



HAL
open science

Les vésicules extracellulaires dans l'hépatotoxicité des hydrocarbures aromatiques polycycliques : biomarqueurs et/ou vecteurs ?

Nettie van Meteren

► To cite this version:

Nettie van Meteren. Les vésicules extracellulaires dans l'hépatotoxicité des hydrocarbures aromatiques polycycliques : biomarqueurs et/ou vecteurs ?. Toxicologie. Université de Rennes, 2020. Français. NNT : 2020REN1B018 . tel-03159590

HAL Id: tel-03159590

<https://theses.hal.science/tel-03159590v1>

Submitted on 4 Mar 2021

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.

THESE DE DOCTORAT DE

L'UNIVERSITE DE RENNES 1

ECOLE DOCTORALE N° 605
Biologie Santé
Spécialité : Toxicologie

Par

Nettie VAN METEREN

Les vésicules extracellulaires dans l'hépatotoxicité des hydrocarbures aromatiques polycycliques : biomarqueurs et/ou vecteurs?

Thèse présentée et soutenue à Rennes, le 30 septembre 2020

Unité de recherche : UMR INSERM U1085 / IRSET Institut de Recherche en Santé, Environnement et Travail

Rapporteurs avant soutenance :

Xavier COUMOUL Professeur, Université de Paris, UMR INSERM 1124, Paris
Guillaume VAN NIEL Directeur de recherche CNRS, UMR INSERM 1266, Paris

Composition du Jury :

Président :

Olivier LOREAL Directeur de recherche INSERM, UMR INSERM 1241, Rennes

Examineurs :

Xavier COUMOUL Professeur, Université de Paris, UMR INSERM 1124, Paris

Guillaume VAN NIEL Directeur de recherche CNRS, UMR INSERM 1266, Paris

Céline ELIE-CAILLE Maître de conférences, Université de Franche-Comté, UMR CNRS 6174, Besançon

Carmen MARTINEZ Directrice de recherche CNRS, UMR INSERM 1063, Angers

Dir. de thèse : Odile SERGENT

Professeur, Université de Rennes 1, INSERM 1085, Rennes

Co-dir. de thèse : Éric LE FERREC

Maître de conférences, Université de Rennes 1, INSERM 1085, Rennes

Remerciements

Je tiens tout d'abord à remercier l'ensemble des membres de mon jury d'avoir accepté d'évaluer mon travail, Dr Guillaume van Niel et Pr Xavier Coumoul en tant que rapporteurs ainsi que Dr Céline Elie-Caille, Dr Carmen Martinez et Dr Oliver Loréal en tant qu'examineurs de cette thèse.

Je remercie aussi l'Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail (Anses) qui a en partie financé ces travaux de recherche.

Je remercie tout particulièrement ma directrice de thèse, Pr Odile Sergent, sans qui ce travail n'aurait pas pu aboutir. Je pense avoir eu beaucoup de chance de travailler et d'apprendre à vos côtés. Votre enthousiasme pour la recherche et l'énergie que vous y consacrez, sont impressionnants et inspirants. Nous avons réussi à créer toutes les deux une bonne dynamique de travail. J'ai beaucoup appris durant ces trois années, grâce à vous ; merci d'avoir partagé avec moi une partie de vos connaissances et de vos méthodes extrêmement rigoureuses, merci de m'avoir fait confiance, d'avoir cru en mes capacités à réussir, d'avoir su me motiver et de m'avoir guidée scientifiquement. Vous m'avez permis de développer des compétences qui me seront extrêmement utiles pour mon avenir professionnel. Je vous remercie aussi de m'avoir toujours soutenue et laissée prendre du temps pour mes projets de formation, mais aussi de m'avoir donné l'opportunité de faire de l'enseignement. Enfin, je voudrais vous dire merci d'avoir été une personne humaine et particulièrement dans les moments difficiles, merci d'avoir toujours pris le soin de vérifier comment je me sentais, de discuter avec moi quand ça n'allait pas. Votre rencontre fut aussi belle humainement que professionnellement.

Je remercie également Dr Eric Le Ferrec, pour ses connaissances et son aide à la préparation du concours de l'école doctorale comme pour les discussions au cours des trois années de thèse.

J'adresse aussi mes plus vifs remerciements au Dr Dominique Lagadic-Gossmann, directrice de mon équipe, pour m'avoir accueillie dans l'équipe lors de mon stage de Master 2 puis préparée au concours et m'avoir toujours soutenue au cours de ces trois ans de thèse, y compris dans les moments les plus difficiles. Je vous remercie de votre bienveillance, votre gentillesse et votre écoute à mon égard mais aussi de toute l'aide que vous m'avez apportée.

Un très grand merci à Martine Chevanne, technicienne formidable qui formait, avant de partir à la retraite, un binôme incroyable et efficace avec Odile. Merci de m'avoir intégrée dans votre petite équipe. Je te remercie de m'avoir tout appris. En effet, avant de venir au laboratoire, je ne maîtrisais pas beaucoup de techniques. Merci de m'avoir transmis beaucoup de tes techniques expérimentales ainsi que ta manière de gérer un laboratoire. Tes exigences dans l'organisation, la

classification, le rangement et le nettoyage sont, à mon sens, essentielles au bon fonctionnement d'un laboratoire. Merci de m'avoir guidée.

Un grand merci également à Isabelle Gallais pour sa précieuse aide technique, ses petits conseils et pour le partage de son expérience en recherche. Je te remercie de ton écoute, de m'avoir rassurée quand mes westerns n'étaient pas forcément réussis. Merci de ta gentillesse et ta bonne humeur. Merci aussi pour toutes ces discussions à la paillasse, dans le couloir, concernant ou non le travail, qui rendaient l'atmosphère de travail beaucoup plus agréable. Je tiens aussi à te remercier d'avoir participé aux manips de révisions pour nos deux articles, ton aide a été bénéfique.

Mes remerciements vont également au Dr Normand Podechard, toujours disponible pour proposer son aide et des conseils, pour sa bonne humeur et sa gentillesse et avec qui j'ai pu effectuer deux missions d'enseignement en biologie cellulaire. Merci de m'avoir guidée puis laissée en autonomie avec tes étudiants et de m'avoir permis de vivre une belle expérience d'enseignement. Je te remercie aussi pour l'aide lors de la révision de mon second article.

Je remercie vivement l'ensemble des collaborateurs sur nos projets de recherches :

- *Fabienne Gauffre et Soizic Chevance, de l'Institut des Sciences Chimiques de Rennes qui nous ont permis d'utiliser leur NTA, outil essentiel dans l'obtention de nombre de nos résultats. Fabienne, je te remercie particulièrement de m'avoir expliqué le fonctionnement de l'appareil mais aussi de ta bienveillance et de ta gentillesse lors de mes passages à l'ISCR. Je souhaite également remercier Clément, pour les réservations et pour nos discussions fort intéressantes ;*
- *Simon Bucher et Bernard Fromenty de l'institut NUMECAN, Nathalie Grova et Brice Appenzeller. du Luxembourg Institute of Health de nous avoir fourni de précieux échantillons de plasma et de sérum de rongeurs exposés aux HAP, qui nous ont permis de compléter la révision de notre premier papier publié dans Toxicological Sciences ;*
- *Agnès Burel, de la plateforme MRic à Rennes, pour l'ensemble de son travail indispensable en microscopie électronique qui nous a permis d'obtenir de belles images. Je te remercie de m'avoir accueillie chaleureusement dans ton laboratoire et de m'avoir appris à préparer des grilles de vésicules. J'ai passé de bons moments de travail à tes côtés et je retiens nos agréables discussions ;*
- *Aurélien Dupont, de la plateforme MRic à Rennes, pour la préparation des échantillons et l'obtention des images des vésicules en Cryo-MET ;*
- *Ludivine Rault, de la plateforme THEMIS à Rennes, d'avoir accepté pour la première fois d'utiliser son microscope pour la mesure du fer dans des échantillons biologiques.*

Je tiens également à remercier Soizig le Lay, de l'institut SOPAM à Angers, et de nouveau Fabienne Gauffre, d'avoir accepté de faire partie de mon comité de thèse et d'avoir suivi l'évolution

de mon travail. Je vous remercie aussi de vos conseils et des discussions qui ont pu faire avancer mon travail.

Je remercie également le reste des membres de l'équipe 3 « Stress, membrane et signalisation », Lydie Sparfel, Corinne Martin-Chouly, pour votre aide, vos questions et vos conseils ; Imran, for also being so kind, supportive, patient and always keeping a smile on your face even when work was hard and you hadn't slept much ; Rima, pour ta gentillesse, je te souhaite de la réussite dans tes projets et du succès au cours de ta thèse ; Maëlle pour ta sympathie, travailler avec toi fut agréable ; Antoine, ta gentillesse et les conversations en pause à la « cafét' » ; Noémie, pour les belles décorations de Noël, pour toutes nos discussions au bureau et pour toujours avoir été partante pour faire une pause à la « cafét' » avec Hélène permettant de me changer les idées, lors de la fin de ma thèse pas toujours facile.

J'adresse de sincères remerciements à deux personnes sans qui le laboratoire ne fonctionnerait pas : à Brigitte, pour son travail et son aide précieuse, sa disponibilité et sa gentillesse au quotidien, ta retraite est bien méritée ; et à Maryline, pour son aide au quotidien.

Je remercie l'ensemble des collègues de l'IRSET avec qui j'ai eu le plaisir d'échanger, de partager des pauses-déjeuner et des gâteaux à la « cafét' » et à qui j'ai pu demander de l'aide technique, je pense particulièrement à Fred, Dominique et Claudie. Je remercie également les autres thésards de l'IRSET, pour certains devenus docteurs, Mélanie, Nessrine, Sophie, Ghania...

Merci à toutes les personnes qui ont partagé une partie de mon quotidien à l'IRSET et en dehors : Marie, Arnaud, Bassil, Hélène, Aurélien et Manon, merci à tous pour nos soirées passées ensemble. Arnaud, d'avoir « supporté » nos interminables conversations dans le bureau avec les filles et de ne jamais avoir été d'accord avec Marie et moi, même lorsque nous avons raison ! Je me souviendrai toujours de tous les moments où tu m'as embêtée, surtout toutce que tu m'as raconté en salle de culture... Merci d'avoir toujours été une aide quand je découvrais la recherche et les manip au labo. Bassil, pour ta bonne humeur, ta gentillesse, ton écoute et ton soutien, je te remercie d'avoir ouvert « le petit salon » dans ton bureau pour nous accueillir avec Hélène en pause. Merci de m'avoir laissée regarder ton téléphone et tes conversations WhatsApp et divertie avec toutes tes histoires. Aurélien, merci de me laisser t'embêter sans faire exprès et de nous supporter, avec Marie dans nos conversations extrêmement engagées, merci d'être souvent d'accord avec nous. Manon ma co-thésarde, d'avoir été présente au début de ma thèse, merci de toutes nos conversations dans le bureau, j'ai été contente de partager ces moments avec une compatriote du Nord Finistère.

A Marie et Hélène, merci de votre écoute, votre aide et votre soutien sans limite au quotidien. Merci d'avoir vécu cette thèse avec moi, ça aurait été beaucoup plus difficile d'y venir à bout sans

vous. Merci d'être des personnes extraordinaires ! Hélène, un énorme giga méga merci pour TOUT ! Merci d'avoir rejoint le bureau et d'avoir été mon binôme dans la vie au laboratoire. Je retiendrai nos instants chansons, décorations dans le bureau et nos discussions plus ou moins intenses et sérieuses. Merci d'avoir été toujours là quand j'avais besoin de parler, d'être motivée, d'être divertie, de me reposer. Je te remercie tellement de ta gentillesse et de ta patience, car il en fallait certains jours avec moi. J'ai toujours été admirative de ta ténacité, ta rigueur, ton dynamisme et ton professionnalisme dans le travail. Je te souhaite beaucoup beaucoup beaucoup de réussite dans tes projets, tu le mérites. Je n'ai pas de doute, ta thèse sera un succès et, si tu as besoin, je serai toujours là en soutien. Enfin, Marie, je ne saurai jamais assez te remercier d'avoir été toujours présente et investie dans ce travail avec moi, même après ton départ. D'abord, merci de m'avoir intégrée lors de mon arrivée en « bébé stagiaire » et d'avoir été à l'initiative de cette si bonne entente entre nous tous dans le bureau/bureau d'Hélène. Merci d'avoir créé (avec Arnaud) cette atmosphère chaleureuse, qui nous a donné envie de rester travailler. Merci d'être la preuve vivante que l'on peut survivre à une thèse. Merci maintenant de passer des heures au téléphone avec moi pour m'expliquer une 1 000^{ième} fois encore que tout se passera bien, ce qui m'a permis de survivre à cette dernière année de thèse. Merci de tout comprendre, de toujours trouver les meilleurs conseils et de savoir me remotiver ! Merci d'être devenue mon amie.

Je tiens aussi à remercier mes amis, Pauline, Antoine, Sophie et Marion, d'être formidables et d'avoir été toujours présents et compréhensifs quand j'étais de mauvaise humeur. Particulièrement, Pauline, ton retour à Rennes pendant ma thèse, bien que trop court, a été une bouffée d'air frais et ta présence dans le bâtiment d'à côté au travail était un très grand plus ! Je te remercie de tout le temps que l'on a passé ensemble, les après-midi à regarder la télé ou se balader, la motivation pour le sport, les soirées à chanter et à hacker le téléphone d'Antoine... Antoine, merci de nous supporter, nous, si méchantes avec Pauline (surtout Pauline), et toi si gentil et bienveillant, merci pour ta présence, de ton soutien et toutes tes histoires passionnantes et dignes de séries !

A Valentin, j'ai tellement de choses à te dire mais je pense que tu les as déjà entendues mille fois, alors je vais juste te remercier d'avoir été et d'être toujours mon pilier.

Enfin, à toute ma famille, Maman, Papa, Aafke, Tom, Na, Sophie, Maximilien, Cassie, Billie, Bobby..., je vous remercie de votre présence, votre soutien et votre amour.

Table des matières

Remerciements	4
Table des matières	8
Liste des abréviations	15
Liste des figures	19
Liste des tableaux	21
Avant-propos	22
PARTIE 1 : INTRODUCTION	25
I. Les hydrocarbures aromatiques polycycliques, contaminants de l'environnement et hépatotoxiques.....	27
A. Généralités	27
1. Propriétés physico-chimiques	27
2. Sources de production.....	29
3. Devenir et distribution dans l'environnement	30
4. Exposition humaine aux HAP	31
a. Exposition orale.....	31
b. Exposition respiratoire	31
i. Air ambiant.....	31
ii. Tabagisme	32
c. Exposition cutanée.....	32
d. de HAP mesurées chez l'Homme	33
5. Toxicocinétique des HAP.....	33
a. Absorption	34
b. Distribution	35
c. Métabolisme des HAP	35
i. Phase I de fonctionnalisation	35
ii. Phase II de conjugaison.....	37
iii. Phase III de transport.....	37
d. Excrétion	37
6. Effet toxiques des HAP	37
a. Toxicité aiguë.....	37
b. Toxicité chronique.....	38
B. Mécanismes d'action toxique des HAP	40
1. Activation du récepteur aux hydrocarbures aromatiques AhR	40
a. Le récepteur aux hydrocarbures aromatiques AhR	40
i. Ligands de l'AhR.....	40
ii. Structure de l'AhR.....	41

iii. Activation de l'AhR.....	42
b. Effets de l'activation de l'AhR par les HAP.....	43
i. Effets génomiques.....	43
ii. Effets non génomiques.....	45
2. Mécanismes AhR indépendants.....	46
a. Activation d'autres récepteurs aux xénobiotiques : les récepteurs PXR et CAR.....	46
b. Signalisation adrénérgique.....	48
c. Signalisation œstrogénique.....	49
3. Formation d'adduits à l'ADN par les métabolites réactifs des HAP.....	49
4. Inhibition de la communication intercellulaire par les jonctions gap.....	50
C. Hépatotoxicité des HAP.....	51
1. Implication des HAP dans les maladies du foie.....	51
a. NAFLD.....	51
b. Cancer du foie.....	52
i. Etudes chez l'Homme.....	52
ii. Etudes chez l'animal.....	53
2. Morts cellulaires induites par les HAP dans le foie.....	54
a. Les morts cellulaires induites par les HAP.....	54
i. L'apoptose.....	54
ii. La nécrose.....	55
b. Mécanismes d'induction de l'apoptose par les HAP.....	56
i. Le stress oxydant.....	57
ii. Activation de p53 et perturbation de la mitochondrie.....	62
iii. Remodelage de la membrane plasmique.....	64
iv. Perméabilisation de la membrane lysosomale.....	66
II. Les vésicules extracellulaires, acteurs de communication.....	68
A. Formation et libération des VE.....	68
1. Biogénèse des vésicules extracellulaires.....	69
a. Biogénèse des exosomes.....	69
i. Mécanismes ESCRT dépendants.....	69
ii. Mécanismes ESCRT indépendants.....	69
b. Biogénèse des microvésicules.....	71
2. Chargement des cargos des vésicules extracellulaires.....	72
3. Sécrétion des vésicules extracellulaires.....	73
a. Sécrétion des exosomes.....	73
i. Transport des MVB vers la membrane plasmique.....	73
ii. Fusion des MVB avec la membrane plasmique.....	73
b. Sécrétion des microvésicules.....	74
4. Stress cellulaires favorisant la libération de VE.....	74
a. Stress oxydant et libération de VE.....	74
b. Mort cellulaire et libération de VE.....	76
B. Caractéristiques biophysiques et biochimiques.....	79

1. Méthodes d'études des caractéristiques des VE	79
a. Méthodes d'isolement	79
<i>i. Séparation selon les propriétés physiques</i>	79
<i>ii. Séparation selon les propriétés chimiques</i>	83
<i>iii. Remarques de conclusion</i>	84
b. Méthodes de caractérisation	85
<i>i. Analyses physiques</i>	85
<i>ii. Analyses biochimiques</i>	89
2. Caractéristiques biophysiques	89
a. Morphologie	89
b. Diamètre	90
c. Densité	90
d. Fluidité	90
3. Caractéristiques biochimiques	91
a. Protéines	92
<i>i. EXO</i>	92
<i>ii. MV</i>	92
b. Acides nucléiques	93
c. Lipides	93
<i>i. EXO</i>	93
<i>ii. MV</i>	94
C. Implications dans la communication intercellulaire et inter-organe	95
1. Relations avec des cellules réceptrices	95
a. Fusion membranaire	95
b. Interaction ligand-récepteur	96
c. Internalisation	96
<i>i. Fixation des VE sur les cellules réceptrices</i>	96
<i>ii. Différentes voies d'internalisation des VE</i>	98
2. Devenir des vésicules internalisées dans les cellules réceptrices	99
3. Devenir des VE <i>in vivo</i>	100
4. Conséquences sur les cellules réceptrices	101
a. Stress oxydant	101
b. Mort cellulaire	103
<i>i. Cible cellulaire des VE</i>	103
<i>ii. Mécanismes impliqués dans la mort cellulaire induite par les VE</i>	105
III. Vésicules extracellulaires et toxicité hépatique liée aux contaminants de l'environnement	112
A. Le foie, source de vésicules extracellulaires	112
1. Architecture et composition cellulaire du foie	112
2. Sources cellulaires des VE	113
3. Caractéristiques des VE produites dans le foie	114

a. Types de VE produites	114
b. Caractéristiques biochimiques.....	115
i. Protéines.....	115
ii. Acides nucléiques	116
iii. Lipides	117
4. Rôles physiologiques des VE produites dans le foie	118
a. Prolifération des hépatocytes.....	118
b. Détoxification	118
c. Tolérance immunitaire du foie	118
d. Maintien de l'épithélium biliaire.....	119
B. Implication des VE dans les maladies du foie.....	120
1. Augmentation de la libération de VE en conditions pathologiques	120
2. Modification du contenu des VE en conditions pathologiques.....	122
a. Atteintes hépatiques aiguës	123
b. Maladies chroniques du foie.....	123
i. ALD : alcoholic liver disease	123
ii. NAFLD : non-alcoholic fatty liver disease.....	124
iii. Fibrose et cirrhose	125
iv. Hépatite virale.....	125
v. Cancer du foie.....	126
3. Mécanismes délétères	129
a. Mort cellulaire.....	130
b. Inflammation.....	131
i. Rôle des VE dans la cholestase.....	131
ii. Rôle des VE dans l'ALD.....	131
iii. Rôle des VE dans les NAFLD	133
iv. Rôle des VE dans les hépatites virales	133
v. Rôle des VE dans l'HCC	134
vi. Rôle des VE dans les dommages hépatiques aigus	134
c. Fibrose.....	135
i. VE et effet pro-fibrotique	135
ii. Mécanismes d'activation des cellules étoilées par les VE	136
d. Remodelage vasculaire et angiogenèse	138
e. Prolifération et migration cellulaire.....	139
i. Mécanismes de prolifération	140
ii. Mécanismes de migration	140
f. Modifications métaboliques.....	142
C. Vésicules extracellulaires et contaminants de l'environnement	145
1. Pollution atmosphérique	145
a. Particules de la pollution atmosphérique.....	145
i. Libération et modification du contenu des VE	145
ii. Effets des VE.....	146
b. Ozone.....	146

2. Fumée de cigarette	146
a. Libération et modification du contenu des VE.....	147
b. Effets des VE.....	148
i. Inflammation	148
ii. Cancérogenèse.....	149
iii. Coagulation.....	149
iv. Hypertension pulmonaire	149
v. Fibrose.....	149
3. Métaux	150
a. Arsenic	150
b. Manganèse.....	151
c. Mercure	151
4. Autres contaminants	152
IV. Contexte et objectifs	154
PARTIE 2 : RESULTATS	157
I. Article 1	159
A. Introduction.....	160
B. Stratégie expérimentale.....	160
C. Résultats.....	161
II. Article 2	197
A. Introduction.....	198
B. Stratégie expérimentale.....	198
C. Résultats.....	199
PARTIE 3 : DISCUSSION ET CONCLUSION.....	231
I. Les HAP induisent l'apoptose et la libération de VE.....	233
A. L'apoptose à l'origine de la libération de VE ?	233
1. Capacité de différents HAP à induire l'apoptose des hépatocytes	233
2. Capacité des différents HAP à induire la libération de VE	234
3. Rôle de l'activation des caspases dans la libération de VE?.....	235
a. Effet temps de traitement.....	235
b. Différence entre MV et EXO	236
B. Rôle des récepteurs aux xénobiotiques et du métabolisme	237
1. Impact des récepteurs nucléaires.....	237
a. Activation du récepteur AhR	237
b. Activation du récepteur CAR.....	238

2. Effets des récepteurs nucléaires	239
a. Métabolisme des HAP et stress oxydant	239
b. Métabolisme des lipides.....	239
i. Cholestérol.....	240
ii. Sphingosine-1-phosphate	240
3. Effet indépendants des récepteurs nucléaires ?	241
II. Le cholestérol, lipide essentiel dans la libération de VE et l'interaction avec la cellule réceptrice	241
A. Libération de VE par les hépatocytes producteurs	242
1. Diminution de la concentration en cholestérol par les cellules productrices suite à l'activation de l'AhR	242
a. Fluidification des membranes par les HAP	242
b. Altération des radeaux lipidiques.....	243
c. Rôles possibles des échangeurs NHE et du pH.....	244
2. Augmentation de la concentration du cholestérol des VE.....	246
3. Le changement du contenu protéique des VE comme reflet du rôle clé du cholestérol dans leur libération	247
B. Entrée des VE dans les hépatocytes récepteurs	248
1. Résistance à la dégradation.....	248
2. Interaction avec les cellules réceptrices.....	248
III. Altération des lysosomes et/ou de l'autophagie sur la libération et l'effet des VE-HAP	249
A. Balance entre la dégradation et la libération des EXO.....	249
1. Altération de la fonction lysosomale.....	249
2. Altération de l'autophagie	250
B. Effet sur les cellules réceptrices	251
IV. Causes et conséquences d'un changement de contenu des VE dans un contexte toxicologique	252
A. Eliminer les molécules délétères, mais aussi les propager	252
1. Facteurs pro-oxydants.....	253
2. Facteurs pro-apoptotiques.....	253
3. Les CYP	255
4. Les toxiques eux-mêmes.....	256
5. Les VE comme moyen de protection cellulaire face au stress	256
B. Effets délétères pour les cellules réceptrices	257
1. Mécanisme de transfert du chargement des VE	258
2. Effet des VE potentiellement cellule spécifique.....	258

3. Transport potentiel des VE jusqu'à la circulation générale et d'autres organes.....	259
Conclusion.....	261
BIBLIOGRAPHIE	263
ANNEXES..	301
Liste des formations	301
Liste des enseignements.....	302
Liste des communications	302
Liste des publications	304

Liste des abréviations

·OH	Radical hydroxyle
3-MC	3-methylcholanthrène
8-OH-DG	8-oxo-2'-désoxyguanosine
ADN	Acide désoxyribonucléique
ADNox	ADN oxydé
AFM	<i>Atomic force microscopy</i>
AH	<i>Alcoholic hepatitis</i>
AhR	<i>Arylhydrocarbon receptor</i>
ALD	<i>Alcoholic liver disease</i>
Alix	<i>Alg-2 interacting protein x</i>
ALT	Alanine aminotransférase
AMP	Adénosine monophosphate
ANSES	Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail
APAP	Paracétamol
ARF 6/1	<i>ADP-ribosylation factor 6/1</i>
ARN	Acide ribonucléique
ARNm	ARN messenger
ARNT	<i>AhR nuclear translocator</i>
ASC	<i>Apoptosis-associated speck-like protein containing a CARD</i>
ASGPR	<i>Asialoglycoprotein receptor</i>
ASH	<i>Alcoholic steatohepatitis</i>
AST	Aspartate aminotransférase
ATP	Adénosine-triphosphate
BaP	Benzo(a)pyrène
Bax	<i>Bcl-2-associated x</i>
BCL-2	<i>B-cell lymphoma</i>
BCRP	<i>Breast cancer resistance protein</i>
BDL	<i>Bile duct ligation</i>
BP	Benzo(a)pyrène
BPCO	Bronchopneumopathie chronique obstructive
BPDE	<i>7,8-diol-9,10-epoxyde BaP</i>
CAR	<i>Constitutive androstane receptor</i>
CCA	<i>Cholangiocarcinoma</i> = cholangiocarcinome
CCL 3/2	<i>Chemokine (C-C motif) ligand 3/2</i>
CCL3L3	<i>Chemokine (C-C motif) ligand 3 like 3</i>
CCN 1/2	<i>Cellular communication network factor 1</i>
CD 81/63/82/9	<i>Cluster of differentiation 81/93/82/9</i>
CES	Carboxylestérase
CIRC	Centre international de recherche sur le cancer
CITEPA	Centre interprofessionnel technique d'études de la pollution atmosphérique
CXCL	<i>Chemokine (C-X-C motif) ligand</i>
CXCR3	<i>C-X-C chemokine receptor type 3</i>
CYP	Cytochrome P450
Cyt c	Cytochrome C
DBA	Dibenzo(a,h)anthracène
DBahA	Dibenzo(a,h)anthracène
DILI	<i>Drug induced liver injury</i>
EFSA	<i>European food safety authority</i>

EGFR	<i>Epidermal growth factor receptor</i>
EndoG	Endonucléase G
ER α / β	<i>Estrogen receptor alpha / beta</i>
ERK	<i>Extracellular signal-regulated kinases</i>
ERN	Espèces réactives de l'azote
ERO	Espèces réactives de l'oxygène
ESCRT	<i>Endosomal sorting complexes required for transport</i>
EXO	Exosome
fer-BPM	Fer de bas poids moléculaire
GSH	Gluthation forme réduite
GSK-3	Glycogène synthase kinase 3
GSSG	Gluthation forme oxydée = <i>glutathione disulfure</i>
GST	Glutathion-S-transférases
GTP	Guanosine triphosphate
H ₂ O ₂	Peroxyde d'hydrogène
HAP	Hydrocarbure aromatique polycyclique
HBV	Virus de l'hépatite B
HCC	<i>Hepatocellular carcinoma</i> = carcinome hépatocellulaire
HSC	<i>Hepatic stellate cell</i>
HCV	Virus de l'hépatite C
HFD	<i>High fat diet</i>
HKII	<i>Hexokinase II</i>
HMGCoA réductase	Hydroxyméthylglutaryl-coA réductase
HRS	<i>Hepatocyte growth factor</i>
HSP90	<i>Heat shock protein 90</i>
IAP	<i>Inhibitor of apoptosis</i>
ICAM	<i>Intercellular adhesion molecule</i>
IKK β	<i>IκB kinase β</i>
IL	<i>Interleukine</i>
ILV	<i>Intraluminal vesicle</i>
INERIS	Institut national de l'environnement industriel et des risques
iNOS	NOS inductible
IPCS	International programme on chemical safety
ITG	Intégrine
JNK	C-Jun N-terminal kinases
LAMP-1	<i>Lysosomal-associated membrane protein 1</i>
IEV	<i>Large EV</i>
LMP	<i>Lysosomal membrane permeabilization</i>
lncARN	ARN long non codant
LOXL4	<i>Lysyl oxidase like 4</i>
LPS	Lipopolysaccharide
MAPK	<i>Mitogen-activated protein kinase</i>
MCP-1	<i>Monocyte chemoattractant protein 1</i>
MDR1	<i>Multidrug resistance protein 1</i>
MEC	Matrice extracellulaire
MET	Microscopie électronique à transmission
MHC-I / II	<i>Major histocompatibility complex class I / II</i>
miARN	Micro-ARN
MLCK	<i>Myosin light-chain kinase</i>
MMP	<i>Matrix metalloproteinase</i>
MV	Microvésicule

MVB	<i>Multivesicular body</i>
NAC	N-acétyl-cystéine
NADPH ox	Nicotinamide adénine dinucléotide phosphate oxydase
NAFLD	<i>Non-alcoholic fatty liver disease</i>
NASH	<i>Non-alcoholic steatohepatitis</i>
NFκB	<i>Nuclear factor-kappa B</i>
NHE1	<i>Sodium-hydrogen antiporter 1</i> = Echangeur Na ⁺ /H ⁺ isoforme 1
NO	Monoxyde d'azote
NOS	<i>Nitric oxide synthase</i>
Nrf2	<i>Nuclear factor erythroid-2-related factor 2</i>
NTA	<i>Nanoparticle tracking analysis</i>
O ₂ ^{•-}	Anion superoxyde
ONOO ⁻	Anion peroxydinitrite
PC	Phosphatidylcholine
PDGFR	<i>Platelet-derived growth factor receptor</i>
PE	Phosphatidyléthanolamine
PG	Phosphatidylglycérol
PI	Phosphatidylinositol
PM	<i>Particule matter</i>
PPARα/d	<i>Peroxisome proliferator-activated receptor alpha /delta</i>
PS	Phosphatidylsérine
PTEN	<i>Phosphatase and tensin homolog</i>
PXR	<i>Pregnane X receptor</i>
PYR	Pyrène
Rab	<i>Ras-associated binding protein</i>
RE	Réticulum endoplasmique
ROCK	<i>Rho-associated protein kinase</i>
S1P	<i>Sphingosine-1-phosphate</i>
S1PR	<i>Sphingosine-1-phosphate receptor</i>
SCF	<i>Scientific Committee on Food</i>
sEV	<i>Small EV</i>
siARN	<i>Silencing-ARN</i>
SK	Sphingosine kinase
SM	Sphingomyéline
Smac/DIABLO	<i>Second mitochondria-derived activator of caspases / Direct IAP-binding protein with low PI</i>
SMase	Sphingomyélinase
SNARE	<i>Soluble N-éthylmaleimide-sensitive-factor attachment protein receptor</i>
SOD	Superoxyde dismutase
SREBP	<i>Sterol regulatory element-binding protein</i>
STAM	<i>Signal transducing adaptor molecule</i>
STAT	<i>Signal transducer and activator of transcription</i>
SULT	Sulfotransférase
TCDD	<i>2,3,7,8-tétrachlorodibenzo-p-dioxine</i>
TGFβ	<i>Transforming growth factor β</i>
TIMP	<i>Tissue inhibitor of metalloproteinase</i>
TLR	<i>Toll like receptor</i>
TNFα	<i>Tumor necrosis factor alpha</i>
TRAIL	<i>Tumor-necrosis-factor related apoptosis inducing ligand</i>
Tsg101	<i>Tumor susceptibility gene 101 protein</i>
TSPN	Tétrapanine

UGT	UDP-glucoronyl transférase
VAMP	<i>Vesicle-associated membrane protein</i>
VCAM 1	<i>Vascular cell adhesion protein 1</i>
VE	Vésicule extracellulaire
VIH	Virus de l'immunodéficience humaine
Vps	<i>Vacuolar protein sorting-associated protein</i>
α -NF	Alpha-naphotoflavone
α SMA	<i>Alpha smooth muscle actin</i>
β 2-AR	<i>Beta 2-adrenergic receptor</i>

Liste des figures

▪ Figure 1 : Répartition de la production des 8 HAP en France par secteur	30
▪ Figure 2 : Devenir des HAP dans l'organisme.....	34
▪ Figure 3 : Principales voies du métabolisme du benzo(a)pyrène.....	36
▪ Figure 4 : Structure du récepteur AhR (adapté de Larigot 2018)	42
▪ Figure 5 : Voies génomique et non génomiques de l'activation du récepteur AhR	43
▪ Figure 6 : Activation des récepteurs PXR et CAR par les HAP.....	47
▪ Figure 7 : Activation de la signalisation calcique liée au récepteur β 2-AR par les HAP.....	49
▪ Figure 8 : Voie intrinsèque de l'apoptose	57
▪ Figure 9 : Différentes sources cellulaires d'ERO et d'ERN.....	58
▪ Figure 10 : Production d'ERO lors du métabolisme	59
▪ Figure 11 : Implication de l'activation de p53 dans l'apoptose induite par le BaP via la mitochondrie....	64
▪ Figure 12 : Implication du remodelage membranaire dans l'apoptose induite par le BaP	66
▪ Figure 13 : Implication de la perméabilisation des lysosomes dans l'apoptose induite par le BaP.....	67
▪ Figure 14 : Libération de vésicules extracellulaires par une cellule	68
▪ Figure 15 : Biogénèse et libération des exosomes	71
▪ Figure 16 : Biogénèse et libération des microvésicules	72
▪ Figure 17 : Mécanismes possibles de libération de VE suite à l'induction de l'apoptose	78
▪ Figure 18 : Isolement des VE par ultracentrifugation différentielle.....	80
▪ Figure 19 : Isolement des VE par gradient ou coussin de densité	81
▪ Figure 20 : Isolement des VE par filtration	82
▪ Figure 21 : Isolement des VE selon leurs propriétés chimiques	83
▪ Figure 22 : Principe du Nanoparticle Tracking Analysis (NTA)	87
▪ Figure 23 : Morphologie caractéristique des VE en microscopie électronique à transmission.....	89
▪ Figure 24 : Taille des différents types de VE.....	90
▪ Figure 25 : Composition générale des VE.....	91
▪ Figure 26 : Communication intercellulaire par les VE.....	95
▪ Figure 27 : Liaison des VE avec les cellules réceptrices	98
▪ Figure 28 : Internalisation et devenir des VE adapté de van Niel et al., 2018.....	100
▪ Figure 29 : Génération d'un stress oxydant par les VE.....	103
▪ Figure 30 : Implication du stress oxydant dans l'apoptose induite par les VE.....	106
▪ Figure 31 : Activation des récepteurs de mort dans l'apoptose induite par les VE	107
▪ Figure 32 : Transfert de molécules pro-apoptotiques et apoptose induite par les VE.....	109
▪ Figure 33 : Les lipides dans l'apoptose induite par les VE.....	111
▪ Figure 34 : Organisation cellulaire du foie.....	113
▪ Figure 35 : Exemples de protéines contenues dans les VE issues d'hépatocytes.....	116
▪ Figure 36 : Les VE dans la communication entre les cellules du foie en conditions pathologiques.....	130
▪ Figure 37 : Mécanismes d'induction de l'inflammation par les VE libérées par les cellules du foie	135
▪ Figure 38 : Mécanismes d'activation des cellules étoilées par les VE libérées par les cellules du foie	137
▪ Figure 39 : Implication des VE libérées par les cellules du foie dans l'angiogenèse	139
▪ Figure 40 : Implication des VE dans la progression tumorale de l'HCC.....	141
▪ Figure 41 : Les HAP provoquent essentiellement l'augmentation de la libération des EXO	236
▪ Figure 42 : Le BP provoque une déstructuration des radeaux lipidiques	244

-
- *Figure 43 : Les transporteurs NHE pourraient être impliqués dans la libération de VE induite par le BP et le DBA.....* 245
 - *Figure 44 : Balance entre la dégradation et la libération d'EXO.....* 251
 - *Figure 45 : Les VE-HAP pourraient provoquer une altération de l'autophagie des hépatocytes récepteurs 252*
 - *Figure 46 : Les VE libérées par les hépatocytes exposés aux HAP sont enrichies en protéines pro-apoptotiques 254*
 - *Figure 47 : Les VE libérées par les hépatocytes exposés aux HAP contiennent le CYP1A1 255*

Liste des tableaux

▪ Tableau 1 : Caractéristiques physico-chimiques des 16 HAP prioritaires	28
▪ Tableau 2 : Concentration moyenne mesurée pour trois HAP dans l'environnement	30
▪ Tableau 3 : Concentration moyenne de 8 HAP contenus dans différents groupes d'aliments	31
▪ Tableau 4 : Apport journalier en HAP selon différentes routes d'exposition en ng/jour	32
▪ Tableau 5 : Concentrations en HAP mesurées dans le sang chez l'Homme	33
▪ Tableau 6 : Génotoxicité et cancérogénicité des HAP	39
▪ Tableau 7 : Ligands d'AhR (adapté de Murray et al, 2014)	40
▪ Tableau 8 : Activation de l'AhR par les HAP dans les hépatocytes	41
▪ Tableau 9 : Implication d'AhR dans l'altération du métabolisme des lipides induit par les HAP	44
▪ Tableau 10 : Implication d'AhR dans la mort cellulaire induite par les HAP	45
▪ Tableau 11 : HAP et développement de NAFLD chez l'animal	52
▪ Tableau 12 : Corrélation entre les taux d'adduits BPDE, biomarqueurs d'exposition aux HAP et l'hépatocarcinome cellulaire (HCC) chez l'Homme	53
▪ Tableau 13 : Implication des HAP dans l'apparition d'un cancer du foie chez l'animal	54
▪ Tableau 14 : Mort cellulaire induite par apoptose par les HAP dans les cellules du foie	55
▪ Tableau 15 : Implication du stress oxydant dans l'apoptose induite par le BaP dans les cellules du foie	61
▪ Tableau 16 : Activation de p53 par le BaP dans les cellules du foie en apoptose	62
▪ Tableau 17 : Implication du stress oxydant dans la libération des VE in vitro	75
▪ Tableau 18 : Rôle potentiel de l'oxydation de protéines dans la formation des VE	76
▪ Tableau 19 : Implication de la mort cellulaire par apoptose dans la libération des VE in vitro	77
▪ Tableau 20 : Avantages et inconvénients de l'ultracentrifugation pour d'isolement des VE	81
▪ Tableau 21 : Comparaison des différentes techniques d'isolement de VE	85
▪ Tableau 22 : Avantages et inconvénients de la MET dans la caractérisation des VE	86
▪ Tableau 23 : Avantages et inconvénients de l'AFM dans la caractérisation des VE	87
▪ Tableau 24 : Avantages et inconvénients du NTA dans la caractérisation des VE	88
▪ Tableau 25 : Avantages et inconvénients de la cytométrie en flux dans la caractérisation des VE	88
▪ Tableau 26 : Participation des VE à la génération d'un stress oxydant dans les cellules réceptrices ..	102
▪ Tableau 27 : Apoptose induite dans les cellules réceptrices suite à l'activation de leurs récepteurs de mort par les VE	107
▪ Tableau 28 : Les VE dans la physiologie du foie	119
▪ Tableau 29 : Augmentation de la libération de VE in vitro en conditions pathologiques	121
▪ Tableau 30 : Modification du contenu des VE isolées du sang de souris ou de patients présentant une NAFLD	125
▪ Tableau 31 : Modification du contenu en miARN dans les VE isolées du plasma de souris ou sérum de patients HCC	127
▪ Tableau 32 : Fonctions des VE dans les pathologies du foie d'après des études in vitro	143
▪ Tableau 33 : Fonctions des VE dans les pathologies du foie d'après des études in vivo	144
▪ Tableau 34 : Libération et modification du contenu des VE suite à une exposition à la fumée de cigarette	147
▪ Tableau 35 : Libération et modification du contenu des VE suite à une exposition à l'arsenic	150

Avant-propos

L'exposition à des polluants environnementaux est largement reconnue pour influencer la santé humaine et devient donc aujourd'hui une préoccupation importante en termes de santé publique. L'exposition, par l'alimentation, l'eau de boisson ou l'air, à des toxiques chimiques de notre environnement (Ex : pesticides, hydrocarbures ou métaux lourds) est maintenant considérée comme un facteur de risque pour le développement de nombreuses pathologies, comme les cancers, les maladies cardio-vasculaires, respiratoires ou neurodégénératives (Cohen *et al.*, 2017; Colao *et al.*, 2016; Gakidou *et al.*, 2017; Lim *et al.*, 2012) ...

Une famille de contaminants persistants majeurs de notre environnement, les hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP), font d'ailleurs, l'objet d'une surveillance particulière des agences environnementales et sanitaires au niveau mondial (EPA [*Environmental protection agency*], EFSA [*European food safety authority*], CIRC [Centre international de recherche sur le cancer], INERIS [Institut national de l'environnement industriel et des risques]), du fait de leurs différents effets toxiques avérés. Ces HAP sont issus principalement de l'activité anthropique par des processus de combustion incomplète, liés à l'industrie ou au chauffage domestique. L'Homme est fortement exposé à ces HAP, par l'alimentation ou la fumée de cigarette.

Le foie est le principal organe impliqué dans le métabolisme des xénobiotiques et à l'origine de leur élimination de l'organisme. Il peut aussi participer à la bio-activation des HAP en métabolites réactifs très toxiques. Ainsi, il est une cible privilégiée de leur toxicité. L'exposition aux HAP serait un facteur de risque de développement de pathologies hépatiques, comme les maladies non alcooliques du foie (NAFLD) ou les cancers du foie.

Comprendre les mécanismes d'action de toxiques, comme les HAP, au niveau moléculaire et cellulaire, est essentiel pour déterminer des biomarqueurs d'exposition ou d'effet, ainsi que de nouvelles cibles thérapeutiques. A l'heure actuelle, la majorité des travaux sur les effets toxiques des HAP mettent en avant leur capacité à induire des adduits à l'ADN et leur relation avec le développement de cancers des poumons ou du foie. Les effets indépendants de la formation de ces adduits sont moins étudiés mais font l'objet d'un intérêt particulier de notre équipe (Collin *et al.*, 2014; Gorria *et al.*, 2006a, 2008; Huc *et al.*, 2006; Tekpli *et al.*, 2010).

Dans ce projet, nous nous sommes particulièrement intéressées aux vésicules extracellulaires (VE) dont l'implication, dans les effets des polluants environnementaux, reste encore peu documentée. Ces VE, nanostructures membranaires libérées par les cellules, jouent un rôle important dans la communication intercellulaire par le transfert de biomolécules et pourraient donc potentiellement jouer un rôle dans la toxicité des HAP au niveau du foie. En outre, dans le cadre d'une exposition à un composé chimique, la recherche de biomarqueurs d'exposition et d'effets chez l'Homme est indispensable pour l'évaluation des risques pour la santé humaine, le diagnostic

clinique ou pour la surveillance de populations sensibles. Chez l'Homme, ces VE sont également retrouvées dans les liquides biologiques (plasma, urines). En plus, leur contenu, reflet du stimulus à l'origine de leur sécrétion et de l'état physiopathologique des cellules et tissus producteurs, est protégé de la dégradation. Ces VE pourraient donc servir de biomarqueurs potentiels d'exposition ou d'effets des polluants environnementaux comme les HAP dans le foie.

Cette thèse s'intéresse donc à l'étude des VE comme potentiels biomarqueurs et vecteurs de l'hépatotoxicité des HAP.

Elle a été réalisée à l'institut IRSET UMR INSERM U1085 à Rennes et a été en partie financée par le projet EXOCELL du programme Environnement – Santé – Travail de l'ANSES avec le soutien de l'ITMO Cancer dans le cadre du plan cancer 2014-2019.

La première partie consiste en une revue bibliographique sur les HAP en tant que contaminants de l'environnement et hépatotoxiques, puis, sur les VE en tant qu'acteurs de la communication intercellulaire, notamment dans le foie, et aussi de la toxicité des contaminants de l'environnement. La seconde partie développe les résultats, regroupés sous la forme de deux articles. Enfin, la troisième partie correspond à la discussion de l'ensemble des résultats obtenus au cours de la thèse et des perspectives envisagées à plus long terme.

PARTIE 1 : INTRODUCTION

I. Les hydrocarbures aromatiques polycycliques, contaminants de l'environnement et hépatotoxiques

Les hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP) sont des molécules constituées exclusivement de carbone et d'hydrogène et possédant au moins deux cycles aromatiques juxtaposés. Ils sont une classe de contaminants de l'environnement très répandue, en raison de leur formation, par combustion incomplète ou pyrolyse de la matière organique. Les HAP sont généralement retrouvés dans l'environnement, sous forme de mélange complexe et l'Homme peut y être exposé par différentes voies. A ce jour, plus d'une centaine de HAP différents ont été identifiés et parmi eux, 16 ont été désignés comme polluants prioritaires par l'EPA. Ces 16 HAP font l'objet d'une attention particulière par les autorités environnementales et sanitaires (EPA, EFSA, CIRC et INERIS en France) au vu de leur prévalence et de leur persistance dans l'environnement ainsi que de leur toxicité potentielle sur l'Homme et d'autres organismes vivants.

A. Généralités

1. Propriétés physico-chimiques









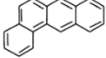
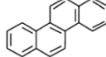
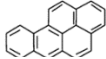
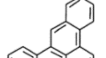
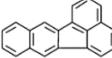
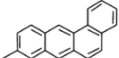

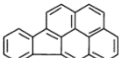
A température ambiante et à l'état pur, les HAP sont des solides cristallins colorés de blanc à jaune. Les HAP sont des composés avec différentes propriétés physico-chimiques (**TABLEAU 1**) qui permettent de prévoir leur répartition et leur comportement dans différents compartiments, comme l'air, l'eau et les sols, ainsi que leur bioaccumulation. Les HAP sont des composés apolaires, lipophiles. Leur faible solubilité dans l'eau est décrite par un fort $\log K_{ow}$ (coefficient de partage octanol-eau). Ils sont stables, généralement peu ou pas volatils, et persistants, un $\log K_{ow}$ supérieur à 3 décrivant un composé bioaccumulable (**TABLEAU 1**). La solubilité dans l'eau et la volatilité de ces composés diminuent lorsque le nombre de cycles augmente ; à l'inverse, la capacité d'adsorption augmente avec le nombre de cycles. Deux classes de HAP se distinguent donc selon leur masse molaire :

- **les HAP lourds** (masse molaire > 250) avec plus de 4 cycles, qui ne sont pas volatils et s'adsorbent sur la matière organique particulaire, généralement sur des particules de taille inférieure à 2,5 μm , comme les cendres ou la suie ;
- **les HAP légers** (masse molaire < 250) avec un nombre de cycles inférieur, plus volatils et plus solubles dans l'eau ; ils sont présents dans les phases gazeuses.

Les HAP sont chimiquement stables et sont très peu dégradés par hydrolyse (IPCS, 1998; SCF, 2002) mais sont sensibles à l'oxydation et à la photo-dégradation par la lumière. Ainsi, le temps de demi-vie des HAP varie de quelques heures à quelques jours dans l'air et de quelques mois à quelques années dans les sols. Lors de la dégradation des HAP, des produits de dégradation ou des dérivés d'HAP nitrosylés par exemple, peuvent se former et présenter eux-mêmes une toxicité.

Tableau 1 : Caractéristiques physico-chimiques des 16 HAP prioritaires

Données issues de Bojes and Pope, 2007; Krauss and Wilcke, 2001; Stogiannidis and Laane, 2015

	Nom	Structure	Log K _{ow}	Poids moléculaire (g/mol)	Solubilité dans l'eau (mg/L)	Demi-vie dans les sols (jours)
HAP légers	Naphtalène		3,32	128,17	31	48
	Acénaphtylène		4,1	152,20	16,1	60
	Acénaphène		3,9	154,21	3,8	102
	Fluorène		4,18	166,22	1,9	60
	Anthracène		4,54	178,23	0,045	460
	Phénanthrène		4,57	178,23	1,1	200
	Fluoranthène		5,22	202,26	0,26	440
	Pyrène (PYR)		5,18	202,26	0,132	1870
	Benzo(a)anthracène		5,6	228,29	0,011	670
	Chrysène		5,86	228,29	0,0015	990
HAP lourds	Benzo(a)pyrène (BaP)		6	252,32	0,0038	530
	Benzo(b)fluoranthène		5,8	252,32	0,0015	610
	Benzo(k)fluoranthène		6	252,32	0,0008	2140
	Dibenzo(ah)anthracène (DBahA)		6,5	278,35	0,0005	940
	Benzo(ghi)pérylène		7,1	276,34	0,00026	650
	Indeno(1,2,3-cd)pyrène		6,6	276,34	0,062	730

2. Sources de production

Les HAP sont des polluants omniprésents dans l'environnement, aussi bien dans l'air, l'eau, les sols mais aussi dans l'alimentation, en raison de la diversité de leurs sources d'émission. Les différents HAP sont formés lors de différentes réactions de combustion incomplète ou de pyrolyse de matière organique, qui peuvent être d'origine naturelle ou anthropique. Les sources naturelles sont majoritairement liées aux feux de forêt ou aux éruptions volcaniques mais représentent un apport minime comparées aux sources anthropiques. Deux types de sources anthropiques sont distingués : les sources anthropiques stationnaires et les sources anthropiques mobiles.

Les **émissions stationnaires** représentent environ 80 % des émissions totales de HAP (CITEPA, 2015, 2019) et peuvent être de **nature industrielle**, liée à l'incinération des déchets, aux activités de production d'aluminium, de fer et d'acier, aux industries du pétrole, du bitume, du goudron et aux industries manufacturières (7,9 T en 2018 en France) ; de **nature agricole** (3,7 T en 2018 en France), liée au brûlage des résidus de culture ; ou de **nature domestique**, liée principalement au chauffage notamment par la combustion du bois, du charbon ou du gaz. Le secteur résidentiel reste la source principale des HAP ; en 2017, il représente près de 63 % des émissions totales de HAP avec une émission de 36 T des 8 HAP réglementés en France métropolitaine (benzo(a)pyrène, benzo(b)fluoranthène, benzo(k)fluoranthène, indeno(1,2,3-cd)pyrène, benzo(g,h,i)pérylène, fluoranthène, dibenzo(a,h)anthracène, benzo(a)anthracène (CITEPA, 2015, 2019)). Parmi les sources stationnaires, la fumée de cigarette est souvent oubliée mais elle pourrait contribuer pour une part importante à la libération de HAP.

Les **sources anthropiques mobiles**, représentant 20 % des émissions totales, sont principalement issues du secteur des transports et presque exclusivement des transports routiers. Les HAP proviennent des gaz d'échappement des véhicules, de l'abrasion des pneus, des freins et de l'usure des routes. Depuis 2002, les émissions diminuent grâce à des améliorations technologiques et par l'interdiction de l'utilisation d'huile dans la fabrication des pneus, suite à la directive REACH (*Registration, evaluation and authorisation of chemicals*) (CITEPA, 2015, 2019).

Parmi les 8 HAP réglementés en France, en 2015, le fluoranthène est le plus produit avec près de 46 T émis dans l'air et le dibenzo(a,h)anthracène (DBaH) est le moins produit avec 0,9 T émis. Pour le benzo(a)pyrène (BaP), la production est intermédiaire, avec 5,4 T émis (**FIGURE 1**) (CITEPA, 2019).

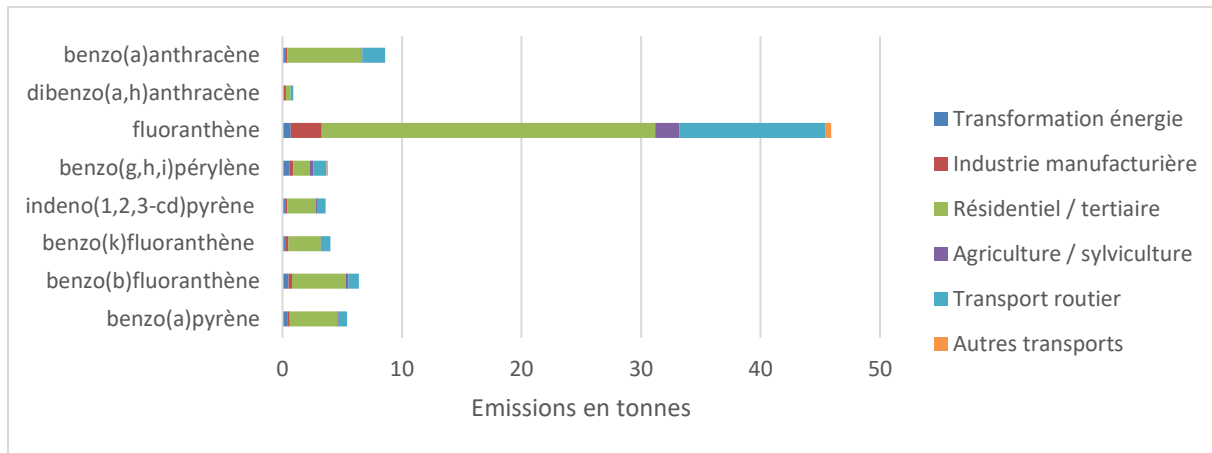


Figure 1 : Répartition de la production des 8 HAP en France par secteur
(Adaptée des données CITEPA 2015)

3. Devenir et distribution dans l'environnement

Les HAP, une fois produits, sont libérés dans l'atmosphère et sont répartis dans la phase gazeuse ou particulaire, selon leurs propriétés physico-chimiques. Ils peuvent ainsi être transportés sur de courtes ou longues distances et se déposer, par dépôt sec ou humide (eaux de pluies) sur le sol, la végétation ou dans l'eau (TABLEAU 2). Une fois déposés, les HAP peuvent se volatiliser, être dégradés, soit par photolyse ou oxydation, soit par biodégradation, s'adsorber fortement à la fraction organique du sol ou des sédiments, ou encore s'accumuler dans les organismes vivants terrestres ou aquatiques. Les HAP subissent aussi le phénomène de biomagnification, c'est-à-dire, l'augmentation de leur concentration dans un organisme vivant au cours des différents niveaux trophiques de la chaîne alimentaire.

Par leur présence dans l'ensemble des compartiments de l'environnement, les HAP peuvent s'accumuler dans les organismes végétaux (feuilles et racines), dans les organismes terrestres ou aquatiques et peuvent donc être présents dans l'alimentation humaine (INERIS, 2006c, 2006a, 2006b).

Tableau 2 : Concentration moyenne mesurée pour trois HAP dans l'environnement
(Adapté des données de l'INERIS 2006) (INERIS, 2006c, 2006a, 2006b)

Milieu	Concentration		
	Benzo(a)pyrène	Dibenzo(a,h)anthracène	Pyrène
Air	<10 ng/m ³	<0,5 ng/m ³	<1 ng/m ³
Eau			1 ng/L
• Eau de surface			
▪ Mers	0,01 à 0,1 ng/L	<0,1 ng/L	
▪ Rivières	1 ng/L		
• Eau de pluie	10 ng/L	<50 ng/L	<100 ng/L
Sol	1 µg/kg	<10 µg/kg	<20 µg/kg
Sédiments		n.d	<500 µg/kg
• Sédiments marins	1 µg/kg		
• Sédiments de rivière			

4. Exposition humaine aux HAP

Les HAP sont des polluants ubiquitaires présents dans l'ensemble des compartiments de l'environnement ; l'exposition humaine aux HAP est donc récurrente. L'exposition peut être aussi bien professionnelle que domestique, par voie orale, respiratoire ou cutanée. L'apport journalier moyen en HAP pour un adulte d'environ 60 kg est présenté dans le [TABLEAU 4](#).

a. Exposition orale

La voie d'exposition majeure, représentant environ 90 % de l'exposition quotidienne, pour un individu non-fumeur est la **voie orale**, par l'ingestion d'aliments contaminés (EFSA, 2008) ([TABLEAU 3](#)). La présence des HAP dans l'alimentation est causée soit par la contamination environnementale soit par la transformation et la cuisson des aliments ; comme lors des processus de séchage ou de fumage et durant la cuisson par grillade, torréfaction ou friture.

Tableau 3 : Concentration moyenne de 8 HAP contenus dans différents groupes d'aliments
(adapté des données de l'EFSA 2008) 8 HAP : benzo(a)pyrène, benzo(b)fluoranthène, benzo(k)fluoranthène, indeno(1,2,3-cd)pyrène, benzo(g,h,i)pérylène, dibenzo(a,h)anthracène, benzo(a)anthracène, chrysène,

Groupe d'aliments	Concentration µg/kg	Consommation moyenne ng/jour	Consommation moyenne BaP ng/jour
Céréales	3,08	393	67
Chocolat/Sucre	2,76	39	5
Graisses et huiles	9,81	239	26
Légumes et noix	1,95	378	50
Fruits	3,08	87	5
Café, thé et cacao	37,39	156	21
Viandes	2,11	279	42
Poissons non transformés	1,05	210	21
Poissons transformés	14,6		
Fruit de mers	15,58	421	36
Produits laitiers	0,84	30	6
Compléments alimentaires	30,31	-	-
Epices	28,4	-	-

En ce qui concerne les HAP, les plus concentrés dans l'alimentation sont l'anthracène, le phénanthrène, le fluoranthène, le pyrène (PYR), et le chrysène (respectivement 5,8 , 48,9 , 12,3 , 10,5 , 2,8 fois plus concentrés que le BaP) alors que le DBahA serait le moins concentré (5 fois moins concentré que le BaP) dans l'ensemble des aliments analysés (SCF, 2002) ([TABLEAU 3](#)).

b. Exposition respiratoire

i. Air ambiant

L'exposition par voie respiratoire est une source minime chez les individus non-fumeurs et non exposés professionnellement. Elle est généralement dix fois inférieure à celle par l'alimentation. L'exposition est variable du fait de la variabilité des émissions de HAP dans l'atmosphère, selon la

géographie et la météorologie. Les expositions par la voie respiratoire seraient en diminution en raison de la baisse des niveaux de HAP dans l'air ces dernières années.

L'exposition par voie respiratoire peut être une source majeure pour les professionnels travaillant dans des industries à fortes émissions de HAP. Les professionnels travaillant dans les secteurs de la construction et de l'entretien des voiries sont particulièrement exposés aux particules, vapeurs et gaz de bitume, riches en HAP (ANSES, 2003) lorsque celui-ci est chauffé. La concentration en HAP dans l'air, des industries impliquant la production d'aluminium, de charbon ou de goudron, est jusqu'à 100 fois supérieure à la concentration dans l'air ambiant.

ii. Tabagisme

La contribution de l'exposition aux HAP par inhalation est bien supérieure lorsqu'un individu est fumeur, même passif. L'exposition par cette voie serait donc entre 2000 et 4000 ng/jour de HAP pour un fumeur, fumant 20 cigarettes par jour, et d'environ 400 ng/j de HAP pour un fumeur passif, avec une exposition d'environ 5 h par jour (Lodovici *et al.*, 2004).

c. Exposition cutanée

L'exposition cutanée peut également avoir lieu mais est principalement limitée à des travailleurs en milieu professionnel.

Tableau 4 : Apport journalier en HAP selon différentes routes d'exposition en ng/jour

(Adapté de SCF 2002) en considérant une respiration de 20 m³ d'air et une ingestion de 2 L d'eau par jour

HAP	Alimentation	Eau de boisson	Air
Anthracène	<30-640		20
Phenanthrène	<330-4510		400
Fluoranthène	600-1660	2-20	100
Pyrène	600-1090	0,2-20	100
Benz(a)anthracène	<20-410	0,2-10	20
Chrysène	200-1530	20	20
Benzo(b)fluoranthène	5-360	0,1-2	20
Benzo(j)fluoranthène	<30	0,02-0,2	
Benzo(k)fluoranthène	40-140	0,02-2	20
Benzo(b+j+k)fluoranthène	<70-1100		60
Benzo(a)pyrène	50-290	0,2-2	20
Benzo(e)pyrène	200		20
Benzo(g,h,i)pérylène	120-360	0,2-2	20
Indeno(1,2,3-cd)pyrène	<20-460	0,2-2	20
Dibenz(a,h)anthracène	<10-80		2

d. de HAP mesurées chez l'Homme

Très peu d'études ont été réalisées afin de mesurer la concentration en HAP dans l'organisme humain. Les principales études sont rassemblées dans le **TABLEAU 5**. La variation assez importante des concentrations de HAP pourrait s'expliquer par les variations d'exposition qui diffèrent selon la géographie, le climat, le mode de vie et d'alimentation.

Tableau 5 : Concentrations en HAP mesurées dans le sang chez l'Homme

Référence	Echantillon		Concentration moyenne (nM)		
	Plasma ou sérum / Nombre /Origine	Statut physiopathologique	BaP	DBahA	PYR
(Neal et al., 2008)	Sérum de 29 patientes canadiennes	fumeuses	3,9		1,5+-0,1
		Non-fumeuses	0,9		1,3+-0,1
(Qin et al., 2011)	Plasma de 111 volontaires Hong-Kong	Non-fumeurs	7,63 ng/g lipides		184-212 ng/g lipides
		Fumeurs	15 ng/g lipides		
(Song et al., 2013)	Plasma de 53 volontaires chinois		335 ± 310	207 ± 182	47 ± 31
(Luzardo et al., 2019)	Sérum de 121 volontaires roumains				2,4
(Loutfy et al., 2017)	Sérum de 44 volontaires égyptiens			1451	
(Pleil et al., 2010)	Plasma de 19 volontaires américains		0,07	0,14	1,2
(Singh et al., 2008)	Sérum de 56 enfants indiens		6,7		56
(Ramesh et al., 2014)	Sérum de 650 personnes décédées aux États-Unis		0,4 -38 nM concentration des 16 HAP prioritaires		
(Al-Daghri et al., 2014)	Sérum de 195 de personnes ou non en Arabie saoudite	non asthmatiques	8,3		3,3
		asthmatiques	19		5,4
(Olabanji et al., 2019)	Plasma de 20 patients nigériens		0,05	0,12	0,12
(Walker et al., 2016)	Sérum de 35 personnels de l'armée des États-Unis		13,4		
(Xia et al., 2016)	Sérum de 200 personnels de l'armée des États-Unis		13,4-22	27,7-68,5	1,4-2,2

5. Toxicocinétique des HAP

Suite à l'ingestion, à l'inhalation ou au contact de composés contenant des HAP, ces derniers peuvent être absorbés au niveau de l'organisme, selon différentes voies, qui se rejoignent au niveau du foie. Les HAP seront ensuite distribués dans l'ensemble des tissus et organes (**FIGURE 2**). Le foie est donc un organe clé dans la toxicocinétique des HAP et dans leur métabolisme, participant à leur bioactivation. Ainsi, le foie apparaît comme un des organes pouvant être une cible privilégiée de la toxicité des HAP.

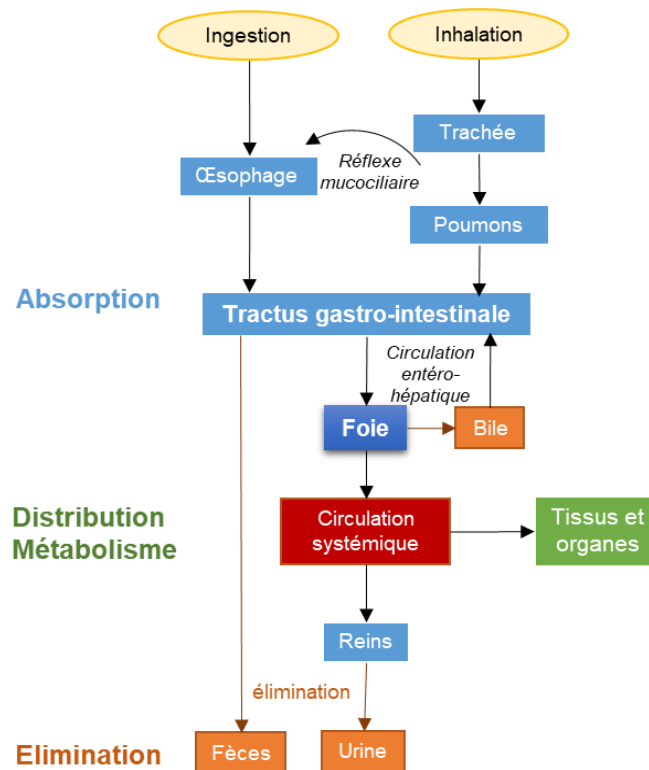


Figure 2 : Devenir des HAP dans l'organisme
(Adapté de Ramesh 2004)

a. Absorption

L'absorption des HAP chez l'Homme peut se faire par trois voies différentes, selon le mode d'exposition : au niveau du tractus gastro-intestinal après ingestion, au niveau du tractus respiratoire après inhalation, au niveau cutanée après contact (FIGURE 2).

En tenant compte du fait que la voie majeure d'exposition est la voie orale, la majorité de l'absorption des HAP, au niveau de l'organisme, a donc lieu au niveau gastro-intestinal. L'absorption gastro-intestinale des HAP s'effectue en seulement quelques heures. Elle dépend des propriétés physico-chimiques des HAP. L'absorption par la voie orale serait plus importante pour les HAP avec les masses moléculaires les plus faibles, c'est-à-dire ceux qui ont 4 cycles ou moins comme l'anthracène, le phénanthrène, le fluoranthène et le PYR. Différentes études chez le rat ont montré que l'absorption intestinale du BaP serait comprise entre 35 et 99 % alors que celle du PYR serait comprise entre 42 et 99 % et celle du chrysène entre 75 et 87 % (IPCS, 1998; Ramesh *et al.*, 2004; SCF, 2002; WHO, 2006).

L'absorption au niveau du tractus respiratoire dépend également des propriétés des HAP. Les HAP volatils sont rapidement absorbés à tous les niveaux du tractus respiratoire. Les HAP de la phase particulaire sont libérés dans les conduits bronchiques et seront lentement absorbés, en

quelques heures, tandis que ceux libérés dans les conduits alvéolaires seront absorbés très rapidement en quelques minutes (Gerde *et al.*, 2001).

L'exposition cutanée peut aussi provoquer une absorption dans l'organisme. Une étude a montré qu'au moins 50 % du PYR appliqué sur la peau de rat était absorbé (IPCS, 1998; SCF, 2002; WHO, 2006).

b. Distribution

Les HAP sont distribués dans l'ensemble de l'organisme (FIGURE 2). Chez les rongeurs, après inhalation ou ingestion, les HAP sont distribués rapidement vers les différents organes du tractus gastro-intestinal, le foie et les reins. Les tissus adipeux sont des lieux de stockage de HAP, d'où ils peuvent être progressivement relargués (IPCS, 1998; WHO, 2006). Chez l'Homme, le BaP est aussi largement distribué dans le foie, la rate, les reins, le cœur, le muscle squelettique et les poumons (WHO, 2006). Le PYR est le HAP le plus abondant dans les tissus notamment dans le foie et le tissu adipeux (Obana *et al.*, 1981, WHO, 2006).

c. Métabolisme des HAP

Les HAP, par leur caractère lipophile, sont capables de franchir les membranes cellulaires et ainsi entrer dans les cellules. En fonction de l'équipement enzymatique de ces dernières, les HAP subissent une biotransformation. Les réactions de biotransformation sont catalysées principalement dans le foie, organe majeur de détoxification des xénobiotiques. Le métabolisme des HAP a pour but d'augmenter leur polarité et leur solubilité afin de faciliter leur excrétion, mais ces transformations conduisent aussi à l'apparition de métabolites plus électrophiles et donc plus réactifs, capables de provoquer des effets nocifs au niveau cellulaire (Miller and Ramos, 2001). Le métabolisme des HAP se divise en 3 phases : phase I de fonctionnalisation, phase II de conjugaison et phase III de transport.

Le métabolisme du BaP est celui qui a été le plus largement étudié au cours de 40 dernières années et est celui qui sert de référence et de modèle pour le métabolisme des autres (FIGURE 3).

i. Phase I de fonctionnalisation

La phase I permet l'addition d'un groupement polaire par les enzymes de la famille des cytochromes P450 (CYP) et de la famille des époxydes hydrolases (EH). La phase I peut conduire à la bioactivation en composés réactifs et potentiellement toxiques, ou à la détoxification en composés inactifs. Il existe plusieurs voies métaboliques d'activation pour les HAP (Xue and Warshawsky, 2005) (FIGURE 3).

La voie majeure est la voie des diol-époxydes qui conduit à la formation de benzo(a)pyrène-diol-époxyde (BPDE) dans le cadre du métabolisme du BaP, un composé hautement électrophile, qui est capable de former des adduits à l'ADN ou aux protéines (*Cf Formation d'adduits à l'ADN par les*

métabolites réactifs des HAP en page 49) (FIGURE 3). La formation de tels diol-époxydes est en grande partie responsable des effets cancérigènes du BaP.

La seconde voie est la voie des o-quinones qui forment des quinones, comme le BaP-7,8-dione, extrêmement réactives et capables de former des adduits à l'ADN. De plus, les quinones peuvent rentrer dans des cycles redox provoquant la génération d'espèces réactives de l'oxygène (ERO) (Sen *et al.*, 2012) (FIGURE 3).

La dernière voie correspond à la formation d'un radical cation qui peut générer des ERO et former des adduits à l'ADN (Xue and Warshawsky, 2005) (FIGURE 3).

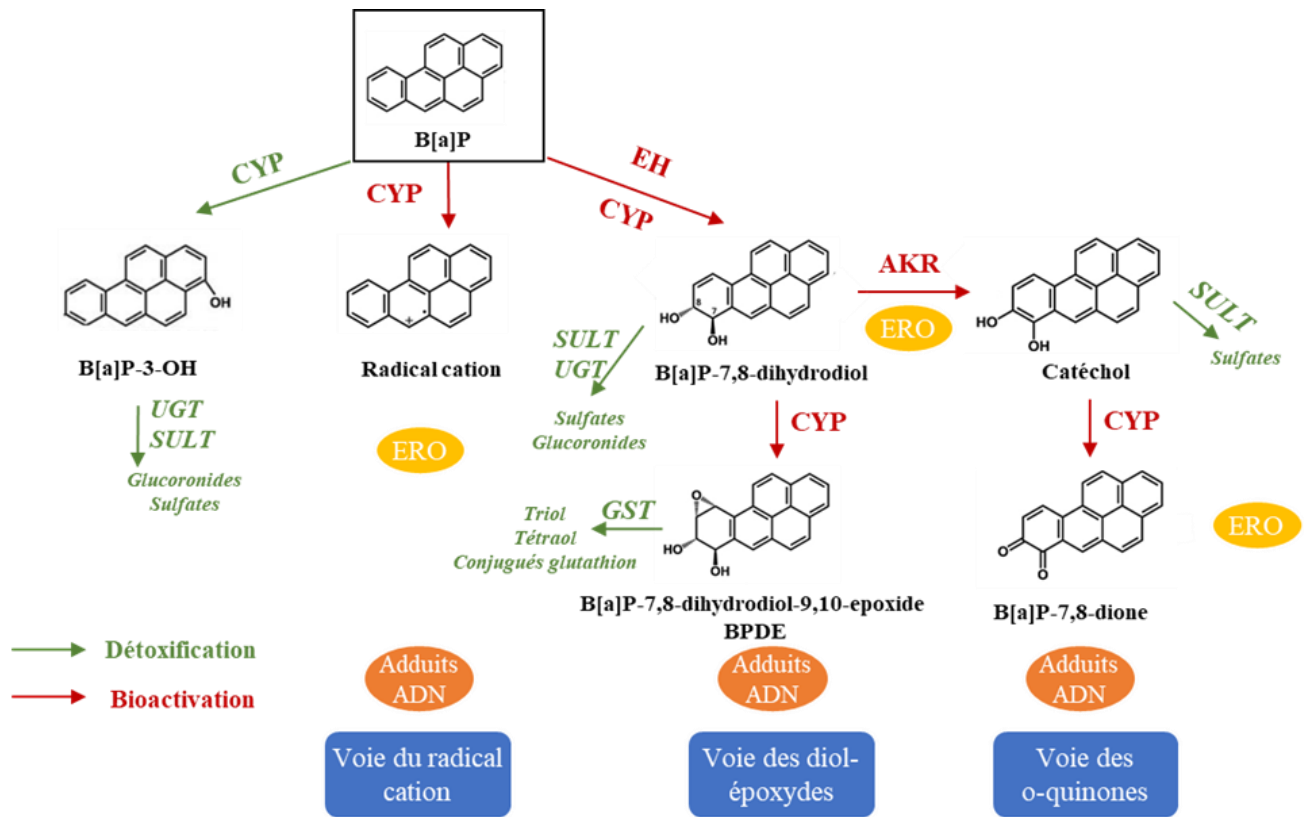


Figure 3 : Principales voies du métabolisme du benzo(a)pyrène

GST : glutathion-S-transférase, UGT : UDP-glucoronyl transférase, SULT : sulfotransférase, CYP : cytochrome P450, AKR : aldo-kéto réductase, EH : époxyde hydrolase, ERO : espèces réactives de l'oxygène

D'autres HAP pourraient former d'autres métabolites réactifs et générer la production d'ERO. En ce qui concerne le PYR et le DBahA, ils pourraient former un 1,6-dihydrodiol et 1,2-dihydrodiol ou 3,4-diol-1,2-dihydrodiol respectivement potentiellement réactifs (IPCS, 1998).

A l'inverse, la **voie de détoxification** majeure est celle des phénols, une hydroxylation par les CYP du BaP par exemple permet la formation d'hydroxy-BaP (BaP-OH), qui pourra être rapidement pris en charge par les enzymes de la phase II pour ensuite être éliminé.

Les CYP450 sont les enzymes majoritairement impliquées dans cette première phase de fonctionnalisation, catalysant des réactions de mono-oxygénation. L'importance d'un CYP particulier dans le métabolisme des HAP peut être influencée par sa spécificité de substrat. Ainsi, le BaP est principalement métabolisé par les CYP1A1, CYP1A2 et CYP1B1 dont il est également capable d'induire l'expression génique (Shimada and Guengerich, 2006). Dans le foie, le CYP1A1 serait principalement impliqué dans des fonctions de détoxification tandis que le CYP1B1 serait impliqué dans la bioactivation des HAP (Endo *et al.*, 2008; Reed *et al.*, 2018; Shiizaki *et al.*, 2017; Uno *et al.*, 2006).

ii. Phase II de conjugaison

La phase II est une étape de conjugaison des HAP avec des groupements endogènes polaires, comme les groupements glucuronides, sulfates et glutathions, dans le but d'augmenter la solubilité des composés. Ainsi, certains métabolites issus de la phase I, sont pris en charge par des enzymes de la famille des glutathion-S-transférases (GST), des sulfotransférases (SULT) ou encore de UDP-glucuronyl transférases (UGT). L'ajout de ces groupements favorise l'élimination des HAP lors de la phase III.

iii. Phase III de transport

La phase III permet l'excrétion des conjugués des HAP en dehors de la cellule par des transporteurs membranaires de la famille ABC (*ATP-binding cassette*) tels que les MRP (*Multidrug resistance protein*) (Gelhaus *et al.*, 2012; Hessel *et al.*, 2013) ou les BCRP (*Breast cancer resistance protein*) (Ebert *et al.*, 2005). L'excrétion peut se faire par le sang ou la bile.

d. Excrétion

Une fois métabolisés, la plupart des métabolites des HAP sont excrétés dans les urines, la bile et les fèces. Environ 80-90 % de l'élimination aurait lieu par les fèces après excrétion dans la bile (FIGURE 2). Un recyclage entéro-hépatique des HAP a été démontré. Les HAP, mais surtout leur métabolites réactifs seraient alors présents plus longtemps dans l'organisme (Ramesh *et al.*, 2004).

