHs): A Review. Front. Microbiol. *7*.

Gimmler, H., and Weis, U. (1992). Dunaliella: physiology, biochemistry, and biotechnology (Boca Raton: CRC Press).

Girard, H., Butler, L.M., Villeneuve, L., Millikan, R.C., Sinha, R., Sandler, R.S., and Guillemette, C. (2008). UGT1A1 and UGT1A9 functional variants, meat intake, and colon cancer, among Caucasians and African-Americans. Mutat. Res. Mol. Mech. Mutagen. *644*, 56–63.

Giri, S.K., Yadav, A., Kumar, A., Dev, K., Gulati, S., Gupta, R., Aggarwal, N., and Gautam, S.K. (2012). CYP1A1 Gene Polymorphisms: Modulator of Genetic Damage in Coal-Tar Workers. Asian Pac. J. Cancer Prev. *13*, 3409–3416.

Glasier, G.F., Filfil, R., and Pacey, P.D. (2001). Formation of polycyclic aromatic hydrocarbons coincident with pyrolytic carbon deposition. Carbon *39*, 497–506.

Godschalk, R.W.L., Van Schooten, F.-J., and Bartsch, H. (2003). A Critical Evaluation of DNA Adducts as Biological Markers for Human Exposure to Polycyclic Aromatic Compounds. BMB Rep. *36*, 1–11.

Goiris, K., Muylaert, K., Voorspoels, S., Noten, B., De Paepe, D., E Baart, G.J., and De Cooman, L. (2014). Detection of flavonoids in microalgae from different evolutionary lineages. J. Phycol. *50*, 483–492.

Gould, S.J., and Raposo, G. (2013). As we wait: coping with an imperfect nomenclature for extracellular vesicles. J. Extracell. Vesicles *2*, 20389.

Graziani, A., Bricko, V., Carmignani, M., Graier, W., and Groschner, K. (2004). Cholesterol- and caveolin-rich membrane domains are essential for phospholipase A-dependent EDHF formation. Cardiovasc. Res. *64*, 234–242.

van Grevenynghe, J., Rion, S., Le Ferrec, E., Le Vee, M., Amiot, L., Fauchet, R., and Fardel, O. (2003). Polycyclic Aromatic Hydrocarbons Inhibit Differentiation of Human Monocytes into Macrophages. J. Immunol. *170*, 2374–2381.

van Grevenynghe, J., Sparfel, L., Vee, M.L., Gilot, D., Drenou, B., Fauchet, R., and Fardel, O. (2004). Cytochrome P450-dependent toxicity of environmental polycyclic aromatic hydrocarbons towards human macrophages. Biochem. Biophys. Res. Commun. *317*, 708–716.

Gross, J.C., Chaudhary, V., Bartscherer, K., and Boutros, M. (2012). Active Wnt proteins are secreted on exosomes. Nat. Cell Biol. *14*, 1036–1045.

Gu, J., Horikawa, Y., Chen, M., Dinney, C.P., and Wu, X. (2008). Benzo(a)pyrene Diol Epoxide-Induced Chromosome 9p21 Aberrations Are Associated with Increased Risk of Bladder Cancer. Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev. *17*, 2445–2450.

Guillou, L., Eikrem, W., Chrétiennot-Dinet, M.-J., Le Gall, F., Massana, R., Romari, K., Pedrós-Alió, C., and Vaulot, D. (2004). Diversity of Picoplanktonic Prasinophytes Assessed by Direct Nuclear SSU rDNA Sequencing of Environmental Samples and Novel Isolates Retrieved from Oceanic and Coastal Marine Ecosystems. Protist *155*, 193–214.

Guruvayoorappan, C., and Kuttan, G. (2007). β-Carotene Inhibits Tumor-Specific Angiogenesis by Altering the Cytokine Profile and Inhibits the Nuclear Translocation of Transcription Factors in B16F-10 Melanoma Cells. Integr. Cancer Ther. *6*, 258–270.

Gustavsson, P., Plato, N., Hallqvist, J., Hogstedt, C., Lewné, M., Reuterwall, C., and Schéele, P. (2001). A Population-Based Case-Referent Study of Myocardial Infarction and Occupational Exposure to Motor Exhaust, Other Combustion Products, Organic Solvents, Lead, and Dynamite: Epidemiology *12*, 222–228.

Guyot, E., Chevallier, A., Barouki, R., and Coumoul, X. (2013). The AhR twist: ligand-dependent AhR signaling and pharmaco-toxicological implications. Drug Discov. Today *18*, 479–486.

György, B., Szabó, T.G., Pásztói, M., Pál, Z., Misják, P., Aradi, B., László, V., Pállinger, É., Pap, E., Kittel, Á., et al. (2011). Membrane vesicles, current state-of-the-art: emerging role of extracellular vesicles. Cell. Mol. Life Sci. *68*, 2667–2688.

Ha, A.W., Na, S.J., and Kim, W.K. (2013). Antioxidant effects of fucoxanthin rich powder in rats fed with high fat diet. Nutr. Res. Pract. *7*, 475.

Haimeur, A., Ulmann, L., Mimouni, V., Guéno, F., Pineau-Vincent, F., Meskini, N., and Tremblin, G. (2012). The role of Odontella aurita, a marine diatom rich in EPA, as a dietary supplement

in dyslipidemia, platelet function and oxidative stress in high-fat fed rats. Lipids Health Dis. *11*, 147.

Han, S.-F., Jin, W.-B., Tu, R.-J., and Wu, W.-M. (2015). Biofuel production from microalgae as feedstock: current status and potential. Crit. Rev. Biotechnol. *35*, 255–268.

Hanson, P.I., and Cashikar, A. (2012). Multivesicular Body Morphogenesis. Annu. Rev. Cell Dev. Biol. *28*, 337–362.

Hardonnière, K., Huc, L., Podechard, N., Fernier, M., Tekpli, X., Gallais, I., Sergent, O., and Lagadic-Gossmann, D. (2015). Benzo[a]pyrene-induced nitric oxide production acts as a survival signal targeting mitochondrial membrane potential. Toxicol. In Vitro *29*, 1597–1608.

Hardonnière, K., Huc, L., Sergent, O., Holme, J.A., and Lagadic-Gossmann, D. (2017). Environmental carcinogenesis and pH homeostasis: Not only a matter of dysregulated metabolism. Semin. Cancer Biol. *43*, 49–65.

Harner, T., Rauert, C., Muir, D., Schuster, J.K., Hsu, Y.-M., Zhang, L., Marson, G., Watson, J.G., Ahad, J., Cho, S., et al. (2018). Air synthesis review: polycyclic aromatic compounds in the oil sands region. Environ. Rev. *26*, 430–468.

Harris, K.L., Banks, L.D., Mantey, J.A., Huderson, A.C., and Ramesh, A. (2013). Bioaccessibility of polycyclic aromatic hydrocarbons: relevance to toxicity and carcinogenesis. Expert Opin. Drug Metab. Toxicol. *9*, 1465–1480.

Hecht, S.S., and Hochalter, J.B. (2014). Quantitation of enantiomers of r-7,t-8,9,c-10-tetrahydroxy-7,8,9,10-tetrahydrobenzo[a]-pyrene in human urine: evidence supporting metabolic activation of benzo[a]pyrene via the bay region diol epoxide. Mutagenesis *29*, 351–356.

Henríquez-Castillo, C., Botebol, H., Mouton, A., Ramírez-Flandes, S., Lozano, J.-C., Lelandais, G., Andrade, S., Trefault, N., De la Iglesia, R., and Bouget, F.-Y. (2018). Ostreococcus tauri Luminescent Reporter Lines as Biosensors for Detecting Pollution From Copper-Mine Tailing Effluents in Coastal Environments. Front. Environ. Sci. *6*, 22.

Himmelstein, M.W., Boogaard, P.J., Cadet, J., Farmer, P.B., Kim, J.H., Martin, E.A., Persaud, R., and Shuker, D.E.G. (2009). Creating context for the use of DNA adduct data in cancer risk assessment: II. Overview of methods of identification and quantitation of DNA damage. Crit. Rev. Toxicol. *39*, 679–694.

Hirsova, P., Malhi, H., Russo, N., Shah, P.A., Trivedi, H., Lau, D.T.Y., Pisa, J.F., Wu, A., Shen, N., Jesudian, A., et al. (2019). Hepatology Highlights: Hepatology Highlights. Hepatology *70*, 455–458.

Hoh, E., Hunt, R.N., Quintana, P.J.E., Zakarian, J.M., Chatfield, D.A., Wittry, B.C., Rodriguez, E., and Matt, G.E. (2012). Environmental Tobacco Smoke as a Source of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in Settled Household Dust. Environ. Sci. Technol. *46*, 4174–4183.

Holme, J.A., Brinchmann, B.C., Le Ferrec, E., Lagadic-Gossmann, D., and Øvrevik, J. (2019a). Combustion Particle-Induced Changes in Calcium Homeostasis: A Contributing Factor to Vascular Disease? Cardiovasc. Toxicol. *19*, 198–209.

Holme, J.A., Brinchmann, B.C., Refsnes, M., Låg, M., and Øvrevik, J. (2019b). Potential role of polycyclic aromatic hydrocarbons as mediators of cardiovascular effects from combustion particles. Environ. Health *18*, 74.

Hosokawa, M., Wanezaki, S., Miyauchi, K., Kurihara, H., Kohno, H., Kawabata, J., Odashima, S., and Takahashi, K. (1999). Apoptosis-Inducing Effect of Fucoxanthin on Human Leukemia Cell Line HL-60. Food Sci. Technol. Res. *5*, 243–246.

Hsu, C., Morohashi, Y., Yoshimura, S., Manrique-Hoyos, N., Jung, S., Lauterbach, M.A., Bakhti, M., Grønborg, M., Möbius, W., Rhee, J., et al. (2010). Regulation of exosome secretion by Rab35 and its GTPase-activating proteins TBC1D10A–C. J. Cell Biol. *189*, 223–232.

Huang, X., Zhou, Y., Cui, X., Wu, X., Yuan, J., Xie, J., and Chen, W. (2018). Urinary polycyclic aromatic hydrocarbon metabolites and adult asthma: a case-control study. Sci. Rep. *8*, 7658.

Huber, M.A., Kraut, N., and Beug, H. (2005). Molecular requirements for epithelial–mesenchymal transition during tumor progression. Curr. Opin. Cell Biol. *17*, 548–558.

Hussain, K., Hoque, R.R., Balachandran, S., Medhi, S., Idris, M.G., Rahman, M., and Hussain, F.L. (2018). Monitoring and Risk Analysis of PAHs in the Environment. In Handbook of Environmental Materials Management, C.M. Hussain, ed. (Cham: Springer International Publishing), pp. 1–35.

Iamiceli, A.L., Abate, V., Abballe, A., Bena, A., De Filippis, S.P., De Luca, S., Fulgenzi, A.R., Iacovella, N., Ingelido, A.M., Marra, V., et al. (2019). Biomonitoring of the adult population in the area of turin waste incinerator: Baseline levels of polycyclic aromatic hydrocarbon metabolites. Environ. Res. 108903.

IARC (1987). Overall evaluations of carcinogenicity: an updating of IARC monographs volumes 1 to 42: this publication represents the views and expert opinions of an IARC ad-hoc Working Group on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans, which met in Lyon, 10-18 March 1987 (Lyon, France : Geneva, Switzerland: World Health Organization, International Agency for Research on Cancer ; Distributed by the World Health Organization, Distribution and Sales Service).

IARC (2010). Some non-heterocyclic polycyclic aromatic hydrocarbons and some related occupational exposures (Lyon, France : Geneva: IARC Press ; Distributed by World Health Organization).

Ichim, G., and Tait, S.W.G. (2016). A fate worse than death: apoptosis as an oncogenic process. Nat. Rev. Cancer *16*, 539–548.

Ikuta, T., Namiki, T., Fujii-Kuriyama, Y., and Kawajiri, K. (2009). AhR protein trafficking and function in the skin. Biochem. Pharmacol. *77*, 588–596.

INERIS (2006). Fiche de données toxicologiques et environnementales des substances chimiques : Benzo[a]pyrène. INERIS –DRC-01-25590-00DF252.doc.

Iqbal, H.M.N. (2017). High-value compounds from microalgae with industrial exploitability - A review. Front. Biosci. *9*, 319–342.

Jackson, D.P., Joshi, A.D., and Elferink, C.J. (2015). Ah receptor pathway intricacies; signaling through diverse protein partners and DNA-motifs. Toxicol. Res. *4*, 1143–1158.

Jacques, C., Perdu, E., Duplan, H., Jamin, E.L., Canlet, C., Debrauwer, L., Cravedi, J.P., Mavon, A., and Zalko, D. (2010). Disposition and biotransformation of 14C-Benzo(a)pyrene in a pig ear skin model: Ex vivo and in vitro approaches. Toxicol. Lett. *199*, 22–33.

JECFA (2006). Evaluation of certain food contaminants: sixty-fourth report of the Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives ; [Rome, 8 - 17 June 2005] (Geneva: World Health Organization).

Jeffrey, S.W., Wright, S.W., and Zapata, M. (2011). Microalgal classes and their signature pigments. In Phytoplankton Pigments, S. Roy, C. Llewellyn, E.S. Egeland, and G. Johnsen, eds. (Cambridge: Cambridge University Press), pp. 3–77.

Jeng, H.A., Pan, C.-H., Chao, M.-R., and Lin, W.-Y. (2015). Sperm DNA oxidative damage and DNA adducts. Mutat. Res. Toxicol. Environ. Mutagen. *794*, 75–82.

Ji, G., Gu, A., Zhou, Y., Shi, X., Xia, Y., Long, Y., Song, L., Wang, S., and Wang, X. (2010). Interactions between Exposure to Environmental Polycyclic Aromatic Hydrocarbons and DNA Repair Gene Polymorphisms on Bulky DNA Adducts in Human Sperm. PLoS ONE *5*, e13145.

Ji, G., Yan, L., Wu, S., Liu, J., Wang, L., Zhang, S., Shi, L., and Gu, A. (2013a). Bulky DNA adducts in human sperm associated with semen parameters and sperm DNA fragmentation in infertile men: a cross-sectional study. Environ. Health *12*, 82.

Ji, K., Xing, C., Jiang, F., Wang, X., Guo, H., Nan, J., Qian, L., Yang, P., Lin, J., Li, M., et al. (2013b). Benzo[a]pyrene induces oxidative stress and endothelial progenitor cell dysfunction via the activation of the NF-κB pathway. Int. J. Mol. Med. *31*, 922–930.

Jimenez, J.J., Jy, W., Mauro, L.M., Soderland, C., Horstman, L.L., and Ahn, Y.S. (2003). Endothelial cells release phenotypically and quantitatively distinct microparticles in activation and apoptosis. Thromb. Res. *109*, 175–180.

de Jong, O.G., Verhaar, M.C., Chen, Y., Vader, P., Gremmels, H., Posthuma, G., Schiffelers, R.M., Gucek, M., and van Balkom, B.W.M. (2012). Cellular stress conditions are reflected in the protein and RNA content of endothelial cell-derived exosomes. J. Extracell. Vesicles *1*, 18396.

Jorfi, S., and Inal, J.M. (2013). The role of microvesicles in cancer progression and drug resistance. Biochem. Soc. Trans. *41*, 293–298.

Judge, M.P., Harel, O., and Lammi-Keefe, C.J. (2007). Maternal consumption of a docosahexaenoic acid–containing functional food during pregnancy: benefit for infant

performance on problem-solving but not on recognition memory tasks at age 9 mo. Am. J. Clin. Nutr. *85*, 1572–1577.

Jules, G.E., Pratap, S., Ramesh, A., and Hood, D.B. (2012). In utero exposure to benzo(a)pyrene predisposes offspring to cardiovascular dysfunction in later-life. Toxicology *295*, 56–67.

Jung, K.H., Yan, B., Moors, K., Chillrud, S.N., Perzanowski, M.S., Whyatt, R.M., Hoepner, L., Goldstein, I., Zhang, B., Camann, D., et al. (2012). Repeated exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons and asthma: effect of seroatopy. Ann. Allergy. Asthma. Immunol. *109*, 249–254.

Jurisicova, A., Taniuchi, A., Li, H., Shang, Y., Antenos, M., Detmar, J., Xu, J., Matikainen, T., Hernández, A.B., Nunez, G., et al. (2007). Maternal exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons diminishes murine ovarian reserve via induction of Harakiri. J. Clin. Invest. JCI28493.

Kajikawa, M., Yamato, K.T., Kohzu, Y., Shoji, S., Matsui, K., Tanaka, Y., Sakai, Y., and Fukuzawa, H. (2006). A Front-end Desaturase from Chlamydomonas reinhardtii Produces Pinolenic and Coniferonic Acids by ω13 Desaturation in Methylotrophic Yeast and Tobacco. Plant Cell Physiol. *47*, 64–73.

Kapuci, M., Ulker, Z., Gurkan, S., and Alpsoy, L. (2014). Determination of cytotoxic and genotoxic effects of naphthalene, 1-naphthol and 2-naphthol on human lymphocyte culture. Toxicol. Ind. Health *30*, 82–89.

Karaman, A., and Pirim, I. (2009). Exposure to bitumen fumes and genotoxic effects on Turkish asphalt workers. Clin. Toxicol. *47*, 321–326.

Karttunen, V., Myllynen, P., Prochazka, G., Pelkonen, O., Segerbäck, D., and Vähäkangas, K. (2010). Placental transfer and DNA binding of benzo(a)pyrene in human placental perfusion. Toxicol. Lett. *197*, 75–81.

Kasai, H. (2016). What causes human cancer? Approaches from the chemistry of DNA damage. Genes Environ. *38*, 19.

Kawamura, Y., Kamata, E., Ogawa, Y., Kaneko, T., Uchiyama, S., and Saito, Y. (1988). The Effect of Various Foods on the Intestinal Absorption of Benzo(a)pyrene in Rats. Food Hyg. Saf. Sci. Shokuhin Eiseigaku Zasshi *29*, 21-25_1.

Kelley, D.S., Siegel, D., Vemuri, M., and Mackey, B.E. (2007). Docosahexaenoic acid supplementation improves fasting and postprandial lipid profiles in hypertriglyceridemic men. Am. J. Clin. Nutr. *86*, 324–333.

Kepley, C.L., Lauer, F.T., Oliver, J.M., and Burchiel, S.W. (2003). Environmental polycyclic aromatic hydrocarbons, benzo(a) pyrene (BaP) and BaP-quinones, enhance IgE-mediated histamine release and IL-4 production in human basophils. Clin. Immunol. *107*, 10–19.

Kim, K.-H., Jahan, S.A., Kabir, E., and Brown, R.J.C. (2013). A review of airborne polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) and their human health effects. Environ. Int. *60*, 71–80.

Kim, K.-N., Heo, S.-J., Yoon, W.-J., Kang, S.-M., Ahn, G., Yi, T.-H., and Jeon, Y.-J. (2010). Fucoxanthin inhibits the inflammatory response by suppressing the activation of NF-κB and MAPKs in lipopolysaccharide-induced RAW 264.7 macrophages. Eur. J. Pharmacol. *649*, 369–375.

Kim, S.-K., Ravichandran, Y.D., Khan, S.B., and Kim, Y.T. (2008). Prospective of the cosmeceuticals derived from marine organisms. Biotechnol. Bioprocess Eng. *13*, 511–523.

Kim, S.M., Jung, Y.-J., Kwon, O.-N., Cha, K.H., Um, B.-H., Chung, D., and Pan, C.-H. (2012). A Potential Commercial Source of Fucoxanthin Extracted from the Microalga Phaeodactylum tricornutum. Appl. Biochem. Biotechnol. *166*, 1843–1855.

Kiss, I., Orsós, Z., Gombos, K., Bogner, B., Csejtei, A., Tibold, A., Varga, Z., Pázsit, E., Magda, I., Zölyomi, A., et al. (2007). Association between allelic polymorphisms of metabolizing enzymes (CYP 1A1, CYP 1A2, CYP 2E1, mEH) and occurrence of colorectal cancer in Hungary. Anticancer Res. *27*, 2931–2937.

Klotz, K., Schindler, B.K., and Angerer, J. (2011). 1,2-Dihydroxynaphthalene as biomarker for a naphthalene exposure in humans. Int. J. Hyg. Environ. Health *214*, 110–114.

Kotake-Nara, E., Kushiro, M., Zhang, H., Sugawara, T., Miyashita, K., and Nagao, A. (2001). Carotenoids Affect Proliferation of Human Prostate Cancer Cells. J. Nutr. *131*, 3303–3306.

Kotake-Nara, E., Terasaki, M., and Nagao, A. (2005). Characterization of Apoptosis Induced by Fucoxanthin in Human Promyelocytic Leukemia Cells. Biosci. Biotechnol. Biochem. *69*, 224–227.

Koyande, A.K., Chew, K.W., Rambabu, K., Tao, Y., Chu, D.-T., and Show, P.-L. (2019). Microalgae: A potential alternative to health supplementation for humans. Food Sci. Hum. Wellness *8*, 16–24.

Krinsky, N.I., and Johnson, E.J. (2005). Carotenoid actions and their relation to health and disease. Mol. Aspects Med. *26*, 459–516.

Kuang, D., Zhang, W., Deng, Q., Zhang, X., Huang, K., Guan, L., Hu, D., Wu, T., and Guo, H. (2013). Dose-Response Relationships of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons Exposure and Oxidative Damage to DNA and Lipid in Coke Oven Workers. Environ. Sci. Technol. *47*, 7446–7456.

Kumari, P., Kumar, M., Reddy, C.R.K., and Jha, B. (2013). Algal lipids, fatty acids and sterols. In Functional Ingredients from Algae for Foods and Nutraceuticals, (Elsevier), pp. 87–134.

Kwon, S.H. (2019). Extracellular vesicles in renal physiology and clinical applications for renal disease. Korean J. Intern. Med. *34*, 470–479.

Ladics, G.S., Kawabata, T.T., Munson, A.E., and White, K.L. (1992). Evaluation of murine splenic cell type metabolism of benzo[a]pyrene and functionality in vitro following repeated in vivo exposure to benzo[a]pyrene. Toxicol. Appl. Pharmacol. *116*, 258–266.

Lafleur, A.L., Taghizadeh, K., Howard, J.B., Anacleto, J.F., and Quilliam, M.A. (1996). Characterization of flame-generated C10 to C160 polycyclic aromatic hydrocarbons by atmospheric-pressure chemical ionization mass spectrometry with liquid introduction via heated nebulizer interface. J. Am. Soc. Mass Spectrom. *7*, 276–286.

Lafontaine, M., Gendre, C., Delsaut, P., and Simon, P. (2004). Urinary 3-hydroxybenzo[a]pyrene as a biomarker of exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons: an approach for dertermining a biological limit value. Polycycl. Aromat. Compd. *24*, 441–450.

Lane, R.E., Korbie, D., Hill, M.M., and Trau, M. (2018). Extracellular vesicles as circulating cancer biomarkers: opportunities and challenges. Clin. Transl. Med. *7*, 14.

Langlois, P.H., Hoyt, A.T., Lupo, P.J., Lawson, C.C., Waters, M.A., Desrosiers, T.A., Shaw, G.M., Romitti, P.A., and Lammer, E.J. (2013). Maternal Occupational Exposure to Polycyclic Aromatic Hydrocarbons and Risk of Oral Cleft-Affected Pregnancies. Cleft Palate. Craniofac. J. *50*, 337–346.

Larigot, L., Juricek, L., Dairou, J., and Coumoul, X. (2018). AhR signaling pathways and regulatory functions. Biochim. Open *7*, 1–9.

Lässer, C., Jang, S.C., and Lötvall, J. (2018). Subpopulations of extracellular vesicles and their therapeutic potential. Mol. Aspects Med. *60*, 1–14.

Latifkar, A., Hur, Y.H., Sanchez, J.C., Cerione, R.A., and Antonyak, M.A. (2019). New insights into extracellular vesicle biogenesis and function. J. Cell Sci. *132*, jcs222406.

Laulagnier, K., Motta, C., Hamdi, S., Roy, S., Fauvelle, F., Pageaux, J.-F., Kobayashi, T., Salles, J.-P., Perret, B., Bonnerot, C., et al. (2004). Mast cell- and dendritic cell-derived exosomes display a specific lipid composition and an unusual membrane organization. Biochem. J. *380*, 161–171.

Laupeze, B., Amiot, L., Sparfel, L., Le Ferrec, E., Fauchet, R., and Fardel, O. (2002). Polycyclic Aromatic Hydrocarbons Affect Functional Differentiation and Maturation of Human Monocyte-Derived Dendritic Cells. J. Immunol. *168*, 2652–2658.

Laurent, C., Feidt, C., Lichtfouse, E., Grova, N., Laurent, F., and Rychen, G. (2001). Milk−Blood Transfer of ^{14}C-Tagged Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAHs) in Pigs. J. Agric. Food Chem. *49*, 2493–2496.

Lauritzen, L., Brambilla, P., Mazzocchi, A., Harsløf, L., Ciappolino, V., and Agostoni, C. (2016). DHA Effects in Brain Development and Function. Nutrients *8*, 6.

Le, H., and Salcedo, E. (2013). Chlorophyll: structure, production and medicinal uses (Hauppauge, N.Y: Nova Science Publishers).

Le Goff, M., Le Ferrec, E., Mayer, C., Mimouni, V., Lagadic-Gossmann, D., Schoefs, B., and Ulmann, L. (2019a). Microalgal carotenoids and phytosterols regulate biochemical mechanisms involved in human health and disease prevention. Biochimie *167*, 106–118.

Le Goff, M., Lagadic-Gossmann, D., Latour, R., Podechard, N., Grova, N., Gauffre, F., Chevance, S., Burel, A., Appenzeller, B.M.R., Ulmann, L., et al. (2019b). PAHs increase the production of extracellular vesicles both in vitro in endothelial cells and in vivo in urines from rats. Environ. Pollut. *255*, 113171.

Le Goff, M., Delbrut, A., Quinton, M., Pradelles, R., Bescher, M., Burel, A., Schoefs, B., Sergent, O., Lagadic-Gossmann, D., Le Ferrec, E., et al. (2019c). Protective Action of Ostreococcus Tauri and Phaeodactylum Tricornutum Extracts towards Benzo[a]Pyrene-Induced Cytotoxicity in Endothelial Cells. Mar. Drugs *18*, 3.

Lecureur, V., Ferrec, E.L., N'diaye, M., Vee, M.L., Gardyn, C., Gilot, D., and Fardel, O. (2005). ERK-dependent induction of TNFα expression by the environmental contaminant benzo(a)pyrene in primary human macrophages. FEBS Lett. *579*, 1904–1910.

Lelandais, G., Scheiber, I., Paz-Yepes, J., Lozano, J.-C., Botebol, H., Pilátová, J., Žárský, V., Léger, T., Blaiseau, P.-L., Bowler, C., et al. (2016). Ostreococcus tauri is a new model green alga for studying iron metabolism in eukaryotic phytoplankton. BMC Genomics *17*, 319.

Leroyer, A., Jeandel, F., Maitre, A., Howsam, M., Deplanque, D., Mazzuca, M., and Nisse, C. (2010). 1-Hydroxypyrene and 3-hydroxybenzo[a]pyrene as biomarkers of exposure to PAH in various environmental exposure situations. Sci. Total Environ. *408*, 1166–1173.

Leya, T., Rahn, A., LÃ¼tz, C., and Remias, D. (2009). Response of arctic snow and permafrost algae to high light and nitrogen stress by changes in pigment composition and applied aspects for biotechnology: Pigment change in snow algae. FEMS Microbiol. Ecol. *67*, 432–443.

Li, B., Antonyak, M.A., Zhang, J., and Cerione, R.A. (2012). RhoA triggers a specific signaling pathway that generates transforming microvesicles in cancer cells. Oncogene *31*, 4740–4749.

Li, Z., Mulholland, J.A., Romanoff, L.C., Pittman, E.N., Trinidad, D.A., Lewin, M.D., and Sjödin, A. (2010). Assessment of non-occupational exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons through personal air sampling and urinary biomonitoring. J. Environ. Monit. *12*, 1110.

Lim, E.J., Májková, Z., Xu, S., Bachas, L., Arzuaga, X., Smart, E., Tseng, M.T., Toborek, M., and Hennig, B. (2008). Coplanar polychlorinated biphenyl-induced CYP1A1 is regulated through caveolae signaling in vascular endothelial cells. Chem. Biol. Interact. *176*, 71–78.

Lin, C.-Y., Lee, C.-H., Chang, Y.-W., Wang, H.-M., Chen, C.-Y., and Chen, Y.-H. (2014). Pheophytin a Inhibits Inflammation via Suppression of LPS-Induced Nitric Oxide Synthase-2, Prostaglandin E2, and Interleukin-1β of Macrophages. Int. J. Mol. Sci. *15*, 22819–22834.

Lin, K.-H., Hsu, C.-Y., Huang, Y.-P., Lai, J.-Y., Hsieh, W.-B., Huang, M.-Y., Yang, C.-M., and Chao, P.-Y. (2013). Chlorophyll-Related Compounds Inhibit Cell Adhesion and Inflammation in Human Aortic Cells. J. Med. Food *16*, 886–898.

Liu, Y., and Chen, Q. (2018). 150 years of Darwin's theory of intercellular flow of hereditary information. Nat. Rev. Mol. Cell Biol. *19*, 749–750.

Lodovici, M., Akpan, V., Evangelisti, C., and Dolara, P. (2004). Sidestream tobacco smoke as the main predictor of exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons. J. Appl. Toxicol. *24*, 277–281.

Loft, S., Danielsen, P., Løhr, M., Jantzen, K., Hemmingsen, J.G., Roursgaard, M., Karotki, D.G., and Møller, P. (2012). Urinary excretion of 8-oxo-7,8-dihydroguanine as biomarker of oxidative damage to DNA. Arch. Biochem. Biophys. *518*, 142–150.

Lotz, A., Pesch, B., Dettbarn, G., Raulf, M., Welge, P., Rihs, H.-P., Breuer, D., Gabriel, S., Hahn, J.-U., Brüning, T., et al. (2016). Metabolites of the PAH diol epoxide pathway and other urinary biomarkers of phenanthrene and pyrene in workers with and without exposure to bitumen fumes. Int. Arch. Occup. Environ. Health *89*, 1251–1267.

Lozano, J.-C., Schatt, P., Botebol, H., Vergé, V., Lesuisse, E., Blain, S., Carré, I.A., and Bouget, F.-Y. (2014). Efficient gene targeting and removal of foreign DNA by homologous recombination in the picoeukaryote *Ostreococcus*. Plant J. *78*, 1073–1083.

Lupo, P.J., Langlois, P.H., Reefhuis, J., Lawson, C.C., Symanski, E., Desrosiers, T.A., Khodr, Z.G., Agopian, A.J., Waters, M.A., Duwe, K.N., et al. (2012). Maternal Occupational Exposure to Polycyclic Aromatic Hydrocarbons: Effects on Gastroschisis among Offspring in the National Birth Defects Prevention Study. Environ. Health Perspect. *120*, 910–915.

Macedo, M.F., Miller, A.Z., Dionisio, A., and Saiz-Jimenez, C. (2009). Biodiversity of cyanobacteria and green algae on monuments in the Mediterranean Basin: an overview. Microbiology *155*, 3476–3490.

Majkova, Z., Toborek, M., and Hennig, B. (2010). The role of caveolae in endothelial cell dysfunction with a focus on nutrition and environmental toxicants. J. Cell. Mol. Med. *14*, 2359–2370.

Manikandan, P., and Nagini, S. (2018). Cytochrome P450 Structure, Function and Clinical Significance: A Review. Curr. Drug Targets *19*.

Marie, C., Bouchard, M., Heredia-Ortiz, R., Viau, C., and Maître, A. (2010). A toxicokinetic study to elucidate 3-hydroxybenzo(a)pyrene atypical urinary excretion profile following intravenous injection of benzo(a)pyrene in rats. J. Appl. Toxicol. n/a-n/a.

Marin, B., and Melkonian, M. (2010). Molecular Phylogeny and Classification of the Mamiellophyceae class. nov. (Chlorophyta) based on Sequence Comparisons of the Nuclear- and Plastid-encoded rRNA Operons. Protist *161*, 304–336.

Martin-Jézéquel, V., and Tesson, B. (2012). 3 Phaeodactylum tricornutum polymorphism : an overview. In Advances in Algal Cell Biology, K. Heimann, and C. Katsaros, eds. (Berlin, Boston: DE GRUYTER), p.

Martino, A.D., Meichenin, A., Shi, J., Pan, K., and Bowler, C. (2007). Genetic and phenotypic characterization of *Phaeodactylum tricornutum* (Bacillariophyceae) accessions [1]. J. Phycol. *43*, 992–1009.

Mathieu, M., Martin-Jaular, L., Lavieu, G., and Théry, C. (2019). Specificities of secretion and uptake of exosomes and other extracellular vesicles for cell-to-cell communication. Nat. Cell Biol. *21*, 9–17.

Matsumura, F. (2009). The significance of the nongenomic pathway in mediating inflammatory signaling of the dioxin-activated Ah receptor to cause toxic effects. Biochem. Pharmacol. *77*, 608–626.

Mayer, C., Côme, M., Ulmann, L., Chini Zittelli, G., Faraloni, C., Nazih, H., Ouguerram, K., Chénais, B., and Mimouni, V. (2019). Preventive Effects of the Marine Microalga Phaeodactylum tricornutum, Used as a Food Supplement, on Risk Factors Associated with Metabolic Syndrome in Wistar Rats. Nutrients *11*, 1069.

McConnell, R.E., Higginbotham, J.N., Shifrin, D.A., Tabb, D.L., Coffey, R.J., and Tyska, M.J. (2009). The enterocyte microvillus is a vesicle-generating organelle. J. Cell Biol. *185*, 1285–1298.

McQuistan, T.J., Simonich, M.T., Pratt, M.M., Pereira, C.B., Hendricks, J.D., Dashwood, R.H., Williams, D.E., and Bailey, G.S. (2012). Cancer chemoprevention by dietary chlorophylls: A 12,000-animal dose–dose matrix biomarker and tumor study. Food Chem. Toxicol. *50*, 341–352.

Meldolesi, J. (2018). Exosomes and Ectosomes in Intercellular Communication. Curr. Biol. *28*, R435–R444.

Meng, F., Knapp, G.W., Green, T., Ross, J.A., and Parsons, B.L. (2009). K- *Ras* mutant fraction in A/J mouse lung increases as a function of benzo[*a*]pyrene dose. Environ. Mol. Mutagen. NA-NA.

Messenger, S.W., Woo, S.S., Sun, Z., and Martin, T.F.J. (2018). A Ca2+-stimulated exosome release pathway in cancer cells is regulated by Munc13-4. J. Cell Biol. *217*, 2877–2890.

van Meteren, N., Lagadic-Gossmann, D., Chevanne, M., Gallais, I., Gobart, D., Burel, A., Bucher, S., Grova, N., Fromenty, B., Appenzeller, B.M.R., et al. (2019). Polycyclic Aromatic Hydrocarbons Can Trigger Hepatocyte Release of Extracellular Vesicles by Various Mechanisms of Action Depending on Their Affinity for the Aryl Hydrocarbon Receptor. Toxicol. Sci. *171*, 443–462.

Miller, K.P., and Ramos, K.S. (2001). Impact of cellular metabolism on the biological effects of benzo[a]pyrene and related hydrocarbons. Drug Metab. Rev. *33*, 1–35.

Mimouni, V., Ulmann, L., Pasquet, V., Mathieu, M., Picot, L., Bougaran, G., Cadoret, J.-P., Morant-Manceau, A., and Schoefs, B. (2012). The Potential of Microalgae for the Production of Bioactive Molecules of Pharmaceutical Interest. Curr. Pharm. Biotechnol. *13*, 2733–2750.

Mimouni, V., Couzinet-Mossion, A., Ulmann, L., and Wielgosz-Collin, G. (2018). Lipids From Microalgae. In Microalgae in Health and Disease Prevention, (Elsevier), pp. 109–131.

Minciacchi, V.R., Freeman, M.R., and Di Vizio, D. (2015). Extracellular Vesicles in Cancer: Exosomes, Microvesicles and the Emerging Role of Large Oncosomes. Semin. Cell Dev. Biol. *40*, 41–51.

Miraglia, N., Assennato, G., Clonfero, E., Fustinoni, S., and Sannolo, N. (2004). [Biologically effective dose biomarkers]. G. Ital. Med. Lav. Ergon. *26*, 298–301.

Miyado, K., Yoshida, K., Yamagata, K., Sakakibara, K., Okabe, M., Wang, X., Miyamoto, K., Akutsu, H., Kondo, T., Takahashi, Y., et al. (2008). The fusing ability of sperm is bestowed by CD9-containing vesicles released from eggs in mice. Proc. Natl. Acad. Sci. *105*, 12921–12926.

Möbius, W., van Donselaar, E., Ohno-Iwashita, Y., Shimada, Y., Heijnen, H.F.G., Slot, J.W., and Geuze, H.J. (2003). Recycling Compartments and the Internal Vesicles of Multivesicular Bodies Harbor Most of the Cholesterol Found in the Endocytic Pathway. Traffic *4*, 222–231.

Mohamed, E.-S.A., Song, W.-H., Oh, S.-A., Park, Y.-J., You, Y.-A., Lee, S., Choi, J.-Y., Kim, Y.-J., Jo, I., and Pang, M.-G. (2010). The transgenerational impact of benzo(a)pyrene on murine male fertility. Hum. Reprod. *25*, 2427–2433.

Moir, D., Viau, A., Chu, I., Withey, J., and McMullen, E. (1998). Pharmacokinetics of benzo[a]pyrene in the rat. J. Toxicol. Environ. Health A *53*, 507–530.

Molino, A., Iovine, A., Casella, P., Mehariya, S., Chianese, S., Cerbone, A., Rimauro, J., and Musmarra, D. (2018). Microalgae Characterization for Consolidated and New Application in Human Food, Animal Feed and Nutraceuticals. Int. J. Environ. Res. Public. Health *15*, 2436.

Moody, R. (1995). In vivo and in vitro dermal absorption of benzo[a]pyrene in rat, guinea pig, human and tissue-cultured skin. J. Dermatol. Sci. *9*, 48–58.

Moody, R.P., Joncas, J., Richardson, M., and Chu, I. (2007). Contaminated Soils (I): In Vitro Dermal Absorption of Benzo[a]Pyrene in Human Skin. J. Toxicol. Environ. Health A *70*, 1858–1865.

Moorthy, B., Chu, C., and Carlin, D.J. (2015). Polycyclic Aromatic Hydrocarbons: From Metabolism to Lung Cancer. Toxicol. Sci. *145*, 5–15.

Morançais, M., Mouget, J.-L., and Dumay, J. (2018). Proteins and Pigments. In Microalgae in Health and Disease Prevention, (Elsevier), pp. 145–175.

Mordukhovich, I., Rossner, P., Terry, M.B., Santella, R., Zhang, Y.-J., Hibshoosh, H., Memeo, L., Mansukhani, M., Long, C.-M., Garbowski, G., et al. (2010). Associations between Polycyclic Aromatic Hydrocarbon–Related Exposures and *p53* Mutations in Breast Tumors. Environ. Health Perspect. *118*, 511–518.

Moulager, M., Corellou, F., Vergé, V., Escande, M.-L., and Bouget, F.-Y. (2010). Integration of Light Signals by the Retinoblastoma Pathway in the Control of S Phase Entry in the Picophytoplanktonic Cell Ostreococcus. PLoS Genet. *6*, e1000957.

Mulcahy, L.A., Pink, R.C., and Carter, D.R.F. (2014). Routes and mechanisms of extracellular vesicle uptake. J. Extracell. Vesicles *3*, 24641.

Mulders, K.J.M., Lamers, P.P., Martens, D.E., and Wijffels, R.H. (2014). Phototrophic pigment production with microalgae: biological constraints and opportunities. J. Phycol. *50*, 229–242.

Muller-Feuga, A. (2013). Microalgae for Aquaculture: The Current Global Situation and Future Trends. In Handbook of Microalgal Culture, A. Richmond, and Q. Hu, eds. (Oxford, UK: John Wiley & Sons, Ltd), pp. 613–627.

Muralidharan-Chari, V., Clancy, J., Plou, C., Romao, M., Chavrier, P., Raposo, G., and D'Souza-Schorey, C. (2009). ARF6-Regulated Shedding of Tumor Cell-Derived Plasma Membrane Microvesicles. Curr. Biol. *19*, 1875–1885.

Murray, L.M.A., and Krasnodembskaya, A.D. (2019). Concise Review: Intercellular Communication Via Organelle Transfer in the Biology and Therapeutic Applications of Stem Cells: Intercellular Communication Via Organelle Transfer. STEM CELLS *37*, 14–25.

Murray, I.A., Patterson, A.D., and Perdew, G.H. (2014). Aryl hydrocarbon receptor ligands in cancer: friend and foe. Nat. Rev. Cancer *14*, 801–814.

Murthy, K.N.C., Vanitha, A., Rajesha, J., Swamy, M.M., Sowmya, P.R., and Ravishankar, G.A. (2005). In vivo antioxidant activity of carotenoids from Dunaliella salina — a green microalga. Life Sci. *76*, 1381–1390.

Myers, M.J., Schook, L.B., and Bick, P.H. (1987). Mechanisms of benzo(a)pyrene-induced modulation of antigen presentation. J. Pharmacol. Exp. Ther. *242*, 399–404.

Myers, M.J., Blanton, R.H., and Bick, P.H. (1988). Inhibition of IL-2 responsiveness following exposure to benzo(A)pyrene is due to alterations in accessory cell function. Int. J. Immunopharmacol. *10*, 177–186.

Nabhan, J.F., Hu, R., Oh, R.S., Cohen, S.N., and Lu, Q. (2012). Formation and release of arrestin domain-containing protein 1-mediated microvesicles (ARMMs) at plasma membrane by recruitment of TSG101 protein. Proc. Natl. Acad. Sci. *109*, 4146–4151.

Nagy, A.S., and Szabo, J. (2018). Particle-Associated PAHs in Urban and Rural Ambient Air Samples. p.

Nakazawa, Y., Sashima, T., Hosokawa, M., and Miyashita, K. (2009). Comparative evaluation of growth inhibitory effect of stereoisomers of fucoxanthin in human cancer cell lines. J. Funct. Foods *1*, 88–97.

Nan, H.-M. (2001). Effects of occupation, lifestyle and genetic polymorphisms of CYP1A1, CYP2E1, GSTM1 and GSTT1 on urinary 1-hydroxypyrene and 2-naphthol concentrations. Carcinogenesis *22*, 787–793.

Naylor, R.L. (2016). Oil crops, aquaculture, and the rising role of demand: A fresh perspective on food security. Glob. Food Secur. *11*, 17–25.

N'Diaye, M., Le Ferrec, E., Lagadic-Gossmann, D., Corre, S., Gilot, D., Lecureur, V., Monteiro, P., Rauch, C., Galibert, M.-D., and Fardel, O. (2006). Aryl Hydrocarbon Receptor- and Calcium-

dependent Induction of the Chemokine CCL1 by the Environmental Contaminant Benzo[*a*]pyrene. J. Biol. Chem. *281*, 19906–19915.

Neal, M.S., Zhu, J., and Foster, W.G. (2008). Quantification of benzo[a]pyrene and other PAHs in the serum and follicular fluid of smokers versus non-smokers. Reprod. Toxicol. *25*, 100–106.

van Niel, G., D'Angelo, G., and Raposo, G. (2018). Shedding light on the cell biology of extracellular vesicles. Nat. Rev. Mol. Cell Biol. *19*, 213–228.

Nikolova-Pavageau, N., and Pillière, F. (2018). Cartographie des expositions aux hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP) par secteur d'activité: focus sur la surveillance biologique des expositions professionnelles. Réf. En Santé Au Trav. *TC 162*, 41–63.

Oboni, J.-B., Marques-Vidal, P., Bastardot, F., Vollenweider, P., and Waeber, G. (2016). Impact of smoking on fertility and age of menopause: a population-based assessment. BMJ Open *6*, e012015.

O'Brien, J.L., Langlois, P.H., Lawson, C.C., Scheuerle, A., Rocheleau, C.M., Waters, M.A., Symanski, E., Romitti, P.A., Agopian, A.J., Lupo, P.J., et al. (2016). Maternal occupational exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons and craniosynostosis among offspring in the national birth defects prevention study: MATERNAL EXPOSURE TO PAHs AND CRANIOSYNOSTOSIS. Birt. Defects Res. A. Clin. Mol. Teratol. *106*, 55–60.

Omland, O., Sherson, D., Hansen, A.M., Sigsgaard, T., Autrup, H., and Overgaard, E. (1994). Exposure of iron foundry workers to polycyclic aromatic hydrocarbons: benzo(a)pyrene-albumin adducts and 1-hydroxypyrene as biomarkers for exposure. Occup. Environ. Med. *51*, 513–518.

O'Neill, I.K., Goldberg, M.T., Ghissassi, F.E., and Rojas-Moreno, M. (1991). Dietary fibre, fat and beef modulation of colonic nuclear aberrations and microcapsule-trapped gastrointestinal metabolites of benzo[*a*]pyrene-treated C57/B6 mice consuming human diets. Carcinogenesis *12*, 175–180.

O'Neill, J.S., van Ooijen, G., Dixon, L.E., Troein, C., Corellou, F., Bouget, F.-Y., Reddy, A.B., and Millar, A.J. (2011). Circadian rhythms persist without transcription in a eukaryote. Nature *469*, 554–558.

Orjuela, M.A., Liu, X., Miller, R.L., Warburton, D., Tang, D., Jobanputra, V., Hoepner, L., Suen, I.H., Diaz-Carreno, S., Li, Z., et al. (2012). Urinary Naphthol Metabolites and Chromosomal Aberrations in 5-Year-Old Children. Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev. *21*, 1191–1202.

Ostrowski, M., Carmo, N.B., Krumeich, S., Fanget, I., Raposo, G., Savina, A., Moita, C.F., Schauer, K., Hume, A.N., Freitas, R.P., et al. (2010). Rab27a and Rab27b control different steps of the exosome secretion pathway. Nat. Cell Biol. *12*, 19–30.

Ou, X., and Ramos, K.S. (1992). Proliferative responses of quail aortic smooth muscle cells to benzo[a]pyrene: implications in PAH-induced atherogenesis. Toxicology *74*, 243–258.

Ovide, C., Kiefer-Meyer, M.-C., Bérard, C., Vergne, N., Lecroq, T., Plasson, C., Burel, C., Bernard, S., Driouich, A., Lerouge, P., et al. (2018). Comparative in depth RNA sequencing of P. tricornutum's morphotypes reveals specific features of the oval morphotype. Sci. Rep. *8*.

Paerl, R.W., Bouget, F.-Y., Lozano, J.-C., Vergé, V., Schatt, P., Allen, E.E., Palenik, B., and Azam, F. (2017). Use of plankton-derived vitamin B1 precursors, especially thiazole-related precursor, by key marine picoeukaryotic phytoplankton. ISME J. *11*, 753–765.

Pajares, S., and Ramos, R. (2019). Processes and Microorganisms Involved in the Marine Nitrogen Cycle: Knowledge and Gaps. Front. Mar. Sci. *6*, 739.

Pandya, R.J., Solomon, G., Kinner, A., and Balmes, J.R. (2002). Diesel exhaust and asthma: hypotheses and molecular mechanisms of action. Environ. Health Perspect. *110*, 103–112.

Parsons, B.L., Myers, M.B., Meng, F., Wang, Y., and McKinzie, P.B. (2010). Oncomutations as biomarkers of cancer risk. Environ. Mol. Mutagen. *51*, 836–850.

Patel, H.H., Murray, F., and Insel, P.A. (2008). Caveolae as Organizers of Pharmacologically Relevant Signal Transduction Molecules. Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol. *48*, 359–391.

Perera, F.P. (1997). Environment and Cancer: Who Are Susceptible? Science *278*, 1068–1073.