6. Effet toxiques des HAP

Les HAP provoquent de nombreux effets toxiques au niveau de l'organisme, ceux concernant le foie ne seront pas présentés ici mais seront développés dans le paragraphe *I.C. Hépatotoxicité des HAP en page 51*.

a. Toxicité aiguë

Jusqu'à présent, très peu d'études chez l'Homme existent concernant la toxicité aiguë des HAP, mis à part pour le naphtalène qui peut conduire, à fortes concentrations, à des maux de tête, des nausées, des vomissements, des diarrhées et à la présence de sang dans les urines, ou dans les cas sévères à des troubles de conscience et des comas (IPCS, 1998). Des études chez les

rongeurs montrent que la toxicité aiguë, par voie orale, est modérée voire faible, la valeur de LD₅₀ (*lethal dose 50*) pour le BaP étant supérieure à 1600 mg/kg b,w et pour le PYR, proche de 600 mg/kg (SCF, 2002).

b. Toxicité chronique

En dehors du foie, l'exposition chronique de rongeurs au PYR (INERIS, 2006b), au DBahA (INERIS, 2006a) ou au BaP (INERIS, 2006c), par voie orale, entraîne des dommages rénaux, de l'estomac ou immunologiques. D'autres études sur le naphthalène, anthracène, fluorène et phénanthrène montrent des effets similaires au **niveau systémique**.

Les HAP présentent aussi des **effets sur la reproduction et le développement**, qui ont été davantage décrits pour le BaP et le naphthalène chez les rongeurs. Ils provoquent des effets toxiques sur le développement fonctionnel des testicules et de l'ovaire et sur la croissance du fœtus (Archibong *et al.*, 2002) et entraînent des malformations congénitales (Ramesh *et al.*, 2017). Chez l'Homme, une exposition aux HAP, dans l'air ambiant, durant la grossesse serait corrélée à des effets négatifs, comme un risque élevé de mort fœtale, un risque élevé de naissance prématurée, un retard de croissance intra-utérin ou un poids faible à la naissance (Parodi *et al.*, 2014). Une exposition *in utero* aux HAP pourrait également être associée à des défauts de développement cognitif et intellectuel mais aussi être corrélée à une infertilité masculine, caractérisée par une diminution de la taille des testicules et de la production de sperme (Madeen and Williams, 2017).

Il existe de nombreuses études mettant en évidence les différents **effets cancérigènes** des HAP chez le rongeur (**TABLEAU 6**). En particulier, une exposition au BaP entraîne la formation, chez les rongeurs, de tumeurs mammaires, pulmonaires, gastriques, de l'estomac notamment et une exposition au DBahA provoque la formation d'adénomes pulmonaires et des papillomes de l'estomac chez les souris (IARC, 2010; IPCS, 1998; SCF, 2002). L'implication des HAP dans la formation de cancers du foie est développée dans le paragraphe *I.C.1 Implication des HAP dans les maladies du foie en page 51*. Chez l'Homme, une exposition dans le milieu professionnel, aux HAP serait corrélée à une augmentation du risque de cancer de la peau, des poumons et de la vessie (CIRC, 2010).

Par leur capacité à induire des dommages à l'ADN *via* leur métabolisme, un grand nombre d'HAP sont considérés comme étant génotoxiques. De très nombreuses études *in vitro* et *in vivo* de tests de mutations, de dommages à l'ADN ont permis de classer les HAP selon leur génotoxicité (**TABLEAU 6**) (SCF, 2002). Le classement CIRC est réalisé en fonction des données épidémiologiques existantes chez l'Homme et des données expérimentales chez l'animal permettant de faire le lien entre exposition au HAP et survenue de cancer (CIRC, 2010). Au niveau mécanistique, le lien entre la formation d'adduits à l'ADN, de mutations et la survenue de cancers suite à une exposition aux HAP est souvent effectué. Néanmoins, d'autres mécanismes pourraient

être à l'origine de l'initiation ou de la promotion de la cancérogénèse, si bien que la génotoxicité d'un HAP ne serait pas l'unique propriété permettant de décrire les risques cancérogènes liés à son exposition.

Tableau 6 : Génotoxicité et cancérogénicité des HAP
d'après les données SCF 2002 et le classement du CIRC.

Nom	Génotoxiques SCF	Cancérogènes CIRC
Naphtalène	/	2B
Acénaphtylène	/	/
Acénaphène	/	3
Fluorène	/	3
Anthracène	NON	3
Phénanthrène	Oui ?	3
Fluoranthène	Oui ?	3
Pyrène	NON	3
Benzo(a)anthracène	OUI	2B
Chrysène	OUI	2B
Benzo(a)pyrène	OUI	1
Benzo(b)fluoranthène	OUI	2B
Benzo(k)fluoranthène	OUI	2B
Dibenzo(a,h)anthracène	OUI	2A
Benzo(g,h,i)pérylène	OUI	3
Indeno(1,2,3-cd)pyrène	OUI	2B

Classement SCF OUI : données positives *in vitro* et *in vivo* suffisantes, NON : données négatives *in vitro* et *in vivo* suffisantes, Oui ? : données mixtes positives et négatives *in vitro* et *in vivo*, / : données insuffisantes.

Classement CIRC 1 : agent cancérogène, 2A : agent probablement cancérogène, 2B : agent possiblement cancérogène, 3 : agent inclassable quant à sa cancérogénicité.

B. Mécanismes d'action toxique des HAP

Les HAP sont à l'origine de nombreux effets biologiques dommageables. Beaucoup de ces effets sont décrits pour être liés à l'activation du récepteur aux hydrocarbures aromatiques AhR (*arylhydrocarbon receptor*), facteur de transcription modulant l'activité de nombreux gènes. Les HAP pourraient interagir avec d'autres récepteurs qui induiraient aussi des effets toxiques.

1. Activation du récepteur aux hydrocarbures aromatiques AhR

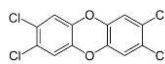
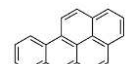
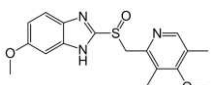
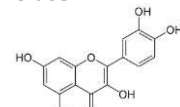
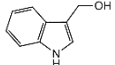
L'AhR est un facteur de transcription activé par des ligands, reconnu comme médiateur de nombreux effets toxiques et cancérigènes d'une variété de contaminants de l'environnement, comme la dioxine mais aussi les hydrocarbures aromatiques polycycliques. L'activation du récepteur AhR permet la régulation de nombreux gènes impliqués notamment dans le métabolisme des xénobiotiques, comme les CYP450. Bien que ces effets ne soient pas développés dans la suite du paragraphe, le récepteur AhR activé peut intervenir dans différents processus au niveau cellulaire, comme la régulation du cycle cellulaire (Larigot *et al.*, 2018), d'interactions protéiques (Beischlag *et al.*, 2008), de mécanismes épigénétiques (Tarnow *et al.*, 2019) et la modulation de voies de signalisation pouvant ainsi participer aux phénomènes d'inflammation, de prolifération cellulaire (Larigot *et al.*, 2018) ou bien aux mécanismes de cancérogénèse (Murray *et al.*, 2014).

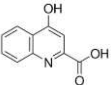
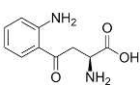
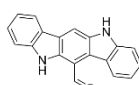
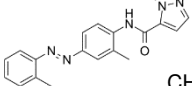
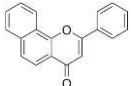
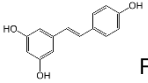
a. Le récepteur aux hydrocarbures aromatiques AhR

i. Ligands de l'AhR

L'AhR est un récepteur qui peut être activé par une multiplicité de ligands exogènes et endogènes (TABLEAU 7). Parmi les ligands exogènes, se trouvent les xénobiotiques, comme la 2,3,7,8-tétrachlorodibenzo-p-dioxine (TCDD) (dioxine), le ligand le plus étudié pour les études sur l'AhR, et les HAP (TABLEAU 7). Par ailleurs, l'AhR possède des ligands qui agissent comme des antagonistes comme l' α -naphthoflavone ou le CH223191 (Bock and Köhle, 2009).

Tableau 7 : Ligands d'AhR (adapté de Murray et al, 2014)

AGONISTES	
Xénobiotiques	<p>Polluants</p> <div style="display: flex; justify-content: space-around; align-items: center;"> <div style="text-align: center;">  <p>TCDD (dioxine)</p> </div> <div style="text-align: center;">  <p>HAP (benzo(a)pyrène)</p> </div> </div>
	<p>Médicaments</p> <div style="text-align: center;">  <p>Oméprazole</p> </div>
Nutriments	<p>Flavonoïdes</p> <div style="text-align: center;">  <p>Quercétine</p> </div>
	<p>Indoles</p> <div style="text-align: center;">  <p>Indole-3-carbinol</p> </div>

Endogènes	Métabolites du tryptophane		
	 Acide kynurénique	 Kynurénine	 FICZ
ANTAGONISTES			
Xénobiotiques	 CH223191		 α-naphthoflavone
	 Resvératrol		

FICZ : 6-Formylindolocarbazole, TCDD : 2,3,7,8-tétrachlorodibenzo-p-dioxine

La TCDD est un puissant ligand d'AhR et sert de référence. Ainsi, l'activation de l'AhR par le BaP est nettement inférieure à celle par la TCDD (celle de la TCDD correspond à 10^5 celle du BaP à 24 h). Au sein des HAP, il existe des ligands à forte affinité pour le récepteur AhR, comme le DBaH ou le benzo(k)fluoranthène et des ligands faibles, comme le PYR ou le fluoranthène (TABLEAU 8).

Tableau 8 : Activation de l'AhR par les HAP dans les hépatocytes
de lignées cellulaires H4IIE (issues d'un hépatome de rat) ou HepG2 (hépatome humain) d'après Machala et al., 2001; Vondráček et al., 2017

HAP		Induction de l'AhR par rapport au BaP à 6 h	
		(Machala et al., 2001)	(Vondráček et al., 2017)
Ligands faibles	Fluorène	n.s	n.s
	Anthracène	n.s	n.s
	Phénanthrène	/	n.s
	Fluoranthène	$1,05 \times 10^{-2}$	n.s
	Pyrène	$7,57 \times 10^{-3}$	n.s
	Benzo(a)anthracène	0,39	0,4
	Benzo(ghi)pérylène	$5,47 \times 10^{-3}$	f.i
Ligands forts	Chrysène	3,25	3,3
	Benzo(a)pyrène	1	1
	Benzo(b)fluoranthène	8,83	8,8
	Benzo(k)fluoranthène	67,76	67,8
	Dibenzo(ah)anthracène	11,46	44,2
	Indeno(1,2,3-cd)pyrène	44,2	11,5
	TCDD	100	1000

Induction donnée par rapport au BaP dont la valeur est attribuée à 1.
n.s: induction non significative, / : non étudié, f.i : faible induction, non mesurée.

ii. Structure de l'AhR

Le récepteur AhR est un facteur de transcription de type β HLLH-PAS (*Basic helix-loop-helix – period/ARNT/Single minded*). Il comprend plusieurs domaines (Abel and Haarmann-Stemmann, 2010) (FIGURE 4) :

- le domaine β HLLH permet la liaison avec l'ADN, l'interaction avec les protéines chaperonnes Hsp90 (*Heat shock protein 90*) et la dimérisation avec l'ARNT (*AhR nuclear translocator*) et contient aussi des séquences permettant l'importation et l'exportation nucléaire ;
- le domaine PAS est impliqué dans la dimérisation avec l'ARNT et la liaison avec le ligand ;

- le domaine TAD (*transactivation domain*) permet le recrutement de co-activateurs et co-répresseurs impliqués dans la régulation de l'activité transcriptionnelle.

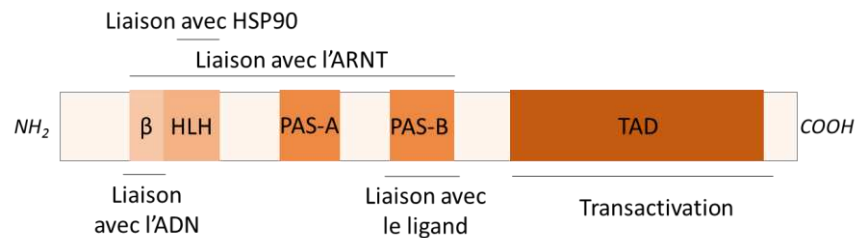


Figure 4 : Structure du récepteur AhR (adapté de Larigot 2018)

iii. Activation de l'AhR

Le récepteur AhR sous sa forme inactive forme un complexe cytosolique avec plusieurs protéines. Ainsi, l'AhR est lié à deux protéines chaperonnes Hsp90, permettant son bon repliement tridimensionnel, à une protéine co-chaperonne p23, permettant la stabilisation des protéines Hsp90 et sa bonne conformation, à une molécule XAP2 (*HBV X-associated protein 2*) ou AIP (*AH receptor-interacting protein*), favorisant sa localisation cytosolique et sa protection contre la dégradation par le protéasome (Beischlag *et al.*, 2008) et enfin à une protéine Src tyrosine kinase qui pourrait intervenir dans les effets non génomiques du récepteur (Esser and Rannug, 2015). Après fixation d'un ligand, la kinase Src est libérée du complexe, deux voies de signalisation se distinguent alors : une voie génomique entraînant l'activation transcriptionnelle de gènes présentant des séquences XRE (*Xenobiotic response element*) et une voie non génomique où l'activité se développe sans régulation transcriptionnelle (Matsumura, 2009) (FIGURE 5).

α) Voie génomique

Le récepteur AhR subit une translocation rapide dans le noyau où il se dimérise avec son partenaire l'ARNT. Ceci entraîne la libération des protéines chaperonnes du complexe. Le complexe ARNT-AhR alors actif, reconnaît et se fixe à des séquences XRE de l'ADN. Ces séquences sont présentes dans les promoteurs des gènes cibles activant ainsi leur transcription (Abel and Haarmann-Stemann, 2010) (FIGURE 5). Parmi les gènes régulés par l'AhR, se trouvent des enzymes du métabolisme : CYP1A1, A2, 1B1, ADH3, UGT1A1 et GST ; des transporteurs : MDR1 et BCRP ; et le répresseur de l'AhR, AhRR (*Aryl hydrocarbon receptor repressor*) (Beischlag *et al.*, 2008). Lorsque la régulation transcriptionnelle a eu lieu, l'AhR est rapidement neutralisé par son répresseur AhRR ou dégradé par le protéasome, suite à une exportation du noyau vers le cytoplasme (Abel and Haarmann-Stemann, 2010; Barouki *et al.*, 2012).

β) Voie non génomique

L'AhR peut également avoir des effets sans régulation transcriptionnelle (FIGURE 5). L'activation d'AhR pourrait participer à l'augmentation précoce de la concentration cytosolique en calcium.

Celui-ci pourrait provenir de l'ouverture des canaux calciques présents dans la membrane plasmique ou le réticulum endoplasmique, ce qui entraînerait l'activation de la protéine kinase C alpha à l'origine de l'activation de la phospholipase A2 et donc la production de l'acide arachidonique (Larigot *et al.*, 2018). De plus, l'activation fonctionnelle de la tyrosine kinase Src, libérée du complexe, participe à l'activation de la voie de signalisation des MAP kinases (MAPK : *Mitogen-activated protein kinases*). Il a été également rapporté que l'AhR activé pouvait interagir directement avec différents acteurs de voies de signalisation comme NFκB (*Nuclear factor-kappa B*), Wnt/β-caténine ou ERα (*Estrogen receptor alpha*) et ainsi moduler leurs actions (Esser and Rannug, 2015).

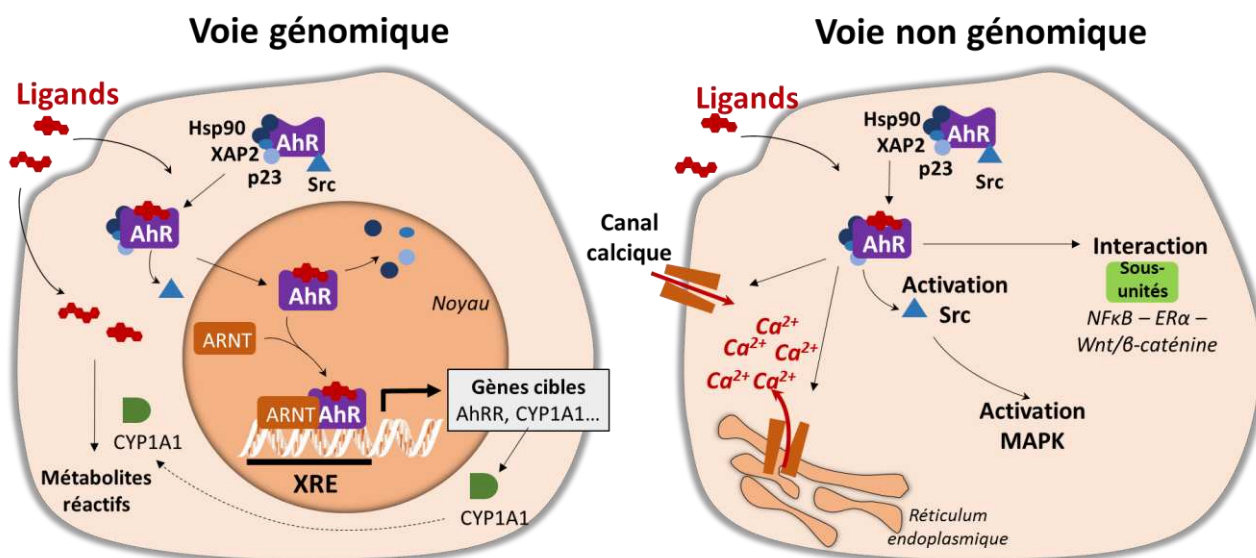


Figure 5 : Voies génomique et non génomiques de l'activation du récepteur AhR

b. Effets de l'activation de l'AhR par les HAP

i. Effets génomiques

α) Métabolisme des xénobiotiques

L'activation d'AhR par les HAP permet l'expression de gènes impliqués dans leur propre métabolisme. En effet, suite à l'activation d'AhR par le BaP, une augmentation de l'expression de certaines enzymes de la phase I de fonctionnalisation : CYP1A1, CYP1A2 et CYP1B, ainsi que AKR10 (*Aldo-keto reductase 10*) (Nebert *et al.*, 2004; Vondráček *et al.*, 2009), est observée. Une augmentation de l'expression des enzymes de la phase II de conjugaison, comme GST (Cai *et al.*, 2016; N'jai *et al.*, 2011; Wang *et al.*, 2009b), dépendant de l'activation de l'AhR est également retrouvée suite à une exposition au BaP. Enfin une élévation de l'expression de la protéine BCRP, transporteur impliqué dans la phase 3 du métabolisme, dépendante d'AhR est entraînée par une exposition à différents HAP dont le BaP (Ebert *et al.*, 2005)

β) Métabolisme des lipides

L'activation du récepteur AhR par les HAP est à l'origine d'effets sur le métabolisme lipidique en altérant l'expression d'enzymes impliquées dans ce métabolisme (TABLEAU 9). Une réduction de la β -oxydation des acides gras (Westman *et al.*, 2013) a été identifiée dans le foie d'embryons de poulet après traitement par les 16 HAP prioritaires d'après l'US-EPA. Par ailleurs, le BaP entraîne une augmentation de l'expression du facteur de transcription SREBP1 (*Sterol regulatory element-binding protein 1*), impliqué dans la synthèse *de novo* des triglycérides et une diminution de l'expression du facteur de transcription PPAR α (*Peroxisome proliferator-activated receptor alpha*), impliqué dans la β -oxydation des acides gras dans le foie de souris et dans les hépatocytes en culture (Zhu *et al.*, 2020). Ces modifications sont à l'origine de l'accumulation de gouttelettes lipidiques dans les hépatocytes (Zhu *et al.*, 2020). Enfin, une diminution de l'expression des enzymes *chain acyl CoA synthetase* (Carvalho and Lettieri, 2011) et SCD1 (*Stearoyl-CoA desaturase 1*) (Podechard *et al.*, 2011), est observée chez les diatomées, après un traitement par le BaP et dans des cellules hépatiques, après exposition au 1-nitropyrene. Ainsi, les HAP sont capables d'altérer la composition lipidique des membranes et des cellules en diminuant les quantités de phospholipides, de cholestérol et d'acides gras (Debiane *et al.*, 2011).

Tableau 9 : Implication d'AhR dans l'altération du métabolisme des lipides induit par les HAP

Effet	Fonction	Modèle et exposition	Exposition HAP	Méthode utilisée	Références
↘ ARNm Ncp1	Transport du cholestérol des lysosomes vers la membrane plasmique	Macrophages primaires humains	BaP 1 μ M 24 h	KO AhR	(Podechard <i>et al.</i> , 2009)
↘ ARNm + protéine HMGCoA reductase	Enzyme participant à la synthèse du cholestérol	Cellules épithéliales du foie de rat F258	BaP 50 nM 24 h	α -NF siARN AhR	(Tekpli <i>et al.</i> , 2010)
↘ cholestérol	-				
↗ ARNm PPARδ et LPIN	Biosynthèse des lipides	Hépatocytes Hepa1c1c7	BaP 50 nM ou 5 μ M 24 h	KO AhR	(Michaelson <i>et al.</i> , 2011)
↗ ARNm Npc1 , Ospb12 , et Pitpnc1	Transports des lipides	Hépatocytes primaires de rat	BaP 20 μ M 48 h	CH223191	(Neuschäfer-Rube <i>et al.</i> , 2015)
↗ ARNm Slc13a5	Echangeur membranaire sodium/citrate impliqué dans la synthèse <i>de novo</i> des acides gras	Kératinocytes HaCaT	BaP 1 μ M ou dibenzo(a,l) pyrène 10 nM 48 h	KO AhR	(Potratz <i>et al.</i> , 2016)
↗ de la synthèse de lysophosphatidylcholine et sphingomyéline	Composants des membranes biologiques impliqués dans la signalisation cellulaire, le trafic intracellulaire et l'inflammation mais aussi la mort cellulaire				
↘ de la glycolyse , du cycle de Krebs et de la β-oxydation	Evènements impliqués dans la biosynthèse de lipides et la production d'ATP				
↘ synthèse des lipides	-	Sébocytes SZ95	BaP 10 μ M 24 h	shARN AhR	(Hu <i>et al.</i> , 2016)

Ncp1 : NPC intracellular cholesterol transporter 1, *HMGCoA* : Hydroxyméthylglutaryl-CoA, *PPAR δ* : Peroxisome proliferator-activated receptor delta, *LPIN* : Lipin Phosphatidate phosphatase, *Ospb12* : Oxysterol binding protein like 2, *Pitpnc1* : Phosphatidylinositol transfer protein cytoplasmic 1, *Slc13a5* : Solute carrier family 13 member 5; KO: Knock-out, α -NF : alpha-naphtoflavone, antagoniste non spécifique de l'AhR car inhibiteur de l'activité du CYP1A1, CH223191 : antagoniste spécifique de l'AhR.

x) Mort cellulaire

Les HAP sont capables d'induire la mort cellulaire par différents mécanismes (*cf I.C.2 Morts cellulaires induites par les HAP dans le foie en page 54*). L'activation d'AhR est impliquée dans la mort cellulaire induite par les HAP. En effet, l'utilisation d'antagonistes connus de l'AhR, comme l' α -NF (non spécifique car aussi inhibiteur de l'activité du CYP1A1) ou le CH223191, antagoniste spécifique d'AhR ou de modèles déficients en AhR, permet de mettre en évidence l'importance de l'activation de l'AhR dans la mort cellulaire observée (**TABLEAU 10**).

Tableau 10 : Implication d'AhR dans la mort cellulaire induite par les HAP

Type de mort	Modèle	Exposition HAP	Méthode utilisée	Références
Apoptose	Lymphocytes B cultivés en présence de cellules stromales	Dimethylbenz(a)anthracène 100nM, 1 μ M 24 h	α -NF KO AhR	(Allan <i>et al.</i> , 2003; Mann <i>et al.</i> , 1999; Yamaguchi <i>et al.</i> , 1997)
Apoptose	Cellules germinales d'ovaires de fœtus	Dimethylbenz(a)anthracène dihydrodiol 0,01-1 μ M 24 h	α -NF	(Matikainen <i>et al.</i> , 2002)
Apoptose	Cellules épithéliales du foie F258	BaP 50 nM 72 h	α -NF	(Huc <i>et al.</i> , 2003, 2004)
Nécrose	Hépatocytes Hepa1c1c7	BaP ou cyclopenta(c,d)pyrène 20 μ M 24 h	α -NF	(Solhaug <i>et al.</i> , 2005, 2004a)
Apoptose	Hépatocytes HepG2	1-nitropyrene 25 μ M 24 h	α -NF	(Su <i>et al.</i> , 2008)
Apoptose	Cellules épithéliales du foie F258	BaP 50 nM 72 h	siARN AhR	(Tekpli <i>et al.</i> , 2010)
Apoptose	Hépatocytes WIF-B9	BaP 0.1 μ M 96 h	α -NF CH223191	(Collin, 2013)
Autophagie	Kératinocytes HaCaT	BaP 2.5 μ M 6 h	KO AhR	(Das <i>et al.</i> , 2017)
Apoptose	Hépatocytes WIF-B9	BaP 10 nM 5 jours	α -NF CH223191	(Tête <i>et al.</i> , 2018)

ii. Effets non génomiques

α) Activation de Src

La fixation de la TCDD à l'AhR est à l'origine de la libération de la tyrosine kinase Src du complexe AhR, ce qui provoque son activation. La kinase Src peut alors activer à son tour la cascade des MAPK. Cette voie de signalisation est bien connue pour participer à plusieurs phénomènes cellulaires, comme la migration, la prolifération ou la survie cellulaire (Matsumura, 2009).

A l'heure actuelle, bien que plusieurs études aient mis en évidence l'activation de la voie MAPK, dans des cellules traitées par les HAP (Andryśík *et al.*, 2011; Chramostová *et al.*, 2004), sans en expliquer le mécanisme, une seule montre cette activation suite à la phosphorylation de Src, dans les cellules de l'épithélium bronchique humain BEAS-2B exposées aux HAP (Vázquez-Gómez *et al.*, 2018).

Par ailleurs, l'activation de cette voie non-génomique participerait à l'induction de l'expression du CYP1A1 et des dommages à l'ADN qui en résultent *via* un entrecroisement avec la voie génomique de l'AhR. En effet, l'activation des kinases Src et ERK1/2 (*Extracellular signal-regulated kinases1/2*) favorise la translocation nucléaire de l'AhR et l'induction de l'expression du CYP1A1 (Vázquez-Gómez *et al.*, 2018). La Src, une fois libérée, pourrait être à l'origine d'une phosphorylation indispensable à la translocation d'AhR dans le noyau. En plus, la Src en activant la cascade des MAPK pourrait provoquer plusieurs phosphorylations de l'AhR, ce qui faciliterait sa liaison à l'ADN et donc l'expression de gènes cibles.

β) Signalisation calcique

La voie non génomique de l'AhR est également à l'origine d'une augmentation de la signalisation calcique après seulement quelques minutes d'exposition à la TCDD. Par conséquent, cela précède l'activation génomique et la transcription de gènes cibles (Matsumura, 2009). Une seule équipe met en évidence l'activation de la signalisation calcique par la voie non génomique de l'AhR suite à l'exposition à un HAP, le PYR dans les cellules endothéliales HMEC-1 (Brinchmann *et al.*, 2018b). Le PYR, ligand faible d'AhR (*cf* [Tableau 8 en page 41](#)), se fixerait en fait sur le récepteur AhR dans sa conformation antagoniste, non activée. Cette fixation n'entraîne pas la translocation de l'AhR dans le noyau, mais dans un premier temps, la libération du calcium des réserves intracellulaires contenues dans le réticulum endoplasmique, puis dans un second temps, une entrée de calcium dans les cellules. Cette entrée de calcium pourrait être reliée à l'altération des radeaux lipidiques induits par le PYR dans les cellules endothéliales. Dans les cellules HMEC-1 exposées à la fraction lipophile des particules d'échappement des moteurs diesel contenant des concentrations élevées en différents HAP, les mêmes effets sur la concentration cytosolique en calcium sont observés (Brinchmann *et al.*, 2018a). La signalisation calcium dépendante est donc activée et pourrait être responsable des effets toxiques des HAP observés, puisque cette signalisation est bien connue pour intervenir dans l'inflammation ou encore dans la régulation de la pression artérielle ou de l'angiogenèse. Par ailleurs, il a été montré que l'AhR co-localiserait avec la caveoline-1 (Rey-Barroso *et al.*, 2014) dans les cavéoles, domaines plus rigides de la membrane, mais également domaines de régulation de la signalisation calcique (Brinchmann *et al.*, 2018a).

2. Mécanismes AhR indépendants

a. Activation d'autres récepteurs aux xénobiotiques : les récepteurs PXR et CAR

Le récepteur AhR n'est pas le seul récepteur impliqué dans la transcription des enzymes du métabolisme CYP450 suite à une exposition à des xénobiotiques. Parmi les autres récepteurs, se distinguent les récepteurs nucléaires PXR (*Pregnane X receptor*) et CAR (*Constitutive androstane receptor*) (Hakkola *et al.*, 2018) ([FIGURE 6](#)).

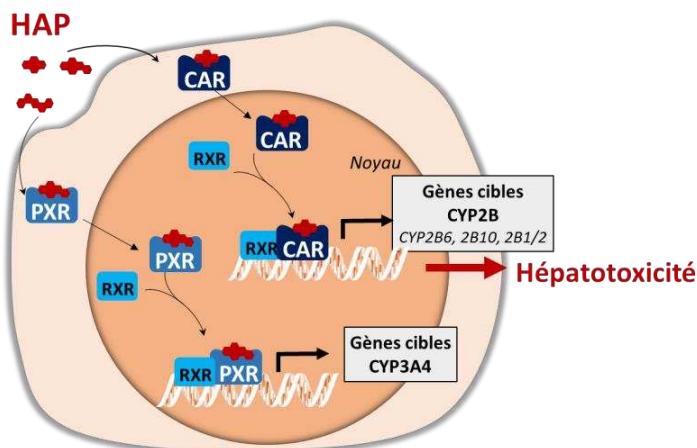


Figure 6 : Activation des récepteurs PXR et CAR par les HAP.

Après fixation du ligand, les récepteurs CAR ou PXR se dimérisent avec le récepteur X de rétinoïdes (RXR).

Le récepteur PXR, facteur de transcription, est le principal régulateur de l'expression du CYP3A4. Ce CYP est connu pour participer au métabolisme des médicaments. Certains HAP, comme le BaP et le 3-méthylcholanthrène (3-MC), peuvent induire l'expression du CYP3A4 dans les hépatocytes HepG2 et Huh-7 (Kumagai *et al.*, 2012) de façon AhR indépendante et de façon PXR dépendante. Le BaP, benzo(c)phenanthrène et le dibenzo(a,l)pyrène ainsi que leur métabolites issus de la phase I (dihydrodiols et diols époxydes) sont aussi des ligands du récepteur PXR dans les cellules HepG2 (Luckert *et al.*, 2013).

Le récepteur CAR, de la même manière que PXR, est un important régulateur du métabolisme des xénobiotiques et principalement les CYP2B (CYP2B6 chez l'homme, CYP2B10 chez la souris et CYP2B1/2 chez le rat) et son activation peut être à l'origine de la toxicité hépatique induite par différents médicaments, comme le phénobarbital (Wei *et al.*, 2000, 2002).

Récemment, le récepteur CAR a été mis en évidence comme pouvant induire certains effets toxiques des HAP, notamment du PYR dans le foie de souris (Lee *et al.*, 2007). Ainsi, le PYR provoque une augmentation de l'expression du récepteur CAR dans le foie de souris (Zhang *et al.*, 2015) et de rats (Zhu *et al.*, 2018) ainsi que son activation, caractérisée par une augmentation de l'expression de ses gènes cibles. L'augmentation de l'activité d'hydroxylation et de sulfatation du PYR chez les souris AhR^{-/-} suggère la participation du récepteur CAR au métabolisme du PYR (Lee *et al.*, 2007). Dans le foie de souris et de rats, l'activation de CAR par le PYR intervient dans l'expression des enzymes du métabolisme CYP1A2, CYP3A11, GST, SUL1A1 (Zhang *et al.*, 2015) et CYP2B1, CYP2B2 (Zhu *et al.*, 2018), respectivement. Dans les hépatocytes primaires humains, l'augmentation de l'expression du CYP2B6, gène cible de CAR montrerait l'activation de CAR par le PYR également (Zhang *et al.*, 2015). Cette activation de CAR, par le PYR, est à l'origine de dommages dans le foie de souris et de rats (Zhang *et al.*, 2015; Zhu *et al.*, 2018). Les auteurs suggèrent que ces dommages induits par le PYR, suite à l'activation de CAR, pourraient être dus

à la mise en évidence dans le foie d'une déplétion en glutathion (GSH), important antioxydant (Zhang *et al.*, 2015; Zhu *et al.*, 2018).

De façon semblable, le phénanthrène est capable d'activer le récepteur CAR dans les hépatocytes primaires humains et dans la lignée HepG2, ainsi que dans le foie de souris CAR +/- (Yang *et al.*, 2019). Ceci se traduit par une augmentation de l'expression du CYP2B6 dans les hépatocytes humains et du CYP2B10 dans le foie de souris. L'activation du récepteur CAR par le phénanthrène provoque aussi une hépatotoxicité chez la souris marquée par une nécrose hépatocellulaire et une diminution du GSH.

b. Signalisation adrénérgique

Les HAP peuvent perturber la signalisation β -adrénérgique et activer les récepteurs β -adrénérgiques.

D'une part, les HAP peuvent induire un **dysfonctionnement des voies β -adrénérgiques**. L'activation de ces voies par l'épinéphrine peut être inhibée par le BaP dans les cellules endothéliales (Mayati *et al.*, 2017) et dans les adipocytes (Irigaray *et al.*, 2006) ou par un mélange de 8 HAP (benz[a]anthracène, chrysène, benzo[b]fluroanthène, benzo[k]fluroanthène, benzo[a]pyrène, indeno[1,2,3-cd]pyrène, dibenzo[a,h]anthracène, benzo[g,h,i]perylène et pyrène) dans les cellules épithéliales et les cellules musculaires lisses des voies respiratoires (Factor *et al.*, 2011). Les HAP provoquent, en fait, la diminution de l'expression membranaire et l'activité de ces récepteurs β -adrénérgiques.

D'autre part, les HAP peuvent provoquer une **augmentation de la concentration en calcium** par activation des récepteurs β 2-adrénérgiques (β 2-AR) (FIGURE 7). L'augmentation du calcium, suite à une exposition au BaP, dans les cellules endothéliales HMEC-1 peut être inhibée par l'utilisation d'antagonistes pharmacologiques de β 2-AR, des anticorps anti- β 2-AR et des siARN β 2-AR et est amplifiée dans les cellules embryonnaires rénales HEK293 surexprimant le récepteur β 2-AR (Mayati *et al.*, 2012). Le BaP est en fait capable de se lier au récepteur β 2-AR, un récepteur membranaire de la famille des GPCR (récepteur couplé à une protéine G). Il active alors la voie de signalisation associée à ce récepteur qui est à l'origine de l'influx de calcium dans le cytosol. En plus, l'activation du récepteur β 2-AR par le 1-nitropyrene (Mayati *et al.*, 2014), un dérivé nitrosylé des HAP associé aux particules diesel, ou par des extraits organiques de particules diesel eux-mêmes (Brinchmann *et al.*, 2019), contenant des HAP, permet la régulation positive de la signalisation calcique à l'origine de la réponse de la chimiokine CXCL-8 (*Chemokine (C-X-C motif) ligand 8*) dans les cellules épithéliales bronchiques BEAS-2B.

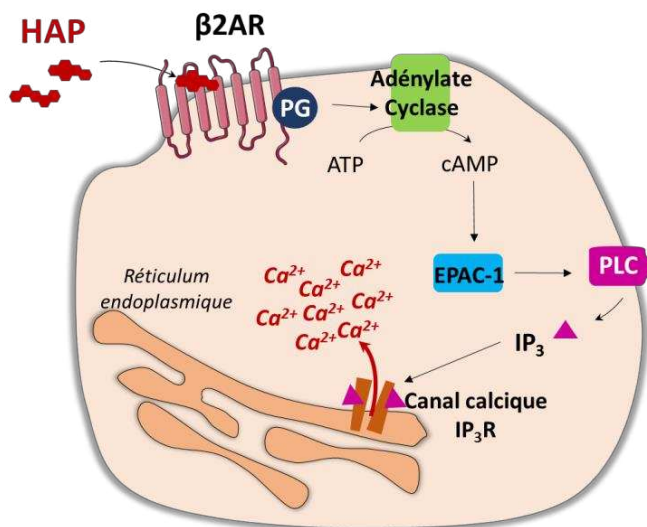


Figure 7 : Activation de la signalisation calcique liée au récepteur β 2-AR par les HAP

La fixation du BaP sur le β 2-AR active de manière séquentielle, la protéine G (PG), l'adénylate cyclase, la formation d'AMPc, l'activation de la protéine Epac-1 à l'origine de la formation de l'inositol 1,4,5-trisphosphate (IP3) par la phospholipase C (PLC). L'IP3 ainsi formé se fixe alors sur les récepteur IP3R du réticulum endoplasmique permettant la mobilisation et la sortie du Ca^{2+} (Mayati *et al.*, 2012).

c. Signalisation œstrogénique

La ressemblance stérique des HAP avec les stéroïdes leur permet de se fixer aux récepteurs des hormones stéroïdiennes. Les HAP et leur métabolites hydroxylés présentent aussi bien des activités œstrogéniques qu'anti-œstrogéniques (Zhang *et al.*, 2016c) et sont donc des agonistes ou antagonistes des récepteurs aux estrogènes (ER) : ER α ou ER β . Le BaP et le DBaH possèdent plutôt des activités anti-œstrogéniques (Ohta *et al.*, 2012) tandis que les métabolites hydroxylés du BaP, les 3-OH BaP et 9-OH BaP, présentent une activité œstrogénique. Ces derniers permettent l'activation du récepteur ER α dans des cellules du cancer du sein MCF-7 (Charles *et al.*, 2000). Le métabolite hydroxylé du PYR, le 1-OH PYR, posséderait également, bien que plus faible, une activité œstrogénique (Kamiya *et al.*, 2005; Wenger *et al.*, 2009).

3. Formation d'adduits à l'ADN par les métabolites réactifs des HAP

Le métabolisme des HAP peut provoquer la formation de métabolites électrophiles très réactifs (cf I.A.5.c ci-dessus Métabolisme des HAP en page 35) capables d'interagir avec l'ADN. Les effets cancérigènes des HAP sont principalement associés à la formation de ces adduits à l'ADN. Lorsque ces dommages ne sont pas réparés, ils conduisent à des mutations qui peuvent participer à l'étape d'initiation de la cancérogénèse. Ces dommages sont également à l'origine de l'activation de p53, protéine impliquée dans le déclenchement de la mort cellulaire (cf I.C.2.b.ii Activation de p53 et perturbation de la mitochondrie en page 62). Les trois voies du métabolisme des HAP sont à l'origine de la **formation de métabolites capables de réagir avec l'ADN** :

- dans la **voie des diol-époxydes**, la formation du BPDE issu du BaP et les 3,4-diol et 10,11-diol issus du DBahA sont capables de se lier de façon covalente avec les groupements amines des purines de l'ADN formant ainsi des adduits stables ; ces métabolites réagissent de préférence avec le groupement amine en position 2 (N2) de la guanine et le groupement amine en position 6 (N6) de l'adénine (Xue and Warshawsky, 2005) ;
- le **radical cation** du BaP est capable de réagir en position N7 ou en C8 avec les déoxyguanosines et déoxyadénosines formant des liaisons instables ; ceci entraîne la dépurination spontanée de l'ADN et la formation de sites abasique (Ewa and Danuta, 2017) ;
- le BaP-7,8-dione, issu de l'activation du BaP par la **voie des o-quinones**, peut former des adduits instables avec l'ADN au niveau du groupement amine N7 de la déoxyguanosine résultant en une dépurination de l'ADN ; il peut aussi former des adduits stables avec la déoxyguanosine et le déoxyadénosine (Ewa and Danuta, 2017).

4. Inhibition de la communication intercellulaire par les jonctions gap

Les HAP peuvent inhiber la communication intercellulaire *via* les jonctions gap (GJIC : *gap junctional intercellular communication*). Dans les cellules épithéliales du foie WB-F344, plusieurs HAP sont capables d'inhiber cette communication, particulièrement ceux considérés comme étant non-génotoxiques et avec une activité carcinogène faible (Blaha, 2002). Le fluorène, le phénanthrène, le PYR et le fluoranthène, des HAP de faible poids moléculaire composés de 3 ou 4 cycles aromatiques se trouvent aussi parmi ces HAP ainsi que le BaP. Cette inhibition précoce et maximale après 30 minutes de traitement, exclut un mécanisme dépendant de l'activation de l'Ahr et du métabolisme par les CYP (Bolotina *et al.*, 2009; Sharovskaja *et al.*, 2004). Les HAP, par leur caractère lipophile, seraient capables de s'intégrer à la membrane plasmique, ce qui modifierait l'environnement membranaire conduisant à l'altération des jonctions gap (Barhoumi, 2000). Il faut toutefois noter que ces effets sont observés pour des concentrations en HAP élevées de l'ordre de la dizaine de micromolaire.

C. Hépatotoxicité des HAP

Quelle que soit la voie d'exposition aux HAP, ceux-ci peuvent atteindre le foie (cf I.A.5 *Toxicocinétique des HAP en page 33*), organe clé pour leur métabolisme et l'activation en composés très réactifs. Par conséquent, le foie est un organe cible de leur toxicité. Dans ce chapitre, seront d'abord décrites les différentes maladies du foie où l'implication des HAP a été démontrée, à savoir les maladies non alcooliques du foie gras ou **NAFLD** (*Non-alcoholic fatty liver diseases*) et les **cancers du foie**. Ensuite, un accent particulier sera accordé à la mort des hépatocytes, composante importante des NAFLD et possible du développement du cancer du foie par un phénomène de compensation d'agressions répétées (Ichim and Tait, 2016). Les mécanismes de déclenchement de cette **mort cellulaire** seront développés car ils ont fait l'objet d'une attention particulière dans la partie expérimentale.

1. Implication des HAP dans les maladies du foie

a. NAFLD

Les maladies non alcooliques du foie gras ou **NAFLD** sont des maladies caractérisées par l'apparition d'une **stéatose**, c'est-à-dire une accumulation réversible de gouttelettes lipidiques dans les hépatocytes, chez des individus consommant peu ou pas d'alcool. Ce sont des maladies lentes et progressives dont la première étape, bénigne, est la stéatose, qui est favorisée par l'obésité et le manque d'exercice physique. Elles peuvent ensuite progresser vers la **stéatohépatite** appelée **NASH** (*Non-alcoholic steatohepatitis*), où se développent une inflammation et la mort des hépatocytes. La stéatohépatite peut évoluer vers une fibrose voire une cirrhose. Les facteurs environnementaux pourraient participer au développement de la stéatose, la stéatohépatite ou favoriser la transition de la stéatose vers la stéatohépatite (Foulds *et al.*, 2017). De plus en plus d'études mettent en évidence l'implication de xénobiotiques, comme les médicaments et les contaminants environnementaux, dans le développement des NAFLD chez les rongeurs mais également chez l'Homme (Deierlein *et al.*, 2017; Foulds *et al.*, 2017; Heindel *et al.*, 2017; Wahlang *et al.*, 2019). Les HAP par leur capacité à déréguler le métabolisme des lipides dans les cellules du foie (cf I.B.1.b.i.b) *Métabolisme des lipides en page 44*) et à induire la mort des hépatocytes (cf I.C.2 *Morts cellulaires induites par les HAP dans le foie en page 54*), peuvent participer à l'apparition de ces maladies, mise en évidence chez l'animal (**TABLEAU 11**).

Tableau 11 : HAP et développement de NAFLD chez l'animal

HAP	Modèles	Concentration (Voie d'exposition)	Temps de traitement	Dommages hépatiques	Référence
BaP	Souris ♀ gestantes	2 et 10 mg/kg/j (voie orale)	J7 à J16 de la gestation	Effets chez les nouveaux-nés ▪ Stéatose ▪ Inflammation	(Ortiz <i>et al.</i> , 2014)
	Souris ♂ Cyp1a1(-/-) Régime WD En stéatose	12,5 mg/kg/j (voie orale)	3 à 15 semaines	▪ Stéatose ▪ Inflammation	(Uno <i>et al.</i> , 2018)
	Souris	1 mg/kg (voie trachéale)	7 et 21 jours	▪ Stéatose	(Li <i>et al.</i> , 2020)
	Zebrafish (larves) HFD en stéatose	25 nM BaP + 43 mM éthanol	7 jours	▪ Stéatose ▪ Dommages des hépatocytes ▪ Inflammation	(Bucher <i>et al.</i> , 2018)
	Xénopes ♂	10 µg/L	24 h	▪ Stéatose	(Regnault <i>et al.</i> , 2016)
3-MC	Souris ♂	100 mg/kg (i.p)	8 h	▪ Stéatose	(Kawano <i>et al.</i> , 2010)
	Souris ♂ Régime HFD En stéatose	0,01, 0,1 et 1 mg/kg/sem (i.p)	10 semaines	▪ Stéatose renforcée	(Jin <i>et al.</i> , 2014)
Phénanthrène	Rats ♂ (nouveaux-nés)	0,5, 5 et 50 µg/kg (i.sc)	21 jours	▪ Stéatose ▪ Dommages des hépatocytes ▪ Fibrose	(Guo <i>et al.</i> , 2018)

HFD (high fat diet) : régime riche en gras, WD (Western Diet) : régime occidental, riche en glucides et en lipides, i.p : injection intrapéritonéale, i.sc : injection sous cutanée

Par ailleurs, chez le rongeur, une association entre exposition à la fumée de cigarette, contenant de fortes quantités de HAP, et la progression des NAFLD a été mise en évidence (Azzalini *et al.*, 2010; Bailey *et al.*, 2009).

b. Cancer du foie

Les HAP peuvent être impliqués dans l'apparition de cancers du foie par la capacité à produire des adduits à l'ADN et à déclencher la mort cellulaire (Ichim and Tait, 2016) dans les cellules du foie.

i. Etudes chez l'Homme

Le cancer du foie le plus étudié est l'hépatocarcinome cellulaire (HCC : *hepatocellular carcinoma*) ; un lien entre l'apparition de l'HCC et l'exposition aux HAP a été établi à l'aide de biomarqueurs spécifiques de cette exposition. L'augmentation significative des niveaux de ces biomarqueurs chez des patients présentant un HCC, par rapport aux sujets sains, est révélatrice d'une corrélation positive entre l'exposition au HAP et le risque de développer un HCC (TABLEAU 12).

Tableau 12 : Corrélation entre les taux d'adduits BPDE, biomarqueurs d'exposition aux HAP et l'hépatocarcinome cellulaire (HCC) chez l'Homme

Nombre et origine des individus		Prélèvement	Résultats	Référence
Sains	HCC			
37 américains	105 américains	Ponction hépatique	<ul style="list-style-type: none"> ▪ ↗ adduits dans les tissus tumoraux par rapport aux tissus non tumoraux chez les patients HCC ▪ ↗ adduits chez les patients HCC par rapport aux sujets sains (301 ± 123 versus 380 ± 119 A.U., p < 0.01). 	(Chen <i>et al.</i> , 2002)
1246 américains	241 américains	Sang	<ul style="list-style-type: none"> ▪ ↗ adduits chez les patients HCC par rapport aux sujets sains (5,74 ± 0,83 versus 5,59 ± 0,74 fmol/mg albumine, p < 0.05). 	(Wu <i>et al.</i> , 2007)
961 chinois	345 chinois	Sang	<ul style="list-style-type: none"> ▪ ↗ adduits chez les patients HCC 	(Su <i>et al.</i> , 2014)
99 chinois	90 chinois	Sang	<ul style="list-style-type: none"> ▪ ↗ adduits chez les patients HCC par rapport aux sujets sains (17,71 ± 21,64 versus 6,48 ± 11,10 fmol/mg albumine, p < 0.001). 	(Tian <i>et al.</i> , 2016)

En outre, une augmentation de l'incidence des HCC est également décrite chez les fumeurs (Chen *et al.*, 2003b; El-Zayadi, 2006; Koh *et al.*, 2011; Marrero *et al.*, 2005; Petrick *et al.*, 2018; Tanaka *et al.*, 2006).

ii. Etudes chez l'animal

Des études expérimentales d'exposition aux HAP chez l'animal, rongeurs et poissons, montrent le développement de tumeurs hépatiques avec une incidence élevée (TABLEAU 13). Plusieurs études portent sur l'effet du BaP. En revanche, jusqu'à maintenant, seulement deux études se sont intéressées à l'effet du DBaH et du PYR sur le développement de cancer du foie (TABLEAU 13).

Tableau 13 : Implication des HAP dans l'apparition d'un cancer du foie chez l'animal

HAP	Modèles	Traitement	Nombre d'animal x par groupe	Durée du traitement	Effet sur le foie	Référence
BaP	Souris ♂ nouveaux-nés	1 x 75 µg/g (<i>i.p</i>)	j1 : 47 j15 : 60 j42 : 55	Jusqu'à apparition de la tumeur 80-110 sem	55 % 60 % 13 % tumeurs hépatiques	(Vesselinovich et al., 1976)
		1 x 150 µg/g (<i>i.p</i>)	j1 : 63 j15 : 55 j42 : 47		81 % 58 % 9 % tumeurs hépatiques	
	Souris ♂ nouveaux-nés	560 nmol x 3 à j1 - j8 - j15 (<i>i.p</i>)	37	1 an	19 % HCC 30 % HA	(Wislocki et al., 1986)
	Souris ♂ nouveaux-nés	1,1 µmol x 3 à j1 - j8 - j15 (<i>i.p</i>)	17	1 an	24 % HCC 53 % HA	(Lavoie et al., 1987)
	Souris ♂	125 250 375 µg x 1 (<i>i.p</i>)	29 27 24	1 an	45 % 52 % 79 % tumeurs hépatiques	(Rodriguez et al., 1997)
	Souris ♂	50 125 375 µg x 1 (<i>i.p</i>)	35	280 j	25 % 58 % 31 % tumeurs hépatiques	(Phillips et al., 2015)
	Souris	10 20 mg/kg/j x 10j (<i>i.p</i>)	17	3 mois	29 % 35 % cancers	(Wang and Xue, 2015)
	Rats	3 10 30 mg/kg/j (5j /sem) (voie orale)	104	2 ans	1 %, 4% 53 % HCC 21 % HA 91 % 5 %	(Kroese et al., 2001; Wester et al., 2012)
	Poisson <i>Fundulus heteroclitus</i>	400 µg/L/j eau du bain à j4 et j11	20	9 mois	30 % lésions cancéreuses	(Wills et al., 2010)
DBahA	Souris ♂ nouveaux-nés	400 nmol x 3 à j1-j8-j15 (<i>i.p</i>)	23	1 an	96 % HCC	(Fu et al., 1998)
PYR	Souris ♂ nouveaux-nés	700 nmol x 3 à j1 - j8 - j15 (<i>i.p</i>)	25	1 an	9 % HCC	(Wislocki et al., 1986)
		2800 nmol x 3 à j1 - j8 - j15 (<i>i.p</i>)	14		7% HCC 14% HA	

i.p : injection intrapéritonéale, HCC : hépatocarcinome cellulaire, HA : adénome hépatocellulaire

2. Morts cellulaires induites par les HAP dans le foie

Pour les cellules du foie, le BaP provoque deux types de mort cellulaire : l'apoptose et la nécrose.

a. Les morts cellulaires induites par les HAP

i. L'apoptose

L'apoptose est un type de mort cellulaire régulée, déclenchée par des signaux intracellulaires ou extracellulaires. Elle est caractérisée par une condensation de la chromatine voire une fragmentation de la chromatine, une diminution du volume cellulaire et des bourgeonnements de la membrane plasmique qui finissent par se détacher pour former des corps apoptotiques (Luedde et al., 2014).

Une induction de l'apoptose est très largement décrite dans des cellules du foie suite à l'exposition aux HAP et principalement au BaP. A notre connaissance, une seule étude montre *in vivo* de l'apoptose dans le foie (Zha *et al.*, 2017). En revanche, il existe de nombreuses études *in vitro* confirmant le caractère pro-apoptotique du BaP à des concentrations variant de 10 nM à 10 μ M et à des temps de traitement variant de 12 h à 5 jours dans des cellules épithéliales du foie ou des hépatocytes (TABLEAU 14). Une seule étude a montré une induction de l'apoptose dans des cellules épithéliales du foie traitées par le DBahA (Topinka *et al.*, 2008).

Tableau 14 : Mort cellulaire induite par apoptose par les HAP dans les cellules du foie

	Modèle	Concentration	Temps de traitement	Pourcentage de cellules en apoptose	Référence
<i>In vivo</i>	Poisson (<i>Gobiocypris rarus</i>)	1, 5, 20, et 80 μ g/L	28 jours	2,5 – 4,3 % (1,4%)	(Zha <i>et al.</i> , 2017)
<i>In vitro</i> (Hépatocyte)	F258	BaP 50 nM	72 h	20 % (7 %)	(Huc <i>et al.</i> , 2003, 2004)
	Hepa1c1c7	BaP 5 μ M	12-36h	5-40% (2 %)	(Lei <i>et al.</i> , 1998)
		BaP 20 μ M	25 h	20 % (4 %)	(Solhaug <i>et al.</i> , 2004a)
		BaP 1 -5 μ M	12 -36 h	63 % (9%)	(Ko <i>et al.</i> , 2004)
	HepG2	BaP 5 μ M	48 h	n.p	(Kim <i>et al.</i> , 2005b)
		Métabolites du BaP BPDE 0,5 – 2,5 μ M	24h	30 – 50% (8 %)	(Chen <i>et al.</i> , 2003a)
		BaP 5 μ M	24 h	n.p	(Al-Anati <i>et al.</i> , 2014)
	Hépatocytes primaires de rat	BaP 3 μ M	72 h	23 % (12 %)	(Stepnik <i>et al.</i> , 2015)
		BaP 0,1 μ M	5h 24 h	8 % (4%) 30 % (20 %)	(Collin <i>et al.</i> , 2014)
	WB-F344	BaP 1 μ M	72 h	35 % (4%)	(Chramostová <i>et al.</i> , 2004)
DBahA 10 μ M		48 h	26 % (10%)	(Topinka <i>et al.</i> , 2008)	
BaP 0.1 – 10 μ M		48 h	20 – 65 % (10%)		
WIF-B9	BaP 10 nM	5 jours	4 % (2%)	(Tête <i>et al.</i> , 2018)	

Entre parenthèses est indiqué le pourcentage de cellules témoins non traitées. n.p : non précisé

ii. La nécrose

La nécrose se caractérise au niveau morphologique, par un gonflement de la cellule et des organites, ainsi qu'une rupture de la membrane plasmique, ce qui conduit finalement à la libération du contenu intracellulaire notamment des lysosomes. Une caractéristique importante de la nécrose est la chute en ATP liée à une altération majeure des mitochondries (Golstein and Kroemer, 2007).

Très peu d'études mettent en évidence une induction de la nécrose par les HAP dans les cellules du foie. Néanmoins, une exposition à de fortes concentrations de BaP (entre 10 et 64 μ M) peut conduire à la nécrose des hépatocytes des lignées cellulaires HepG2 (Lin and Yang, 2008; Lin *et al.*, 2008) et Hep3B p53 null (Jiang *et al.*, 2011). La nécrose pourrait être due à l'augmentation de la production des ERO et de la peroxydation lipidique, à l'origine d'un stress oxydant, qui entraîne

un dysfonctionnement mitochondrial (Jiang *et al.*, 2011). Elle pourrait être aussi la conséquence de l'activation de PARP-1 (Poly(ADP-ribose) polymérase) qui conduit à la déplétion en NAD (Nicotinamide adénine dinucléotide) (Lin and Yang, 2008). L'activation de PARP-1 serait liée à l'activation de p53 suite aux dommages à l'ADN causés par le BaP (Lin *et al.*, 2008).

Ce type de mort étant peu fréquente avec les HAP, seuls les mécanismes de développement de l'apoptose seront décrits.

b. Mécanismes d'induction de l'apoptose par les HAP

Deux voies d'apoptose se distinguent : la voie intrinsèque et la voie extrinsèque.

La **voie extrinsèque** fait appel à des interactions médiées par des récepteurs transmembranaires appelés récepteurs de mort, comme ceux de la superfamille des récepteurs de TNF (*Tumor necrosis factor*). Suite à l'interaction des ligands, comme le FasL, TRAIL (*Tumor-necrosis-factor related apoptosis inducing ligand*) ou TNF α (*Tumor necrosis factor alpha*), avec leurs récepteurs, ceux-ci se trimérisent et recrutent des protéines adaptatrices cytoplasmiques permettant le recrutement de pro-caspases et la formation d'un complexe appelé DISC (*Death-inducing signaling complex*) qui aboutit principalement au clivage des procaspases initiateuses de type 8 en caspases actives. Celles-ci activent ensuite des caspases effectrices (caspases de type 3 ou 7) de l'apoptose capables de condenser et fragmenter l'ADN à l'origine de la mort (Galluzzi *et al.*, 2018).

La **voie intrinsèque**, dépendante de la mitochondrie, est une voie déclenchée par des perturbations intracellulaires, comme les dommages à l'ADN, le stress du réticulum endoplasmique ou une surproduction d'ERO. L'ensemble de ces signaux entraîne la perméabilisation de la membrane externe de la mitochondrie (*MOMP : mitochondrial outer membrane permeabilization*) (Galluzzi *et al.*, 2018). Cette voie est régulée par des protéines de la famille Bcl-2 (*B-cell lymphoma 2*). Ainsi, les protéines Bad, Bax et Bid participent à la formation de pores dans la membrane de la mitochondrie tandis que les protéines Bcl-2 et Bcl-x_L inhibent la formation de ces pores. Suite à la formation de pores, des protéines pro-apoptotiques de l'espace inter-membranaire de la mitochondrie sont alors libérées. Certaines d'entre elles déclenchent une apoptose caspase dépendante. Par exemple, la protéine pro-apoptotique cytochrome C (cyt C) permet l'activation de la caspase initiateuse de type 9 résultant en une activation de caspases effectrices. D'autres protéines déclenchent une apoptose caspase indépendante. Les protéines pro-apoptotiques AIF (*Apoptosis-inducing factor*) ou endonucléase G (endoG) déclenchent directement la fragmentation de l'ADN et donc la mort. Des protéines, également libérées de l'espace intermembranaire mitochondrial, comme Smac/DIABLO (*Second mitochondria-derived activator of caspases / Direct IAP-binding protein with low PI*) ou Htr2A/Omi (*5-hydroxytryptamine receptor 2a*) ont un rôle indirect

sur les caspases, puisque ces deux protéines participent à la levée de l'inhibition des caspases par les protéines IAP (*Inhibitor of apoptosis*) (Elmore, 2007) (FIGURE 8).

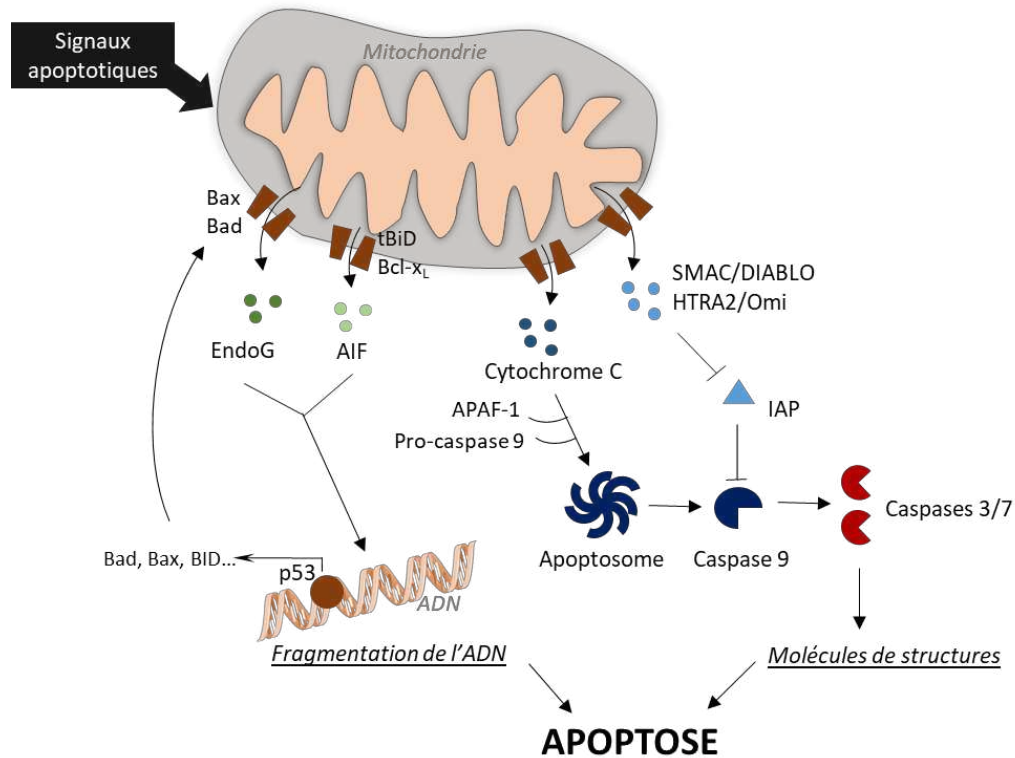


Figure 8 : Voie intrinsèque de l'apoptose

L'apoptose induite par le BaP suivrait principalement la voie intrinsèque dans les cellules du foie. Les principaux mécanismes de mort cellulaire induits par les HAP dans le foie font intervenir le stress oxydant, l'activation de la protéine p53, le remodelage de la membrane plasmique, la perméabilisation de la membrane lysosomale ou bien un dysfonctionnement mitochondrial.

i. Le stress oxydant

Le stress oxydant est généralement défini comme un déséquilibre de la balance entre les facteurs pro-oxydants et les antioxydants au profit des facteurs pro-oxydants, ce qui déclenche des dommages oxydatifs. Certaines études ont mis en évidence, *in vitro* et aussi *in vivo* dans des modèles de rongeurs, l'implication de contaminants environnementaux dans la génération de facteurs pro-oxydants comme les espèces réactives de l'oxygène (ERO) et dans les dommages oxydatifs (Klaunig *et al.*, 2011).

α) Facteurs pro-oxydants

▪ Rappels sur les facteurs pro-oxydants

Parmi les facteurs pro-oxydants se distinguent les espèces réactives de l'oxygène (ERO), les espèces réactives de l'azote (ERN) et le fer de bas poids moléculaire (fer-BPM) (FIGURE 9).

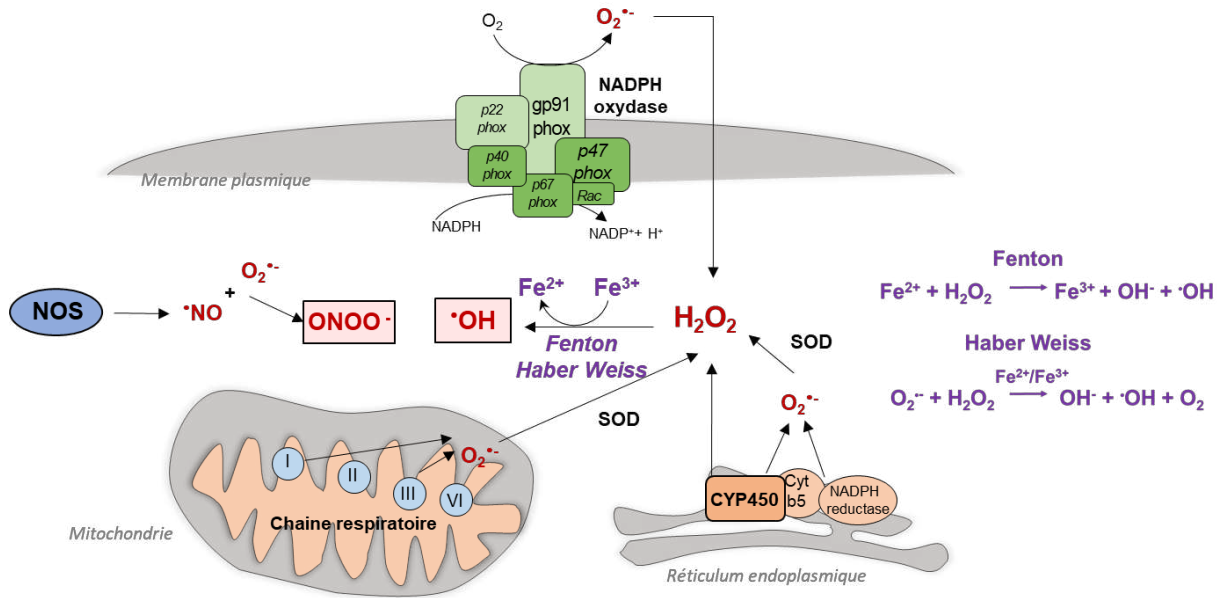


Figure 9 : Différentes sources cellulaires d'ERO et d'ERN

Les ERO comprennent des radicaux libres dérivés de l'O₂ comme l'anion superoxyde (O₂^{•-}), le radical hydroxyle (•OH) ainsi que des espèces non radicalaires dérivées de l'O₂ comme le peroxyde d'hydrogène (H₂O₂). Les ERO peuvent être générées par diverses sources cellulaires, notamment la chaîne respiratoire mitochondriale et des enzymes comme la NADPH oxydase ou les CYP450 (Bolisetty and Jaimes, 2013) (FIGURE 9). Une réaction de dismutation entraîne la réduction de l'anion superoxyde (O₂^{•-}) en **peroxyde d'hydrogène (H₂O₂)** grâce à la superoxyde dismutase (SOD). Il existe plusieurs types de SOD, la Cu,Zn-SOD localisée dans le cytosol, la Mn-SOD localisée dans la mitochondrie et la SOD extracellulaire. Le peroxyde d'hydrogène (H₂O₂) peut alors diffuser dans l'ensemble de la cellule et participer à la catalyse du radical hydroxyle (•OH) par la réaction de Fenton en présence de fer ou la réaction d'Haber Weiss, en présence de fer et d'anion superoxyde (O₂^{•-}),

Les ERN (espèces réactives de l'azote) rassemblent des espèces telles que le monoxyde d'azote (NO•) et l'anion peroxynitrite (ONOO⁻). Le monoxyde d'azote (NO•) est synthétisé lors de la transformation de la L-arginine en citrulline par les NO synthases (NOS). Il existe plusieurs types de NOS, la NOS neuronale, la NOS endothéliale, la NOS inducible (iNOS) et enfin la NOS mitochondriale. Le NO a la capacité de réagir avec l'anion superoxyde (O₂^{•-}) et ainsi former l'anion peroxynitrite (ONOO⁻).

La réactivité et la durée de vie des ERN et ERO est variable. Ainsi, le radical hydroxyle (•OH) et le peroxynitrite (ONOO⁻) sont très réactifs et de puissants oxydants tandis que le peroxyde d'hydrogène est plus stable, ce qui explique sa capacité à diffuser dans les différents compartiments cellulaires.

Le fer joue un rôle important dans la production d'ERO (Bresgen and Eckl, 2015; Galaris and Pantopoulos, 2008; Meneghini, 1997). Ainsi, il est capable de participer à des réactions de transfert d'électron, comme les réactions de Fenton, qui permettent la génération de radicaux hydroxyle ($\cdot\text{OH}$). Le fer se trouve sous plusieurs formes dans la cellule, mais seul le fer libre, c'est-à-dire non lié à des protéines, comme la ferritine ou la transferrine, peut participer à de telles réactions redox (Kruszewski, 2003). Cette espèce de fer représente entre 0,2 et 5 % du fer cellulaire total (Bresgen and Eckl, 2015; Kakhlon and Cabantchik, 2002). Il peut également être appelé fer de bas poids moléculaire (fer-BPM) par opposition au fer contenu dans les protéines de haut poids moléculaire. Le fer-BPM est complexé à des molécules de bas poids moléculaire, comme le glutathion, le citrate, l'ATP/AMP ou le pyrophosphate (Galaris and Pantopoulos, 2008). Il est réparti dans la cellule entre le compartiment cytosolique, le compartiment endo/lysosomal et le compartiment mitochondrial. Plusieurs sources sont possibles : le milieu extracellulaire par endocytose du fer lié à la transferrine ; les lysosomes qui peuvent dégrader des ferroprotéines comme la transferrine ou certains organites riches en fer, comme les mitochondries ; la ferritine cytosolique qui peut libérer du fer dans des conditions réductrices (Terman and Kurz, 2013).

- **Implication des HAP dans la production de facteurs pro-oxydants**

- **ERO**

Les HAP et le BaP notamment par leur **métabolisme** sont capables de générer des ERO. L'anion superoxyde ($\text{O}_2^{\cdot-}$), le radical hydroxyle ($\cdot\text{OH}$) et le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) peuvent être générés, par l'activité des CYP450, lors d'un découplage du cycle de mono-oxygénation (Hrycay and Bandiera, 2015) ou peuvent provenir de cycles redox dans lesquels rentrent les métabolites des HAP, comme les quinones (Sen *et al.*, 2012) (**FIGURE 10**).

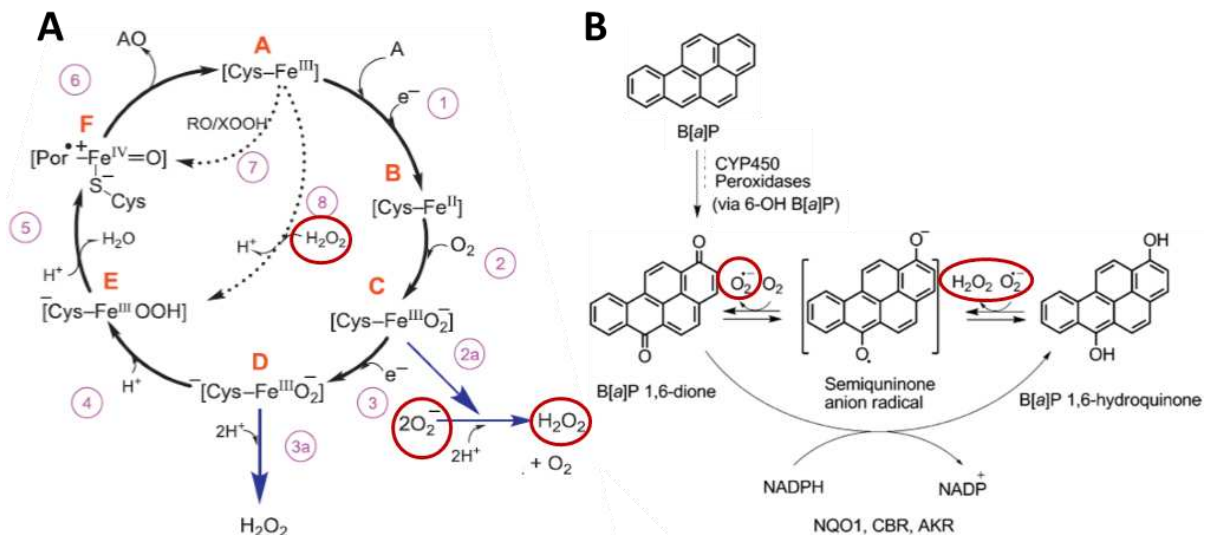


Figure 10 : Production d'ERO lors du métabolisme

A) Cycle de mono-oxygénation des CYP450 (issu de Hrycay and Bandiera, 2015) **B**) Cycle redox des quinones (issu de Sen *et al.*, 2012)

L'altération des mitochondries des cellules du foie traitées par le BaP participe également à la production d'ERO. En effet, dans les cellules épithéliales du foie F258, l'activation de l'échangeur Na⁺/H⁺ isoforme 1 (NHE1) et de la voie p53 (*Cf I.C.2.b.ii Activation de p53 et perturbation de la mitochondrie en page 62*) provoque une atteinte mitochondriale (Huc *et al.*, 2003, 2006). Ce dysfonctionnement mitochondrial peut entraîner une fuite d'électrons de la chaîne respiratoire mitochondrial et ainsi provoquer la formation d'anion superoxyde (O₂^{•-}) par réduction monoélectronique de l'oxygène. Plus précisément, la production de l'anion superoxyde induite par le BaP a été mise en évidence comme dérivant de l'activité du complexe III (coenzyme Q-cytochrome c réductase) de la chaîne respiratoire (Huc *et al.*, 2006, 2007),

L'exposition au BaP des cellules épithéliales du foie F258 et des hépatocytes primaires de rat déclenche **l'altération des lysosomes**, également à l'origine de la production d'ERO (Collin *et al.*, 2014; Gorria *et al.*, 2008). La perméabilisation des membranes des lysosomes par le BaP, (*cf I.C.2.b.iv Perméabilisation de la membrane lysosomale en page 66*), peut provoquer la sortie de fer et d'ERO vers le cytosol amplifiant la production et la présence d'ERO dans le cytosol (Gorria *et al.*, 2008).

- **ERN**

La production de monoxyde d'azote (NO) dans les cellules du foie exposées au BaP dépend essentiellement d'une augmentation de l'expression de la iNOS. L'activation d'AhR, la production d'ERO et l'activation de la voie NFκB par le BaP participent à l'augmentation de l'expression de la iNOS dans les cellules F258 (Hardonnière *et al.*, 2015) et WIF-B9 en stéatose (Tête *et al.*, 2018).

β) Les dommages oxydatifs causés par les HAP

Le BaP est capable de provoquer différents dommages oxydatifs, principalement décrits pour la peroxydation lipidique et l'oxydation de l'ADN.

Le BP peut induire une **peroxydation lipidique** dans le foie *in vivo* chez les rongeurs (Araujo *et al.*, 2019; Deng *et al.*, 2018; Ji *et al.*, 2016; Kumar *et al.*, 2012, 2017a; Ma *et al.*, 2011; Murawska-Ciałowicz *et al.*, 2011; Ramya *et al.*, 2012) mais aussi *in vitro* (Collin *et al.*, 2014; Gorria *et al.*, 2006a; Park *et al.*, 2006; Tête *et al.*, 2018). Chez l'Homme, une étude met en évidence une corrélation entre les niveaux sanguins de HAP et l'élévation des concentrations en malondialdéhyde, un produit de dégradation des lipides oxydés, dans le sang d'enfants indiens (Singh *et al.*, 2008b); une autre étude indique une corrélation entre le taux de métabolites de HAP et la concentration en 8-iso-prostaglandine F_{2α}, un produit de la peroxydation de l'acide arachidonique, dans les urines de travailleurs d'une cokerie (Kuang *et al.*, 2013).

Le BaP ou ses métabolites sont également capables de déclencher **l'oxydation de l'ADN**, évaluée par la formation de 8-OH-DG (8-oxo-2'-désoxyguanosine), *in vivo* dans le foie de rongeurs (Kim and Lee, 1997; Sehgal *et al.*, 2011) ou *in vitro* dans les hépatocytes Hepa1c1c7 et HepG2 (Park *et al.*, 2009; Yuan *et al.*, 2009). Chez l'Homme, chez des travailleurs de cokeries (Kuang *et*

al., 2013) ou de jeunes enfants asthmatiques ou non (Wang *et al.*, 2017), les taux urinaires de métabolites de HAP, notamment le 1-hydroxypyrene, sont corrélés aux taux urinaires de 8-OH-DG.

χ) Altération de la signalisation redox par les HAP

Le BP peut également perturber la signalisation redox. La signalisation redox consiste en des variations d'activité de protéines liées à leur oxydation réversible. Par exemple, les ERO et ERN peuvent oxyder et ainsi moduler positivement ou négativement l'activité de certaines protéines impliquées dans la signalisation des voies NFκB, MAPK, Nrf2 (*Nuclear factor erythroid-2-related factor 2*) ou PI3K-Akt (*Phosphoinositide 3-kinase*) (Zhang *et al.*, 2016a).

Une exposition au BaP est à l'origine de la génération de peroxyde d'hydrogène (H₂O₂), qui active alors la voie de signalisation JNK (*C-Jun N-terminal kinases*) (Huc *et al.*, 2007). En fait, le peroxyde d'hydrogène (H₂O₂) permet la phosphorylation de MKK4 (*MAPK kinase 4*) qui phosphoryle elle-même la protéine JNK, activant alors la calmoduline (CaM) (Tekpli *et al.*, 2012) impliquée dans l'apoptose induite par le BaP (*cf I.C.2.b.iii Remodelage de la membrane plasmique en page 64*).

δ) Implication du stress oxydant induit par les HAP dans la mort cellulaire

Il a été démontré que le stress oxydant est impliqué dans la mort cellulaire induite par le BaP, notamment par l'utilisation de différents composés tels que : la thiourée, piègeur de l'anion superoxyde et du radical hydroxyle ; la N-Acétyl-Cystéine (NAC), un acide aminé stimulant la production de glutathion, un antioxydant important ; la desferrioxamine, un chélateur du fer ciblant spécifiquement les lysosomes et la déféripone, chélateur du fer total intracellulaire ; la vitamine E, un inhibiteur de la peroxydation lipidique ; le CPTIO (*2-4-carboxyphenyl-4,4,5,5-tetramethylimidazole-1-oxyl-3-oxide*), piègeur de NO ; et le FeTPPS [*5,10,15,20-Tetrakis(4-sulfonatophenyl)porphyrinato Iron (III)*] permettant la décomposition du peroxyde nitrite (**TABLEAU 15**). Le **TABLEAU 15** indique que le stress oxydant induit par de faibles concentrations de BaP, pour des temps courts et longs, participe à l'apoptose induite par le BaP dans les cellules du foie.

Tableau 15 : Implication du stress oxydant dans l'apoptose induite par le BaP dans les cellules du foie

	Type cellulaire	Concentration	Temps de traitement	Antioxydants pour inhiber la mort	Références
<i>In vitro</i>	Cellules épithéliales de foie F258	50 nM	48 h	NAC	(Huc <i>et al.</i> , 2007)
		50 nM	72 h	Déféripone Desferrioxamine	(Gorria <i>et al.</i> , 2008)
	Hépatocytes primaires de rat	0.1 μM	18 h	Thiourée Vitamine E Déféripone	(Collin <i>et al.</i> , 2014)
	Hépatocytes WIF-B9	10 nM	5 jours	Thiourée CPTIO FeTPPS	(Tête <i>et al.</i> , 2018)

Thiourée : piègeur de l'anion superoxyde et du radical hydroxyle, *N-Acétyl-Cystéine (NAC)* : stimulant de la production de glutathion, *desferrioxamine* : chélateur du fer des lysosomes, *déféripone* : chélateur du fer total intracellulaire, *vitamine E* : inhibiteur de la peroxydation lipidique, *CPTIO* : piègeur de NO, *FeTPPS* : décomposition du peroxyde nitrite

ii. Activation de p53 et perturbation de la mitochondrie

Dans un contexte physiologique sans dommages, la protéine p53 est associée à son répresseur, la protéine MDM2 (*Murine double minute 2*), une E3-ubiquitine ligase, qui, en ubiquitinylant la protéine p53 déclenche un signal pour sa dégradation dans le protéasome. Suite à des dommages à l'ADN, la réponse DDR (*DNA damage response*) se met en place impliquant de nombreuses kinases. Elle permet, entre autres, la phosphorylation des kinases ATM (*Ataxia telangiectasia mutated*) et ATR (*Ataxia telangiectasia and Rad3-related protein*) induisant alors la phosphorylation de MDM2 et donc son inhibition. La protéine p53 n'est plus dégradée et peut être activée, notamment par phosphorylation (Sullivan *et al.*, 2018). La protéine p53, facteur de transcription assure alors le contrôle de gènes cibles impliqués dans différents processus biologiques comme la réparation de l'ADN mais aussi la prolifération, le cycle cellulaire, l'autophagie ou encore l'apoptose (Kasthuber and Lowe, 2017).

L'activation de la protéine p53 peut faire suite **aux altérations de l'ADN induites par les HAP** (Cf I.B.3 Formation d'adduits à l'ADN par les métabolites réactifs des HAP en page 49). Les dommages à l'ADN provoqués par le BaP sont décrits pour entraîner la phosphorylation ou l'acétylation de p53 dans les cellules du foie *in vitro* et *in vivo* (TABLEAU 16). En plus, dans les cellules du foie, le BaP est capable d'activer d'autres protéines de dommages à l'ADN comme la protéine p38 (Kim *et al.*, 2005b; Lin *et al.*, 2008; Solhaug *et al.*, 2005; Su *et al.*, 2008) ou ERK (Lin *et al.*, 2008), protéines de la famille des MAPK, kinases permettant la phosphorylation de p53.

Tableau 16 : Activation de p53 par le BaP dans les cellules du foie en apoptose

	Modèle	Concentration	Temps de traitement	Agent pharmacologique inhibiteur de la mort cellulaire	Références
<i>In vitro</i>	Cellules épithéliales de foie F258	50 nM-5 µM	20h-48 h	pifithrine-α	(Huc <i>et al.</i> , 2006, 2007)
	Hépatocytes Hepa1c1c7	1 -5 µM	12 -36 h	-	(Ko <i>et al.</i> , 2004)
		20 µM	25 h	inhibiteurs des MAPK pifithrine-α	(Solhaug <i>et al.</i> , 2004b, 2005)
		5 µM	48 h	inhibiteur des MAPK	(Kim <i>et al.</i> , 2005b)
		10 µM	72h	-	(Chung <i>et al.</i> , 2007)
	Hépatocytes HepG2	1 µM	24 h	-	(Park <i>et al.</i> , 2006)
		10 µM	48 h	pifithrine-α	(Lin <i>et al.</i> , 2008)
5 µM		24 h	-	(Al-Anati <i>et al.</i> , 2014)	
Hépatocytes WIF-B9	10 nM	5 jours	pifithrine-α	(Tête <i>et al.</i> , 2018)	
<i>In vivo</i>	Souris	40 mg/kg x 5 pendant 5jours	1 jour 13 semaines	-	(Qin <i>et al.</i> , 2015)

Pifithrine-α : inhibiteur de l'activité de p53, - aucun inhibiteur n'a été utilisé dans l'étude pour mettre en lien directement l'activation de p53 et la mort cellulaire

La protéine p53 activée par le BaP peut déclencher l'apoptose, par voie intrinsèque, selon deux mécanismes (**FIGURE 11**) :

L'activation de p53 par le BaP favorise l'expression de nombreux gènes impliqués dans l'apoptose tels que les **gènes pro-apoptotiques** de la famille Bcl-2 comprenant notamment Bax. Ceci a été démontré *in vitro* (Holme *et al.*, 2007; Ko *et al.*, 2004; Solhaug *et al.*, 2004b) et *in vivo* (Qin *et al.*, 2015). Ces protéines de la famille Bcl-2 peuvent s'insérer dans la membrane externe de la mitochondrie et favoriser la perméabilisation de la mitochondrie. La perméabilisation de la membrane mitochondriale permet la libération de protéines pro-apoptotiques comme endoG (Huc *et al.*, 2006) et le cytochrome C (Holme *et al.*, 2007; Ko *et al.*, 2004) (*cf I.C.2.b Mécanismes d'induction de l'apoptose par les HAP en page 56*).

Dans les cellules épithéliales du foie F258 exposées au BaP, l'activation de la protéine p53 en collaboration avec l'activation de l'échangeur sodium-proton, NHE-1, permet la phosphorylation de la protéine GSK-3 α (*Glycogène synthase kinase*) (Dendelé *et al.*, 2012) à l'origine de la diminution de l'expression de la protéine c-Myc et de celle de l'hexokinase II (HKII), ainsi que de la relocalisation de la protéine HKII en dehors de la mitochondrie (Dendelé *et al.*, 2012; Huc *et al.*, 2007). La relocalisation de l'HKII pourrait favoriser la **formation du pore de transition de perméabilité mitochondriale** (Ko *et al.*, 2004) et un **dysfonctionnement mitochondrial**. Le dysfonctionnement mitochondrial aboutit à l'inversion de la pompe mitochondriale F0F1 ATPase, ce qui entraîne une acidification du cytosol à l'origine de l'activation de caspases effectrices et de la cathepsine B. Cette dernière peut activer l'endonucléase LEI/L-DNase II, par clivage (Huc *et al.*, 2006). Le dysfonctionnement mitochondrial participe également à l'augmentation de la production d'ERO (Dendelé *et al.*, 2012; Holme *et al.*, 2007; Huc *et al.*, 2007; Tête *et al.*, 2018) qui favorise aussi l'apoptose (*cf I.C.2.b.i Le stress oxydant en page 57*).

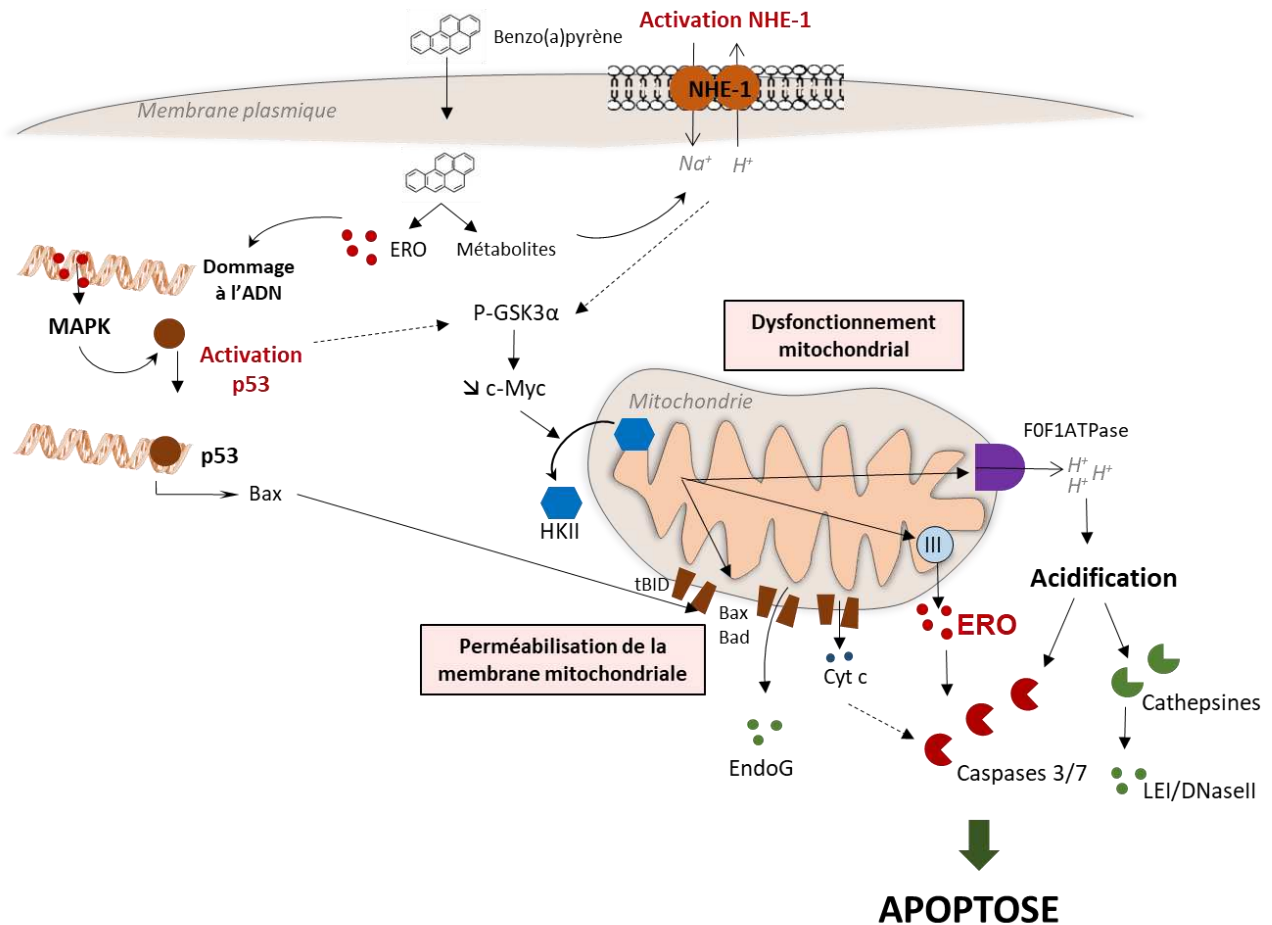


Figure 11 : Implication de l'activation de p53 dans l'apoptose induite par le BaP via la mitochondrie

iii. Remodelage de la membrane plasmique

L'équipe a mis en évidence une implication d'un remodelage de la membrane plasmique dans la mort cellulaire induite par la BaP, dans les cellules du foie *in vitro*.

α) Définition du remodelage de la membrane plasmique

Le remodelage de la membrane plasmique peut se caractériser par des **variations de fluidité membranaire** et des **altérations physico-chimiques des radeaux lipidiques**. La fluidité membranaire est définie comme la conséquence des mouvements des constituants de la membrane plasmique. Les radeaux lipidiques se distinguent comme des micro-domaines de la membrane plasmique résistants aux détergents non ioniques, enrichis en cholestérol, en sphingolipides, avec un degré de compaction élevé et une fluidité réduite par rapport à d'autres zones de la membrane (Sezgin *et al.*, 2017). Ces radeaux lipidiques contiennent des protéines spécifiques qui sont résidentes, comme la cavéoline, la phosphatase alcaline ou encore la flotilline, ou bien d'autres, qui sont transitoirement incorporées sous l'effet de différents stress. Ces radeaux jouent un rôle important dans la signalisation intracellulaire. En effet, ils sont capables de s'agréger

et de former des plateformes de signalisation, et ainsi inhiber ou activer des protéines impliquées dans différentes voies de signalisation.

β) Le remodelage membranaire induit par les HAP

Le BaP est capable, dans les cellules épithéliales du foie F258 ou dans les hépatocytes primaires de rat, de provoquer un remodelage membranaire, caractérisé par une augmentation de la fluidité membranaire (Collin *et al.*, 2014; Gorria *et al.*, 2006a) et une déstructuration des radeaux lipidiques (Collin *et al.*, 2014; Tekpli *et al.*, 2010) à l'origine de l'apoptose.

L'augmentation de la fluidité membranaire est provoquée par une diminution du cholestérol dans les cellules (Collin *et al.*, 2014; Gorria *et al.*, 2006a; Tekpli *et al.*, 2012) tandis que la déstructuration des radeaux lipidiques fait suite à une augmentation de leur teneur en acides gras polyinsaturés et à une diminution de celle en cholestérol. Ces effets résultent de l'inhibition par le BaP de l'expression de l'HMGCoA réductase, enzyme impliquée dans la biosynthèse du cholestérol (Tekpli *et al.*, 2010). Cette diminution de l'expression de l'HMGCoA réductase dépendrait de l'inhibition, par l'Ahr, de l'expression de deux facteurs de transcription, LXR β (*Liver X nuclear receptor beta*) et SREBP1, impliqués dans la régulation du métabolisme des lipides en permettant l'expression d'enzymes telles que l'HMG-CoA réductase (Tekpli *et al.*, 2010, 2012).

La déstructuration des radeaux lipidiques provoque une sortie de l'échangeur sodium-proton NHE-1 des radeaux lipidiques vers des zones plus fluides (Tekpli *et al.*, 2012). La relocalisation de NHE-1 dans des zones plus fluides ainsi que son interaction avec la calmoduline (CaM) permettent son activation ; cette activation provoque ainsi la sortie de protons et une alcalinisation intracellulaire (Tekpli *et al.*, 2012). Cette alcalinisation précoce est un élément-clé dans le déclenchement de l'apoptose; elle provoque un dysfonctionnement des mitochondries et une production d'ERO par ces organites à l'origine de l'apoptose des cellules épithéliales du foie F258 (Huc *et al.*, 2004, 2007) (FIGURE 12). Par ailleurs, l'activation de NHE-1 favoriserait aussi l'augmentation de fluidité membranaire induite par le BaP (Gorria *et al.*, 2006). Cette fluidification de la membrane plasmique faciliterait l'endocytose du fer. L'augmentation de sa présence dans les lysosomes serait à l'origine d'une production d'ERO (cf I.C.2.b.i.a) *Facteurs pro-oxydants en page 57*) et de l'apoptose (Gorria *et al.*, 2006) (FIGURE 12).

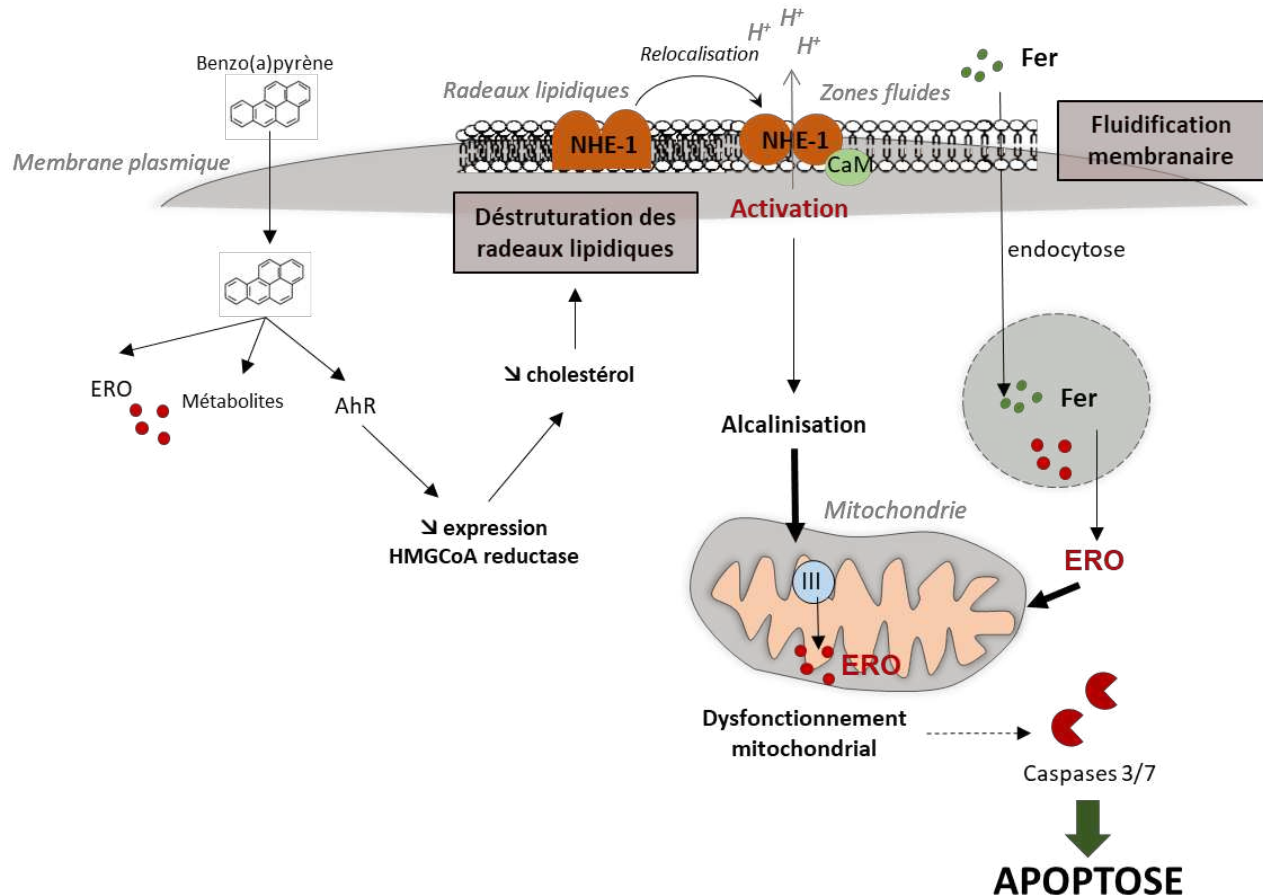


Figure 12 : Implication du remodelage membranaire dans l'apoptose induite par le BaP

iv. Perméabilisation de la membrane lysosomale

Dans les cellules épithéliales du foie F258, le BaP est capable de provoquer une augmentation de la taille des lysosomes et une alcalinisation de leur pH (Gorria *et al.*, 2008), signes précoces d'une perméabilisation de la membrane lysosomale (LMP) (Wang *et al.*, 2018a). Ainsi, le BaP entraîne une perméabilisation de la membrane des lysosomes dans les cellules épithéliales de foie de rat F258 (Gorria *et al.*, 2008) et dans les hépatocytes primaires de rat (Collin *et al.*, 2014). Ceci pourrait s'expliquer par la capacité du BaP à favoriser l'entrée de fer exogène (Gorria *et al.*, 2006a). Le fer, qui entre dans les cellules par endocytose, peut donc se concentrer dans les lysosomes, y déclencher des réactions de Fenton (*cf I.C.2.b.i.a) Facteurs pro-oxydants en page 57*) et donc provoquer une peroxydation lipidique de leur membrane.

Ce phénomène de LMP est connu pour déclencher la mort cellulaire (Wang *et al.*, 2018a) par la libération de cathepsines, d'ERO et de fer induisant une altération de la structure des mitochondries, une augmentation de la peroxydation lipidique dans d'autres compartiments ou bien une activation directe des caspases (Wang *et al.*, 2018a). Ainsi, la libération de fer (Gorria *et al.*,

2006a, 2008) et de protéases, comme les cathepsines (Collin *et al.*, 2014; Huc *et al.*, 2006) ou la lactoferrine (Gorria *et al.*, 2008), en dehors du lysosome, a été décrite suite à une exposition au BaP d'hépatocytes primaires de rat ou de cellules épithéliales du foie F258. Cette libération a été directement reliée à l'activation des caspases et au déclenchement de l'apoptose (Collin *et al.*, 2014) (FIGURE 13).

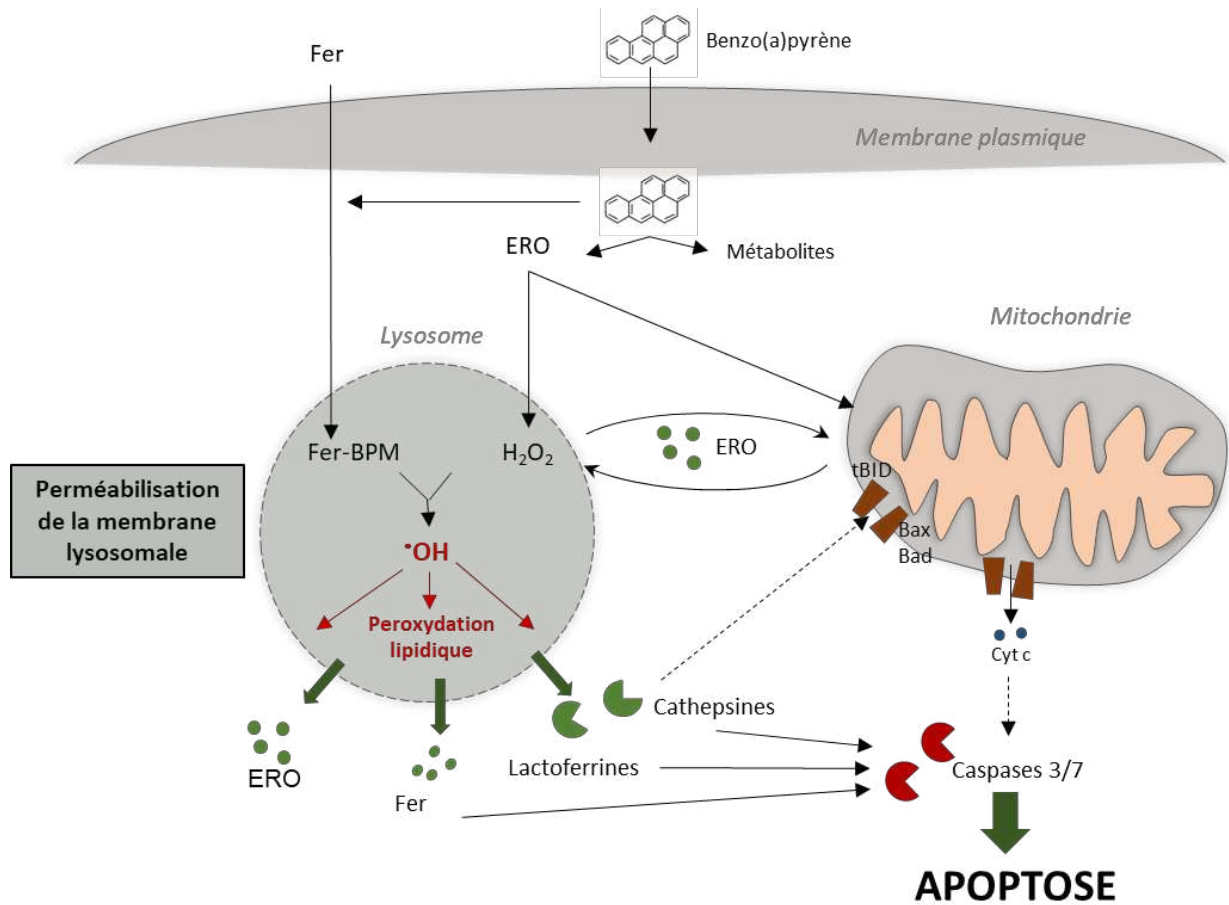


Figure 13 : Implication de la perméabilisation des lysosomes dans l'apoptose induite par le BaP

II. Les vésicules extracellulaires, acteurs de communication

Les vésicules extracellulaires (VE) sont un groupe hétérogène de nanostructures subcellulaires entourées d'une bicouche lipidique et libérées par les cellules dans le milieu extracellulaire. La nomenclature de ces structures n'est pas encore bien établie, néanmoins, trois types se distinguent : les **exosomes**, les **microvésicules** (FIGURE 14) et les **corps apoptotiques**. Ces VE sont maintenant reconnues comme acteurs à part entière de la communication intercellulaire permettant l'échange entre cellules de lipides, protéines et acides nucléiques.

Dans cette thèse, les corps apoptotiques ne seront pas inclus dans l'étude des VE, car ils constituent une classe particulière de VE uniquement libérées en conditions apoptotiques.

A. Formation et libération des VE

Les exosomes (**EXO**) sont des particules issues du compartiment endosomal. Les EXO ont pour origine les vésicules intraluminales (*ILV : intraluminal vesicle*) contenues dans des vésicules appelées corps multivésiculaires (*MVB : multivesicular body*) (FIGURE 14). Ces ILV sont libérées dans le milieu extracellulaire lors de l'exocytose des MVB et prennent alors le nom d'EXO. Ils ont une taille comprise entre 50 et 200 nm. Les microvésicules (**MV**), appelées aussi antérieurement, ectosomes, microparticules ou encore vésicules membranaires, sont des particules issues du bourgeonnement de la membrane plasmique (FIGURE 14) et de taille plus hétérogène comprise entre 100 et 1000 nm (*Cf II.B.2 Caractéristiques biophysiques en page 89*).

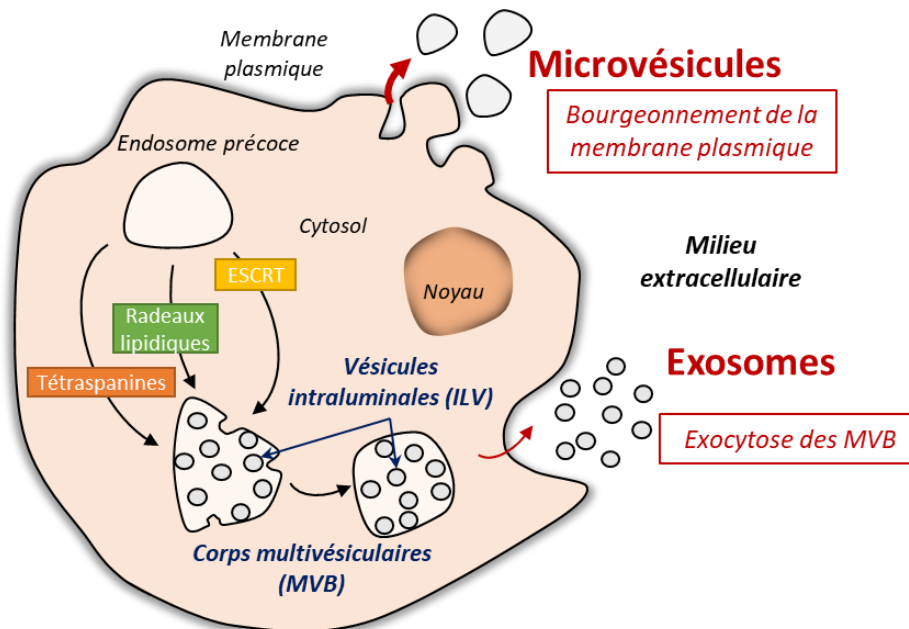


Figure 14 : Libération de vésicules extracellulaires par une cellule

1. Biogénèse des vésicules extracellulaires

Les mécanismes à l'origine de la biogénèse des EXO et des MV sont très différents et surviennent à des sites distincts de la cellule, le compartiment endosomal et la membrane plasmique. Néanmoins, ils font intervenir tous les deux, des composants communs, impliqués dans le tri moléculaire et le trafic intracellulaire pouvant rendre la distinction entre les deux populations de VE plus difficile lors de la caractérisation (cf II.B.3 *Caractéristiques biochimiques en page 91*). Les mécanismes de biogénèse des VE ne sont pas encore totalement décryptés. La biogénèse des VE se déroule en trois grandes étapes : le ciblage des cargos vers les sites de production des VE, l'enrichissement spécifique des cargos au niveau de la vésicule en formation et enfin le bourgeonnement et la fission de la vésicule formée.

a. Biogénèse des exosomes

Les EXO sont formés à partir du compartiment des endosomes tardifs. Le bourgeonnement interne de la membrane de ces endosomes est à l'origine de la formation d'ILV, futurs EXO, dans la lumière, au cours de leur maturation. Ces endosomes deviennent alors des MVB. Plusieurs mécanismes de formation de ces MVB et donc des EXO sont possibles : des mécanismes dépendants de la machinerie ESCRT (*Endosomal sorting complexes required for transport*) et des mécanismes indépendants impliquant certains lipides comme les céramides ou des protéines telles que les tétraspanines (FIGURE 15).

Ces différentes voies de biogénèse pourraient intervenir simultanément dans la formation d'un MVB. La biogénèse des EXO et des VE, de façon générale, dépendrait fortement du type cellulaire, de l'homéostasie ou du stress cellulaire subi (Colombo et al., 2014; Hessvik and Llorente, 2018; van Niel et al., 2018).

i. Mécanismes ESCRT dépendants

La **voie ESCRT** fut la première voie de biogénèse des EXO mise en évidence. Elle met en jeu quatre complexes protéiques du cytosol qui se fixent successivement à la membrane de l'endosome (Cocucci and Meldolesi, 2015; Colombo *et al.*, 2014b; Kalra *et al.*, 2016; Kowal *et al.*, 2014; van Niel *et al.*, 2018) (FIGURE 15) :

- **ESCRT-0** (constitué de protéines comme HRS [*Hepatocyte growth factor*] et STAM [*Signal transducing adaptor molecule*]), responsable du recrutement de certaines protéines (protéines du chargement) dans une région particulière de la membrane de l'endosome. Il se lie à la membrane de l'endosome, par le phosphate d'un phosphatidylinositol 3 phosphate (PI(3)P) et les résidus ubiquitine des protéines du chargement ;
- **ESCRT-I** (constitué de de protéines comme TSG101 [*Tumor susceptibility gene 101 protein*] et Vps28 [*Vacuolar protein sorting-associated protein*]), **et ESCRT-II** (constitué de protéines comme Vps22), assurant l'initiation du bourgeonnement de la membrane dans la lumière de l'endosome.

ESCRT-I assure un pont entre le complexe ESCRT-0 et ESCRT-II et permet le transfert de la cargaison de protéines, ESCRT-II permet le recrutement d'ESCRT-III à la surface de l'endosome.

- **ESCRT-III** (constitué de protéines comme Vps2), finalisant le bourgeoisement interne de la membrane de l'endosome, conduisant à la fermeture puis à la scission de la vésicule intraluminaire dans la lumière du MVB. ESCRT-II permet l'initiation de la polymérisation de monomères d'ESCRT-III en filaments multiprotéiques qui adoptent une forme en spirale permettant l'invagination de la membrane de l'endosome et la constriction progressive. Une protéine accessoire à ESCRT, Alix [*Alg-2 interacting protein x*] participe aussi à la formation des MVB, en recrutant et stabilisant les complexes ESCRT-III. Par ailleurs, l'interaction de la protéine Alix avec des synténines, protéines de liaison aux syndécans, des protéoglycane à chaîne héparane sulfate, faciliterait le bourgeoisement intraluminaire des ILV (Hessvik and Llorente, 2018; Juan and Fürthauer, 2018).

Enfin, la dissociation et le recyclage des composants de la machinerie ESCRT nécessite l'interaction avec la protéine AAA-ATPase Vps4.

ii. Mécanismes ESCRT indépendants

La biogénèse des EXO peut également survenir par des mécanismes moléculaires indépendants de la machinerie ESCRT. Une production d'EXO par des cellules faisant intervenir des micro-domaines spécifiques de la membrane endosomale riches en tétraspanines (Hurwitz *et al.*, 2016) ou en lipides spécifiques (Trajkovic *et al.*, 2008) a été mise en évidence (**FIGURE 15**).

α) Radeaux lipidiques

Une voie de biogénèse des EXO serait dépendante **des radeaux lipidiques**. Les radeaux lipidiques sont des microdomaines membranaires riches en cholestérol et sphingolipides. Ils permettent le regroupement de protéines de manière locale dans la membrane endosomale (Trajkovic *et al.*, 2008). Dans ces domaines concentrés en sphingolipides, la sphingomyélinase (SMase) neutre peut catalyser, la transformation des sphingolipides en céramides, au niveau du feuillet externe des endosomes (Verderio *et al.*, 2018). Les céramides, lipides avec une structure en cône inverse, sont alors capables de provoquer une courbure négative spontanée, de la membrane, qui pourraient potentiellement participer au bourgeoisement des ILV dans les MVB (Trajkovic *et al.*, 2008; Verderio *et al.*, 2018). Néanmoins, cette voie de biogénèse ne serait pas une voie générale présente dans l'ensemble des types cellulaires (Phuyal *et al.*, 2014).

β) Tétraspansines

Une autre voie de biogénèse, ESCRT indépendante, impliquerait des domaines enrichis en **tétraspansines** : les TEM (*Tetraspanin Enriched Microdomains*). Les tétraspansines (par exemple : CD63, CD81 ou CD9) sont des protéines à quatre domaines transmembranaires ; elles

constitueraient des plateformes de sélection de protéines et permettraient la déformation de la membrane des endosomes à l'origine de la libération des ILV dans la lumière (Andreu and Yáñez-Mó, 2014).

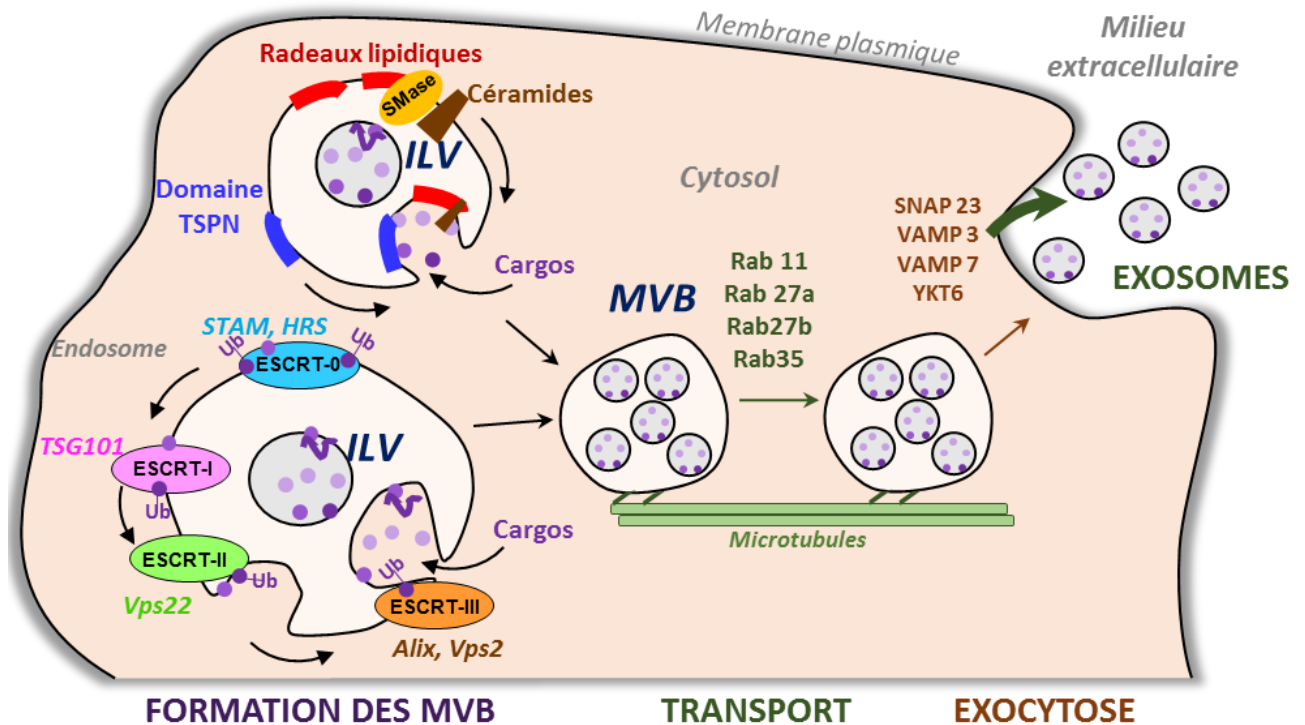


Figure 15 : Biogénèse et libération des exosomes

SMase : sphingomyélinase neutre, TSPN : tétrapanines, Ub : ubiquitine, ILV : vésicule intraluminale, MVB : corps multivésiculaire

b. Biogénèse des microvésicules

La formation des MV, moins bien décrite, dépend du bourgeonnement externe de micro-domaines de la membrane plasmique.

Le **calcium** jouerait un rôle important. L'augmentation de la concentration calcique dans le cytoplasme peut permettre l'activation de la calpaïne, protéase à l'origine d'un réarrangement du cytosquelette, ainsi que l'inhibition de la flippase, l'activation de la floppase et de la scramblase, enzymes permettant un réarrangement des phospholipides et une externalisation de la phosphatidylsérine. Le réarrangement du cytosquelette et des phospholipides accentuerait la courbure de la membrane vers le milieu extracellulaire et favoriserait donc la formation des MV (Cocucci and Meldolesi, 2015; Colombo *et al.*, 2014b; Kalra *et al.*, 2016; van Niel *et al.*, 2018) (FIGURE 16). Un autre mécanisme, à l'origine de la production de MV, concerne l'activation de Rho GTPases comme **Rho A** et les kinases ROCK (*Rho-associated protein kinase*) associées comme **ROCK-1**, qui permettent la régulation de la dynamique des microfilaments d'actine (van Niel *et al.*,

2018; Tricarico *et al.*, 2017) et donc le réarrangement du cytosquelette à l'origine du bourgeonnement. Un troisième mécanisme pourrait faire intervenir la **sphingomyélinase acide** qui est transloquée à la membrane plasmique ; elle permet la synthèse de céramides au niveau du feuillet interne favorisant la formation de la courbure et le bourgeonnement externe de la membrane (van Niel *et al.*, 2018; Verderio *et al.*, 2018) (FIGURE 16).

En conclusion, à l'image de la genèse des ILV, les lipides tels que le cholestérol, la sphingomyéline et les céramides, les tétraspanines ainsi que des membres de la machinerie ESCRT participent au tri des cargos, à l'assemblage et au bourgeonnement des MV (Cocucci and Meldolesi, 2015; Juan and Fürthauer, 2018; Kalra *et al.*, 2016; van Niel *et al.*, 2018).

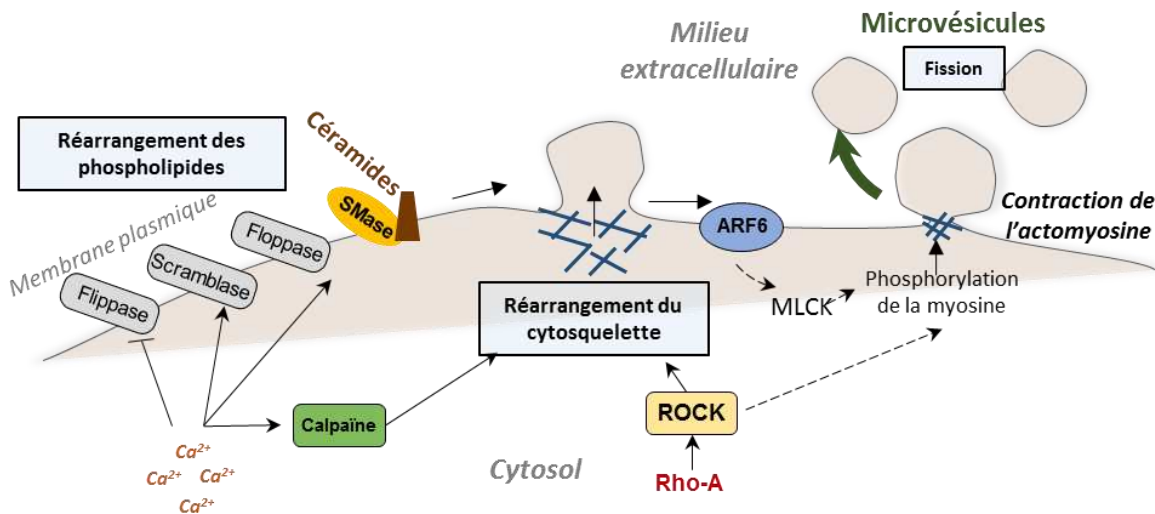


Figure 16 : Biogénèse et libération des microvésicules

SMase : Sphingomyélinase acide, MLCK : Myosin-light kinase, ROCK : Rho-A activated kinase.

2. Chargement des cargos des vésicules extracellulaires

La composition des VE varie selon le type cellulaire et peut être influencée par différentes conditions ou stimuli internes ou externes. Le mécanisme exact de sélection de cargos spécifiques vers les VE en formation est encore très mal connu. Dans la sélection de protéines transmembranaires vers les EXO, les protéines permettant la formation des ILV dans les MVB comme les protéines des complexes ESCRT, HRS ou STAM sont à l'origine du recrutement de certaines protéines ubiquitylées (Colombo *et al.*, 2014b). La chaperonne Hsc70 aurait aussi un rôle dans l'adressage de protéines transmembranaires vers les EXO. En ce qui concerne les cargos solubles du cytosol, l'ubiquitylation ou la présence de séquence en acides aminés répétés dans les protéines seraient importantes. Les lipides et les radeaux lipidiques pourraient aussi intervenir en sélectionnant des protéines de signalisation et des lipides comme le cholestérol, les glycosphingolipides et les sphingomyélines.

Dans la sélection des cargos vers les MV, ARF6 (*ADP-ribosylation factor 6*), protéine de liaison au GTP, associée à la membrane plasmique, a été identifiée comme régulateur du recrutement du récepteur aux intégrines, de molécules de classe I, MHC-I (*Major histocompatibility complex class I*), de MMP14 (*Matrix metalloproteinase*) et de VAMP13 (*Vesicle-associated membrane protein*) dans des MV issues de cellules de cellules tumorales (van Niel *et al.*, 2018; Tricarico *et al.*, 2017). Par ailleurs, la protéine Rab22a (*Ras-associated binding protein*) serait à l'origine du chargement de protéines spécifiques des MV libérées par les cellules du cancer du sein en conditions hypoxiques (van Niel *et al.*, 2018; Tricarico *et al.*, 2017).

En ce qui concerne l'incorporation d'acides nucléiques dans les EXO et dans les MV, certains ARNm pourraient posséder une séquence spécifique dans leur région 3'UTR, qui permettrait leur insertion spécifique dans les VE ; et certains miARN seraient intégrés dans les VE par co-insertion avec des protéines cargos des VE comme Argonaute 2 (Hessvik and Llorente, 2018; Tricarico *et al.*, 2017).

3. Sécrétion des vésicules extracellulaires

a. Sécrétion des exosomes

Les mécanismes participant au transport et à la fusion des MVB avec la membrane plasmique sont encore mal connus, mais il semblerait qu'ils feraient intervenir de petites GTPases de la famille des Rab et les complexes SNARE (*Soluble N-éthylmaleimide-sensitive-factor Attachment protein receptor*) (FIGURE 15) (Colombo *et al.*, 2014b; Kowal *et al.*, 2014).

i. Transport des MVB vers la membrane plasmique

Les MVB peuvent suivre deux voies dans le trafic vésiculaire, soit ils sont dirigés vers les lysosomes où ils sont alors dégradés, soit ils sont dirigés vers la membrane plasmique pour l'exocytose. Certaines protéines présentes à la surface des MVB seraient à l'origine de leur adressage, soit vers les lysosomes, soit vers la membrane plasmique (Eitan *et al.*, 2016). Le transport des MVB vers les lysosomes est effectué le long des microtubules grâce à la protéine motrice dynéine. L'arrimage spécifique des MVB aux lysosomes dépend de la protéine Rab7. En outre, l'inhibition de l'activité des lysosomes peut provoquer une augmentation de la sécrétion des EXO (Eitan *et al.*, 2016; Palmulli and van Niel, 2018). Le transport des MVB vers la membrane plasmique dépend aussi du transport le long des microtubules et l'arrimage avec la membrane plasmique s'effectue avec l'aide d'autres Rab, comme Rab11, Rab27a, Rab27b ou encore Rab35 (Colombo *et al.*, 2014b; Eitan *et al.*, 2016; Palmulli and van Niel, 2018).

ii. Fusion des MVB avec la membrane plasmique

La fusion des MVB avec la membrane est la dernière étape nécessaire à l'exocytose des MVB, la sortie des ILV et donc la libération des EXO dans le milieu extracellulaire. Cette fusion est notamment sous la dépendance des protéines SNARE comme SNAP23 (*Synaptosomal-associated*

protein 23), VAMP 3, VAMP 7 et YKT6 (Hessvik and Llorente, 2018; Palmulli and van Niel, 2018). La signalisation calcique pourrait également jouer un rôle dans cette fusion en permettant l'activation de certains complexes SNARE et permettre une augmentation de la sécrétion des EXO (van Niel *et al.*, 2018).

b. Sécrétion des microvésicules

La sécrétion des MV nécessite le simple pincement du bourgeon formé vers l'extérieur de la cellule. Ce pincement est obtenu grâce à des protéines G de la famille Raf comme ARF6 ou ARF1 (Cocucci and Meldolesi, 2015; Colombo *et al.*, 2014b; Kalra *et al.*, 2016; van Niel *et al.*, 2018) (FIGURE 16). ARF6 participe à l'activation de la phospholipase D, catalysant l'hydrolyse de la phosphatidylcholine en acide phosphatidique, qui permet le recrutement d'ERK au niveau du bourgeon. ERK entraîne ensuite la phosphorylation de la kinase MLCK (*Myosin light-chain kinase*), qui elle-même phosphoryle la myosine. Le phosphorylation de la myosine provoque la contraction de l'actomyosine et donc le détachement de la MV de la membrane plasmique (Kalra *et al.*, 2016; Tricarico *et al.*, 2017). Par ailleurs, les protéines RhoA et ROCK pourrait également participer à la phosphorylation de la myosine (Latifkar *et al.*, 2019; Tricarico *et al.*, 2017).

4. Stress cellulaires favorisant la libération de VE

La libération de VE par les cellules se déroule de manière constitutive ; néanmoins, elle peut être induite par de nombreux phénomènes cellulaires. En effet, la sécrétion des VE par les cellules peut être augmentée, suite à différents stimuli internes ou externes à l'origine d'un stress cellulaire, comme l'inflammation, le stress du réticulum endoplasmique, l'altération de la fonction lysosomale, la dérégulation du métabolisme énergétique, la dérégulation de la signalisation calcique (Hessvik and Llorente, 2018; Latifkar *et al.*, 2019; Palmulli and van Niel, 2018), le stress oxydant ou encore la mort cellulaire. Dans le paragraphe suivant, nous détaillerons l'augmentation de la libération et la modification du contenu des VE suite à la génération d'un stress oxydant ou à l'induction de la mort cellulaire.

a. Stress oxydant et libération de VE

La génération d'ERO ou d'un stress oxydant peut être à l'origine d'une libération de VE. Il a été montré pour la première fois en 1979, qu'après une exposition à différents composés, comme le formaldéhyde, l'acroléine, molécules capables de provoquer un stress oxydant, des cellules de différentes espèces et de différents tissus comme les macrophages, fibroblastes et monocytes, sont capables de libérer des MV. Par la suite, quelques études ont également montré une corrélation entre l'induction d'un stress oxydant et la libération de MV (Dachary-Prigent *et al.*, 2013; Thom *et al.*, 2017) ou la libération d'EXO (Downs *et al.*, 2018; Shah *et al.*, 2018), mais sans établir un lien directe par l'utilisation d'antioxydants. D'autres travaux ont confirmé l'implication d'un stress oxydant dans la production de VE par l'utilisation de méthode inhibant le stress oxydant (TABLEAU 17).

Tableau 17 : Implication du stress oxydant dans la libération des VE *in vitro*

Type de VE	Inducteur stress oxydant	Type cellulaire	Antioxydant inhibant la libération de VE	Référence
MV	5,5'-dithiobis-(2-acide nitrobenzoïque)	Macrophages Cellules du muscle lisse	NAC	(Furlan-Freguia <i>et al.</i> , 2011)
	4-hydroxynonéal	Monocytes Cellules endothéliales	NAC	(Vatsyayan <i>et al.</i> , 2013)
	N ₂	Neutrophiles Monocytes	Inhibiteur de NOX et NOS-2 ou KO NOS-2	(Thom <i>et al.</i> , 2014)
	H ₂ O ₂	Cellules épithéliales alvéolaires et bronchiques	NAC	(Novelli <i>et al.</i> , 2014)
	H ₂ O ₂ Hypoxie/reoxygénation	Hépatocytes	NAC	(Teoh <i>et al.</i> , 2014)
	H ₂ O ₂	Cellules de l'épithélium pigmentaire rétinien	NACA	(Carver and Yang, 2016)
EXO	Fumée de cigarette Acroléine	Cellules épithéliales bronchiques	NAC GSH	(Benedikter <i>et al.</i> , 2017)
	Diéthylamine	Cellules du cancer du sein	NAC	(Shiau <i>et al.</i> , 2017)
	Ethanol	Hépatocytes	NAC	(Cho <i>et al.</i> , 2017a)
VE	Fumée de cigarette Bacitracine	Cellules épithéliales bronchiques Fibroblastes pulmonaires	NAC	(Stassen <i>et al.</i> , 2019)

NOX : NADPH oxydase, NOS : NO (monoxyde d'azote) synthase, GSH : glutathion, participant à l'élimination des ERO, NAC : N-Acétyl-Cystéine, et NACA : NAC amide, piègeurs d'ERO et stimulants de la production de glutathion

D'après ce TABLEAU 17, il apparaît que la majorité des études ont démontré l'implication des ERO dans la libération des VE, mais jamais précisément l'implication de dommages oxydatifs en utilisant par exemple la vitamine E, inhibiteur de la peroxydation lipidique.

Le stress oxydant peut également modifier le contenu des VE. Ainsi, les VE peuvent être enrichies en protéines liées à l'inflammation comme Hsp70 (Sheller *et al.*, 2016), les interleukines (IL) IL1 β et IL18, et la caspase-1 (Zhang *et al.*, 2019) ; au stress oxydant comme la NADPH oxydase (Hervera *et al.*, 2018) et l'iNOS (Biasutto *et al.*, 2013) ; et à la balance apoptose/prolifération comme les protéines p38MAPK, PTEN (*Phosphatase and tensin homolog*), Bak, Smac/Diablo (Biasutto *et al.*, 2013; Sheller *et al.*, 2016).

In vivo, seulement trois études se sont intéressées à l'implication du stress oxydant dans la libération de VE. Chez des souris soumises à une ischémie-reperfusion du foie, l'augmentation de la libération de MV dans la circulation sanguine peut être inhibée, par un traitement, des souris, avec la NAC (Teoh *et al.*, 2014). Chez des patients diabétiques, présentant un infarctus du myocarde, des MV sont libérées dans la circulation sanguine ; cette libération peut être significativement diminuée par un traitement à la vitamine C, un antioxydant (Morel *et al.*, 2003). Enfin, chez les patients infectés par le VIH (virus de l'immunodéficience humaine), l'augmentation du nombre d'EXO dans le plasma a été corrélée à l'augmentation de marqueurs du stress oxydant (Chettimada *et al.*, 2018).

Pour le moment, peu de choses sont connues en ce qui concerne le mécanisme provoquant une augmentation de la libération de VE par le stress oxydant. Il est vraisemblable que des oxydations de protéines ou de lipides, régulant de manière directe ou indirecte la biogénèse ou la sécrétion de VE, tels que les canaux calciques, le cytosquelette d'actine, ou encore les flippases, pourraient avoir lieu (Benedikter *et al.*, 2018) (TABLEAU 18). Une seule étude pour le moment présente un mécanisme par lequel le stress oxydant participerait à la libération de MV. La nitrosylation de l'actine favoriserait sa polymérisation et son association avec les flippases et floppases et donc le bourgeonnement de la membrane plasmique, à l'origine des MV, dans les neutrophiles suite à une exposition au CO₂ (Thom *et al.*, 2017).

Tableau 18 : Rôle potentiel de l'oxydation de protéines dans la formation des VE

(d'après Benedikter *et al.*, 2018)

Cible protéique	Conséquence d'une oxydation	Effet cellulaire	Effet sur la formation des VE
Canaux calciques (TRPA1, SERCA, IP3R)	Ouverture	↗ Ca ²⁺ intracytosolique	Bourgeonnement membrane plasmique Fusion MVB avec la membrane plasmique
Cytosquelette d'actine	Augmentation du taux de polymérisation	Restructuration du cytosquelette	Bourgeonnement de la membrane plasmique
Flippases	Inhibition	Externalisation de la phosphatidylsérine	Bourgeonnement de la membrane plasmique

TRPA1 : Transient receptor potential cation channel, subfamily A, member 1, SERCA : Sarco/endoplasmic reticulum Ca²⁺-ATPase, IP3R : Inositol trisphosphate receptor

b. Mort cellulaire et libération de VE

Les cellules en apoptose libèrent une quantité plus importante de VE, par rapport, à des cellules normales (Baxter *et al.*, 2019; Distler *et al.*, 2005), qui sont différentes des corps apoptotiques d'un point de vue morphologique et composition moléculaire (Théry *et al.*, 2001; Tucher *et al.*, 2018) (Dieudé *et al.*, 2015) (Hardy *et al.*, 2019). Quelques études ont mis en évidence une corrélation entre l'induction d'une mort cellulaire, par apoptose, dans différents types cellulaires du système immunitaire, et l'augmentation de la libération de MV (Ainola *et al.*, 2018; Distler *et al.*, 2005; Tucher *et al.*, 2018), d'EXO (Chen *et al.*, 2019) ou de VE totale (Baxter *et al.*, 2019; Farinacci *et al.*, 2012; Théry *et al.*, 2001). D'autres travaux ont confirmé l'implication de l'apoptose, dans la production de VE, *in vitro*, en inhibant cette mort cellulaire et en comparant les niveaux de VE dans le milieu extracellulaire avec des cellules en apoptose (TABLEAU 19).

La mort cellulaire peut également modifier le contenu des VE. Ainsi, les VE peuvent être enrichies en protéines liées au métabolisme des ERO, à la réparation de l'ADN, et au repliement des protéines (Abramowicz *et al.*, 2019) comme cela a été décrit dans des EXO libérés par des cellules cancéreuses irradiées. La modification du contenu de ces VE pourrait être directement dépendante de l'activation de la caspase 3 (Pavlyukov *et al.*, 2018).

Tableau 19 : Implication de la mort cellulaire par apoptose dans la libération des VE *in vitro*

Type de VE	Type cellulaire	Inducteur de mort cellulaire	Inhibiteur d'apoptose	Référence
MV	Adipocytes	Palmitate	Inhibiteur caspase 3	(Eguchi <i>et al.</i> , 2015)
	Hépatocytes	Palmitate Lysophosphatidylcholine	Inhibiteur caspase 3	(Povero <i>et al.</i> , 2013)
	Cellules β pancréatiques	Mutation HNF1A	Inhibiteur caspase 3	(Bonner <i>et al.</i> , 2010)
EXO	Cellules HeLa	Staurosporine	KO Caspases 3/9	(Park <i>et al.</i> , 2018)
	Cellules pulmonaires	Irradiation	KO p53	(Yu <i>et al.</i> , 2006b)
	Cellules endothéliales	Privation sérum	Inhibiteur ou siARN caspase 3	(Sirois <i>et al.</i> , 2011)
	Cellules endothéliales	Privation sérum	Inhibiteur ou KO caspase 3	(Dieudé <i>et al.</i> , 2015)
VE	Hépatocytes	Palmitate Lysophosphatidylcholine	Inhibiteur caspases KO caspases 3/8 ShARN caspase 8	(Hirsova <i>et al.</i> , 2016)
	Hépatocytes	Ethanol	Inhibition ou shARN caspase 3	(Verma <i>et al.</i> , 2016)
	Macrophages	Privation sérum	-	(Farinacci <i>et al.</i> , 2012)
	Cellules dendritiques	UV	-	(Théry <i>et al.</i> , 2001)
	Cellules issues de gliome	UV	Inhibiteur caspase 3	(Pavlyukov <i>et al.</i> , 2018)

L'augmentation de la libération de VE suite à l'apoptose a aussi été démontrée *in vivo*. En effet, il a été mis en évidence un lien entre apoptose et quantité de VE circulantes chez des souris obèses (Eguchi *et al.*, 2015), des souris NASH (Hirsova *et al.*, 2016; Povero *et al.*, 2013), des souris exposées à l'éthanol (Verma *et al.*, 2016). Enfin, chez l'Homme, une augmentation des MV dites apoptotiques est détectée dans le plasma de patients présentant un lupus. Ces MV sont dites apoptotiques car elles présentent des modifications liées à l'apoptose, à savoir des protéines reflétant les modifications de la chromatine et des histones comme H4K8,12,16Ac et H2BK12Ac (Dieker *et al.*, 2016).

A l'heure actuelle, **les mécanismes liés à la mort cellulaire, régulant la formation de ces EXO ou MV** ne sont pas bien encore bien définis.

La majorité des études montre une libération dépendante de l'activation de la caspase 3 (TABLEAU 19). Ainsi, la **caspase 3 active peut cliver la kinase ROCK et l'activer** (Eguchi *et al.*, 2015; Hirsova *et al.*, 2016; Verma *et al.*, 2016) (FIGURE 17). La protéine ROCK est bien connue pour intervenir dans la régulation de la dynamique de l'actine, au niveau de la membrane plasmique. Les nouveaux microfilaments d'actine formés participent au bourgeonnement de la membrane plasmique vers l'extérieur lors de la biogénèse des MV (cf II.A.1.b Biogénèse des microvésicules en page 71). L'activation de ROCK, lors de l'apoptose, favoriserait donc la libération de MV à des temps précoces et a été décrit dans des hépatocytes ou adipocytes en apoptose *in vitro* (Eguchi *et al.*, 2015; Hirsova *et al.*, 2016; Verma *et al.*, 2016) mais aussi *in vivo* chez des souris (Hirsova *et al.*, 2016).

Cependant, quelques études indiquent que la libération de VE lors de l'apoptose peut être dépendante d'événements plus précoces en amont de l'activation de la caspase 3 (Yu *et al.*, 2006b). Un mécanisme, permettant la sécrétion d'EXO, serait **l'activation de p53** (FIGURE 17). En effet, le facteur de transcription p53 activé contrôle positivement l'expression de la protéine TSAP6 (*Tumor suppressor activated pathway 6*) (Yu *et al.*, 2006b). Cette protéine serait un acteur essentiel de la sécrétion d'EXO et du tri/chargement de cargo dans ces EXO (Amzallag *et al.*, 2004; Lespagnol *et al.*, 2008). Par contre, les événements moléculaires précis liant TSAP6 à la formation de MVB ou d'ILV ne sont pas connus. Une autre voie serait **l'interaction SP1/SP1R1** (Park *et al.*, 2018) (FIGURE 17). Lors de la phase précoce de l'apoptose, dans les cellules Hela (Park *et al.*, 2018), l'augmentation de la libération d'EXO impliquerait des lipides (*cf II.A.1.a Biogénèse des exosomes en page 69*), précisément, par l'activation de la SMase, de la céramidase et de la sphingosine kinase 2 (SPK2). La SPK2 catalyse la synthèse de la sphingosine-1-phosphate (S1P) qui se lie alors aux récepteurs S1PR1 ou S1PR3. Ces récepteurs permettent la transduction du signal *via* les sous-unités $\beta\gamma$ de protéines G, aboutissant à la modulation du cytosquelette d'actine par les GTPases de la famille Rho, facilitant l'endocytose et donc la formation d'endosomes. Ces endosomes deviennent alors des MVB permettant la formation d'ILV.

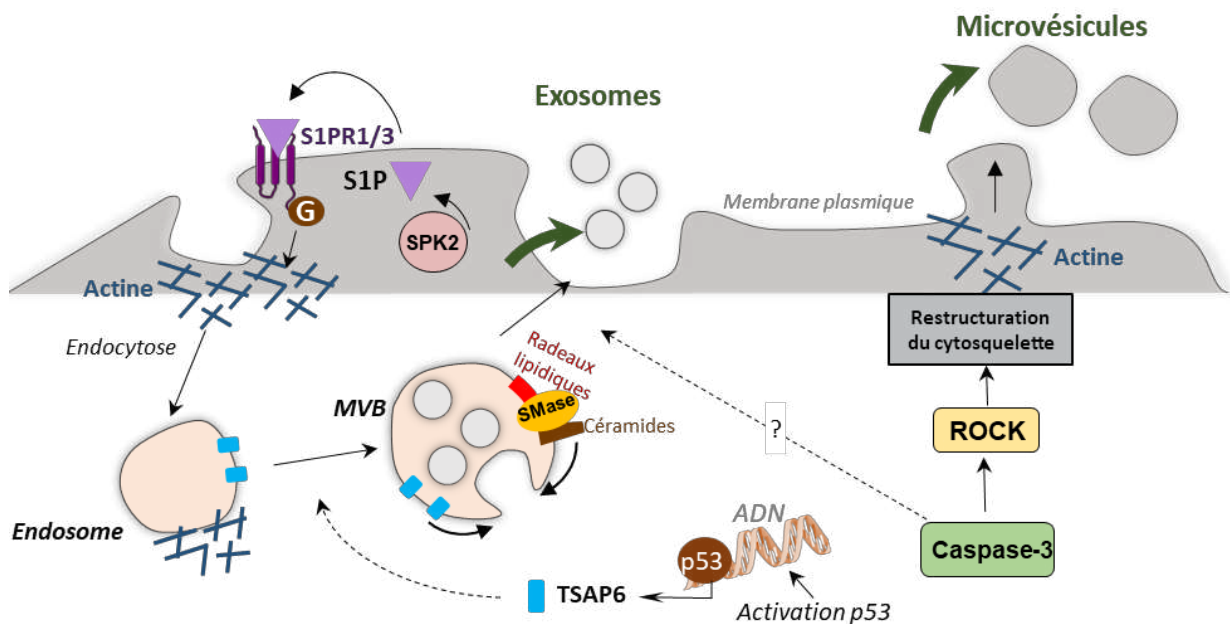


Figure 17 : Mécanismes possibles de libération de VE suite à l'induction de l'apoptose
 S1P : Sphingosine-1-phosphate, S1PR : S1P receptor, SPK2 : Sphingosine kinase 2, G : protéine G

B. Caractéristiques biophysiques et biochimiques

Les travaux de recherche sur les VE nécessitent l'isolement de ces VE ainsi qu'une caractérisation biophysique ou biochimique. Les caractéristiques biophysiques et biochimiques des VE permettent de distinguer, et donc de séparer, les MV des EXO, mais peuvent être aussi le reflet de stress cellulaires ou de maladies. Particulièrement, les VE retrouvées *in vivo* dans les liquides biologiques comme le plasma et les urines pourraient servir de biomarqueurs de maladies. Il est alors important de les étudier avec des méthodes efficaces. Le domaine d'étude étant récent, il est difficile de distinguer les meilleures méthodes parmi les nombreuses possibilités (TABLEAU 21). Dans ce chapitre, nous chercherons à les clarifier. Ces différentes méthodes permettent aussi d'identifier des caractères communs et spécifiques aux deux types de VE.

1. Méthodes d'études des caractéristiques des VE

Dans un premier temps, il est nécessaire d'isoler les VE, les purifier et les concentrer pour dans un deuxième temps les caractériser.

a. Méthodes d'isolement

A l'heure actuelle, différentes méthodes d'isolement des VE existent et elles reposent sur la taille et la densité des particules, leur solubilité, leur capacité de s'agréger dans différents composés par précipitation ou sur leur interaction spécifique avec différents anticorps. Cependant, aucune méthode standard de référence n'a été décrite pour l'isolement de populations pures de différentes catégories de VE.

i. Séparation selon les propriétés physiques

Les VE peuvent être isolées, du milieu de culture ou d'un liquide biologique, selon leur taille ou leur densité, en utilisant des procédures faisant intervenir l'ultracentrifugation, la chromatographie d'exclusion ou l'ultrafiltration.

α) Ultracentrifugation

Jusqu'à présent, la méthode la plus largement utilisée pour isoler les VE et les différentes sous-populations de VE est l'ultracentrifugation. Cette méthode classique d'isolement, repose sur la sédimentation des VE à une force de centrifugation élevée.

▪ *Ultracentrifugation différentielle*

L'ultracentrifugation différentielle repose sur la différence de sédimentation entre les différents types de particules (VE et complexes protéiques). Les particules avec un diamètre plus large et une densité plus importante seront celles qui sédimenteront en premier. La FIGURE 18 présente les différentes étapes nécessaires à l'isolement des EXO, des MV ou bien des VE totales.

La durée d'ultracentrifugation peut être allongée afin d'obtenir un meilleur rendement en VE mais au détriment de la pureté et donc avec un risque de contamination par des complexes protéiques

solubles (Cvjetkovic *et al.*, 2014). Les lavages, à l'inverse, cherchent à éliminer les contaminations protéiques, mais participent également à la diminution du rendement (Webber and Clayton, 2013).

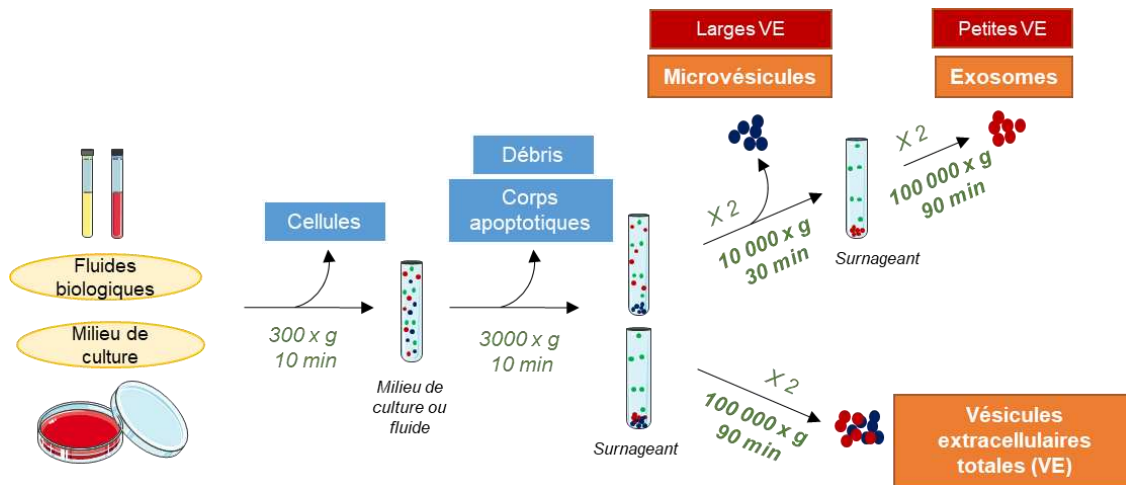


Figure 18 : Isolement des VE par ultracentrifugation différentielle

La première étape (centrifugations) permet d'éliminer les cellules, les débris cellulaires et les corps apoptotiques ; la seconde étape (ultracentrifugations) permet de culoter les VE, puis de les laver avec un tampon afin d'éliminer les contaminants protéiques en faisant une seconde ultracentrifugation (x 2) dans les mêmes conditions.

En fait, le choix des rotors, les vitesses et le temps d'ultracentrifugation peuvent varier, expliquant la multiplicité des protocoles rencontrés dans la littérature (Cvjetkovic *et al.*, 2014; Livshits *et al.*, 2015). L'ensemble de ces facteurs peut influencer le rendement ainsi que la pureté du culot de particules.

De récentes publications, mettent en évidence que ces protocoles d'ultracentrifugation ne permettent qu'un enrichissement en EXO ou en MV et n'exclut pas la présence d'un type de VE dans le culot prévu pour l'autre type de VE, puisque la séparation est effectuée selon la taille des particules. La distinction entre EXO et MV n'est donc pas stricte. Par conséquent, la qualification d'EXO ou de MV suite à l'isolement par ultracentrifugation doit être systématiquement vérifiée grâce à d'autres techniques (Théry *et al.*, 2018) comme la présence ou l'absence de marqueurs protéiques spécifiques de chaque type de VE (cf II.B.3 Caractéristiques biochimiques en page 91), la mesure de la taille par NTA et la visualisation des VE par microscopie électronique (cf II.B.1.b.i Analyses physiques en page 85) par exemple. Si de telles informations ne peuvent être fournies, il est préférable de parler de larges VE (large EVs ou IEVs) pour celles issues du culot à 10 000 x g et de petites VE (small EVs ou sEVs) pour celles issues du culot à 100 000 x g (FIGURE 18).

Du fait de nombreux avantages offrant l'ultracentrifugation, cette méthode reste la méthode la plus utilisée actuellement. En 2015, plus de 90 % des travaux effectués sur les VE, isolent les VE de cette manière (Gudbergsson *et al.*, 2016). Néanmoins, de nouvelles méthodes d'isolement se développent afin de s'affranchir de certains inconvénients de l'ultracentrifugation (TABLEAU 20) et sont de plus en plus fréquemment utilisées.

Tableau 20 : Avantages et inconvénients de l'ultracentrifugation pour d'isolement des VE

Avantages	Inconvénients
<ul style="list-style-type: none"> - Volumes importants de fluides biologiques - Peu de consommables (faible coût en routine) - Pas d'addition de réactifs 	<ul style="list-style-type: none"> - Contamination protéique possible - Reproductibilité faible - Durée d'isolement long - Equipement coûteux

▪ Gradient de densité

La limite principale de l'ultracentrifugation différentielle serait la co-précipitation des VE avec des agrégats protéiques. Pour s'affranchir d'une telle contamination, l'utilisation de gradient de densité ou de coussin de densité, construits dans le tube d'ultracentrifugation permet de séparer les vésicules selon leur densité (Doyle and Wang, 2019) (FIGURE 19). Les VE avec une densité comprise entre 1,1 et 1,18 g/mL (Konoshenko *et al.*, 2018), peuvent alors être séparées de contaminants protéiques, comme l'albumine avec une densité entre 1,03 et 1,15 g/mL et les lipoprotéines avec une densité entre 1 et 1,1 g/mL (Onódi *et al.*, 2018). Jusqu'à présent, il existe deux types de composés pour préparer un gradient de densité : le saccharose ou l'iodoxinol (OptiPrep™). Il serait préférable d'utiliser l'iodoxinol qui permet de former des solutions iso-osmotiques contrairement au saccharose qui forment des solutions hyper-osmotiques. Ainsi, le saccharose, qui a l'avantage d'être moins coûteux, pourrait toutefois provoquer la déformation des VE (Konoshenko *et al.*, 2018).

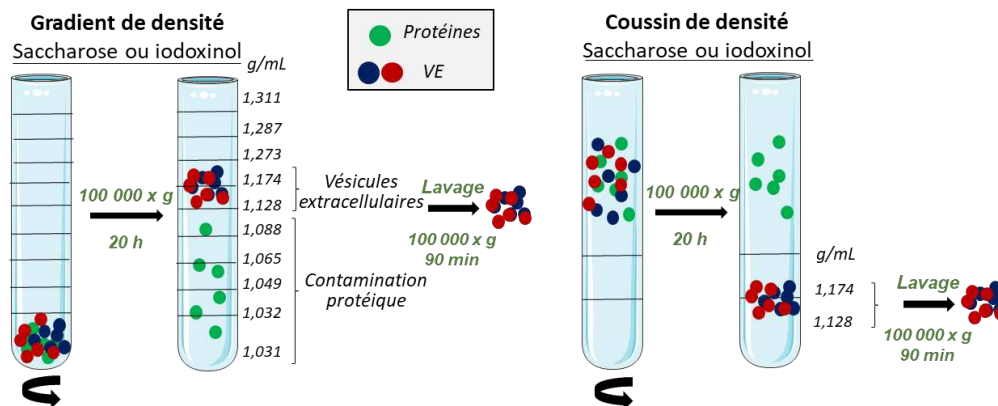


Figure 19 : Isolement des VE par gradient ou coussin de densité

β) Filtration

De nouvelles méthodes d'isolement des VE se développent utilisant la séparation des particules selon leur taille, principalement l'ultrafiltration et la chromatographie d'exclusion stérique.