Perera, F.P. (2000). Molecular Epidemiology: On the Path to Prevention? JNCI J. Natl. Cancer Inst. *92*, 602–612.

Perera, F.P., Tang, D., Rauh, V., Lester, K., Tsai, W.Y., Tu, Y.H., Weiss, L., Hoepner, L., King, J., Del Priore, G., et al. (2005). Relationships among Polycyclic Aromatic Hydrocarbon–DNA Adducts, Proximity to the World Trade Center, and Effects on Fetal Growth. Environ. Health Perspect. *113*, 1062–1067.

Perera, F.P., Wang, S., Vishnevetsky, J., Zhang, B., Cole, K.J., Tang, D., Rauh, V., and Phillips, D.H. (2011). Polycyclic Aromatic Hydrocarbons–Aromatic DNA Adducts in Cord Blood and Behavior Scores in New York City Children. Environ. Health Perspect. *119*, 1176–1181.

Petit, P., Maître, A., Persoons, R., and Bicout, D.J. (2019). Lung cancer risk assessment for workers exposed to polycyclic aromatic hydrocarbons in various industries. Environ. Int. *124*, 109–120.

Pfeil, B.E., Schoefs, B., and Spetea, C. (2014). Function and evolution of channels and transporters in photosynthetic membranes. Cell. Mol. Life Sci. *71*, 979–998.

Phinney, D.G., Di Giuseppe, M., Njah, J., Sala, E., Shiva, S., St Croix, C.M., Stolz, D.B., Watkins, S.C., Di, Y.P., Leikauf, G.D., et al. (2015). Mesenchymal stem cells use extracellular vesicles to outsource mitophagy and shuttle microRNAs. Nat. Commun. *6*, 8472.

Piccin, A., Murphy, W.G., and Smith, O.P. (2007). Circulating microparticles: pathophysiology and clinical implications. Blood Rev. *21*, 157–171.

Plourde, M., and Cunnane, S.C. (2007). Extremely limited synthesis of long chain polyunsaturates in adults: implications for their dietary essentiality and use as supplements. Appl. Physiol. Nutr. Metab. Physiol. Appl. Nutr. Metab. *32*, 619–634.

Poblete-Naredo, I., and Albores, A. (2016). Molecular biomarkers to assess health risks due to environmental contaminants exposure. Biomédica *36*, 309.

Podechard, N., Lecureur, V., Le Ferrec, E., Guenon, I., Sparfel, L., Gilot, D., Gordon, J.R., Lagente, V., and Fardel, O. (2008). Interleukin-8 induction by the environmental contaminant benzo(a)pyrene is aryl hydrocarbon receptor-dependent and leads to lung inflammation. Toxicol. Lett. *177*, 130–137.

Poirier, M.C. (2004). Chemical-induced DNA damage and human cancer risk. Nat. Rev. Cancer *4*, 630–637.

Poirier, M.C. (2016). Linking DNA adduct formation and human cancer risk in chemical carcinogenesis: DNA Damage and Cancer Risk. Environ. Mol. Mutagen. *57*, 499–507.

Pollet, H., Conrard, L., Cloos, A.-S., and Tyteca, D. (2018). Plasma Membrane Lipid Domains as Platforms for Vesicle Biogenesis and Shedding? Biomolecules *8*, 94.

Porter, T.D. (2002). The roles of cytochromeb5 in cytochrome P450 reactions. J. Biochem. Mol. Toxicol. *16*, 311–316.

Poursafa, P., Moosazadeh, M., Abedini, E., Hajizadeh, Y., Mansourian, M., Pourzamani, H., and Amin, M.-M. (2017). A systematic review on the effects of polycyclic aromatic hydrocarbons on cardiometabolic impairment. Int. J. Prev. Med. *8*, 19.

Povey, A.C. (2000). DNA Adducts: Endogenous and Induced. Toxicol. Pathol. *28*, 405–414.

Pucci, F., Garris, C., Lai, C.P., Newton, A., Pfirschke, C., Engblom, C., Alvarez, D., Sprachman, M., Evavold, C., Magnuson, A., et al. (2016). SCS macrophages suppress melanoma by restricting tumor-derived vesicle-B cell interactions. Science *352*, 242–246.

Puga, A., Hoffer, A., Zhou, S., Bohm, J.M., Leikauf, G.D., and Shertzer, H.G. (1997). Sustained Increase in Intracellular Free Calcium and Activation of Cyclooxygenase-2 Expression in Mouse Hepatoma Cells Treated with Dioxin. Biochem. Pharmacol. *54*, 1287–1296.

Qin, Y.Y., Leung, C.K.M., Lin, C.K., Leung, A.O.W., Wang, H.S., Giesy, J.P., and Wong, M.H. (2011). Halogenated POPs and PAHs in Blood Plasma of Hong Kong Residents. Environ. Sci. Technol. *45*, 1630–1637.

Rahman, A., Barrowman, J.A., and Rahimtula, A. (1986). The influence of bile on the bioavailability of polynuclear aromatic hydrocarbons from the rat intestine. Can. J. Physiol. Pharmacol. *64*, 1214–1218.

Rahman, M.A., Kodidela, S., Sinha, N., Haque, S., Shukla, P.K., Rao, R., and Kumar, S. (2019). Plasma exosomes exacerbate alcohol- and acetaminophen-induced toxicity via CYP2E1 pathway. Sci. Rep. *9*, 6571.

Ramesh, A., Walker, S.A., Hood, D.B., Guillén, M.D., Schneider, K., and Weyand, E.H. (2004). Bioavailability and Risk Assessment of Orally Ingested Polycyclic Aromatic Hydrocarbons. Int. J. Toxicol. *23*, 301–333.

Ramesh, A., Kumar, A., Aramandla, M., and Nyanda, A. (2014). Polycyclic Aromatic Hydrocarbon Residues in Serum Samples of Autopsied Individuals from Tennessee. Int. J. Environ. Res. Public. Health *12*, 322–334.

Ramos, K.S., and Parrish, A.R. (1995). Growth-related signaling as a target of toxic insult in vascular smooth muscle cells: Implications in atherogenesis. Life Sci. *57*, 627–635.

Rao, A., and Rao, L. (2007). Carotenoids and human health. Pharmacol. Res. *55*, 207–216.

Raposo, M.F. de J., and de Morais, A.M.M.B. (2015). Microalgae for the prevention of cardiovascular disease and stroke. Life Sci. *125*, 32–41.

Raposo, G., Nijman, H.W., Stoorvogel, W., Liejendekker, R., Harding, C.V., Melief, C.J., and Geuze, H.J. (1996). B lymphocytes secrete antigen-presenting vesicles. J. Exp. Med. *183*, 1161–1172.

Rastogi, A., Vieira, F.R.J., Deton-Cabanillas, A.-F., Veluchamy, A., Cantrel, C., Wang, G., Vanormelingen, P., Bowler, C., Piganeau, G., Hu, H., et al. (2019). A genomics approach reveals the global genetic polymorphism, structure, and functional diversity of ten accessions of the marine model diatom Phaeodactylum tricornutum. ISME J.

Rebolloso-Fuentes, M.M., Navarro-Pérez, A., Ramos-Miras, J.J., and Guil-Guerrero, J.L. (2001). Biomass nutrient profiles of the microlaga Phaeodactylum tricornutum. J. Food Biochem. *25*, 57–76.

Reddy, K.P., and Reddy, P.S. (2016). Testicular and epididymal toxicity induced by benzo(a)pyrene, alcohol, and their combination in Wistar rats. Toxicol. Res. *5*, 420–433.

Reed, L., Mrizova, I., Barta, F., Indra, R., Moserova, M., Kopka, K., Schmeiser, H.H., Wolf, C.R., Henderson, C.J., Stiborova, M., et al. (2018). Cytochrome b 5 impacts on cytochrome P450-mediated metabolism of benzo[a]pyrene and its DNA adduct formation: studies in hepatic cytochrome b 5 /P450 reductase null (HBRN) mice. Arch. Toxicol. *92*, 1625–1638.

Reiners, J.J., and Clift, R.E. (1999). Aryl Hydrocarbon Receptor Regulation of Ceramide-induced Apoptosis in Murine Hepatoma 1c1c7 Cells: A FUNCTION INDEPENDENT OF ARYL HYDROCARBON RECEPTOR NUCLEAR TRANSLOCATOR. J. Biol. Chem. *274*, 2502–2510.

Rengarajan, T., Rajendran, P., Nandakumar, N., Lokeshkumar, B., Rajendran, P., and Nishigaki, I. (2015). Exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons with special focus on cancer. Asian Pac. J. Trop. Biomed. *5*, 182–189.

Rey-Barroso, J., Alvarez-Barrientos, A., Rico-Leo, E., Contador-Troca, M., Carvajal-Gonzalez, J.M., Echarri, A., del Pozo, M.A., and Fernandez-Salguero, P.M. (2014). The Dioxin receptor modulates Caveolin-1 mobilization during directional migration: role of cholesterol. Cell Commun. Signal. *12*, 57.

Riddick, D.S., Ding, X., Wolf, C.R., Porter, T.D., Pandey, A.V., Zhang, Q.-Y., Gu, J., Finn, R.D., Ronseaux, S., McLaughlin, L.A., et al. (2013). NADPH–Cytochrome P450 Oxidoreductase: Roles in Physiology, Pharmacology, and Toxicology. Drug Metab. Dispos. *41*, 12–23.

Rizwan, M., Mujtaba, G., Memon, S.A., Lee, K., and Rashid, N. (2018). Exploring the potential of microalgae for new biotechnology applications and beyond: A review. Renew. Sustain. Energy Rev. *92*, 394–404.

Robinson, L.E., Shridar, M., Smith, P., and Murrell-Lagnado, R.D. (2014). Plasma membrane cholesterol as a regulator of human and rodent P2X7 receptor activation and sensitization. J. Biol. Chem. *289*, 31983–31994.

Rocca, S., Agostini, A., Giuntoli, J., Marelli, L., European Commission, Joint Research Centre, and Institute for Energy and Transport (2015). Biofuels from algae: technology options, energy balance and GHG emissions : insights from a literature review. (Luxembourg: Publications Office).

Rodríguez, F., Derelle, E., Guillou, L., Le Gall, F., Vaulot, D., and Moreau, H. (2005). Ecotype diversity in the marine picoeukaryote Ostreococcus (Chlorophyta, Prasinophyceae): Ecotype diversity in the picoeukaryote Ostreococus. Environ. Microbiol. *7*, 853–859.

Rokkaku, T., Kimura, R., Ishikawa, C., Yasumoto, T., Senba, M., Kanaya, F., and Mori, N. (2013). Anticancer effects of marine carotenoids, fucoxanthin and its deacetylated product, fucoxanthinol, on osteosarcoma. Int. J. Oncol. *43*, 1176–1186.

Ronga, D., Biazzi, E., Parati, K., Carminati, D., Carminati, E., and Tava, A. (2019). Microalgal Biostimulants and Biofertilisers in Crop Productions. Agronomy *9*, 192.

Roscoff Culture Collection Roscoff Culture Collection | Marine Microalgae, Macroalgae, Protists, Bacteria and Viruses.

Rossbach, B., Preuss, R., Letzel, S., Drexler, H., and Angerer, J. (2007). Biological monitoring of occupational exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons (PAH) by determination of monohydroxylated metabolites of phenanthrene and pyrene in urine. Int. Arch. Occup. Environ. Health *81*, 221–229.

Rossner, P., Svecova, V., Schmuczerova, J., Milcova, A., Tabashidze, N., Topinka, J., Pastorkova, A., and Sram, R.J. (2013). Analysis of biomarkers in a Czech population exposed to heavy air pollution. Part I: bulky DNA adducts. Mutagenesis *28*, 89–95.

Rothhammer, V., and Quintana, F.J. (2019). The aryl hydrocarbon receptor: an environmental sensor integrating immune responses in health and disease. Nat. Rev. Immunol. *19*, 184–197.

Ruzgyte, A., Bouchard, M., and Viau, C. (2005). Development of a High-Performance Liquid Chromatographic Method for the Simultaneous Determination of Pyrene-1,6- and 1,8-Dione in Animal and Human Urine. J. Anal. Toxicol. *29*, 533–538.

Rybicki, B.A., Neslund-Dudas, C., Nock, N.L., Schultz, L.R., Eklund, L., Rosbolt, J., Bock, C.H., and Monaghan, K.G. (2006). Prostate cancer risk from occupational exposure to polycyclic

aromatic hydrocarbons interacting with the GSTP1 Ile105Val polymorphism. Cancer Detect. Prev. *30*, 412–422.

Salines, G. (2012). Biosurveillance humaine, biomarqueurs et biosurveillance environnementale. Ann. Pharm. Fr. *70*, 199–203.

Sanchez-Ferandin, S., Leroy, F., Bouget, F.-Y., and Joux, F. (2013). A New, Sensitive Marine Microalgal Recombinant Biosensor Using Luminescence Monitoring for Toxicity Testing of Antifouling Biocides. Appl. Environ. Microbiol. *79*, 631–638.

Sánchez-Guerra, M., Pelallo-Martínez, N., Díaz-Barriga, F., Rothenberg, S.J., Hernández-Cadena, L., Faugeron, S., Oropeza-Hernández, L.F., Guaderrama-Díaz, M., and Quintanilla-Vega, B. (2012). Environmental polycyclic aromatic hydrocarbon (PAH) exposure and DNA damage in Mexican children. Mutat. Res. Toxicol. Environ. Mutagen. *742*, 66–71.

Sanders, C.L., Skinner, C., and Gelman, R.A. (1984). Percutaneous absorption of [7.10-14C]benzo[a]pyrene and [7,12-14C]dimethylbenz[a]anthracene in mice. Environ. Res. *33*, 353–360.

Sansone, P., Savini, C., Kurelac, I., Chang, Q., Amato, L.B., Strillacci, A., Stepanova, A., Iommarini, L., Mastroleo, C., Daly, L., et al. (2017). Packaging and transfer of mitochondrial DNA via exosomes regulate escape from dormancy in hormonal therapy-resistant breast cancer. Proc. Natl. Acad. Sci. *114*, E9066–E9075.

Sardar Sinha, M., Ansell-Schultz, A., Civitelli, L., Hildesjö, C., Larsson, M., Lannfelt, L., Ingelsson, M., and Hallbeck, M. (2018). Alzheimer's disease pathology propagation by exosomes containing toxic amyloid-beta oligomers. Acta Neuropathol. (Berl.) *136*, 41–56.

Sathasivam, R., Radhakrishnan, R., Hashem, A., and Abd_Allah, E.F. (2019). Microalgae metabolites: A rich source for food and medicine. Saudi J. Biol. Sci. *26*, 709–722.

Satomi, Y. (2017). Antitumor and Cancer-preventative Function of Fucoxanthin: A Marine Carotenoid. Anticancer Res. *37*, 1557–1562.

Savina, A., Fader, C.M., Damiani, M.T., and Colombo, M.I. (2005). Rab11 Promotes Docking and Fusion of Multivesicular Bodies in a Calcium-Dependent Manner: Ca2+-Dependent Multivesicular Body Fusion. Traffic *6*, 131–143.

SCF (2002). Opinion of the Scientific Committee on Food on the risks to human health of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in food.

Scherer, G., Frank, S., Riedel, K., Meger-Kossien, I., and Renner, T. (2000). Biomonitoring of exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons of nonoccupationally exposed persons. Cancer Epidemiol. Biomark. Prev. Publ. Am. Assoc. Cancer Res. Cosponsored Am. Soc. Prev. Oncol. *9*, 373–380.

Scheurer, M.E., Danysh, H.E., Follen, M., and Lupo, P.J. (2014). (Duarte-Salles. Environ. Health *13*, 52.

Schlede, E., Kuntzman, R., and Conney, A.H. (1970). Stimulatory effect of benzo(alpha)pyrene and phenobarbital pretreatment on the biliary excretion of benzo(alpha)pyrene metabolites in the rat. Cancer Res. *30*, 2898–2904.

Schlienger, S., Campbell, S., and Claing, A. (2014). ARF1 regulates the Rho/MLC pathway to control EGF-dependent breast cancer cell invasion. Mol. Biol. Cell *25*, 17–29.

Schmitz, G., and Ecker, J. (2008). The opposing effects of n−3 and n−6 fatty acids. Prog. Lipid Res. *47*, 147–155.

Schoefs, B. (2002). Chlorophyll and carotenoid analysis in food products. Properties of the pigments and methods of analysis. Trends Food Sci. Technol. *13*, 361–371.

Schults, M.A., Chiu, R.K., Nagle, P.W., Wilms, L.C., Kleinjans, J.C., van Schooten, F.J., and Godschalk, R.W. (2013). Genetic polymorphisms in catalase and CYP1B1 determine DNA adduct formation by benzo(a)pyrene ex vivo. Mutagenesis *28*, 181–185.

Scott D. Doughman, Srirama Krupanidhi, and Carani B. Sanjeevi (2007). Omega-3 Fatty Acids for Nutrition and Medicine: Considering Microalgae Oil as a Vegetarian Source of EPA and DHA. Curr. Diabetes Rev. *3*, 198–203.

Sedgwick, A.E., Clancy, J.W., Olivia Balmert, M., and D'Souza-Schorey, C. (2015). Extracellular microvesicles and invadopodia mediate non-overlapping modes of tumor cell invasion. Sci. Rep. *5*, 14748.

Seidel, A., Spickenheuer, A., Straif, K., Rihs, H.-P., Marczynski, B., Scherenberg, M., Dettbarn, G., Angerer, J., Wilhelm, M., Brüning, T., et al. (2008). New Biomarkers of Occupational Exposure to Polycyclic Aromatic Hydrocarbons. J. Toxicol. Environ. Health A *71*, 734–745.

Seiffert, K., Ding, W., Wagner, J.A., and Granstein, R.D. (2006). ATPγS Enhances the Production of Inflammatory Mediators by a Human Dermal Endothelial Cell Line via Purinergic Receptor Signaling. J. Invest. Dermatol. *126*, 1017–1027.

Sen, S., Bhojnagarwala, P., Francey, L., Lu, D., Penning, T.M., and Field, J. (2012). p53 Mutagenesis by Benzo[a]pyrene Derived Radical Cations. Chem. Res. Toxicol. *25*, 2117–2126.

Seo, J.-S., Keum, Y.-S., Harada, R.M., and Li, Q.X. (2007). Isolation and Characterization of Bacteria Capable of Degrading Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAHs) and Organophosphorus Pesticides from PAH-Contaminated Soil in Hilo, Hawaii. J. Agric. Food Chem. *55*, 5383–5389.

Serdar, B., Egeghy, P.P., Gibson, R., and Rappaport, S.M. (2004). Dose-dependent production of urinary naphthols among workers exposed to jet fuel (JP-8). Am. J. Ind. Med. *46*, 234–244.

Sharma, N.K., Rai, A.K., Singh, S., and Brown, R.M. (2007). AIRBORNE ALGAE: THEIR PRESENT STATUS AND RELEVANCE [1]. J. Phycol. *43*, 615–627.

Sharma, R., Biedenharn, K.R., Fedor, J.M., and Agarwal, A. (2013). Lifestyle factors and reproductive health: taking control of your fertility. Reprod. Biol. Endocrinol. *11*, 66.

Shedden, K., Xie, X.T., Chandaroy, P., Chang, Y.T., and Rosania, G.R. (2003). Expulsion of small molecules in vesicles shed by cancer cells: association with gene expression and chemosensitivity profiles. Cancer Res. *63*, 4331–4337.

Shiizaki, K., Kawanishi, M., and Yagi, T. (2017). Modulation of benzo[a]pyrene–DNA adduct formation by CYP1 inducer and inhibitor. Genes Environ. *39*, 14.

Shinozaki, R., Inoue, S., Choi, K.-S., and Tatsuno, T. (1999). Association of Benzo[*a*]Pyrene-Diol-Epoxide-Deoxyribonucleic Acid (BPDE-DNA) Adduct Level with Aging in Male Smokers and Nonsmokers. Arch. Environ. Health Int. J. *54*, 79–85.

Shiratori, K., Ohgami, K., Ilieva, I., Jin, X.-H., Koyama, Y., Miyashita, K., Yoshida, K., Kase, S., and Ohno, S. (2005). Effects of fucoxanthin on lipopolysaccharide-induced inflammation in vitro and in vivo. Exp. Eye Res. *81*, 422–428.

Siddiqui, I.A., Sanna, V., Ahmad, N., Sechi, M., and Mukhtar, H. (2015). Resveratrol nanoformulation for cancer prevention and therapy: Resveratrol nanoformulations for cancer. Ann. N. Y. Acad. Sci. *1348*, 20–31.

da Silva Ferreira, V., and Sant'Anna, C. (2017). Impact of culture conditions on the chlorophyll content of microalgae for biotechnological applications. World J. Microbiol. Biotechnol. *33*, 20.

Simpson, C.D., Wu, M.-T., Christiani, D.C., Santella, R.M., Carmella, S.G., and Hecht, S.S. (2000). Determination of *r* -7, *t* -8,9, *c* -10-Tetrahydroxy-7,8,9,10-tetrahydrobenzo[*a*]pyrene in Human Urine by Gas Chromatography/Negative Ion Chemical Ionization/Mass Spectrometry. Chem. Res. Toxicol. *13*, 271–280.

Siriwardhana, N., Kalupahana, N.S., and Moustaid-Moussa, N. (2012). Health Benefits of n-3 Polyunsaturated Fatty Acids. In Advances in Food and Nutrition Research, (Elsevier), pp. 211–222.

Six, C., Worden, A.Z., Rodríguez, F., Moreau, H., and Partensky, F. (2005). New Insights into the Nature and Phylogeny of Prasinophyte Antenna Proteins: Ostreococcus tauri, a Case Study. Mol. Biol. Evol. *22*, 2217–2230.

Skupińska, K., Misiewicz, I., and Kasprzycka-Guttman, T. (2004). Polycyclic aromatic hydrocarbons: physicochemical properties, environmental appearance and impact on living organisms. Acta Pol. Pharm. *61*, 233–240.

Spolaore, P., Joannis-Cassan, C., Duran, E., and Isambert, A. (2006). Commercial applications of microalgae. J. Biosci. Bioeng. *101*, 87–96.

Spugnini, E., Logozzi, M., Di Raimo, R., Mizzoni, D., and Fais, S. (2018). A Role of Tumor-Released Exosomes in Paracrine Dissemination and Metastasis. Int. J. Mol. Sci. *19*, 3968.

Srogi, K. (2007). Monitoring of environmental exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons: a review. Environ. Chem. Lett. *5*, 169–195.

Stahl, W., and Sies, H. (2005). Bioactivity and protective effects of natural carotenoids. Biochim. Biophys. Acta BBA - Mol. Basis Dis. *1740*, 101–107.

Stejskalova, L., Dvorak, Z., and Pavek, P. (2011). Endogenous and Exogenous Ligands of Aryl Hydrocarbon Receptor: Current State of Art. Curr. Drug Metab. *12*, 198–212.

Stenehjem, J.S., Robsahm, T.E., Bråtveit, M., Samuelsen, S.O., Kirkeleit, J., and Grimsrud, T.K. (2017). Aromatic hydrocarbons and risk of skin cancer by anatomical site in 25 000 male offshore petroleum workers. Am. J. Ind. Med. *60*, 679–688.

Stiborová, M., Indra, R., Moserová, M., Frei, E., Schmeiser, H.H., Kopka, K., Philips, D.H., and Arlt, V.M. (2016). NADH:Cytochrome b5 Reductase and Cytochrome b5 Can Act as Sole Electron Donors to Human Cytochrome P450 1A1-Mediated Oxidation and DNA Adduct Formation by Benzo[a]pyrene. Chem. Res. Toxicol. *29*, 1325–1334.

Stuffers, S., Sem Wegner, C., Stenmark, H., and Brech, A. (2009). Multivesicular Endosome Biogenesis in the Absence of ESCRTs. Traffic *10*, 925–937.

Subra, C., Laulagnier, K., Perret, B., and Record, M. (2007). Exosome lipidomics unravels lipid sorting at the level of multivesicular bodies. Biochimie *89*, 205–212.