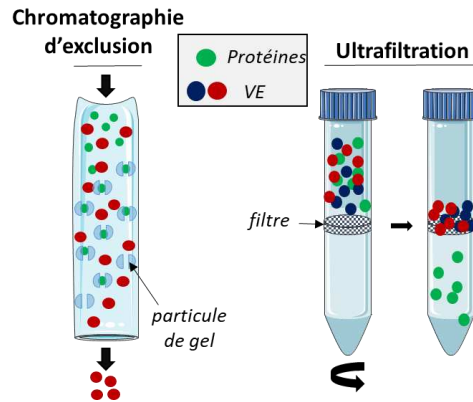


Figure 20 : Isolement des VE par filtration

▪ **Chromatographie d'exclusion**

La chromatographie d'exclusion stérique (SEC : *size exclusion chromatography*) consiste à faire passer un échantillon au travers d'une colonne chargée d'un gel poreux. Les particules de petites tailles comme les protéines, sont ralenties par leur entrée dans les pores tandis que les particules de plus grandes tailles comme les VE ne peuvent pas pénétrer dans le gel et éluent donc plus rapidement (Böing *et al.*, 2014) (FIGURE 20). Bien que la chromatographie SEC permette de purifier les VE de façon importante et de maintenir l'intégrité de leur structure et de leur activité biologique, l'isolement des VE d'un seul échantillon nécessite plusieurs heures et cette méthode ne peut donc pas être utilisée à grand échelle (Monguió-Tortajada *et al.*, 2019). Pour réduire le temps d'isolement, de nombreuses compagnies développent des colonnes de chromatographie SEC prêtes à l'emploi. Ces colonnes présentent des pores de 35 ou 75 nm permettant de récupérer les VE au bout de seulement 15 min pour un volume d'échantillon entre 100 µL et 10 mL (Patel *et al.*, 2019).

De façon générale, la chromatographie SEC reste une méthode avec un rendement plutôt faible, et un coût élevé avec l'utilisation de nombreux sorbants. En plus, les fractions de VE obtenues sont diluées et nécessiteront une étape supplémentaire de concentration (Konoshenko *et al.*, 2018) par ultrafiltration.

▪ **Ultrafiltration**

Le principe de l'ultrafiltration repose sur l'utilisation de membranes présentant des pores de diamètres connus permettant de retenir des particules d'un diamètre supérieur. On parle de seuil de coupure (ou *cut off*) pour désigner le plus petit diamètre des particules retenues par la membrane. Etant donné que le diamètre est corrélé au poids moléculaire, l'unité du seuil de coupure est le kiloDalton (kDa). L'ultrafiltration correspond à l'utilisation de membranes dont les pores retiennent des particules de petites tailles entre 1 et 100 nm. La microfiltration permet de retenir des particules de taille plus élevée (entre 100 nm et 10 µm).

Plusieurs méthodologies d'isolement des VE font appel à la microfiltration et surtout l'ultrafiltration. La microfiltration n'est utilisée qu'en méthode préparatoire avant l'ultracentrifugation. Par exemple, une microfiltration à l'aide d'un filtre 0,22 μm permet d'éliminer une grande partie des MV avant de réaliser l'ultracentrifugation pour obtenir les EXO (Théry *et al.*, 2006). L'ultrafiltration nécessite qu'une pression soit appliquée pour forcer le passage du fluide au travers de la membrane. Deux possibilités existent à l'heure actuelle :

- Placer la membrane dans une cartouche qui est centrifugée à 3000 x g ; des membranes avec un seuil de coupure de 100 et 500 kDa permettent ainsi de laisser passer les protéines solubles et de retenir les VE (Konoshenko *et al.*, 2018; Zhang *et al.*, 2018) (FIGURE 20).
- Placer la membrane dans une seringue ; la force sera exercée par le piston ; deux membranes avec des pores de 200 nm et de 20 nm peuvent être incorporées dans une seringue (modèle ExoMir™), la première, située en amont, permet de retenir des VE assimilées à des MV et la seconde, en aval, permet de retenir les autres VE et de laisser passer les protéines. Ainsi, les petites vésicules assimilées à des EXO se trouvent entre les deux membranes dans la seringue (Doyle and Wang, 2019; Zhang *et al.*, 2018).

La concentration des VE par ultrafiltration raccourcit considérablement le temps par rapport à l'ultracentrifugation ; en revanche, elle peut conduire à la diminution du rendement de VE, qui peuvent être retenues à l'intérieur des membranes, voire à la perte de VE par déformation ou lyse, à cause de la pression exercée sur la membrane lors de la centrifugation.

ii. Séparation selon les propriétés chimiques

D'autres méthodes se basent sur le manque de solubilité des VE dans certains milieux ou sur la potentielle interaction de composés à la surface des VE avec des molécules retenues sur une surface.

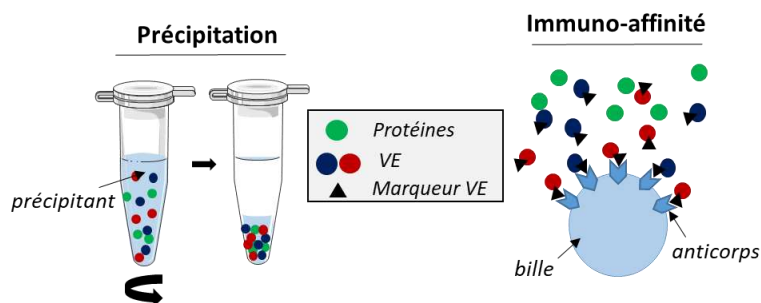


Figure 21 : Isolement des VE selon leurs propriétés chimiques

α) Précipitation

▪ **Précipitation par le polyéthylène glycol**

La précipitation des VE par le polyéthylène glycol (PEG) est la seconde méthode la plus utilisée après l'ultracentrifugation différentielle (Konoshenko *et al.*, 2018). Par cette méthode, la solubilité des VE dans l'eau est réduite. En effet, le PEG est un polymère hydrophile qui retient les molécules d'eau. Ainsi, après addition de PEG à un échantillon biologique contenant des VE, les VE sont précipitées et récupérées par centrifugation à 1500 x g (FIGURE 21) (Doyle and Wang, 2019). De nombreux kits sont commercialisés permettant une isolation rapide des VE, surtout de petites tailles (Total Exosome Isolation Kit™, ExoQuick™ ou ExoPrep™).

▪ **Précipitation par l'acétate de sodium**

La précipitation à l'aide de l'acétate de sodium repose sur la présence de la phosphatidylsérine chargée négativement à la surface des VE. L'acétate de sodium interfère avec l'hydratation de la surface des VE et initie l'agrégation des VE par formation d'interaction hydrophobes. Les VE sont sédimentées par centrifugation à 5000 x g et récupérées (Brownlee *et al.*, 2014).

Bien que les méthodes de précipitation soient rapides et faciles d'utilisation et puissent être utilisées avec des volumes très faibles d'échantillon, la principale limitation reste toutefois la contamination protéique, qui est la plus élevée de toutes les méthodes actuellement à disposition pour l'isolement des VE (Patel *et al.*, 2019).

β) Affinité

Des molécules présentent à la surface des VE telles que les protéines CD63, CD81 ou CD9 (*cf II.B.3 Caractéristiques biochimiques en page 91*), peuvent interagir par immuno-affinité avec leur anticorps. Ces anticorps peuvent être attachés à une surface ou à des billes magnétiques (FIGURE 21). En fait, les VE ainsi isolées appartiennent à des sous-populations particulières de VE exprimant le marqueur utilisé pour l'isolement et ne sont pas représentatives de l'ensemble de la population de VE. La solution serait d'utiliser une combinaison de marqueurs permettant l'isolement d'un maximum de VE (Monguió-Tortajada *et al.*, 2019). Cependant, l'avantage de cette méthode est la possibilité d'isoler des VE émises par un type cellulaire précis dans un échantillon complexe, comme par exemple l'utilisation du marqueur ASGPR1 (*Asialoglycoprotein receptor 1*) qui permettrait l'isolement des VE issues spécifiquement des hépatocytes dans un échantillon de sang ou d'urine (Doyle and Wang, 2019). En outre, cette méthode est la plus coûteuse parmi celles à disposition actuellement.

iii. Remarques de conclusion

A ce jour, aucun consensus n'a été établi quant à la méthode d'isolement des VE adéquate. Toutes présentent des avantages et des inconvénients (TABLEAU 21). C'est la raison pour laquelle, il est essentiel de rapporter l'ensemble des détails techniques de ces protocoles lors de la

publication des travaux. Le choix d'une méthode d'isolement se fait alors en fonction du matériel à disposition dans le laboratoire, le volume et la nature des échantillons de départ, et des éventuelles analyses postérieures prévues sur ces VE

Tableau 21 : Comparaison des différentes techniques d'isolement de VE

Méthodes	Pureté	Rendement	Utilisation	Volume de l'échantillon	Temps	Coût
Ultracentrifugation différentielle	++	+	++	100 mL	3-10 h	+
Gradient de densité	++++	+	+	1 mL	20-90 h	+ / ++
Chromatographie d'exclusion	+++	++	+	10 mL	10 min- 4 h	+++
Ultrafiltration	+ / ++	+	+++	50 mL	1-2 h	++
Précipitation	+	+++	+++	1 mL	30 min-12 h	+++
Immuno-capture	++	+ / ++	++	1 mL	4 – 20 h	++++

b. Méthodes de caractérisation

La caractérisation revêt une importance cruciale puisque la plupart des techniques d'isolement actuelles ne parviennent pas à fournir une population pure de VE et se limitent à un enrichissement. En outre, l'évaluation des caractéristiques physico-chimiques des VE est utile dans la compréhension de leur biogénèse, de leur sécrétion, de leurs interactions, ainsi que de leurs fonctions. A l'heure actuelle, les méthodes d'analyses permettent de visualiser leur morphologie et de mesurer leurs caractéristiques physiques ou biochimiques.

i. Analyses physiques

α) Microscopie électronique

A ce jour, la technique indispensable pour visualiser la présence et la morphologie des VE, présentes dans un isolat, reste la microscopie électronique à transmission (MET) (TABLEAU 22). Pour l'étude des VE, la MET classique consiste en une coloration négative des VE grâce à une solution d'uranyle acétate. Avant observation en MET classique, les échantillons de VE subissent un traitement important ; ils doivent être fixés dans la glutaraldéhyde et déshydratés (Théry *et al.*, 2006), ce qui peut conduire à l'altération des VE. Ceci a deux conséquences : 1) la MET ne peut pas être utilisée pour mesurer les diamètres des VE 2) toutes les VE ont une forme relativement sphérique, mais les EXO apparaissent en forme de cupule. Cette déformation spécifique aux EXO devient une caractéristique.

La cryo-MET, contrairement à la MET classique, ne nécessite pas de fixation lors de la préparation de l'échantillon et évite la dénaturation des VE. Les VE sont ainsi rapidement congelées dans l'éthane liquide, sans aucune déshydratation, et observées sous azote liquide à très faible

température, ce qui permet de les figer sous leur état natif dans la glace (Gurunathan *et al.*, 2019). Par conséquent, la mesure des diamètres peut être effectuée en cryo-MET et les VE présentent leur forme normale sphérique.

En outre, comme les phénomènes d'adsorption des VE sur la grille de MET sont complexes et peu contrôlés, la MET et la cryo-MET ne peuvent pas être utilisées pour mesurer la concentration des VE (Coumans *et al.*, 2017).

Par ailleurs, ces deux techniques permettent également des immuno-marquages des VE grâce à l'utilisation d'anticorps marqués à l'or. Ceci permettant d'obtenir des informations supplémentaires sur le phénotype de ces VE (Arraud *et al.*, 2014; Valadi *et al.*, 2007).

Tableau 22 : Avantages et inconvénients de la MET dans la caractérisation des VE

	Avantages	Inconvénients
MET	<ul style="list-style-type: none"> - Technique d'acquisition d'images la plus rapide (25 min / échantillon) - Confirme la présence de VE facilement 	<ul style="list-style-type: none"> - Morphologie altérée - Pas de visualisation de la bicouche lipidique et du contenu luminal - Pas de quantification possible
Cryo-MET	<ul style="list-style-type: none"> - Morphologie intacte - Visualisation de l'ultrastructure (bicouche lipidique et contenu luminal) - Préparation des échantillons relativement rapide 	<ul style="list-style-type: none"> - Equipement ultraspécialisé - Technique d'acquisition d'images très lente (plusieurs heures/échantillon) - Pas de quantification possible

β) La microscopie à force atomique

La microscopie à force atomique (AFM : *atomic force microscopy*) permet l'analyse de la topologie de la surface d'un échantillon. Les VE sont maintenues immobilisées, sur une surface plane déshydratée, soit par interactions électrostatiques, soit par liaisons avec des anticorps spécifiques (Hardij *et al.*, 2013). L'AFM est composé d'une pointe et d'un système optique constitué d'un laser ; lorsque la pointe est en contact avec l'échantillon, le rayon laser est dévié et permet de renseigner sur la taille et la topographie des échantillons. Par ailleurs, l'AFM permet de mesurer des paramètres mécaniques comme la rigidité, l'élasticité ou l'adhérence des VE (Sharma *et al.*, 2014) (TABLEAU 23). Elle permet également de fournir des informations de nature bio-fonctionnelle sur les VE puisqu'elle peut être associée à des immuno-marquages avec des particules d'or ou par liaison à la surface d'analyse grâce à des anticorps spécifiques d'une molécule d'intérêt (Hartjes *et al.*, 2019).

Tableau 23 : Avantages et inconvénients de l'AFM dans la caractérisation des VE

Avantages	Inconvénients
<ul style="list-style-type: none"> - Méthode quantitative - Peu de préparation de l'échantillon - Caractéristiques structurales, mécaniques et fonctionnelles obtenues simultanément - Mesure individuelle de chaque VE 	<ul style="list-style-type: none"> - Equipement ultraspécialisé - Technique d'acquisition très lente (plusieurs heures/échantillon)

χ) Nanoparticle Tracking Analysis

Le *Nanoparticle Tracking Analysis* (NTA) permet d'enregistrer le mouvement brownien et donc de mesurer la vitesse de déplacement de particules. Cette vitesse étant inversement proportionnelle au diamètre des particules, le NTA permet de calculer le diamètre des particules selon la loi de Stokes-Einstein :

$$\text{Loi de Stokes-Einstein} \quad \frac{(x, y)^2}{4} = Dt = \frac{k_b T}{3\pi\eta d}$$

Dt : constante de diffusion
T : température absolue
k_b : constante de Boltzmann
η : viscosité du milieu
d : diamètre de la particule

L'échantillon est soumis à la lumière d'un laser et les particules en suspension, présentes sur la trajectoire du laser, diffusent la lumière. Ainsi, les particules sont visualisées grâce à un microscope couplé à une caméra. Le suivi du déplacement individuel de chaque particule présente dans une fenêtre de mesure, est réalisé par enregistrement vidéo. Le logiciel NTA permet ensuite de calculer le diamètre de chaque particule individuellement en se basant sur la formule de Stokes-Einstein (Gardiner *et al.*, 2013; Momen-Heravi *et al.*, 2012) (FIGURE 22).

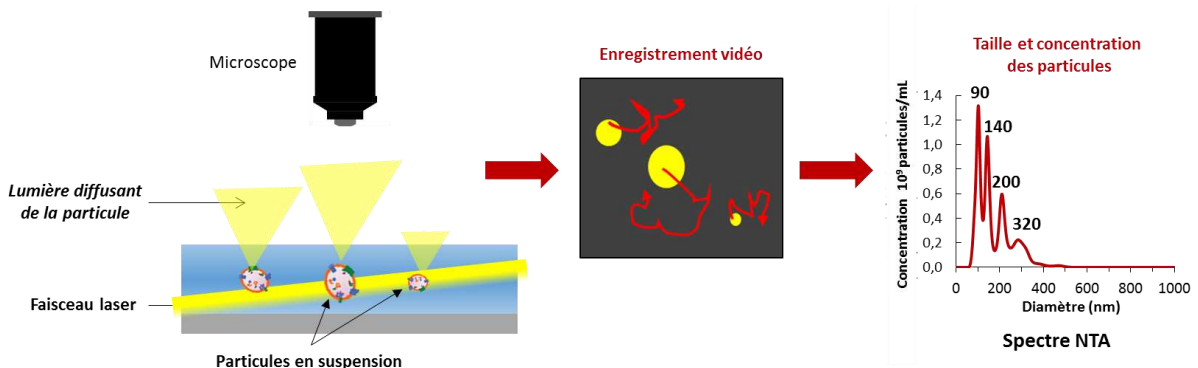


Figure 22 : Principe du Nanoparticle Tracking Analysis (NTA)

Le NTA permet alors d'obtenir sur un échantillon, le diamètre et la concentration en VE ; en plus, il fournit une indication de la distribution des VE en fonction de leur diamètre (Gardiner *et al.*, 2013) (FIGURE 22) (TABLEAU 24). Par ailleurs, le NTA, peut aussi détecter des populations spécifiques de VE lorsqu'elle sont préalablement marquées par des anticorps couplés à des fluorochromes (Dragovic *et al.*, 2011).

Tableau 24 : Avantages et inconvénients du NTA dans la caractérisation des VE

Avantages	Inconvénients
<ul style="list-style-type: none"> - Méthode quantitative - Peu de préparation de l'échantillon - Mesure rapide - Mesure individuelle de chaque VE - Diamètre, concentration et répartition obtenues simultanément 	<ul style="list-style-type: none"> - Contamination possible par les dilutions - Différence des indices de réfraction des différentes particules en suspension → le nombre de particules les plus larges peut être surestimé - Mesure des trajectoires trop longues → perte des VE - Mesure des trajectoires trop courtes → incertitude statistique sur la distribution des tailles - Taille mesurée peut être différente de celle mesurée en MET

δ) Cytométrie en flux

La cytométrie en flux permet l'analyse multiparamétrique ainsi que la quantification de VE et est actuellement largement utilisée pour l'étude des MV issues du sang. Un flux entraîne les particules en suspension et les fait passer, individuellement devant le faisceau d'un laser. La diffusion de la lumière permet alors de renseigner sur la taille et la granulosité des particules (van der Pol *et al.*, 2012). De plus, la cytométrie en flux peut, également, détecter la fluorescence émise par les VE marquées au préalable par un anticorps couplé à un fluorochrome (van der Pol *et al.*, 2016). Les cytomètres classiques, ne peuvent pas détecter des particules de diamètre inférieur à 300 nm mais de nouvelles générations de machines se développent repoussant la limite vers les 100 nm. Avec les cytomètres classiques, l'analyse des VE de petites taille assimilées aux EXO est difficile, et nécessite le couplage au préalable avec des billes (Doyle and Wang, 2019). La cytométrie en flux est une technique qui permet également de déterminer le type cellulaire ayant produit des VE dans un mélange complexe comme les fluides biologiques (plasma, urines). En outre, la cytométrie en flux (TABLEAU 25), est la méthode de caractérisation des VE qui a le potentiel le plus fort pour être utilisée dans l'analyse des échantillons cliniques et pourrait donc servir dans des applications de diagnostic ou de recherche clinique (Gurunathan *et al.*, 2019).

Tableau 25 : Avantages et inconvénients de la cytométrie en flux dans la caractérisation des VE

Avantages	Inconvénients
<ul style="list-style-type: none"> - Méthode quantitative - Méthode rapide haut débit - Utilisation envisageable en clinique 	<ul style="list-style-type: none"> - Détection peu sensible au VE car leur indice de réfraction est faible - Pas entre la taille des VE et des billes de calibration car leur indice de réfraction est différent - Agrégation des VE → sous-estimation de la concentration et surestimation de la taille

Selon la société internationale concernant les vésicules extracellulaires (ISEV) et l'initiative EV-TRACK, il est recommandé lors de l'analyse biophysique des VE, d'utiliser deux techniques complémentaires pour la caractérisation de vésicules permettant 1) l'observation des VE comme la microscopie électronique ou l'AFM 2) le suivi individuel de particule comme le NTA ou la cytométrie en flux (EV-TRACK Consortium *et al.*, 2017; Théry *et al.*, 2018).

ii. Analyses biochimiques

Les analyses biochimiques des VE reposent principalement sur l'étude de la composition protéique par les méthodes classiques.

Selon ISEV et l'initiative EV-TRACK, il est recommandé lors de la caractérisation biochimique des VE d'analyser : 1) la présence d'au moins trois protéines enrichies dans les VE, comprenant au moins une protéine transmembranaire ou ancrée à la bicouche lipidique et une protéine cytosolique 2) l'absence d'une protéine d'une fraction non VE.

2. Caractéristiques biophysiques

Les caractéristiques biophysiques comme la morphologie, le diamètre, la densité ou la rigidité peuvent permettre de distinguer différentes VE.

a. Morphologie

En MET avec une coloration négative, les EXO apparaissent avec une forme en cupule tandis que les MV apparaissent avec une forme plutôt sphérique (FIGURE 23) et avec la bicouche lipidique plus visible. Bien que la morphologie en cupule des EXO, observée en MET, soit un artéfact, elle est généralement utilisée pour discriminer les EXO (Colombo *et al.*, 2014b; van der Pol *et al.*, 2012). La cryo-MET indique que la majorité des VE (EXO et MV) ont une forme sphérique avec une bicouche lipidique ; certains types cellulaires seraient capables de produire des VE en forme de tubule ou avec des doubles voire triples membranes (Arraud *et al.*, 2014; Höög and Lötvall, 2015).

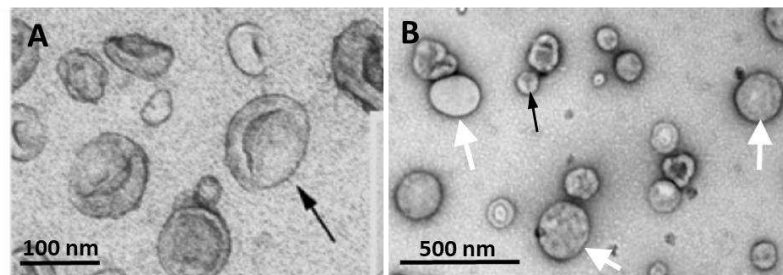


Figure 23 : Morphologie caractéristique des VE en microscopie électronique à transmission
A) Forme en cupule des EXO (flèche noire) (adapté de Théry *et al.*, 2006) **B)** Forme sphérique des MV (flèche blanche) (adapté de van der Pol *et al.*, 2010)

b. Diamètre

Les petites vésicules d'origine endosomale ou EXO sont un groupe homogène de VE de taille comprise entre 50 et 200 nm tandis que les vésicules issues du bourgeonnement de la membrane plasmique ou MV sont un groupe beaucoup plus hétérogène avec des tailles pouvant aller de 100 nm jusqu'à 1 μ M (Colombo *et al.*, 2014b; van der Pol *et al.*, 2012) (FIGURE 24).

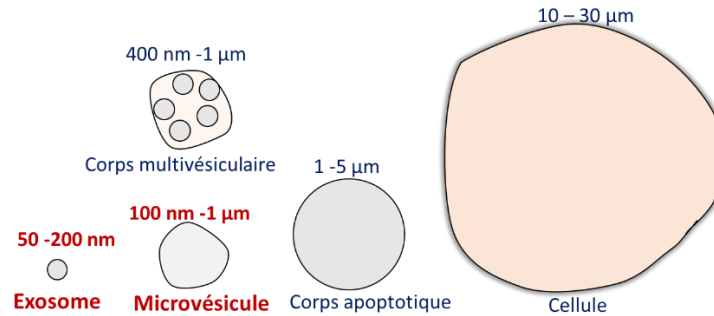


Figure 24 : Taille des différents types de VE

c. Densité

Les EXO, sédimentant à 100 000 x g, auraient une densité comprise entre 1,1 et 1,18 g/mL qui permettent de les distinguer des protéines et des lipoprotéines également présents dans les fluides biologiques (cf II.B.1.a.i.a) *Ultracentrifugation en page 79*). Les MV, sédimentant à 10 000 x g, ont à l'heure actuelle une densité non encore déterminée qui pourrait être légèrement supérieure ou se superposer avec la densité des EXO (Colombo *et al.*, 2014b; van der Pol *et al.*, 2012). En revanche, il existe une multitude de différentes sous-populations de VE se distinguant par des différences de densité et des différences de contenu (Lässer *et al.*, 2018).

d. Fluidité

Les VE étant entourées d'une bichouche lipidique, leur fluidité peut ainsi être mesurée de la même manière que celle de la membrane plasmique. La fluidité des EXO est diminuée par rapport à celle de la membrane plasmique (Laulagnier *et al.*, 2004). Du fait de la différence de leur composition en lipides et de leur ratio protéines/lipides (cf II.B.3.c *Lipides en page 93*), les EXO et les MV peuvent se distinguer par leur fluidité (Record *et al.*, 2018). En effet, les EXO seraient moins fluides que les MV car ils résistent à divers traitements par les détergents (Osteikoetxea *et al.*, 2015a). Par ailleurs, la mesure directe de l'ordre membranaire par le sonde fluorescente di-4-ANEPPDHQ, en microscopie et en cytométrie en flux, a permis de mettre en évidence que les EXO possèdent l'ordre membranaire le plus élevé (Osteikoetxea *et al.*, 2015b).

Par ailleurs, l'AFM permet de distinguer des sous-populations de VE selon leur rigidité (Ridolfi *et al.*, 2019). Ainsi, la rigidité des VE issues de la circulation sanguine, diminue chez les patients atteints de sphérocytose héréditaire par rapport à des VE de donneurs sains (Vorselen *et al.*, 2018), montrant que selon les conditions physiopathologiques, la rigidité des VE pourrait être altérée.

3. Caractéristiques biochimiques

La composition des VE varie selon le mode de biogénèse, le type cellulaire et les conditions physiologiques ou physiopathologiques ; néanmoins toutes les VE peuvent contenir des protéines, lipides et acides nucléiques (**FIGURE 25**). Les méthodes d'isolement des VE (*cf II.B.1.a Méthodes d'isolement en page 79*) ne permettent pas d'obtenir un isolat pur de VE, d'EXO ou des MV, mais seulement des enrichissements en certaines populations de VE. Nous parlerons donc plutôt d'enrichissement moléculaire dans un type de VE, et nous éviterons d'écrire que certaines molécules ne sont présentes que dans certains types de VE.

Deux bases de données ont été développées par la communauté de recherche sur les VE : ExoCarta (Keerthikumar *et al.*, 2016) listant les protéines, ARN et lipides identifiés dans les EXO, et Vesiclepedia (Kalra *et al.*, 2012) permettant la description des données moléculaires de l'ensemble des VE. Ainsi, elles permettent de donner une vision globale des caractéristiques biochimiques communes ou spécifiques à l'ensemble des VE, des EXO ou des MV.

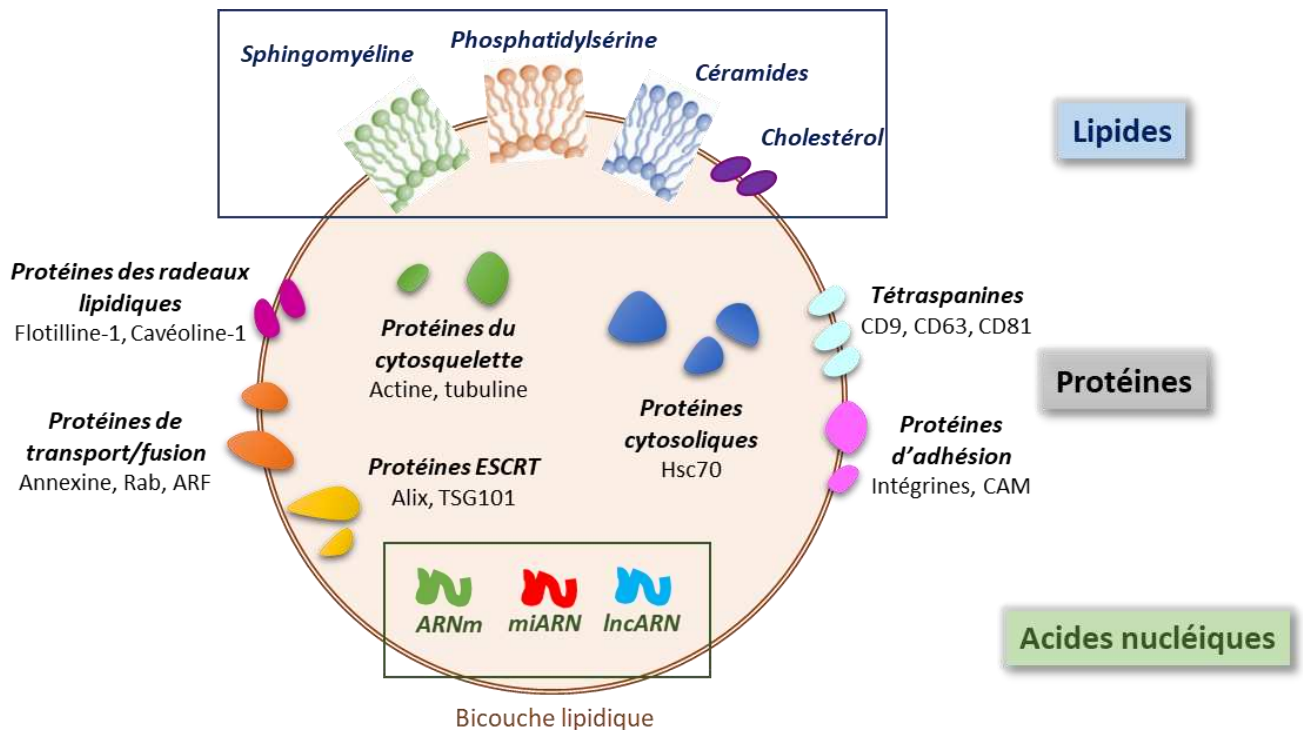


Figure 25 : Composition générale des VE

a. Protéines

i. EXO

Les EXO sont enrichis en un ensemble spécifique de protéines, par rapport aux cellules productrices. Les protéines des endosomes, de la membrane plasmique et du cytosol sont présentes dans les EXO tandis que les protéines issues du noyau, de la mitochondrie, du réticulum endoplasmique et du Golgi ne sont présentes qu'en faible quantité voire ne sont pas détectées (Colombo *et al.*, 2014b; Théry *et al.*, 2001). En revanche, dans des conditions physiopathologiques particulières, ces dernières pourraient se retrouver dans les EXO (Théry *et al.*, 2018). En outre, les EXO, quel que soit le type cellulaire producteur, sont enrichis spécifiquement en composants nécessaires à leur formation et en composants présents au niveau de leur lieu de formation (Colombo *et al.*, 2014b; Kalra *et al.*, 2016; Mathivanan *et al.*, 2010; Théry *et al.*, 2001) :

- des protéines transmembranaires impliquées dans la formation des MVB, comme Alix, TSG101, en tétraspanines, comme CD9, CD63, CD81 ou CD82
- des protéines impliquées dans le transport membranaire et la fusion, comme les annexines ou les GTPases Rab
- des protéines impliquées dans l'adhésion ou le ciblage, comme les intégrines, ou les complexes majeurs d'histocompatibilité MHC I et II
- des protéines associées aux lipides, comme la lactadhérine, des protéines des radeaux lipidiques, comme la flotilline-1 ou la cavéoline-1
- des protéines des endosomes, comme LAMP1 (*Lysosomal-associated membrane protein 1*) ou TfR (*Transferrin Receptor*)

Les EXO peuvent également être enrichis en protéines spécifiques du type cellulaire source comme la protéine ASGPR1 pour les EXO issus des hépatocytes (Conde-Vancells *et al.*, 2008).

ii. MV

L'enrichissement des MV par rapport aux cellules productrices peut se décliner de la façon suivante :

- des protéines participant à leur formation, comme ARF6, ERK, MLCK ;
- des protéines d'adhésion, comme les intégrines ou les CAM (*Cell adhesion molecules*) ;
- des protéines de la matrice extracellulaire, comme les métalloprotéinases (MMP) ;
- des protéines impliquées dans le transport membranaire et la fusion, comme les annexines ou les GTPases Rab ;
- des récepteurs membranaires, comme EGFR (*Epidermal growth factor receptor*).

En plus, il n'est pas exclu que des protéines associées à ESCRT, comme TSG101, Alix ou Vps4 ainsi que des tétraspanines puissent également être présentes dans les MV. En effet, ces protéines peuvent participer à la formation du bourgeonnement de la membrane plasmique dans certains

types cellulaires (Kalra *et al.*, 2016; Yáñez-Mó *et al.*, 2015). Enfin, les MV peuvent aussi contenir des protéines issues du noyau ou de la mitochondrie (Yáñez-Mó *et al.*, 2015).

Quelle que soit la catégorie, les VE contiennent, dans leur lumière, des protéines issues du cytosol, comme les HSP (*Heat shock protein*), du cytosquelette, comme l'actine, de la membrane plasmique et des protéines impliquées dans le trafic intracellulaire (Yáñez-Mó *et al.*, 2015).

b. Acides nucléiques

La présence d'acides nucléiques dans les VE a été décrite la première fois dans les MV issues de cellules souches embryonnaires, qui étaient enrichis, en ARNm de plusieurs facteurs de transcription pluripotents (Ratajczak *et al.*, 2006). Les EXO libérés par des mastocytes contenaient un ensemble d'ARNm fonctionnels capables d'être transcrits dans les cellules réceptrices, ainsi qu'un ensemble de miARN pouvant être transférés dans les cellules réceptrices (Valadi *et al.*, 2007).

A l'heure actuelle, de nombreuses autres études, notamment des séquençages haut-débit, décrivent également, dans les VE, la présence d'ARNm intacts, de fragments d'ARNm, de longs ARN non codants (lncARN) ainsi que des enrichissements en ARN de petites tailles de natures diverses, majoritairement des miARN (Turchinovich *et al.*, 2019). Contrairement aux cellules productrices, les VE sont relativement pauvres en ARN ribosomiaux 18S et 28S.

c. Lipides

Comme la membrane plasmique, les VE contiennent des phospholipides, des glycolipides et du cholestérol dans leur membrane, mais la répartition est différente de celle de la membrane plasmique des cellules productrices. La membrane plasmique des cellules productrices est une structure asymétrique, avec la phosphatidylsérine (PS), la phosphatidyléthanolamine (PE) et le phosphatidylinositol (PI) se trouvant principalement dans son feuillet interne, et les glycosphingolipides, phosphatidylcholine (PC) et sphingomyéline (SM) localisés majoritairement dans son feuillet externe.

i. EXO

Par rapport à la membrane plasmique des cellules productrices, les EXO sont enrichis en cholestérol (environ 40 % contre 20 %), glycosphingolipides, SM (environ 10-15 % contre 5-7 %), PS et en céramides, mais présentent des taux réduits en PC et PI et des niveaux similaires en PE et un rapport SM/PC d'environ 3 (membrane plasmique < 1) (Llorente *et al.*, 2013; Record *et al.*, 2014; Skotland *et al.*, 2017, 2020; Subra *et al.*, 2007). Cette forte quantité de cholestérol, de SM et d'acides gras saturés, est responsable de l'augmentation de la densité de leur membrane et par conséquent de l'augmentation de leur stabilité (Osteikoetxea *et al.*, 2015a) et de leur rigidité (Osteikoetxea *et al.*, 2015b). La composition lipidique peut également varier sous l'effet de différents

stimulis. Par ailleurs, le ratio protéines/lipides des EXO est le plus élevé parmi les VE (Record *et al.*, 2014; Skotland *et al.*, 2017, 2020).

ii. MV

En ce qui concerne la composition lipidique des MV, peu d'études ont été menées. À l'inverse des EXO, la composition lipidique des MV serait plus proche de celle de la membrane plasmique de la cellule productrice. Par conséquent, les MV présentent une quantité plus faible en cholestérol par rapport aux EXO et une fluidité plus importante (Durcin *et al.*, 2017; Osteikoetxea *et al.*, 2015a, 2015b). Du fait de l'hétérogénéité des MV, cette composition lipidique peut cependant varier. Ainsi, certaines MV peuvent présenter des enrichissements en certains lipides comme la SM ou les céramides, révélant la possibilité d'un bourgeonnement des MV au niveau de domaines spécifiques de la membrane plasmique, comme les radeaux lipidiques (Pollet *et al.*, 2018).

Comme pour les EXO, la PS est transloquée sur le feuillet externe de la membrane des MV. Par conséquent, la présence de l'annexine V, protéine se liant à la PS dans longtemps considérée comme un marqueur spécifique des MV est maintenant reconnue comme un caractère commun aux deux catégories (Pollet *et al.*, 2018).

En conclusion, la composition en protéines, lipides et acides nucléiques des VE peut varier en fonction du type cellulaire mais également des conditions physiopathologiques ou de stress, auxquels la cellule est soumise. Par conséquent, l'étude de cette composition peut se révéler être un moyen de mettre en évidence de nouveaux biomarqueurs de situations physiopathologiques ou de stress.

C. Implications dans la communication intercellulaire et inter-organe

La communication intercellulaire est essentielle à l'interaction et la coordination entre les cellules au sein d'un tissu, d'un organe et plus largement, au sein d'un organisme. La communication intercellulaire peut survenir par interactions directes entre les cellules ou par la sécrétion de facteurs solubles. Récemment, les VE, relarguées dans le milieu extracellulaire, ont été mises en évidence comme médiateurs de cette communication intercellulaire par leur capacité à interagir en surface avec des cellules réceptrices ou à transférer leur contenu dans les cellules réceptrices, qu'elles soient voisines ou distantes. Les VE agissent alors comme des acteurs de signalisation capables de modifier le phénotype des cellules réceptrices (FIGURE 26).

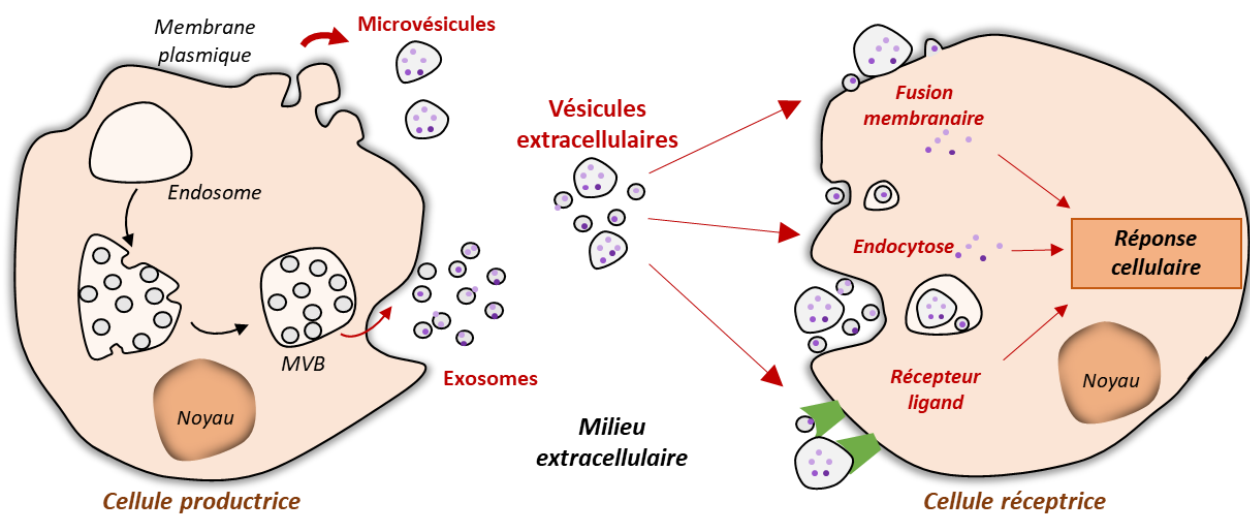


Figure 26 : Communication intercellulaire par les VE

1. Relations avec des cellules réceptrices

Le mode d'interaction des VE avec la surface des cellules réceptrices et les mécanismes, qui permettent le transfert de leurs cargos, ne sont pas bien connus, à l'heure actuelle. Ces phénomènes sont très certainement dépendants des types de cellules productrices et réceptrices (van Niel *et al.*, 2018).

La communication intercellulaire, par les VE, peut se faire par différents modes d'interaction : la fusion membranaire entre la membrane des VE et la membrane plasmique de la cellule réceptrice ; l'interaction récepteur-ligand à la surface de la cellule réceptrice et celle des VE ; ou une internalisation des VE par endocytose (Mulcahy *et al.*, 2014) (FIGURE 26).

a. Fusion membranaire

Les VE pourraient interagir avec les cellules réceptrices par fusion directe de leur membrane avec la membrane plasmique des cellules réceptrices (del Conde *et al.*, 2005; Parolini *et al.*, 2009). La fusion membranaire consiste à l'interaction des feuilletts externes de deux membranes grâce à

des protéines de types SNARE ou Rab, puis à la formation d'un pore d'hémi-fusion des deux feuillettes externes et enfin à l'apparition d'un diaphragme qui permet l'ouverture du pore de fusion et la formation d'une seule structure. La fusion membranaire de VE, marquées par une sonde lipidique fluorescente, est observée avec la membrane plasmique de cellules de mélanome (Parolini *et al.*, 2009) ou des macrophages, permettant ainsi la libération de miARN fonctionnels dans le cytosol (Montecalvo *et al.*, 2012). La fusion serait favorisée en conditions de pH acide, que l'on retrouve plutôt dans les endosomes qu'autour de la membrane plasmique. (Parolini *et al.*, 2009). Pour cette raison et parce qu'il y a très peu d'études montrant une fusion des VE, l'interaction des VE avec les cellules réceptrices par fusion est très probablement une voie très minoritaire par rapport aux autres voies (Mulcahy *et al.*, 2014). En cas de fusion, les VE se fixeraient à la membrane plasmique des cellules réceptrices par des mécanismes similaires à ceux des VE subissant une endocytose, développés dans le paragraphe *II.C.1.c.i Fixation des VE sur les cellules réceptrices ci-dessous*.

b. Interaction ligand-récepteur

Une autre voie d'interaction des VE avec des cellules réceptrices est l'interaction de type récepteur-ligand. L'interaction entre un ligand à la surface des VE et un récepteur d'une cellule peut permettre le déclenchement d'un signal et donc un éventuel effet dans la cellule réceptrice (Mulcahy *et al.*, 2014; Stoeck *et al.*, 2006). Ce type de relation avec la cellule réceptrice est décrit, par exemple, pour le ligand FasL dans la membrane des VE libérées par des cellules cancéreuses et le récepteur Fas à la surface de lymphocytes T, pour déclencher l'apoptose (*cf II.C.4.b.i.d Activation des récepteurs de mort en page 106*).

c. Internalisation

La principale voie d'interaction des VE avec les cellules réceptrices est l'internalisation par endocytose. Cette internalisation s'effectue en deux étapes : une étape de fixation à la membrane de la cellule réceptrice puis une endocytose.

i. Fixation des VE sur les cellules réceptrices

Il existerait plusieurs types de liaisons impliquant les tétraspanines, les intégrines, les immunoglobulines, les lipides, les lectines et les protéoglycanes présents à la fois à la surface des VE et à la surface de la cellule réceptrice (Mulcahy *et al.*, 2014; van Niel *et al.*, 2018) (**FIGURE 27**).

- Les **tétraspanines** (CD63, CD81, CD9), protéines transmembranaires présentes à la surface des VE, peuvent servir de plateforme d'adhésion et interagir avec les intégrines ou les immunoglobulines. Cela a été décrit pour les EXO issus de cellules tumorales avec les chaînes $\alpha 4$ et $\beta 4$ des intégrines ou avec l'immunoglobuline ICAM1 (*Intercellular adhesion molecule*) des cellules endothéliales (Rana *et al.*, 2012), permettant leur interaction avec les cellules réceptrices et leur internalisation (Nazarenko *et al.*, 2010).

- Les **intégrines** à la surface des VE peuvent interagir avec **les immunoglobulines** à la surface des cellules et inversement. Cela a été particulièrement décrit pour l'internalisation des EXO par les cellules dendritiques, qui est dépendante des protéines (MFG)–E8/lactadhérine, de l'intégrine CD11a, de l'immunoglobuline CD54/ICAM-1, de la phosphatidylsérine, et des tétraspanines CD9 et CD81 présentes à la surface des EXO et des intégrines CD51, CD61, CD11a et de l'immunoglobuline CD54 présentes à la surface des cellules réceptrices (Morelli *et al.*, 2004).

En ce qui concerne les cellules du foie, l'interaction des VE sur les hépatocytes est dépendante de l'intégrine $\alpha 4$ et dans une moindre mesure de CD44 et CD29 présente à la surface des VE (Herrera *et al.*, 2010). En plus, l'adhésion des VE aux cellules étoilées est permise par les interactions de la fibronectine présente à la surface des VE et les intégrines $\beta 1$ à la surface des cellules réceptrices (Chen *et al.*, 2017a; Wang *et al.*, 2015a) et est nécessaire pour induire la signalisation Akt et la migration des cellules étoilées (Wang *et al.*, 2015a). *In vivo*, les intégrines à la surface d'EXO issus de cellules tumorales sont essentielles pour se lier aux cellules du foie et des poumons avant internalisation (Hoshino *et al.*, 2015).

L'interaction des intégrines des VE avec la fibronectine ou la laminine de la matrice extracellulaire pourrait également faciliter leur interaction avec les cellules cibles (Purushothaman *et al.*, 2016).

- Les **lectines**, protéines capables de se lier à des fractions glucidiques et les **protéoglycanes**, protéines composées d'une fraction glucidique importante, présents à la fois à surface des VE et celle des cellules réceptrices participent également à la liaison VE – cellule. Cela a été décrit pour les VE isolées à partir de lait humain, possédant en surface la lectine Mucin-1, qui se lie au récepteur de la famille des lectines DC-SIGN (*Dendritic cell-specific intercellular adhesion molecule-3-grabbing non-integrin*) à la membrane de cellules dendritiques, facilitant alors leur internalisation (Näslund *et al.*, 2014). Par ailleurs, l'internalisation d'EXO dérivés de cellules cancéreuses dépend de sa fixation avec des protéoglycanes héparanes sulfates (HSPG), présents à la surface de cellules cancéreuses réceptrices (Christianson *et al.*, 2013).
- Le **phosphatidylsérine** du feuillet externe de la membrane des VE peut se lier à des récepteurs de membrane des cellules réceptrices, comme TIM4 (*T-cell membrane protein 4*) (French *et al.*, 2017), ou recruter des protéines spécifiques, comme la galectine 5 ou l'annexine V. Ces protéines interagissent ensuite avec des composés de la membrane plasmique de la cellule réceptrice (Morelli *et al.*, 2004; van Niel *et al.*, 2018).

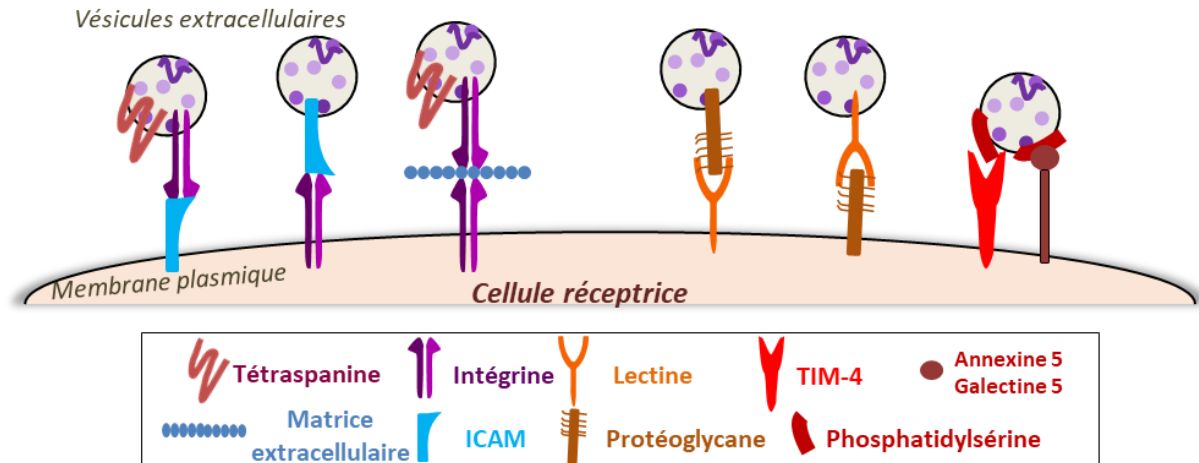


Figure 27 : Liaison des VE avec les cellules réceptrices

La compréhension du ciblage spécifique ou non, des VE, vers certains types cellulaires, sera essentielle dans la compréhension du rôle des VE dans la communication intercellulaire. A l'heure actuelle, les VE peuvent être internalisées par des cellules de tout type ou bien des cellules spécifiques sans que le mécanisme ne soit compris. Par exemple, une injection intraveineuse, à des souris, de VE issues d'hépatocytes sont préférentiellement internalisées par les cellules du foie ; aucune VE n'est détectée dans les cellules d'autres organes, comme les poumons (Chen *et al.*, 2017a). Dans le foie, ces VE sont particulièrement internalisées par les cellules étoilées et les hépatocytes, et non par les cellules de Kupffer et endothéliales, et feraient intervenir, entre autres, des liaisons intégrines et héparines dépendantes entre les VE et les cellules cibles (Chen *et al.*, 2017a; Herrera *et al.*, 2010; Wang *et al.*, 2015a).

ii. Différentes voies d'internalisation des VE

L'internalisation des VE s'effectue principalement par endocytose. Cette endocytose peut survenir selon différents mécanismes : macropinocytose, phagocytose et endocytose dépendante de la cavéoline, de la clathrine, ou encore des radeaux lipidiques (French *et al.*, 2017; Mulcahy *et al.*, 2014) (FIGURE 28). Le type de mécanisme dépendrait du type cellulaire de la cellule réceptrice, de l'origine et du type de VE et plus particulièrement de la combinaison de molécules présentes à la surface des VE et des cellules, ainsi que des conditions de l'environnement.

En ce qui concerne les cellules du foie, les VE sont majoritairement internalisées par endocytose *in vitro* et *in vivo*. En effet, le marquage de VE en fluorescence montrent leur présence dans des structures endosomales dans le cytoplasme des cellules réceptrices (Charrier *et al.*, 2014; Chen *et al.*, 2017a; Devhare *et al.*, 2017; Kogure *et al.*, 2011, 2011; Li *et al.*, 2018a, 2019b; Nojima *et al.*, 2016; Povero *et al.*, 2013; Sato *et al.*, 2017; Wang *et al.*, 2015a). A l'heure, aucune voie d'endocytose particulière n'est privilégiée pour l'internalisation des VE dans le foie. Ainsi, les VE

dérivées d'hépatocytes expriment en surface la protéine Vanin-1, une ecto-enzyme contenant une ancre glycosylphosphatidylinositol (GPI), souvent associée aux radeaux lipidiques dans la membrane plasmique (Povero *et al.*, 2013, 2015). Cette protéine, à la surface des VE, permet leur interaction avec les radeaux lipidiques des cellules endothéliales ou étoilées réceptrices et facilite leur endocytose, par la voie des radeaux lipidiques et des cavéoles (Povero *et al.*, 2013, 2015). En plus, l'endocytose, des EXO isolés de cellules endothéliales, par les cellules étoilées réceptrices est dépendante de l'activité de la dynamine-2, GTPase impliquée dans la séparation des vésicules d'endocytose de la membrane plasmique (Wang *et al.*, 2015a). Les VE produites par les hépatocytes peuvent être, aussi, internalisées, par endocytose dépendante de la dynamine ou par phagocytose, dans des cellules dendritiques réceptrices (Ogese *et al.*, 2019). Enfin, en conditions physiopathologiques particulières, la modification de la composition des VE peut être à l'origine d'une augmentation de leur endocytose. C'est le cas des VE isolées de la circulation des souris exposées à l'alcool. Ces VE sont davantage internalisées par les hépatocytes et les cellules de Küpffer que celles issues de souris saines (Saha *et al.*, 2018). De façon similaire, les VE, isolées d'hépatocytes traités par des acides gras lipotoxiques, sont davantage internalisées par des cellules endothéliales, du fait de l'augmentation de l'expression de la Vanin-1 à leur surface (Povero *et al.*, 2013).

2. Devenir des vésicules internalisées dans les cellules réceptrices

Une fois internalisées, les VE sont transportées, *via* la voie classique du trafic intracellulaire, jusqu'aux endosomes tardifs et finalement, dans la plupart des cas, vers les lysosomes des cellules réceptrices (Eitan *et al.*, 2016; Tian *et al.*, 2013; Zheng *et al.*, 2019) (FIGURE 28). Les lysosomes sont des compartiments acides de dégradations enzymatiques de différentes structures et macromolécules, où les membranes des VE pourraient donc être dégradées par les hydrolases ce qui entraînerait une libération de leur cargo.

A l'heure actuelle, les mécanismes de sortie des composants des VE vers le cytosol ne sont pas encore connus. Le lien entre la présence des VE dans les lysosomes et les effets des VE dans les cellules réceptrices ne sont pas encore compris. Par exemple, les VE libérées par des cellules de cancer colorectal et internalisées par des hépatocytes sont bien présentes dans les lysosomes et provoquent la migration des hépatocytes, par l'activation de la voies de signalisation ERK (Chiba *et al.*, 2016). En revanche le rôle de la présence des VE dans les lysosomes et le lien avec les effets observés ne sont pas étudiés.

En outre, certaines VE pourraient échapper à la dégradation par les lysosomes par un processus de fusion rétrograde des VE avec la membrane des endosomes (FIGURE 28). Cela correspond au phénomène inverse de la formation des ILV (Bissig and Gruenberg, 2014) et aboutit à la libération du contenu des VE dans le cytosol (van Niel *et al.*, 2018; Somiya, 2020). Ce phénomène est appelé

« endosomal escape ». Pour l'instant, il existe peu d'évidence montrant cette fusion rétrograde avec l'endosome (Joshi *et al.*, 2020), mais l'avancement dans les techniques d'imagerie en temps réel et l'amélioration de la résolution vont permettre, dans les années à venir, de comprendre les mécanismes précis de libération des cargos des VE dans la cellule réceptrice (van Niel *et al.*, 2018; Somiya, 2020).

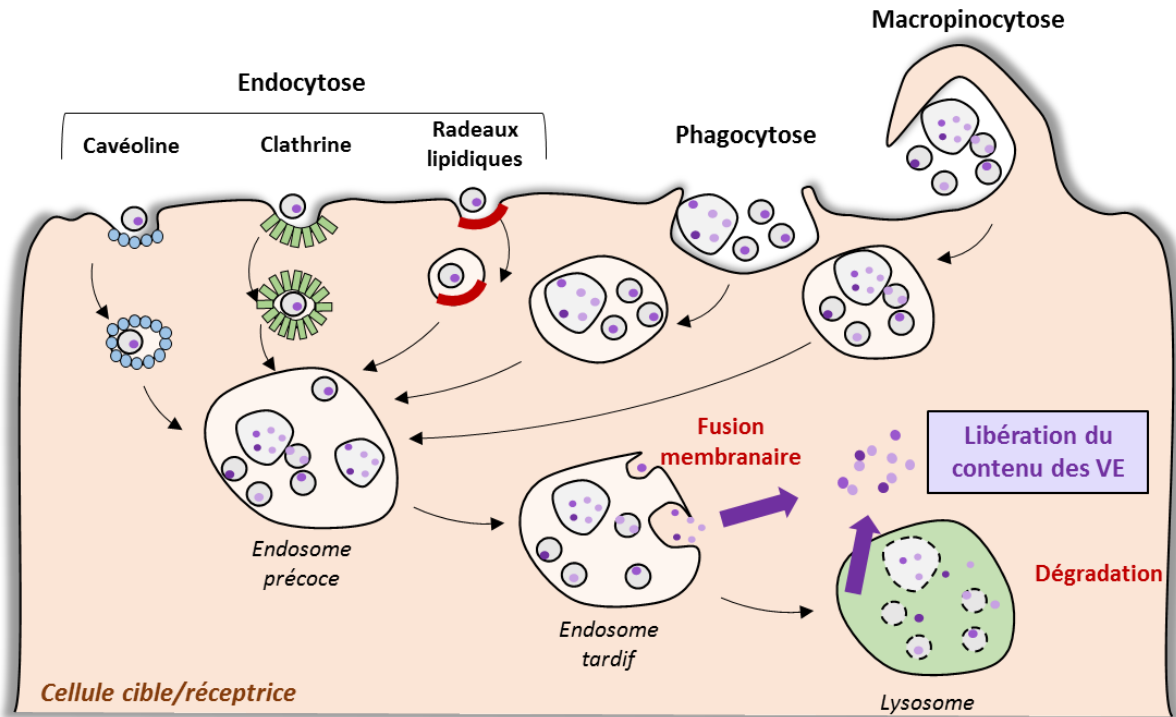


Figure 28 : Internalisation et devenir des VE adapté de van Niel *et al.*, 2018

3. Devenir des VE *in vivo*

Les niveaux de VE dans le sang dépendent de la sécrétion de VE et de leur clairance. La cinétique de clairance des VE de la circulation sanguine est variable et peut être influencée par l'exposition de molécules spécifiques à leur surface, comme la PS, qui accélérerait l'élimination des VE, par son interaction avec les macrophages ou les cellules endothéliales endothéliales (Imai *et al.*, 2015; Matsumoto *et al.*, 2017). De manière générale, la clairance des VE est un phénomène rapide. *In vivo*, l'administration de VE d'origine exogène au niveau systémique, par voie intraveineuse chez les rongeurs, montre des durées de vie de VE comprises entre quelques minutes et plusieurs heures dans le sang (Saunderson *et al.*, 2014; Takahashi *et al.*, 2017). Néanmoins, l'ensemble de ces études utilisent des VE, dont la production a été stimulée de manière artificielle, ou ayant subi à des altérations liées aux procédés d'isolement ou au mode de conservation. Ceux-ci peuvent être à l'origine d'une augmentation de l'externalisation de la PS à la surface des VE, qui ne serait pas forcément retrouvée dans les VE circulantes ;

par conséquent, les durées de clairance pourraient être sous-estimées (Ayers *et al.*, 2015). Les VE seraient éliminées par les voies hépatiques et par les voies rénales après plusieurs heures (environ six) (Lai *et al.*, 2014).

Chez les rongeurs, les VE, injectées par voie intraveineuse, sont principalement accumulées dans le foie, mais aussi dans les poumons, la rate et la moelle osseuse (Chen *et al.*, 2017a; Lai *et al.*, 2014; Takahashi *et al.*, 2013). Ainsi, le foie serait une cible privilégiée des VE. Les VE spécifiquement isolées à partir de cellules du foie, et injectées par voie intraveineuse chez la souris sont détectées 4 heures après l'injection exclusivement dans le foie et majoritairement dans les hépatocytes et les cellules étoilées (Chen *et al.*, 2017a).

En outre, la clairance et la bio-distribution des VE dépendraient très probablement du type cellulaire producteur de VE et de l'état physiopathologique de l'individu (Augustine Daniel *et al.*, 2014; Lai *et al.*, 2014; Yáñez-Mó *et al.*, 2015).

4. Conséquences sur les cellules réceptrices

a. Stress oxydant

En fonction des stimuli ou des contextes pathologiques, les VE libérées peuvent contenir des composés, capables d'induire un stress oxydant dans les cellules réceptrices. Ainsi, des VE dérivées de plaquettes (Gambim *et al.*, 2007; Janiszewski *et al.*, 2004) expriment la NADPH oxydase et la NOS2. Des niveaux plus élevés de NADPH ox, active ou non, et d'ERO ont également été retrouvés dans les VE issues de cellules endothéliales après hypoxie/réoxygénation (Jansen *et al.*, 2013; Zhang *et al.*, 2016b) ou de macrophages après activation (Hervera *et al.*, 2018) (FIGURE 29). Le traitement de cellules endothéliales ou de cardiomyocytes, par ces VE, provoquent une augmentation de la teneur en ERO dans ces cellules. Des miARN (miR-27a, miR-28-3p, miR34a) contenus dans les EXO libérés par des fibroblastes cardiaques après stimulation par le TNF α , sont à l'origine la diminution dans les cardiomyocytes de l'expression de Nrf2, facteur de transcription contrôlant positivement l'expression d'antioxydants (Tian *et al.*, 2018) (FIGURE 29).

Les VE isolées à partir de sang humain ou de sang de rongeurs ou bien les VE issues de différents types cellulaires peuvent provoquer une production d'ERO dans les cellules réceptrices mais très peu d'études indiquent le déclenchement de dommages oxydatifs. Enfin, certaines études associent des effets cellulaires à cette production d'ERO, mais la moitié seulement prouve un lien direct entre les ERO et les effets cellulaires en les éliminant grâce à un antioxydant (TABLEAU 26).

Tableau 26 : Participation des VE à la génération d'un stress oxydant dans les cellules réceptrices

Origine des VE	Type de VE	Cellules réceptrices	Mesure du stress oxydant	Effet cellulaire induit par le stress oxydant	AO	Référence
Souris IRI Hépatocytes H/R	MV		↗ ERO ↗ GSSG	Mort cellulaire	O	(Teoh <i>et al.</i> , 2014)
Souris exposées à l'alcool	EXO	Hépatocytes	↗ ERO ↗ protéines nitrées ↗ iNOS		x	(Cho <i>et al.</i> , 2017a)
Souris exposées au paracétamol	EXO		↗ ERO		x	(Cho <i>et al.</i> , 2018)
Patients atteints de sepsis	VE	Cellules endothéliales Cellules musculaires lisses vasculaires	↗ ERO		O	(Janiszewski <i>et al.</i> , 2004)
Patients atteints de sepsis Plaquettes	EXO	Cellules endothéliales de l'aorte	↗ ERO ↗ ERN		O	(Gambim <i>et al.</i> , 2007)
Cellules endothéliales H/R	MV	Cardiomyocytes	↘ activité SOD ↗ ERO Peroxydation lipidique		x	(Zhang <i>et al.</i> , 2016b)
Lymphocytes T	MV	Cellules épithéliales bronchiques et alvéolaires	↗ ERO Peroxydation lipidique ↘ GSH		O	(Qiu <i>et al.</i> , 2014)
Plaquettes stimulées par oxLDL	MV	Plaquettes	Peroxydation lipidique	Activation thromboplastique	x	(Wang <i>et al.</i> , 2012b)
Patients avec un lupus érythémateux systémique	MV	Leucocytes	↗ ERO	Dégranulation	x	(Winberg <i>et al.</i> , 2017)
Eosinophiles de patients asthmatiques	EXO	Eosinophiles	↗ ERO ↗ NO	-	-	(Cañas <i>et al.</i> , 2017)
Neutrophiles infectés avec la tuberculose	VE	Macrophages	↗ ERO ↗ NO	Autophagie	x	(Alvarez-Jiménez <i>et al.</i> , 2018)
Cellules issues d'un mélanome	EXO	Lymphocytes T	↗ ERO	-	x	(Söderberg <i>et al.</i> , 2007)
Cellules endothéliales traitées par le glucose	MV		↗ ERO	Activation	O	(Jansen <i>et al.</i> , 2013)
Cellules endothéliales en sénescence	MV		↗ ERO	Sénescence	O	(Burger <i>et al.</i> , 2012, 2016)
Cellules endothéliales en sénescence Patients avec syndrome coronarien aigu	MV	Cellules endothéliales	↗ ERO ↗ NADPH ox et COX-2	Sénescence	O	(Abbas <i>et al.</i> , 2017)
Cellules du cancer du sein	EXO		↗ ERO	Autophagie	O	(Dutta <i>et al.</i> , 2014)
Patients avec un syndrome métabolique	MV	Aorte de souris	↗ ERO ↗ NADPH ox	Hypo-réactivité vasculaire	x	(Agouni <i>et al.</i> , 2011)
Fibroblastes et myocytes cardiaques exposés au TNFα	EXO	Fibroblastes et myocytes cardiaques exposés au TNFα	↘ Nrf2, NQO1 et catalase	Hypertrophie	x	(Tian <i>et al.</i> , 2018)
Kératinocytes irradiés	EXO	Fibroblastes	↗ ERO	Diminution de la migration	O	(Tan <i>et al.</i> , 2019)
Macrophages	EXO	Ganglions rachidiens de souris endommagés	-	Régénération axonale	O	(Hervera <i>et al.</i> , 2018)
Cellules de l'épithélium pigmentaire rétinien exposées à la lumière bleue	EXO	Cellules de l'épithélium pigmentaire rétinien	↗ ERO Peroxydation lipidique Oxydation de l'ADN	Activation de l'inflammasome	x	(Zhang <i>et al.</i> , 2019)

GSH : glutathion forme réduite, GSSG : glutathion forme oxydée, SOD : superoxyde dismutase, COX2 : cyclooxygénase 2, NQO1 : NAD(P)H:quinone acceptor oxydoréductase 1,

AO : antioxydant, O correspond à l'utilisation d'un AO dans l'étude pour inhiber les effets cellulaires observés suite à la génération d'un stress oxydant par le VE et X correspond à la non-utilisation d'un AO.

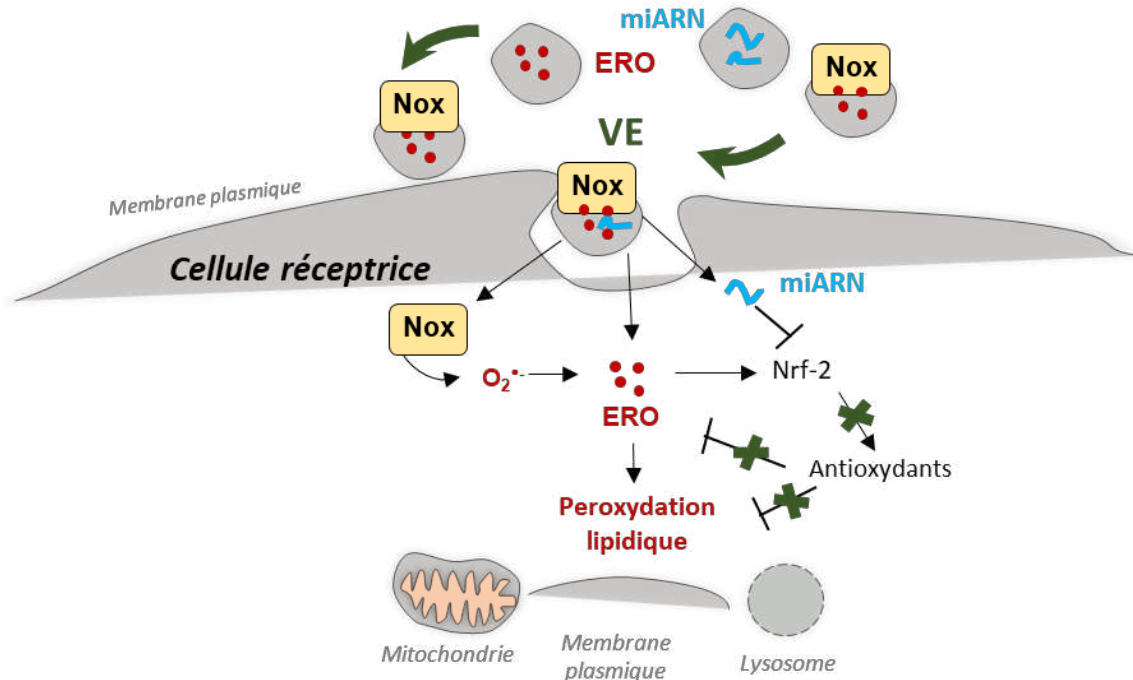


Figure 29 : Génération d'un stress oxydant par les VE

Nox : NADPH oxydase

b. Mort cellulaire

Les VE sont surtout impliquées dans la mort cellulaire de type apoptotique.

i. Cible cellulaire des VE

α) Les cellules immunes

Les premières études à s'intéresser à la mort cellulaire des cellules réceptrices concernent les lymphocytes T. Ainsi, les VE isolées, *in vitro*, de lignées cellulaires de cancer colorectal (Huber *et al.*, 2005), du mélanome (Martínez-Lorenzo *et al.*, 2004; Wieckowski *et al.*, 2009; Zhou *et al.*, 2018a), de cancer de la prostate (Abusamra *et al.*, 2005), du lymphome (Attoub *et al.*, 2015), de cancers gastriques (Qu *et al.*, 2009), de cancer du rein (Yang *et al.*, 2013) ou de culture primaire de cellules du cancer des ovaires (Abrahams *et al.*, 2003), peuvent entraîner l'apoptose des lymphocytes T, issues de lignées cellulaires ou isolées à partir du sang de rongeurs ou d'humains. En plus, les VE isolées, *in vivo*, du sérum de patients avec un cancer oral (Kim *et al.*, 2005a), un mélanome (Wieckowski *et al.*, 2009), un cancer du nasopharynx (Klibi *et al.*, 2009) ou d'ascites de cancer des ovaires (Taylor and Gerçel-Taylor, 2005) provoquent, similairement, l'apoptose des lymphocytes T. Ces VE participeraient à l'échappement immunitaire, observé lors de la progression d'un cancer. Enfin, des VE isolées du sérum de femmes enceintes (Gerçel-Taylor *et al.*, 2002) ou de placentas humains (Stenqvist *et al.*, 2013) permettent, de la même manière, d'induire la mort cellulaire des lymphocytes T ; ces VE seraient impliquées dans le phénomène de tolérance immunitaire du fœtus durant la grossesse.

Par ailleurs, les lymphocytes T sont, également, capables de libérer des VE provoquant l'apoptose de cellules immunes. Des VE issues de lymphocytes T, en apoptose ou non, peuvent interagir avec des macrophages (Distler *et al.*, 2005), ou d'autres lymphocytes (Lenassi *et al.*, 2010) (Monleon *et al.*, 2001) (Alonso *et al.*, 2005) participant ainsi à leur apoptose. De plus, les VE issues du plasma de sujets sains (Ren *et al.*, 2011) ou issues de plasma de patients septiques (Exline *et al.*, 2014) engendrent l'apoptose de lymphocytes T. Ces VE participeraient à la régulation de l'homéostasie des lymphocytes T et la régulation négative des réponses immunes.

β) Les cellules cancéreuses

Des cellules normales non transformées, cellules circulantes (Schneider *et al.*, 2012), cellules dendritiques (Munich *et al.*, 2012), cellules souches mésenchymateuses (Ding *et al.*, 2019), sont capables de générer des VE, induisant la mort de cellules cancéreuses, montrant ainsi que ces VE pourraient protéger contre le développement d'un cancer. En outre, *in vivo*, chez la souris, l'injection intratumorale des VE issues de cellules souches mésenchymateuses engendrent l'apoptose des cellules tumorales et participent à la réduction de la taille des tumeurs au niveau pancréatique (Ding *et al.*, 2019).

Par ailleurs, des VE issues de cellules cancéreuses pancréatiques entraînent la mort, par apoptose, de ces mêmes cellules différenciées, mais pas celle de cellules tumorales peu différenciées (Ristorcelli *et al.*, 2008). Ces VE participeraient au développement du cancer du pancréas en favorisant la croissance d'une population de cellules progénitrices.

γ) Les cellules du cerveau

Les VE pourraient intervenir dans la communication entre les différents types cellulaires du cerveau dans un contexte physiopathologique. Plusieurs situations ont ainsi été décrites.

▪ *Maladie d'Alzheimer*

Le peptide amyloïde bêta (A β), à l'origine de la formation de plaques amyloïdes extracellulaires présentes dans la maladie d'Alzheimer, entraîne la sécrétion d'EXO, par des astrocytes en culture primaire, qui sont internalisés par d'autres astrocytes, provoquant alors leur apoptose (Wang *et al.*, 2012a). Des co-cultures de neurones et de cellules gliales exposées aux protofibrilles A β , libèrent des VE qui sont neurotoxiques (Söllvander *et al.*, 2016).

▪ *Hypoperfusion du cerveau*

Les VE isolées du plasma de rat, présentant une hypoperfusion cérébrale chronique, délivrent des signaux pro-apoptotiques vers les cellules endothéliales du cerveau de rat en culture primaire (Schock *et al.*, 2014).

▪ **Tumeurs du cerveau**

Des VE dérivées de cellules d'oligodendrogliome provoquent la mort des astrocytes ou neurones en culture primaire (Di Liegro, 2011) (D'Agostino *et al.*, 2006) ou d'oligodendrocytes *in vitro* (Podbielska *et al.*, 2016), participant ainsi au processus d'invasion de ces tumeurs dans le tissu nerveux.

δ) Cellules du foie, du cœur, des poumons et du pancréas

Les VE pourraient participer à la mort par apoptose de nombreux autres types cellulaires, comme les cellules du foie, les cellules cardiaques, les cellules pulmonaires et les cellules pancréatiques, dans des contextes particuliers. Ainsi, des EXO isolés du plasma de souris, exposées à l'éthanol (Cho *et al.*, 2017a) ou au paracétamol (Cho *et al.*, 2018), provoquent la mort d'hépatocytes *in vitro* et *in vivo* dans le foie de souris. Les VE isolées à partir, du sang de patients septiques (Gambim *et al.*, 2007; Janiszewski *et al.*, 2004), de monocytes (Sarkar *et al.*, 2009), ou de cellules endothéliales après hypoxie – réoxygénation (Zhang *et al.*, 2016b), sont à l'origine de l'apoptose des cellules endothéliales aortiques, de cardiomyocytes ou de cellules musculaires lisses de l'aorte. Par ailleurs, des lymphocytes T stimulés libèrent des VE déclenchant la mort cellulaire de cellules endothéliales (Mitra *et al.*, 2015) et épithéliales des poumons (Qiu *et al.*, 2014). Enfin, les cellules β pancréatiques rentrent en apoptose suite à une exposition à des VE issues de cellules pancréatiques (Guay *et al.*, 2015) ou de lymphocytes T stimulés (Guay *et al.*, 2018).

ii. Mécanismes impliqués dans la mort cellulaire induite par les VE

Les VE peuvent induire l'apoptose des cellules aussi bien par la voie extrinsèque, avec l'activation de récepteurs de mort que par la voie intrinsèque impliquant la mitochondrie. Plusieurs mécanismes ont été démontrés *in vitro* comme étant impliqués dans l'apoptose induite par les VE : la génération d'un stress oxydant, l'activation des récepteurs de mort, l'activation de la caspase-1, le transfert de molécules intervenant dans la signalisation intracellulaire de l'apoptose et la régulation par certains lipides spécifiques.

α) Génération d'un stress oxydant

Certaines VE pourraient induire la mort des cellules, par apoptose, par la génération d'un stress oxydant (*cf II.C.4.a Stress oxydant en page 101*). Certains travaux suggèrent un lien entre la génération du stress oxydant dans les cellules réceptrices par les VE et la mort cellulaire induite par les VE (Cho *et al.*, 2017a, 2018; Zhang *et al.*, 2016b), bien qu'ils ne l'aient pas mis directement en évidence, grâce à l'utilisation d'antioxydants (**TABLEAU 26 en page 102**). L'utilisation de la NAC (Qiu *et al.*, 2014; Teoh *et al.*, 2014), de la SOD, d'inhibiteurs de la NADPH oxydase ou de la NOS (Gambim *et al.*, 2007; Janiszewski *et al.*, 2004), permet de démontrer que le stress oxydant est impliqué dans l'apoptose induite par les VE.

Les VE pourraient être à l'origine du transfert d'ERO, d'ERN, ou de molécules pro-oxydantes comme la NADPH oxydase et la NOS (Gambim *et al.*, 2007; Janiszewski *et al.*, 2004) participant à la génération d'ERO et de dommages oxydatifs dans les cellules réceptrices (Cho *et al.*, 2018; Qiu *et al.*, 2014; Zhang *et al.*, 2016b). Cela pourrait, soit conduire directement à l'initiation de l'apoptose, soit participer à l'activation de la voie de signalisation p38MAPK (Cho *et al.*, 2017a, 2018; Zhang *et al.*, 2016b), qui permettrait l'expression de protéines pro-apoptotiques de la famille Bcl-2 comme Bak (FIGURE 30).

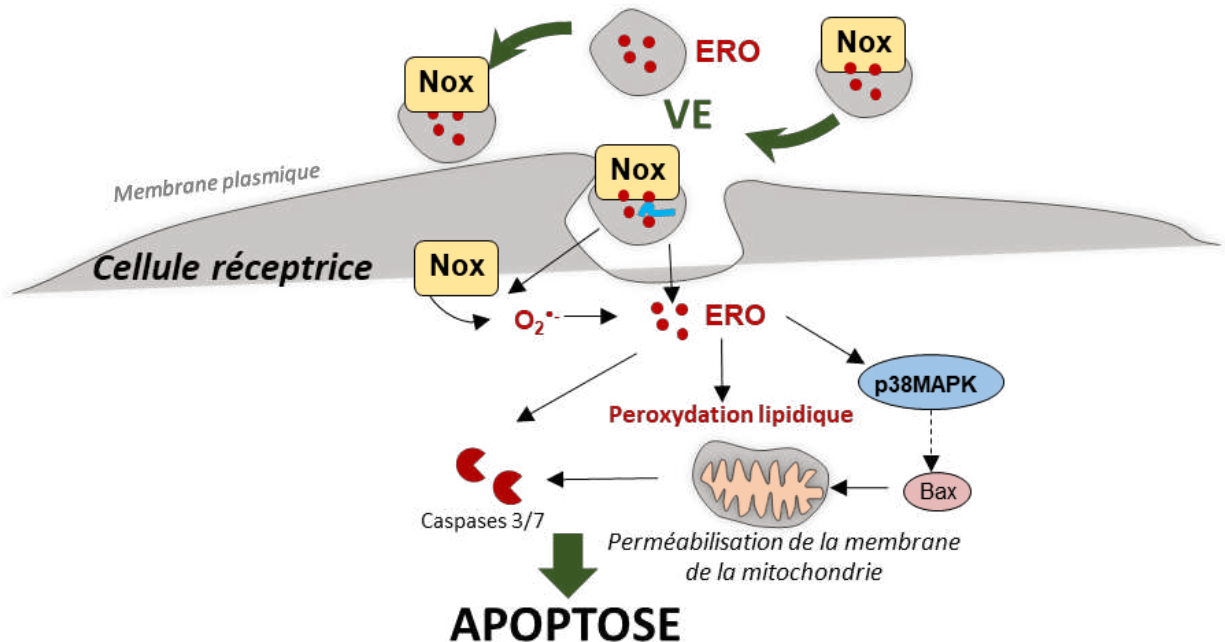


Figure 30 : Implication du stress oxydant dans l'apoptose induite par les VE

Nox : NADPH oxydase

β) Activation des récepteurs de mort

Les VE seraient capables d'activer les récepteurs de mort, comme Fas et TRAIL-R (*TRAIL receptor*), déclenchant la voie extrinsèque de l'apoptose (cf I.C.2.b Mécanismes d'induction de l'apoptose par les HAP en page 56) (FIGURE 31). En effet, des VE peuvent présenter à leur surface membranaire, les ligands **FasL**, **TRAIL** ou **TNF α** (Di Liegro, 2011; Gercel-Taylor *et al.*, 2002; Jodo *et al.*, 2001; Klinker *et al.*, 2014; Ludwig *et al.*, 2018; Stenqvist *et al.*, 2013; Taylor and Gerçel-Taylor, 2005) activant les récepteurs de mort, TNFR, TRAIL-R ou Fas, présents à la surface des cellules réceptrices (TABLEAU 27). Par ailleurs, l'activation des récepteurs de mort par les VE, peut également conduire à l'activation secondaire de la voie intrinsèque de l'apoptose, en déclenchant le clivage de Bid en tBid par la caspase 8, ce qui provoque la perméabilisation de la membrane externe de la mitochondrie (Kim *et al.*, 2005a; Martínez-Lorenzo *et al.*, 2004) (FIGURE 31).

Tableau 27 : Apoptose induite dans les cellules réceptrices suite à l'activation de leurs récepteurs de mort par les VE

Type de VE	Cellules productrices	Cargo VE	Cellules réceptrices	Référence
EXO	Cellules de mélanome	FasL	Lymphocytes T	(Andreola <i>et al.</i> , 2002)
	Cellules du cancer de la prostate	FasL	Lymphocytes T	(Abusamra <i>et al.</i> , 2005)
	Lymphocytes T	FasL	Lymphocytes T	(Alonso <i>et al.</i> , 2005)
	Plasma sujets sains	FasL	Lymphocytes T	(Ren <i>et al.</i> , 2011)
	Cellules dendritiques	TNF, FasL et TRAIL	Cellules tumorales	(Munich <i>et al.</i> , 2012)
	Cellules d'adénocarcinome du rein	FasL	Lymphocytes T	(Yang <i>et al.</i> , 2013)
	Cellules issues d'un lymphome infectées avec virus Epstein-Barr	FasL	Lymphocytes T	(Attoub <i>et al.</i> , 2015)
	Cellules transfectées avec TRAIL	TRAIL	Cellules tumorales	(Rivoltini <i>et al.</i> , 2016)
MV	Plasma de rat avec hypoperfusion cérébrale chronique	-	Cellules endothéliales du cerveau	(Schock <i>et al.</i> , 2014)
VE	Ascites de patients avec un cancer des ovaires	FasL	Lymphocytes T	(Abrahams <i>et al.</i> , 2003)
	Cellules de mélanome	FasL et TRAIL	Lymphocytes T	(Martínez-Lorenzo <i>et al.</i> , 2004)
	Cellules du cancer colorectal	FasL et TRAIL	Lymphocytes T	(Huber <i>et al.</i> , 2005)
	Sérum patients cancer oral Cellules du cancer oral	FasL	Lymphocytes T	(Kim <i>et al.</i> , 2005a)
	Cellules d'oligodendrogliome	FasL	Neurones	(D'Agostino <i>et al.</i> , 2006)
	Sérum de patients mélanome Cellules de mélanome	FasL	Lymphocytes T	(Wieckowski <i>et al.</i> , 2009)

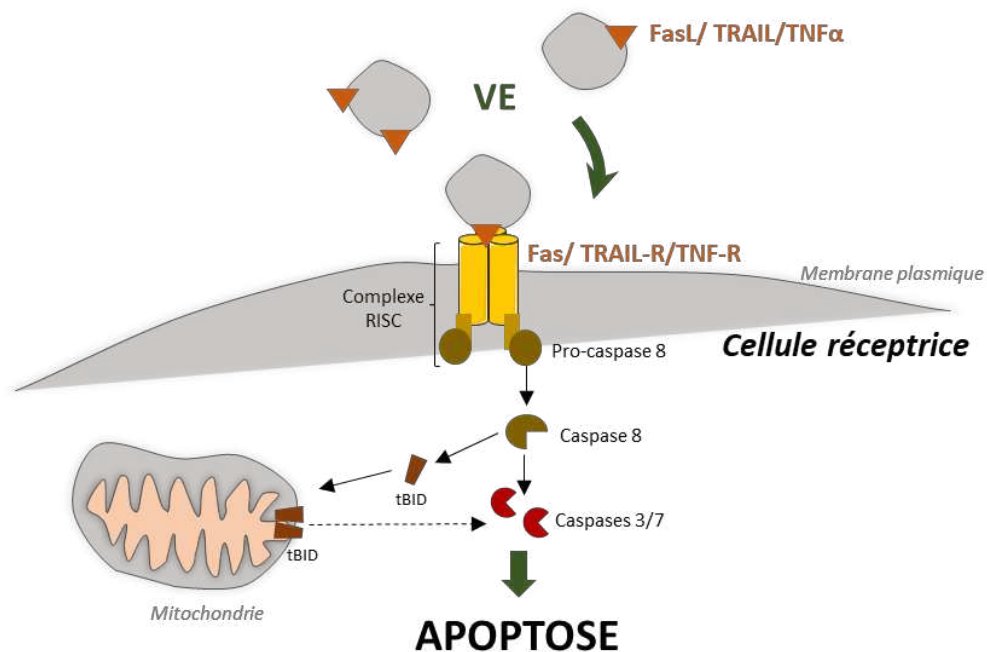


Figure 31 : Activation des récepteurs de mort dans l'apoptose induite par les VE

χ) Activation de la caspase-1

La protéine caspase 1 active est présente dans des VE isolées de plasma de patients septiques (Exline *et al.*, 2014) ou de monocytes stimulés par le LPS (Lipopolysaccharide) (Mitra *et al.*, 2015; Sarkar *et al.*, 2009). La caspase-1 est bien connue pour faire partie de l'inflammasome et son activation conduit généralement à une mort cellulaire par pyroptose. Son rôle dans l'apoptose reste encore controversé, mais la caspase 1 pourrait permettre une activation, soit directe de la caspase 3, soit indirecte par l'initiation de la voie intrinsèque, en permettant le clivage de Bid en tBid. En outre, le transfert de la caspase-1 active pourrait participer à l'apoptose induite par les VE. En effet, l'apoptose des cellules musculaires lisses vasculaires, des cellules endothéliales pulmonaires et des lymphocytes T, induite par les VE, est considérablement réduite par le pré-traitement des VE avec l'inhibiteur spécifique de la caspase-1, Y-VAD-cmk (Exline *et al.*, 2014; Mitra *et al.*, 2015; Sarkar *et al.*, 2009).

δ) Transfert de molécules modulant la signalisation apoptotique

Les VE peuvent être enrichies en molécules de signalisation pro-apoptotique comme les caspases tels que la caspase 1 (cf II.C.4.b.ii.c) *Activation de la caspase-1 ci-dessus*) ou la caspase 3. La caspase 3 a été mise en évidence dans les VE issues de cellules épithéliales soumises à une hypoxie (Moon *et al.*, 2015), dans les MV du plasma de patients atteints de lupus (Abid Hussein *et al.*, 2005), dans les MV issues du plasma de rat présentant une hypoperfusion cérébrale (Schock *et al.*, 2014) ou dans les MV isolées du sang de sujets sains (Schneider *et al.*, 2012), et elle est présentée comme étant active dans certains cas. Le transfert caspase 3 active par les VE, déclenche l'apoptose des cellules cancéreuses (Schneider *et al.*, 2012) ou de cellules endothéliales du cerveau réceptrices (Schock *et al.*, 2014) (FIGURE 32).

En outre, les VE peuvent être enrichis en acides nucléiques, comme les mi-ARN ou des longs ARN non codants (lncARN), qui peuvent être transférés vers les cellules réceptrices et déclencher la signalisation liée à l'apoptose.

Deux études ont montré l'implication d'un transfert de **lncARN** de VE dans l'apoptose de cellules réceptrices. Ainsi, des EXO isolés de cellules normales (Zheng *et al.*, 2018), chargés en lncARN PTENP1 (*PTEN Pseudogene 1*), sont à l'origine de l'apoptose des cellules cancéreuses *in vitro* mais aussi *in vivo* dans les tumeurs de souris. Dans les cellules réceptrices, le lncARN PTENP1 permettrait la régulation positive de PTEN, inhibiteur de l'activation de la voie de survie Akt. L'effet du lncARN PTENP1 est obtenu par liaison compétitive avec le miR-17, un répresseur bien connu de PTEN (FIGURE 32). Par ailleurs, le lncARN GAS5, dans les EXO de monocytes, est responsable de la mort par apoptose de cellules épithéliales et de macrophages (Chen *et al.*, 2017b). Le lncARN GAS5, fait partie d'une classe de gènes diminuant la survie et en relation avec l'expression de p53 et les dommages à l'ADN.

Les **miARN** ont été plus largement étudiés pour leur présence dans les VE et leur participation à l'apoptose induite par ces VE. Guay *et al.* ont été les premiers à identifier les miARN, dans les VE, comme signaux pro-apoptotiques. Ainsi, l'inhibition de la protéine Ago2 du complexe RISC (*RNA-induced silencing complex*), essentielle pour l'action des miARN dans les cellules réceptrices, empêche l'effet pro-apoptotique des VE issues de cellules pancréatiques stimulées par des cytokines (Guay *et al.*, 2015). De la même manière, des MV secrétées par des cellules tumorales induisant l'apoptose de lymphocytes T, sont enrichies en un nombre important de miARN, qui sont impliqués dans le réseau de régulation directe ou indirecte de la caspase 3 (Zhao *et al.*, 2017). Les miR-142-3p, miR-142-5p, et miR-155 contenus dans les EXO dérivés de lymphocytes T stimulés sont transférés dans les cellules β pancréatiques et provoquent leur apoptose possiblement par l'activation de la voie de signalisation NF κ B (Guay *et al.*, 2018). Enfin, d'autres miARN, contenus dans les EXO issus de cellules de mélanome, provoquent l'apoptose des lymphocytes T, en diminuant l'expression des protéines apoptotiques de la famille Bcl-2 (Zhou *et al.*, 2018a) (FIGURE 32).

Finalement, le chargement des VE, avec des miARN, particulier pourraient être exploité comme une stratégie thérapeutique pour induire l'apoptose et empêcher la progression des cellules tumorales. Ainsi, les EXO dérivés de cellules souches mésenchymateuses, chargés en miR-145-5p, un suppresseur de tumeur bien connu, limitent la prolifération des cellules tumorales, leur invasion et participent à leur apoptose aussi bien *in vitro* qu'*in vivo* dans les tumeurs de souris (Ding *et al.*, 2019).

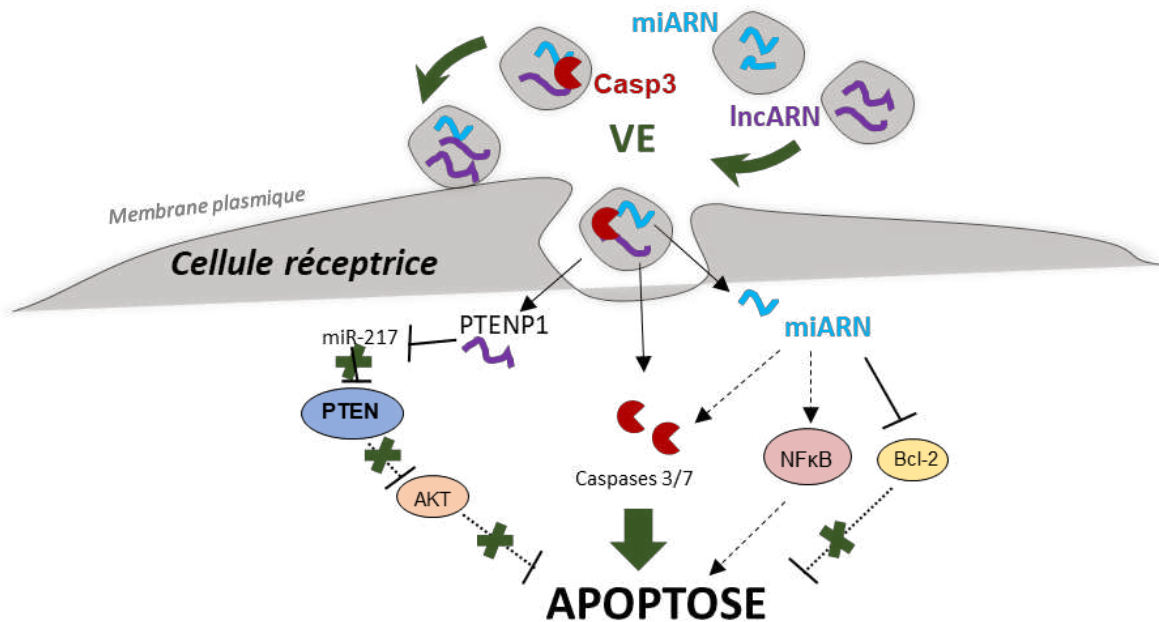


Figure 32 : Transfert de molécules pro-apoptotiques et apoptose induite par les VE

ε) Régulation par les lipides

Certains lipides, contenus dans les VE, pourraient déclencher l'apoptose des cellules réceptrices.

▪ **Céramides**

Le traitement d'astrocytes par le peptide amyloïde provoque la libération d'EXO, enrichis en céramides C18:0 (Wang *et al.*, 2012a). Ces EXO peuvent entraîner une apoptose d'autres astrocytes, par l'intermédiaires de ces céramides (Wang *et al.*, 2012a). De façon similaire, les cellules d'oligodendrogliome stimulées par le TNF α sécrètent des EXO enrichis en céramides **C16:0, C24:0 et C24:1** (Podbielska *et al.*, 2016) impliqués dans la mort d'oligodendrocytes (**FIGURE 33**).

▪ **Acide arachidonique**

L'apoptose de cellules endothéliales entraîne la sécrétion de MV enrichies en acide arachidonique (Distler *et al.*, 2011). Ces MV stimulent l'activité de la SMase dans les cellules issues de la circulation, par l'intermédiaire de l'acide arachidonique et donc la production de **céramides** permettant ultérieurement l'activation des caspases apoptotiques (**FIGURE 33**).

▪ **Lipides des radeaux lipidiques**

Les EXO sécrétés par des cellules pancréatiques, peuvent être enrichis en lipides connus pour se localiser de façon préférentielle dans les radeaux lipidiques, tels que le cholestérol, la sphingomyéline et la phosphatidylcholine (Ristorcelli *et al.*, 2008). Ces EXO interagiraient directement avec les radeaux lipidiques des cellules réceptrices (Ristorcelli *et al.*, 2008), par fusion membranaire (Beloribi *et al.*, 2012), désorganisant le complexe Notch présent dans les radeaux lipidiques, et par conséquent inhibant sa voie de signalisation en aval, normalement impliquée dans la prolifération et la survie cellulaire (Ristorcelli *et al.*, 2009). Cette inhibition conduit donc à l'apoptose des cellules réceptrices.

La désorganisation du complexe membranaire Notch-1/ADAM17/ γ -sécrétase, empêche l'activation de voies de survie, soit par l'intermédiaire de la diminution de l'expression du facteur de transcription Hes-1, soit par la levée de l'inhibition du complexe PTEN/GSK-3 β . L'activation de PTEN et GSK-3 β permettent ainsi l'inhibition des voies de survie comme Akt, et l'inhibition de l'activité de la pyruvate déshydrogénase (PDH), qui peut entraîner l'apparition de dommages mitochondriaux (Ristorcelli *et al.*, 2008, 2009) (**FIGURE 33**). Cette interaction provoque aussi la séquestration de la β -caténine dans les complexes PTEN/GSK-3 β , qui est alors incapable de transloquer dans le noyau et d'activer l'expression de gènes cibles, comme la cycline D1 pour promouvoir la survie (Ristorcelli *et al.*, 2008) (**FIGURE 33**).

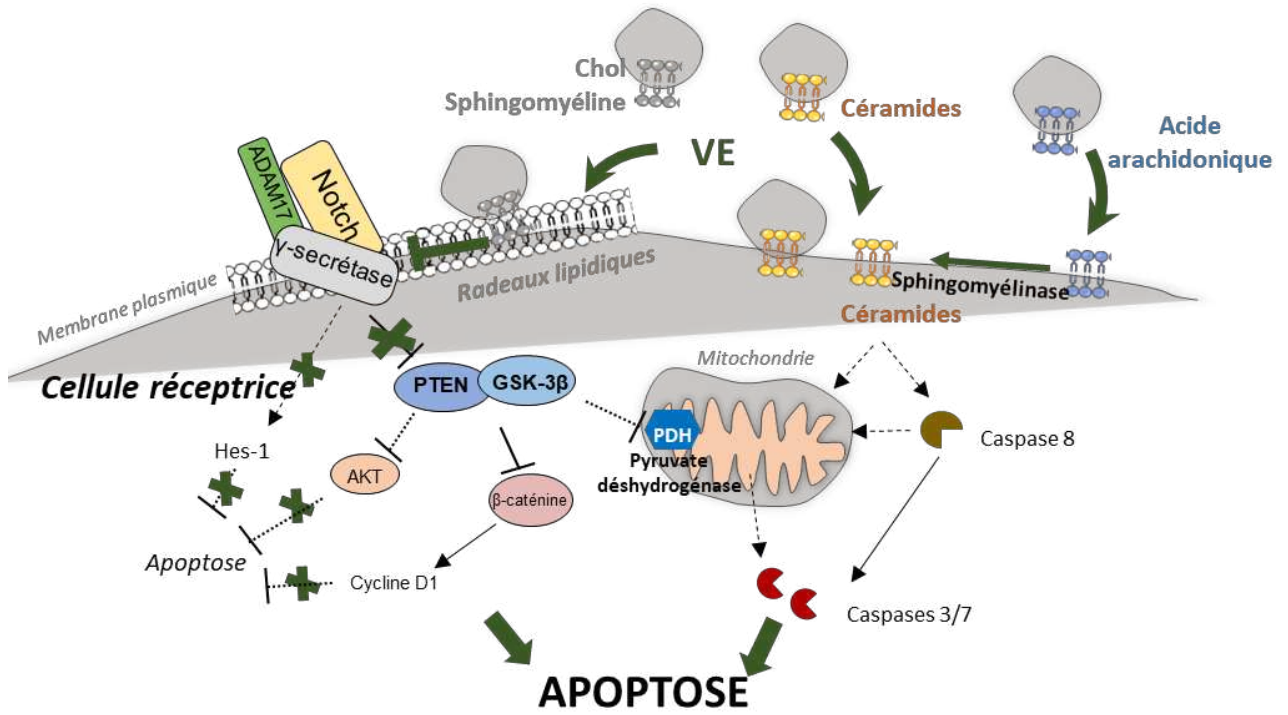


Figure 33 : Les lipides dans l'apoptose induite par les VE

III. Vésicules extracellulaires et toxicité hépatique liée aux contaminants de l'environnement

Le foie est un organe qui possède de nombreuses fonctions critiques pour maintenir une homéostasie physiologique. C'est un organe important de **stockage de nutriments**, vitamines et minéraux comme le glycogène, la vitamine A et B, ainsi que le fer et le cuivre. Il joue un rôle actif dans le processus de **digestion** *via* l'excrétion de la bile, composée d'eau, d'acides biliaires, de bilirubine et de cholestérol. Le foie est largement impliqué dans le **métabolisme** ; il participe à la synthèse et la dégradation des macromolécules comme les lipides, les protéines et les glucides mais aussi les acides aminés ; il est donc central dans le métabolisme énergétique et la production d'ATP. Il est également capable d'éliminer les déchets azotés issus du catabolisme des acides aminés, par la transformation et l'excrétion de l'urée. De plus, le foie intervient dans la **synthèse de protéines plasmatiques** comme l'albumine et les facteurs de coagulation, et dans le **processus immunitaire**, grâce aux macrophages résidents. Enfin, c'est le principal organe impliqué dans la **détoxification de composés xénobiotiques**. A ce titre, le foie est donc exposé à la toxicité de nombreux xénobiotiques, dont les contaminants de l'environnement (*cf I.C.11 Implication des HAP dans les maladies du foie en page 51*).

Dans le chapitre II précédent, les VE ont été décrites comme des acteurs majeurs de la communication cellulaire. Le foie étant un organe composé de nombreux types cellulaires, nous verrons dans ce chapitre comment les VE participent à la communication dans le foie et donc au développement de certaines maladies du foie. Dans ce chapitre, nous chercherons aussi à savoir si les VE participent à la toxicité hépatique des contaminants de l'environnement.

A. Le foie, source de vésicules extracellulaires

1. Architecture et composition cellulaire du foie

Le foie est un organe divisé en quatre lobes qui sont eux-mêmes, divisés en environ 100 000 **lobules**, de forme hexagonale, considérés comme les **unités fonctionnelles du foie**. Chaque lobule est composé de six veines portes et six artères hépatiques, connectées entre elles par les sinusoides qui s'étendent des veines portes à la veine centrale (**FIGURE 34**). Les sinusoides sont délimités par les cellules endothéliales sinusoidales et contiennent des cellules de Küpffer. En bordure des cellules endothéliales, se trouvent les hépatocytes. Le reste du lobule est composé de cholangiocytes et de cellules étoilées (**FIGURE 34**). Le foie est un organe avec une vascularisation particulière. En effet, il reçoit du sang oxygéné par l'artère hépatique mais il reçoit aussi le sang circulant de la rate, de l'estomac, du pancréas et des intestins par la veine porte hépatique. Ce sang est ensuite redistribué à l'ensemble du tissu hépatique puis éliminé par la veine centrale qui rejoint la circulation systémique *via* la veine cave.

Les hépatocytes sont les cellules majoritaires représentant environ 60 % du nombre et 80 % du poids total du foie. Ce sont des cellules organisées en travées et polarisées avec un pôle vasculaire en contact avec l'espace de Disse et un pôle biliaire situé entre deux hépatocytes formant ainsi un canalicule biliaire. **Les cholangiocytes** sont des cellules épithéliales qui délimitent les canaux biliaires, ils représentent environ 5 % des cellules du foie. Leur principale fonction est de sécréter la bile. **Les cellules étoilées** appelées également cellules stellaires se localisent au niveau de l'espace de Disse. Elles ont pour principale fonction le stockage de la vitamine A mais sont aussi, sous certaines conditions, activées et se différencient alors en myofibroblastes et acquièrent la capacité de migrer et de sécréter de la matrice extracellulaire. **Les cellules endothéliales sinusoidales** sont les cellules tapissant les vaisseaux du foie. Ce sont des cellules dites « fenestrées » possédant des pores intra-cytoplasmiques qui forment une couche discontinue au niveau des sinusoides. **Les cellules de Küpffer** sont les macrophages résidents du foie.

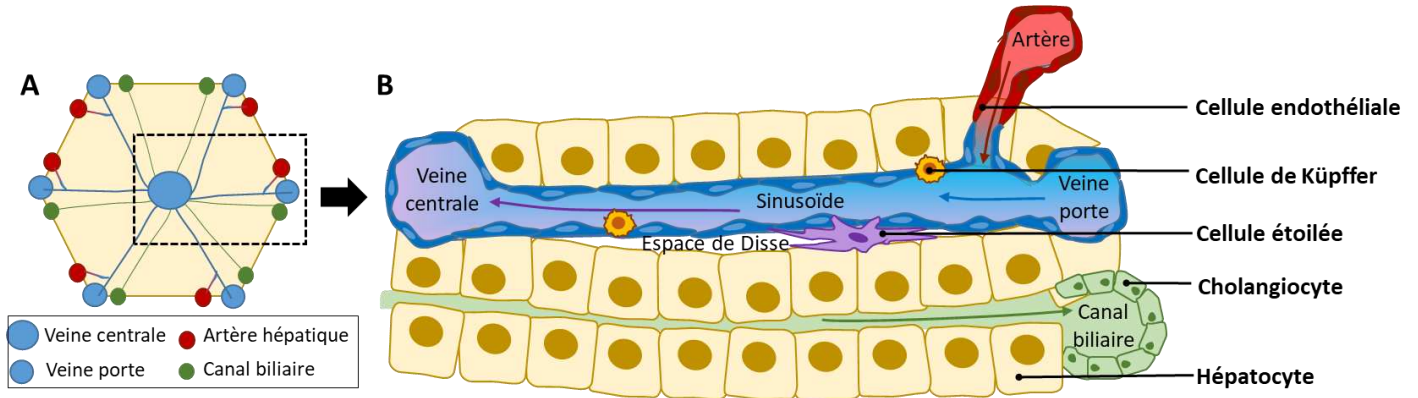


Figure 34 : Organisation cellulaire du foie
A) lobule hépatique B) sinusoidé hépatique

2. Sources cellulaires des VE

Le foie, dans un contexte physiologique ou pathologique, peut libérer des VE, dans leur environnement cellulaire, qui se retrouvent alors dans la circulation générale. Ainsi, des VE contenant des protéines, lipides ou acides nucléiques spécifiques du foie sont détectées dans le sang chez l'Homme ou les rongeurs. Des ARNm de protéines spécifiques du foie (albumine, fibrinogène et haptoglobine) sont présents dans des VE isolées de sang de rats sains (Wetmore *et al.*, 2010). En plus, dans des contextes pathologiques, des VE issues du foie, ainsi identifiées, grâce à la mise en évidence de composés spécifiques du foie, comme les protéines ASGPR1 (*Asialoglycoprotein receptor-1*) et CES-1 (Carboxylestérase-1) ou les miARN miR-122 ou miR-192, sont aussi isolées du plasma de souris (Bala *et al.*, 2012; Holman *et al.*, 2016; Povero *et al.*, 2014) ou du plasma de patients humains (Momen-Heravi *et al.*, 2015a).

Plusieurs types cellulaires présents dans le foie sont responsables de cette production en conditions physiologiques :

- **Les hépatocytes** : les hépatocytes primaires humains (Hirsova *et al.*, 2016), de souris (Cai *et al.*, 2017; Lee *et al.*, 2017; Povero *et al.*, 2015; Seo *et al.*, 2016) et de rat (Cho *et al.*, 2017b; Conde-Vancells *et al.*, 2008; Rodríguez-Suárez *et al.*, 2014) ainsi que des lignées cellulaires d'hépatocytes comme HepG2 ou Huh7 (Kakazu *et al.*, 2016; Povero *et al.*, 2013; Verma *et al.*, 2016) peuvent libérer des VE, des EXO et des MV. Cette production de VE est capable de varier quantitativement ou qualitativement en fonction des différentes stimulations cellulaires et en fonction du contexte pathologique.
- **Les cholangiocytes** : la présence de VE, principalement issues de cholangiocytes et d'hépatocytes, a été mise en évidence dans la bile (Masyuk *et al.*, 2010). Les cholangiocytes humains (Liu *et al.*, 2019b) ou issus de lignées cellulaires (Witek *et al.*, 2009) peuvent également libérer des VE dans le milieu extracellulaire. De façon intéressante, une sécrétion *in vivo* de VE par des cholangiocytes est observée, par microscopie électronique, chez la souris (Masyuk *et al.*, 2010) ; ces VE seraient principalement des EXO car il est clairement mis en évidence la formation de MVB.
- **Les cellules étoilées** : des cellules primaires étoilées de souris (Chen *et al.*, 2014; Wan *et al.*, 2019) mais aussi une lignée cellulaire de myofibroblastes activés du foie (Witek *et al.*, 2009) peuvent libérer des VE.
- **Les cellules endothéliales** : les cellules endothéliales, tapissant les vaisseaux sanguins, sont étudiées depuis longtemps pour leur capacité à générer des VE et notamment des MV. Il se trouve que les cellules endothéliales sinusoidales issues du foie de souris (Wang *et al.*, 2015b) sont elles aussi productrices de VE.
- **Les cellules de Küpffer** : peu d'études montrent spécifiquement la production de VE par les macrophages du foie directement, mais les cellules de Küpffer sont au même titre que d'autres macrophages de l'organisme capables de libérer des VE (Nojima *et al.*, 2016).

3. Caractéristiques des VE produites dans le foie

Les études de caractérisation des VE comprenant des analyses approfondies de la composition en protéines, en acides nucléiques et en lipides concernent uniquement celles libérées par les **hépatocytes** en conditions physiologiques. C'est pourquoi, nous nous intéresserons uniquement aux caractéristiques de ces dernières dans les paragraphes suivants.

a. Types de VE produites

Les hépatocytes sont capables de libérer des VE assimilées à des **EXO**, du fait de leurs tailles aux alentours de 100 nm, de leurs structures en cupule observées en microscopie électronique ou de leurs expressions des marqueurs CD81, CD63, LAMP-1, TSG101, Rab5, Alix, (Cai *et al.*, 2017;

Cho *et al.*, 2017a; Conde-Vancells *et al.*, 2008; Lee *et al.*, 2017; Povero *et al.*, 2015; Rodríguez-Suárez *et al.*, 2014; Seo *et al.*, 2016) ; ou bien des VE assimilées à des **MV** du fait de leurs tailles comprises entre 100 et 1000 nm et de leurs expressions de marqueurs comme l'annexine V ou ARF6 (Povero *et al.*, 2013). A notre connaissance, aucune étude n'a étudié la libération de l'ensemble des VE simultanément, les études se concentrant sur l'isolement, soit des EXO, soit des MV selon des procédures différentes. Par conséquent, il est impossible de savoir si les hépatocytes produisent un type de VE de façon préférentielle en fonction des stimuli. Enfin, il est également difficile d'établir une échelle de concentration des VE libérées car les méthodes d'isolement utilisées ont des rendements variables (*cf II.B.1.a Méthodes d'isolement en page 79*) mais aussi puisque la plupart des études, exprimant la concentration de VE en particules par millilitre, ne précisent pas s'il s'agit du volume de milieu ou du tampon dans lequel les VE sont resuspendues après leur isolement.

b. Caractéristiques biochimiques

i. Protéines

Par protéomique, sur les EXO produits par des hépatocytes primaires de rat, **251 protéines** ont pu être identifiées (Conde-Vancells *et al.*, 2008). Parmi celles-ci, 109 sont aussi présentes dans des EXO issus d'autres types cellulaires non hépatiques. En améliorant les techniques d'analyses, plus de 550 protéines sont ensuite identifiées (Rodrigues *et al.*, 2008). Des protéines transmembranaires comme les tétraspanines CD81, CD63 et CD82 ou LAMP-1 confirment leur origine exosomale, le récepteur ASGPR1, protéine spécifique des hépatocytes, permet de confirmer leur origine cellulaire. Dans les EXO d'hépatocytes se trouvent :

- des protéines participant à la biogénèse des EXO au niveau **endosomale** comme des annexines, des petites GTPases, protéines du cytosquelette (actine, tubuline), des protéines de liaison au cytosquelette (moesine, ezrin, cofilin-1) et des protéines motrices (myosines) ;
- des **protéines sécrétées** par le foie dans la circulation sanguine, comme des facteurs de coagulation, l'albumine ou des apolipoprotéines ;
- des **protéines cytosoliques** comme hsp70 ou hsp90 probablement incorporées lors de la formation des VE.

D'autres protéines identifiées sont impliquées dans le **métabolisme des lipides**, le **métabolisme des acides aminés et glucides** et le **métabolisme des hormones** (**FIGURE 35**). De façon intéressante, des protéines liées au **métabolisme des xénobiotiques**, comme les UGT (UGT2B2, 2B3, 2B5) et les CYP450 (CYP2A1, 2A2 2A3, 2B3, 2C11, 2D1, 2D3, 2D10, 2D18, 2D26, 2E1, 3A2, 4F4) sont également contenues dans les VE d'hépatocytes (Rodríguez-Suárez *et al.*, 2014). Une analyse *Genome ontology* montre que les protéines présentes dans ces EXO, ont des fonctions moléculaires oxydoréductase, GTPase, hydrolase ou encore sont des protéines de liaison au fer ou aux lipides. En outre, les VE d'hépatocytes sont enrichies en protéines associées au

transport intracellulaire, au repliement de protéines, à la réponse au stress, à l'homéostasie cellulaire et au métabolisme des lipides (Conde-Vancells *et al.*, 2008; Rodríguez-Suárez *et al.*, 2014) (FIGURE 35). Récemment, une étude protéomique sur les EXO libérés par des hépatocytes primaires humains en condition physiologique identifie près de 1200 protéines (Ogese *et al.*, 2019) impliquées dans les mêmes voies biologiques que précédemment.

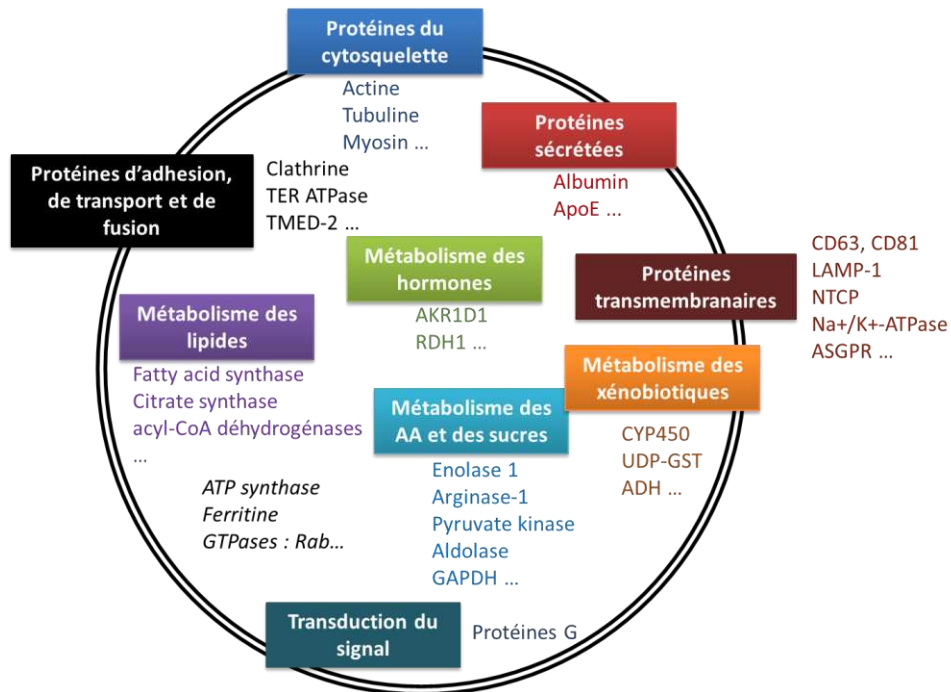


Figure 35 : Exemples de protéines contenues dans les VE issues d'hépatocytes

Tandis que les profils protéiques des EXO sont plus éloignées de celui des cellules dont ils proviennent, les profils protéiques des MV libérées par les hépatocytes seraient proches de ceux des cellules d'origine (Haraszti *et al.*, 2016).

ii. Acides nucléiques

A l'aide de puces à ADN (Royo *et al.*, 2013), plus de 1336 ARNm de gènes transcrits sont décrits dans des VE libérées par des hépatocytes de rat, qui contribuent également au métabolisme énergétique, des lipides et des xénobiotiques.

Bien que des séquençages haut-débit de miARN montrant des signatures spécifiques ont été effectués dans des types cellulaires non hépatiques (Bellingham *et al.*, 2012; Nolte-t Hoen *et al.*, 2012), à notre connaissance, une seule étude, par approche omique, du contenu en miARN, des VE libérées par les hépatocytes humains primaires a été menée (Holman *et al.*, 2019). Les EXO sont enrichis en certains miARN par rapport aux hépatocytes ; les 50 miARN les plus présents réguleraient des réponses dans différentes catégories notamment reliées à des réponses inflammatoires comme la régulation négative de l'expression de cytokines comme TNF α ou de

chimiokines comme CXCL10 ou CCL3 (*Chemokine (C-C motif) ligand 3*). En plus, des études ciblées montrent bien que les VE d'hépatocytes contiennent des miARN spécifiques comme par exemple le miR-122, miARN le plus abondant dans le foie et qui posséderait une multitude de fonctions dans les réponses au stress, dans l'hépatocarcinogénèse et dans la réplication du virus de l'hépatite C (Momen-Heravi *et al.*, 2015b).

iii. Lipides

Des approches lipidomiques révèlent que les EXO, issus d'hépatocytes de rat en culture primaire (Royo *et al.*, 2019), de la lignée MLP29 (*Mouse liver progenitor cells*) (Royo *et al.*, 2019), de la lignée Huh-7 (Haraszi *et al.*, 2016) et HepG2/C3A (Chapuy-Regaud *et al.*, 2017) d'hépatocarcinome humain, ont des compositions lipidiques similaires aux EXO d'autres types cellulaires non hépatiques comme les cellules PC-3 issues de la lignée cellulaire de cancer de la prostate ou les cellules Oli-neu issues de la lignée cellulaire de précurseurs d'oligodendrocytes (Llorente *et al.*, 2013; Skotland *et al.*, 2017, 2019). Ainsi, les EXO des hépatocytes sont enrichies, par rapport à leur cellule d'origine en cholestérol, SM, PS, céramides, acides gras libres, lysophosphatidylsérines, lysophosphatidylglycérols et triglycérides et appauvris en PC, PI, phosphatidylglycérols (PG), phosphatidyléthanolamines (PE), diacyl et triacyl glycérols (Chapuy-Regaud *et al.*, 2017; Haraszi *et al.*, 2016; Royo *et al.*, 2019).

En ce qui concerne les MV libérées par les hépatocytes de la lignée Huh7, leur profil lipidique serait proche de celui de leur cellule d'origine, mis à part un enrichissement en SM (Haraszi *et al.*, 2016).

Cependant, les caractéristiques lipidiques des VE peuvent être différentes selon l'origine cellulaire des VE. Ainsi, des VE libérées par des hépatocytes primaires de rat sont très largement enrichies en triglycérides et dans la moindre mesure en diacylglycérophosphocholines, par rapport à celles issues de la lignée cellulaire MLP29 et pourrait être le reflet de la différence de la composition lipidique des cellules productrices (Royo *et al.*, 2019).

En conclusion, il est important de noter que les différences de composition entre des VE produites par différents types cellulaires d'hépatocytes reflètent leur différence d'origine (espèce, cellule normale ou cellule transformée). En effet, la composition de VE issues d'hépatocytes primaires de rat signale la présence d'enzymes impliquées dans les fonctions hépatiques, alors que celle des VE issues d'hépatocytes de la lignée MLP29 de cellules progénitrices du foie de souris, indique la présence de protéines et de transcrits liés à la régulation du cycle cellulaire et au processus de différenciation (Conde-Vancells *et al.*, 2008; Royo *et al.*, 2013). Par ailleurs, l'étude de Royo *et al.*, montre une composition lipidique différente, entre les VE dérivées d'hépatocytes humains en culture primaire et celles dérivées de lignées cellulaires (Royo *et al.*, 2019). Il paraît alors essentiel de vérifier les résultats obtenus à partir de VE issues de lignées cellulaires, dans des hépatocytes en culture primaire.

4. Rôles physiologiques des VE produites dans le foie

Les hépatocytes exécutent les principales fonctions hépatiques comme la glycolyse, la production de bile, la détoxification et la régénération du foie en cas de dommages. Bien que le nombre d'études sur le rôle des VE issues de cellules hépatiques saines soient encore très faibles, celles-ci montrent clairement un rôle primordial des VE essentiellement dérivées des hépatocytes pour maintenir l'homéostasie hépatique (TABLEAU 28).

a. Prolifération des hépatocytes

Les VE issues de cellules souches adultes humaines du foie (Herrera *et al.*, 2010) et les EXO issus d'hépatocytes primaires de souris (Nojima *et al.*, 2016) peuvent stimuler la prolifération d'hépatocytes primaires humains, de rat et de souris respectivement. *In vivo*, chez le rat après hépatectomie (Herrera *et al.*, 2010) et chez la souris après hépatectomie ou ischémie/reperfusion (Nojima *et al.*, 2016), ces mêmes VE participent à la régénération du foie, par la stimulation de la prolifération des hépatocytes. L'ARN contenu dans ces VE pourrait être transféré dans des hépatocytes cibles permettant la synthèse *de novo* de protéines à l'origine de leur prolifération (Herrera *et al.*, 2010) ; le mécanisme précis n'ayant pas été décrit. Une autre explication serait le transfert d'enzymes comme la céramidase neutre et la sphingosine kinase 2, par les EXO dans les hépatocytes cibles, permettant la formation, au niveau intracellulaire, de la sphingosine-1-phosphate activant la prolifération par un mécanisme non précisé. De façon intéressante, les EXO libérés par les cellules de Küpffer ou les cellules endothéliales sinusoidales de souris n'entraînent pas la prolifération des hépatocytes et la régénération du foie de souris (Nojima *et al.*, 2016). Ceci suggère le rôle spécifique des VE et leur cargo, comme médiateurs de l'activité proliférative des hépatocytes.

b. Détoxification

Les EXO libérés par des hépatocytes sains contiennent de nombreuses enzymes impliquées dans la détoxification de composés endogènes et exogènes (Conde-Vancells *et al.*, 2008), telles que des CYP450, des UGT, et des GST. En plus, certains cytochromes comme les CYP1B1, 2A6, 2E1 et 3A4 sont actifs dans les EXO (Kumar *et al.*, 2017b). Ils peuvent être libérés dans la circulation générale et pourraient être redistribués vers d'autres tissus non hépatiques (Kumar *et al.*, 2017b). Ainsi, les VE issues du foie pourraient potentiellement participer à l'acquisition d'une activité de détoxification de différents organes et tissus éloignés qui seraient alors protégés de la toxicité potentielle de composés xénobiotiques (Conde-Vancells *et al.*, 2010).

c. Tolérance immunitaire du foie

La tolérance immunitaire du foie correspond à une activation inefficace des cellules immunitaires, par les néo-antigènes produits dans le foie et par des antigènes issus de l'alimentation ou de la flore intestinale, permettant de prévenir une suractivation des réponses

immunitaires face à des composés inoffensifs. Les EXO issus d'hépatocytes primaires humains contiennent un profil de miARN pouvant participer à l'immunosuppression (Holman *et al.*, 2019). Ainsi, ces EXO provoquent une diminution de l'expression de gènes liés à la réponse immunitaire innée comme les chimiokines CCL3, CCL3L3 ou CXCL8 et une diminution de la libération des cytokines IL8, IL1 β et TNF α dans les monocytes stimulés par le LPS (Holman *et al.*, 2019).

d. Maintien de l'épithélium biliaire

Les VE présentes dans la bile correspondent à un mélange d'EXO dérivés d'hépatocytes et de cholangiocytes. Les EXO biliaires sont capables de s'attacher aux cils des cholangiocytes du foie de souris et de rat *in vivo* (Masyuk *et al.*, 2010) et provoquent alors une modification de la signalisation cellulaire des cholangiocytes. Ainsi, la phosphorylation de la protéine kinase ERK1/2 est réduite, alors que l'expression du miR-15A est augmentée, participant à l'inhibition de la prolifération des cholangiocytes (Masyuk *et al.*, 2010). Les VE contenues dans la bile joueraient alors un rôle important pour maintenir le caractère quiescent de l'épithélium biliaire constitué de cholangiocytes.

Tableau 28 : Les VE dans la physiologie du foie

Source de VE	Cellules réceptrices	Effet	Cargo VE	Référence
Hépatocytes	Hépatocytes	Prolifération	Céramidase neutre Sphingosine kinase 2	(Nojima <i>et al.</i> , 2016)
Human liver stem cells (HLSC)	Hépatocytes	Prolifération Résistance à l'apoptose	ARN	(Herrera <i>et al.</i> , 2010)
Hépatocytes	Cellules extrahépatiques	Activité métabolique	CYP450 UGT GST	(Conde-Vancells <i>et al.</i> , 2008, 2010)
Hépatocytes	Monocytes	Immunosuppression	miARN	(Holman <i>et al.</i> , 2019)
Bile	Cholangiocytes	Réduction de la prolifération	/	(Masyuk <i>et al.</i> , 2010)

B. Implication des VE dans les maladies du foie

Les VE sont aussi reconnues pour participer au développement de nombreuses pathologies comme les cancers, le dysfonctionnement vasculaire, les maladies immunes, neurodégénératives et les troubles métaboliques (Yáñez-Mó *et al.*, 2015). Depuis dix ans, la recherche en hépatologie s'intéresse aux rôles des VE dans les maladies du foie. Nous avons vu précédemment que les VE pouvaient être libérées par les cellules du foie en conditions physiologiques. En conditions pathologiques, la libération de VE peut être modifiée, soit par augmentation de la production de VE, soit par modification du contenu de ces VE. Ces VE modifiées pourraient ensuite être impliquées dans l'initiation de différents mécanismes délétères qui participent au déclenchement ou à la progression de différentes maladies du foie comme les **maladies hépatiques aiguës** ou les maladies chroniques comme les **maladies alcooliques du foie** (**ALD** : *alcoholic liver diseases*, **AH** : *alcoholic hepatitis*, **ASH** : *alcoholic steatohepatitis*), les **maladies non alcooliques du foie** (**NAFLD** : *non-alcoholic fatty liver diseases*, **NASH** : *non-alcoholic steatohepatitis*), les **fibroses** et **cirrhoses**, les **hépatites virales**, les **cholangiopathies** et les **cancers du foie**.

1. Augmentation de la libération de VE en conditions pathologiques

In vitro, la libération de VE par les hépatocytes et les cellules étoilées est augmentée dans des contextes d'intoxication à l'éthanol, de surcharges en acides gras ou d'activation fibrotique, modèles d'ALD, de NAFLD ou de fibrose hépatique.

Certains mécanismes participant à la régulation de cette libération de VE ont été proposés (**TABLEAU 29**). La libération de VE par les hépatocytes traités par des acides gras ou l'éthanol dépend notamment de l'activation des caspases 3 et de ROCK 1 (Hirsova *et al.*, 2016; Povero *et al.*, 2013; Verma *et al.*, 2016) (*cf II.A.4.b Mort cellulaire et libération de VE en page 76*) ou du stress du réticulum endoplasmique (RE) activant les voies IRE α (*Inositol-requiring enzyme 1 α*) et PERK (*PKR-like ER protein kinase*) (Cho *et al.*, 2017a; Kakazu *et al.*, 2016). En ce qui concerne le stress du RE, suite à l'activation de la voie IRE1 α /XBP-1, le facteur de transcription XBP-1 (*X-box binding protein 1*) permet l'expression de la sérine palmitoyltransférase 1, enzyme impliquée dans la biosynthèse *de novo* des céramides, favorisant alors la production de VE (Kakazu *et al.*, 2016). La libération de VE dans ces conditions pourrait aussi dépendre de l'activation de voies de signalisation comme p38MAPK (Guo *et al.*, 2019; Ibrahim *et al.*, 2016; Seo *et al.*, 2019).

Tableau 29 : Augmentation de la libération de VE *in vitro* en conditions pathologiques

Modèle	Traitement	Cellules productrices	Type de VE	Cargo	Mécanisme de production	Référence
NAFLD	PA	Hépatocytes	↗ MV	↗ Vanin-1	Activation caspase-3	(Povero <i>et al.</i> , 2013)
	LPC		↗ sEV	↗ CXCL-10	Activation p38MAPK	(Ibrahim <i>et al.</i> , 2016)
	PA		↗ sEV	↗ Céràmides	Activation des voies du stress du RE IRE1α/XBP-1	(Kakazu <i>et al.</i> , 2016)
	LPC-PA		↗ sEV	↗ TRAIL	Activation caspase-3 et ROCK-1	(Hirsova <i>et al.</i> , 2016)
ALD	Ethanol	Hépatocytes	↗ MV	↗ mtDNA	Activation des voies du stress du RE IRE1α/PERK	(Cai <i>et al.</i> , 2017)
			↗ EV	↗ CD40L	Activation caspase-3 et ROCK-1	(Verma <i>et al.</i> , 2016)
			↗ EXO	↗ CYP2E1, CYP2A, CYP1A1/2, et CYP4B	Activation des voies du stress du RE PDI ou Grp78 Production d'ERO	(Cho <i>et al.</i> , 2017a)
			↗ EXO	-	↗ ARNm liés au trafic intracellulaire des vésicules Rab 5a,b,c, Rab 7a, Rab27a,b) ↗ ARNm liés à la biogénèse des EXO ESCRT (HGS, Alix, STAM1, TSG101, VTA1, YKT6) ou céramide (nSmase2)	(Chen <i>et al.</i> , 2017a)
Cancer du foie	CCl ₄ + Ethanol	Hépatocytes ALDH2 ^{-/-}	↗ EV	↗ ADNox	-	(Seo <i>et al.</i> , 2019)

ALDH2 : Aldéhyde Dehydrogénase 2, Grp78 : Binding immunoglobulin protein (BiP) ou heat shock 70 kDa protein 5, IREα : inositol-requiring enzyme 1 α, LPC, lysophosphatidylcholine, nSMase 2 : sphingomyélinase neutre 2, PA : acide palmitique, PERK : PKR-like ER protein kinase, PDI : protéine disulfure isomérase, RE : réticulum endoplasmique, XBP-1 : X-box binding protein 1, VTA1 : Vacuolar protein sorting-associated protein.

Une augmentation de la libération de VE est également observée dans la circulation générale de modèles de rongeurs ou de patients présentant des dommages hépatiques aigus ou différentes maladies du foie. Ainsi, une augmentation de la quantité de VE est retrouvée dans la circulation générale de rongeurs, dans des modèles de **dommages hépatiques aigus**, obtenus par exemple après exposition des rongeurs à la galactosamine (Cho *et al.*, 2017c, 2017b; Wetmore *et al.*, 2010) ou au paracétamol (APAP) (Cho *et al.*, 2017c, 2017b, 2018; Schmelzle *et al.*, 2013; Wetmore *et al.*, 2010) ; ou après ischémie-reperfusion (Freeman *et al.*, 2014). Chez l'Homme, une augmentation de la libération de VE est observée dans le sang de patients présentant des dommages hépatiques aigus par rapport à des volontaires sains (Schmelzle *et al.*, 2013).

Une élévation des niveaux de VE est également constatée dans le sang :

- de modèles de rongeurs et de patients présentant une **hépatite alcoolique** (Bala *et al.*, 2012; Cai *et al.*, 2017; Cho *et al.*, 2017a; Eguchi *et al.*, 2017; Momen-Heravi *et al.*, 2015a, 2015b; Saha *et al.*, 2016, 2018; Sukriti *et al.*, 2018; Verma *et al.*, 2016) ;
- de modèles de rongeurs ou de patients **NAFLD** ou **NASH** (Hirsova *et al.*, 2016; Ibrahim *et al.*, 2016; Kakazu *et al.*, 2016; Lee *et al.*, 2017; Povero *et al.*, 2013, 2014) ;
- de patients présentant une **cirrhose** (Rautou *et al.*, 2012) ;
- de patients présentant un **HCC** (Arbelaiz *et al.*, 2017; Brodsky *et al.*, 2008; Fang *et al.*, 2018a).

2. Modification du contenu des VE en conditions pathologiques

En conditions pathologiques, le contenu des VE libérées par les cellules du foie est modifié *in vitro* (TABLEAU 29 ET TABLEAU 32); ainsi des enrichissements en molécules potentiellement impliquées dans des mécanismes délétères comme l'inflammation, l'angiogenèse, la mort cellulaire, la progression tumorale, la fibrogenèse sont retrouvés. *In vivo*, chez les rongeurs ou chez des patients atteints de maladies du foie, une modification du contenu des VE est également détectée, pouvant potentiellement servir de biomarqueurs.

La découverte de nouveaux biomarqueurs représente une opportunité de détection précoce, de meilleure surveillance et d'évaluation de la réponse au traitement dans les maladies du foie. Plusieurs définitions sont attribuées à la notion de biomarqueurs. Selon le *National Institute of Health* (NIH), il s'agit d' « une caractéristique qui est objectivement mesurée et évaluée comme un indicateur de processus biologiques normaux ou pathologiques, ou de réponses pharmacologiques à une intervention thérapeutique ». Pour l'OMS (Organisation mondiale de la santé), il correspond à « toute substance, structure ou procédé qui peut être mesuré dans le corps humain ou dans ses matrices susceptibles d'influencer ou prédire l'incidence ou l'apparition d'une maladie » (Strimbu and Tavel, 2010). Jusqu'à présent, la référence pour le diagnostic et la surveillance des maladies du foie est la biopsie, méthode invasive, qui questionne sur le besoin de méthodes moins invasives comme le prélèvement sanguin. Néanmoins, les biomarqueurs sanguins actuels de dommages hépatiques comme la mesure des niveaux de transaminases ALT (Alaline aminotransférase), et AST (Aspartate aminotransférase), d'alkaline phosphatase ou de γ -glutamyltranspeptidase ne sont pas forcément spécifiques des diverses maladies du foie et ne corrélerent pas avec les différents stades des maladies, notamment l'étendue de l'inflammation ou des dommages tissulaires (Szabo and Momen-Heravi, 2017).

Or, les VE sont présentes dans les fluides biologiques et la diversité de leur contenu (acides nucléiques, lipides et protéines) peut être spécifique des cellules productrices et aussi refléter l'état physiologique ou pathologique des tissus. Les VE pourraient donc servir de potentiels biomarqueurs non invasifs de diagnostic ou de pronostic dans les maladies du foie.

Dans les maladies du foie, à savoir les **atteintes hépatiques aiguës** et les maladies chroniques telles que les maladies alcooliques du foie **ALD**, les maladies non alcooliques du foie **NAFLD**, les **fibroses** et **cirrhoses**, les **hépatites virales**, les **cholangiopathies** et les **cancers du foie** ; le contenu de VE isolées de divers fluides biologiques, urine, plasma, sérum et bile, a été caractérisé par différentes approches omiques ; génomiques, protéomique et lipidomique, afin de rechercher des molécules cargos et d'établir une signature spécifique pouvant indiquer un état pathologique et servir d'outil de diagnostic ou de pronostic.

a. Atteintes hépatiques aiguës

Chez les rongeurs présentant des dommages hépatiques liés aux médicaments (exposition au paracétamol ou modélisés par une exposition à la galactosamine), les VE circulantes sont enrichies en ARNm ou protéines comme l'albumine ou l'arginase 1 (Cho *et al.*, 2018; Royo *et al.*, 2013; Wetmore *et al.*, 2010), et en miARN (miR-122) (Bala *et al.*, 2012; Cho *et al.*, 2017c, 2017b; Holman *et al.*, 2016) spécifiques du foie, suggérant une élévation de la sécrétion de VE par les hépatocytes. En plus, ces VE de rongeurs et celles issues de patients, atteints de dommages hépatiques aigus, sont enrichies en CD133 et CD39, protéines normalement présentes à la surface des cellules souches hématopoïétiques impliquées dans la régénération hépatique, ce qui est révélateur de dommages hépatiques (Schmelzle *et al.*, 2013).

L'augmentation des niveaux de miR-122, miR-192 et miR-155, miR associés à l'inflammation, est mise en évidence dans les VE circulantes de souris et de rats exposés au paracétamol (Bala *et al.*, 2012; Cho *et al.*, 2017c, 2017b; Holman *et al.*, 2016). Par ailleurs, une augmentation d'expression d'ARNm ou de protéines caractéristiques des DILI est détectée dans ces VE : des ARNm ou protéines liés au métabolisme des xénobiotiques (ADH1, CYP2D1, GST, CES-1 ou CES-3), au dysfonctionnement endothélial (arginase 1), à l'inflammation (Rbp4 [*Retinol-binding protein 4*], ASS1 [*Argininosuccinate synthase 1*], haptoglobine, peroxyredoxine 1, fibrinogène, CCL2, HSP90 et HSP70) et à l'homéostasie du fer (ferritine) (Cho *et al.*, 2017c, 2017b, 2018; Palomo *et al.*, 2018; Rodríguez-Suárez *et al.*, 2014; Royo *et al.*, 2013; Wetmore *et al.*, 2010).

Ces études suggèrent l'utilisation des VE comme potentiels biomarqueurs de dommages hépatiques aigus et notamment de dommages liés à l'utilisation de médicaments (DILI).

b. Maladies chroniques du foie

i. ALD : *alcoholic liver disease*

Chez des rongeurs exposés à l'éthanol, chez des patients alcooliques (Cho *et al.*, 2017a, 2017b) ou chez des patients présentant une hépatite alcoolique (Momen-Heravi *et al.*, 2015b; Sukriti *et al.*, 2018), une augmentation dans les VE, de marqueurs hépatiques (albumine, ASGPR, miR-122 et CYP2E1) suggère une libération spécifique de VE par les hépatocytes ; l'élévation du marqueur CD34 présent dans certaines cellules souches hématopoïétiques impliquées dans la régénération hépatique, marquerait un dommage au niveau du foie (Sukriti *et al.*, 2018).

Les VE libérées en conditions d'ALD, présentent une modification de leur contenu en protéines et miARN essentiellement. Les VE circulantes sont enrichies en protéines liées à l'inflammation et au métabolisme du xénobiotiques. Ainsi, une signature protéique particulière est retrouvée chez les souris chroniquement exposées à l'alcool, (Saha *et al.*, 2018) ; un enrichissement en CD40L est observée chez les patients atteints d'une hépatite alcoolique (Verma *et al.*, 2016) ; une élévation

des niveaux d'haptoglobine, de peroxyredoxine1 et de GST, est révélée chez des patients alcooliques (Cho *et al.*, 2017b). En ce qui concerne les miARN, une augmentation des niveaux de miR-122, miR-192, miR-155, miR-27a, présentant des fonctions dans l'inflammation, de miR-30a, impliqué dans l'angiogenèse (Bala *et al.*, 2012; Momen-Heravi *et al.*, 2015a, 2015b; Saha *et al.*, 2016) et de let7f, miR-29a et miR-340, associés à l'oncogenèse et l'inflammation (Eguchi *et al.*, 2017), est mise en évidence dans les VE isolées de sang de patients alcooliques présentant une hépatite alcoolique ou de souris chroniquement exposées à l'alcool. Enfin, une augmentation de l'ADN mitochondrial oxydé, capable d'activer une réponse inflammatoire, est retrouvée dans les VE isolées de souris exposées à l'alcool (Cai *et al.*, 2017). Le contenu modifié de ces VE pourraient alors servir comme outil de diagnostic des maladies alcooliques du foie.

ii. NAFLD : *non-alcoholic fatty liver disease*

Chez les souris NAFLD (Povero *et al.*, 2014) ou NASH (Povero *et al.*, 2013) et chez les patients atteints de NAFLD (Lee *et al.*, 2017) ou NASH (Hirsova *et al.*, 2016; Kornek *et al.*, 2012), une augmentation des marqueurs ASGPR1, CYP2E1, miR-122 ou miR-192, spécifiques du foie, ainsi que de CD4, CD14 et iNKT, à la surface des VE indique une élévation spécifique de la libération de VE par les hépatocytes et par des cellules impliquées dans l'inflammation (monocytes, macrophages et cellules NK).

Par ailleurs, une modification du contenu est mise en évidence dans les VE circulantes issues de rongeurs ou de malades atteints de NAFLD ([TABLEAU 30](#)). Ainsi, une signature protéomique particulière est retrouvée dans les VE isolées de plasma de souris NAFLD et permet de les distinguer de celles de souris saines (Povero *et al.*, 2014). Ces VE contiennent un nombre plus important de protéines liées à l'inflammation (Povero *et al.*, 2014). En plus, les VE isolées, à partir du sérum ou plasma de souris ayant développé une NASH, contiennent des niveaux plus élevés en Vanin-1, impliquée dans l'angiogenèse (Povero *et al.*, 2013) et en CXCL-10, jouant un rôle dans l'inflammation (Ibrahim *et al.*, 2016). Les VE isolées des patients NASH sont enrichies en intégrines ITGβ1 (Guo *et al.*, 2019), en ADN mitochondrial oxydé (Garcia-Martinez *et al.*, 2016), en céramides et en sphingosine-1-phosphate (Hirsova *et al.*, 2016), molécules impliquées dans le processus d'inflammation. Enfin, les VE issues de rongeurs et de patients NAFLD ou NASH présentent une modification de leur contenu en miARN, avec principalement un enrichissement des miARN associés à l'inflammation et la fibrose (Lee *et al.*, 2017; Murakami *et al.*, 2012; Povero *et al.*, 2014). Ces modifications du contenu des VE libérées dans le sang pourraient potentiellement servir dans le diagnostic de NAFLD.

Tableau 30 : Modification du contenu des VE isolées du sang de souris ou de patients présentant une NAFLD

Source	Type de VE	Marqueurs	Fonction associée	Groupe témoin	Référence
Souris NAFLD	<i>Plasma</i>	↗ EV ↗ miR-122, miR-192	Inflammation	Souris saines	(Povero <i>et al.</i> , 2014)
Souris NASH	<i>Plasma</i>	↗ EV ↗ miR-122, Vanin-1	Inflammation Angiogenèse	Souris saines	(Povero <i>et al.</i> , 2013)
		↗ sEV ↗ CXCL-10, céramides, S1P	Inflammation		(Ibrahim <i>et al.</i> , 2016; Kakazu <i>et al.</i> , 2016)
Patients NAFLD avancée	<i>Sérum</i>	↗ EXO ↗ miR-122, miR-192	Inflammation Fibrose	Patients NAFLD précoce	(Lee <i>et al.</i> , 2017)
Patients stéatose et patients NASH	<i>Plasma</i>	↗ sEV ↗ Céramides, S1P	Inflammation	Patients obèses	(Kakazu <i>et al.</i> , 2016)
Patients NASH	<i>Sérum</i>	sEV ↗ ITGβ ₁	Inflammation	Patients stéatose	(Guo <i>et al.</i> , 2019)
	<i>Plasma</i>	EV ↗ mtADNox		Humains sains	(Garcia-Martinez <i>et al.</i> , 2016)
	<i>Sérum</i>	EXO Panel miRNA			(Murakami <i>et al.</i> , 2012)

iii. Fibrose et cirrhose

Un enrichissement en thromboplastine tissulaire, protéine associée à une élévation de l'activité de coagulation, est détecté dans les VE dérivées du plasma de patients cirrhotiques, par rapport, à des individus sains (Rautou *et al.*, 2012). Parmi ces VE, une augmentation du nombre, libérées par les cellules leuko-endothéliales (VE CD31+CD41-) et par les hépatocytes (VE cytokératine 18+) est observée, mettant en évidence la libération de VE par deux types cellulaires impliquées dans la pathogenèse de la cirrhose (Rautou *et al.*, 2012). Dans les ascites ponctionnées de malades, la quantité de VE est réduite ; ainsi une quantité inférieure à une valeur seuil de 488.4 MV/μl, associée à une augmentation des VE libérées par des neutrophiles et des lymphocytes T (VE CD66b+CD3+) permettrait de prédire une survie plus faible des patients à 30 jours (Engelmann *et al.*, 2017). Enfin, une diminution de la quantité VE libérées par une sous-population spécifique de monocytes CD14+CD16+ est corrélée positivement avec la sévérité de la fibrose chez des patients NAFLD (Welsh *et al.*, 2018). Ces VE pourraient alors de servir à la détection, à la surveillance de la progression de la fibrose et cirrhose et aussi à la prédiction de la survie des malades.

iv. Hépatite virale

Les VE libérées dans la circulation de patients présentant une hépatite virale se distinguent par la modification de leur chargement. Ainsi, une élévation de CD81, tétraspanine permettant la liaison au virus et impliquée dans la diminution de la réponse immune, et du complexe HSP90-miR-122-Ago2, associé à la transmission du virus, est mise en évidence dans les VE isolées du sérum de patients présentant une hépatite virale C, par rapport à des individus sains (Bukong *et al.*, 2014) ou

des patients infectées par le virus, mais ne présentant pas d'hépatite (Welker et al., 2012). Par ailleurs, la signature en miARN est modifiée, dans les VE isolées du sérum de patients présentant une hépatite virale B et ayant développé un cancer HCC, par rapport, à des patients présentant une hépatite sans HCC (Sohn *et al.*, 2015). Ainsi, une augmentation des niveaux de miR-18a, miR-221, miR-222 et miR-224, associées à la prolifération, la migration et l'inhibition de l'apoptose, et une diminution des niveaux de miR-101, miR-106b, miR-122 et miR-195, suppresseurs de tumeurs, est mise en évidence (Sohn *et al.*, 2015). Cette modulation révèle l'utilisation possible des VE en tant que biomarqueurs, mais aussi en tant que médiateurs de la progression de l'hépatite virale vers le HCC.

v. Cancer du foie

Dans les cancers du foie, le contenu des VE, libérées dans la circulation sanguine et la bile, ou sécrétées dans l'urine, est modifié. Ainsi, les VE présentes dans ces fluides biologiques pourraient servir de biomarqueurs potentiels dans le diagnostic ou le pronostic des cancers primaires du foie : carcinome hépatocellulaire (HCC), hépatoblastome (HB), et cholangiocarcinome (CAA).

α) Carcinome hépatocellulaire

L'enrichissement en certains marqueurs protéiques à la surface des VE circulantes des patients HCC montre une augmentation de la libération des VE spécifiquement par les cellules cancéreuses du foie [VE HepPar1+ (Abbate *et al.*, 2017; Brodsky *et al.*, 2008) ou VE AnnexinV+EpCAM+ASGPR1+ (Julich-Haertel *et al.*, 2017)] et les lymphocytes T (VE CD4+CD8+) (Kornek *et al.*, 2012) et pourrait servir de biomarqueurs de diagnostic. De plus, des protéines telles que LG3BP (*Galectin-3-binding protein*), PIGR (*Polymeric immunoglobulin receptor*), et A2MG (*Alpha-2-macroglobulin*), connues pour être impliquées dans la progression tumorale (Arbelaiz *et al.*, 2017) et des ARNm d'AFP et de glypican-3, protéines avec de nombreuses fonctions dans la prolifération, l'angiogenèse, l'échappement immunitaire, l'invasion, sont surexprimés dans les VE circulantes dans l'HCC.

Chez les patients atteints d'HCC, les miARN sont très étudiés, dans les VE circulantes, en tant que biomarqueurs (TABLEAU 31). Notamment, le miR-21 est augmenté dans les VE de patients atteints de HCC, comparés, à des patients présentant une hépatite virale ou des sujets sains (Wang *et al.*, 2014). Cette augmentation corrèle avec un stade avancé du cancer. Le miR-665 pourrait donc être un outil de pronostic, étant donné que son expression dans les VE corrèle positivement avec une augmentation de la largeur des tumeurs et des stades cliniques avancés, et corrèle négativement avec la survie (Qu *et al.*, 2017). De façon intéressante, le miR-1247-3p dans les VE serait un marqueur de la capacité de ce cancer à métastaser (Fang *et al.*, 2018b). A l'inverse, certains miARN seraient des bons biomarqueurs de pronostic, lorsque leurs niveaux sont diminués

dans les VE circulantes. Par exemple, la réduction de l'expression du miR-718 corrèle positivement avec la largeur des tumeurs et leur récurrence (Sugimachi *et al.*, 2015).

Tableau 31 : Modification du contenu en miARN dans les VE isolées du plasma de souris ou sérum de patients HCC

Source	Type de VE	Marqueurs	Fonction associée	Groupe témoin	Référence
Souris xénotreffes HCC	EXO	↑ miR-103	Invasion	Souris non HCC	(Fang <i>et al.</i> , 2018a)
Patients HBV+HCC	EXO	↑ miR-221, let-7a, and miR-26a	Progression tumorale	Patients avec résection	(Li <i>et al.</i> , 2015)
Patients HCC	EXO	↑ miR-21, miR-122, miR-148a, miR-1246	Progression tumorale	Patients non HCC	(Wang <i>et al.</i> , 2014, 2018b)
		↑ miR-93, miR-665	Prolifération	Sujets sains	(Qu <i>et al.</i> , 2017; Xue <i>et al.</i> , 2018)
		↑ miR-210-3p	Angiogenèse		(Lin <i>et al.</i> , 2018)
Patients HCC avec des métastases pulmonaires	↑ EXO	↑ miR-1247-3p	Métastase	Patients HCC sans métastases	(Fang <i>et al.</i> , 2018b)
Patients HBV+HCC	EXO	↑ miR-18a, miR-221, miR-222 et miR-224	Prolifération Migration Inhibition de l'apoptose	Patients HBV sans HCC Patients cirrrose	(Sohn <i>et al.</i> , 2015)
		↓ miR-101, miR-106b, miR-122 et miR-195	Suppresseurs de tumeurs		
Patients HCC	EXO	↓ miR-718, miR-9-3p, miR-638	Suppresseur de tumeurs	Sujets sains	(Murakami <i>et al.</i> , 2012; Sugimachi <i>et al.</i> , 2015; Tang <i>et al.</i> , 2018)
	EXO	Panel miARN	Fibrose Inflammation	-	(Murakami <i>et al.</i> , 2012)

HBV : hépatite virale B

β) Hépatoblastome

Chez les patients atteints d'un hépatoblastome (HB), ce sont principalement des modulations des niveaux de miARN dans les VE, qui ont été mises en évidence et qui serviraient de biomarqueurs. Ainsi, les VE isolées de patients HB sont enrichies en miR-21, connu pour être impliqué dans la progression tumorale, par rapport aux individus sains (Liu *et al.*, 2016). D'autre part, une diminution des niveaux en miR-34a, miR-34b et en miR-34c, miARN suppresseurs de tumeurs, est retrouvée dans ces VE (Jiao *et al.*, 2017). En plus, ces variations en miARN sont négativement corrélées à la survie des patients (Jiao *et al.*, 2017; Liu *et al.*, 2016).

χ) Cholangiocarcinome

Dans le cholangiocarcinome (CCA), les VE libérées dans la bile ou la circulation sanguine présentent une modification de leur contenu en miRNA et en protéines.

Ainsi, un panel de **miRNA** (miR-191, miR-486-3p, miR-1274b, miR-16 et miR-484) (Li *et al.*, 2014), associés à l'inhibition de l'apoptose et la prolifération cellulaire, et un panel de **lncRNA**,

associés à l'angiogenèse, l'invasion et la migration cellulaire (Ge *et al.*, 2017), sont régulés positivement dans les VE de la bile de patients atteints de CCA comparées à celles d'individus présentant des maladies biliaires sans cancer et à celles d'individus sains, respectivement. L'augmentation de deux lncRNAs ENST00000588480.1 et ENST00000517758 dans les VE de la bile pourraient servir d'outil diagnostique et de pronostic du CCA. En effet les niveaux de la combinaison de ces 2 lncRNA sont plus élevés dans les VE à des stades avancés du CCA et prédiraient un faible taux de survie (Ge *et al.*, 2017).

Une augmentation de **marqueurs protéiques**, comme AMPN (*Aminopeptidase N*), VNN1 (*Vanin 1*), PIGR (*Polymeric immunoglobulin receptor*), CRP (*C-Reactive Protein*), FIBG (*Fibrinogen*), IGHA1 (*Immunoglobulin heavy constant alpha 1*), A1AG1 (*Alpha-1-acid glycoprotein 1*), protéines impliquées dans la progression tumorale, dans les VE circulantes différencierait des patients CCA, d'individus sains ; et une augmentation de FIBG, A1A1 et S10A8 (*S100 calcium binding protein A8*), également associées à la progression tumorale, dans les VE, les différencierait des patients présentant une cholangite biliaire primitive, maladie inflammatoire des voies biliaires (Arbelaiz *et al.*, 2017).

Par ailleurs, des concentrations plus fortes en VE présentant l'association des marqueurs protéiques [AnnexinV+EpCAM+ASGPR1+], **marqueurs de cellules cancéreuses du foie**, permettent de différencier des patients CCA de patients cirrhotiques (Julich-Haertel *et al.*, 2017). Notamment, les taux de ces marqueurs dans les VE diminuent une semaine après la résection chirurgicale des tumeurs hépatiques.

Malgré, les nombreux avantages et opportunités de l'utilisation de VE en tant que biomarqueurs, de nombreux obstacles à dépasser existent encore. Les inconvénients de l'utilisation de VE et leur contenu comme biomarqueurs sont actuellement l'isolement des VE, évoluant encore sur le point technologique, et donc pas encore standardisé, et la définition des populations, qui n'est pas encore bien établie. La méthode d'isolement de référence pour l'instant reste l'ultracentrifugation qui nécessite une instrumentation sophistiquée et coûteuse, un temps d'isolement d'au moins 2 h et une quantité de liquide biologique plutôt élevée ; cette méthode n'est pour le moment pas adaptée à des conditions cliniques. Enfin, la normalisation des données doit également être améliorée, la recherche de molécules dont les niveaux ne varient pas selon la situation physiopathologique serait nécessaire.

3. Mécanismes délétères

Les VE par leur rôle dans la communication entre les cellules du foie participeraient au développement et à la progression de différentes maladies du foie. En effet, en conditions pathologiques, nous venons de voir que le contenu des VE est modifié et pourrait donc être impliqué dans les maladies hépatiques aiguës et dans la pathogénèse des maladies chroniques.