Subramoniam, A., Asha, V.V., Nair, S.A., Sasidharan, S.P., Sureshkumar, P.K., Rajendran, K.N., Karunagaran, D., and Ramalingam, K. (2012). Chlorophyll Revisited: Anti-inflammatory Activities of Chlorophyll a and Inhibition of Expression of TNF-α Gene by the Same. Inflammation *35*, 959–966.

Suess, M.J. (1976). The environmental load and cycle of polycyclic aromatic hydrocarbons. Sci. Total Environ. *6*, 239–250.

Sugawara, T., Matsubara, K., Akagi, R., Mori, M., and Hirata, T. (2006). Antiangiogenic Activity of Brown Algae Fucoxanthin and Its Deacetylated Product, Fucoxanthinol. J. Agric. Food Chem. *54*, 9805–9810.

Šulc, M., Indra, R., Moserová, M., Schmeiser, H.H., Frei, E., Arlt, V.M., and Stiborová, M. (2016). The impact of individual cytochrome P450 enzymes on oxidative metabolism of benzo[*a*]pyrene in human livers: Activation and Detoxification of Benzo[a]Pyrene by Human Cytochrome P450s. Environ. Mol. Mutagen. *57*, 229–235.

Sun, J.D., Wolff, R.K., Kanapilly, G.M., and McClellan, R.O. (1984). Lung retention and metabolic fate of inhaled benzo(a)pyrene associated with diesel exhaust particles. Toxicol. Appl. Pharmacol. *73*, 48–59.

Sun, X.-M., Ren, L.-J., Zhao, Q.-Y., Ji, X.-J., and Huang, H. (2018). Microalgae for the production of lipid and carotenoids: a review with focus on stress regulation and adaptation. Biotechnol. Biofuels *11*, 272.

Svensson, K.J., Christianson, H.C., Wittrup, A., Bourseau-Guilmain, E., Lindqvist, E., Svensson, L.M., Mörgelin, M., and Belting, M. (2013). Exosome Uptake Depends on ERK1/2-Heat Shock

Protein 27 Signaling and Lipid Raft-mediated Endocytosis Negatively Regulated by Caveolin-1. J. Biol. Chem. *288*, 17713–17724.

Szczeklik, A., Szczeklik, J., Galuszka, Z., Musial, J., Kolarzyk, E., and Targosz, D. (1994). Humoral immunosuppression in men exposed to polycyclic aromatic hydrocarbons and related carcinogens in polluted environments. Environ. Health Perspect. *102*, 302–304.

Taioli, E., Sram, R.J., Garte, S., Kalina, I., Popov, T.A., and Farmer, P.B. (2007). Effects of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in environmental pollution on exogenous and oxidative DNA damage (EXPAH project): Description of the population under study. Mutat. Res. Mol. Mech. Mutagen. *620*, 1–6.

Takaichi, S. (2011). Carotenoids in Algae: Distributions, Biosyntheses and Functions. Mar. Drugs *9*, 1101–1118.

Tao, J., Li, N., Liu, Z., Deng, Y., Li, X., Chen, M., Yu, J., Zhu, J., Yu, P., and Wang, Y. (2019). The effect on congenital heart diseases of maternal EPHX1 polymorphisms modified by polycyclic aromatic hydrocarbons exposure. Medicine (Baltimore) *98*, e16556.

Tekpli, X., Rissel, M., Huc, L., Catheline, D., Sergent, O., Rioux, V., Legrand, P., Holme, J.A., Dimanche-Boitrel, M.-T., and Lagadic-Gossmann, D. (2010). Membrane remodeling, an early event in benzo[α]pyrene-induced apoptosis. Toxicol. Appl. Pharmacol. *243*, 68–76.

Terry, M.B., Gammon, M.D., Zhang, F.F., Eng, S.M., Sagiv, S.K., Paykin, A.B., Wang, Q., Hayes, S., Teitelbaum, S.L., Neugut, A.I., et al. (2004). Polymorphism in the DNA repair gene XPD, polycyclic aromatic hydrocarbon-DNA adducts, cigarette smoking, and breast cancer risk. Cancer Epidemiol. Biomark. Prev. Publ. Am. Assoc. Cancer Res. Cosponsored Am. Soc. Prev. Oncol. *13*, 2053–2058.

Théry, C., Witwer, K.W., Aikawa, E., Alcaraz, M.J., Anderson, J.D., Andriantsitohaina, R., Antoniou, A., Arab, T., Archer, F., Atkin-Smith, G.K., et al. (2018). Minimal information for studies of extracellular vesicles 2018 (MISEV2018): a position statement of the International Society for Extracellular Vesicles and update of the MISEV2014 guidelines. J. Extracell. Vesicles *7*, 1535750.

Théry, C., Gho, Y.S., and Quesenberry, P. (2019). Journal of extracellular vesicles: the seven year itch! J. Extracell. Vesicles *8*, 1654729.

Thomas, L.M., and Salter, R.D. (2010). Activation of Macrophages by P2X $_7$ -Induced Microvesicles from Myeloid Cells Is Mediated by Phospholipids and Is Partially Dependent on TLR4. J. Immunol. *185*, 3740–3749.

Timbrell, J.A. (1998). Biomarkers in toxicology. Toxicology *129*, 1–12.

Tomkiewicz, C., Herry, L., Bui, L.-C., Métayer, C., Bourdeloux, M., Barouki, R., and Coumoul, X. (2013). The aryl hydrocarbon receptor regulates focal adhesion sites through a non-genomic FAK/Src pathway. Oncogene *32*, 1811–1820.

Trajkovic, K., Hsu, C., Chiantia, S., Rajendran, L., Wenzel, D., Wieland, F., Schwille, P., Brugger, B., and Simons, M. (2008). Ceramide Triggers Budding of Exosome Vesicles into Multivesicular Endosomes. Science *319*, 1244–1247.

Trams, E.G., Lauter, C.J., Norman Salem, Jr., and Heine, U. (1981). Exfoliation of membrane ecto-enzymes in the form of micro-vesicles. Biochim. Biophys. Acta BBA - Biomembr. *645*, 63–70.

Ulmann, L., Blanckaert, V., Mimouni, V., Andersson, M.X., Schoefs, B., and Chenais, B. (2017). Microalgal Fatty Acids and Their Implication in Health and Disease. Mini-Rev. Med. Chem. *17*.

Valadi, H., Ekström, K., Bossios, A., Sjöstrand, M., Lee, J.J., and Lötvall, J.O. (2007). Exosome-mediated transfer of mRNAs and microRNAs is a novel mechanism of genetic exchange between cells. Nat. Cell Biol. *9*, 654–659.

Vandewiel, J., Fijneman, P., Duijf, C., Anzion, R., Theuws, J., and Bos, R. (1993). Excretion of benzo[a]pyrene and metabolites in urine and feces of rats: influence of route of administration, sex and long-term ethanol treatment. Toxicology *80*, 103–115.

Vanrooij, J.G., Bodelier-Bade, M.M., De Looff, A.J., Dijkmans, A.P., and Jongeneelen, F.J. (1992). Dermal exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons among primary aluminium workers. Med. Lav. *83*, 519–529.

VanRooij, J.G.M., De Roos, J.H.C., Bodelier-Bade, M.M., and Jongeneelen, F.J. (1993). Absorption of polycyclic aromatic hydrocarbons through human skin: Differences between anatomical sites and individuals. J. Toxicol. Environ. Health *38*, 355–368.

Verderio, C., Gabrielli, M., and Giussani, P. (2018). Role of sphingolipids in the biogenesis and biological activity of extracellular vesicles. J. Lipid Res. *59*, 1325–1340.

Verma, N., Pink, M., Rettenmeier, A.W., and Schmitz-Spanke, S. (2012). Review on proteomic analyses of benzo[a]pyrene toxicity. PROTEOMICS *12*, 1731–1755.

Vicens, F. (2015). Indicateurs biologiques d'effets précoces. Leur utilisation dans la prévention du risque chimique en santé au travail. Réf. En Santé Trav. *TC 149*, 24–33.

Villarruel-López, A., Ascencio, F., and Nuño, K. (2017). Microalgae, a Potential Natural Functional Food Source – a Review. Pol. J. Food Nutr. Sci. *67*, 251–263.

Vogel, C.F.A., and Matsumura, F. (2009). A new cross-talk between the aryl hydrocarbon receptor and RelB, a member of the NF-κB family. Biochem. Pharmacol. *77*, 734–745.

Voloshin, R.A., Kreslavski, V.D., Zharmukhamedov, S.K., Bedbenov, V.S., Ramakrishna, S., and Allakhverdiev, S.I. (2015). Photoelectrochemical cells based on photosynthetic systems: a review. Biofuel Res. J. *2*, 227–235.

Voutilainen, S., Nurmi, T., Mursu, J., and Rissanen, T.H. (2006). Carotenoids and cardiovascular health. Am. J. Clin. Nutr. *83*, 1265–1271.

Vu, A.T., Taylor, K.M., Holman, M.R., Ding, Y.S., Hearn, B., and Watson, C.H. (2015). Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in the Mainstream Smoke of Popular U.S. Cigarettes. Chem. Res. Toxicol. *28*, 1616–1626.

Wagner, M., Hoppe, K., Czabany, T., Heilmann, M., Daum, G., Feussner, I., and Fulda, M. (2010). Identification and characterization of an acyl-CoA:diacylglycerol acyltransferase 2 (DGAT2) gene from the microalga O. tauri. Plant Physiol. Biochem. *48*, 407–416.

Wakx, A., Regazzetti, A., Dargère, D., Auzeil, N., Gil, S., Evain-Brion, D., Laprévote, O., and Rat, P. (2016). New in vitro biomarkers to detect toxicity in human placental cells: The example of benzo[A]pyrene. Toxicol. In Vitro *32*, 76–85.

Wang, H.-C., Wong, T.-H., Wang, L.-T., Su, H.-H., Yu, H.-Y., Wu, A.-H., Lin, Y.-C., Chen, H.-L., Suen, J.-L., Hsu, S.-H., et al. (2019). Aryl hydrocarbon receptor signaling promotes ORMDL3-dependent generation of sphingosine-1-phosphate by inhibiting sphingosine-1-phosphate lyase. Cell. Mol. Immunol. *16*, 783–790.

Wang, Y., Yang, H., Li, L., Wang, H., Xia, X., and Zhang, C. (2012). Biomarkers of chromosomal damage in peripheral blood lymphocytes induced by polycyclic aromatic hydrocarbons: a meta-analysis. Int. Arch. Occup. Environ. Health *85*, 13–25.

Wang, Y., Pan, T., Li, L., Wang, H., Zhang, D., and Yang, H. (2018). Benzo(a)pyrene promotes Hep-G2 cell migration and invasion by upregulating phosphorylated extracellular signal-regulated kinase expression. Oncol. Lett.

Wehman, A.M., Poggioli, C., Schweinsberg, P., Grant, B.D., and Nance, J. (2011). The P4-ATPase TAT-5 Inhibits the Budding of Extracellular Vesicles in C. elegans Embryos. Curr. Biol. *21*, 1951–1959.

White, K.L., and Holsapple, M.P. (1984). Direct suppression of in vitro antibody production by mouse spleen cells by the carcinogen benzo(a)pyrene but not by the noncarcinogenic congener benzo(e)pyrene. Cancer Res. *44*, 3388–3393.

White, S.S., and Birnbaum, L.S. (2009). An overview of the effects of dioxins and dioxin-like compounds on vertebrates, as documented in human and ecological epidemiology. J. Environ. Sci. Health Part C Environ. Carcinog. Ecotoxicol. Rev. *27*, 197–211.

White, I.J., Bailey, L.M., Aghakhani, M.R., Moss, S.E., and Futter, C.E. (2006). EGF stimulates annexin 1-dependent inward vesiculation in a multivesicular endosome subpopulation. EMBO J. *25*, 1–12.

WHO (2001). Biomarkers in risk assessment: validity and validation (Geneva: World Health Organization).

WHO (2018). Noncommunicable diseases country profiles 2018.

WHO, and Scovronick, N. (2015). Reducing global health risks through mitigation of short-lived climate pollutants.

Wiersma, D.A., and Roth, R.A. (1983). Total body clearance of circulating benzo(a)pyrene in conscious rats: effect of pretreatment with 3-methylcholanthrene and the role of liver and lung. J. Pharmacol. Exp. Ther. *226*, 661–667.

Wiktorowska-Owczarek, A., Berezińska, M., and Nowak, J. (2015). PUFAs: Structures, Metabolism and Functions. Adv. Clin. Exp. Med. *24*, 931–941.

Willms, E., Johansson, H.J., Mäger, I., Lee, Y., Blomberg, K.E.M., Sadik, M., Alaarg, A., Smith, C.I.E., Lehtiö, J., EL Andaloussi, S., et al. (2016). Cells release subpopulations of exosomes with distinct molecular and biological properties. Sci. Rep. *6*, 22519.

Wolf, P. (1967). The Nature and Significance of Platelet Products in Human Plasma. Br. J. Haematol. *13*, 269–288.

Wu, F., Yin, Z., Yang, L., Fan, J., Xu, J., Jin, Y., Yu, J., Zhang, D., and Yang, G. (2019). Smoking Induced Extracellular Vesicles Release and Their Distinct Properties in Non-Small Cell Lung Cancer. J. Cancer *10*, 3435–3443.

Wubbolts, R., Leckie, R.S., Veenhuizen, P.T.M., Schwarzmann, G., Möbius, W., Hoernschemeyer, J., Slot, J.-W., Geuze, H.J., and Stoorvogel, W. (2003). Proteomic and Biochemical Analyses of Human B Cell-derived Exosomes: POTENTIAL IMPLICATIONS FOR THEIR FUNCTION AND MULTIVESICULAR BODY FORMATION. J. Biol. Chem. *278*, 10963–10972.

Xu, R., Rai, A., Chen, M., Suwakulsiri, W., Greening, D.W., and Simpson, R.J. (2018). Extracellular vesicles in cancer — implications for future improvements in cancer care. Nat. Rev. Clin. Oncol. *15*, 617–638.

Xu, X., Hu, H., Kearney, G.D., Kan, H., and Sheps, D.S. (2013). Studying the effects of polycyclic aromatic hydrocarbons on peripheral arterial disease in the United States. Sci. Total Environ. *461–462*, 341–347.

Xue, W., and Warshawsky, D. (2005). Metabolic activation of polycyclic and heterocyclic aromatic hydrocarbons and DNA damage: A review. Toxicol. Appl. Pharmacol. *206*, 73–93.

Yamazaki, H., and Kakiuchi, Y. (1989). The uptake and distribution of benzo(a)pyrene in rat after continuous oral administration. Toxicol. Environ. Chem. *24*, 95–104.

Yang, D.-J., Lin, J.-T., Chen, Y.-C., Liu, S.-C., Lu, F.-J., Chang, T.-J., Wang, M., Lin, H.-W., and Chang, Y.-Y. (2013). Suppressive effect of carotenoid extract of Dunaliella salina alga on production of LPS-stimulated pro-inflammatory mediators in RAW264.7 cells via NF-κB and JNK inactivation. J. Funct. Foods *5*, 607–615.

Yang, H., Zhou, L., Wang, Z., Roberts, L.J., Lin, X., Zhao, Y., and Guo, Z. (2009). Overexpression of antioxidant enzymes in ApoE-deficient mice suppresses Benzo(a)pyrene-accelerated atherosclerosis. Atherosclerosis *207*, 51–58.

Yang, Q., Zhao, Y., Qiu, X., Zhang, C., Li, R., and Qiao, J. (2015). Association of serum levels of typical organic pollutants with polycystic ovary syndrome (PCOS): a case–control study. Hum. Reprod. *30*, 1964–1973.

Yi, T., Wang, J., Zhu, K., Tang, Y., Huang, S., Shui, X., Ding, Y., Chen, C., and Lei, W. (2018). Aryl Hydrocarbon Receptor: A New Player of Pathogenesis and Therapy in Cardiovascular Diseases. BioMed Res. Int. *2018*, 1–11.

Yuan, L., Liu, J., Deng, H., and Gao, C. (2017). Benzo[a]pyrene Induces Autophagic and Pyroptotic Death Simultaneously in HL-7702 Human Normal Liver Cells. J. Agric. Food Chem. *65*, 9763–9773.

Zelinkova, Z., and Wenzl, T. (2015). The Occurrence of 16 EPA PAHs in Food – A Review. Polycycl. Aromat. Compd. *35*, 248–284.

Zhang, H., Freitas, D., Kim, H.S., Fabijanic, K., Li, Z., Chen, H., Mark, M.T., Molina, H., Martin, A.B., Bojmar, L., et al. (2018). Identification of distinct nanoparticles and subsets of extracellular vesicles by asymmetric flow field-flow fractionation. Nat. Cell Biol. *20*, 332–343.

Zhang, Y., Dong, S., Wang, H., Tao, S., and Kiyama, R. (2016). Biological impact of environmental polycyclic aromatic hydrocarbons (ePAHs) as endocrine disruptors. Environ. Pollut. *213*, 809–824.

Zhen, Y., and Stenmark, H. (2015). Cellular functions of Rab GTPases at a glance. J. Cell Sci. *128*, 3171–3176.

Zhu, Y., Horikawa, Y., Yang, H., Wood, C.G., Habuchi, T., and Wu, X. (2008). BPDE Induced Lymphocytic Chromosome 3p Deletions May Predict Renal Cell Carcinoma Risk. J. Urol. *179*, 2416–2421.

Zimmerman, B., Kelly, B., McMillan, B.J., Seegar, T.C.M., Dror, R.O., Kruse, A.C., and Blacklow, S.C. (2016). Crystal Structure of a Full-Length Human Tetraspanin Reveals a Cholesterol-Binding Pocket. Cell *167*, 1041-1051.e11.

Zullaikah, S., Utomo, A.T., Yasmin, M., Ong, L.K., and Ju, Y.H. (2019). Ecofuel conversion technology of inedible lipid feedstocks to renewable fuel. In Advances in Eco-Fuels for a Sustainable Environment, (Elsevier), pp. 237–276.

Annexes

1. Revue

Microalgal carotenoids and phytosterols regulate biochemical mechanisms involved in human health and disease prevention

Manon Le Goff, Eric Le Ferrec, Claire Mayer, Virginie Mimouni, Dominique Lagadic-Gossmann, Benoît Schoefs, Lionel Ulmann. Microalgal carotenoids and phytosterols regulate biochemical mechanisms involved in human helth and disease prevention.
Biochimie. 2019 Sep, 167 : 106-119. doi : 10.1016/j.biochi.2019.09.012.

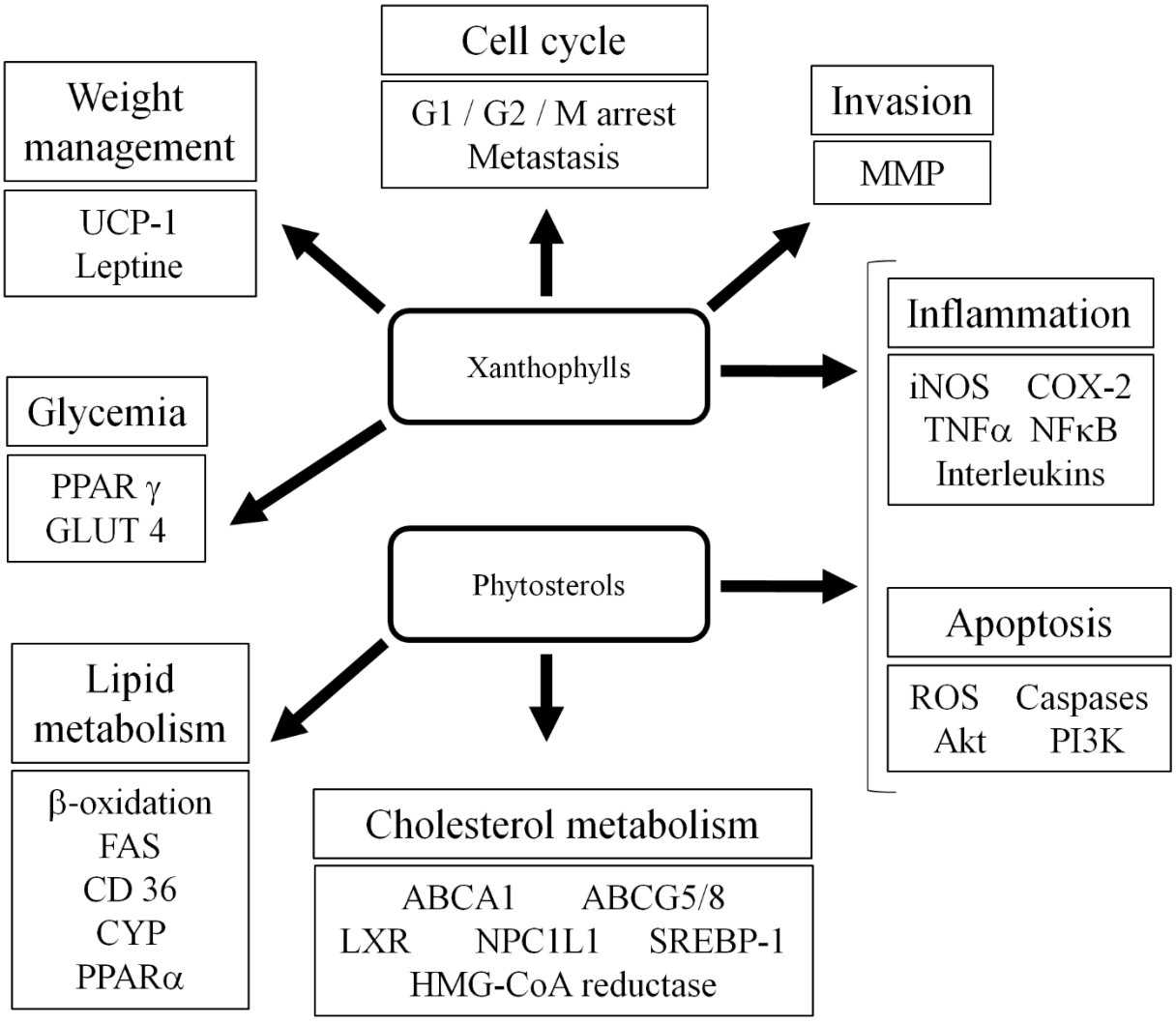


***Figure 31** : Résumé graphique "Microalgal carotenoids and phytosterols regulate biochemical mechanisms involved in human health and disease prevention".*
Issue de (Le Goff et al., 2019a).

Mots clés : Micro-algues; Xanthophylles; Phytostérols; Prévention des maladies chroniques; Régulation de voie de signalisation cellulaire.

Biochimie 167 (2019) 106–118

Contents lists available at ScienceDirect

Biochimie

journal homepage: www.elsevier.com/locate/biochi

Review

Microalgal carotenoids and phytosterols regulate biochemical mechanisms involved in human health and disease prevention

Manon Le Goff [a], Eric Le Ferrec [b], Claire Mayer [a], Virginie Mimouni [a], Dominique Lagadic-Gossmann [b], Benoît Schoefs [a], Lionel Ulmann [a, *]

[a] EA 2160 Mer Molécules Santé - MIMMA, IUML FR-3473 CNRS, Le Mans Université, Laval, F-53020, France
[b] Univ Rennes, Inserm, EHESP, Irset (Institut de Recherche en Santé, Environnement et Travail) - UMR_S 1085, F-35000, Rennes, France

ARTICLE INFO

Article history:
Received 26 April 2019
Accepted 18 September 2019
Available online 20 September 2019

Keywords:
Microalgae
Xanthophylls
Phytosterols
Chronic disease prevention
Cell signaling pathway regulation

ABSTRACT

Microalgae are photosynthetic microorganisms that produce numerous bioactive molecules that can be used as food supplement to prevent chronic disease installation. Indeed, they produce phycobiliproteins, polysaccharides, lipids, carotenoids and sterolic compounds. The use of microalgae in human nutrition provide a mixture of these molecules with synergistic effect.

The aim of this review is to present the specific roles played by the xanthophylls, and specifically astaxanthin and fucoxanthin, two high added value carotenoids, and by microalgal phytosterols such as β-sitosterol, campesterol and stigmasterol on several cell mechanisms involved in the prevention of cardiometabolic diseases and cancers.