- Les **maladies hépatiques aiguës** consistent en une inflammation aiguë du tissu hépatique accompagnée d'une nécrose des hépatocytes.
- Les **NAFLD** (*cf I.C.1.a NAFLD en page 51*) et les **ALD** sont des maladies qui consistent en l'apparition d'une stéatose qui correspond à une accumulation de triglycérides sous forme de gouttelettes lipidiques dans le foie, étape bénigne et réversible, qui peut néanmoins progresser vers la stéatohépatite (**NASH** ou **ASH**), où se développent une inflammation et la mort des hépatocytes. La stéatohépatite peut évoluer vers une **fibrose** voire une **cirrhose**, facteur de risque important dans le développement d'un **HCC**.
- Les **hépatites virales** sont des maladies caractérisées par une inflammation chronique du foie causée par une infection d'un virus qui peut provoquer l'apparition d'une fibrose et éventuellement conduire au développement de la **cirrhose** et d'un **HCC**.
- La **fibrose** hépatique est caractérisée par un dépôt excessif de matrice extracellulaire, formée de collagène insoluble, appelé fibrogénèse, et médié par les cellules étoilées activées en myofibroblastes. La **cirrhose** correspond à un stade avancé de la fibrose, avec une dégénérescence et nécrose des hépatocytes, marqué par l'apparition de nodules de régénération et la perte des fonctions hépatiques.
- Les **cancers du foie** notamment le **HCC** sont caractérisés par un échappement immunitaire, une prolifération anormale des hépatocytes transformés formant des nodules au niveau du foie et une angiogénèse. Le HCC peut progresser vers la formation de métastases, marquée par l'acquisition d'une plasticité des cellules cancéreuses leur conférant des propriétés de migration et d'invasion.
- Les **cholangiopathies** sont des maladies impliquant les cholangiocytes. La **cholestase** est une maladie associée à un défaut de formation de la bile qui est lié à une incapacité d'excrétion des acides biliaires dans le canalicule biliaire, résultant en des taux élevés d'acides biliaires dans le sérum et dans le foie. De manière chronique, la rétention et l'accumulation des acides biliaires, molécules hydrophobes et toxiques, dans le foie, provoquent des dommages tissulaires, une inflammation et une fibrose au niveau hépatique (Guicciardi and Gores, 2005)

Les VE ont plusieurs rôles dans cette communication entre les différents types cellulaires du foie et participeraient à la mort cellulaire, l'inflammation, la fibrose, l'angiogénèse et le remodelage vasculaire ainsi que la progression tumorale *via* la prolifération et l'invasion de cellules cancéreuses dans les différentes pathologies du foie (**FIGURE 36**) (**TABLEAU 32 ET TABLEAU 33**).

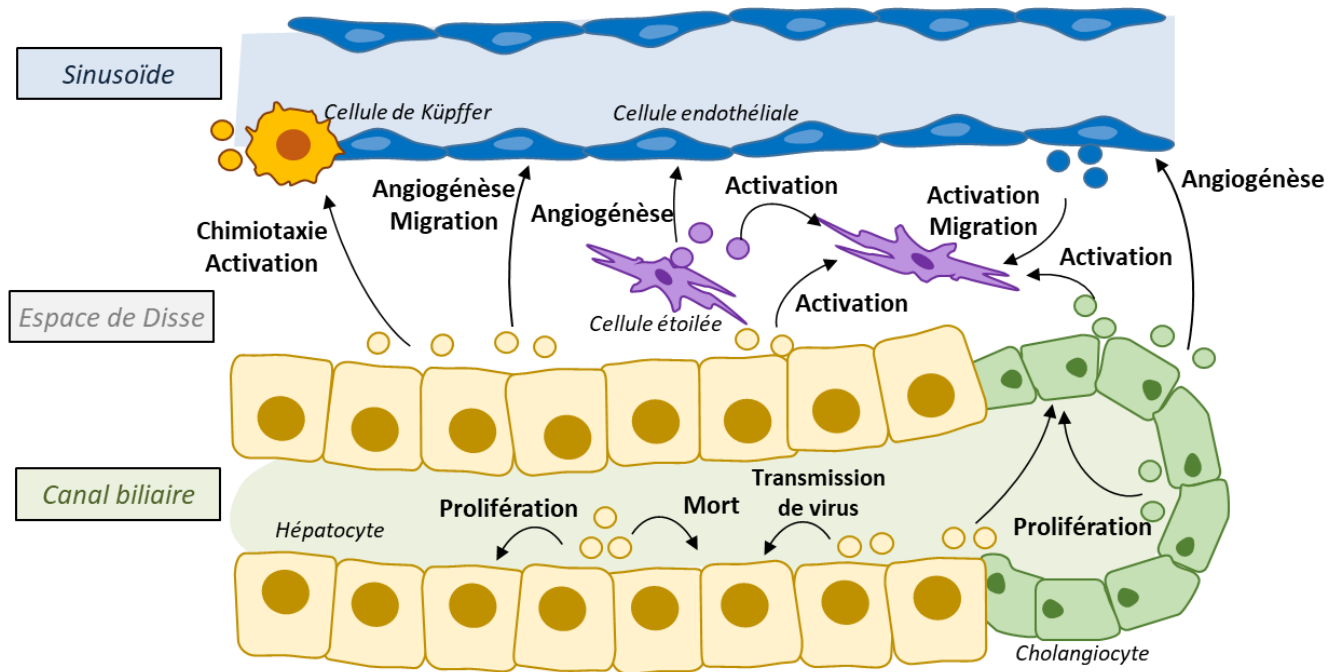


Figure 36 : Les VE dans la communication entre les cellules du foie en conditions pathologiques

a. Mort cellulaire

Les VE pourraient participer à la mort des hépatocytes du foie, événement clé dans les dommages hépatiques aigus liés à des médicaments ou dans la progression des NAFLD et ALD.

Les VE circulantes de souris dans des contextes d'ischémie-reperfusion (Teoh *et al.*, 2014), d'intoxication à l'alcool (Cho *et al.*, 2017b) et d'intoxication au paracétamol (Cho *et al.*, 2018) peuvent induire la mort cellulaire d'hépatocytes *in vitro*. Néanmoins, ces VE circulantes peuvent provenir de cellules de différents organes de l'organisme entier. Les effets observés ne sont donc pas spécifiquement liés à des VE issues de cellules du foie. Ces VE induisent l'augmentation de la production d'ERO dans les hépatocytes suite à l'internalisation des VE (cf II.C.4.a *Stress oxydant en page 101*) mais seulement une étude montre le lien entre cette production et la mort cellulaire (Teoh *et al.*, 2014). Par ailleurs, à l'heure actuelle, aucun mécanisme n'a été mis en évidence expliquant, dans les hépatocytes, l'induction du stress oxydant ou la mort cellulaire par les VE.

b. Inflammation

Les VE ont un rôle important dans l'inflammation du tissu hépatique, dans les cholangiopathies, dans les NAFLD et ALD, dans les hépatites virales, dans les cancers et dans les dommages hépatiques aigus liés aux médicaments (FIGURE 37) (TABLEAU 32 ET TABLEAU 33).

i. Rôle des VE dans la cholestase

Dans des modèles cellulaires de cholangiopathies *in vitro*, les VE issues de **cholangiocytes** activés (Katsumi *et al.*, 2019), exposés à des acides biliaires, (Li *et al.*, 2018b, 2020) ou stimulés par le LPS (Sato *et al.*, 2017) participent à l'activation de macrophages ou de cholangiocytes induisant la sécrétion de cytokines pro inflammatoires.

Les VE issues de sérum de souris Mdr2^{-/-} ou BDL (*bile duct ligation*), modèles *in vivo* de cholestase, favorisent l'inflammation du foie, caractérisée par l'infiltration de cellules immunitaires et l'expression de cytokines comme le TNF α , IL10 et IL1 β , chez des souris présentant déjà une cholestase (Li *et al.*, 2018b; Liu *et al.*, 2019b).

Deux mécanismes peuvent être à l'origine de cette inflammation (FIGURE 37). Les cholangiocytes activés sécrètent des VE contenant un ligand pour le récepteur RAGE (*Receptor for advanced glycation end products*), le **DAMP S100A11** (*Damage-associated molecular patterns*). La stimulation du récepteur RAGE sur les macrophages par ce ligand permet l'activation de la voie NF κ B déclenchant l'expression de gènes pro-inflammatoires des cytokines TNF α , IL1 β ou IL6 (Katsumi *et al.*, 2019). Un autre mécanisme a été décrit par les EXO, libérés par les cholangiocytes exposés à des acides biliaires, contenant un **ARN non codant lncH19** (Li *et al.*, 2018b, 2020). Ce lncH19 favorise la différenciation des monocytes en macrophages, puis leur migration et leur activation, ainsi que l'activation des cellules de Küpffer, grâce à l'augmentation de l'expression de CCL2 dans les monocytes et les cellules de Küpffer et de l'expression d'IL6, IL1 β et CXCL10 dans les macrophages (Li *et al.*, 2020). De plus, la stimulation de cholangiocytes par le LPS induit une augmentation de la libération de VE responsables de la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires de cholangiocytes non stimulés (Sato *et al.*, 2017).

ii. Rôle des VE dans l'ALD

Les VE isolées à partir de sérum de souris ALD (Saha *et al.*, 2018) et les VE issues d'**hépatocytes exposés à l'alcool** (Momen-Heravi *et al.*, 2015a; Verma *et al.*, 2016) sont capables, *in vitro*, de différencier les monocytes en macrophages et d'activer les macrophages et les cellules de Küpffer favorisant ainsi leur sécrétion de protéines pro-inflammatoires comme TNF α , IL1 β , IL6, ou NOS. Ces VE peuvent même stimuler les cellules endothéliales qui peuvent alors libérer des molécules pro-inflammatoires, comme les molécules d'adhésion ICAM1 ou VCAM1 (*Vascular cell adhesion protein 1*) ou la cytokine IL1 β (Jiang *et al.*, 2020).

In vivo, les VE isolées, à partir de sang de souris exposées chroniquement à l'alcool (VE-ALD), et injectées à des souris saines provoquent une augmentation du nombre de neutrophiles dans le sérum (Cai *et al.*, 2017) et de l'inflammation dans le foie (Saha *et al.*, 2018). Ces VE-ALD sont internalisées dans les hépatocytes et dans les cellules de Küpffer. Une fois internalisées, ces VE-ALD déclenchent la sécrétion de la protéine MCP-1 (*Monocyte chemoattractant protein 1*) par les hépatocytes, ce qui entraîne le recrutement de cellules immunitaires dans le foie, une activation des cellules de Küpffer qui sécrètent alors des cytokines pro-inflammatoires comme le TNF α et l'IL12/23.

Un premier mécanisme serait l'activation de récepteurs par des ligands enrichis dans les VE (FIGURE 37). Ainsi, le **CD40L** contenu dans les VE libérées par les hépatocytes, surexprimant le CYP2E1, cytochrome P450 impliqué dans le métabolisme de l'éthanol, permet l'activation des macrophages par interaction avec le récepteur CD40 à leur surface (Verma *et al.*, 2016). Par ailleurs, l'**ADN mitochondrial**, présent dans les VE circulantes probablement d'origine hépatocytaire, permet l'activation du récepteur TLR-9 (*Toll like receptor*) dans les macrophages et les neutrophiles *in vitro et in vivo* (Cai *et al.*, 2017). Cette activation de TLR-9, récepteur présent au niveau des endosomes connu pour activer différentes voies de signalisation aboutissant à une production de cytokines pro-inflammatoires, est donc à l'origine de l'activation de macrophages et l'infiltration de neutrophiles résultant en une inflammation (Cai *et al.*, 2017).

Un second mécanisme serait *via* l'interaction avec des composants de la voie NF κ B favorisant sa translocation dans le noyau et l'expression de gènes cibles (FIGURE 37). La protéine chaperonne **Hsp90** présente dans les VE circulantes, participent à l'activation des macrophages *in vivo et in vitro* dans le foie (Saha *et al.*, 2018) probablement par son interaction avec la kinase IKK β (*I κ B kinase β*) du complexe IKK, maintenant son activité et donc la dégradation de la protéine inhibitrice I κ B, ce qui favorise la libération des sous-unités effectrices de NF κ B (Mandrekar *et al.*, 2008). De la même manière, le **miR-1** contenu dans les VE et internalisé par les cellules endothéliales, provoquent la suppression de l'expression de KLF4 (*Kruppel-like factor 4*), connu pour séquestrer p300, une sous unité interagissant avec les sous-unités effectrices de NF κ B, favorisant alors son activation (Jiang *et al.*, 2020). L'activation du facteur de transcription NF κ B permet alors l'expression de molécules pro-inflammatoires comme les molécules d'adhésion ICAM1 ou VCAM1 et les cytokines TNF α ou IL1 β .

Enfin, un dernier mécanisme serait l'inhibition de processus anti-inflammatoires. Le transfert de **miR-122** des VE vers les monocytes, entraîne la diminution de l'expression de l'hème oxygénase-1 (HO-1), molécule anti-oxydante et anti-inflammatoire, sensibilisant alors les cellules à la stimulation par le LPS et participant à l'augmentation de leur sécrétion de cytokines pro-inflammatoires (Momen-Heravi *et al.*, 2015a).

iii. Rôle des VE dans les NAFLD

Les VE libérées par des **hépatocytes**, traités par des acides gras pour induire une stéatose et modéliser une NAFLD *in vitro*, favorisent également le recrutement de monocytes (Guo *et al.*, 2019), l'activation (Hirsova *et al.*, 2016) et la migration des macrophages (Ibrahim *et al.*, 2016; Kakazu *et al.*, 2016; Liao *et al.*, 2018) (FIGURE 37).

De façon similaire, des VE isolées du sang périphérique de souris HFD (*high fat diet*, régime riche en gras), modèle *in vivo* de NAFLD, et injectées chez des souris saines, participent à l'inflammation du foie de souris saines (Deng *et al.*, 2009). Ces VE sont internalisées par les monocytes, ce qui permet de les activer ; ces derniers s'accumulent alors dans le foie participant à l'inflammation hépatique.

Plusieurs mécanismes sont décrits en fonction du contenu des VE (FIGURE 37). Les VE véhiculant **TRAIL**, entraînent l'expression de cytokines pro-inflammatoires comme IL1 β et IL6 dans les macrophages *via* la signalisation non canonique de TRAIL (Hirsova *et al.*, 2016). L'interaction de TRAIL avec le récepteur DR5 (*Death receptor 5*) présent à la surface des macrophages permet la formation du complexe multi-protéique comprenant FADD (*Fas-associated protein with death domain*), RIPK1 (*Receptor-interacting protein kinase 1*), TRADD (*TNF receptor type 1-associated death domain protein*), cIAP-1, cFLIP_L (*FLICE-like inhibitory protein*), TRAF6 (*TNF receptor associated factor 6*) et IKK β résultant en l'activation de la voie NF κ B et une translocation de la sous unité p65 dans le noyau. Cette translocation de NF κ B est responsable de son contrôle transcriptionnel positif de l'expression de cytokines pro-inflammatoires.

Les **céramides** contenus dans les VE participent à la formation de sphingosine-1-phosphate (SP1) dans les macrophages (Kakazu *et al.*, 2016). La SP1 ainsi produite, en plus de la **SP1** (Liao *et al.*, 2018) et la chimiokine **CXCL-10** (Ibrahim *et al.*, 2016) présentes dans les VE permettent l'activation de leurs récepteurs S1PR1 et CXCR3 respectivement, impliqués dans la signalisation de la chimio-attraction et de la migration des cellules immunitaires.

Enfin, les **intégrines ITG $\alpha_9\beta_1$** (ITG β_1) transportées par les VE favorisent l'adhésion des monocytes aux cellules endothéliales, processus essentiel à leur infiltration dans le foie au cours de l'inflammation (Guo *et al.*, 2019). ITG β_1 est transférée des VE à la membrane des monocytes, soit par fusion membranaire des VE avec la membrane plasmique des monocytes, soit par endocytose et recyclage d'ITG β_1 à la membrane plasmique de ces cellules. L'adhésion des monocytes est obtenue par interaction entre ITG β_1 , à la surface des monocytes et VCAM-1, à la surface des cellules endothéliales (Guo *et al.*, 2019).

iv. Rôle des VE dans les hépatites virales

Les **hépatocytes infectés par le virus** de l'hépatite B (HBV), produisent des VE contenant des acides nucléiques viraux (Kouwaki *et al.*, 2016), à l'origine de la stimulation des voies de

signalisation dépendant du MyD88 (*Myeloid differentiation primary response 88*), ICAM1 et MAVS (*Mitochondrial antiviral signaling protein*). Ces voies de signalisation aboutissent à l'expression des ligands NKG2D dans les macrophages, connus pour permettre la production de l'interféron- γ par les cellules NK.

v. Rôle des VE dans l'HCC

Les VE isolées à partir de la lignée cellulaire de HCC PLC/PRF/5 contiennent plus d'ARN non codant TUC339 (lncTUC339) par rapport à une lignée d'hépatocytes normaux non cancéreux HL-7702. Suite à leur internalisation par des monocytes, les VE transfèrent le lncTUC339 qui participe alors à leur différenciation en macrophages et leur activation (Li *et al.*, 2018a).

vi. Rôle des VE dans les dommages hépatiques aigus

Des **hépatocytes exposés à des médicaments** (amoxicilline, flucloxacilline, isoniazide ou sulfaméthoxazole), modèles de DILI, libèrent des EXO contenant un protéome modifié (Ogese *et al.*, 2019). Ces VE peuvent être internalisées par des cellules dendritiques dérivées de monocytes humains, ce qui provoque l'augmentation du nombre d'antigènes HLA (*Human leukocyte antigen*) à leur membrane favorisant alors l'activation des lymphocytes T (Ogese *et al.*, 2019). En plus, les VE isolées à partir du plasma de souris exposées au paracétamol et injectées dans des souris saines provoquent, *in vivo*, une inflammation du foie, mise en évidence par l'élévation des niveaux intra-hépatiques du TNF α et de l'IL1 β (Cho *et al.*, 2018).

Les VE libérées par des **hépatocytes soumis à un stress thermique** ou isolées à partir du plasma de souris suite à un stress thermique, peuvent induire l'inflammation *in vitro* dans les hépatocytes et *in vivo* dans le foie de souris (Li *et al.*, 2019b). Ces VE sont en fait capables de provoquer une augmentation de la signalisation NOD (*Nucleotide oligomerization domain-containing protein*) via l'expression des protéines NLRP (*NOD-like receptor family, pyrin domain containing*), ASC (*apoptosis-associated speck-like protein containing a CARD*), et l'activation de la caspase-1 et une sécrétion de l'IL1 β , grâce au transfert de leur contenu protéique dans les cellules cibles.

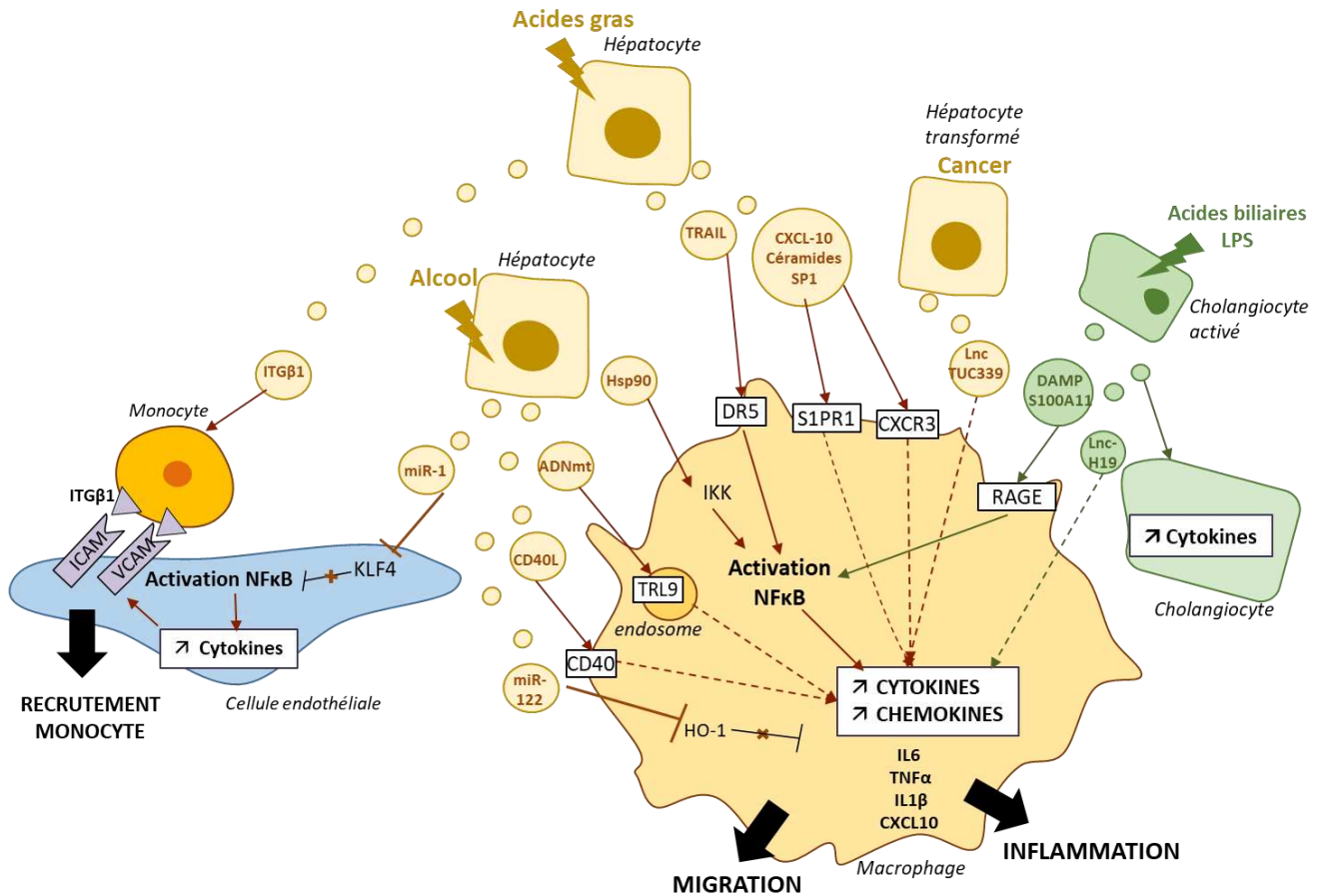


Figure 37 : Mécanismes d'induction de l'inflammation par les VE libérées par les cellules du foie

c. Fibrose

A l'état physiologique, les cellules étoilées sont quiescentes mais lorsque le foie est endommagé, les cellules étoilées sont activées ; elles peuvent proliférer, migrer, et libérer des éléments de la matrice extracellulaire (MEC) devenant alors des myofibroblastes. Ces myofibroblastes participent au dépôt excessif de la MEC à l'origine de la fibrose. La fibrose est associée à la progression de nombreuses maladies du foie, comme les NASH, les hépatites alcooliques, les hépatites virales et les cholestases. Les VE pourraient jouer un rôle dans le développement de la fibrose (FIGURE 38) (TABLEAU 32 ET TABLEAU 33).

i. VE et effet pro-fibrotique

Les VE issues de cellules normales ou cancéreuses, cultivées dans des conditions pathologiques variables, sont capables de provoquer la différenciation des cellules étoilées en myofibroblastes. Parmi ces cellules productrices, se distinguent :

- des **hépatocytes** normaux traités par le CCl₄, pour induire une fibrose (Seo *et al.*, 2016), par l'acide palmitique, pour induire une stéatose (Lee *et al.*, 2017; Povero *et al.*, 2015) ou infectés par le HCV (Devhare *et al.*, 2017; Kapoor *et al.*, 2017) ; des hépatocytes cancéreux issus d'un

hépatocarcinome (Zhou *et al.*, 2018b) ; des **cellules endothéliales** sinusoidales exposées au CCl₄ (Wang *et al.*, 2015b) ; des **cholangiocytes** exposés à des acides biliaires, pour induire une cholestase (Liu *et al.*, 2019b) ; des **cellules étoilées** déjà activées (Charrier *et al.*, 2014; Kostallari *et al.*, 2018).

Cette activation des cellules étoilées est marquée par une augmentation de l'expression de **protéines pro-fibrotiques** comme : l'**αSMA** (*α smooth muscle actin*), un type d'actine conférant une activité contractile élevée aux cellules ; le **collagène 1**, constituant majeur de la MEC ; le **TIMP-1** (*Tissue inhibitor of metalloproteinases 2*), l'inhibiteur de MMP dégradant la MEC ; le **PDGFR** (*Platelet-derived growth factor receptor*), récepteur impliquant dans la régulation positive de différentes voies de signalisation permettant l'expression de TIMP-1 ou de collagène ; et le **TGFβ** (*Transforming growth factor β*), régulateur positif de la voie de signalisation Smad à l'origine de de la transcription de collagène et de αSMA (**FIGURE 38**).

In vivo, l'implication des VE a aussi été démontrée dans la fibrose hépatique (**TABLEAU 32 ET TABLEAU 33**). En effet, des patients ALD et des souris présentant une fibrose, induite par la ligature des canaux biliaires (BDL : *bile duct ligature*), libèrent des VE enrichies en PDGFRα. De plus, des VE issues de cellules étoilées activées en culture, enrichies en PDGFRα et injectées à des souris saines, sont internalisées par les cellules du foie et provoquent l'apparition d'une fibrose hépatique (Kostallari *et al.*, 2018). Par ailleurs, ces VE entraînent une exacerbation de la fibrose hépatique induite par le CCl₄ ou par BDL chez des souris ; elle est caractérisée par une augmentation du dépôt de la MEC et une augmentation de l'expression de protéines pro-fibrotiques, comme PDGFRα, PDGFRβ, collagène 1 et αSMA (Kostallari *et al.*, 2018).

En plus, les VE issues de sérum de souris Mdr2^{-/-} ou BDL, deux modèles rongeurs de cholestase, favorisent, chez des souris présentant déjà une cholestase, l'apparition de la fibrose hépatique marquée par l'activation des cellules étoilées, l'expression de gènes pro-fibrotiques comme αSMA, collagène 1, Acta2, Loxl2 (*Lysyl oxidase like 2*), TGF-β, et la cytokératine 19 et le dépôt de collagène (Li *et al.*, 2018b; Liu *et al.*, 2019b). En revanche, ces VE sont incapables de provoquer la fibrose chez des souris saines (Liu *et al.*, 2019b) indiquant que ces VE ne permettent pas le développement de la fibrose, mais participent à la progression de la fibrose dans les maladies cholestatiques.

ii. Mécanismes d'activation des cellules étoilées par les VE

Plusieurs mécanismes permettent d'expliquer cette activation (**FIGURE 38**). Les VE issues d'hépatocytes endommagés par le CCl₄, contiennent des **ligands du récepteur TLR-3** présent à la surface des cellules étoilées. Ce récepteur, une fois activé, entraîne l'activation des cellules étoilées et la production de cytokines pro-inflammatoires (Seo *et al.*, 2016). Un autre mécanisme ferait intervenir le **transfert de miARN** comme le miR-128-3p (Povero *et al.*, 2015), le miR-192 (Lee *et al.*, 2017), le miR-21 (Zhou *et al.*, 2018b) ou bien le miR-19a (Devhare *et al.*, 2017) qui

favorisent l'expression, par les cellules étoilées, de protéines pro-fibrotiques comme l' α SMA, le TGF β , le Col1 α 1, un type de collagène et le TIMP-1. Le **miR-128-3p** entraîne la suppression de l'expression de PPAR- γ , facteur de transcription impliqué dans le maintien d'un phénotype quiescent (Povero *et al.*, 2015). Le **miR-21** supprime l'expression de PTEN, ce qui active la voie de signalisation PDK1/Akt (*Pyruvate dehydrogenase kinase 1*) dans les cellules étoilées ; cette voie favorisent l'expression de facteurs fibrotiques et la prolifération des cellules, par avancée dans la phase S du cycle cellulaire (Zhou *et al.*, 2018b). Enfin, le **miR-19a** cible l'ARNm de SOCS3 (*Suppressor of cytokine signaling 3*) stimulant ainsi la voie de signalisation STAT-3/TGF β (Devhare *et al.*, 2017). Le **transfert de lncARN** comme le **lncH19**, connu pour cibler le miR-140 qui inhibe la signalisation TGF β (Wang *et al.*, 2019b), permet d'activer l'expression de gènes fibrotiques, le dépôt de matrice extracellulaire ainsi que la prolifération des cellules étoilées (Liu *et al.*, 2019b). Enfin, le **transfert d'ARNm ou de protéines** par les VE pourrait également engendrer l'activation des cellules étoilées. En effet, les EXO libérés par des cellules étoilées activées contiennent des niveaux élevés en ARNm ou protéine **CCN2** (*Cellular communication network factor 2*), protéine matricellaire impliquée dans la régulation positive de la signalisation pro-fibrotique, qui est transférée vers les cellules étoilées quiescentes ou activées (Charrier *et al.*, 2014). Par ailleurs, les cellules endothéliales sinusoidales exposées au CCl₄ produisent des VE enrichies en ARNm et protéines de la **sphingosine kinase-1 SK1** ; SK-1 est délivrée dans les cellules étoilées où elle permet l'activation de la voie AKT par sa phosphorylation et donc l'activation de ces cellules étoilées et leur migration (Wang *et al.*, 2015b).

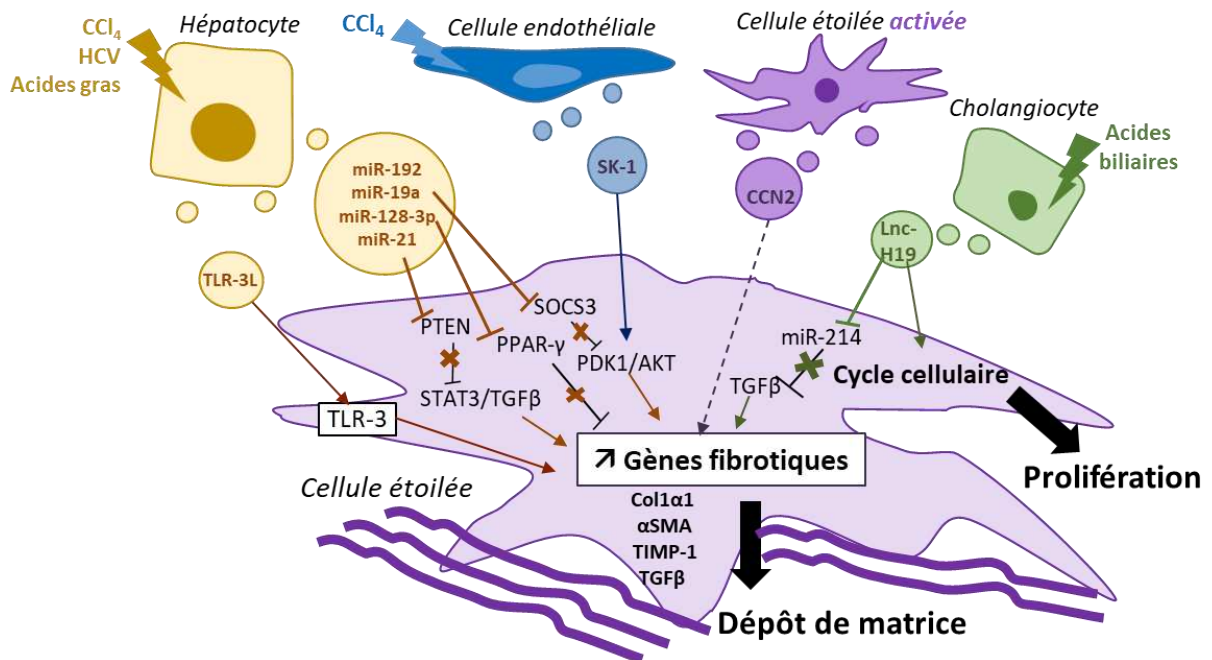


Figure 38 : Mécanismes d'activation des cellules étoilées par les VE libérées par les cellules du foie

d. Remodelage vasculaire et angiogénèse

Le remodelage vasculaire correspond à la modification de la structure et de la fonction artérielle lors de processus physiopathologiques. L'angiogénèse peut participer au remodelage vasculaire et correspond à la formation de nouveaux vaisseaux, à partir d'une vasculature préexistante ; elle est caractérisée par la dégradation de la matrice extracellulaire, la migration et la prolifération des cellules endothéliales et la formation de structures tubulaires. L'angiogénèse permet d'alimenter les nodules hépatiques en nutriments, dans la cirrhose et dans le HCC, et jouerait donc un rôle important dans la progression de la fibrose vers la cirrhose, de la cirrhose vers le HCC et dans le développement de l'HCC (Lemoinne *et al.*, 2015; Povero *et al.*, 2013). Cette angiogénèse peut être régulée par d'autres types cellulaires du foie *via* les VE (FIGURE 39) (TABLEAU 32 ET TABLEAU 33).

Les VE libérées par les **hépatocytes** issus d'un hépatocarcinome (Lin *et al.*, 2018), exposés au TGF- β (Li *et al.*, 2019a), modèles de HCC, ou traités par des acides gras lipotoxiques, modèle de NAFLD (Povero *et al.*, 2013) ; les **cholangiocytes** exposés au PDGF, modèles de fibrose (Witek *et al.*, 2009) ; et les **cellules étoilées** activées, modèles de fibrose (Lemoinne *et al.*, 2015; Witek *et al.*, 2009) ainsi que les VE isolées **de la bile ou du plasma de rat** présentant une fibrose hépatique (Witek *et al.*, 2009), participent à l'activation angiogénique des cellules endothéliales myofibroblastes. Cette activation est notamment marquée par une élévation de l'expression de CD31 (*platelet endothelial cell adhesion molecule*), molécule impliquée dans l'adhésion des cellules endothéliales entre elles et, par conséquent, dans la tubulogénèse, et de l'expression d'iNOS, à l'origine de la production de NO, impliquée dans la signalisation aboutissant à l'expression de gènes de l'angiogénèse, tels que des facteurs de croissance ou des MMP (Witek *et al.*, 2009). Ces VE participent également à l'augmentation de la prolifération, de la migration et de la capacité des cellules endothéliales à former un tube *in vitro* (Lemoinne *et al.*, 2015; Li *et al.*, 2019a; Lin *et al.*, 2018; Povero *et al.*, 2013) et *in vivo* chez des souris (Lin *et al.*, 2018; Povero *et al.*, 2013).

Différents mécanismes sont mis en évidence, en fonction des cargos transportés par les VE (FIGURE 39). Le premier serait **l'activation de récepteurs** à la membrane des cellules endothéliales, par des ligands contenus dans les VE. Ainsi, les VE issues de myofibroblastes et cholangiocytes exposés au PDGF, un facteur important de développement de la fibrose, ou de la bile et du plasma de rat présentant une fibrose hépatique, contiennent des ligands biologiquement actifs de la voie Hedgehog (Hh), *sonic hedgehog* (**Shh**) et *Indian hedgehog* (**Ihh**) (Witek *et al.*, 2009). Shh et Ihh, apportés par les VE, sont capables de se lier au récepteur Ptch1 (*patched 1*) sur les cellules endothéliales, déclenchant la signalisation Hh et l'activation du facteur de transcription Gli permettant l'expression de gènes liées à l'angiogénèse (Witek *et al.*, 2009). En plus, la protéine **VEGF-A** (*Vascular endothelial growth factor*), présente dans les VE issues de myofibroblastes, peut se lier au récepteur VEGFR2 à la surface des cellules endothéliales, permettant sa phosphorylation à l'origine de l'activation de différentes voies de signalisation connues pour être impliquées dans

l'angiogenèse (Lemoine *et al.*, 2015). Un autre mécanisme ferait intervenir le **transfert**, dans les cellules endothéliales, de molécules modulant les voies de signalisation liées à l'angiogenèse. La protéine **LOXL4** (*Lysyl oxidase-like 4*) délivrée par les VE d'hépatocytes issus d'HCC, dans les cellules endothéliales pourrait permettre l'activation de différentes voies de signalisation liées à l'angiogenèse *via* la production d' H_2O_2 (Li *et al.*, 2019a). Enfin, le transfert de **miR-210**, contenu dans les VE de cellules HCC, dans les cellules endothéliales permettent l'inhibition de l'expression de SMAD4 et de STAT6, protéines impliquées dans la régulation négative de la signalisation de l'angiogenèse (Lin *et al.*, 2018)

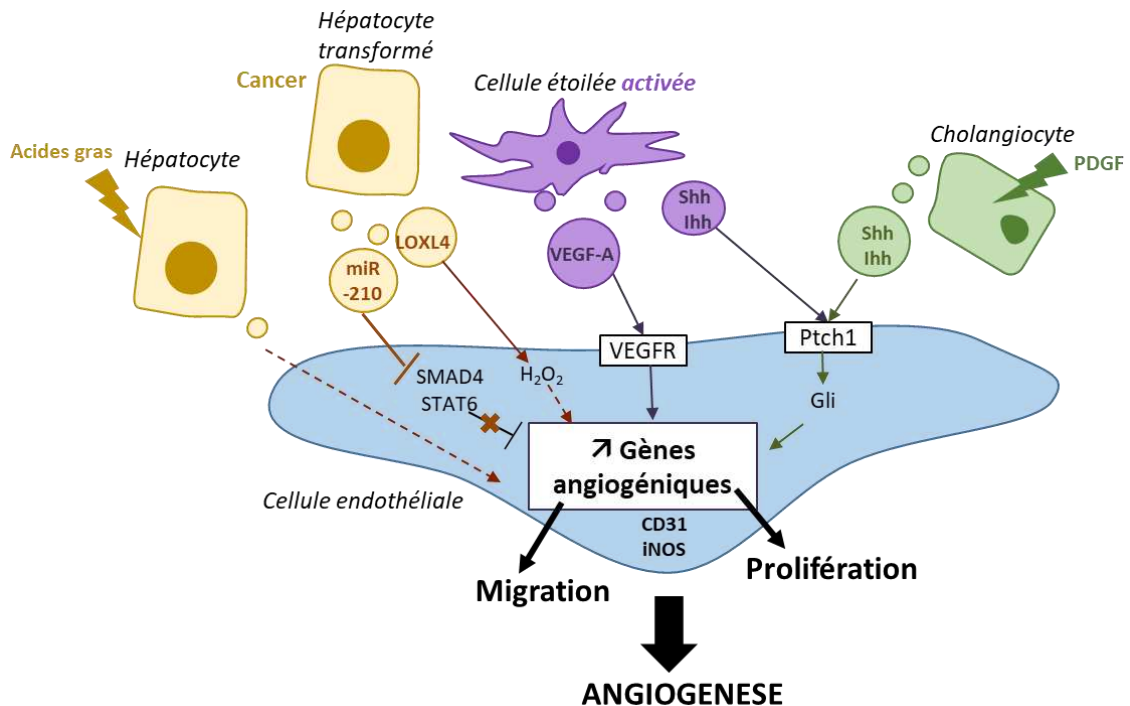


Figure 39 : Implication des VE libérées par les cellules du foie dans l'angiogenèse

e. Prolifération et migration cellulaire

La communication par les VE joue un rôle important dans la progression tumorale, en stimulant la prolifération et dans la formation de métastases, en stimulant l'adhésion et la migration des cellules cancéreuses (FIGURE 40) (TABLEAU 32 ET TABLEAU 33).

Ceci a été démontré dans le cas de l'hépatocarcinome hépatocellulaire (HCC) et le cholangiocarcinome (CCA). Ainsi, les VE libérées par des cellules HCC provoque la prolifération d'autres cellules HCC (Fu *et al.*, 2018; Kogure *et al.*, 2011, 2013; Qu *et al.*, 2017; Seo *et al.*, 2019; Xue *et al.*, 2018) *in vitro* et *in vivo* dans le foie de souris présentant une xénogreffe de cellules HCC (Qu *et al.*, 2017) ainsi que l'acquisition d'un phénotype migratoire (Fu *et al.*, 2018; He *et al.*, 2015; Li *et al.*, 2019a; Xue *et al.*, 2018). Des résultats similaires sont obtenus avec des VE de cellules issues de CCA, causant la migration et l'invasion d'autres cellules CCA (Dutta *et al.*, 2015). Par ailleurs, ces VE sont capables d'interagir avec des cellules souches dans le microenvironnement

permettant leur différenciation en fibroblastes et la sécrétion de cytokines comme l'IL6 favorisant la prolifération d'autres cellules CCA (Haga *et al.*, 2015).

i. Mécanismes de prolifération

Plusieurs mécanismes permettent d'expliquer l'effet des VE sur la prolifération des cellules cancéreuses (FIGURE 40). Un premier mécanisme ferait intervenir le **transfert** de lncARN et de miARN modulant les voies de signalisation liées à la prolifération. Un profil particulier de miARN a été mis en évidence dans les EXO issus de cellules HCC, ainsi **11 miARN dont les miR-584 ou miR-517c** sont exclusivement exprimés dans ces EXO ; une analyse bio-informatique révèle que ces miARN interviendraient dans la régulation négative de la voie de signalisation TAK-1 (*transforming growth factor beta activated kinase-1*), un inhibiteur bien connu de la prolifération dans l'hépatocarcinogénèse (Kogure *et al.*, 2011). Ces miARN provoqueraient la diminution de l'expression de TAK-1 et de TAB-2 (*TAK-1 binding protein 2*) et donc la répression de la signalisation JNK en aval, dans les cellules HCC, à l'origine de la prolifération. En plus, le **miR-665** présent dans les EXO HCC permet l'activation de la voie MAPK/ERK, à l'origine de l'expression de l'EGFR et de la prolifération des cellules HCC (Qu *et al.*, 2017), probablement en réprimant l'expression de SRCIN1 (*Src kinase signaling inhibitor 1*), inhibiteur de la Src kinase impliquée dans la voie MAPK/ERK (Zhou *et al.*, 2020). Le **miR-93** transféré des VE vers les cellules HCC permet la répression de l'expression : de l'inhibiteur de kinases CDK (*Cyclin-dependent kinase*), CDKN1A (*Cyclin Dependent Kinase Inhibitor 1A*) ; et de la protéine de stress impliquée dans l'initiation de l'apoptose TP53INP1 (*Tumor Protein P53 Inducible Nuclear Protein 1*) (Xue *et al.*, 2018). Ceci favoriserait la prolifération ainsi que l'invasion des cellules cancéreuses (Xue *et al.*, 2018). Enfin le transfert de l'ARN non codant **lncTUC339** participerait à la prolifération des cellules HCC mais aucune cible moléculaire, pour cette lncARN, n'a encore été explicitée (Kogure *et al.*, 2013).

Un autre mécanisme serait la **génération d'ERO** dans les cellules HCC favorisant l'activation d'oncogènes. Ainsi, l'**ADN oxydé** transporté dans les VE sécrétées par des hépatocytes avec une déficience en Aldh2 (*aldehyde Dehydrogenase 2*) provoquent en partie l'augmentation de la production d'ERO (Seo *et al.*, 2019). Celle-ci provoque l'activation des protéines pP38, pSTAT-3 et pJNK ainsi que l'expression du co-activateur de facteur de transcription TAZ (*transcriptional coactivator with PDZ-binding motif*), du facteur de croissance CTGF (*connective tissue growth factor*), et de la protéine anti-apoptotique Bcl-2, à l'origine de la prolifération des cellules HCC (Seo *et al.*, 2019).

ii. Mécanismes de migration

Plusieurs mécanismes sont mis en jeu dans l'induction de la migration des cellules HCC par les VE (FIGURE 40). Un premier mécanisme serait le **transfert** d'acides nucléiques et protéines à l'origine de l'expression ou l'activité de protéines impliquées dans la dégradation de la MEC ou la formation de points d'adhésion, facilitant la motilité des cellules cancéreuses. Ainsi, le **miR-93**

permet la répression de l'expression de TIMP-2, inhibiteur des MMP-2 (Xue *et al.*, 2018) et un ensemble d'ARNm et de protéines activent les voies de signalisation MAPK et Akt stimulant la production des MMP-2 et MMP-9 (He *et al.*, 2015). De plus, les VE HCC renferment des ARNm et des protéines **SMAD-3** activant la voie de signalisation SMAD dans les cellules HCC (Fu *et al.*, 2018) à l'origine de la production d'ERO suite à l'expression de la NADPH oxydase. Les ERO sont connus pour favoriser l'augmentation de la formation de point focaux d'adhésion (Goitre *et al.*, 2012) et permettent donc l'acquisition du phénotype migratoire des cellules HCC (Fu *et al.*, 2018). Enfin, le transfert de l'enzyme **LOXL4** peut provoquer la production de H₂O₂ dans les cellules HCC activant alors la voie de signalisation FAK/Src (*Focal Adhesion Kinase*) à l'origine de l'expression de gènes impliqués dans l'adhésion et la migration (Li *et al.*, 2019a).

Un autre mécanisme serait l'augmentation de la **perméabilité** de la barrière endothéliale par les VE (Fang *et al.*, 2018a). Ainsi, le miR-103, chargé dans les VE HCC, est transféré dans les cellules endothéliales où il réprime l'expression de protéines de jonctions comme la VE-Cadherine, la p120-caténine (p120) et la zonula occludens 1 (ZO-1). La perméabilisation de la barrière endothéliale facilite la migration et l'invasion des cellules HCC (Fang *et al.*, 2018a).

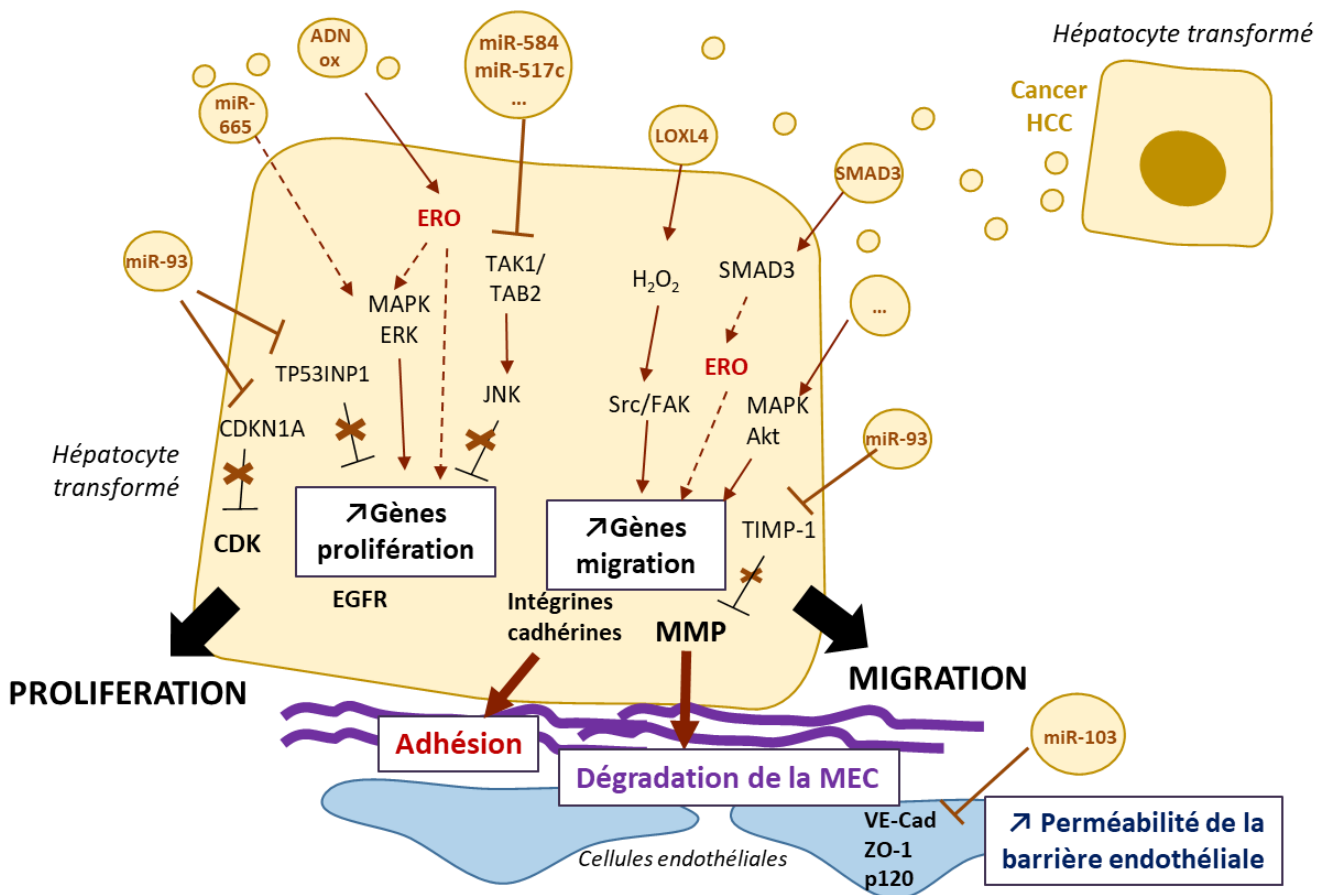


Figure 40 : Implication des VE dans la progression tumorale de l'HCC

f. Modifications métaboliques

Les VE issues de cellules de foie peuvent participer à d'autres effets délétères comme la modulation du métabolisme des acides biliaires, impliquée dans le développement de la cholestase ou celle du métabolisme énergétique, impliquée dans la fibrose hépatique.

Les cholangiocytes exposés à l'acide taurocholique, acide biliaire, pour induire une cholestase, libèrent des EXO contenant l'ARN non codant lncH29. Dans les hépatocytes cibles, le lncH19 supprime l'expression de la protéine SHP (*Small heterodimer partner*) normalement impliquée dans le rétrocontrôle négatif de la synthèse des acides biliaires (Li *et al.*, 2018b). *In vivo*, les VE isolées à partir du sérum de souris présentant une cholestase, entraînent la rétention d'acides biliaires dans le foie et une augmentation de leur niveaux dans le sérum chez la souris (Li *et al.*, 2018b). Ceci provoque une accumulation d'acides biliaires toxiques, à l'origine des dommages tissulaires cholestatiques.

Les EXO provenant de cellules étoilées actives contiennent la protéine de transport du glucose GLUT-1 (*Glucose transporter 1*) et la kinase PKM2 (*Pyruvate kinase M2*), qui sont transférées dans les cellules étoilées quiescentes, les cellules endothéliales sinusoidales et les cellules de Küpffer induisant une augmentation de la glycolyse. (Wan *et al.*, 2019) Ce switch du métabolisme énergétique vers la glycolyse pourrait participer à la progression de la fibrose hépatique, mais le mécanisme n'a pas été explicité (Wan *et al.*, 2019).

Tableau 32 : Fonctions des VE dans les pathologies du foie d'après des études *in vitro*

Modèle	Source de VE	Cellules réceptrices	Effet	Cargo VE impliqué	Références
NAFLD	Hépatocytes	HSC	Activation	miR-128-3p, miR-192	(Lee <i>et al.</i> , 2017; Povero <i>et al.</i> , 2015)
		Macrophage	Migration	CXCL-10, SP1, céramides	(Ibrahim <i>et al.</i> , 2016; Kakazu <i>et al.</i> , 2016; Liao <i>et al.</i> , 2018)
			Activation	TRAIL	(Hirsova <i>et al.</i> , 2016)
		Monocyte	Adhésion	ITGβ1	(Guo <i>et al.</i> , 2019)
		Cellules endothéliales	Inflammation	miR-1	(Jiang <i>et al.</i> , 2020)
Angiogenèse	-		(Povero <i>et al.</i> , 2013)		
ALD	Hépatocytes	Macrophages	Activation Adhésion	CD40L	(Verma <i>et al.</i> , 2016)
		Monocytes	Activation	miR-122	(Momen-Heravi <i>et al.</i> , 2015a)
	Sérum souris ALD	Macrophages	Activation	Hsp90	(Saha <i>et al.</i> , 2018)
		Hépatocytes	Mort cellulaire	-	(Cho <i>et al.</i> , 2017a)
Fibrose	HSC activées	HSC	Activation	CCN2, PDGFRα	(Charrier <i>et al.</i> , 2014; Kostallari <i>et al.</i> , 2018)
		HSC	Glycolyse	GLUT-1, PKM2	(Wan <i>et al.</i> , 2019)
	Cellules endothéliales	HSC	Activation Migration	SK-1	(Wang <i>et al.</i> , 2015b)
	Hépatocytes	HSC	Activation	Ligands TLR-3	(Seo <i>et al.</i> , 2016)
Cirrhose	Myofibroblastes	Cellules endothéliales	Angiogenèse	VEGF	(Lemoine <i>et al.</i> , 2015)
	HSC activées Cholangiocytes	Cellules endothéliales	Activation	Shh, Ihh	(Witek <i>et al.</i> , 2009)
Cholangiopathies	Cholangiocytes	Hépatocytes	Modulation du métabolisme des acides biliaires	lncH19	(Li <i>et al.</i> , 2018b)
		HSC	Activation	lncH19	(Liu <i>et al.</i> , 2019b)
		Macrophages	Activation Migration	DAMPS100A11, lncH19	(Katsumi <i>et al.</i> , 2019; Li <i>et al.</i> , 2020)
		Cholangiocytes	Inflammation Prolifération	-	(Sato <i>et al.</i> , 2017)
Hépatites virales	Lymphocytes T	HSC	Activation	-	(Kornek <i>et al.</i> , 2011)
	Hépatocytes	HSC	Activation	miR-19a	(Devhare <i>et al.</i> , 2017; Kapoor <i>et al.</i> , 2017)
		Hépatocytes	Transmission du HCV	ARN, protéines, particules virales	(Bukong <i>et al.</i> , 2014; Ramakrishnaiah <i>et al.</i> , 2013)
Cancer du foie	Hépatocytes HCC	HSC	Activation	miR-21	(Zhou <i>et al.</i> , 2018b)
		Hépatocytes HCC	Prolifération	miR-584, miR-517c, miR-665, miR-93, lncTUC339, ADN ox	(Fu <i>et al.</i> , 2018; Kogure <i>et al.</i> , 2011, 2013; Qu <i>et al.</i> , 2017; Seo <i>et al.</i> , 2019; Xue <i>et al.</i> , 2018)
			Migration	SMAD3, LOXL4, miR-93	(Fu <i>et al.</i> , 2018; He <i>et al.</i> , 2015; Li <i>et al.</i> , 2019a; Xue <i>et al.</i> , 2018)
		Cellules endothéliales	Augmentation de la perméabilité Angiogenèse	miR-103 LOXL4, miR-210	(Fang <i>et al.</i> , 2018a) (Li <i>et al.</i> , 2019a; Lin <i>et al.</i> , 2018)

		Macrophages	Activation	IncTUC339	(Li <i>et al.</i> , 2018a)
	Cholangiocytes	Cholangiocytes	Prolifération		(Haga <i>et al.</i> , 2015)
	CCA	CCA	Adhésion/migration		(Dutta <i>et al.</i> , 2015)
Dommages aigus	Hépatocytes	Sérum humain	Dysfonctionnement endothélial	Arginase-1	(Royo <i>et al.</i> , 2017)
	Plasma souris APAP	Hépatocytes	Mort cellulaire	-	(Cho <i>et al.</i> , 2018)
	Hépatocytes	Monocytes	Activation	Protéines	(Ogese <i>et al.</i> , 2019)
	Hépatocytes	Hépatocytes	Inflammation	-	(Li <i>et al.</i> , 2019b)

HSC : *hepatic stellate cells* = cellules étoilées du foie

Tableau 33 : Fonctions des VE dans les pathologies du foie d'après des études *in vivo*

Maladies	Source des VE	Exposition	Organisme receveur	Effet dans le foie	Référence
<i>Atteintes hépatiques chroniques</i>					
NASH	Hépatocytes en conditions lipotoxiques	s.c n.p VE 14 j	Souris saines	Angiogenèse	(Povero <i>et al.</i> , 2013)
NAFLD	Sang souris HFD	i.v 2 x 50 µg VE/semaine 4 semaines	Souris saines	Dommages hépatiques Inflammation	(Deng <i>et al.</i> , 2009)
ALD	Plasma souris ALD 2-/- exposées à l'éthanol	i.v 100 µg VE 3 h	Souris saines	Inflammation	(Saha <i>et al.</i> , 2018)
	Sérum souris exposées à l'éthanol	i.v 4.10 ¹² VE 6 h	Souris saines	Neutrophilie	(Cai <i>et al.</i> , 2017)
Fibrose	Cellules étoilées surexprimant PDGFRα	i.p 2.10 ⁹ VE /j 4 semaines	Souris saines Souris CCl4	Fibrose	(Kostallari <i>et al.</i> , 2018)
HCC	Cellules HCC QGY-miR-210	s.c 9.5 µg VE 10 j	Souris saines	Angiogenèse	(Lin <i>et al.</i> , 2018)
	Cellules HCC	s.c 100 µg VE Durée n.p	Souris xénotgreffe HCC 15j	Prolifération	(Qu <i>et al.</i> , 2017)
Cholestase	Sérum souris Mdr2-/- 100j	i.v 2 x n.p VE 7 j	Souris Mdr2-/- 50j	Dommages hépatiques Rétention d'acide biliaire Inflammation Fibrose	(Li <i>et al.</i> , 2018b)
	Sérum souris BDL Cholangiocytes surexprimant H19	i.v 2 x 1.10 ⁹ VE 7 j	Souris BDLKOH19 ou Mdr2-/-H19-/-	Fibrose Inflammation	(Liu <i>et al.</i> , 2019a)
<i>Atteintes hépatiques aiguës</i>					
Dommages	Plasma souris exposées au paracétamol	i.v n.p VE 4 h	Souris saines	Mort cellulaire Inflammation	(Cho <i>et al.</i> , 2018)
	Hépatocytes Souris exposées à un stress thermique à 43°C	i.v 40 µg EV 8h	Souris saines	Inflammation Dommages hépatiques	(Li <i>et al.</i> , 2019b)

injection i.v : intraveineuse, s.c : sous cutanée, i.p : intrapéritonéale ; quantité ou durée n.p : non précisée

C. Vésicules extracellulaires et contaminants de l'environnement

Le foie est exposé à la toxicité de nombreux contaminants de l'environnement quelle que soit la voie d'exposition (orale ou respiratoire) (Arciello *et al.*, 2013). Les VE ont bien été discutées comme de potentiels acteurs de la communication délétère dans les pathologies hépatiques. Aussi, il reste à savoir si les VE pourraient participer à la toxicité des contaminants de l'environnement notamment dans le foie et donc être des biomarqueurs d'exposition voire d'effets.

1. Pollution atmosphérique

La pollution atmosphérique est un mélange complexe de différents composés comprenant des particules fines en suspension (notées PM pour *particule matter*), de l'ozone, des oxydes de soufre et d'azote, du monoxyde de carbone et du plomb (Kurt *et al.*, 2016). L'exposition à la pollution atmosphérique est un problème de santé majeur à travers le monde et serait à l'origine de plus de 3 millions de morts chaque année. La pollution de l'air serait responsable du développement et/ou de la progression de différentes maladies cardiopulmonaires comme l'asthme, la bronchopneumopathie chronique obstructive (BPCO), le cancer des poumons ou encore des infections au niveau respiratoire (Kurt *et al.*, 2016; Lim *et al.*, 2012).

a. Particules de la pollution atmosphérique

Parmi les composés de la pollution atmosphérique, les plus étudiés dans le domaine des VE sont les PM. Les PM sont de nature hétérogène et affectent la santé humaine de façon différentielle en fonction de leur taille. Les particules avec un diamètre inférieur à 10 μm (PM10) sont capables d'atteindre les bronches, tandis que les particules avec un diamètre inférieur à 2,5 μm (PM2,5) sont capables de pénétrer de façon plus profonde dans les poumons, jusque dans les régions alvéolaires pour finalement être absorbées, dans la circulation sanguine *via* les capillaires ; ainsi les PM provoquent aussi bien des effets au niveau pulmonaire qu'au niveau systémique (Fiordelisi *et al.*, 2017). L'exposition aux PM déclenche un stress oxydant et une inflammation, qui sont à l'origine des effets néfastes mis en évidence dans l'organisme (Bourdrel *et al.*, 2017).

i. Libération et modification du contenu des VE

L'exposition à des PM de fibroblastes et de cellules épithéliales (Stassen *et al.*, 2019), de cellules mononuclées du sang (Neri *et al.*, 2016) ou de monocytes (Martin *et al.*, 2019) provoque une **augmentation de la libération de VE** dans le milieu extracellulaire. *In vivo*, une exposition à des PM chez l'Homme est associée à une augmentation de la quantité de VE dans le plasma ou sérum de travailleurs de l'acier exposés professionnellement (Bollati *et al.*, 2015; Pavanello *et al.*, 2016), de personnes obèses (Bonzini *et al.*, 2017; Pergoli *et al.*, 2017; Rodosthenous *et al.*, 2018) et de personnes âgées (Rodosthenous *et al.*, 2015).

Les VE libérées en réponse à l'exposition aux PM présentent une **modification de leur contenu protéique et en miRNA**. Ainsi, dans les VE issues de cellules endothéliales ou épithéliales pulmonaires, les taux de de thromboplastine cellulaire (**TF**) (Neri *et al.*, 2016) ou de la protéine **CCN1** (Moon *et al.*, 2014) et du **miR-128** (Bollati *et al.*, 2015) sont augmentés. L'augmentation de ce miR-218 en plus du **miR-302c** est également détectée dans les VE isolées de sérum de travailleurs sains exposés professionnellement (Bollati *et al.*, 2015) ; ces deux miARN seraient associés à l'inflammation, la coagulation et le développement de l'athérosclérose (Bollati *et al.*, 2015). En plus, dans les VE isolées du plasma de ces mêmes individus, une élévation de l'expression de 17 miARN, associés à la biosynthèse de l'insuline, l'inflammation et la coagulation, est identifiée (Pavanello *et al.*, 2016). Enfin, l'exposition aux PM_{2,5} est corrélée à l'augmentation de miARN : associés au stress oxydant et à l'inflammation, dans les VE isolées du sérum de personnes âgées (Rodosthenous *et al.*, 2015); associés au développement de maladies cardiovasculaires dans les VE isolées du sérum de sujets obèses.

La modification des cargos des VE circulantes ou issues de cellules endothéliales et épithéliales pulmonaires, et l'implication potentielle de ces cargos dans des mécanismes d'inflammation, de coagulation ou de stress oxydant, montre que ces VE pourraient participer au développement de pathologies bien connues pour être induites par les PM. Les VE pourraient donc se révéler être de bons biomarqueurs d'exposition mais aussi de risque de pathologies associées aux PM.

ii. Effets des VE

A notre connaissance, une seule étude rapporte des changements au niveau du phénotype de cellules réceptrices, après exposition à ces VE. Ainsi, les VE, isolées des macrophages THP-1 exposés aux PM_{2,5}, sont capables d'induire un phénotype pro-inflammatoire des cellules épithéliales bronchiques BEAS-2B (Martin *et al.*, 2019).

b. Ozone

Une seule étude montre l'implication de VE dans la toxicité induite par un autre constituant de la pollution atmosphérique, l'ozone. Les VE isolées, après lavage broncho-alvéolaire, de souris exposées à l'ozone, proviennent principalement des cellules épithéliales et contiennent des niveaux plus importants en miARN comme les miR-17, miR-92a, et miR-199a, associés à l'inflammation. Ces VE sont internalisées par des macrophages alvéolaires et conduisent *in vivo* à une inflammation dans les poumons de souris saines (Andres *et al.*, 2020).

2. Fumée de cigarette

La fumée de cigarette contient près de 4000 composés chimiques différents extrêmement réactifs tels que des composés carbonylés, des quinones, des nitrosamines ou encore des espèces réactives de l'oxygène (Colombo *et al.*, 2014a). Elle contient également de nombreux hydrocarbures, parmi lesquels on retrouve certains HAP. La fumée de cigarette serait responsable

de plus de 6 millions de mort chaque année dans le monde (OMS 2017) (Lim *et al.*, 2012). De surcroît, elle serait impliquée dans la mort de près de 600 000 non-fumeurs par an (fumeurs passifs) (Lim *et al.*, 2012). L'exposition à la fumée de cigarette de manière similaire à la pollution atmosphérique, provoque le développement ou la progression de pathologies pulmonaires telles que l'asthme, la BPCO, le cancer des poumons (Strzelak *et al.*, 2018) ou des pathologies cardiovasculaires (DiGiacomo *et al.*, 2018), et peut même participer à certaines maladies du foie comme les NAFLD et le cancer. L'exposition à la fumée de cigarette peut entraîner un stress oxydant et une inflammation (Colombo *et al.*, 2014a; DiGiacomo *et al.*, 2018; Strzelak *et al.*, 2018). Les principales cibles cellulaires de la fumée de cigarette sont les cellules épithéliales et les macrophages des voies respiratoires et de façon secondaire, les cellules endothéliales et les cellules du foie.

a. Libération et modification du contenu des VE

In vitro, suite à une exposition à la fumée de cigarette, les cellules épithéliales bronchiques (Benedikter *et al.*, 2017, 2019; Fujita *et al.*, 2015; Serban *et al.*, 2016; Stassen *et al.*, 2019), les macrophages (Cordazzo *et al.*, 2014; Li *et al.*, 2013) et les cellules endothéliales (Zhu *et al.*, 2019) libèrent une quantité plus importante de VE, par rapport à des cellules non exposées (TABLEAU 34). *In vivo*, une exposition à la fumée de cigarette provoque l'augmentation de la quantité de VE dans le plasma de souris (Serban *et al.*, 2016). Chez l'Homme, la fumée de cigarette provoque une élévation de la quantité de VE produites, que ce soit chez les individus sains (Mobarrez *et al.*, 2014), ou chez les malades atteints par le VIH (Kodidela *et al.*, 2018), de BPCO (Serban *et al.*, 2016; Sundar *et al.*, 2019) par rapport aux individus sains (TABLEAU 34).

La modification du contenu (miARN, protéines, lipides) de ces VE suite à l'exposition à la fumée de cigarette, aussi bien *in vitro* qu'*in vivo* (TABLEAU 34), permettrait d'envisager les VE comme potentiels biomarqueurs d'exposition, d'effet mais aussi de risque du développement de certaines maladies associées à la fumée de cigarette comme la BPCO (Feller *et al.*, 2018; Serban *et al.*, 2016; Xu *et al.*, 2018) ou les maladies cardiovasculaires (Badrnya *et al.*, 2014).

Tableau 34 : Libération et modification du contenu des VE suite à une exposition à la fumée de cigarette

	Sources de VE	Types de VE	Cargo VE	Fonction associée au cargo	Référence
<i>In vitro</i>	Cellules épithéliales bronchiques	EXO	↗ CCN1	Inflammation	(Moon <i>et al.</i> , 2014)
	Macrophages	MV	↗ HMGB1		(Chen <i>et al.</i> , 2016)
		↗ MV	↗ MMP14		(Li <i>et al.</i> , 2013)
	Cellules épithéliales amniotiques	EXO	↗ hsp70 ↗ p38MAPK Modification du protéome	(Sheller <i>et al.</i> , 2016)	
	Cellules endothéliales pulmonaires Cellules épithéliales pulmonaires	↗ MV	↗ miR126/125/22/191/ let7d ↗ Céramides C16: C18:0 C24:1	Inflammation Fibrose Angiogenèse	(Serban <i>et al.</i> , 2016)

	Cellules épithéliales bronchiques	↗ VE ↗ miR-210	Fibrose	(Fujita <i>et al.</i> , 2015)
		EXO ↗ miR-21		(Xu <i>et al.</i> , 2018)
	Macrophages	↗ MV ↗ thromboplastine cellulaire	Coagulation	(Li <i>et al.</i> , 2010)
	Cellules mononuclées humaines	↗ MV ↗ thromboplastine cellulaire		(Cordazzo <i>et al.</i> , 2014)
	Cellules épithéliales bronchiques	↗ EXO ↗ VE ↗ thromboplastine cellulaire		(Benedikter <i>et al.</i> , 2017, 2019)
	Cellules endothéliales	↗ VE ↗ spermine	Hypertension pulmonaire	(Zhu <i>et al.</i> , 2019)
Cellules épithéliales bronchiques Fibroblastes pulmonaires	↗ VE -	-	(Stassen <i>et al.</i> , 2019)	
In vivo	Plasma souris Plasma patients BPCO & fumeurs	↗ MV ↗ miR126/125/22/191, let7d ↗ Céramides C16: C18:0 C24:1	Inflammation Fibrose Angiogenèse	(Serban <i>et al.</i> , 2016)
	Lavage broncho-alvéolaire de fumeurs	VE ↘ miR26b, let7e, let7g	Cancérogenèse	(Héliot <i>et al.</i> , 2017)
	Sérum fumeurs	↗ EXO Modification du protéome	Coagulation Réponse immune	(Sundar <i>et al.</i> , 2019)
	Sérum patients BPCO fumeurs	VE ↗ Wnt5a, ↗ IL 8/1β/6/10/12p70, TNFα	Inflammation	(Feller <i>et al.</i> , 2018)
		EXO ↗ miR-21	Fibrose	(Xu <i>et al.</i> , 2018)
	Plasma sujets sains	MV ↗ miR29b ↘ miR-223		(Badrnya <i>et al.</i> , 2014)
			↗ MV -	-
	Plasma patients VIH fumeurs	↗ EXO -	-	(Kodidela <i>et al.</i> , 2018)

b. Effets des VE

i. Inflammation

In vitro, les VE libérées par les cellules pulmonaires exposées à la fumée de cigarette sont capables d'inhiber l'efférocytose des macrophages (Serban *et al.*, 2016) et de déclencher une réponse inflammatoire dans d'autres cellules pulmonaires. En effet, les VE libérées par des cellules épithéliales bronchiques ou des cellules mononuclées humaines provoquent une augmentation de la sécrétion de la cytokine pro-inflammatoire IL8, par d'autres cellules épithéliales bronchiques (Moon *et al.*, 2014), ainsi que celle de la chimiokine MCP-1 et de la protéine d'adhésion des protéines ICAM1, par les cellules épithéliales alvéolaires (Cordazzo *et al.*, 2014). Les VE issues de lavage broncho-alvéolaire de fumeurs entraînent également, dans les cellules épithéliales bronchiques, une augmentation de l'expression de l'IL6 et l'IL8 (Héliot *et al.*, 2017). En outre, *in vivo*, l'administration de VE provenant de cellules épithéliales alvéolaires traitées par la fumée de cigarette, provoque une inflammation pulmonaire, mais aussi systémique chez la souris, avec une inflammation du foie et de la rate (Feller *et al.*, 2018). Les VE pourraient alors participer à l'inflammation induite par la fumée de cigarette à l'origine du développement de pathologies comme l'emphysème pulmonaire ou la BPCO, ou de maladies du foie telles que les NAFLD.

ii. Cancérogenèse

Les VE isolées de lavage broncho-alvéolaire de fumeurs induisent, aussi, dans les cellules épithéliales, une diminution de l'expression de la protéine PTEN, suppresseur de tumeur, et de la protéine Nrf2, régulateur de la réponse anti-oxydante et de la réponse au stress cellulaire (Héliot *et al.*, 2017). Ces VE pourraient donc être associées à un risque de développement de tumeurs, d'autant plus, qu'elles provoquent l'augmentation de la production de la protéine CYFRA21-1 (fragment de la cytokératine 19), facteur de pronostic déterminant dans le cancer des poumons (Héliot *et al.*, 2017).

iii. Coagulation

Certaines VE issues de l'exposition à la fumée de cigarette de macrophages, de cellules mononuclées ou de cellules épithéliales bronchiques, possèdent également des activités de coagulation, grâce à la présence de thromboplastine cellulaire sur leur membrane et induisent la coagulation du plasma humain *ex vivo* (Benedikter *et al.*, 2019; Cordazzo *et al.*, 2014; Li *et al.*, 2010).

iv. Hypertension pulmonaire

Les VE libérées par les cellules endothéliales, suite à un traitement à la fumée de cigarette, possèdent une protéine de surface, la spermine, permettant l'activation de récepteurs senseurs de calcium, dans les cellules musculaires lisses isolées de l'artère du poumon de rat (Zhu *et al.*, 2019). Ceci entraîne une élévation de la concentration en calcium cytosolique favorisant la constriction et la prolifération de ces cellules (Zhu *et al.*, 2019). Ces effets observés *in vitro* pourraient être responsables de l'hypertension pulmonaire mesurée *in vivo* chez le rat après administration de ces mêmes VE (Zhu *et al.*, 2019).

v. Fibrose

De plus, les VE issues de cellules épithéliales bronchiques traitées par la fumée de cigarette provoquent la différenciation de fibroblastes pulmonaires en myofibroblastes, par le transfert du miR-21 (Xu *et al.*, 2018) et du miR-210 (Fujita *et al.*, 2015). D'une part, le miR-21, dérivé des VE, permet la régulation négative de la protéine *von Hippel-Lindau* des fibroblastes, ce qui augmente l'expression du facteur de transcription HIF-1 α (*Hypoxia-inducible factor 1 α*). Celui-ci est impliqué dans la régulation transcriptionnelle de α SMA participant à l'activation des myofibroblastes (Xu *et al.*, 2018). D'autre part, le miR-210 permet la régulation négative de la protéine ATG7 (*Autophagy related 7*) qui participe à la cascade d'activation déclenchant l'autophagie. Cette inhibition de l'autophagie est un mécanisme permettant la différenciation des fibroblastes en myofibroblastes (Fujita *et al.*, 2015). Ces myofibroblastes sont à l'origine d'une production en excès de MEC. Ainsi, les VE pourraient participer au développement de la fibrose dans des pathologies liées à la fumée de cigarette.

3. Métaux

Certains métaux, provenant de l'activité anthropogénique, sont considérés comme des polluants majeurs de l'environnement à travers le monde. L'exposition de manière chronique, par l'alimentation, l'air ou l'eau contaminée, à des métaux peut provoquer l'apparition de différentes pathologies : le manganèse est décrit pour favoriser le développement de maladies neurodégénératives comme la maladie de Parkinson ; l'arsenic participe au développement de différents cancers notamment de la peau, des poumons ou de la vessie et de la fibrose hépatique ; le mercure peut intervenir dans les désordres neurologiques, les maladies immunes, les atteintes rénales ou encore les maladies cardiovasculaires.

a. Arsenic

L'exposition à l'arsenic de cellules épithéliales de la prostate (Ngalame *et al.*, 2018), de cellules épithéliales des bronches (Xu *et al.*, 2015) et de cellules endothéliales (Zhou *et al.*, 2011) provoque une libération plus importante de VE et modifie également leur contenu (TABLEAU 35). L'arsenic entraîne notamment une modification du contenu des VE libérées par des hépatocytes *in vitro* et des VE circulantes isolées de sérum de sujets humains (Dai *et al.*, 2019). Ces VE présentent des taux plus élevés en MALAT1 (*Metastasis associated lung adenocarcinoma transcript 1*), protéine qui est connue pour être impliquée dans le développement de la fibrose hépatique.

Tableau 35 : Libération et modification du contenu des VE suite à une exposition à l'arsenic

	Sources de VE	Type de VE	Cargo VE	Fonction associée au cargo	Référence
<i>In vitro</i>	Cellules épithéliales bronchiques	↗ EXO	↗ miR-21	Fibrose Cancérogenèse	(Xu <i>et al.</i> , 2015)
	Cellules épithéliales de la prostate	↗ EXO	↗ ARNm et protéines KRAS, NRAS, VEGFA, MYB, EGFR, COX-2, IL1 β , IL6, TGF β , TNF α ↗ miARN oncogéniques	Inflammation Cancérogenèse	(Ngalame <i>et al.</i> , 2018)
	Cellules endothéliales	↗ VE	↗ Activité protéolytique	Coagulopathie	(Zhou <i>et al.</i> , 2011)
	Hépatocytes	EXO			
<i>In vivo</i>	Sérum sujets exposés à l'arsenic	EXO	↗ ARMm MALAT1	Fibrose	(Dai <i>et al.</i> , 2019)

Les VE libérées suite à une exposition à l'arsenic pourraient aussi participer à la communication intercellulaire, délétère, en lien avec les pathologies décrites pour être induites par l'arsenic, notamment le cancer. En effet, les VE libérées par des cellules épithéliales bronchiques traitées par l'arsenic sont capables de transférer le **miR-21** dans les cellules épithéliales bronchiques réceptrices, stimulant ainsi leur prolifération, par l'augmentation de l'expression de la protéine PTEN impliquée dans des voies de signalisation de **prolifération cellulaire**. Par ailleurs, les VE isolées de cellules épithéliales de la prostate traitées par l'arsenic permettent l'acquisition d'un phénotype oncogénique de cellules souches et la transition épithélio-mésenchymateuse accompagnée d'une

augmentation de l'activité MMP favorisant leur motilité et l'invasion (Ngalame *et al.*, 2018). Ces effets seraient probablement dus au transfert de leur contenu en oncogènes, en cytokines pro-inflammatoires ou en miR associés à l'oncogenèse (**TABLEAU 35**) (Ngalame *et al.*, 2018).

Ces VE produites sous l'effet de l'arsenic pourraient, également, participer au développement de la fibrose hépatique induite par l'arsenic. En effet, les VE isolées d'hépatocytes traités à l'arsenic entraîne un transfert d'ARNm MALAT1 dans les cellules étoilées du foie. Le MALAT1 peut provoquer l'augmentation de l'expression du collagène, par l'inhibition de l'activité du miR-26b, qui lorsqu'il est actif, induit la dégradation de l'ARNm du collagène COL1A2 (Dai *et al.*, 2019). Ces VE engendrent donc une activation fibrotique des cellules étoilées ainsi qu'une prolifération.

b. Manganèse

Les cellules microgliales et les cellules neuronales traitées par le manganèse libèrent une quantité plus importante de VE, principalement des EXO (Harischandra *et al.*, 2019; Sarkar *et al.*, 2019). Une augmentation de la quantité d'EXO est également retrouvée *in vivo* dans le sérum de souris exposées au manganèse (Sarkar *et al.*, 2019) et dans le sérum de travailleurs exposés de manière professionnelle (Harischandra *et al.*, 2019; Sarkar *et al.*, 2019). Ces VE contiennent la protéine α -synucléine (α Syn) mal repliée, impliquée dans la mort des neurones (Harischandra *et al.*, 2015, 2019), la protéine ASC associée à l'inflammasome (Sarkar *et al.*, 2019) ou encore de nombreux miARN associés à l'agrégation protéique, l'autophagie, l'inflammation et l'hypoxie (Harischandra *et al.*, 2018).

Ces VE peuvent être responsables de la communication intercellulaire délétère et participer ainsi à la pathogénèse de maladies neurodégénératives induites par le manganèse. *In vitro*, ces VE peuvent participer à la réponse inflammatoire des cellules microgliales, en y transférant la protéine adaptatrice **ASC** nécessaire à la formation de l'inflammasome (Sarkar *et al.*, 2019) qui provoque alors l'augmentation de la sécrétion de l'IL1 β ; ces VE induisent également l'expression de protéines pro-inflammatoires iNOS, IBA-1 IL1 β , IL6, TNF α , et IL12 (Harischandra *et al.*, 2019). Par ailleurs, les VE peuvent participer au transfert de l' **α Syn mal repliée** vers des cellules saines et ainsi provoquer une augmentation de l'agrégation protéique dans les cellules du cerveau (Harischandra *et al.*, 2015), mais aussi une mort des neurones (Harischandra *et al.*, 2019). Enfin, une étude *in vivo*, confirme la participation de ces VE à la pathogénèse des maladies neuronales, puisque l'administration de VE, isolées de cellules neuronales exposées au manganèse, provoque l'initiation de la maladie de Parkinson dans le cerveau de souris (Harischandra *et al.*, 2019).

c. Mercure

Les érythrocytes exposés au mercure *in vitro* libèrent une quantité plus importante de VE. Ces VE présentent une externalisation de la PS, qui est un important médiateur de l'activation pro-coagulante, facilitant la formation des complexes enzymatiques à l'origine de la synthèse de la

thrombine (Lim *et al.*, 2010). Les auteurs suggèrent que ces VE pourraient être des médiateurs de la coagulation induite par le mercure et pourraient donc potentiellement être impliquées dans des maladies thrombotiques liées à une exposition au mercure.

4. Autres contaminants

L'exposition à des **composés perfluorés**, notamment l'acide perfluorooctanesulfonique (PFOS), est corrélée positivement avec l'augmentation des VE dans la circulation sanguine et l'épaississement de l'intima média des vaisseaux sanguins, chez de jeunes adultes et adolescents (Lin *et al.*, 2016). Ces VE pourraient ainsi être impliquées dans le développement de l'athérosclérose, suite à une exposition aux PFOS.

Chez des rats exposés aux neurotoxiques, **le bromure de pyridostigmine et la perméthrine**, et au **pesticide**, le **DEET** (N,N-diéthyl-3-méthylbenzamide), les VE circulantes présentent une altération de leur profil en miARN (Pierce *et al.*, 2016). L'exposition à de tels agents chimiques permet d'étudier l'origine du développement de dysfonctionnements, du système nerveux central, rencontrés chez de nombreux vétérans suite à la guerre du Golfe dans les années 1990 (Gulf WAR illness). En effet, ces militaires avaient été exposés à des composés comme le bromure de pyridostigmine, utilisé massivement comme traitement prophylactique d'armes chimiques attaquant le système nerveux ; ou la perméthrine et le DEET, suite à une utilisation excessive d'insectifuges et de pesticides pendant la guerre. Chez le rat, les dysfonctionnements du système nerveux central sont corrélés avec des changements épigénétiques dans le cerveau et notamment une modification de l'expression des miARN ; ces miARN contenus dans les VE isolées du sang pourraient alors servir de biomarqueurs de diagnostic de cette maladie.

Les **nanoparticules de silice** entraîne une élévation de la production de VE par les cellules épithéliales bronchiques et les fibroblastes pulmonaires (Stassen *et al.*, 2019). Le **DTT** induit la sécrétion de VE par les cellules ovariennes (Rossi *et al.*, 2017). Le **toluène** provoque une modification des miARN contenus dans les VE libérées par des cellules sanguines (Lim *et al.*, 2017) supposant leur utilisation en tant que biomarqueurs d'exposition. Par ailleurs, la **roténone et le méthyl viologène** cause la libération de VE par les cellules neuronales (Pan-Montojo *et al.*, 2012) et modifie profondément le protéome de VE libérées par des cellules ARPE du pigment rétinien, par rapport à celui des VE issues de cellules non exposées (Biasutto *et al.*, 2013). La modification du contenu protéique de ces VE présente une orientation vers les voies de signalisation régulant l'apoptose ; or la mort cellulaire des cellules rétinienne est un facteur déterminant de la dégénérescence maculaire liée à l'âge (Biasutto *et al.*, 2013). Les auteurs suggèrent la possible implication des VE dans la communication intercellulaire pouvant conduire à la pathogénèse d'une telle maladie sous l'effet des contaminants de l'environnement.

En conclusion, très peu d'études se sont jusqu'à maintenant intéressées à libération de VE sous l'effet des contaminants environnementaux et encore moins aux rôles de ces VE dans la toxicité induite par ces contaminants. Concernant le rôle des VE dans les pathologies hépatiques, les publications sont encore plus rares. Récemment, à la fin de l'année 2019, deux publications montrent un lien entre la production de VE par des hépatocytes traités à l'arsenic et les effets toxiques de l'arsenic (Dai *et al.*, 2019), et un lien entre la libération de VE, par des cellules épithéliales alvéolaires, induite par la fumée de cigarette et l'inflammation dans le foie (Feller *et al.*, 2018). Aucun autre contaminant n'a été étudié. Ainsi, aucune étude ne s'est intéressée à l'effet des HAP sur la libération et l'effet des VE quelle que soit la pathologie associée, l'organe ou le type cellulaire. Pourtant, l'ensemble des données présentées ci-dessus montre clairement l'intérêt des VE, en tant que potentiels biomarqueurs d'exposition et/ou de risques de développement de pathologies liées aux contaminants environnementaux, et aussi en tant que potentiels vecteurs de la toxicité et de la pathogenèse induite par ces toxiques.

IV. Contexte et objectifs

Les composés de la famille des **hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP)** constituent une classe majeure de polluants environnementaux émis dans l'atmosphère. En effet, par leur caractère lipophile, les différentes molécules de HAP peuvent s'accumuler dans la chaîne alimentaire. La population humaine est donc largement exposée aux mélanges d'HAP, par des voies multiples, et majoritairement par la voie orale *via* l'alimentation. Par ailleurs, ces HAP peuvent entraîner différents effets toxiques chez l'Homme et contribuer au développement de nombreuses maladies telles que les cancers ou les maladies cardio-respiratoires. Ainsi, une exposition aux HAP a été corrélée au développement de maladies hépatiques chroniques, comme le cancer hépatocellulaire ou les maladies non-alcooliques du foie (NAFLD). En outre, certains HAP sont décrits pour entraîner la mort de certaines cellules du foie et principalement des hépatocytes. Or, la **mort cellulaire des hépatocytes** est un évènement-clé de la stéatohépatite (NASH) et sa récurrence, par des agressions répétées, favorise l'apparition de tumeurs hépatiques. L'exposition aux HAP peut donc être considérée comme un facteur de risque de développement de telles pathologies chroniques, affectant une partie importante de la population mondiale : la prévalence des NAFLD est de 25 % dans la population mondiale et celle des NASH de 5 % ; les cancers du foie sont classés 3^e type de cancer en terme de mortalité et 6^e en terme d'incidence dans le monde entier, avec une survie à 5 ans inférieure à 20 %. Il apparaît alors fondamental d'identifier en amont les mécanismes cellulaires et moléculaires favorables à l'induction de la mort cellulaire.

Dans ce contexte, nous nous intéressons aux **vésicules extracellulaires (VE)** libérées par les hépatocytes exposés à des HAP. Ces VE sont des nanostructures subcellulaires, entourées d'une bicouche lipidique, libérées par les cellules dans le milieu extracellulaire. Elles peuvent transporter de nombreuses biomolécules (protéines, lipides, acides nucléiques) spécifiques de la cellule d'origine, du type d'agression et même du composé responsable du stress, si bien que les VE pourraient être des **biomarqueurs potentiels d'exposition et d'effet**. Ces VE interviennent également dans la communication intercellulaire, puisqu'elles ont la capacité d'interagir avec des cellules réceptrices par fusion, contact ou endocytose. Elles sont alors susceptibles de transférer des biomolécules dans ces cellules, modifiant ainsi leur fonctionnement, et peuvent donc être considérées comme des **vecteurs potentiels de toxicité**.

Avant le début de nos travaux, aucune étude ne s'était intéressée à l'impact de polluants environnementaux sur la libération de VE par les cellules du foie, ni aux effets de ces VE. Aucune étude n'avait envisagé l'effet des HAP, quel que soit le type cellulaire non plus.

Dans ce cadre, les objectifs de cette thèse ont été :

- 1) d'évaluer la capacité des HAP à induire une libération de VE par les hépatocytes** parallèlement à la mort cellulaire.

Nous avons donc étudié le niveau de production des VE par les hépatocytes, les modifications biophysiques et biochimiques de ces VE sous l'effet des HAP, ainsi que les différents mécanismes, dépendants ou non du récepteur AhR, par lesquels les HAP pourraient provoquer une libération de VE. Cette étude a fait l'objet d'une publication parue dans le journal *Toxicological Sciences* « *Polycyclic Aromatic Hydrocarbons Can Trigger Hepatocyte Release of Extracellular Vesicles by Various Mechanisms of Action Depending on Their Affinity for the Aryl Hydrocarbon Receptor* » (van Meteren *et al.*, 2019), présentée dans la **PARTIE 2 : II en page 159**.

- 2) de déterminer le rôle de ces VE, libérées suite à une exposition aux HAP, dans les dommages hépatiques**, en s'intéressant particulièrement au stress oxydant et à la mort cellulaire des hépatocytes récepteurs.

Nous avons cherché à identifier les cargos des VE ainsi que les mécanismes à l'origine du stress oxydant et de la mort. Cette étude fait l'objet d'une publication, actuellement en révision dans la revue *Free Radical Biology and Medicine* « *Extracellular vesicles released by polycyclic aromatic hydrocarbons-treated hepatocytes trigger oxidative stress in recipient hepatocytes by delivering iron* », présentée dans la **PARTIE 2 : II Article 2 en page 197**.

PARTIE 2 : RESULTATS

I. Article 1

Nettie van Meteren, Dominique Lagadic-Gossmann, Martine Chevanne, Isabelle Gallais, Dimitri Gobart, Agnès Burel, Simon Bucher, Nathalie Grova, Bernard Fromenty, Brice M.R. Appenzeller, Soizic Chevance, Fabienne Gauffre, Eric Le Ferrec, et Odile Sergent

Les hydrocarbures aromatiques polycycliques provoquent une libération de vésicules extracellulaires par les hépatocytes, selon différents mécanismes, en fonction de leur affinité pour le récepteur AhR

publié dans le journal TOXICOLOGICAL SCIENCES

A. Introduction

La compréhension du réseau de communication intercellulaire présente un intérêt particulier dans la pathogénèse hépatique puisque le foie est un organe multicellulaire composé, à la fois, d'hépatocytes et de cellules non parenchymateuses. Dans ce contexte, un rôle-clé des vésicules extracellulaires (VE), nanostructures entourées d'une membrane libérées par les cellules dans le milieu extracellulaire, a été mis en évidence. Les VE sont enrichies en protéines, lipides et acides nucléiques qui peuvent être spécifiques de la cellule productrice et du stimulus subit. Ces VE sont capables de transférer leur contenu dans des cellules réceptrices et ainsi moduler les fonctions cellulaires. Leur participation au développement ou à la progression de maladies hépatiques comme l'hépatite, la cirrhose ou le carcinome hépatocellulaire a été largement mise en évidence.

En ce qui concerne l'exposition aux xénobiotiques, une augmentation des niveaux de VE a été détectée dans la circulation sanguine de rongeurs présentant des dommages hépatiques liés à des médicaments (DILI), et de patients traités par le paracétamol. En revanche, à l'heure actuelle, aucune étude ne s'est intéressée à la libération de VE dans les maladies du foie associées à des toxiques (*Toxicant-Associated Fatty Liver Disease* [TAFDL]- *Toxicant-Associated SteatoHepatitis* [TASH]). En outre, l'effet de polluants environnementaux sur la libération de VE n'a été que très peu étudiée et seulement dans des contextes de maladies cardio-vasculaires, pulmonaires ou neurodégénératives.

L'objectif de cette étude a donc été d'évaluer l'impact d'hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP) sur la production de VE par les hépatocytes, en s'intéressant parallèlement à la mort de ces cellules, caractéristique importante de certaines maladies du foie.

B. Stratégie expérimentale

Trois molécules d'HAP, le **benzo(a)pyrène** (BP)¹, le **dibenzo(a,h)anthracène** (DBA)² et le **pyrène** (PYR), ont été choisies, en fonction de leur appartenance aux différents groupes de cancérigènes classés par le CIRC, leur présence dans l'alimentation humaine (EFSA, 2008) et leur affinité au récepteur *aryl hydrocarbon* (AhR) (Machala et al., 2001), principal médiateur des effets biologiques observés pour certains HAP.

En plus, deux modèles cellulaires d'hépatocytes ont été utilisés :

- les **hépatocytes de rat en culture primaire**, car c'est un modèle proche de l'*in vivo*, comportant toutes les enzymes du métabolisme (Davila and Morris, 1999). Cependant pour des raisons de survie, ce modèle ne permet qu'une étude d'exposition courte (maximum 24 heures).

¹ Le **benzo(a)pyrène** noté **BaP** dans le corps de texte de la thèse est noté **BP** dans l'article 1

² Le **dibenzo(a,h)anthracène** noté **DBaA** dans le corps de texte de la thèse est noté **DBA** dans l'article 1

- les **hépatocytes hybrides de la lignée WIF-B9**, issus d'une fusion d'hépatocytes de la lignée FaO d'hépatome de rat et de fibroblastes humains (Wi38), car ils permettent l'étude sur une exposition plus longue (entre 1 et 3 jours). Par ailleurs, ces cellules ont l'avantage d'être polarisées, différenciées et d'exprimer de nombreuses enzymes du métabolisme (Biagini *et al.*, 2006) permettant de travailler avec de faibles doses de toxiques.

Les hépatocytes de la lignée WIF-B9 et les hépatocytes de rat en culture primaire sont traités par les HAP à la concentration de 100 nM pendant 72 h et 18 h respectivement. Les VE sont ensuite isolées du milieu de culture des hépatocytes, par ultracentrifugations à 100 000 x g pendant 1 h 45. Les VE issues du sang de rat exposés au mélange de 16 HAP ou de souris nourries avec un régime riche en gras et exposées au BP pendant 3 mois (*échantillons fournis par Nathalie Grova du Luxembourg Institute of Health et Bernard Fromenty de l'institut NUMECAN à Rennes*) sont isolées par précipitation, à l'aide d'un kit commercial *Total Exosome Isolation (from plasma) Kit™* d'Invitrogen.

- La libération de VE est quantifiée par la technologie du *Nanoparticle Tracking Analysis* (NTA) et la caractérisation des VE a été effectuée grâce au NTA, la microscopie électronique à transmission, au western-blotting.
- La mort cellulaire par apoptose est évaluée grâce au marquage par le fluorochrome Hoescht 33342 et par mesure fluorimétrique de l'activité des caspases 3/7.
- L'activation des récepteurs AhR et CAR et le métabolisme des HAP ont été étudié en mesurant l'expression des gènes cibles par RT-qPCR et l'activité des CYP1 par le test de l'activité EROD.
- La quantité de cholestérol est mesurée, par colorimétrie, grâce à l'utilisation du kit Infinity™ cholestérol, après extraction des lipides par le mélange chloroforme-méthanol.
- La fluidité membranaire des cellules et des VE est analysée grâce à l'utilisation de la sonde 12-DSA (*12-doxylstearic acid*), par résonance paramagnétique électronique (RPE).

C. Résultats

Le traitement des hépatocytes par chacun des trois HAP entraîne une augmentation de la libération des VE par ces cellules. Cette augmentation est confirmée *in vivo*, dans le sang de rongeurs exposés de manière prolongée à un ou plusieurs HAP. La caractérisation des VE libérées par les hépatocytes non-traités de la lignée WIF-B9 ou des cellules primaires, suggère qu'elles sont principalement composées d'exosomes (EXO). En effet, ce sont des vésicules rigides, avec une morphologie en forme de cupule en MET, d'une taille inférieure à 200 nm, enrichies en cholestérol et en marqueurs protéiques des EXO (Tsg101, Alix, CD63 et CD81). Par ailleurs, chacun des trois HAP provoquent, dans les VE, une modification de l'expression des marqueurs protéiques des EXO : une augmentation de l'expression des composés de la voie ESCRT, Alix et Tsg101 et une diminution de l'expression des tétraspanines CD81 et CD63. Ceci pourrait traduire une

augmentation de la biogénèse des VE par la voie ESCRT induite par les HAP. En revanche, la diminution des marqueurs protéiques des radeaux lipidiques à la surface des VE n'est pas observée pour tous les HAP. Elle n'est mise en évidence que pour le BP ou le DBA, HAP à forte affinité pour le récepteur AhR. Le PYR, qui a une faible affinité pour le récepteur AhR, n'a pas d'effet, suggérant ainsi que les mécanismes d'action, permettant la libération de VE pourraient être différents selon l'affinité à l'AhR.

Pour comprendre les mécanismes d'action la mort cellulaire a été ciblée pour les premières expériences. Ainsi, bien que chacun des trois HAP soit capable d'induire une mort des hépatocytes par apoptose, l'activité des caspases n'est pas impliquée dans l'augmentation de la libération des VE induite par les HAP. Ceci nous a amené à nous questionner quant à l'implication des récepteurs et facteurs de transcription AhR et CAR (*constitutive androstane receptor*). L'AhR est bien connu pour participer à l'induction de la mort des hépatocytes par les HAP et le CAR a été montré comme étant activé par le PYR et à l'origine de dommages hépatiques. Pour le BP et le DBA, à forte affinité pour l'AhR, l'augmentation de la libération de VE est bien dépendante de l'activation de l'AhR et de l'activité des CYP1, tandis que pour le PYR, l'élévation est sous la dépendance de CAR. Enfin, l'activation de l'AhR est à l'origine d'une déplétion en cholestérol et d'une augmentation de la fluidité membranaire des cellules, deux événements précédemment décrits par notre équipe pour induire l'apoptose. De façon originale, ces mêmes mécanismes sont impliqués dans la libération de VE par les hépatocytes. En plus, nous avons mis en évidence une surcharge en cholestérol dans les VE libérées par les hépatocytes exposées à chacun des trois HAP, qui pourrait aussi participer à l'augmentation de leur libération.

Pour conclure, les HAP sont bien capables de provoquer une mort modérée des hépatocytes, et de favoriser une libération de VE. Ces deux phénomènes seraient dépendants des mêmes mécanismes. Ainsi, l'augmentation de la quantité et la modification de certaines caractéristiques biophysiques et biochimiques des VE reflétant l'apoptose induite par les HAP suggèrent l'utilisation potentielle des VE, non seulement comme biomarqueurs d'exposition mais également comme biomarqueurs de la mort cellulaire induite par les HAP.

Polycyclic Aromatic Hydrocarbons Can Trigger Hepatocyte Release of Extracellular Vesicles by Various Mechanisms of Action Depending on Their Affinity for the Aryl Hydrocarbon Receptor

Nettie van Meteren,^{*} Dominique Lagadic-Gossmann,^{*} Martine Chevanne,^{*} Isabelle Gallais,^{*} Dimitri Gobart,^{*} Agnès Burel,[†] Simon Bucher,[‡] Nathalie Grova,^{§,¶} Bernard Fromenty,[‡] Brice M.R. Appenzeller,^{||} Soizic Chevance,^{|||} Fabienne Gauffre,^{|||} Eric Le Ferrec,^{*} and Odile Sergent^{*,1}

^{*}Univ Rennes, Inserm, EHESP, IRSET (Institut de recherche en santé, environnement et travail) - UMR_S 1085, F-35000 Rennes, France; [†]Univ Rennes, Biosit – UMS 3480, US_S 018, F-35000 Rennes, France; [‡]Univ Rennes, Inserm, Inra, Institut NUMECAN (Nutrition Metabolisms and Cancer)-UMR_S1241, UMR_A 1341, F-35000 Rennes, France; [§]Department of Infection and Immunity, Luxembourg Institute of Health, Immune Endocrine Epigenetics Research Group, L-4354 Esch-sur-Alzette, Luxembourg; [¶]Calbinotox, Faculty of Science and Technology, Lorraine University, F-54506 Vandoeuvre-les-Nancy, France; ^{||}Human Biomonitoring Research Unit, Department of Population Health, Luxembourg Institute of Health, L-1445 Strassen, Luxembourg; and ^{|||}Univ Rennes, CNRS, ISCR (Institut des sciences chimiques de Rennes) – UMR 6226, F-35000 Rennes, France

¹To whom correspondence should be addressed at IRSET, Faculté de Pharmacie, 2, av Pr. Léon Bernard, 35043 Rennes Cedex, France. Fax: +33-223-235055. E-mail: odile.sergent@univ-rennes1.fr

ABSTRACT

Extracellular vesicles (EVs) are membrane-enclosed nanostructures released by cells into the extracellular environment. As major actors of physiological intercellular communication, they have been shown to be pathogenic mediators of several liver diseases. Extracellular vesicles also appear to be potential actors of drug-induced liver injury but nothing is known concerning environmental pollutants. We aimed to study the impact of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs), major contaminants, on hepatocyte-derived EV production, with a special focus on hepatocyte death. Three PAHs were selected, based on their presence in food and their affinity for the aryl hydrocarbon receptor (AhR): benzo[a]pyrene (BP), dibenzo[a,h]anthracene (DBA), and pyrene (PYR). Treatment of primary rat and WIF-B9 hepatocytes by all 3 PAHs increased the release of EVs, mainly comprised of exosomes, in parallel with modifying exosome protein marker expression and inducing apoptosis. Moreover, PAH treatment of rodents for 3 months also led to increased EV levels in plasma. The EV release involved CYP metabolism and the activation of the transcription factor, the AhR, for BP and DBA and another transcription factor, the constitutive androstane receptor, for PYR. Furthermore, all PAHs increased cholesterol levels in EVs but only BP and DBA were able to reduce the cholesterol content of total cell membranes. All cholesterol changes very likely participated in the increase in EV release and cell death. Finally, we studied changes in cell membrane fluidity caused by BP and DBA due to cholesterol depletion. Our data showed increased cell membrane fluidity, which contributed to hepatocyte EV release and cell death.

Key words: polycyclic aromatic hydrocarbons; hepatocytes; extracellular vesicles; exosomes; aryl hydrocarbon receptor; cell death.

The intercellular communication network is of particular interest in liver pathogenesis, as liver is a multicellular organ comprised of hepatocytes and nonparenchymal cells. A key role for extracellular vesicles (EVs), cell-derived membrane-enclosed vesicles found in the extracellular environment, as well as the bloodstream, has recently emerged in intercellular communication (Szabo and Momen-Heravi, 2017). Extracellular vesicles released from a donor cell can shuttle their content into a recipient cell (Szabo and Momen-Heravi, 2017). They are selectively enriched in proteins, lipids, DNA, and miRNA, depending on the initial stimulus of the parental cell (Maji et al., 2017). In the recipient cells, EVs can physiologically mediate multiple cell functions. Thus, they can be considered to be pathogenic mediators and their contribution to several liver diseases, in particular hepatitis, cirrhosis, and hepatocellular carcinoma, has been reported (Maji et al., 2017; Szabo and Momen-Heravi, 2017). In addition, increased EV release has been found to correlate with the severity of several liver diseases, such as nonalcoholic steatohepatitis (NASH) in mice (Hirsova et al., 2016) and, NASH (Kornek et al., 2012), alcoholic hepatitis (Momen-Heravi et al., 2015), and cirrhosis (Rautou et al., 2012) in patients.

Circulating EV levels have also been reported to be increased in drug-induced liver injury (DILI), both in rodents (Cho et al., 2018) and patients treated with acetaminophen; a correlation between their cargo and liver damage has even been found (Ward et al., 2014). Given the increasing range of air, water, and food-borne chemical pollutants that can reach and damage the liver, regardless of the exposure route (Arciello et al., 2013), another xenobiotic-linked liver disease has emerged, called toxicant-associated fatty liver disease (TAFLD) and toxicant-associated steatohepatitis (TASH), pathologically similar to NASH (Al-Eryani et al., 2015; Wahlang et al., 2013). Extracellular vesicles have been demonstrated to be involved in the progression of steatosis to NASH as liver damage mediators. Thus, the investigation of EV release in the context of TAFLD and TASH could reveal new therapeutic targets and their quantitative or phenotypic changes could be considered as biomarkers or diagnostic tools for the severity of the disease. With the exception of arsenite-transformed hepatic epithelial cells (Chen et al., 2017), the effect of environmental toxicants on EV release has only been studied for lung diseases, neurodegenerative diseases, and some cancers (Harischandra et al., 2017) but not in the context of liver diseases.

The study of EVs in liver could represent a major challenge in terms of a new therapeutic strategy or diagnostic tools for TAFLD and TASH, as nothing is known about the ability of chemical pollutants to induce the release of EVs by normal liver cells, especially hepatocytes. Our aim was thus to test whether polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) can increase hepatocyte-derived EV production, with particular attention to hepatocyte death, as a key characteristic of TASH. Polycyclic aromatic hydrocarbons are major environmental pollutants formed during incomplete combustion of organic materials, such as fossil fuels, cigarettes, and smoked or grilled food. We selected benzo[a]pyrene (BP), dibenzo[a,h]anthracene (DBA), and pyrene (PYR) based on their presence in food (Alexander et al., 2008) and their affinity for the aryl hydrocarbon receptor (AhR) (Machala et al., 2001) (Supplementary Table 1). Indeed, found in polluted air, water, or soil, the main exposure to these

compounds in nonsmokers is through food (Alexander et al., 2008). In addition, most of the biological effects of several PAHs have been described to be mediated by their binding to the cytosolic transcription factor, the AhR, which activates the expression of CYP1 genes (Nebert et al., 2000). When metabolized by CYP1, PAHs can produce reactive oxygen species or reactive electrophilic metabolites capable of inducing the death of hepatocytes and liver epithelial cells via damage to the organelles or cell structures (Collin et al., 2014; Gorria et al., 2006, 2008; Holme et al., 2007; Huc et al., 2004, 2006; Tekpli et al., 2010, 2012; Topinka et al., 2008). Finally, the recent discovery of increase sensitivity of lipid-overloaded hepatocytes to BP (Bucher et al., 2018) highlights the importance of these previous findings concerning BP-induced cell death toward gaining insight into the progression of TASH.

Extracellular vesicle release has already been correlated with the severity of several liver diseases and the ability of chemical pollutants to induce their release by hepatocytes has not yet been described. Thus, we aimed to determine whether pollutants, such as PAHs, can (1) increase both hepatocyte-derived EV production and cell death and (2) modify the physical and chemical properties of the resulting EVs. This research could also provide new potential biomarkers of PAH exposure and effects.

MATERIALS AND METHODS

Chemicals

α -naphthoflavone (α NF), BP, DBA, PYR, water-soluble cholesterol, N-acetyl-Asp-Glu-Val-Asp-7-amido-4 methylcoumarin (Ac-DEVD AMC), 12-doxyl stearic acid, Hoechst 33342, pravastatin, 1-methyl-N-[2-methyl-4-[2-(2-methylphenyl)diazenyl]phenyl]-1H-pyrazole-5-carboxamide (CH229131), 5-phosphomevalonate lithium salt (Mev), cholesteryl oleate, p-nitrophenylphosphate ready-to-use Liquid Reagent, benzyl alcohol, and dimethyl sulfoxide (DMSO) were all purchased from Sigma-Aldrich (Saint-Quentin-Fallavier, France), and SYTOX Green was from Life Technologies (Thermo Fisher Scientific, Courtaboeuf, France). The 16 PAHs naphthalene, fluorene, acenaphthene, acenaphthylene, anthracene, phenanthrene, fluoranthene, pyrene, benz[a]anthracene, chrysene, benzo[b]fluoranthene, benzo[k]fluoranthene, benzo[a]pyrene, benzo[g,h,i]perylene, indeno[1,2,3-c,d]pyrene, and dibenz[a,h]anthracene used for the rat experiment model were purchased from Sigma-Aldrich (Bornem, Belgium). Ursodeoxycholic acid sodium salt (UDCA) and n-benzoyloxycarbonyl-Val-Ala-Asp(O-Me) fluoromethyl ketone (Z-VAD-FMK) were acquired from Calbiochem (Millipore, France). Infinity TM cholesterol reagent was obtained from Thermo Scientific (Thermo Fisher Scientific), and ethyl 5-[[diethylamino]acetyl]-10,11-dihydro-5H-dibenz[b,f]azepin-3-yl]carbamate (CINPA1) from Tocris (Lille, France).

Mouse monoclonal anti-AIP1 and antiflotillin-1 antibodies were purchased from BD Biosciences (Le Pont de Claix, France). Mouse monoclonal anti-ASGPR 1/2, mouse monoclonal anti-HSC70 and rabbit polyclonal anti-CD63 were acquired from Santa Cruz Biotechnology (Heidelberg, Germany) and rabbit polyclonal anti-CYP1A1 and anti-Tsg101 from Abcam (Paris, France). Rabbit polyclonal anti-CD81 and mouse monoclonal

anti- β -actin were from Sigma-Aldrich. Horseradish peroxidase (HRP)-conjugated secondary antibodies were obtained from Dako (Agilent Technologies, Courtaboeuf, France).

Animal Experimentation

All procedures using rats were carried out following the European Community Council Directive of September 22, 2010 (2010/63/EU) and approved by the Ministry of Agriculture, Grand Duchy of Luxembourg. The 180–200 g female Long Evans rats (Janvier Labs, Le Genest-Saint-Isle, France) were housed at $22 \pm 2^\circ\text{C}$ and a relative humidity of $40 \pm 5\%$ with 12 h light/dark cycles. Food and water were available *ad libitum*. The water, food, and oil were tested according to NF ISO 15302 standards to confirm that they were PAH-free (down to a detection limit of 10 ng/l of water and 1 ng/g of fat). The PAH mixture was composed of the 16 compounds identified by the US-EPA (United States—Environmental Protection Agency) for their toxicity and prepared in vegetable oil weekly (0.4 ml/kg of body weight, ISIO4, Lesieur, Neuilly-sur-Seine, France). Animals were treated similarly as in a previous study (Grova et al., 2017). Briefly, 8 rats were randomly allocated to the PAH group and dosed orally by gavage with 0.8 mg/kg body weight of an equimolar PAH mixture, 3 times per week, over a 90-day period. Eight control rats received the vehicle only. At the end of the experiment, the rats were euthanized 3 h following the last gavage of PAHs using carbon dioxide. Blood was collected by cardiac puncture carried out just before the heartbeat stopped. Venous blood (2.5 ml) was collected into tubes containing EDTA and plasma was stored at -80°C before use.

All experiments concerning high-fat diet (HFD) mice were performed according to national guidelines for the use of animals in biomedical research and approved by the French Ministère de l'Éducation Nationale, de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche (agreement n°904-201506221708455). Eighteen 7-week-old male C57BL/6J-+/+ mice, weighing 20–23 g, were purchased from Janvier Labs. After arrival, the mice were acclimatized in the animal care facility of the University of Rennes 1 (ARCHE), accredited by the French veterinary authorities (agreement n°A35 23840) and fed a standard diet (SD) containing 3 kcal/g of food (Teklad global 16% protein rodent diet, ENVIGO, Huntingdon, UK) *ad libitum*. After 1 week of acclimatization, the mice were fed a 60% HFD, similarly to a previous study (Bucher et al., 2019), containing 5.5 kcal/g (260HF V19, Safe Diet, Augy, France). In this diet, 60% of the energy came from lipids, mainly anhydrous milk fat, with 233 g/kg of saturated fatty acids. After 1 month, the mice were split into 2 groups of 9 animals. The PAH group received BP directly provided in the pellets with the HFD (Safe Diet) over an 84-day period. The daily oral BP dose was estimated to be 8 mg/kg body weight. The control group still received a 60% HFD but without BP. Immediately after collection, blood was centrifuged for 10 min at $1000 \times g$ and the serum was immediately stored at -80°C until use.

Cell Isolation and Culture

Two types of hepatocytes, primary rat hepatocytes and hybrid human/rat hepatocytes of the WIF-B9 cell line, were studied. Primary hepatocytes were used as they are physiologically and metabolically close to *in vivo* models. For longer incubation times, not suited for primary hepatocyte survival, the WIF-B9 cell line was also tested due to its high level of differentiation into hepatocytes, making it very sensitive to chemical toxicants, even at very low doses (Biagini et al., 2006; Bucher et al., 2018).

Primary Rat Hepatocytes

Adult rat hepatocytes were isolated from 2-month-old male Sprague Dawley rats (Janvier Labs) by perfusion of the liver with a $17 \mu\text{g/ml}$ liberase (Roche Diagnostic, Meylan, France) solution to obtain liver dissociation. Viability of the freshly isolated hepatocytes was routinely above 85%. Cells were seeded at densities of 1.5×10^6 cells in 35-mm petri dishes (Hoechst 33342 staining), 3×10^6 cells in 60-mm petri dishes (caspase-3/7 activity, EV isolation for nanoparticle tracking analysis [NTA]), 8×10^6 cells in 100-mm petri dishes (membrane fluidity determination and cholesterol measurement), and 15×10^6 cells in 150-mm petri dishes (EV isolation for protein, lipid, and electron paramagnetic resonance [EPR] analysis). They were then cultured in a medium composed of 75% minimum Eagle's medium and 25% medium 199 with Hanks salts (Sigma-Aldrich), supplemented with 10% fetal calf serum (FCS) (Gibco, Illkirch, France) and containing 2.2 g/l NaHCO_3 and $5 \mu\text{g}$ streptomycin, 5 UI penicillin (Gibco), $3.2 \mu\text{g}$ bovine serum albumin (BSA) (Eurobio, Courtaboeuf, France), and $5 \mu\text{g}$ bovine insulin (Sigma-Aldrich) per milliliter. Cells were incubated at 37°C under an atmosphere of 5% CO_2 and 95% air. The medium was changed 3 h following seeding and replaced by the same medium without FCS.

WIF-B9 Cell Line

WIF-B9 hybrid cells, obtained by fusion of Fao rat hepatoma cells and WI-38 human fibroblasts, were a generous gift from Doris Cassio (UMR Inserm S757, Université Paris-Sud, Orsay, France). WIF-B9 cells were grown in F12 Ham Coon's nutrient medium (Sigma-Aldrich) supplemented with 5% FCS (Gibco) and containing 2.2 g/l NaHCO_3 , 100 UI penicillin, $10 \mu\text{g}$ streptomycin, and 0.25 μg amphotericin B (Sigma-Aldrich) per milliliter, 2 mM glutamine (Gibco), and HAT supplement [sodium hypoxanthine (10 μM), aminopterin (40 nM), and thymidine (1.6 μM)] (Gibco). Cells were incubated at 37°C in an atmosphere of 5% CO_2 and 95% air. Cells were seeded at 12.5×10^3 cells/cm² and cultured for 7 days, until reaching approximately 80% of confluence, before PAH treatment. At this high density, no proliferation could be detected in control cells, as shown by the analysis of metabolically viable cells by MTT assay (Supplementary Figure 1). Before treatment, the medium was changed and replaced by the same medium but previously deprived of EVs. Extracellular vesicle depletion was obtained by ultracentrifugation of the medium containing 25% FCS, at $100\,000 \times g$ for 14 h at 4°C .

Cell Treatment

Cells were exposed to PAHs (100 nM BP, DBA, or PYR), or 0.0005% dimethyl sulfoxide (DMSO) as control cultures, for 2–18 h for primary rat hepatocytes and 5–72 h for WIF-B9 hepatocytes, depending on the experiment. This PAH concentration was chosen based on results obtained for cell death at 3 different PAH concentrations (50, 100, or 1000 nM) and incubation times (24, 48, or 72 h) (Supplementary Figure 1). No significant differences between those concentrations were detected. We, therefore, decided to focus on the lower concentrations to be closer to those found in human sera of nonsmokers and in the range of dietary intake (Supplementary Table 2). As expected, better EV release was obtained with longer exposures, such as 72 h. We finally chose the 100 nM concentration because greater cell death, but not significantly more than for the other concentrations, was measured for this incubation time (Supplementary Figure 1). In the experiments to investigate the mechanisms underlying the induction of EV production by PAHs, cultures were pretreated each day with various compounds (Supplementary Table 3) for

1 h prior to coexposure with the toxicants. The PAHs did not influence cell proliferation (Supplementary Figure 1).

Cell Death Evaluation

Cells were tested for both apoptotic and necrotic cell death. Apoptotic cells were identified by chromatin condensation and morphological changes in the nucleus using the blue-fluorescence chromatin dye Hoechst 33342, while necrotic cells were evidenced by the SYTOX Green nucleic acid stain, only permeant to cells with compromised plasma membranes. After each toxicant treatment, WIF-B9 cells and primary rat hepatocytes were stained at 37°C with 175 nM SYTOX Green and also with 50 and 100 µg/ml Hoechst 33342 for 20 and 30 min, respectively. Apoptotic and necrotic cells were then counted using a fluorescence microscope (Axio Scope A1, ZEISS, Marly le Roi, France); 400 cells in total were examined for each condition.

In order to further identify cell death mode, the caspase-3/7 activity assay was performed. Cells were lysed in the caspase activity buffer as previously described (Collin et al., 2014). Eighty micrograms of protein were thus incubated with 80 µM DEVD-AMC for 2 h at 37°C. Caspase-mediated cleavage of DEVD-AMC was evaluated by spectrofluorimetry (Spectramax Gemini; Molecular Devices, San Jose, California) using 380 nm excitation and 440 nm emission wavelengths.

Isolation of Extracellular Vesicles

Hepatocyte-Derived Extracellular Vesicles

After each treatment with toxicant, culture media (Supplementary Table 4) were collected to isolate total EVs. The media was first centrifuged at 3650 × g for 10 min to remove any cells, cell debris and apoptotic bodies. Total EVs were then pelleted by ultracentrifugation (Optima L-90 K Ultracentrifuge, Beckman Coulter, Villepinte, France) of the cleared supernatants at 100 000 × g for 1 h 45 min at 4°C in a SW28-1 swinging-bucket rotor (Beckman Coulter). Pellets were then washed with phosphate-buffered saline (PBS) and recentrifuged at the same speed. Finally, EVs were resuspended in 25–200 µl PBS, depending on the experiment.

Plasma or Serum Exosomes

Plasma or serum exosomes were isolated using the Total Exosome Isolation (from plasma) Kit (Invitrogen, Thermo Fisher Scientific) according to the manufacturer's protocol. Briefly, plasma or sera underwent a first centrifugation step at 2000 × g for 20 min to eliminate cells and cell debris and the supernatants were centrifuged again at 10 000 × g for 20 min. The clarified supernatants (50–100 µl) were then incubated with proteinase K in PBS for 10 min at 37°C. They were then incubated, for 30 min at 4°C with the exosome precipitation reagent and finally centrifuged for 30 min at 10 000 × g at 4°C. The pellets were resuspended in 50 µl PBS.

Extracellular Vesicle Analysis

Morphology, Quantification, and Size

Transmission electron microscopy. Three to six microliters of native EV suspension were diluted and fixed at one-eighth with 2% paraformaldehyde in Tris-buffered saline (TBS) buffer. Thirty microliters of fixed EV suspension were incubated for 20 min on formvar carbon-coated grids (Nickel Grid 300 mesh, Agar Scientific, Oxford Instruments, Gometz-la-Ville, France), previously glow-discharged with a Cressington 208C (Cressington Scientific Instruments, Roissy, France) high-vacuum carbon

coate. The grids were then transferred on TBS buffer, then on 1% glutaraldehyde for 5 min and finally washed 7 times with distilled water. Negative staining was performed on grids with 4% uranyl acetate in 0.15 M sodium oxalate (ratio of 1:1, v/v) for 5 min, then with 4% uranyl acetate in 2% methylcellulose (ratio 1:4, v/v) for 10 min in the dark at 4°C. Excess liquid was removed using Whatman paper. Grids were air-dried for 10 min. Samples were imaged using a Jeol JEM 1400 microscope (JEOL Ltd, JEOL Europe SAS, Croissy-sur-Seine, France) operated at an acceleration voltage of 120 kV and equipped with an “on column” Orius 1000 camera (Gatan Inc) set at a 60 k magnification.

Nanoparticle tracking analysis. The size and concentration of isolated EVs were quantified by NTA using a Nanosight LM14 configured with a 405-nm laser and equipped with NTA software version 3.1 build 54 (Malvern Instruments, Orsay, France). Purified EVs were diluted to a concentration of 10⁸–10⁹ particles/ml in PBS buffer. Three videos of 30 s were recorded per sample at 25°C. The detection threshold was set to 5 for the analysis.

Protein Analysis

Protein Concentration

The protein concentrations of cell lysates and EVs were determined by the Pierce BCA protein assay kit (Thermo Fisher Scientific, Illkirch, France) using BSA as the standard. Hepatocytes were lysed in RIPA buffer (50 mM Tris buffer, 150 mM NaCl, 0.1% SDS, 1% Triton X-100, 0.5% NaDOC, 50 mM NaF, 5 mM EDTA pH 8) supplemented with protease inhibitors (1 mM orthovanadate, 1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride, 5 µg/ml leupeptin, 0.1 µg/ml aprotinin, and 0.5 mM dithiothreitol) before sonication on ice.

Protein Expression

Equal amounts of protein (at least 10 µg) were denatured for 5 min at 95°C in RIPA buffer and then separated by sodium dodecyl sulfate (SDS) polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) using 12% or 15% polyacrylamide gels. After overnight transfer onto nitrocellulose membranes (Millipore, St Quentin-Yvelines, France) and blocking for 1 h at room temperature with a TBS solution containing 5% BSA, primary antibodies were added and the membranes incubated for 2 h at room temperature (anti-AIP1/Alix [1:500], anti-ASGPR 1/2 [1:1000], anti-β-Actin [1:1000], anti-CD81 [1:1000], anti-CD63 [1:200], antiflotillin-1 [1:2000], anti-HSC70 [1:10 000], and anti-Tsg101 [1:600]). Then, membranes were washed 3 times with 0.1% Tween 20 in TBS for 10 min and incubated in blocking buffer containing appropriate horseradish peroxidase-conjugated secondary antibodies (1:2500) for 1 h at room temperature. Following incubation, they were washed 6 times with 0.1% Tween 20 in TBS for 5 min. Immunolabeled proteins were then visualized by chemiluminescence using an enhanced chemiluminescence solution (Tris-HCl 0.1 M pH 8.5, 0.22 mM coumaric acid, 1.25 mM luminol, and 0.009% H₂O₂) and an LAS-3000 analyzer and the images processed using Multi Gauge software (Fujifilm, Saint-Quentin Les Yvelines, France). HSC70 or β-actin primary antibodies were used to evaluate protein loading.

Multiple bands appeared for the following proteins: Tsg101, CD63, and ASGPR1/2. For Tsg101, it is known that its molecular weight may vary from the predicted molecular weight due to post-translational modifications, notably mono-ubiquitinylation at multiple sites (Jiang et al., 2013) likely explaining the existence of several bands on our blots. Concerning tetraspanins, although CD63 displays a predicted

molecular weight similar to that of the non-glycosylated tetraspanin CD81 (26 kD), its observed molecular weight can greatly vary due to extensive N-linked glycosylation, responsible for the appearance of multiple bands (Ageberg and Lindmark, 2003). The asialoglycoprotein receptor (ASGPR) is a hepatic specific lectin, composed of 2 homologous subunits, ASGPR1 and ASGPR2, forming multimeric complexes (Braun et al., 1996). The antibody recognizes both subunits, likely explaining the formation of multiple bands.

Independent experiments could not be run on the same gel. Thus, the relative density ratio was calculated. First, band densities of the protein of interest (CD81, CD63, Tsg101, AIP1/Alix, flotillin-1, or ASGPR1/2) and that of the loading controls (Hsc70 or β -actin) were measured on every blot and the backgrounds subtracted. Then, the density of the protein of interest in each lane was divided by the respective density of the loading control on every blot. Finally, each normalized density of the protein of interest for the EVs and cell lysate was divided by the normalized density of the control EVs (first lane on the blots) (see [Supplementary Figure 2](#)). Each value for the control EV from independent blots was equal to 1, as the density ratios were systematically relative to the control EV ratio. Differences in the means of relative density ratios allowed us to compare expression levels of the proteins of interest from different blots. For multiple bands, the densities of each band were added and the sum used as the density of the protein of interest.

Alkaline Phosphatase Activity

Alkaline phosphatase activity was determined by a colorimetric method using p-nitrophenylphosphate as a substrate, as previously described (Collin et al., 2014). Equal amount of protein (at least 10 μ g) were incubated for 20 min at 37°C with 100 μ l p-nitrophenylphosphate ready-to-use Liquid Reagent. The absorbance was then measured at 405 nm using a Spectrostar Nano microplate reader (BMG Labtech, Ortenberg, Germany).

Cytochrome P450 1 Activity

CYP1 activity was estimated by the ethoxyresorufin O-deethylase (EROD) assay that relies on the conversion of ethoxyresorufin into resorufin by CYP1 enzymes. Rapidly, after treatment, cells were incubated with 1.5 mM salicylamide (inhibitor of phase II-conjugating enzymes) and 5 μ M ethoxyresorufin. Fluorescence of resorufin (excitation at 544 nm and emission at 584 nm) was monitored for 30 min at 37°C using a microplate reader (EnSpire Multimode 2300 Plate Reader, Perkin Elmer, Waltham). EROD activity was expressed as pg resorufin per min and mg protein.

Analysis of Gene mRNA Expression

Gene mRNA levels were determined as previously described (Bucher et al., 2018). The sequences of the rat primers used are provided in [Supplementary Table 5](#).

Membrane Fluidity Determined by Electron Paramagnetic Resonance

As previously described (Collin et al., 2014), membrane fluidity was measured in bulk membranes of cells (ie, plasma membrane and possibly endosome and lysosome membranes) and in EV membranes. Membranes were spin-labeled by incubating cell or EV suspensions at 37°C for 30 min with 12-doxylstearic acid (50 μ g/ml). A unique washing step in 17 ml PBS was performed for labeled EVs by a 1 h 45 min ultracentrifugation at

100 000 g, while cells were washed 3 times in 100 μ l PBS by a 2500 \times g centrifugation. Electron paramagnetic resonance spectra of labeled samples were acquired at ambient temperature on a Elexsys EPR spectrometer (Bruker, Wissembourg, France) operating at 3509 G center field, 20 mW microwave power, 9.86 GHz microwave frequency, 1.77 G modulation amplitude, and 100 kHz modulation frequency. The fluidity of the labeled membranes was evaluated by the calculation of the order parameter (S) that is inversely related to membrane fluidity.

Cholesterol Measurement

Lipids were extracted from EV and cell suspensions with 2:1 chloroform-methanol (v/v). The chloroformic phase was evaporated under nitrogen and lipids were resuspended in ethanol. Cholesterol concentrations were spectrophotometrically measured by a cholesterol oxidase/peroxidase assay using the Infinity TM cholesterol kit following instructions provided by the manufacturer. Absorbance of samples was measured at 492 nm using a Spectrostar Nano microplate reader (BMG Labtech). Total lipid concentrations were measured using a colorimetric method based on the sulfo-phospho-vanillin reaction. Absorbance of samples was measured at 540 nm on a Specord 205 Jena spectrophotometer (Serlabo, France). Finally, cholesterol content was expressed as μ mol/mg lipids.

Statistical Analysis

Values are presented as means \pm standard deviation from at least 3 independent experiments. Statistical analyses were performed using one-way analysis of variance (ANOVA) followed by a Newman-Keuls post-test. Significance was accepted at $p < .05$. All statistical analyses were performed using GraphPad Prism5 software (San Diego).

RESULTS

All Tested Polycyclic Aromatic Hydrocarbons Can Increase the Release of Extracellular Vesicles by Both Types of Hepatocytes

After PAH treatment, released EVs were isolated from the cell culture media by differential ultracentrifugation and quantified by NTA. The increase in EV release by PAH-treated WIF-B9 hepatocytes was significant and similar for all PAHs (by approximately 40% relative to controls), but only after 72 h of exposure ([Figure 1A](#)). PYR differed from BP and DBA, as we detected a significant increase in EV release earlier, as soon as 24 h, and it was higher (+ 60% relative to controls). Similarly, all PAHs significantly and similarly increased the production of primary rat hepatocyte-derived EVs by approximately 50% and 70% after 5 and 18 h, respectively ([Figure 1B](#)). However, increased EV production by primary rat hepatocytes, may have occurred earlier, as the amount of EVs at 5 (10^6 particles per million cells) and 18 h (10^8 particles per million cells) was roughly identical to that obtained later with the WIF-B9 hepatocytes (ie, after 24 and 72 h of treatment, respectively). No increase in the quantity of EVs was detected following a 5-h exposure of WIF-B9 hepatocytes, in contrast to primary rat hepatocytes. Once again, different results were obtained with PYR than for the other 2 PAHs. Indeed, although BP was also able to induce a very early increase in EV release (after 2 h of exposure), the effect of PYR was significantly higher (BP: +45%, PYR: +89%). For both types of hepatocytes, PYR thus induced earlier and greater EV production.

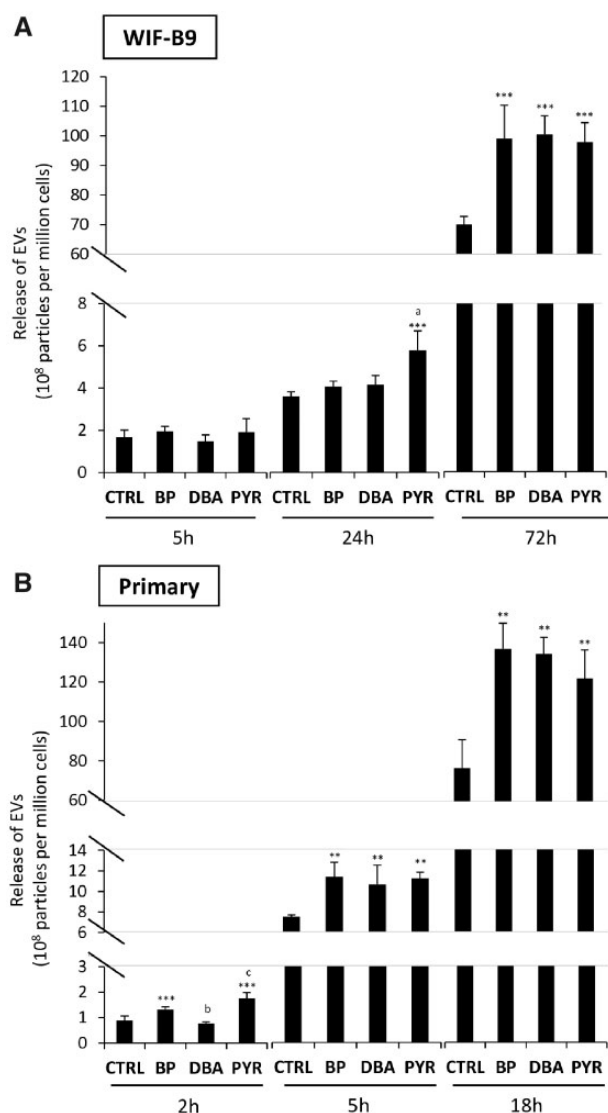


Figure 1. Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) increase EV release by hepatocytes. Determination of the quantity of EVs was carried out by nanoparticle tracking analysis. WIF-B9 cells were exposed to 100 nM BP, DBA, or PYR for 5, 24, or 72 h (A), whereas primary rat hepatocytes were treated for 2, 5, or 18 h with the same PAHs (B). Untreated cultures were used as controls (CTRL). Values are given as the means \pm standard deviation of 3–7 independent experiments. Treated versus CTRL: ^{**} $p < .01$, ^{***} $p < .001$. PYR versus BP or DBA: ^a $p < .01$. DBA versus BP or PYR: ^b $p < .001$. PYR versus BP: ^c $p < .01$. Abbreviations: BP, benzo[a]pyrene; CTRL, controls; DBA, dibenzo[a,h]anthracene; EV, extracellular vesicle; PYR, pyrene.

More EVs were produced by primary rat hepatocytes after 18 h of exposure to the PAHs and by WIF-B9 hepatocytes after 72 h. Thus, the following EV characterization experiments were performed using these incubation times.

Extracellular Vesicles Released by Untreated Hepatocytes Are Highly Enriched in Exosomes

Control hepatocyte-derived EVs were first characterized to determine the effects of PAHs on EV features, especially as WIF-B9 hepatocyte-derived EVs had never been studied, in contrast to primary rat hepatocytes (Hirsova et al., 2016; Holman et al., 2016). EVs are divided into 3 main subclasses, distinguished based on their size, content, and biogenesis: exosomes, the smallest vesicles (50–200 nm in

diameter), formed within multivesicular bodies (MBVs) and released into the extracellular space upon MVB fusion with the plasma membrane; microvesicles or microparticles, which typically have a diameter from 200 to 1000 nm and are directly shed from the plasma membrane by a budding process; and apoptotic bodies, the largest EVs, ranging from 1 to 4 μ m in diameter and formed at the final stage of apoptosis.

Most of the EVs released by both types of hepatocytes had a diameter of ≤ 200 nm by NTA, ie, an exosome feature (94% of EVs for WIF-B9 and 85% for primary rat hepatocytes) (Figure 2A). Nanoparticle tracking analysis spectra also showed the presence of 2 separate subpopulations based on diameter (100 nm and 160 nm) for WIF-B9 hepatocyte-derived EVs and 3 for primary rat hepatocyte-derived EVs (90, 140, and 200 nm) (Figure 2A). Similarly, only a minority of EVs had a diameter > 200 nm for both hepatocyte types, ie, a microvesicle feature (6% of EVs for WIF-B9 hepatocytes and 15% for primary rat hepatocytes) (Figure 2A). In addition, the NTA spectra obtained for both cell types were similar for all culture times (data not shown).

Extracellular vesicle morphology, examined by transmission electron microscopy (TEM) (Figure 2B), corroborated the presence of mostly exosomes in the preparations of both hepatocyte types. Indeed, most of the particles observed had a specific cup shape, characteristic of exosomes, and a size range of around 100 nm, whereas only a minority of microvesicle-shaped particles with a size range > 200 nm was found. The TEM images obtained for both EV cell types were also similar for all culture times (data not shown).

We confirmed the presence of exosomes in the EV preparations by searching for the enrichment of various exosome protein markers, based on their involvement in EV biogenesis (Hessvik and Llorente, 2018; Palmulli and van Niel, 2018), by western-blot characterization of the EVs relative to that of total cell lysates (Figure 2C) (see original images in Supplementary Figure 2). Extracellular vesicles of both WIF-B9 and primary rat hepatocytes were enriched for the ESCRT (endosomal sorting complex required for transport) proteins, Tsg101 and Alix/AIP-1, and the tetraspanins CD81 and CD63 (Figure 2C). The combination of these 4 proteins indicates the presence of exosome particles, as previously described (Kowal et al., 2016). Lipid rafts have also been described to be involved in exosome biogenesis (de Gassart et al., 2003; Salaün et al., 2004), notably the lipid-raft protein, flotillin (Strauss et al., 2010). We thus investigated its presence in the purified EVs. Control hepatocyte-derived EVs contained more flotillin-1 (flot-1) than control-cell lysates. ASGPR, a liver-specific protein, could be detected in the EVs, suggesting the possible use of EVs as a TASH biomarker.

Finally, as EV biogenesis appears to also require specific lipids, notably cholesterol (Record et al., 2014; Skotland et al., 2017), we compared the cholesterol content of control hepatocyte-derived-EVs to that of total lipids extracted from control hepatocytes. Extracellular vesicles released by both hepatocyte types showed cholesterol enrichment (Figure 1D). In addition, exosomes have also been previously reported to be enriched in other membrane-rigidifying lipids, such as phospholipids with saturated fatty acyl groups, sphingomyelin, and ceramide (Record et al., 2014; Skotland et al., 2017). We thus assessed the membrane fluidity of the EVs by EPR and compared it to that of the parent cells. Both WIF-B9 and primary rat hepatocytes released EVs with lower membrane fluidity than that of the hepatocyte bulk membranes, suggesting that the EV membranes were rigid, as would be expected for exosomes.

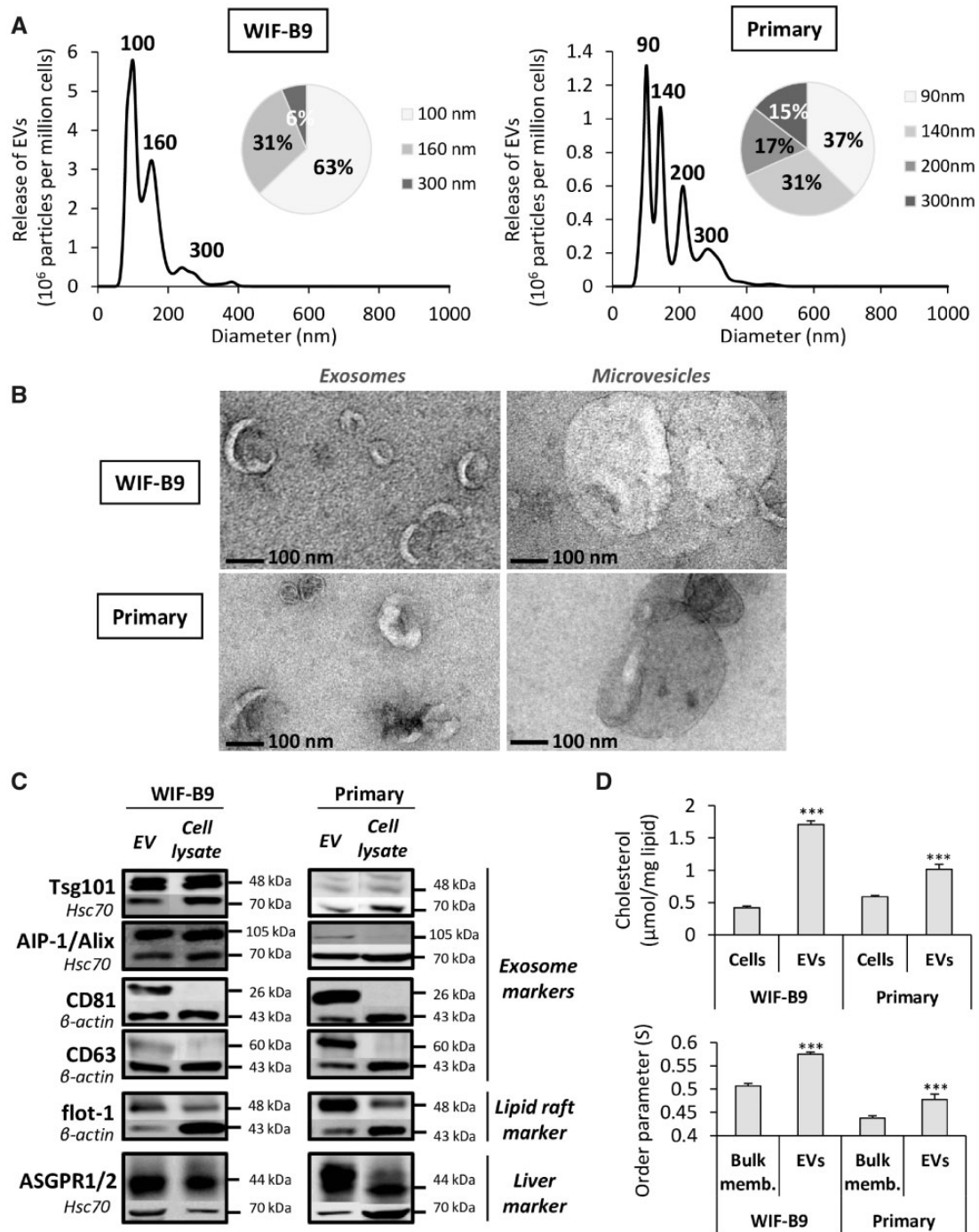


Figure 2. WIF-B9 and primary rat hepatocytes release mostly exosomes. EVs from untreated cells were characterized. EVs were isolated by differential ultracentrifugation of un-replenished media from 24-h (A, B) and 72-h (C, D) cultures of WIF-B9 cells or 2-h (A, B) and 18-h (C, D) cultures of primary rat hepatocytes. A) Size distribution of EVs, estimated by nanoparticle tracking analysis. Representative distributions of EVs, depending on their diameter, are shown for WIF-B9 (left panel) and primary hepatocytes (right panel). B) Morphology of representative EVs, observed by electron transmission microscopy in negative contrast. EVs were fixed with 1% glutaraldehyde and negatively contrasted with uranyl. C) Expression of protein markers. The expression of exosome-specific protein markers (CD81 and CD63 tetraspanins), ESCRT proteins (Tsg101 and Alix/AIP-1), a lipid raft protein marker (flotillin-1), and a liver-specific protein (ASGPR) of EVs and the corresponding total cell lysates was studied by Western blotting. The blots are representative of at least 3 independent experiments. D) Total amount of cholesterol determined by spectrophotometry in cells and the corresponding released EVs. The membrane fluidity of bulk (bulk memb.) and EV membranes was monitored by electron paramagnetic resonance analysis of 12-doylestearic acid embedded in the membranes, which allows the calculation of the order parameter (S), inversely related to membrane fluidity. Values are given as the means \pm standard deviation of at least 3 independent experiments. EV versus bulk memb. or cells: *** $p < .001$. Abbreviation: EV, extracellular vesicle.

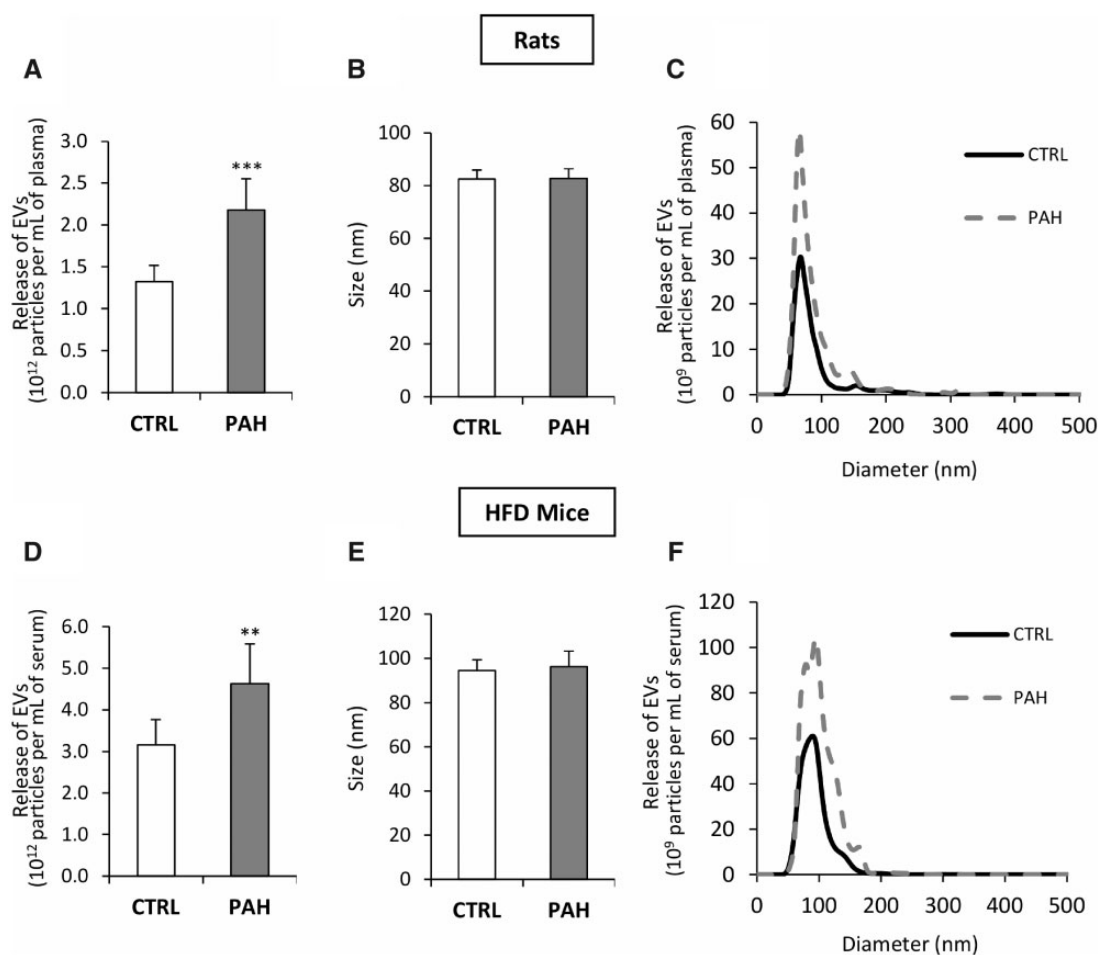


Figure 3. PAHs increase exosome release *in vivo* in rodents. The amount (A, D), mean size (B, E), and representative size distribution of exosomes (C, F) from the plasma or sera of PAH-exposed rodents were assessed by nanoparticle tracking analysis. Exosomes were isolated from rat plasma or mouse serum using the total exosome isolation (from plasma) Kit (Invitrogen). Rats received a mixture of 16 PAHs at 0.8 mg/kg (PAH group) by oral administration, 3 times per week, for 90 days or only vehicle (CTRL group). Mice being fed a high-fat diet received benzo[a]pyrene alone directly in their food at an estimated dose of 8 mg/kg/day for 84 days (PAH group) or not (CTRL group). Values are given as the means \pm standard deviation of 8 (rats) or 9 (mice) independent experiments. PAH treated versus CTRL: *** $p < .001$, ** $p < .01$. Abbreviations: CTRL, controls; EV, extracellular vesicle; PAHs, polycyclic aromatic hydrocarbons.

Overall, these data (diameter size, morphology, protein and lipid composition, and membrane fluidity) support that WIF-B9 hepatocyte-derived EVs contain mainly exosomes, like primary rat hepatocytes.

Polycyclic Aromatic Hydrocarbons Can Increase Extracellular Vesicle Release *In Vivo*

Polycyclic aromatic hydrocarbons increased EV release into the plasma/serum of PAH-treated rodents. Rats treated with a mixture of the 16 PAHs, highlighted by the US-EPA for their toxicity, exhibited increased EV levels in the plasma of approximately 65% over those found in the plasma of control rats (Figure 3A). Although the absolute value was higher in plasma than culture medium, the increase in EV levels was in the same range as that obtained in the culture media of PAH-treated hepatocytes (from 40% to 70%), emphasizing the impact of the results found *in vitro*. The higher absolute value in plasma can be explained by the fact that plasma exosomes are the result of EV release by potentially all tissues of the body and the longer duration of the *in vivo* experiment (90 days). In addition, BP alone was still able

to increase EV release by approximately 47% in HFD mice (Figure 3D).

The PAHs did not affect particle diameter in either rats or mice (Figs. 3B and 3E), and the size distribution remained homogeneous at approximately 80 and 95 nm, respectively (Figs. 3C and 3F). Of note, the EV isolation method using a precipitation reagent, especially suited for these small volume samples, only allowed exosome recovery.

Polycyclic Aromatic Hydrocarbons Do Not Alter Extracellular Vesicle Size or Morphology but Change Exosome Protein Marker Expression in Both Types of Hepatocytes

Polycyclic aromatic hydrocarbon exposure of hepatocytes did not lead to significant changes in the distribution of any of the subpopulations (exosomes, microvesicles) over time (Supplementary Figs. 3 and 4), and as *in vivo*, there were no significant changes in particle diameter (Supplementary Figs. 3 and 4). Thus, PAHs increased the release of particles with a diameter ≤ 200 nm (Supplementary Figs. 3 and 4). Overall, these results suggest that PAHs only affect exosome

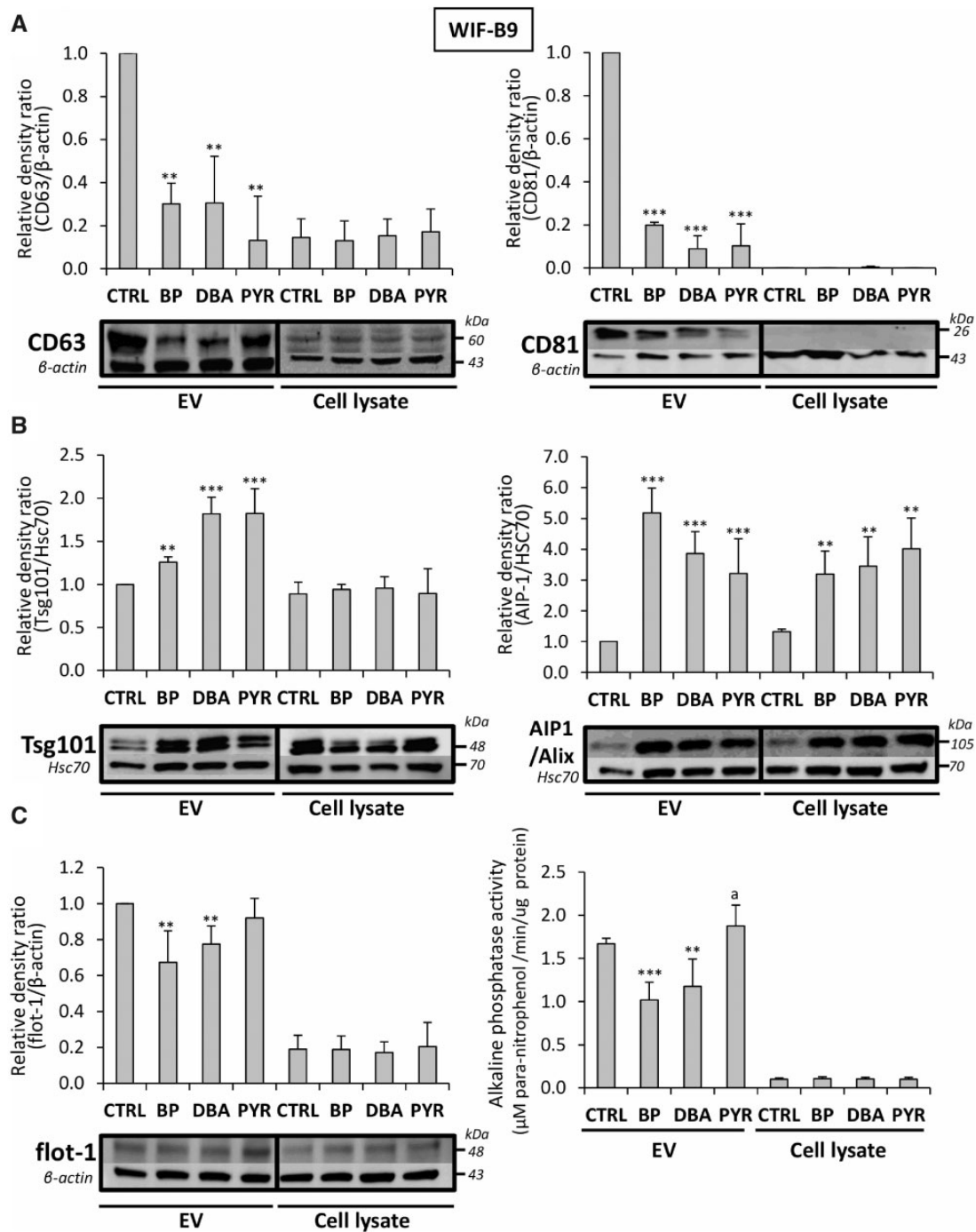


Figure 4. The 3 polycyclic aromatic hydrocarbons modify the protein composition of EVs released by WIF-B9 cells. Protein expression or activity of tetraspanins (A) (CD63 [left] and CD81 [right]), lipid-raft proteins (B) (flotillin-1 [flot-1] [left] and alkaline phosphatase [right]), and ESCRT proteins (C) (Tsg101 [left panel] and Alix/AIP1 [right panel]), were studied by Western blotting or spectrophotometry. WIF-B9 cells were exposed, or not, to 100 nM BP, DBA, or PYR for 72 h. Values are given as the means \pm standard deviation of 3–7 independent experiments. Treated versus CTRL: ** $p < .01$, *** $p < .001$. PYR versus BP or DBA: ^a $p < .01$. Abbreviations: BP, benzo[a]pyrene; CTRL, controls; DBA, dibenzo[a,h]anthracene; EV, extracellular vesicle; PYR, pyrene.

production. Thus, we assessed the expression of the exosome protein markers found in untreated hepatocyte-derived EVs, especially the combination of the 4 proteins described to be relevant for exosomes (Kowal et al., 2016).