This review explains how these microalgal molecules modulate cell signaling pathways involved in carbohydrate and lipid metabolisms, inflammation, apoptosis, invasion and metastasis. Xanthophylls and phytosterols are involved in the reduction of inflammatory markers in relation with the regulation of the c-Jun N-terminal kinases and nuclear factor-kappa B signaling pathways, and suppression of production of pro-inflammatory mediators. Xanthophylls act on glucose and lipid metabolisms via both the upregulation of peroxisome proliferator-activated receptors (PPARs) and glucose transporters and its effects on the expression of enzymes involved in fatty acid synthesis and cholesterol metabolism. Their anticancer effects are related to the induction of intrinsic apoptosis due to down-regulation of key regulatory kinases. The anti-angiogenesis, anti-proliferative and anti-invasive effects are correlated with decreased production of endothelial growth factors and of matrix metalloproteinases.

Phytosterols have a major role on cholesterol absorption via modification of the activities of Niemann-Pick C1 like 1 and ATP-binding cassette transporters and on cholesterol esterification. Their action are also related with the modulation of PPARs and sterol regulatory element-binding protein-1 activities.

© 2019 Elsevier B.V. and Société Française de Biochimie et Biologie Moléculaire (SFBBM). All rights reserved.

Contents

1. Introduction 108
2. Bioactive molecules synthesized by microalgae 109
   2.1. Production of carotenoids by microalgae 109
   2.2. Production of phytosterols by microalgae 110
   2.3. Characteristics and synthesis of carotenoids 110
   2.4. Characteristics and synthesis of phytosterols 111
3. Bioavailability and absorption of carotenoids and phytosterols 111

* Corresponding author. EA 2160 Mer Molécules Santé - MIMMA, Le Mans Université, IUT - Dépt. Génie Biologique, Laval, F-53020, France.
E-mail addresses: manon.le_goff@univ-lemans.fr (M. Le Goff), eric.leferrec@univ-rennes1.fr (E. Le Ferrec), Claire.Mayer@univ-lemans.fr (C. Mayer), Virginie.Mimouni@univ-lemans.fr (V. Mimouni), dominique.lagadic@univ-rennes1.fr (D. Lagadic-Gossmann), Benoit.Schoefs@univ-lemans.fr (B. Schoefs), Lionel.Ulmann@univ-lemans.fr (L. Ulmann).

https://doi.org/10.1016/j.biochi.2019.09.012
0300-9084/© 2019 Elsevier B.V. and Société Française de Biochimie et Biologie Moléculaire (SFBBM). All rights reserved.

3.1. Carotenoids ... 111
3.1.1. Bioavailability ... 111
3.1.2. Mechanisms of absorption ... 112
3.2. Phytosterols ... 112
3.2.1. Bioavailability ... 112
3.2.2. Mechanisms of absorption ... 112
4. Carotenoids and disease prevention ... 112
4.1. Metabolic disease prevention ... 113
4.2. Anti-cancer and anti-angiogenic activities ... 114
4.3. Anti-inflammatory activities ... 114
4.4. Anti-oxidant activities ... 114
5. Phytosterols and disease prevention ... 114
5.1. Cholesterol-lowering activity and lipid metabolism ... 114
5.2. Anti-inflammatory activities ... 115
5.3. Anti-cancer activities ... 115
6. Conclusion ... 115
Authors' contribution ... 116
Declaration of interest ... 116
Acknowledgements ... 116
References ... 116

Abbreviations

ABC	ATP-binding cassette
ACAT	acyl-CoA cholesterol acyltransferase
Adr	adrenic receptor
Akt	protein kinase B
CD36	cluster of differentiation 36
CPT	carnitine palmitoyl-transferase
COX	cyclooxygenase
CVD	cardiovascular disease
CYP	cytochrome P450
DMAPP	dimethylallyl pyrophosphate
DOXP	1-deoxy-D-xylulose-5-phosphate
EGR	early growth factor
EPS	exopolysaccharides
ERK	extracellular signal-regulated kinase
FADD	Fas-associated protein with dead domain
FAS	fatty acid synthase
FGF	fibroblast growth factor
FGFR	fibroblast growth factor receptor
GGPP	geranyl geranyl pyrophosphate
GLUT	glucose transporter protein
GSH	glutathione
GSH-Px	glutathione peroxidase
GSK	glycogen synthase kinase
Hb	hemoglobin
HDL	high density lipoprotein
HepG2	liver hepatocellular cells
HL	human leukemia
HMG-CoA	hydroxyl methyl glutaryl CoA
HO	heme oxygenase
HUVEC	human umbilical vein endothelial cells
IKK	I kappa B kinase
IL	interleukin
iNOS	inductible nitric oxide synthase
IPP	isopentenyl pyrophosphate
IRS	insulin receptor substrate
JAK	Janus kinase
JNK	c-Jun N-terminal kinase
LCAT	lecithin-cholesterol acyltransferase
LDL	low density lipoprotein
LPS	lipopolysaccharide
LXR	liver X receptor
MAPK	mitogen-activated protein kinase
MDA	malondialdehyde
MEP	methylerythrol phosphate
MMP	matrix metalloproteinase
MVA	mevalonate
NAFLD	nonalcoholic fatty liver disease
NF-κB	nuclear factor-kappa B
NO	nitric oxide
NPC1L1	Niemann-Pick C1 like 1
NQO	NADPH quinone oxidoreductase
Nrf2	nuclear factor erythroid-2 related factor 2
PC	prostate cancer
PGE	prostaglandin E
PI3K	phosphoinositide 3-kinase
PKA	protein kinase A
PKC	protein kinase C
PPAR	peroxisome proliferator-activated receptor
PS	polysaccharides
PUFA	polyunsaturated fatty acids
ROS	reactive oxygen species
RXR	retinoid X receptor
SCD	stearoyl CoA desaturase
S-EPS	sulfated exopolysaccharides
SERBP	sterol regulatory element-binding protein
SOD	superoxide dismutase
S-PS	sulfated polysaccharides
SR-B1	scavenger receptor class B type 1
StAR	steroidogenic acute regulatory protein
STAT	signal transducer and activator of transcription
TNF	tumor necrosis factor
UCP	uncoupling protein
VEGF	vascular endothelial growth factor
VEGFR	vascular endothelial growth factor receptor
VLDL	very low density lipoprotein

1. Introduction

For more than twenty five years, worldwide production of oilseed crops – soybean, peanut, rapeseed, sunflower, olive or coprah – has been increasing in order to answer the strong population growth in many countries in which food access is not easy, thereby resulting in caloric deficits and therefore precarious health status [1]. Recently, there has been an increased interest for the use of microalgae as new sources of bioactive molecules for animal and human nutrition, but also due to the growing awareness and search for healthier foods [2]. Microalgae are able to produce numerous bioactive phytochemicals which major compounds are phycobiliproteins, polysaccharides, carotenoids and lipids [3]. Other molecules such as phenolic and sterolic compounds are also produced by microalgae. All these molecules are known to provide health benefits when they are used as food supplement for human nutrition.

For this use, molecules have to be extracted from fresh, frozen, dried or freeze-dried microalgal biomass. Several extraction techniques can be used such as mechanical treatments, solvents, pressurized extraction, ultrasounds, pulsed electric field [4], resonance frequency [5] and microwaves. With the exception of polar carotenoids such as crocetin, carotenoids, as hydrophobic pigments, are extracted with organic solvents such as acetone, diethyl ether, ethanol and methanol [6]. Numerous studies have been conducted to optimize these extraction methods, by the use of combined methods with green solvents. For example, in the green microalga *Chlorella vulgaris*, it has been shown that the extraction of carotenoids was enhanced by the use of a mixture of ethanol and 2-methyltetrahydrofuran, a green solvent, coupled with high temperature (110 °C) [7]. Specifically for the extraction of astaxanthin, a well-known bioactive carotenoid, it has been reported in the red phase *Haematococcus pluvialis*, that the use of acetone and ethanol, combined with mechanical pre-treatment to disrupt the hard double wall red cysts, was able to extract around 90% of total astaxanthin avoiding any degradation [8]. In this microalga, it has also been shown that the use of different types of 1-ethyl-3-methylimidazolium-based ionic liquids was efficient for cell disruption [9], and supercritical carbon dioxide extraction combined with temperature and pressure was able to extract more than 98% of total astaxanthin [10]. For an overview of the different techniques used for the extraction of microalgal hydrophobic molecules, see the review by Mubarak et al. [11].

One major interest for proposing microalgae as food supplement is that they are able to provide a mixture of all these molecules, with an expected synergistic effect. Indeed, some of these microalgal chemicals can be used to counteract the inflammation and oxidative stress that are associated with diseases such as cardiovascular diseases, aging or cancer, notably due to damages caused by reactive oxygen species (ROS) to lipids, proteins and nucleic acids. For example, it is well-known that the blue photosynthetic pigment phycocyanin, a phycobiliprotein produced by the cyanobacteria *Arthrospira* sp., also called *Spirulina*, has a real potential in cholesterol metabolism regulation and in the inhibition of lipid peroxidation. Recently, it has been shown that a phycocyanin rich extract from *Spirulina*, protects against fibrosis during nonalcoholic steatohepatitis, with a decrease in superoxide anion, nitric oxide (NO) and thiobarbituric reactive substances [12]. A wide diversity of polysaccharides (PS) are produced by marine microalgae [13]. PS and exopolysaccharides (EPS) can be found also as sulfated derivates (S-PS and S-EPS, respectively). It has been reported that these different molecular species produced by numerous cyanobacteria and microalgae exhibit antiviral and antibacterial activities [14]. PS and EPS, sulfated or not, have also been shown to have anti-inflammatory and immunomodulatory properties, and other biological activities such as antioxidant, free radical scavenging, anti-tumor, and against vascular muscle cell proliferation. Finally, they have preventive properties of cardiovascular diseases (CVD), such as anti-lipidemic, anti-glycemic, anti-coagulant and anti-thrombotic activities [13]. Phenolic compounds produced by microalgae accentuate their antioxidant properties. Indeed, numerous microalgae are able to produce phenolic acids such as caffeic and chlorogenic acids, that, in association with 13-cis-retinoic acid, are known to have high antioxidant activity by preventing lipid peroxidation [15].

In clinical studies, the use of whole microalgae as food supplement have shown their efficiency. Indeed, the use of *Dunaliella* sp. (0.56–3 g/day) afforded an antioxidant protection and counteracted diabetes and hyperlipidemia installation. The administration of *Arthrospira* sp. in diabetes, dyslipidemia and ischemic heart disease patients led to significant decreases in blood cholesterol, low density lipoproteins (LDL) and very low density lipoproteins (VLDL), triacylglycerols and lipid peroxidation (malondialdehyde, MDA) levels with an improvement in total antioxidant status [16]. In high fat-fed rats, it has been reported that the use of freeze-dried *Odontella aurita*, a marine diatom, had a preventive role in dyslipidemia, oxidative stress and platelet aggregation [17] with better results than those observed with fish oil [18], as earlier reported with the microalga *Chlorella pyrenoidosa* [19]. In diabetic rats, the microalga *Isochrysis galbana* has been reported to decrease blood levels of glucose, triacylglycerols and cholesterol [20].

To better understand the role played by microalgal compounds, the aim of this review will focus on the effects of microalgal-derived molecules, specifically carotenoids (Fig. 1) and phytosterols (Fig. 2), regarding the regulation of biochemical mechanisms involved in chronic diseases such as inflammation, cardiovascular diseases and cancer. Informations concerning the ability of microalgae to produce these molecules will be also given.

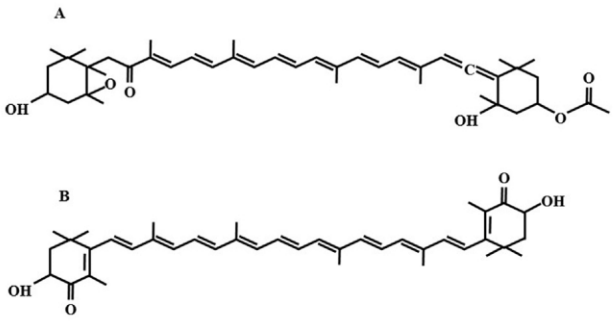


Fig. 1. Chemical structures of the main high added value bioactive xanthophylls produced by microalgae. A: fucoxanthin, B: astaxanthin.

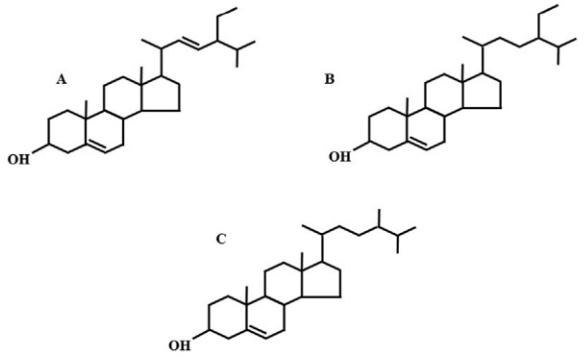


Fig. 2. Chemical structures of bioactive phytosterols produced by microalgae. A: stigmasterol, B: β-sitosterol, C: campesterol.

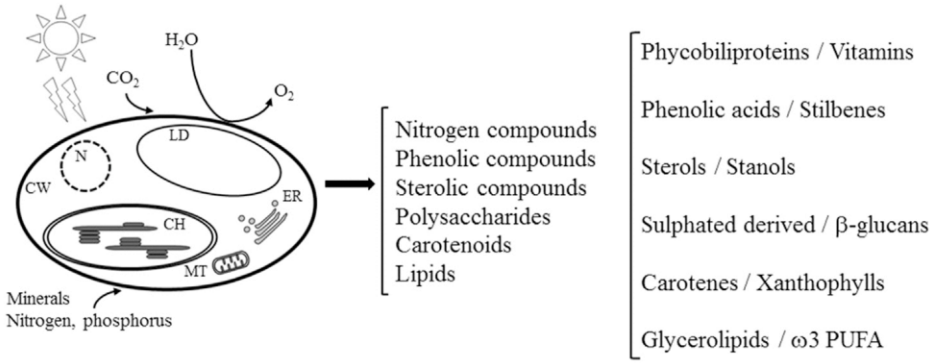


Fig. 3. Synthesis of bioactive compounds by microalgae.
CH: chloroplast, CW: cell wall, ER: endoplasmic reticulum, LD: lipid droplet, MT: mitochondria, N, nucleus.

2. Bioactive molecules synthesized by microalgae

Bioactive compounds are molecules that have functional properties for human health. Several of these functional ingredients could be used in food and pharmaceutical industries such as carotenoids, sterols, polyphenols or polyunsaturated fatty acids (PUFA). Microalgae have the advantage to produce these compounds but also other molecules such as vitamins, enzymes or PS that can also be used for commercial use. Microalgal primary metabolism, such as described in diatoms, requires different subcellular compartments as chloroplast, peroxisomes, mitochondria and cytoplasm involved in the Calvin-Benson cycle with the synthesis of glyceraldehyde-3-phosphate, fatty acid oxidation, the Krebs cycle and glycolysis and neoglucogenesis, respectively [21]. To produce all the molecules that can be used for nutrition and health, the microalgal metabolism requires light as the essential energy source but also water, CO_2, and nutrients as nitrogen and phosphorus (Fig. 3).

2.1. Production of carotenoids by microalgae

The fat-soluble carotenoids are divided into carotenes and xanthophylls. Total carotenoids in the different microalgae, range from 0.02 (*Scenedesmus obliquus*) to 291 mg/g dry weight (*Dunaliella salina*). Carotenes are represented by α- and β-carotenes. α-Carotene is present in *Chlorophyceae* and *Cryptophyceae* while β-carotene is present in all classes of microalgae [6]. In addition to carotenes, *Chlorophytae (Chlorophyceae and Prasinophyceae)* produce lutein and siphonaxanthin as major xanthophylls, and minor pigments or pigments limited to some specific groups, as antheraxanthin, astaxanthin, canthaxanthin, prasinoxanthin, neoxanthin, violaxanthin, or/and zeaxanthin [22]. In addition to β-carotene, the *Bacillariophyceae* and *Prymnesiophyceae* groups produce mainly diadinoxanthin, diatoxanthin, and fucoxanthin (Table 1). Concerning fucoxanthin, its production in diatoms range from 0.07 to 26.6 mg/g dry weight (the highest level being produced in *Mallomonas* sp.) compared to 2.19 mg/g dry weight in the haptophyte

Table 1
Main microalgal producers of carotenoids and selected phytosterols [6,22,28,31]. Results are expressed *in mg of total carotenoids per g dry weight of microalgal biomass * and in percentage of total sterols **. Main accessory carotenoids in bold.*

Classes	Carotenoids	Contents*	Activities in human health
Chlorophyceae *Prasinophyceae*	**α-, β-, γ-carotenes, lutein** **siphonaxanthin, siphonein,** antheraxanthin, astaxanthin, canthaxanthin, prasinoxanthin, neoxanthin, violaxanthin, zeaxanthin	0.02–291	Anti-cancer Anti-inflammatory Anti-oxidant Anti-obesity
Bacillariophyceae *Prymnesiophyceae*	**β-carotene, fucoxanthin** **diatoxanthin, diadinoxanthin** cantaxanthin	0.11–26.6	Cardiovascular
Classes	**Phytosterol**	**Contents****	**Activities in human health**
	Campesterol		
Chlorophyceae		2–48	Anti-angiogenic
Prasinophyceae		34–99	Anti-cancer Anti-oxidant
Bacillariophyceae		1–39	Cholesterol-lowering
Prymnesiophyceae		6–18	
	β-Sitosterol		
Chlorophyceae		1–33	Analgesic activity
Prasinophyceae		–	Anti-cancer Anti-inflammatory
Bacillariophyceae		1–95	Anti-mutagenic
Prymnesiophyceae		1–73	
	Stigmasterol		
Chlorophyceae		19–72	Anti-cancer
Prasinophyceae		–	Anti-oxidant Cholesterol-lowering
Bacillariophyceae		1–100	Hypoglycaemic
Prymnesiophyceae		10–47	

Isochrysis galbana, [6]. Astaxanthin is produced by the green microalga *Haematococcus pluvialis* when during its red phase can accumulate up to 5% of its dry weight [23]. In *Chlorella zofingiensis*, another freshwater green microalga, it has been shown that under stress conditions (high light irradiance, salt stress and low nitrogen), the content of astaxanthin can reach 5.32–6.02 mg/g dry weight of biomass [24].

2.2. Production of phytosterols by microalgae

Phytosterols are important structural components of membranes and are involved in the regulation of membrane fluidity and permeability; they also act as hormonal precursors involved in signal transductions in organisms [25]. They are found in all microalgal species. In microalgal oil extracts, the phytosterol content has been reported as ranging from 7 to 34 g per kg (0.7–3.4%) when issued from *Isochrysis galbana*, *Nannochloropsis* sp. and *Phaeodactylum tricornutum* [26]. Recently, *Diacronema lutheri* (syn. *Pavlova lutheri*), *Tetraselmis* sp. and *Nannochloropsis* sp. have been identified as the highest phytosterol producers, with content ranging from 0.4% to 2.6% dry weight biomass, and reaching 5.1%, depending on nutrients, salinity and cultivation duration [27]. According to the results reported by Volkman [28] in the genus *Chlorella*, a freshwater green alga (*Chlorophyceae*), the highest levels of sterols (expressed as percentage of total sterols) are represented by campesterol (23–31%) and by stigmasterol (56–72%). In the class of the *Prasinophyceae*, campesterol range from 34 to 99% of total sterols in *Tetraselmis* sp. The haptophyte (*Prymnesiophyceae*) *Diacronema lutheri* is characterized by levels of β-sitosterol ranging from 23 to 73% of total sterols and by levels of campesterol and stigmasterol about 16–18% and 10–31%, respectively. In diatoms (*Bacillariophyceae*), a large variety of sterols can be found, depending on species. Indeed the diatom *Thalassiosira pseudonana* is characterized by 100% of stigmasterol while in *Asterionella glacialis*, the level of β-sitosterol is 95%. Campesterol is mainly found in the diatoms *Odontella aurita* and *Chaetoceros* sp. with levels from 18 to 38% of total sterols. A summary of the main classes of microalgae producing campesterol, β-sitosterol and stigmasterol, is given in Table 1. More detailed information concerning the main microalgal producers, are reported in an exhaustive review written by Volkman [29] and in Mimouni et al. [30].

2.3. Characteristics and synthesis of carotenoids

Carotenoids belong to the family of terpenoid compounds and has more than 750 members [31]. Carotenoids are represented by carotenes that are true hydrocarbons without any substituent in their structure, and by xanthophylls or oxycarotenoids, that contain oxygen atoms [32]. Carotenoids are C30–C50 molecules characterized by an extended network of conjugated double bonds forming the chromophore, which absorbs visible light in the violet-green region. A consequence of the presence of double bonds is the abundant number of carotenoid isomers [33]. Thus, carotenoids may adopt several 3D-configurations that are important for their biological properties. For instance, *cis*-isomers of fucoxanthin have been reported to be more efficient than all-*trans*-isomers in human cancer lines [31]. Another consequence of the extended network of conjugated double bonds resides in their capacity to act as antioxidants [31]. Although the carotenoid diversity in microalgae is very large and in many cases specific of taxa, in addition to the regular carotenoids also found in land plants, microalgae can produce molecular species with unique chemical structures [34]. It is out of the scope of this review to describe here the different types of carotenoids present in microalgae; therefore, for more information, readers are directed towards excellent reviews on that specific topic [34].

Fucoxanthin (Fig. 1A) is a carotenoid present in the chloroplast of most of the algae belonging to the Heterokonta. In the photosynthetic apparatus, fucoxanthin is associated to pigments and has an essential role in photon capture for photosynthesis. Like any carotenoid, fucoxanthin exhibits a polyene chain with a conjugated carbonyl, an epoxide and a hydroxyl groups. The presence of an allenic bond makes the structure of fucoxanthin unique (Fig. 1A). Altogether, these features confer to fucoxanthin a strong antioxidant capacity as well as a unusual color for a carotenoid i.e. khaki color.

Astaxanthin (Fig. 1B) is a ketocarotenoid accumulating under stress conditions [35] in several green microalgae [36], the most famous being *Haematococcus pluvialis* [37]. In contrast to fucoxanthin and most of other carotenoids, astaxanthin accumulates in the cytoplasm within lipid/carotenoid droplets. As fucoxanthin, astaxanthin exhibits a polyene chain with an epoxide and a hydroxyl groups on each end cycle. The astaxanthin that accumulates in microalgae is usually esterified with fatty acids [38], which might be interesting from the nutritional point of view [39]. Altogether, these features confer to astaxanthin a very strong antioxidant capacity, a red color and a potential for nutrition. The main characteristics of fucoxanthin and astaxanthin, with their microalgal location and role, are reported in Table 2.

The first step in the carotenogenesis is the synthesis of

Table 2
Main characteristics of selected bioactive molecules in microalgae [6,25,29,42,43].

Carotenoids	**Chemical structure**	**Color**	**Detection Spectrophotometry (nm)**	**Location**	**Role**
Astaxanthin	$C_{40}H_{52}O_4$	Red	472 (methanol) 466 (hexane) 485 (chloroform)	Cytoplasm Lipid droplets	Photosynthetic apparatus
Fucoxanthin	$C_{42}H_{58}O_6$	Orange	449 (acetone) 453 (petroleum ether)	Chloroplast	Photosynthetic apparatus

Phytosterols	**Chemical structure**	**Systematic name**	**Detection Chromatography** (all sterols)	**Location**	**Role**
Campesterol	$C_{28}H_{48}O$	24α-methylcholest-5-en-3β-ol	Flame ionization detection Mass spectrometry	Membranes	Fluidity/Permeability Brassinosteroid synthesis
β-Sitosterol	$C_{29}H_{50}O$	24β-ethylcholest-5-en-3β-ol	UV 208 nm Diode array detection Evaporative light	Membranes	Fluidity/Permeability Membrane-bound enzyme effector
Stigmasterol	$C_{29}H_{48}O$	24α-ethylcholesta-5,22E-dien-3β-ol	scattering detection	Membranes	Fluidity/Permeability Membrane-bound enzyme effector Cell proliferation

isopentenyl pyrophosphate (IPP) through the mevalonate (MVA) pathway or the 1-deoxy-D-xylulose-5-phosphate (DOXP) pathway, that will be converted into geranyl geranyl pyrophosphate (GGPP) [40]. The carotenoid synthesis requires a condensing enzyme, the phytoene synthase, to produce the condensation of two molecules of GGPP to yield phytoene [41]. From this molecule, all the carotenoids will be synthesized, among which β-carotene, astaxanthin, lutein and xanthophylls as violaxanthin, diatoxanthin, and fucoxanthin through the xanthophyll cycles [32].

2.4. Characteristics and synthesis of phytosterols

Phytosterols are tetracyclic cyclopenta phenanthrene structures (ring A, B, C, and D) associated with an aliphatic chain on the carbon 17 (ring D) that can be analyzed by chromatography techniques and detected with numerous methods [42]. They are the end products of isoprenoid synthesis, derived from IPP and dimethylallyl pyrophosphate (DMAPP). Phytosterols are essential components of membranes [43], controlling fluidity, permeability or activities of membrane-bound enzymes [44]. In microalgae, there is a wide range of structures due to the great diversity of microalgal classes, genera and species, combined with a long evolutionary history of most microalgae [29]. Some sterols can be restricted to few microalgal classes while others are widespread. A large diversity of sterols are found in microalgae. For a review, it can be consulted a very interesting work in this field [29]. The aim of our review is to focus on some phytosterols that are known to have benefits on human health. In this context, here will be presented some characteristics of stigmasterol, β-sitosterol, and campesterol (Table 2). All microalgae contain sterols dominated with a Δ5 double bond and no methyl group on C4. Stigmasterol and β-sitosterol (Fig. 2) are C29 sterols (C29:2 and C29:1, respectively), and their systematic names are 24α-ethylcholesta-5,22E-dien-3β-ol and 24β-ethylcholest-5-en-3β-ol, respectively. One of the characteristics of C29 sterols is that they have a 24-ethyl substituent while C28 sterols have a 24-methyl group. Even if stigmasterol and β-sitosterol are commonly associated with higher plants, they can also be found in numerous microalgal species such as diatoms, chlorophytes, chrysophytes, haptophytes and freshwater eustigmatophytes [44]. Campesterol (Fig. 2) is a C28 sterol with one double bond (C28:1) and its systematic name is 24α-methylcholest-5-en-3β-ol. Campesterol is more specifically found in chlorophytes [29].

Two metabolic pathways are involved in their biosynthesis. The MVA pathway and the methylerythritol phosphate (MEP) pathway [44]. The existence of these two metabolic pathways have been proved in numerous microalgae [45]. Microalgal-derived phytosterols are reported as 4-desmethyl-Δ5-sterols, 4-desmethyl-Δ7-sterols, 4-methyl-sterols and dihydroxylated sterols [46].

In Fig. 4 is reported a short view of the two common metabolic pathways involved in the synthesis of microalgal carotenoids and sterols.

3. Bioavailability and absorption of carotenoids and phytosterols

3.1. Carotenoids

3.1.1. Bioavailability

The absorption of hydrophobic molecules as carotenoids, need different steps as follows: release from food matrix, lipid emulsion, solubilization into mixed micelles, uptake by enterocytes and secretion into lymphatic system [47]. Moreover, the increase of diet fat seems to enhance the absorption of carotenoids [48]. Carotenoid bioavailability depends on numerous dietary factors such as the source, food matrix, food processing or lipid levels but also depends on host-related factors, e.g. diseases, life-style habits age or genetic variations [49]. It is difficult to compare bioavailabilities of carotenoids from different plant sources as vegetables, fruits or microalgae because different *in vivo* and *in vitro* approaches have been used, even if high correlations have been found, thus stressing that

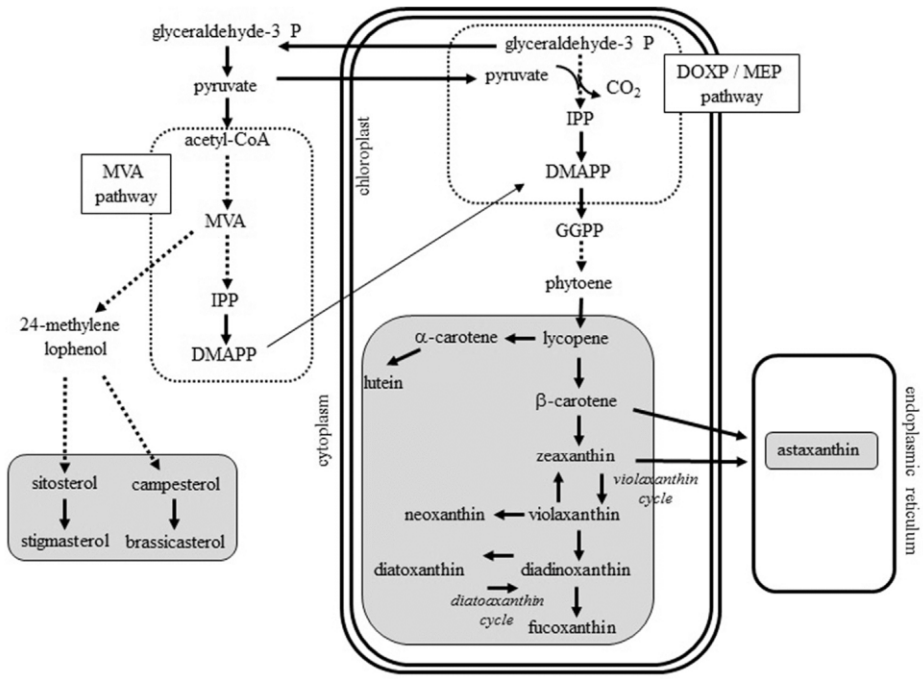


Fig. 4. Common metabolic pathways of microalgal carotenoid and sterol syntheses [32,45,110].
DMAPP: dimethylallyl pyrophosphate, DOXP/MEP: 1-deoxy-D-xylulose-5-phosphate/methylerythrol phosphate, GGPP: geranyl geranyl pyrophosphate, IPP: isopentenyl pyrophosphate, MVA: mevalonate.

estimating *in vitro* bioaccessibility (solubility/micellarization) can be indicative of the amount available for uptake in the gastrointestinal tract *in vivo* [50]. Moreover, there is a lack of information concerning microalgal sources. Nevertheless, below will be presented some reported results with different plant sources.

According to the literature, more than 750 carotenoid species have been identified and only 40 are consumed, the most abundant being β-carotene, lycopene, lutein, β-cryptoxanthin, α-carotene and zeaxanthin. Astaxanthin and cantaxanthin are absorbed in subjects fed with diets rich in sea food [49]. It has been reported that vegetable and fruit carotene bioavailability was ranged from 1.5 to 39%; concerning xanthophylls, this bioavailability was of 4–59% [51]. Carotenoids from microalgae have also been reported to be bioavailable for nutrition studies. Indeed, a study has been conducted in rats with diets containing *Spirulina platensis*, *Haematococcus pluvialis* or *Botryococcus braunii*, providing 200 μmol/L of β-carotene, astaxanthin or lutein, respectively [52]. After 15 days of diet, plasma levels of these carotenoids range from 255 to 485 nmol/L, the highest level being obtained for astaxanthin, probably due to astaxanthin esterification, which can increase astaxanthin absorption [53]. Moreover, in a previous similar nutritional study, it was also reported that the peak level of individual carotenoids in plasma was observed 2 h after administration of microalgal biomass [54].

3.1.2. Mechanisms of absorption

When carotenoids are released from the food matrix, they are incorporated into lipid droplets and then in mixed micelles after action of pancreatic lipases and bile salts that are absorbed in the enterocytes. For a long time, it has been thought that carotenoids were absorbed by passive diffusion but recently it has been proposed the role of proteins involved in their uptake but also in their secretion. Indeed, the uptake of carotenoids are captured by the apical membrane transporters as scavenger receptor class B type 1 (SR-B1), cluster of differentiation 36 (CD36) and Niemann-Pick C1-like 1 (NPC1L1) [55]. Carotenoids are transported by lipoproteins with a specific accumulation of β-carotene in chylomicrons and very low density lipoproteins (VLDL), while xanthophylls are more specifically incorporated into LDL and high density lipoproteins (HDL) [40] (Fig. 5). Beside liver, the main tissue target of β-carotene in which it will be accumulated is adipose tissue [56].

3.2. Phytosterols

3.2.1. Bioavailability

Campesterol, β-sitosterol and stigmasterol are the most common phytosterols, with a chemical structure resembling cholesterol one. As human cells do not synthesize them, phytosterol levels and activities depend on plant origin diet [57]. In human serum, phytosterol levels are hundred times lower than cholesterol ones, in a range of 3–20 mg/L. This can be partially explained by the fact that less than 10% of phytosterols are absorbed by comparison with the levels of absorbed cholesterol that are around 50–60% [58]. However, due to the poor solubility and bioavailability of free phytosterols, a minimum intake of 2–3 g/days is necessary for a cholesterol-lowering effect [27]. In various animal species, it has been reported an absorption ranging from 0% in rabbit to 4% in rat; and in human subjects fed with 240–320 mg of sitosterol, the estimated absorption was from 1.5% to 5% [59].

3.2.2. Mechanisms of absorption

Intestinal uptake of phytosterols takes place after their incorporation into mixed micelles. Then, sterols are released from the micelles and transported into the enterocyte via the NPC1L1 transporter [60]. Once incorporated, the absorption is inhibited by

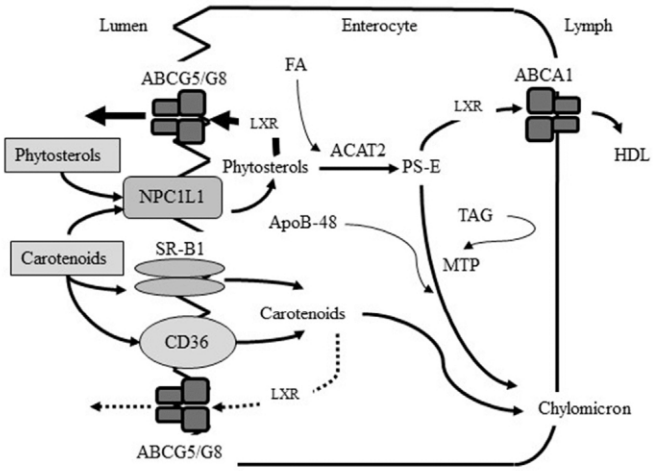


Fig. 5. Intestinal uptake and secretion pathways of carotenoids and phytosterols [55,88,111,112].
ABC: ATP-binding cassette, ACAT2: acyl-coenzyme A cholesterol acyltransferase 2, ApoB-48: apolipoprotein B48, CD36: cluster of differentiation 36, FA: fatty acid, HDL: high density lipoprotein, LXR: liver X receptor, MTP: mitochondrial transfer protein, NPC1L1: Niemann-Pick C1-like 1, PS-E: esterified phytosterol, SR-B1: scavenger receptor class B type 1, TAG: triacylglycerol.

ATP-binding cassette (ABC) efflux transporters as ABCG5 and ABCG8 that are involved in the secretion of phytosterols in the inter-intestinal lumen [61]. In the enterocytes, contrary to cholesterol, phytosterols are not esterified, resulting in a lower incorporation into the nascent chylomicrons which enter the lymphatic system and then blood circulation. Then, phytosterols are taken up by liver in which there are metabolized. However, based upon a higher rate of bile excretion of phytosterols compared to cholesterol, this can also explain the low serum levels of these molecules [62].

4. Carotenoids and disease prevention

In microalgae, β-carotene, astaxanthin and fucoxanthin are among the most interesting compounds based upon their antioxidant functions. Among the carotenoids, β-carotene is responsible for the production of retinol and retinoic acid, thus activating numerous transcription factors such as retinoid X receptor (RXR) and peroxisome proliferator-activated receptors (PPARs), and hormone receptors [56]. *In vitro* and *in vivo* studies have reported that β-carotene was also involved in the reduction of angiogenesis through decreasing new formed blood vessels and suppression of cell proliferation and migration. The expression of matrix metalloproteinases (MMP)-2 and −9 was downregulated, and a decrease of the pro-inflammatory cytokine levels has also been observed [63]. Concerning diabetes, serum β-carotene levels have been reported to be inversely correlated with levels of HbA1c that are linked to impaired insulin sensitivity.

In the following sections, only the effects of xanthophylls on biochemical mechanisms in disease prevention and health benefits will be detailed, and more specifically the role played by astaxanthin and fucoxanthin, two microalgal high added value products. Indeed, these molecules have been proposed to have benefits on human health through antioxidant activity, hypolipidemic, anti-inflammatory and hypotensive effects, and through the improvement of endothelial function [64]. A summary of the role of xanthophylls is given in Fig. 6.

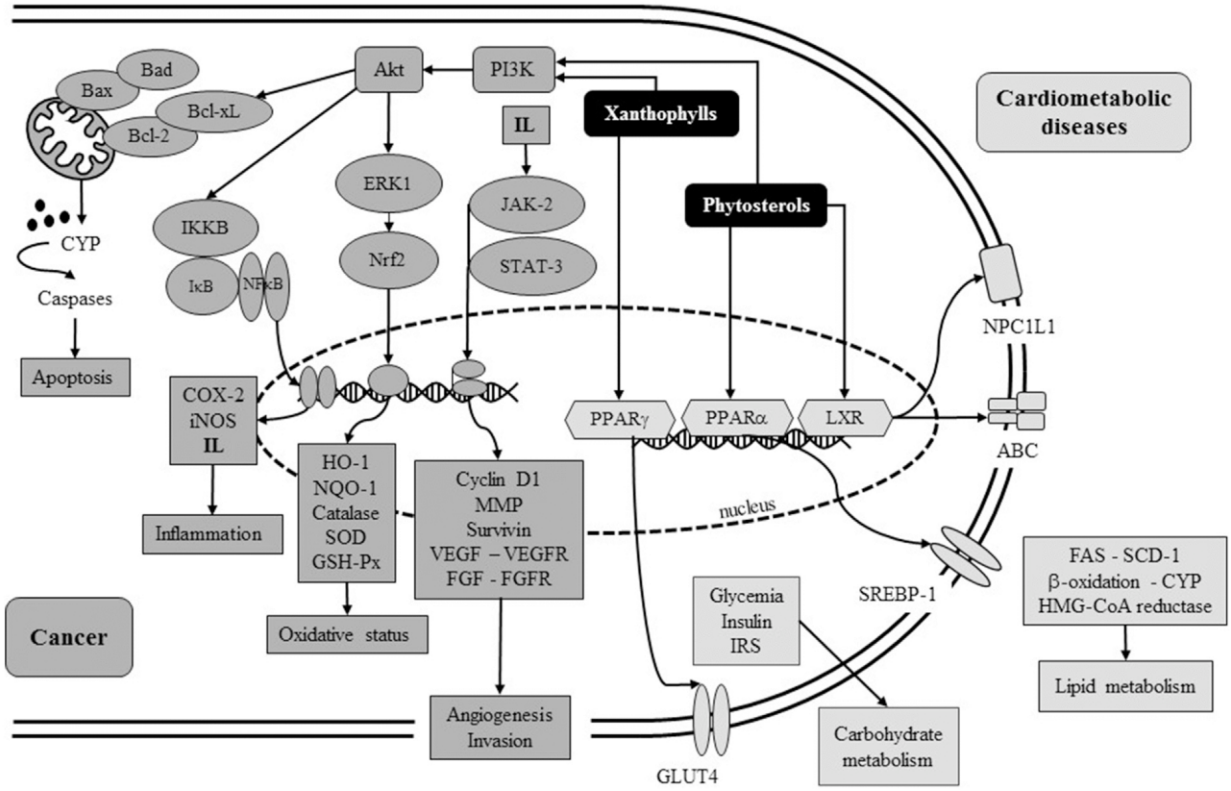


Fig. 6. The roles of microalgal xanthophylls and phytosterols in the regulation of biochemical parameters involved in chronic diseases. ABC: ATP-binding cassette, Akt: protein kinase B, COX: cyclooxygenase, CYP: cytochrome P450, EGR: early growth factor, ERK: extracellular signal-regulated kinase, FAS: fatty acid synthase, FGF: fibroblast growth factor, FGFR: fibroblast growth factor receptor, GLUT: glucose transporter protein, GSH-Px: glutathione peroxidase, HO: heme oxygenase, IKK: I kappa B kinase, IL: interleukin, iNOS: inductible nitric oxide synthase, IRS: insulin receptor substrate, JAK: Janus kinase, JNK: c-Jun N-terminal kinase, LXR: liver X receptor, MMP: matrix metalloproteinase, NFκB: nuclear factor-kappa B, NO: nitric oxide, NPC1L1: Niemann-Pick C1 like 1, NQO: NADPH quinone oxidoreductase, Nrf2: nuclear factor erythroid-2 related factor 2, PI3K: phosphoinositide 3-kinase, PPAR: peroxisome proliferator-activated receptor, SCD: stearoyl CoA desaturase, SERBP: sterol regulatory element-binding protein, SOD: superoxide dismutase, STAT: signal transducer and activator of transcription, TNF: tumor necrosis factor, VEGF: vascular endothelial growth factor, VEGFR: vascular endothelial growth factor receptor.

4.1. Metabolic disease prevention

Astaxanthin, one of the most important carotenoids that can be extracted from the microalga *Haematococcus pluvialis*, has a real anti-hypertensive effect. This protective effect has been reported in SHR and Zucker rats with a systolic blood pressure lowering action [65,66]. It has been proposed that this effect could be mediated by NO-related mechanisms and by the activity of the renin-angiotensin system. Astaxanthin has also been shown to have a great potential in diabetes prevention and treatment. In the db/db mouse model, treatment with astaxanthin induced a decrease of glucose tolerance with attenuation of blood glucose levels and serum insulin enhancement. Moreover, due to its antioxidant properties, astaxanthin was reported to help in the preservation of pancreatic β-cell function [67]. In high fat diet-fed mice, it has been shown that this xanthophyll was able to reduce ROS production, lipid accumulation, and the hepatic expression of endoplasmic reticulum stress and inflammatory markers. These reductions have been related to reduced c-Jun N-terminal kinase 1 (JNK1) and nuclear factor-kappa B (NF-κB) cell signaling pathways, leading to the conclusion that astaxanthin might be used as a treatment for insulin resistant patients [68]. This carotenoid has also been shown to bind to PPARγ, decrease glycemia and triglyceridemia and improve serum HDL-cholesterol and adiponectin levels, thus resulting in an anti-hyperglycemic effect [41]. Still concerning the carbohydrate metabolism regulation, the xanthophyll fucoxanthin, like astaxanthin, has the ability to regulate glycemia and insulin levels in diabetic/obese mice but it also upregulates the mRNA levels of the glucose transporter 4 protein (GLUT4), known to be involved in the uptake of glucose. The translocation of GLUT4 from intracellular vesicles to plasma membrane would result from the increased phosphorylation levels of protein kinase B (Akt) and from the induction of PPARγ coactivator-1α [69].

Fucoxanthin is also recognized to have an anti-obesity activity. Indeed, several mechanisms are regulated by this carotenoid in relation with weight loss and lipid metabolism. It has thus been reported that fucoxanthin decreased the mRNA expression of the fatty acid synthase (FAS) and inhibited the adipocyte uptake of glucose by reducing the phosphorylation of the insulin receptor substrate 1 (IRS-1). Its anti-obesity effects would also be due to the stimulation of the uncoupling protein-1 (UCP-1) expression in white adipose tissue. Thermogenesis and lipolysis are increased by the UCP-1 stimulation and also by the increased mRNA expression of the β3-adrenergic receptor (Adrb3) [70]. This anti-obesity action is also related to a decrease in plasma leptin levels and to a down-regulation of the liver stearoyl-CoA desaturase-1 (SCD1), a rate limiting step in the saturated and monounsaturated fatty acids. This alteration of fatty acid composition has been proposed to stem from leptin signaling in mice [71]. This anti-obesity effect is also due to the action of fucoxanthin and its derivates on lipid metabolism. Fucoxanthin has been reported to regulate the hydroxyl methyl glutaryl CoA (HMG-CoA), acyl-CoA cholesterol acyltransferase (ACAT), lecithin-cholesterol acyltransferase (LCAT) and carnitine palmitoyl-transferase (CPT-1) activities as well as sterol regulatory

element-binding protein-1 (SREBP-1) [70].

4.2. Anti-cancer and anti-angiogenic activities

The anti-cancer effects of astaxanthin have been studied in numerous cancers in murine models in which it has been reported a significant lower occurrence of cancer, an anti-proliferative activity, a reduction of metastasis induced by stress, and a reduction of weights and sizes of tumours [41]. The pro-cell death effect of astaxanthin could go through the activation of a caspase-dependent mitochondrial apoptotic pathway; this would involve a downregulation of the expression of anti-apoptotic proteins (eg. *Bcl-2*, *p-Bad*, and surviving), and an upregulation of pro-apoptotic proteins (*Bax* and *Bad*), with a release of cytochrome *c* from mitochondria and cleavage of ADP-ribose polymerase [72]. In oral cancer, astaxanthin has been shown to inhibit invasion through a decrease in the mRNA and protein levels of overexpressed MMP-2 and -9, and through an increase of the protein levels of their endogenous inhibitors [73].

In relation with these observations, molecular targets of astaxanthin have been proposed that would explain its role in cancer prevention. The activation of the caspase-mediated mitochondrial apoptotic pathway would be due to the inhibition of the NF-κB signaling pathway and to the down-regulation of the key regulatory kinases, I kappa B kinase (IKKβ) and glycogen synthase kinase-3β (GSK-3β) [72]. The anti-proliferative and anti-angiogenic effects of astaxanthin have been related to the inhibition of the JAK-2 (Janus kinase-2)/STAT-3 (signal transducers and activators of transcription-3) signaling with an inhibition of STAT-3 phosphorylation and its nuclear translocation leading to down-regulation of STAT-3 target genes involved in cell proliferation (cyclin D1), invasion (MMP) and angiogenesis (vascular endothelial growth factor (VEGF) and its receptor VEGFR-2) [73]. Among the signaling pathways regulating cell survival, the phosphoinositide 3-kinase PI3K/Akt has an important role. Astaxanthin decreased the phosphorylation of AKT to induce apoptosis. Other molecular targets such as mitogen-activated protein kinases (MAPKs), PPARγ and nuclear factor erythroid-2 related factor 2 (Nrf-2) are regulated by astaxanthin. For a detailed review see Zhang and Wang [74].

Fucoxanthin seems to have a better anti-cancer activity compared with lycopene, β-carotene or astaxanthin. Indeed, in the human leukemia HL-60 cell line, only fucoxanthin induced high levels of DNA fragmentation. In this study, the authors stated that the apoptosis induced by fucoxanthin was related to the generation of ROS, leading to cytotoxicity involving the cleavage of caspases-3 and -9 [75]. In prostate cancer cell lines, fucoxanthin and its metabolite fucoxanthinol have been reported to inhibit cell-growth rate [76] and to induce apoptosis in prostate cancer PC-3 cells by activating caspase-3 [77]. Fucoxanthin and fucoxanthinol have also been reported to induce cell-cycle arrest in numerous human tumor cell lines by modulating expression of various molecules and signal transduction pathways [78]. In osteosarcoma, they induced G_1 cell cycle arrest by reducing the expression of cyclin-dependent kinases. In this bone tumor, fucoxanthin and fucoxanthinol also induced apoptosis with a reduced expression of survivin, an X-linked inhibitor of apoptosis protein, and of the anti-apoptotic genes *Bcl-2* and *Bcl-xL*. The resulting apoptosis is associated with caspase activation and with an inhibition of the Akt pathway. Migration and invasion inhibitions have been associated with the reduced MMP-1 expression and the activator protein-1 signal [79]. Studies reported in human umbilical vein endothelial cells (HUVEC) have demonstrated the anti-angiogenic activity of fucoxanthin and fucoxanthinol. Indeed, it has been shown a suppression of the growth of microvessels [80] and a down-regulation of the fibroblast growth factor-2 (FGF-2), its receptor FGFR-1 as well as of the factor of transcription early growth response protein 1 (EGR-1). In this study, it has also been shown that fucoxanthin hampered the phosphorylation of signaling proteins such as extracellular signal-regulated kinases (ERK) and Akt [81].

4.3. Anti-inflammatory activities

The anti-inflammatory effects of astaxanthin have been reported in numerous *in vitro* and *in vivo* studies on lipopolysaccharide (LPS)-induced inflammatory reactions, with suppression of the production of NO, prostaglandin E_2 (PGE_2), interleukin (IL)-1β and tumor necrosis factor alpha (TNF-α), and prevention of the expression of inductible nitric oxide synthase (iNOS) and cyclo-oxygenase (COX)-2. All these results have been related with the inhibition of the NF-κB signaling pathway. The same results have been observed in LPS-stimulated murine macrophages, in which fucoxanthin was able to reduce levels of pro-inflammatory molecules such as NO, PGE_2, IL-1β/6, TNF-α, by the suppression of the NF-κB but also by the inhibition of the MAPK pathways signaling [75].

4.4. Anti-oxidant activities

Astaxanthin scavenges free radicals and other antioxidants to protect lipids from peroxidation. It inhibits H_2O_2-mediated activation of the transcription factor NF-κB that is involved in the expression of heme oxygenase-1 (HO-1) and iNOS engaged against oxidative stress [82]; subsequently, the production of pro-inflammatory cytokines was blocked through the increase of tyrosine phosphatase-1 expression [83]. In brain, the use of astaxanthin has been reported to protect from oxidative stress with a decreased level of MDA and NO and increased activities of catalase and of superoxide dismutase (SOD) and higher glutathione (GSH) levels [84]. It also protects the steroidogenesis from oxidative stress with a prevention in the down-regulation of the steroidogenic acute regulatory protein (StAR), a protein involved in the transport of cholesterol. Indeed, during oxidative stress, the protein kinase A (PKA) pathway is attenuated, leading to the suppression of the expression of StAR; administration of astaxanthin acts on the PKA pathway, thereby restoring the StAR expression [85].

In vivo studies have shown that fucoxanthin exhibit antioxidant activities through the increase of catalase, SOD and glutathione peroxidase (GSH-Px) activities, as well as the plasmatic expression of Nrf2 and NADPH quinone oxidoreductase 1 (NQO1) [86]. The increased Nrf2 protein accumulation is accompanied by an enhancement of ERK, p38 phosphorylation and of HO-1 expression [87].

5. Phytosterols and disease prevention

5.1. Cholesterol-lowering activity and lipid metabolism

Phytosterols have been reported to interact with the cholesterol absorption through inhibitory mechanisms. Among suggested mechanisms, it has been proposed the release of cholesterol from mixed micelles, the modification of the gene expression of NPC1L1 and of ABCG5 and ABCG8 transporters, or the decrease of the intestinal cholesterol esterification rate [88]. The selective binding of sitosterol to the ABCG5 and ABCG8 transporters involved in the regulation of liver and intestinal sterol absorption and secretion, is related to blood cholesterol lowering [89]. Microalgal phytosterols as campesterol and β-sitosterol are also involved in cholesterol level decrease through the down-regulation of hepatic HMG-CoA reductase and the stimulation of the LDL-C receptors, thus facilitating the removal of plasma cholesterol [90]. Moreover, β-

sitosterol has a competing activity with NPC1L1 [91]. LXRs are nuclear receptors involved in the regulation of lipid metabolism. Even if the main function of LXRs is the regulation of cholesterol metabolism, their activation inhibits inflammation, autoimmune reactions and atherogenesis [92]. The treatment of intestinal cells with phytosterols, like campesterol and β-sitosterol, would lead to an increase in the expression of LXR target genes, suggesting a ligand action of these molecules on LXRs. Specifically, phytosterols increase the ABCA1 expression and decrease cholesterol absorption [93]. In rat, it has been shown that the incorporation of β-sitosterol into liver membranes, decreased its fluidity while an increase in liver desaturases (Δ9, Δ6 and Δ5 desaturases) was observed, probably as a compensatory mechanism for the decreased fluidity [57,94].

As phytosterols are supposed to be metabolized in the same way as cholesterol in intestinal lumen, the effect of campest-5-en-3-one (campestenone), an oxidized derivate of campesterol, has been studied on lipid metabolism in rats. It has been reported that campestenone increased the activities and mRNA expressions of enzymes involved in liver β-oxidation; it also reduced visceral fat weight, triacylglycerol and cholesterol levels in serum and liver, as well as the activities and mRNA expression of enzymes involved in fatty acid synthesis [95]. In this study, it has also been reported an activation of human PPARα and a decreased mRNA level of SREBP-1. All these results are in favor of an effect of dietary campesterol and its oxidized derivate to prevent CVD by improving obesity and dyslipidemia.

In human pancreatic islet and in the INS-1 insulinoma cell line, the use of stigmasterol prevents the increase of both cholesterol and ROS levels induced by glucolipotoxicity. In this study, stigmasterol has been shown to decrease free cholesterol levels resulting from glucolipotoxicity, with a real potential to protect pancreatic cells during diabetes progression [96].

Recently, in mice fed high-fat western-style diet, it has been reported that stigmasterol and β-sitosterol were able to attenuate the nonalcoholic fatty liver disease (NAFLD) and to alter lipid metabolism. Administered at a dose corresponding to what is suggested for human, it has been shown an amelioration of high fat diet-induced fatty liver, including liver total lipid, triacylglycerol and cholesterol levels. Moreover, both phytosterols were able to decrease the intestinal bile acid levels. Analyses of gene expressions have shown a prevention of the decreased mRNA expression of HMG-CoA reductase in liver by both phytosterols. Only stigmasterol was reported to suppress lipogenesis-related genes such as SCD1 and FAS, while both increased the expression of PPARα and CD36. The hepatic expressions of the cytochrome P450s CYP7A1, CYP8B1 and CYP27A1 were also increased [97].

5.2. Anti-inflammatory activities

Ergosterol and peroxide-derived ergosterol from microalga such as *Chlorella vulgaris* and *Dunaliella tertiolecta* have been shown to reduce the LPS-induced inflammatory response through the reduction of pro-inflammatory cytokines (TNF-α, IL-6, IL-10) [98]. β-Sitosterol, has been shown to have anti-inflammatory activity in murine macrophages. Indeed, treatment with this phytosterol inhibited both the STAT1 pathway and the translocation of NF-κB, two pro-inflammatory signal transduction pathways, which were supposed to be mediated by the activation of the tyrosine phosphatase SHP-1 [99]. Stigmasterol has been described to have anti-osteoarthritic properties with inhibition of pro-inflammatory and matrix degradation mediators involved in cartilage degradation in part via the NF-κB pathway [100]. In LPS-induced innate immune responses in mice, stigmasterol has also been reported to decrease fever response, lung inflammation, transaminase activities and liver damages [101].

5.3. Anti-cancer activities

Numerous studies have reported that phytosterols exhibit bioactivities against tumours. Thus, stigmasterol isolated from the microalga *Navicula incerta* induces toxicity in HepG2 cells and triggers apoptosis via up-regulation of *Bax* and down-regulation of *Bcl-2* [102]. β-Sitosterol is also involved in the increase of the *Bax*/*Bcl*-2 ratio and in the activation of caspase-3, thus enhancing apoptosis and inhibiting proliferation in human leukemic cells [103]. In MDA-MB-231 cells, this phytosterol has been shown to inhibit GO/G1 cell cycle associated with induction of apoptosis. The use of β-sitosterol indeed induced the depolarization of mitochondrial membrane potential and also increased the *Bax*/*Bcl*-2 ratio in this human breast cancer line [104]. The Fas/CD95 apoptotic pathway in human breast cancer has also been suggested to be affected by β-sitosterol. Indeed, its incorporation in cell membranes induced an increase in Fas protein levels, and caspase-8 activity, resulting in an inhibition of tumor cell growth [105].

As shown in macrophages, another mechanism of the anti-cancer activity of phytosterols might occur through the increase of antioxidant enzymes, like the manganese SOD and the GSH-Px, resulting in a protection of cells from damage caused by ROS and depending on the estrogen/PI3K pathway [106].

As phospholipids interact with cholesterol in cell membranes, the incorporation of phytosterols into membranes could modify their structure and thus cell signaling [107]. Indeed, lipid rafts, where sterols are highly concentrated, regulate phosphorylation chain reactions, and the incorporation of phytosterols might lead to beneficial changes in signal transduction [108]. To explain the role of β-sitosterol on the inhibition of tumor growth, the signaling pathways involving the protein kinase C (PKC) and sphingomyelin cycle have been investigated. *In vivo* and *in vitro* studies did not report any effect of β-sitosterol on the PKC pathway and on the phospholipase C activity. However, the *in vitro* studies showed an activation of the sphingomyelin cycle, in cells supplemented with β-sitosterol, resulting in an increased production of ceramide, a major cell second messenger promoting cell cycle arrest and apoptosis [57]. *In vitro* studies have further shown the role of β-sitosterol in the reduction of sphingomyelin levels via the activation of sphingomyelinase leading to an increase in ceramide [109]. A summary of the role of the main microalgal phytosterols is reported in Fig. 6.

6. Conclusion

The results reported in this review explain how microalgae could be promising food supplement for health and disease prevention. The whole cell can be used in nutrition to provide a mixture of molecules that possess preventive effects towards several chronic diseases; on the other hand, extracted molecules could also be proposed for targeting specific effects. In this review, the effects of microalgal ω3 PUFA have not been discussed but their high amounts contained in microalgae help in the efficiency of these microorganisms in cardiometabolic disease prevention and anti-tumoral activities. Fish oils provide high levels of ω3 PUFA but the advantage of microalgae is that they also provide molecules such as carotenoids and sterols that have obvious health beneficial effects. At present, few microalgae can be used in human nutrition because cytotoxicity tests must be conducted prior to agreement by food authorities. However, as emphasized in this review, extracted molecules might be directly used for nutrition in order to act specifically on cell signaling pathways and thus, might be considered not only as preventive agents but also as therapeutic agents.

Authors' contribution

MLG and ELF contributed to the redaction of the section related to cancer prevention; CM and VM contributed to the section related to cardiovascular disease prevention; DLG thoroughly read the manuscript and added more information, notably related to underlying mechanisms, when necessary, besides checking for correct English usage; BS contributed to the redaction of the section related to the carotenoid production, and also to the revision of English language; LU supervised the redaction of this review and compiled all the reported informations, was responsible of the different sections, created all figures and tables and wrote the sections in relation with the illustrations.

Declaration of interest

None.

Acknowledgements

This work was jointly funded by the Collectivités Locales Mayennaises and the French Ministère de l'Enseignement Supérieur de la Recherche et de l'Innovation.

References

[1] R.L. Naylor, Oil crops, aquaculture, and the rising role of demand: a fresh perspective on food security, Glob. Food Secur. 11 (Dec. 2016) 17–25.
[2] A. Molino, et al., Microalgae characterization for consolidated and new application in human food, animal feed and nutraceuticals, Int. J. Environ. Res. Public Health 15 (11) (Nov. 2018) 2436.
[3] R.H. Liu, Potential synergy of phytochemicals in cancer prevention: mechanism of action, J. Nutr. 134 (12) (Dec. 2004) 3479S–3485S.
[4] V. Vinayak, et al., Diatom milking: a review and new approaches, Mar. Drugs 13 (5) (May 2015) 2629–2665.
[5] V. Vinayak, V. Kumar, M. Kashyap, K.B. Joshi, R. Gordon, B. Schoefs, Fabrication of resonating microfluidic chamber for biofuel production in diatoms (Resonating device for biofuel production), in: 2016 3rd International Conference on Emerging Electronics (ICEE), 2016, pp. 1–6.
[6] M. Morançais, J.-L. Mouget, J. Dumay, Proteins and pigments, in: I.A. Levine, J. Fleurence (Eds.), Microalgae in Health and Disease Prevention, Academic Press, 2018, pp. 145–175.
[7] E. Damergi, J.-P. Schwitzguébel, D. Refardt, S. Sharma, C. Holliger, C. Ludwig, Extraction of carotenoids from Chlorella vulgaris using green solvents and syngas production from residual biomass, Algal Res. 25 (2017) 488–495.
[8] A. Molino, et al., Extraction of astaxanthin from microalga Haematococcus pluvialis in red phase by using generally recognized as safe solvents and accelerated extraction, J. Biotechnol. 283 (Oct. 2018) 51–61.
[9] S.-A. Choi, et al., High-efficiency cell disruption and astaxanthin recovery from Haematococcus pluvialis cyst cells using room-temperature imidazolium-based ionic liquid/water mixtures, Bioresour. Technol. 274 (Feb. 2019) 120–126.
[10] G.D. Sanzo, et al., Supercritical carbon dioxide extraction of astaxanthin, lutein, and fatty acids from Haematococcus pluvialis microalgae, Mar. Drugs 16 (9) (Sep. 2018) 334.
[11] M. Mubarak, A. Shaija, T.V. Suchithra, A review on the extraction of lipid from microalgae for biodiesel production, Algal Res. 7 (Jan. 2015) 117–123.
[12] M. Coué, et al., Spirulina liquid extract protects against fibrosis related to non-alcoholic steatohepatitis and increases ursodeoxycholic acid, Nutrients 11 (1) (Jan. 2019) 194.
[13] M.F. de Jesus Raposo, A.M.M.B. de Morais, R.M.S.C. de Morais, Bioactivity and applications of polysaccharides from marine microalgae, in: K.G. Ramawat, J.-M. Mérillon (Eds.), Polysaccharides: Bioactivity and Biotechnology, Springer International Publishing, Cham, 2015, pp. 1683–1727.
[14] M.F. de J. Raposo, et al., Bioactivity and applications of sulphated polysaccharides from marine microalgae, Mar. Drugs 11 (1) (Jan. 2013) 233–252.
[15] E.M. Marinova, N.V.L. Yanishlieva, Inhibited oxidation of lipids II: comparison of the antioxidative properties of some hydroxy derivatives of benzoic and cinnamic acids, Fett Wiss. Technol./Fat Sci. Technol. 94 (11) (Jan. 1992) 428–432.
[16] M.F. de J. Raposo, A.M.M.B. de Morais, Microalgae for the prevention of cardiovascular disease and stroke, Life Sci. 125 (Mar. 2015) 32–41.
[17] A. Haimeur, et al., The role of Odontella aurita, a marine diatom rich in EPA, as a dietary supplement in dyslipidemia, platelet function and oxidative stress in high-fat fed rats, Lipids Health Dis. 11 (1) (Oct. 2012) 147.
[18] A. Haimeur, et al., Fish oil and microalga omega-3 as dietary supplements: a comparative study on cardiovascular risk factors in high-fat fed rats, Lipids 51 (9) (Sep. 2016) 1037–1049.
[19] J.-Y. Cherng, M.-F. Shih, Preventing dyslipidemia by Chlorella pyrenoidosa in rats and hamsters after chronic high fat diet treatment, Life Sci. 76 (26) (May 2005) 3001–3013.
[20] K. Nuño, A. Villarruel-López, A.M. Puebla-Pérez, E. Romero-Velarde, A.G. Puebla-Mora, F. Ascencio, Effects of the marine microalgae Isochrysis galbana and Nannochloropsis oculata in diabetic rats, J. Funct. Foods 5 (1) (Jan. 2013) 106–115.
[21] Heydarizadeh Parisa, et al., Response of CO2-starved diatom Phaeodactylum tricornutum to light intensity transition, Philos. Trans. R. Soc. Biol. Sci. 372 (1728) (Sep. 2017) 20160396.
[22] D.B. Stengel, S. Connan, Z.A. Popper, Algal chemodiversity and bioactivity: sources of natural variability and implications for commercial application, Biotechnol. Adv. 29 (5) (Sep. 2011) 483–501.
[23] R. Sathasivam, R. Radhakrishnan, A. Hashem, E.F. Abd_Allah, Microalgae metabolites: a rich source for food and medicine, Saudi J. Biol. Sci. 26 (4) (2019) 709–722.
[24] D. Pelah, A. Sintov, E. Cohen, 'The effect of salt stress on the production of canthaxanthin and astaxanthin by <Emphasis Type="Italic">Chlorella zofingiensis</emphasis> grown under limited light intensity', World J. Microbiol. Biotechnol. 20 (5) (Jul. 2004) 483–486.
[25] W.A. Stirk, et al., Hormone profiles in microalgae: gibberellins and brassinosteroids, Plant Physiol. Biochem. 70 (Sep. 2013) 348–353.
[26] E. Ryckebosch, C. Bruneel, R. Termote-Verhalle, K. Muylaert, I. Foubert, Influence of extraction solvent system on extractability of lipid components from different microalgae species, Algal Res. 3 (Jan. 2014) 36–43.
[27] X. Luo, P. Su, W. Zhang, Advances in microalgae-derived phytosterols for functional food and pharmaceutical applications, Mar. Drugs 13 (7) (Jul. 2015) 4231–4254.
[28] J.K. Volkman, A review of sterol markers for marine and terrigenous organic matter, Org. Geochem. 9 (2) (Jan. 1986) 83–99.
[29] J.K. Volkman, Sterols in microalgae, in: M.A. Borowitzka, J. Beardall, J.A. Raven (Eds.), The Physiology of Microalgae, Springer International Publishing, Cham, 2016, pp. 485–505.
[30] V. Mimouni, A. Couzinet-Mossion, L. Ulmann, G. Wielgosz-Collin, Lipids from microalgae, in: I.A. Levine, J. Fleurence (Eds.), Microalgae in Health and Disease Prevention, Academic Press, 2018, pp. 109–131.
[31] H. Gateau, K. Solymosi, J. Marchand, B. Schoefs, Carotenoids of microalgae used in food industry and medicine [Online]. Available: https://www.ingentaconnect.com/contentone/ben/mrmc/2017/00000017/00000013/art00005, 2017. (Accessed 23 April 2019).
[32] K.J.M. Mulders, P.P. Lamers, D.E. Martens, R.H. Wijffels, Phototrophic pigment production with microalgae: biological constraints and opportunities, J. Phycol. 50 (2) (Apr. 2014) 229–242.
[33] P. Heydarizadeh, et al., Plastids of marine phytoplankton produce bioactive pigments and lipids, Mar. Drugs 11 (9) (Sep. 2013) 3425–3471.
[34] E.S. Egeland, Carotenoids, in: M.A. Borowitzka, J. Beardall, J.A. Raven (Eds.), The Physiology of Microalgae, Cham: Springer International Publishing, 2016, pp. 507–563.
[35] Y. Lemoine, B. Schoefs, Secondary ketocarotenoid astaxanthin biosynthesis in algae: a multifunctional response to stress, Photosynth. Res. 106 (1–2) (Nov. 2010) 155–177.
[36] J. Kopecky, B. Schoefs, K. Loest, D. Stys, O. Pulz, Microalgae as a Source for Secondary Carotenoid Production: a Screening Study, Algological Studies, 2000, pp. 153–168.
[37] A. Solovchenko, K. Neverov, Carotenogenic response in photosynthetic organisms: a colorful story, Photosynth. Res. 133 (1–3) (Sep. 2017) 31–47.
[38] B. Schoefs, N.-E. Rmiki, J. Rachadi, Y. Lemoine, Astaxanthin accumulation in Haematococcus requires a cytochrome P450 hydroxylase and an active synthesis of fatty acids, FEBS Lett. 500 (3) (Jul. 2001) 125–128.
[39] Y. Lemoine, N.E. Rmiki, A. Creach, J. Rachidi, B. Schoefs, Cytoplasmic accumulation of astaxanthin by the green alga Haematococcus pluvialis (flotow) in Plant Cell Organelles- Selected topics, in: B. Schoefs (Ed.), Plant Cell Organelles- Selected Topics, Research Signpost Publ, Kerala, India, 2008, ISBN 978-81-308-0104-9, pp. 251–284.
[40] M.F. de J. Raposo, et al., Carotenoids from marine microalgae: a valuable natural source for the prevention of chronic diseases, Mar. Drugs 13 (8) (Aug. 2015) 5128–5155.
[41] R. Sathasivam, J.-S. Ki, A review of the biological activities of microalgal carotenoids and their potential use in healthcare and cosmetic industries, Mar. Drugs 16 (1) (Jan. 2018) 26.
[42] M.J. Lagarda, G. García-Llatas, R. Farré, Analysis of phytosterols in foods, J. Pharm. Biomed. Anal. 41 (5) (Aug. 2006) 1486–1496.
[43] M.-A. Hartmann, Plant sterols and the membrane environment, Trends Plant Sci. 3 (5) (May 1998) 170–175.
[44] J. Volkman, Sterols in microorganisms, Appl. Microbiol. Biotechnol. 60 (5) (Jan. 2003) 495–506.
[45] M. Lohr, J. Schwender, J.E.W. Polle, Isoprenoid biosynthesis in eukaryotic phototrophs: a spotlight on algae, Plant Sci. 185–186 (Apr. 2012) 9–22.
[46] S.W. Rampen, B.A. Abbas, S. Schouten, J.S. Sinninghe Damste, A comprehensive study of sterols in marine diatoms (Bacillariophyta): implications for their use as tracers for diatom productivity, Limnol. Oceanogr. 55 (1) (Jan. 2010) 91–105.
[47] R.K. Saini, S.H. Nile, S.W. Park, Carotenoids from fruits and vegetables: chemistry, analysis, occurrence, bioavailability and biological activities, Food

Res. Int. 76 (Oct. 2015) 735–750.
[48] L. Yonekura, A. Nagao, Intestinal absorption of dietary carotenoids, Mol. Nutr. Food Res. 51 (1) (Jan. 2007) 107–115.
[49] C. Desmarchelier, P. Borel, Overview of carotenoid bioavailability determinants: from dietary factors to host genetic variations, Trends Food Sci. Technol. 69 (Nov. 2017) 270–280.
[50] T. Bohn, et al., 'Mind the gap—deficits in our knowledge of aspects impacting the bioavailability of phytochemicals and their metabolites—a position paper focusing on carotenoids and polyphenols', Mol. Nutr. Food Res. 59 (7) (Jul. 2015) 1307–1323.
[51] J.M. Carbonell-Capella, M. Buniowska, F.J. Barba, M.J. Esteve, A. Frígola, Analytical methods for determining bioavailability and bioaccessibility of bioactive compounds from fruits and vegetables: a review, Compr. Rev. Food Sci. Food Saf. 13 (2) (Mar. 2014) 155–171.
[52] A. Ranga Rao, V. Baskaran, R. Sarada, G.A. Ravishankar, 'In vivo bioavailability and antioxidant activity of carotenoids from microalgal biomass — a repeated dose study', Food Res. Int. 54 (1) (Nov. 2013) 711–717.
[53] J.-P. Yuan, J. Peng, K. Yin, J.-H. Wang, Potential health-promoting effects of astaxanthin: a high-value carotenoid mostly from microalgae, Mol. Nutr. Food Res. 55 (1) (Jan. 2011) 150–165.
[54] A. Ranga Rao, R.L. Raghunath Reddy, V. Baskaran, R. Sarada, G.A. Ravishankar, Characterization of microalgal carotenoids by mass spectrometry and their bioavailability and antioxidant properties elucidated in rat model, J. Agric. Food Chem. 58 (15) (Aug. 2010) 8553–8559.
[55] E. Reboul, Absorption of vitamin A and carotenoids by the enterocyte: focus on transport proteins, Nutrients 5 (9) (Sep. 2013) 3563–3581.
[56] A. Dembinska-Kiec, 'Carotenoids: risk or benefit for health', *Carotenoids Diet*, Lipids 1740 (2) (May 2005) 93–94.
[57] N. Shahzad, et al., Phytosterols as a natural anticancer agent: current status and future perspective, Biomed. Pharmacother. 88 (Apr. 2017) 786–794.
[58] R.E. Ostlund, et al., Gastrointestinal absorption and plasma kinetics of soy delta5-phytosterols and phytostanols in humans, Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab. 282 (4) (Apr. 2002) E911–E916.
[59] D. Kritchevsky, S.C. Chen, 'Phytosterols—health benefits and potential concerns: a review', Nutr. Res. 25 (5) (May 2005) 413–428.
[60] H. Gylling, et al., Plant sterols and plant stanols in the management of dyslipidaemia and prevention of cardiovascular disease, Atherosclerosis 232 (2) (Feb. 2014) 346–360.
[61] T. Sudhop, D. Lütjohann, K. von Bergmann, Sterol transporters: targets of natural sterols and new lipid lowering drugs, Pharmacol. Ther. 105 (3) (Mar. 2005) 333–341.
[62] T. Sudhop, et al., Comparison of the hepatic clearances of campesterol, sitosterol, and cholesterol in healthy subjects suggests that efflux transporters controlling intestinal sterol absorption also regulate biliary secretion, Gut 51 (6) (Dec. 2002) 860–863.
[63] C. Guruvayoorappan, G. Kuttan, β-Carotene inhibits tumor-specific angiogenesis by altering the cytokine profile and inhibits the nuclear translocation of transcription factors in B16F-10 melanoma cells, Integr. Cancer Ther. 6 (3) (Sep. 2007) 258–270.
[64] B. Kulczyński, A. Gramza-Michałowska, J. Kobus-Cisowska, D. Kmiecik, 'The role of carotenoids in the prevention and treatment of cardiovascular disease – current state of knowledge', J. Funct. Foods 38 (Nov. 2017) 45–65.
[65] G. Hussein, et al., Antihypertensive and neuroprotective effects of astaxanthin in experimental animals, Biol. Pharm. Bull. 28 (1) (Jan. 2005) 47–52.
[66] H.G. Preuss, B. Echard, E. Yamashita, N.V. Perricone, High dose astaxanthin lowers blood pressure and increases insulin sensitivity in rats: are these effects interdependent? Int. J. Med. Sci. 8 (2) (Feb. 2011) 126–138.
[67] K. Uchiyama, Y. Naito, G. Hasegawa, N. Nakamura, J. Takahashi, T. Yoshikawa, Astaxanthin protects beta-cells against glucose toxicity in diabetic db/db mice, Redox Rep. 7 (5) (2002) 290–293.
[68] S. Bhuvaneswari, B. Yogalakshmi, S. Sreeja, C.V. Anuradha, Astaxanthin reduces hepatic endoplasmic reticulum stress and nuclear factor-κB-mediated inflammation in high fructose and high fat diet-fed mice, Cell Stress Chaperones 19 (2) (Mar. 2014) 183–191.
[69] S. Nishikawa, M. Hosokawa, K. Miyashita, Fucoxanthin promotes translocation and induction of glucose transporter 4 in skeletal muscles of diabetic/obese KK-A(y) mice, Phytomed. 19 (5) (Mar. 2012) 389–394.
[70] M.A. Gammone, N. D'Orazio, Anti-obesity activity of the marine carotenoid fucoxanthin, Mar. Drugs 13 (4) (Apr. 2015) 2196–2214.
[71] F. Beppu, M. Hosokawa, M.-J. Yim, T. Shinoda, K. Miyashita, Down-regulation of hepatic stearoyl-CoA desaturase-1 expression by fucoxanthin via leptin signaling in diabetic/obese KK-A(y) mice, Lipids 48 (5) (May 2013) 449–455.
[72] K. Kavitha, J. Kowshik, T.K.K. Kishore, A.B. Baba, S. Nagini, Astaxanthin inhibits NF-κB and Wnt/β-catenin signaling pathways via inactivation of Erk/MAPK and PI3K/Akt to induce intrinsic apoptosis in a hamster model of oral cancer, Biochim. Biophys. Acta 1830 (10) (Oct. 2013) 4433–4444.
[73] J. Kowshik, A.B. Baba, H. Giri, G. Deepak Reddy, M. Dixit, S. Nagini, Astaxanthin inhibits JAK/STAT-3 signaling to abrogate cell proliferation, invasion and angiogenesis in a hamster model of oral cancer, PLoS One 9 (10) (2014) e109114.
[74] L. Zhang, H. Wang, Multiple mechanisms of anti-cancer effects exerted by astaxanthin, Mar. Drugs 13 (7) (Jul. 2015) 4310–4330.
[75] K.-N. Kim, et al., Fucoxanthin inhibits the inflammatory response by suppressing the activation of NF-κB and MAPKs in lipopolysaccharide-induced RAW 264.7 macrophages, Eur. J. Pharmacol. 649 (1–3) (Dec. 2010) 369–375.
[76] E. Kotake-Nara, M. Kushiro, H. Zhang, T. Sugawara, K. Miyashita, A. Nagao, Carotenoids affect proliferation of human prostate cancer cells, J. Nutr. 131 (12) (Dec. 2001) 3303–3306.
[77] E. Kotake-Nara, M. Terasaki, A. Nagao, Characterization of apoptosis induced by fucoxanthin in human promyelocytic leukemia cells, Biosci. Biotechnol. Biochem. 69 (1) (Jan. 2005) 224–227.
[78] Y. Satomi, Antitumor and cancer-preventative function of fucoxanthin: a marine carotenoid, Anticancer Res. 37 (4) (Apr. 2017) 1557–1562.
[79] T. Rokkaku, et al., Anticancer effects of marine carotenoids, fucoxanthin and its deacetylated product, fucoxanthinol, on osteosarcoma, Int. J. Oncol. 43 (4) (Oct. 2013) 1176–1186.
[80] T. Sugawara, K. Matsubara, R. Akagi, M. Mori, T. Hirata, Antiangiogenic activity of brown algae fucoxanthin and its deacetylated product, fucoxanthinol, J. Agric. Food Chem. 54 (26) (Dec. 2006) 9805–9810.
[81] P. Ganesan, K. Matsubara, T. Sugawara, T. Hirata, Marine algal carotenoids inhibit angiogenesis by down-regulating FGF-2-mediated intracellular signals in vascular endothelial cells, Mol. Cell. Biochem. 380 (1–2) (Aug. 2013) 1–9.
[82] M.A. Gammone, G. Riccioni, N. D'Orazio, Marine carotenoids against oxidative stress: effects on human health, Mar. Drugs 13 (10) (Oct. 2015) 6226–6246.
[83] L. Speranza, et al., Astaxanthin treatment reduced oxidative induced pro-inflammatory cytokines secretion in U937: SHP-1 as a novel biological target, Mar. Drugs 10 (4) (Apr. 2012) 890–899.
[84] M.M. Al-Amin, et al., The antioxidant effect of astaxanthin is higher in young mice than aged: a region specific study on brain, Metab. Brain Dis. 30 (5) (Oct. 2015) 1237–1246.
[85] J.-Y. Wang, et al., Astaxanthin protects steroidogenesis from hydrogen peroxide-induced oxidative stress in mouse Leydig cells, Mar. Drugs 13 (3) (Mar. 2015) 1375–1388.
[86] A.W. Ha, S.J. Na, W.K. Kim, Antioxidant effects of fucoxanthin rich powder in rats fed with high fat diet, Nutr. Res. Pract. 7 (6) (Dec. 2013) 475–480.
[87] C.-L. Liu, Y.-T. Chiu, M.-L. Hu, Fucoxanthin enhances HO-1 and NQO1 expression in murine hepatic BNL CL.2 cells through activation of the Nrf2/ARE system partially by its pro-oxidant activity, J. Agric. Food Chem. 59 (20) (Oct. 2011) 11344–11351.
[88] H. Gylling, P. Simonen, H. Gylling, P. Simonen, Phytosterols, Phytostanols, and Lipoprotein Metabolism, Nutr. 7 (9) (Sep. 2015) 7965–7977.
[89] M. Luz Fernandez, S. Vega-López, Efficacy and safety of sitosterol in the management of blood cholesterol levels, Cardiovasc. Drug Rev. 23 (1) (Mar. 2005) 57–70.
[90] X. Luo, P. Su, W. Zhang, X. Luo, P. Su, W. Zhang, Advances in microalgae-derived phytosterols for functional food and pharmaceutical applications, Mar. Drugs 13 (7) (Jul. 2015) 4231–4254.
[91] J. Chen, R. Jiao, Y. Jiang, Y. Bi, Z.-Y. Chen, Algal sterols are as effective as β-sitosterol in reducing plasma cholesterol concentration, J. Agric. Food Chem. 62 (3) (Jan. 2014) 675–681.
[92] S.D. Lee, P. Tontonoz, Liver X receptors at the intersection of lipid metabolism and atherogenesis, Atherosclerosis 242 (1) (Sep. 2015) 29–36.
[93] R. Komati, et al., Ligands of therapeutic utility for the liver X receptors, Molecules 22 (1) (Jan. 2017) 88.
[94] A.B. Awad, C.S. Fink, Phytosterols as anticancer dietary components: evidence and mechanism of action, J. Nutr. 130 (9) (Sep. 2000) 2127–2130.
[95] I. Ikeda, et al., Campest-5-en-3-one, an oxidized derivative of campesterol, activates PPARα, promotes energy consumption and reduces visceral fat deposition in rats, Biochim. Biophys. Acta BBA - Gen. Subj. 1760 (5) (May 2006) 800–807.
[96] M.G. Ward, G. Li, V.C. Barbosa-Lorenzi, M. Hao, Stigmasterol prevents glucolipotoxicity induced defects in glucose-stimulated insulin secretion, Sci. Rep. 7 (Aug) (2017).
[97] S. Feng, et al., Intake of stigmasterol and β-sitosterol alters lipid metabolism and alleviates NAFLD in mice fed a high-fat western-style diet, Biochim. Biophys. Acta Mol. Cell Biol. Lipids 1863 (10) (Oct. 2018) 1274–1284.
[98] M. Caroprese, M. Albenzio, M.G. Ciliberti, M. Francavilla, A. Sevi, A mixture of phytosterols from Dunaliella tertiolecta affects proliferation of peripheral blood mononuclear cells and cytokine production in sheep, Vet. Immunol. Immunopathol. 150 (1) (Nov. 2012) 27–35.
[99] M. Valerio, A.B. Awad, β-Sitosterol down-regulates some pro-inflammatory signal transduction pathways by increasing the activity of tyrosine phosphatase SHP-1 in J774A.1 murine macrophages, Int. Immunopharmacol. 11 (8) (Aug. 2011) 1012–1017.
[100] O. Gabay, et al., Stigmasterol: a phytosterol with potential anti-osteoarthritic properties, Osteoarthr. Cartil. 18 (1) (Jan. 2010) 106–116.
[101] A.O. Antwi, D.D. Obiri, N. Osafo, A.D. Forkuo, L.B. Essel, Stigmasterol inhibits lipopolysaccharide-induced innate immune responses in murine models, Int. Immunopharmacol. 53 (Dec. 2017) 105–113.
[102] Y.-S. Kim, X.-F. Li, K.-H. Kang, B. Ryu, S.K. Kim, Stigmasterol isolated from marine microalgae Navicula incerta induces apoptosis in human hepatoma HepG2 cells, BMB Rep. 47 (8) (Aug. 2014) 433–438.
[103] C. Park, et al., β-Sitosterol induces anti-proliferation and apoptosis in human leukemic U937 cells through activation of caspase-3 and induction of Bax/Bcl-2 ratio, Biol. Pharm. Bull. 30 (7) (2007) 1317–1323.
[104] S.S. Vundru, R.K. Kale, R.P. Singh, β-sitosterol induces G1 arrest and causes depolarization of mitochondrial membrane potential in breast carcinoma MDA-MB-231 cells, BMC Complement Altern. Med. 13 (1) (Oct. 2013) 280.

[105] A.B. Awad, M. Chinnam, C.S. Fink, P.G. Bradford, β-Sitosterol activates Fas signaling in human breast cancer cells, Phytomedicine 14 (11) (Nov. 2007) 747–754.
[106] M. Vivancos, J.J. Moreno, β-Sitosterol modulates antioxidant enzyme response in RAW 264.7 macrophages, Free Radic. Biol. Med. 39 (1) (Jul. 2005) 91–97.
[107] K. Hąc-Wydro, P. Wydro, A. Jagoda, J. Kapusta, The study on the interaction between phytosterols and phospholipids in model membranes, Chem. Phys. Lipids 150 (1) (Nov. 2007) 22–34.
[108] V.R. Ramprasath, A.B. Awad, Role of phytosterols in cancer prevention and treatment, J. AOAC Int. 98 (3) (Jun. 2015) 735–738.
[109] A.B. Awad, S.L. Barta, C.S. Fink, P.G. Bradford, β-Sitosterol enhances tamoxifen effectiveness on breast cancer cells by affecting ceramide metabolism, Mol. Nutr. Food Res. 52 (4) (Apr. 2008) 419–426.
[110] S. Takaichi, Carotenoids in algae: distributions, biosyntheses and functions, Mar. Drugs 9 (6) (Jun. 2011) 1101–1118.
[111] E. Kotake-Nara, A. Nagao, Absorption and metabolism of xanthophylls, Mar. Drugs 9 (6) (Jun. 2011) 1024–1037.
[112] L. Calpe-Berdiel, J.C. Escolà-Gil, F. Blanco-Vaca, New insights into the molecular actions of plant sterols and stanols in cholesterol metabolism, Atherosclerosis 203 (1) (Mar. 2009) 18–31.

2. Publications de thèse

Manon Le Goff, Dominique Lagadic-Gossmann, Remi Latour, Normand Podechard, Nathalie Grova, Fabienne Gauffre, Soizic Chevance, Agnes Burel, Brice Appenzeller, Lionel Ulmann, Odile Sergent, Eric Le Ferrec. PAHs increase the production of extracellular vesicles both *in vitro* in endothelial cells and *in vivo* in urines from rats. Environmental Pollution. 2019 Sep, 255: 113171. doi : 10.1016/j.envpol.2019.113171.

Manon Le Goff, Antoine Delbrut, Rémi Pradelles, Agnès Burel, Fabienne Gauffre, Benoît Schoefs, Odile Sergent, Dominique Lagadic-Gossmann, Eric Le Ferrec and Lionel Ulmann. Protective action of *Ostreococcus tauri* and *Phaeodactylum tricornutum* extracts on benzo[a]pyrene-induced cytotoxicity in endothelial cells. Marine Drugs. 2019 Dec, 18, 3. doi : 10.3390/md18010003.

Manon Le Goff, Eric Le Ferrec, Claire Mayer, Virginie Mimouni, Dominique Lagadic-Gossmann, Benoît Schoefs, Lionel Ulmann. Microalgal carotenoids and phytosterols regulate biochemical mechanisms involved in human helth and disease prevention. Biochimie. 2019 Sep, 167 : 106-119. doi : 10.1016/j.biochi.2019.09.012.

3. Communications

Congrès

- **M. Le Goff**, R. Latour, M. Ferrier, N. Podechard, F. Gauffre, S. Chevance, A. Burel, D. Lagadic-Gossmann, O. Sergent, E. Le Ferrec. "Influence des hydrocarbures aromatiques polycycliques sur la production de vésicules extracellulaires par les cellules endothéliales", Journées du Cancéropôle Grand Ouest, 2-3 Juillet 2018, Vannes (en français)

- **M. Le Goff**, A. Delbrut, R. Pradelles, O. Sergent, D. Lagadic-Gossmann, E. Le Ferrec, L. Ulmann. "Influence of microalgae extracts on the toxicity of a carcinogenic polycyclic aromatic hydrocarbon, benzo(a)pyrene, in endothelial cells, International Conference on Cancer Research, 10-11 Juin 2019, E-conférence (en anglais)

Présentations orales

- **M. Le Goff**, R. Latour, M. Ferrier, N. Podechard, F. Gauffre, S. Chevance, A. Burel, D. Lagadic-Gossmann, O. Sergent, L. Ulmann, E. Le Ferrec. "PAHs trigger active EVs production by endothelial cells", Réunions réseau GO-EVs, 19 Octobre 2018, Rennes (en français)

- **M. Le Goff**, R. Latour, M. Ferrier, N. Podechard, F. Gauffre, S. Chevance, A. Burel, N. Grova, D. Lagadic-Gossmann, O. Sergent, E. Le Ferrec. "PAHs trigger production of active extracellular vesicles by endothelial cells", Journée Recherche du Campus Santé de Villejean, 16 Janvier 2019, Rennes (en français)

Présentations flash 180s

- **M. Le Goff**, R. Latour, M. Ferrier, N. Podechard, F. Gauffre, S. Chevance, A. Burel, V. Usache, R. Pradelles, D. Lagadic-Gossmann, O. Sergent, E. Le Ferrec, L. Ulmann. "Comment identifier et prévenir des effets nocifs des hydrocarbures aromatiques polycycliques, contaminants de l'environnement", Journées EDSML, 28-1 Février-Mars 2019, La Turballe (en français)

Affiches

- C. Mayer, B. Huang, **M. Le Goff**, M. Come, G. Chini Zittelli, C. Faraloni, V. Blanckaert, K. Ouguerram, H. Nazih, B. Schoefs, B. Chénais, V. Mimouni, L. Ulmann. "Efficiency of the marine diatom *Phaeodactylum tricornutum* in the prevention of metabolic syndrome installation: restoration of EPA levels in high-fat fed rat plasma and red blood cell lipids", Congress of The International Society for Applied Phycology, 18-23 Juin 2017, Nantes

- E. Le Ferrec, **M. Le Goff**, N. van Metteren, R. Latour, N. Podechard, M. Ferrier, M. Chevanne, F. Descaves, S. Chevance, F. Gauffre, A. Burel, D. Lagadic-Gossmann, O. Sergent. "Les vésicules extracellulaires, nouveaux biomarqueurs précoces d'un excès de risque de cancer du foie, suite à une exposition à des polluants de l'environnement", 1er Symposium Polluants de l'environnement et Cancer, 28 Mars 2017, EHESP Rennes

- E. Le Ferrec, **M. Le Goff**, N. van Metteren, R. Latour, N. Podechard, M. Ferrier, M. Chevanne, F. Descaves, S. Chevance, F. Gauffre, A. Burel, D. Lagadic-Gossmann, O. Sergent. " Les vésicules extracellulaires, nouveaux biomarqueurs précoces d'un excès de risque de cancer du foie, suite à une exposition à des polluants de l'environnement", Journées du Cancéropôle Grand Ouest, 29-30 Juin 2017, Vannes

- **M. Le Goff**, R. Latour, M. Ferrier, N. Podechard, F. Gauffre, S. Chevance, A. Burel, D. Lagadic-Gossmann, O. Sergent, E. Le Ferrec. "Influence of benzo[a]pyrene on the production of extracellular vesicles by endothelial cells ", Congrès FSEV, 6-7 Novembre 2017, Paris

- **M. Le Goff**, R. Latour, M. Ferrier, N. Podechard, F. Gauffre, S. Chevance, A. Burel, D. Lagadic-Gossmann, O. Sergent, E. Le Ferrec. "Influence of benzo[a]pyrene on the production of extracellular vesicles by endothelial cells", Journée des Jeunes Chercheurs de l'IRSET, 11 Décembre 2017, Rennes (avec présentation flash)

- **M. Le Goff**, R. Latour, M. Ferrier, N. Podechard, F. Gauffre, S. Chevance, A. Burel, V. Usache, R. Pradelles, D. Lagadic-Gossmann, O. Sergent, E. Le Ferrec, L. Ulmann. "Comment identifier et prévenir des effets nocifs des hydrocarbures aromatiques

polycycliques, contaminants de l'environnement", Forum des Jeunes Chercheurs, 30 Novembre 2018, Le Mans (avec présentation flash)

- **M. Le Goff**, R. Latour, M. Ferrier, N. Podechard, F. Gauffre, S. Chevance, A. Burel, D. Lagadic-Gossmann, O. Sergent, E. Le Ferrec. "Influence of benzo(a)pyrene on the production of extracellular vesicles by endothelial cells", Journée Recherche du Campus Santé de Villejean, 17 Janvier 2018, Rennes (avec présentation flash)

- **M. Le Goff**, D. Lagadic-Gossmann, R. Latour, N. Podechard, N. Grova, F. Gauffre, S. Chevance, A. Burel, B. Appenzeller, L. Ulmann, O. Sergent, E. Le Ferrec. "PAH increase the production of extracellular vesicles both *in vitro* in endothelial cells and *in vivo* in urines from rats", Congrès FSEV, 14-15 Octobre 2019, Nantes.

Titre : **Etude des vésicules extracellulaires endothéliales et autres marqueurs de toxicité du Benzo[a]pyrène : influence d'extraits de microalgues d'origine marine**

Mots clés : Hydrocarbures aromatiques polycycliques; Benzo[a]pyrène; Vésicules extracellulaires; Extraits de micro-algues; Récepteur aux hydrocarbures aromatiques; Biomarqueurs; Protection cellulaire; Cellules endothéliales

Résumé : Les hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP), e.g. benzo[a]pyrène (B[a]P), sont des polluants environnementaux associés aux cancers et aux maladies cardiovasculaires. Les objectifs de cette thèse ont été : (1) d'identifier des biomarqueurs d'un risque de développement de ces maladies dues aux HAP et (2) de tester des produits naturels en prévention, sur les cellules endothéliales HMEC-1. Dans ce contexte, les vésicules extracellulaires (VE): exosomes (EXO) et microvésicules (MV), accessibles dans les fluides biologiques, semblent être des biomarqueurs prometteurs non invasifs. La composition et la production des VE dépendent du type et de l'état physiopathologique de la cellule. Nos résultats démontrent que certains HAP stimulent *in vitro* et *in vivo* la production de VE et modifient leur contenu. Nous avons montré que la surproduction d'EXO dépend du récepteur aux hydrocarbures aromatiques (AhR) contrairement aux MV. Nous avons étudié l'influence de deux extraits de microalgues, *O. tauri* et *P. tricornutum*, riches en oméga-3 et en pigments sur la toxicité du B[a]P. Nous avons observé que l'extrait d'*O. tauri* peut influencer la toxicité du B[a]P. En effet, l'apoptose et la production de VE ont diminué probablement par réduction de l'expression du CYP1A1, une enzyme de bioactivation du B[a]P. En outre, l'expression des cytokines inflammatoires induite par le B[a]P a été réduite. L'extrait de *P. tricornutum* n'a inhibé que l'expression de la cytokine IL-8 induite par le B[a]P. Ces travaux de thèse suggèrent une application potentielle des VE comme biomarqueurs de toxicité des HAP et la possible utilisation d'*O. tauri* dans la prévention de pathologies médiées par les HAP.

Title : **Study of endothelial extracellular vesicles and other toxicity markers of Benzo[a]pyrene: influence of marine microalgal extracts**

Keywords : Polycyclic Aromatic Hydrocarbons; Benzo[a]pyrene; Extracellular vesicles, Microalgae extracts, Aromatic hydrocarbon receptor; Biomarkers; Cell protection; Endothelial cells

Abstract : Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs), such as benzo[a]pyrene (B[a]P), are environmental pollutants associated with cancers and cardiovascular diseases. The aims of the present thesis have been: (1) to identify biomarkers of a risk of developing these pathologies due to PAHs, and (2) to test the preventing effects of natural products on HMEC-1 endothelial cells. In this context, extracellular vesicles (EV): exosomes (EXO) and microvesicles (MV), accessible in biological fluids, seem to be promising non-invasive biomarkers. EV composition and production depend on the type and physiopathological state of the cell. Our results demonstrate that some PAHs stimulate *in vitro* and *in vivo* EV production and modify their content. We have further shown that the overproduction of EXO depends on the aromatic hydrocarbon receptor (AhR) unlike the MV.
We have studied the influence of two extracts of microalgae, *O. tauri* and *P. tricornutum*, rich in omega-3 and pigments, on the toxicity of B[a]P. We have observed that *O. tauri* extract can influence the toxicity of B[a]P. Indeed, apoptosis and EV production were decreased likely through reduction of the expression of CYP1A1, a B[a]P bioactivation enzyme. In addition, the B[a]P-induced expression of the inflammatory cytokines IL-8 and IL1-β was reduced. The *P. tricornutum* extract only inhibited the expression of the B[a]P-induced cytokine IL-8 expression. Overall, this thesis suggests a potential application of EVs as biomarkers of PAH toxicity, and the possible use of *O. tauri* extract in the prevention of PAHs-mediated pathologies.