Extracellular vesicle expression of both tetraspanins, CD63 and CD81, decreased markedly (by approximately 60% and 80%, respectively) following exposure of WIF-B9

hepatocytes to the PAHs (Figure 4A). Conversely, EV expression of both ESCRT proteins, Tsg101, and Alix/AIP-1, increased following PAH exposure (Figure 4B). The increase was considerable for Alix protein (approximately 300%) and can be partially explained by the increased expression also found in cell lysates. This was not true for the other proteins, for which no significant changes were detected in cell

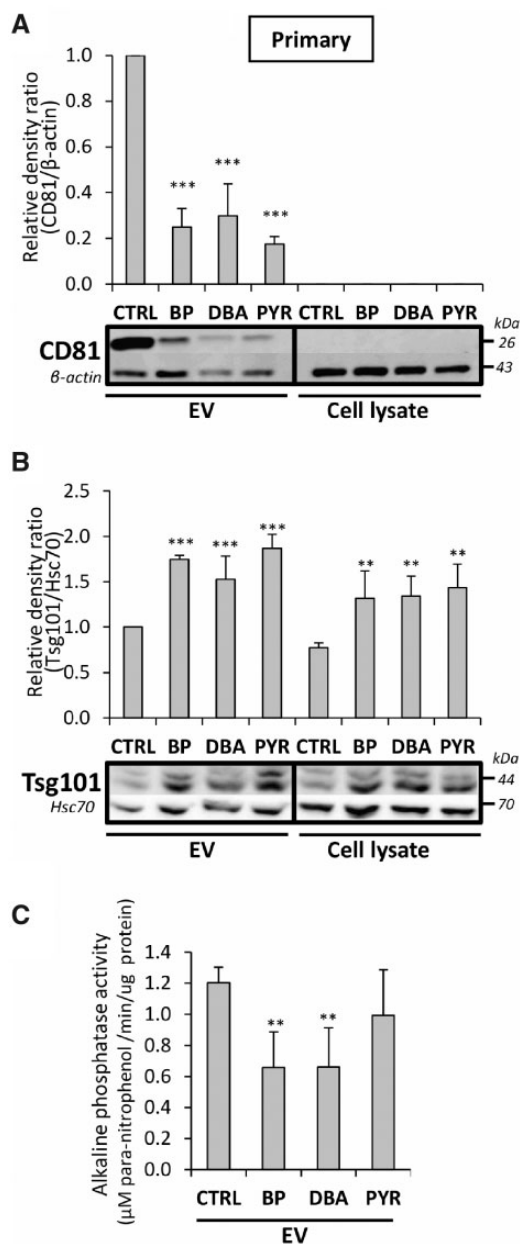


Figure 5. The 3 polycyclic aromatic hydrocarbons modify the protein composition of EVs released by primary rat hepatocytes. Protein expression or activity of the tetraspanin CD81 (A), the lipid-raft protein alkaline phosphatase (B), and the ESCRT protein Tsg101 (C) were studied by Western blotting or spectrophotometry. Primary rat hepatocytes were exposed, or not, to 100 nM BP, DBA, or PYR for 5 h (A) or 18 h (B, C). Values are given as the means \pm standard deviation of 3–7 independent experiments. Treated versus CTRL: ** $p < .01$, *** $p < .001$. Abbreviations: BP, benzo[a]pyrene; CTRL, controls; DBA, dibenzo[a,h]anthracene; EV, extracellular vesicle; PYR, pyrene.

lysates (Figure 4). As already mentioned, lipid rafts can also be involved in exosome biogenesis. In addition, we previously showed the involvement of these plasma membrane microstructures in the BP-induced death of liver cells (Tekpli *et al.*, 2010, 2012). Here, BP and DBA exposure of WIF-B9 hepatocytes caused a significant decrease in EV flotillin-1 expression and alkaline phosphatase activity, both lipid raft protein markers. In contrast, PYR did not affect the level of these proteins (Figure 4C), even though the difference in

flotillin-1 expression was not significant following exposure to the other PAHs.

Changes in the level of several proteins were also examined in primary rat hepatocytes (Figure 5). Similar to WIF-B9 hepatocytes, PAH exposure resulted in a decrease in the expression of CD81, representative of the tetraspanin family, and alkaline phosphatase activity, a lipid raft protein marker, as well as a decrease in the expression of Tsg101, representative of the ESCRT family.

Overall, these results suggest the capacity of all PAHs to increase exosome release via the ESCRT pathway, regardless of their AhR affinity.

All Tested Polycyclic Aromatic Hydrocarbons Induce Apoptosis in Both Types of Hepatocytes, but Hepatocyte-Derived Extracellular Vesicle Production Is Independent of Caspase Activation

Benzo[a]pyrene has previously been shown to induce hepatocyte death (Collin *et al.*, 2014), with an increased sensitivity for lipid-overloaded hepatocytes (Bucher *et al.*, 2018), which is a crucial aspect of TASH development. However, no studies of the effects of DBA or PYR on hepatocyte death have been reported. We next estimated cell death by Hoechst 33342 and Sytox Green staining of WIF-B9 and primary rat hepatocytes. Benzo[a]pyrene, DBA, and PYR exposure did not cause any changes in the number of necrotic cells (data not shown) but led to a significant increase (approximately 100%) in the number of apoptotic WIF-B9 hepatocytes from 24 h (Figure 6A). Once again, the effect of PAHs on apoptosis was earlier for primary rat hepatocytes and appeared as soon as 2 h (Figure 6B). At 5 h, there was no detectable apoptosis of exposed WIF-B9 cells (Figure 6A), whereas it was already occurring in primary rat hepatocytes (Figure 6B). Not only BP caused hepatocyte death, as expected, but also DBA, and more remarkably PYR, despite its low affinity for the AhR. The capacity of PAH to induce condensed and fragmented nuclei was weak (only 2–6% of all cells at the tested concentration) but persisted for at least 72 h for WIF-B9 hepatocytes and 18 h for primary rat hepatocytes. We observed a progressive increase in apoptotic cell death with time in the control primary hepatocytes (Figure 6B), likely due to senescence, but the increase in the percentage of apoptosis in the presence of PAHs (approximately 100%) remained steady. Apoptotic cell death was accompanied by a significant increase in caspase 3/7 activity (approximately 100%) (Figs. 6C and 6D).

Caspases have been previously shown to be involved in EV release by hepatocytes exposed to toxic lipids, such as palmitic acid or lysophosphatidylcholine (Hirsova *et al.*, 2016), or chemical toxicants, such as alcohol (Verma *et al.*, 2016). We, therefore, investigated the involvement of caspase activation by PAHs in EV production using Z-VAD-FMK (Z-VAD), a specific inhibitor of effector caspases 3/7. Although Z-VAD prevented the increase in the number of apoptotic cells (Figs. 6E and 6F, left panels), thus indicating that all PAHs triggered caspase-dependent apoptosis, it did not block EV release (Figs. 6E and 6F, right panels).

Overall, these results show that exposure to PAHs induce the onset of hepatocyte caspase-dependent apoptotic death, with no involvement of caspases in EV release.

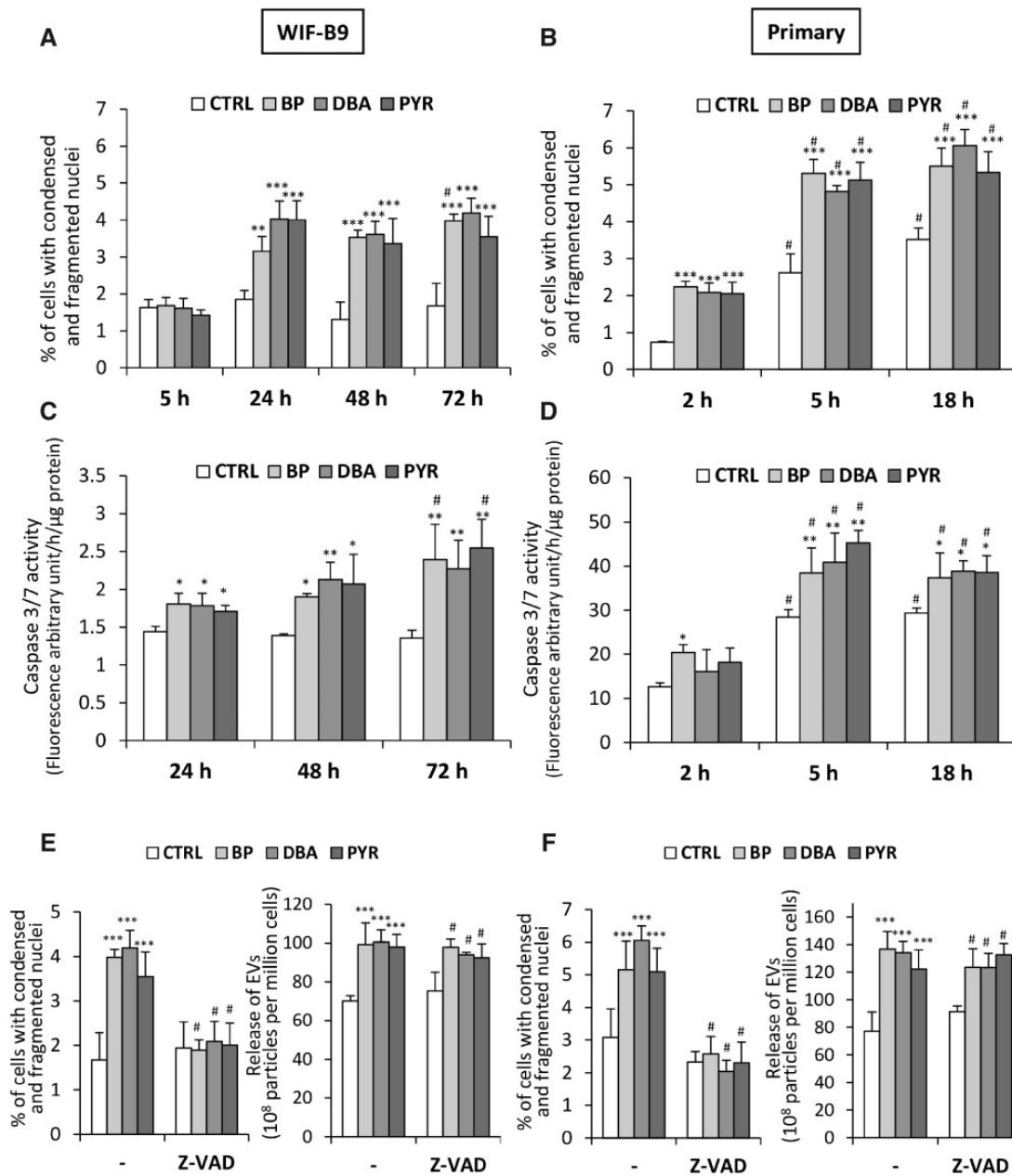


Figure 6. Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) induce apoptosis but extracellular vesicle (EV) release does not depend on caspase activity. Apoptosis was estimated by microscopic observation of the number of cells with condensed and/or fragmented chromatin after nuclear staining by Hoechst 33342 (A, B, E, F left) and by measuring the DEVDase activity of caspase-3/7 by spectrofluorimetry (C, D). EV release was evaluated by nanoparticle tracking analysis (E, F right). WIF-B9 cells were exposed to 100 nM BP, DBA, or PYR for 5, 24, 48, or 72 h (A, C) or 72 h (E), whereas primary rat hepatocytes were treated for 2, 5, or 18 h with the same PAHs (B, D) or for 18 h (F). Untreated cultures were used as CTRL. Some cultures were pretreated for 1 h, or not (-), with 10 μ M Z-VAD-FMK (Z-VAD), an inhibitor of caspase 3/7 activity (E, F). Values are given as the means \pm standard deviation of 3–5 independent experiments. Treated versus CTRL: * $p < .05$, ** $p < .01$, *** $p < .001$. Twenty-four hours versus 72 h and 2 h versus 5 or 18 h: # $p < .05$. Abbreviations: BP, benzo[a]pyrene; CTRL, controls; DBA, dibenzo[a,h]anthracene; PYR, pyrene.

Hepatocyte-Derived Extracellular Vesicle Production, as Well as Cell Death, Involves CYP Metabolism and the Activation of Cytosolic Transcription Factors, Such as the Aryl Hydrocarbon Receptor or Constitutive Androstane Receptor, Depending on the Polycyclic Aromatic Hydrocarbons

Extracellular vesicles can be considered as pathogenic mediators in several liver diseases. We thus looked for mechanisms of EV production based on processes known to be involved in

PAH-induced hepatocyte death. First, we tested the involvement of CYP1 activity and AhR activation, both already recognized to mediate the toxic effects of BP, notably the triggering of hepatic cell death (Collin et al., 2014). Moreover, nothing has been established yet concerning CYP activity or AhR activation regarding either DBA- or PYR-induced cell death, or EV release upon PAH exposure of hepatocytes. We assessed the mRNA levels of CYP1 in both hepatocyte types (Supplementary Figure 5), as well as CYP1 activity, determined by EROD activity (Figs. 7E and 7F). Benzo[a]pyrene and DBA induced an increase in CYP1

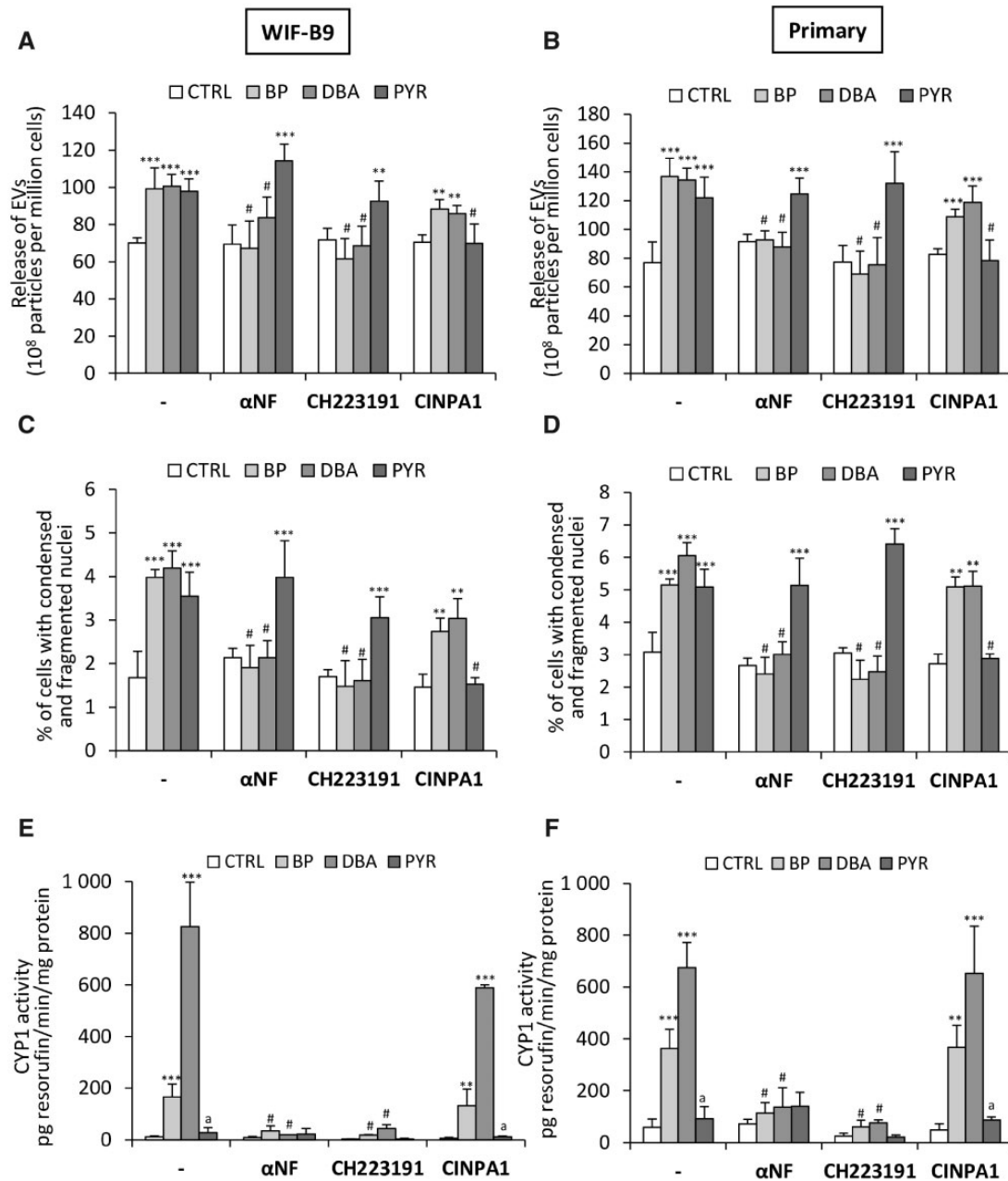


Figure 7. Increased EV release may depend on polycyclic aromatic hydrocarbons (PAH) metabolism by the AhR and CYPs following BP and DBA exposure or on constitutive androstane receptor activation following PYR exposure. EV release was evaluated by nanoparticle tracking analysis (A, B). Apoptosis was estimated by microscopic observation of the number of cells with condensed and/or fragmented chromatin after nuclear staining by Hoechst 33342 (C, D). CYP1 activity (E, F) was studied using the EROD assay in WIF-B9 after 72 h or primary rat hepatocytes after 18 h of treatment. WIF-B9 cells (A, C, E) were exposed, or not, to 100 nM BP, DBA, or PYR for 72 h and primary rat hepatocytes (B, D, F) were treated, or not, for 18 h with the same PAHs. Some cultures were pretreated for 1 h, or not (–), with 10 μM α-naphthoflavone (αNF), an inhibitor of CYP1 activity and an antagonist of the AhR, 3 μM CH223191 (CH223191), a specific antagonist of the AhR, or 0.3 μM CINPA1 (CINPA1), a potential inhibitor of the CAR. Values are given as the means ± standard deviation of 4–7 independent experiments. PAH-treated versus CTRL: **p* < .05, ***p* < .01, ****p* < .001. αNF, CH223191, or Z-VAD pretreated versus non-pretreated: #*p* < .01. PYR versus BP or DBA: ^a*p* < .01. Abbreviations: BP, benzo[a]pyrene; CTRL, controls; DBA, dibenzo[a,h]anthracene; EV, extracellular vesicle; PYR, pyrene.

mRNA levels and activity, but not PYR, suggesting that the AhR was functional and activated by BP and DBA, but not PYR. We, therefore, investigated the involvement of these 2 major actors of PAH toxicity using αNF, a CYP1 and AhR inhibitor, and CH223191, a specific AhR antagonist. These inhibitors were tested for their ability to inhibit the induction of EROD activity by BP and DBA at 72 and 18 h of exposure of WIF-B9 and primary

rat hepatocytes, respectively (Figs. 7E and 7F). We completed these data by also successfully assessing their effect after 48 and 5 h of PAH exposure in WIF-B9 and primary rat hepatocytes, respectively (see Supplementary Figs. 6B and 6C). αNF and CH223191 prevented EV release by WIF-B9 and primary rat hepatocytes (Figs. 7A and 7B) induced by BP and DBA, ie, 2 high-affinity AhR ligands, thus providing evidence for an AhR- and

CYP1-dependent mode of action for BP and DBA. As expected, BP- and DBA-induced cell death was inhibited under these conditions (Figs. 7C and 7D).

As CYP1 may be involved in the EV release and cell death induced by BP and DBA exposure, we performed a kinetic study of CYP1 activity in both hepatocyte types (Supplementary Figure 6A). Primary rat hepatocytes responded more rapidly to PAHs than WIF-B9, likely explaining the faster response of hepatocytes in terms of EV release and cell death. Thus, CYP1 activity in primary rat hepatocytes induced by BP and DBA treatment was higher at 5 h than in WIF-B9 cells. At 18 h, EROD activity was still elevated in primary rat hepatocytes and still greater than that measured in WIF-B9. At 48 h, CYP1 activity reached the same level in WIF-B9 hepatocytes as in primary rat hepatocytes at 18 h. Finally, as AhR appears to play a crucial role in the EV release induced by BP and DBA, a non-PAH agonist of the AhR, 2, 3, 7, 8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD), was also tested at a concentration of 10 nM. As expected, TCDD induced an increase in apoptosis, which was inhibited by both α NF and CH223191 (Supplementary Figure 7). However, TCDD was unable to induce the release of EVs by either primary rat or WIF-B9 hepatocytes, suggesting that TCDD and PAHs may induce a different response downstream of AhR activation and/or different parallel intracellular signaling pathways, thus highlighting the PAH specificity of EV release.

Neither the EV release nor cell death induced by PYR, a low-affinity AhR ligand, were prevented by α NF or CH223191, suggesting a different mode of action for PYR. Note, that the weak affinity of PYR for the AhR relative to the other 2 PAHs (Machala et al., 2001) was ascertained by the lack of induction of CYP1A1 mRNA expression and CYP1 activity (Figs. 7E and 7F; Supplementary Figure 5). We tested the role of the constitutive androstane receptor (CAR) in an attempt to understand the mode of action of PYR, as PYR has previously been determined to be a CAR activator, with a role for this transcription factor in PYR metabolism and hepatocyte damage (Zhang et al., 2015). Constitutive androstane receptor mRNA levels were verified in both hepatocyte types by a Ct inferior to 30. In addition, the CAR appeared to be active only in PYR-treated hepatocytes, as we detected an increase in CYP2C6 mRNA levels only in these cells (Supplementary Figure 5D). CINPA1, a potential specific inhibitor of the hepatic CAR (Cherian et al., 2015, 2018), was able to prevent PYR-induced cell death and EV release in both types of hepatocytes (Figure 7). CINPA1 did not exhibit such an effect on BP- or DBA-induced EV release nor on cell death or EROD activity (Figure 7). These results suggest that the effects of PYR may depend on CAR activation under our conditions.

All Tested Polycyclic Aromatic Hydrocarbons Modify Cholesterol Levels Both in Cells and Extracellular Vesicles, but EV Release and Cell Death Could Only Be Attributed to These Changes in Cholesterol Cellular Levels Induced by Benzo[a]pyrene and Dibenzo[a,h]anthracene

The BP-induced decrease in cholesterol levels (Collin et al., 2014, Tekpli et al., 2010) has been demonstrated to be crucial for the activation of Na⁺/H⁺ Exchanger Isoform 1 (NHE1) (Tekpli et al., 2012), which plays a pivotal role in BP-induced cell death (Huc et al., 2004). We, therefore, investigated cholesterol levels after PAH exposure using a colorimetric method in both hepatocyte types and the corresponding EVs. As previously described for BP, BP or DBA treatment induced a slight but significant decrease in cholesterol levels in both types of hepatocytes,

whereas no significant change occurred after PYR exposure (Figs. 8A and 8B, left panels). Furthermore, in contrast to hepatocytes, EVs exhibited strikingly higher cholesterol levels than control EVs, regardless of the PAH tested (Figs. 8A and 8B, right panels).

We tested the involvement of cellular cholesterol depletion in EV production due to BP and DBA exposure by replenishing the cholesterol of hepatocytes by supplementation with cholesterol (Chol) or mevalonate (Mev), an intermediate in cholesterol biosynthesis via HMGCoA reductase. Treatment with cholesterol or mevalonate protected the cells from BP- and DBA-induced EV release (Figs. 8C and 8D), as well as cell death (Figs. 8E and 8F). As expected, cholesterol or mevalonate supplementation did not modify the effects of PYR. Treatment with pravastatin alone, an HMGCoA reductase inhibitor that inhibits cholesterol biosynthesis, triggered EV release (Figs. 8C and 8D). However, no further elevation of EV release was obtained when PAHs were added to the pravastatin-treated hepatocytes (Figs. 8C and 8D). We examined the cholesterol content in pravastatin-treated WIF-B9 hepatocytes and the corresponding EVs to better understand this result (Supplementary Figs. 8A and 8B). As for EV release, exposure of these cells to BP or DBA did not induce any further decrease in total cellular cholesterol (Supplementary Figs. 8A and 8B), whereas BP or DBA alone were able to induce a decrease in total cholesterol (Figs. 8A and 8B). This was not surprising as BP and certainly DBA have the same target, HMG-CoA reductase. In contrast, as expected, pravastatin was able to further reduce cholesterol levels of cells treated with PYR, emphasizing again a different mechanism, which appears to be independent of total cellular cholesterol depletion, for this AhR low-affinity PAH. However, pravastatin was able to reduce cholesterol levels in EVs released from PAH-treated WIF-B9 hepatocytes (Supplementary Figure 8E). Overall, these results suggest an important role for cellular cholesterol in EV release and cell death induced by PAHs with a high affinity for the AhR.

Changes in Membrane Fluidity of Extracellular Vesicles Occurs with All Tested Polycyclic Aromatic Hydrocarbons, but Bulk Cellular Membrane Fluidification Is Only Involved in BP- and DBA-Induced Extracellular Vesicle Release and Cell Death

We previously reported the ability of BP to fluidify bulk membranes of liver epithelial cells (Gorria et al., 2006) and primary rat hepatocytes (Collin et al., 2014), leading to cell death. We thus investigated changes in the fluidity of both bulk cellular membranes and EV membranes by EPR after exposure of hepatocytes to PAHs. As expected, BP treatment caused an increase in bulk cellular membrane fluidity of both WIF-B9 and primary rat hepatocytes (Figure 9A). Similarly, DBA triggered the same fluidification of bulk membranes (Figure 9A). BP- and DBA-induced membrane fluidification required CYP1 activity and AhR activation (Figure 9B). On the contrary, PYR treatment did not cause any significant changes in bulk membrane fluidity (Figure 9A), thus highlighting a potential AhR-dependent mechanism for PAH-induced fluidification.

As expected from the effects of pravastatin on cellular total cholesterol, this compound was able to increase membrane fluidity only in control and PYR-treated WIF-B9 hepatocytes, but not BP- and DBA-exposed cells (Supplementary Figure 8E). Note that a decrease in cellular total cholesterol content was also only obtained for control and PYR-treated cells in the presence of pravastatin (Supplementary Figs. 8A and 8B). As cholesterol is a well-known membrane stabilizer, the effects of pravastatin on membrane fluidity can be attributed to these restricted changes

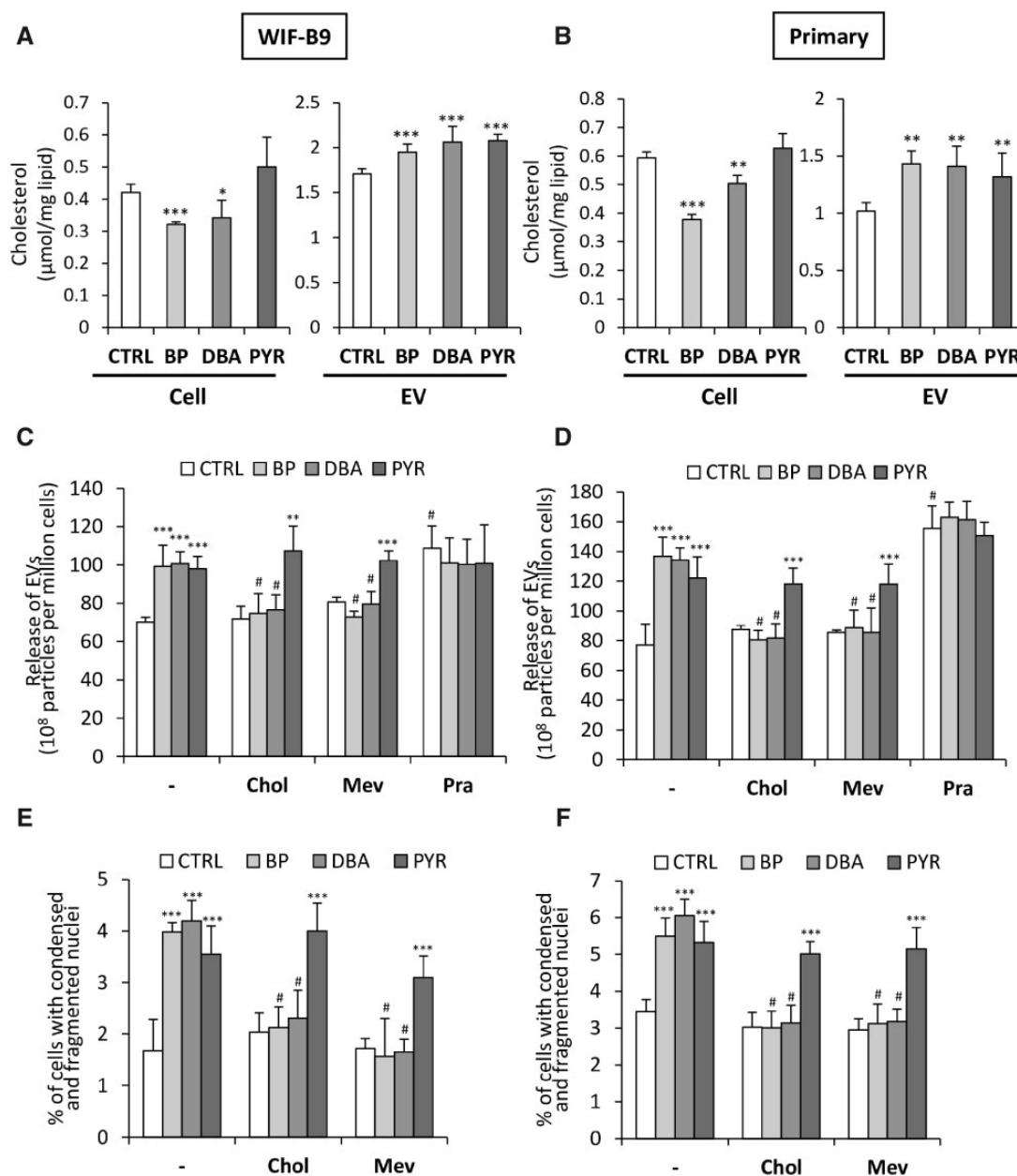


Figure 8. Cell-wide cholesterol depletion may be involved in BP- and DBA-induced cell death and EV release. The total amount of cholesterol was determined by spectrophotometry in WIF-B9 (A, left panel) or primary rat (B, left panel) hepatocytes and the corresponding released EVs (A and B, right panels). EV release was evaluated by nanoparticle tracking analysis (C, D). Apoptosis was estimated by microscopic observation of the number of cells with condensed and/or fragmented chromatin after nuclear staining by Hoechst 33342 (E, F). WIF-B9 cells (A, C, E) were exposed, or not, to 100 nM BP, DBA, or PYR for 72 h and primary rat hepatocytes (B, D, F) were treated, or not, for 18 h with the same polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs). Some cultures were pretreated for 1 h, or not (-), with 10 µM Pra, a competitive HMG-CoA reductase inhibitor that blocks cholesterol biogenesis, 77 µM Chol or 25 µM Mev, the product of HMGCoA reductase and a precursor of cholesterol. Values are given as the means ± standard deviation of 4–7 independent experiments. PAH-treated versus CTRL: * $p < .05$, ** $p < .01$, *** $p < .001$. Chol, Mev, or Pra pretreated versus non-pretreated: # $p < .01$. Abbreviations: BP, benzo[a]pyrene; Chol, cholesterol; CTRL, controls; DBA, dibenzo[a,h]anthracene; EV, extracellular vesicle; Mev, mevalonate; Pra, pravastatin; PYR, pyrene.

in total cellular cholesterol and explain the lack of increased EV release with PAHs.

The EV membrane response to PAHs differed entirely from that of bulk cellular membranes. First, control hepatocyte-derived EVs displayed a more rigid membrane than bulk cellular membranes (Figure 9A). Second, BP and DBA remarkably increased the membrane rigidity of these EVs, whereas PYR provoked significant fluidification relative to control EVs (Figure 9A).

A role for variations in cell membrane fluidity in EV release has been proposed (Nandi et al., 2009) and we observed changes in bulk membrane fluidity in our models. Thus, we investigated the involvement of changes in membrane fluidity in EV release and cell death. Ursodeoxycholic acid (UDCA), a known membrane stabilizer (Collin et al., 2014), prevented BP- and DBA-induced EV release (Figure 9C) and cell death (Figure 9D) by both hepatocyte types, suggesting the involvement of cell membrane fluidification in BP- and DBA-induced EV release. In contrast to

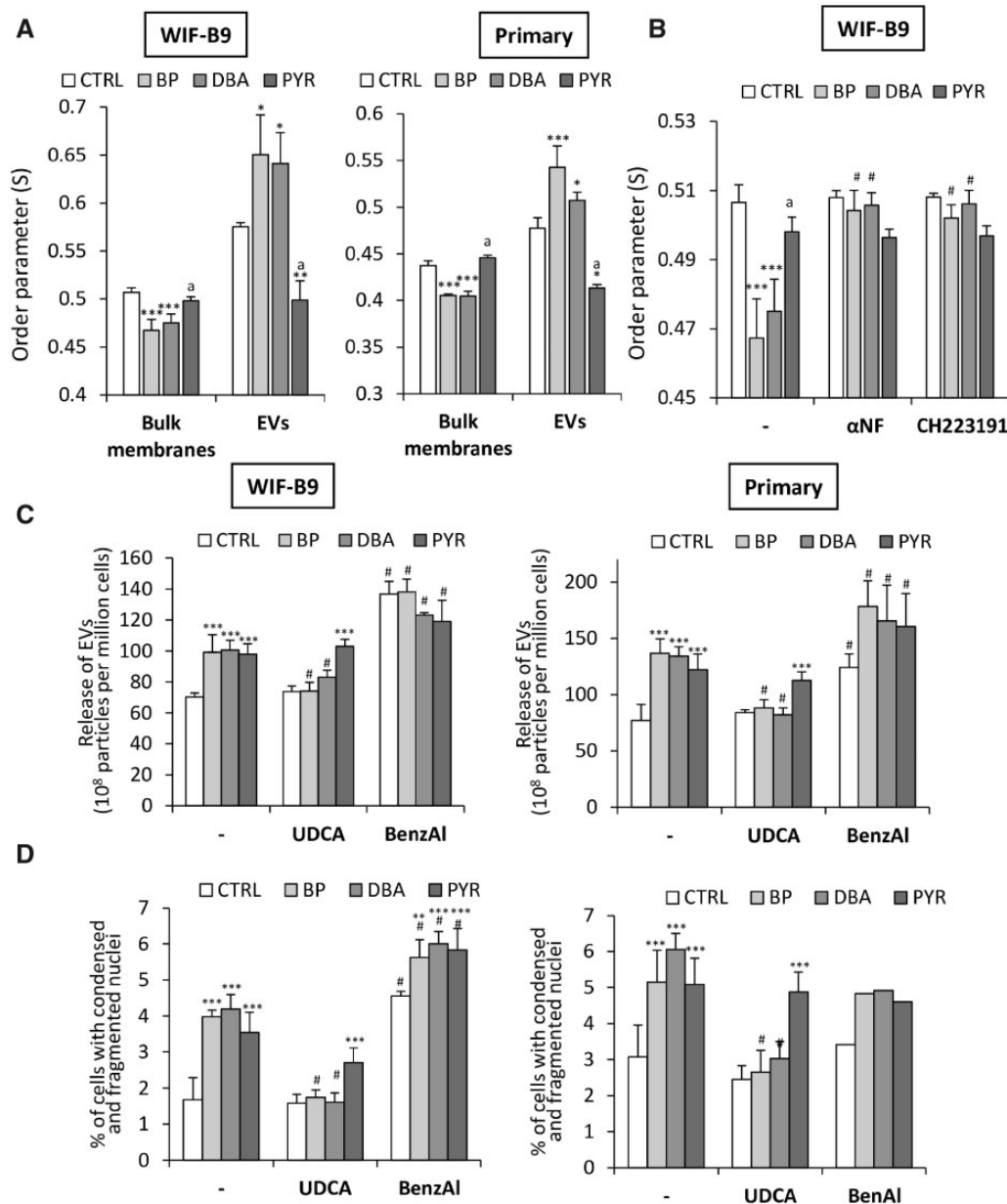


Figure 9. Membrane fluidity may be involved in the increase in EV release induced by BP and DBA. Changes in membrane fluidity of bulk and EV membranes of WIF-B9 (A, left panel and B) and primary hepatocytes (A, right panel) were monitored by electron paramagnetic resonance analysis of 12-doxylstearic acid embedded in the membranes, allowing the calculation of the order parameter (S), inversely related to membrane fluidity. EV release was evaluated by nanoparticle tracking analysis (C). Apoptosis was estimated by microscopic observation of the number of cells with condensed and/or fragmented chromatin after nuclear staining by Hoechst 33342 (D). WIF-B9 cells were exposed, or not, to 100 nM BP, DBA, or PYR for 72 h and primary rat hepatocytes were treated, or not, for 18 h with the same polycyclic aromatic hydrocarbons. Some cultures were pretreated for 1 h, or not (–), with 10 μ M α -naphthoflavone (α NF), 3 μ M CH223191 (CH223191), 25 μ M (WIF-B9), 100 μ M (Primary) UDCA, or 10 mM BenzAl. Values are given as the means \pm standard deviation of 3–7 independent experiments. Treated versus CTRL: * p < .05, ** p < .01, *** p < .001. PYR versus BP or DBA: ^a p < .001. Abbreviations: BenzAl, benzyl alcohol; BP, benzo[a]pyrene; CTRL, controls; DBA, dibenzo[a,h]anthracene; EV, extracellular vesicle; PYR, pyrene; UDCA, ursodeoxycholic acid sodium salt.

BP and DBA, UDCA did not modify the effects of PYR (Figs. 9C and 9D), further emphasizing a potential AhR-independent mechanism. We pretreated some cultures with benzyl alcohol (BenzAl), a recognized membrane fluidizer, to strengthen the evidence of a role of cell membrane fluidification in EV release. BenzAl treatment enhanced EV release and cell death in all PAH-treated cells, as well as control cells (Figs. 9C and 9D). Of note, the non-PAH AhR agonist, TCDD, which did not induce EV release in our models, was previously shown to rigidify liver membranes (Alsharif et al., 1990) and did not modify membrane

fluidity in the primary rat and WIF-B9 hepatocytes (Supplementary Figure 7C). Overall, these results demonstrate that only PAHs with high affinity for the AhR, but not all AhR agonists, are highly involved in the cell membrane fluidification required for EV release and cell death.

DISCUSSION

We show, for the first time, that environmental pollutants can cause increased release of EVs *in vitro* by hepatocytes and *in vivo*

in the plasma of exposed rats. The increased release of EVs induced by PAHs mainly consisted of exosomes, as for control hepatocytes, but with modified exosome protein markers, thus suggesting an important impact of PAHs on EV biogenesis. In this context, we investigated the mechanisms of EV production, paying special attention to those linked to cell death, as all tested PAHs, including PYR (the PAH with a low affinity for the AhR), were able to induce hepatocyte death.

First, we tested the role of the binding of several PAHs to the AhR, responsible for many of the biological effects of PAHs, notably by activation of CYP1 gene expression (Nebert et al., 2000). As expected, BP and DBA, but not PYR, activated CYP1 gene expression, thus showing strong binding to the AhR. We confirmed that the AhR and CYP1 are involved in the BP-induced apoptosis of hepatocytes, corroborating our previous studies (Collin et al., 2014; Huc et al., 2004, 2006). Here, we also show, for the first time, that the AhR and CYP1 are also involved in DBA-induced cell death, even though its high affinity for the AhR (Machala et al., 2001) and its capacity to trigger apoptosis in WB-F344 rat liver epithelial cells (Topinka et al., 2008) and HepG2 hepatocytes (Staal et al., 2007) has already been reported in independent studies. In addition, the increase in EV release due to BP and DBA was also related to CYP metabolism and AhR activation. However, 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD), a non-PAH agonist of the AhR, was unable to induce the release of EVs, whereas it triggered CYP1- and AhR-dependent apoptosis. This further highlights the fact that TCDD and PAHs may have a different response downstream of the AhR. Such a difference has indeed already been reported, notably concerning cell adhesion proteins (McGarry et al., 2002) and growth-related transcriptional factors (Zhao and Ramos, 1998). This may indicate the interest of EVs as a specific biomarker of PAH exposure.

We previously demonstrated the involvement of CYP1- and AhR-dependent BP-induced plasma membrane stress in hepatic cell death (Collin et al., 2014; Gorria et al., 2006, 2008; Tekpli et al., 2010, 2012). Thus, we investigated the possible participation of membrane remodeling in EV release, especially changes in cholesterol cellular concentration and membrane fluidity, focusing on PAHs with a high affinity for the AhR. As expected for BP, exposure to such PAHs led to a significant decrease in total cellular cholesterol. In addition, we also showed that cholesterol depletion is involved in EV release and cell death. Cholesterol depletion has also been shown to participate in EV release in other cell types, such as PC-3 human prostate cancer cells (Llorente et al., 2007), liver cells (Chen et al., 2010), and HEK-293 human embryonic kidney cells (Gioia et al., 2015), but no reliable effort has been made to decipher the mode of action. Here, we provide an explanation by connecting cholesterol depletion to membrane fluidification. Indeed, cholesterol is a well-known membrane stabilizer (Yang et al., 2016) and membrane fluidification was previously shown to be involved in the BP-induced apoptosis of F258 epithelial cells (Gorria et al., 2006) and primary rat hepatocytes (Collin et al., 2014). In our hepatocyte models, we also found such an increase in bulk membrane fluidity following treatment by either BP or DBA related to EV release and cell death. The importance of membrane fluidification in this process was highlighted by the experiments with pravastatin, an inhibitor of cholesterol biosynthesis, and benzylalcohol, a membrane fluidifier. Indeed, membrane fluidification was related to an increase in EV release for control cells treated with pravastatin and all cells treated with benzylalcohol, regardless of the condition tested. No further increase in EV release due to pravastatin could be obtained in PAH-treated hepatocytes, consistent with no detection of additional cholesterol

depletion or membrane fluidification. In addition, AhR antagonists, such as α NF and CH223191, showed this nuclear receptor to be involved in the increase in membrane fluidity of PAH-treated hepatocytes. As membrane fluidification appears to be a key player in the mode of action of PAHs with a high affinity for the AhR, it is worth noting that the non-PAH agonist of the AhR, TCDD, was unable to alter membrane fluidity, in accordance with its inability to trigger EV release. This suggests that the mechanism involving membrane fluidification is specific to PAHs with a high affinity for the AhR. Thus, EVs and their modifications could serve as potential biomarkers for PAH exposure and effects.

Surprisingly, despite its weak affinity for the AhR (Machala et al., 2001), as corroborated by the lack of induction of the AhR target gene CYP1 in both types of hepatocytes, PYR, a PAH widely found in food, also increased the production of EVs. However, PYR does not appear to use the mechanisms described above for PAHs with a high affinity for the AhR. Thus, neither cellular cholesterol depletion and the protective effect of cholesterol supplementation nor bulk membrane fluidification could be detected. We thus sought a different mechanism, specifically associated with the CAR, another nuclear receptor. Indeed, PYR has previously been described to induce its expression (Lee et al., 2007) and activity in mouse liver, leading to liver injury (Zhang et al., 2015). In our hepatocyte models, the CAR may be active and possibly involved in EV release only by PYR-treated cells. As EVs have already been reported to be pathogenic mediators in several liver diseases, such EV release mediated by PYR could be a new mechanism to explain how PYR can exert hepatotoxicity independently of AhR activation. Although the mechanism for PYR appears to involve the CAR rather than the AhR, PYR-dependent EV release may also involve cholesterol. Alterations in cholesterol levels specifically affected EVs and all tested PAHs were concerned. Indeed, treatment by all 3 PAHs led to an increase in the cholesterol content of EVs. This could also partially explain the increase in EV release, as cholesterol has been reported to promote membrane fusion (Yang et al., 2016). In addition, our results with the inhibitor of cholesterol biosynthesis, pravastatin, emphasize the importance of this mechanism. Indeed, unlike PAH-dependent cholesterol depletion that caused by pravastatin also affected organelle membranes and thus EVs. Consequently, pravastatin prevented PAHs from increasing the cholesterol content in EVs and hence from promoting EV release. Both nuclear receptors, the AhR and CAR, are likely to affect cholesterol in EVs, explaining why all tested PAHs could modify EV release. Indeed, the AhR has been reported to be capable of triggering cholesterol accumulation in the endosomal/lysosomal compartments of macrophages (Podechard et al., 2009) and the CAR to inhibit cholesterol transport outside the liver (Cheng et al., 2017). However, in both hepatocyte types, only EVs derived from BP- and DBA-treated cells exhibited an increase in membrane rigidity, whereas PYR provoked membrane fluidification of EVs. These differences may be related to changes in the composition of lipids other than cholesterol and merit further study.

Taken altogether, these data suggest a key role for cholesterol in the effects of PAHs on EV release (Figure 10). It is likely based on (1) cholesterol depletion of the plasma membrane, which increases membrane fluidity, thus promoting EV release and cell death, as observed for PAHs with a high affinity for the AhR, ie, BP and DBA, and (2) a cholesterol overload of EVs for all 3 PAHs, also responsible for the increase in EV release. Changes in exosome-specific protein content may reflect the prominent

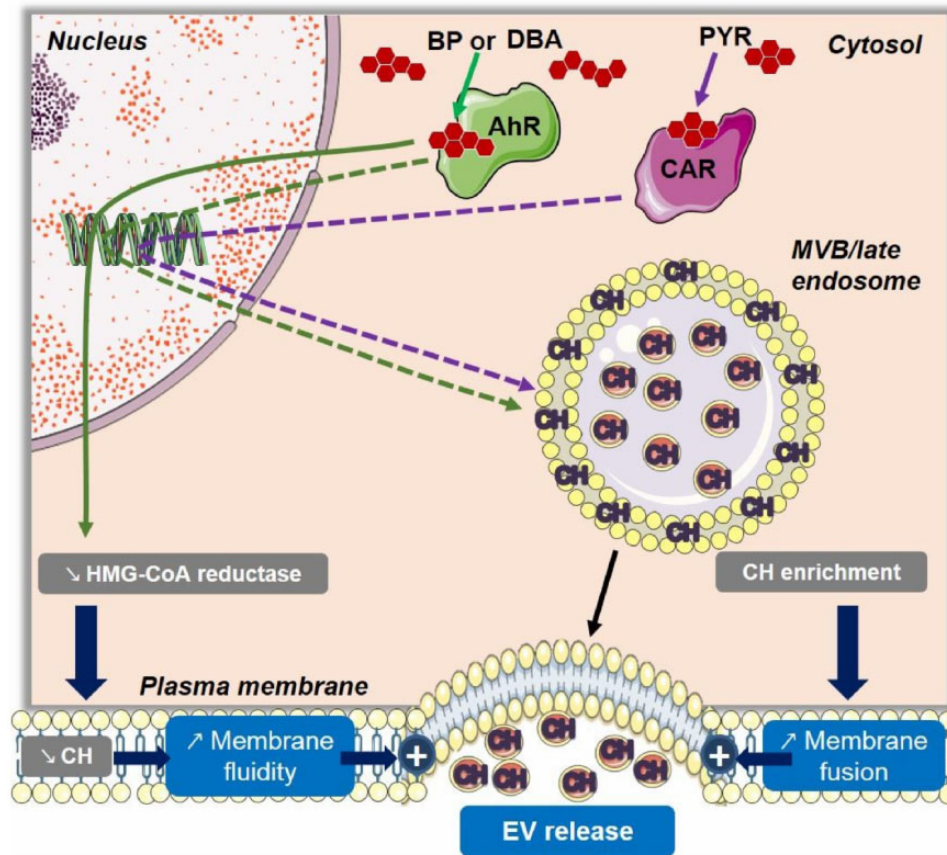


Figure 10. Proposed mechanism for the key role played by CH in polycyclic aromatic hydrocarbons-induced EV release by hepatocytes. Abbreviations: BP, benzo[a]pyrene; CH, cholesterol; DBA, dibenzo[a,h]anthracene; EV, extracellular vesicle; PYR, pyrene.

role played by cholesterol. Indeed, the PAH-induced increase in proteins (Tsg101 and Alix) of the ESCRT machinery, which play a major role in the generation of MVBs, could be the consequence of the increase in cholesterol content of the EVs induced by all 3 PAHs (Boura *et al.*, 2012; Chevallier *et al.*, 2008). Conversely, the decrease in the level of the tetraspanins, CD63 or CD81, and lipid raft marker proteins, flotillin and alkaline phosphatase, may also be related to the decrease in cholesterol content of the plasma membrane (Charrin *et al.*, 2003; Zimmerman *et al.*, 2016; Bodin *et al.*, 2014; Meister and Tikkanen, 2014). Moreover, a decrease in cholesterol content within lipid rafts upon exposure to BP of liver epithelial cells was previously demonstrated to be responsible for lipid raft-disruption and hence apoptosis (Tekpli *et al.*, 2010, 2012). Consequently, exosomes and changes in specific exosome protein markers could be used as biomarkers of PAH-induced hepatic cell death, especially as we observed an increase in EVs in the plasma of rats exposed to PAHs. In addition, EVs may also be potential biomarkers of TASH, as an increase in EVs was also detected in the sera of BP-treated HFD mice.

In conclusion, as EVs have been shown to be pathogenic mediators in the development of liver diseases, the ability of PAHs of various affinities for the AhR to stimulate the release of EVs paves the way for the discovery of new therapeutic strategies or diagnostic tools, notably in the case of TASH. Further studies are required to understand how PAH-induced changes in exosomes are likely to affect the cell and tissue environment to promote the development of liver diseases.

DATA AVAILABILITY

Supplementary data are available at <https://doi.org/10.5061/dryad.3n39r6k>.

FUNDING

“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 Cancéropôle Grand Ouest/Région Bretagne (CONCERTO project). Nettie van Meteren has a doctoral fellowship from the French Ministry for Higher Education and Research.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank the animal house platform ARCHE (SFR Biosit, Rennes, France) and Laurence Bernard-Touami for her assistance, and also Normand Podechard and Lydie Sparfel for their helpful discussion. We also wish to thank the society Alex Edelman and Associates, for correcting and modifying our manuscript to make the message clear and the style appropriate.

DECLARATION OF CONFLICTING INTERESTS

The author(s) declared no potential conflicts of interest with respect to the research, authorship, and/or publication of

this article'. If this is incorrect please supply the necessary text to identify the conflict of interest.

REFERENCES

- Ageberg, M., and Lindmark, A. (2003). Characterisation of the biosynthesis and processing of the neutrophil granule membrane protein CD63 in myeloid cells. *Clin. Lab. Haematol.* **25**, 297–306.
- Al-Eryani, L., Wahlang, B., Falkner, K. C., Guardiola, J. J., Clair, H. B., Prough, R. A., and Cave, M. (2015). Identification of environmental chemicals associated with the development of toxicant-associated fatty liver disease in rodents. *Toxicol. Pathol.* **43**, 482–497.
- Alexander, J., Benford, D., Cockburn, A., Cravedi J.-P., Dogliotti, E., Di Domenico, A., Fernandez-Cruz, M. L., Fink-Gremmels, J., Fürst, P., Galli, C. (2008). Polycyclic aromatic hydrocarbons in food. Scientific opinion of the panel on contaminants in the food chain. *EFSA J.* **724**, 1–114. <https://efsa.onlinelibrary.wiley.com/doi/epdf/10.2903/j.efsa.2008.724>. Accessed February 22, 2019.
- Alsharif, N. Z., Grandjean, C. J., Murray, W. J., and Stohs, S. J. (1990). 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD)-induced decrease in the fluidity of rat liver membranes. *Xenobiotica* **20**, 979–988.
- Arciello, M., Gori, M., Maggio, R., Barbaro, B., Tarocchi, M., Galli, A., and Balsano, C. (2013). Environmental pollution: a tangible risk for NADFLS pathogenesis. *Int. J. Mol. Sci.* **14**, 22052–22066.
- Biagini, C. P., Boissel, E., Borde, F., Bender, V. E., Bouskila, M., Blazy, F., Nicaise, L., Mignot, A., Cassio, D., and Chevalier, S. (2006). Investigation of the hepatotoxicity profile of chemical entities using Liverbeads and WIF-B9 *in vitro* models. *Toxicol. In Vitro* **20**, 1051–1059.
- Bodin, S., Planchon, D., Rios Morris, E., Comunale, F., and Gauthier, R. (2014). Flotillins in intercellular adhesion—from cellular physiology to human diseases. *J. Cell Sci.* **127**, 5139–5147.
- Boura, E., Ivanov, V., Carlson, L. A., Mizuuchi, K., and Hurley, J. H. (2012). Endosomal sorting complex required for transport (ESCRT) complexes induce phase-separated microdomains in supported lipid bilayers. *J. Biol. Chem.* **287**, 28144–28151.
- Braun, J. R., Willnow, T. E., Ishibashi, S., Ashwell, G., and Herz, J. (1996). The major subunit of the asialoglycoprotein receptor is expressed on the hepatocellular surface in mice lacking the minor receptor subunit. *J. Biol. Chem.* **271**, 21160–21166.
- Bucher, S., Begriche, K., Catheline, D., Trak-Smayra, V., Tiaho, F., Coulouarn, C., Pinon, G., Lagadic-Gossmann, D., Rioux, V., and Fromenty, B. (2019). Moderate chronic ethanol consumption exerts beneficial effects on nonalcoholic fatty liver in mice fed a high-fat diet: possible role of higher formation of triglycerides enriched in monounsaturated fatty acids. *Eur. J. Nutr.* doi: 10.1007/s00394-019-02017-1.
- Bucher, S., Tête, A., Podechard, N., Liamin, M., Le Guillou, D., Chevanne, M., Coulouarn, C., Imran, M., Gallais, I., and Fernier, M. (2018). Co-exposure to benzo[a]pyrene and ethanol induces a pathological progression of liver steatosis *in vitro* and *in vivo*. *Sci. Rep.* **13**, 5963.
- Charrin, S., Manié, S., Thiele, C., Billard, M., Gerlier, D., Boucheix, C., and Rubinstein, E. (2003). A physical and functional link between cholesterol and tetraspanins. *Eur. J. Immunol.* **33**, 2479–2489.
- Chen, C., Luo, F., Liu, X., Lu, L., Xu, H., Yang, Q., Xue, J., Shi, L., Li, J., and Zhang, A. (2017). NF- κ B-regulated exosomal miR-155 promotes the inflammation associated with arsenite carcinogenesis. *Cancer Lett.* **388**, 21–33.
- Chen, F. W., Li, C., and Ioannou, Y. A. (2010). Cyclodextrin induces calcium-dependent lysosomal exocytosis. *PLoS One* **5**, e15054.
- Cheng, S., Zou, M., Liu, Q., Kuang, J., Shen, J., Pu, J., Chen, S., Li, H., Wu, T., and Li, R. (2017). Activation of constitutive androstane receptor prevents cholesterol gallstone formation. *Am. J. Pathol.* **187**, 808–818.
- Cherian, M. T., Chai, S. C., Wright, W. C., Singh, A., Casal, M. A., Zheng, J., Wu, J., Lee, R. E., Griffin, P. R., and Chen, T. (2018). CINPA1 binds directly to constitutive androstane receptor and inhibits its activity. *Biochem. Pharmacol.* **152**, 211–223.
- Cherian, M. T., Lin, W., Wu, J., and Chen, T. (2015). CINPA1 is an inhibitor of constitutive androstane receptor that does not activate pregnane X receptor. *Mol. Pharmacol.* **87**, 878–889.
- Chevallier, J., Chamoun, Z., Jiang, G., Prestwich, G., Sakai, N., Matile, S., Parton, R. G., and Gruenberg, J. (2008). Lyso-bisphosphatidic acid controls endosomal cholesterol levels. *J. Biol. Chem.* **283**, 27871–27880.
- Cho, Y. E., Seo, W., Kim, D. K., Moon, P. G., Kim, S. H., Lee, B. H., Song, B. J., and Baek, M. C. (2018). Exogenous exosomes from mice with acetaminophen-induced liver injury promote toxicity in the recipient hepatocytes and mice. *Sci. Rep.* **8**, 16070.
- Collin, A., Hardonnière, K., Chevanne, M., Vuillemin, J., Podechard, N., Burel, A., Dimanche-Boitrel, M.-T., Lagadic-Gossmann, D., and Sergent, O. (2014). Cooperative interaction of benzo[a]pyrene and ethanol on plasma membrane remodeling is responsible for enhanced oxidative stress and cell death in primary rat hepatocytes. *Free Radic. Biol. Med.* **72**, 11–22.
- de Gassart, A., Géminard, C., Février, B., Raposo, G., and Vidal, M. (2003). Lipid raft-associated protein sorting in exosomes. *Blood* **102**, 4336–4344.
- Gioia, M., Vindigni, G., Testa, B., Raniolo, S., Fasciglione, G. F., Coletta, M., and Biocca, S. (2015). Membrane cholesterol modulates LOX-1 shedding in endothelial cells. *PLoS One* **10**, e0141270.
- Gorria, M., Tekpli, X., Rissel, M., Sergent, O., Huc, L., Landvik, N., Fardel, O., Dimanche-Boitrel, M.-T., Holme, J. A., and Lagadic, G. D. (2008). A new lactoferrin- and iron-dependent lysosomal death pathway is induced by benzo[a]pyrene in hepatic epithelial cells. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **228**, 212–224.
- Gorria, M., Tekpli, X., Sergent, O., Huc, L., Gaboriau, F., Rissel, M., Chevanne, M., Dimanche-Boitrel, M.-T., and Lagadic-Gossmann, D. (2006). Membrane fluidity changes are associated with benzo[a]pyrene-induced apoptosis in F258 cells: protection by exogenous cholesterol. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **1090**, 108–112.
- Grova, N., Fayss, F., Hardy, E. M., and 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.
- Harischandra, D. S., Ghaisas, S., Rokad, D., and Kanthasamy, A. G. (2017). Exosomes in toxicology: relevance to chemical exposure and pathogenesis of environmentally linked diseases. *Toxicol. Sci.* **158**, 3–13.
- Hessvik, N. P., and Lorente, A. (2018). Current knowledge on exosome biogenesis and release. *Cell. Mol. Life Sci.* **75**, 193–208.
- Hirsova, P., Ibrahim, S. H., Krishnan, A., Verma, V. K., Bronk, S. F., Werneburg, N. W., Charlton, M. R., Shah, V. H., Malhi, H., and Gores, G. J. (2016). Lipid-induced signaling causes release of

- inflammatory extracellular vesicles from hepatocytes. *Gastroenterology* **150**, 956–967.
- Holman, N. S., Mosedale, M., Wolf, K. W., LeCluyse, E. L., and Watkins, P. B. (2016). Subtoxic alterations in hepatocyte-derived exosomes: an early step in drug-induced liver injury. *Toxicol. Sci.* **151**, 365–375.
- Holme, J. A., Gorria, M., Arlt, V. M., Ovrebo, S., Solhaug, A., Tekpli, X., Landvik, N. E., Huc, L., Fardel, O., and Lagadic-Gossmann, D. (2007). Different mechanisms involved in apoptosis following exposure to benzo[a]pyrene in F258 and Hepa1c1c7 cells. *Chem. Biol. Interact.* **167**, 41–55.
- Huc, L., Rissel, M., Solhaug, A., Tekpli, X., Gorria, M., Torriglia, A., Holme, J. A., Dimanche-Boitrel, M.-T., and Lagadic-Gossmann, D. (2006). Multiple apoptotic pathways induced by p53-dependent acidification in benzo[a]pyrene-exposed hepatic F258 cells. *J. Cell. Physiol.* **208**, 527–537.
- Huc, L., Sparfel, L., Rissel, M., Dimanche-Boitrel, M.-T., Guillouzo, A., Fardel, O., and Lagadic-Gossmann, D. (2004). Identification of Na⁺/H⁺ exchange as a new target for toxic polycyclic aromatic hydrocarbons. *FASEB J.* **18**, 344–346.
- Jiang, Y., Ou, Y., and Cheng, X. (2013). Role of TSG101 in cancer. *Front Biosci.* **18**, 279–288.
- Kornek, M., Lynch, M., Mehta, S. H., Lai, M., Exley, M., Afdhal, N. H., and Schuppan, D. (2012). Circulating microparticles as disease-specific biomarkers of severity of inflammation in patients with hepatitis C or non alcoholic steatohepatitis. *Gastroenterology* **143**, 448–458.
- Kowal, J., Arras, G., Colombo, M., Jouve, M., Morath, J. P., Primdal-Bengtson, B., Dingli, F., Loew, D., Tkach, M., and Théry, C. (2016). Proteomic comparison defines novel markers to characterize heterogeneous populations of extracellular vesicle subtypes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **113**, E968–E977.
- Lee, C.-H., Ito, Y., Yanagiba, Y., Yamanoshita, O., Kim, H., Zhang, S.-Y., Kamijima, M., Gonzalez, F. J., and Nakajima, T. (2007). Pyrene-induced CYP1A2 and SULT1A1 may be regulated by CAR and not by AhR. *Toxicology* **238**, 147–156.
- Llorente, A., van Deurs, B., and Sandvig, K. (2007). Cholesterol regulates prostatesome release from secretory lysosomes in PC-3 human prostate cancer cells. *Eur. J. Cell. Biol.* **86**, 405–415.
- Machala, M., Vondracek, J., Blaha, L., Ciganek, M., and Neca, J. (2001). Aryl hydrocarbon receptor-mediated activity of mutagenic polycyclic aromatic hydrocarbons determined using in vitro reporter gene assay. *Mutation Res.* **497**, 49–62.
- Maji, S., Matsuda, A., Yan, I. K., Parasramka, M., and Patel, T. (2017). Extracellular vesicles in liver diseases. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver. Physiol.* **312**, G194–G200.
- McGarry, M. A., Charles, G. D., Medrano, T., Bubb, M. R., Grant, M. B., Campbell-Thompson, M., and Shiverick, K. T. (2002). Benzo(a)pyrene, but not 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin, alters cell adhesion proteins in human uterine RL95-2 cells. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **294**, 101–107.
- Meister, M., and Tikkanen, R. (2014). Endocytic trafficking of membrane-bound cargo: a flotillin point of view. *Membranes* **4**, 356–371.
- Momen-Heravi, F., Saha, B., Kodys, K., Catalano, D., Satishchandran, A., and Szabo, G. (2015). Increased number of circulating exosomes and their microRNA cargos are potential novel biomarkers in alcohol hepatitis. *J. Transl. Med.* **13**, 261. doi: 10.1186/s12967-015-0623-9.
- Nandi, S., Ma, L., Denis, M., Karwatsky, J., Li, Z., Jiang, X.-C., and Zha, X. (2009). ABCA1-mediated cholesterol efflux generates microparticles in addition to HDL through processes governed by membrane rigidity. *J. Lipid Res.* **50**, 456–466.
- Nebert, D. W., Roe, A. L., Dieter, M. Z., Solis, W. A., Yang, Y., and Dalton, T. P. (2000). Role of the aromatic hydrocarbon receptor and [ah]gene battery in the oxidative stress response, cell cycle and apoptosis. *Biochem. Pharmacol.* **59**, 65–85.
- Palmulli, R., and van Niel, G. (2018). To be or not to be secreted as exosomes, a balance finely tuned by the mechanisms of biogenesis. *Essays Biochem.* **62**, 177–191.
- Podechard, N., Le Ferrec, E., Rebillard, A., Fardel, O., and Lecureur, V. (2009). NPC1 repression contributes to lipid accumulation in human macrophages exposed to environmental aryl hydrocarbons. *Cardiovasc. Res.* **82**, 361–370.
- Rautou, P.-E., Bresson, J., Sainte-Marie, Y., Vion, A.-C., Paradis, V., Renard, J.-M., Devue, C., Heymes, C., Letteron, P., Elkrief, L., et al. (2012). Abnormal plasma microparticles impair vasoconstrictor responses in patients with cirrhosis. *Gastroenterology* **143**, 166–176.
- Record, M., Carayon, K., Poirot, M., and Silvente-Poirot, S. (2014). Exosomes as a new vesicular lipid transporters involved in cell-cell communication and various pathophysiological. *Biochim. Biophys. Acta* **1841**, 108–120.
- Salaün, C., James, D. J., and Chamberlain, L. H. (2004). Lipid rafts and the regulation of exocytosis. *Traffic* **5**, 255–264.
- Skotland, T., Sandvig, K., and Llorente, A. (2017). Lipids in exosomes: current knowledge and the way forward. *Prog. Lipid Res* **66**, 30–41.
- Staal, Y. C. M., Hebel, D. G. A. J., van Herwijnen, M. H. M., Gottschalk, R. W. H., van Schooten, F. J., and van Delft, J. H. M. (2007). Binary PAH mixtures cause additive or antagonistic effect on gene expression but synergistic effects on DNA adduct formation. *Carcinogenesis* **28**, 2632–2640.
- Strauss, K., Goebel, C., Runz, H., Möbius, W., Weiss, S., Feussner, I., Simons, M., and Schneider, A. (2010). Exosome secretion ameliorates lysosomal storage of cholesterol in Niemann-Pick type C disease. *J. Biol. Chem.* **285**, 26279–26288.
- Szabo, G., and Momen-Heravi, F. (2017). Extracellular vesicles in liver disease and potential as biomarkers and therapeutic targets. *Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol.* **14**, 455–466.
- Tekpli, X., Huc, L., Sergent, O., Dendelé, B., Dimanche-Boitrel, M.-T., Holme, J. A., and Lagadic-Gossmann, D. (2012). NHE-1 relocation outside cholesterol-rich membrane microdomains is associated with its benzo[a]pyrene-related apoptotic function. *Cell. Physiol. Biochem.* **29**, 657–666.
- 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[a]pyrene-induced apoptosis. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **243**, 68–76.
- Topinka, J., Marvanová, S., Vondráček, J., Sevastyanova, O., Nováková, Z., Krčmář, P., Pěncíková, K., and Machala, M. (2008). DNA adducts formation and induction of apoptosis in rat liver epithelial 'stem-like' cells exposed to carcinogenic polycyclic aromatic hydrocarbons. *Mutation Res.* **638**, 122–132.
- Verma, V. K., Li, H., Wang, R., Hirsova, P., Mushref, M., Liu, Y., Cao, S., Contreras, P. C., Malhi, H., Kamath, P. S., et al. (2016). Alcohol stimulates macrophage activation through caspase-dependent hepatocyte derived release of CD40L containing extracellular vesicles. *J. Hepatol.* **64**, 651–660.
- Wahlang, B., Beier, J. I., Clair, H. B., Bellis-Jones, H. J., Falkner, K. C., McClain, C. J., and Cave, M. C. (2013). Toxicant-associated steatohepatitis. *Toxicol. Pathol.* **41**, 343–360.
- Ward, J., Kanchagar, C., Veksler-Lublinsky, I., Lee, R. C., McGill, M. R., Jaeschke, H., Curry, S. C., and Ambros, V. R. (2014). Circulating microRNA profiles in human patients with

- acetaminophen hepatotoxicity or ischemic hepatitis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **111**, 12169–12174.
- Yang, S.-T., Kreutzberger, A. J. B., Lee, J., Kiessling, V., and Tamm, L. K. (2016). The role of cholesterol in membrane fusion. *Chem. Phys. Lipids* **199**, 136–143.
- Zhang, X.-J., Shi, Z., Lyv, J.-X., He, X., Englert, N. A., and Zhang, S.-Y. (2015). Pyrene is a novel constitutive androstane receptor (CAR) activator and causes hepatotoxicity by CAR. *Toxicol. Sci.* **147**, 436–445.
- Zhao, W., and Ramos, K. S. (1998). Modulation of hepatocyte gene expression by the carcinogen benzo[a]pyrene. *Toxicol. In Vitro* **12**, 395–402.
- 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.

Figure S1: Dose and time response exposure in terms of cell death and proliferation in WIF-B9 cells upon PAH exposure in terms of cell death and proliferation. Apoptosis was estimated by microscopic observation of the number of cells with condensed and/or fragmented chromatin after nuclear staining by Hoechst 33342 (A,B,C). The amount of metabolically active viable hepatocytes was evaluated by the mitochondrial succinate dehydrogenase activity using a MTT assay (D). This amount was proportional to the absorbance at 570 nm. WIF-B9 cells were exposed or not to 50 nM, 100 nM or 1 μ M BP (A), DBA (B) or PYR (C) for 24, 48 or 72 hours. Values are given as means \pm standard deviation of 3 to 5 independent experiments. Non treated cells *versus* treated with PAHs : * p< 0.05 ; **p<0.01 ; ***p<0.001 .

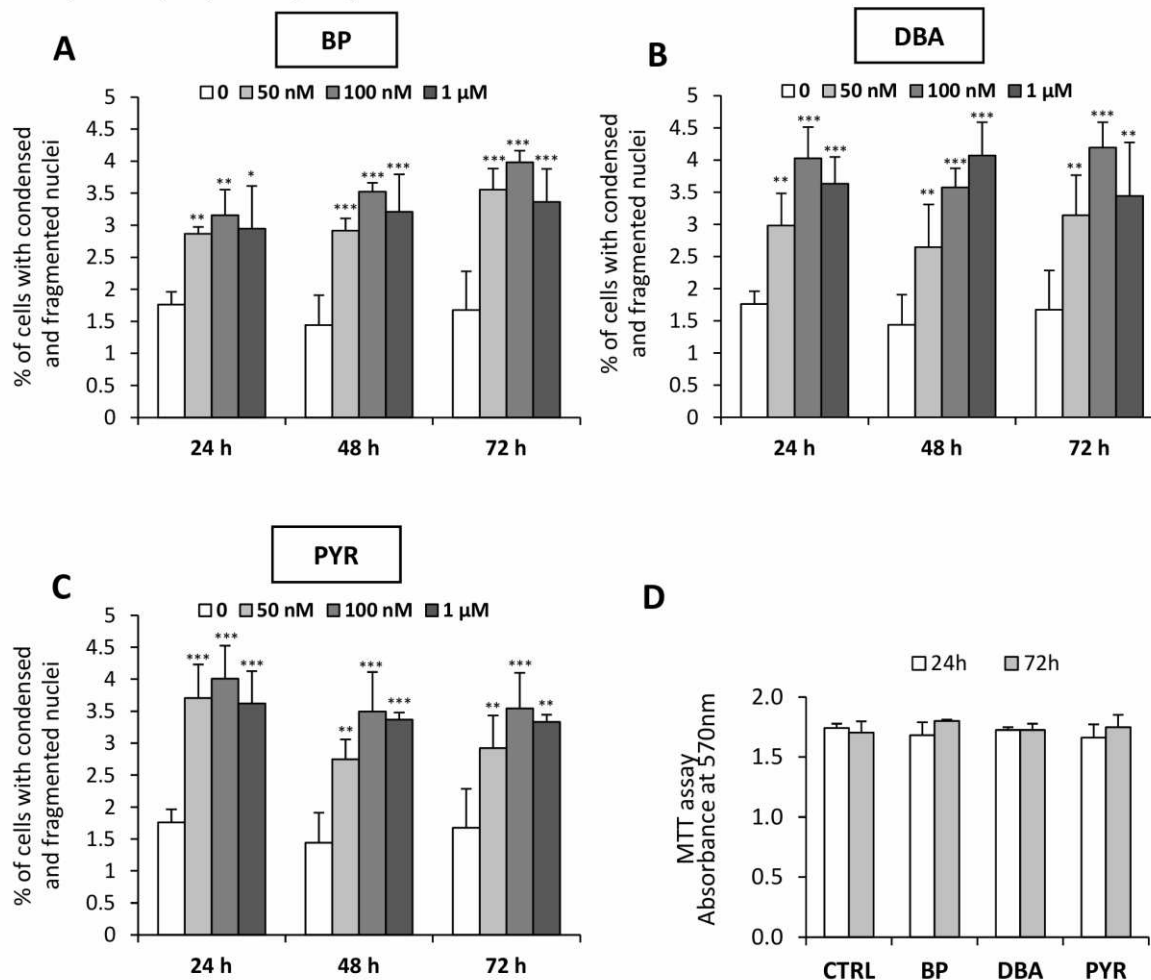


Figure S2 : Original pictures of western-blots from which some results are extracted for a presentation in figure 2C. Results of figure 2C concern only EVs and cell lysates from untreated cells and not the other tests related to cells treated by PAHs. Results for EVs and corresponding cell lysates from untreated cells are shown in red and blue inserts, respectively.

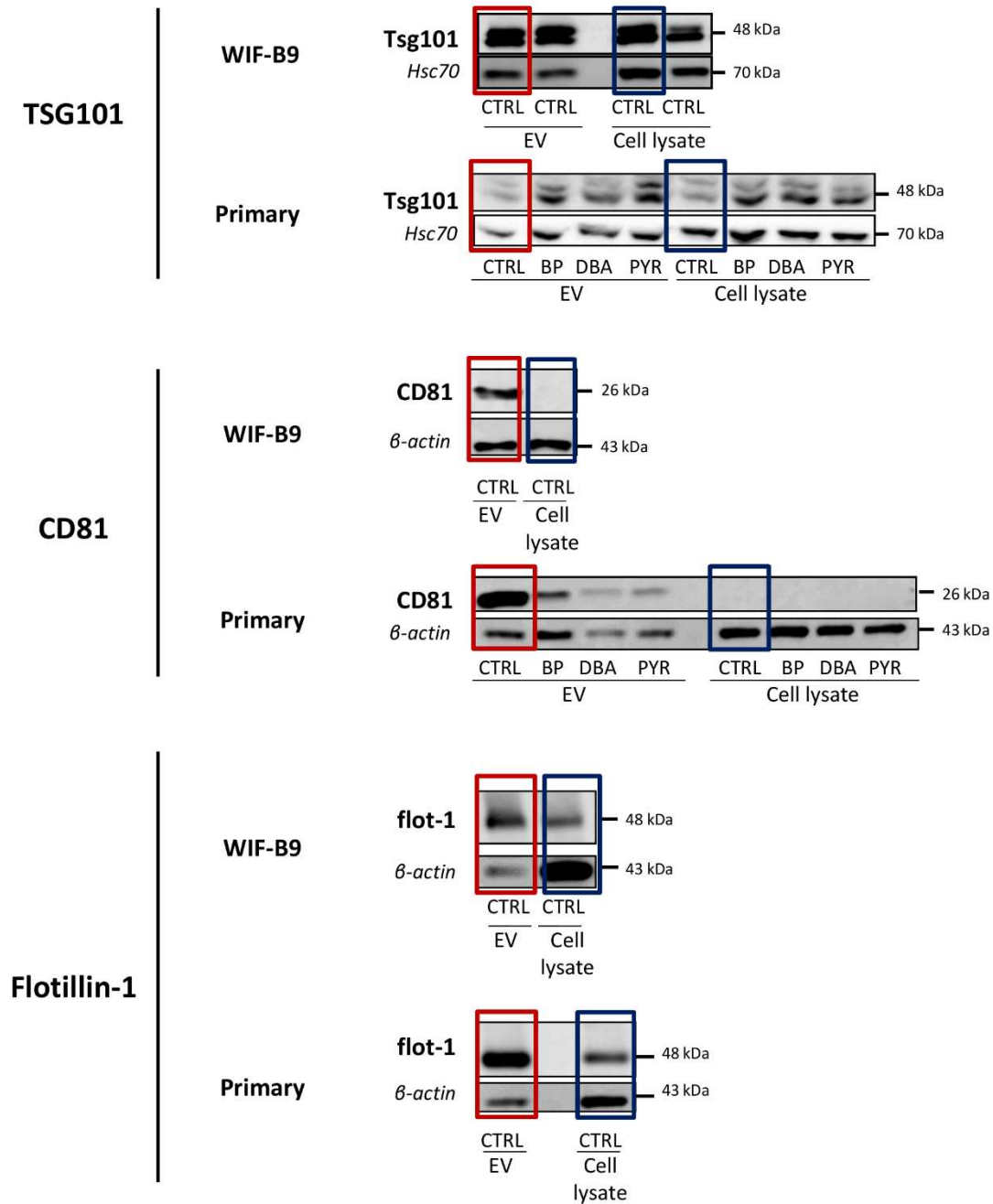


Figure S3 : PAHs do not affect the size of EVs released by WIF-B9 cells. (A-C) NTA analysis of mean size of total EVs, exosomes (diameter of less than 200 nm) or microvesicles (diameter higher than 200 nm). WIF-B9 cells were exposed or not to 100 nM BP, DBA or PYR for 5 (A), 24 (B) or 72 hours (C). Values are given as means +/- standard deviation of 3 to 7 independent experiments. (D-F) Representative distribution patterns of EVs depending on their diameter estimated by NTA for WIF-B9 treated or not with PAHs for 72 hours.

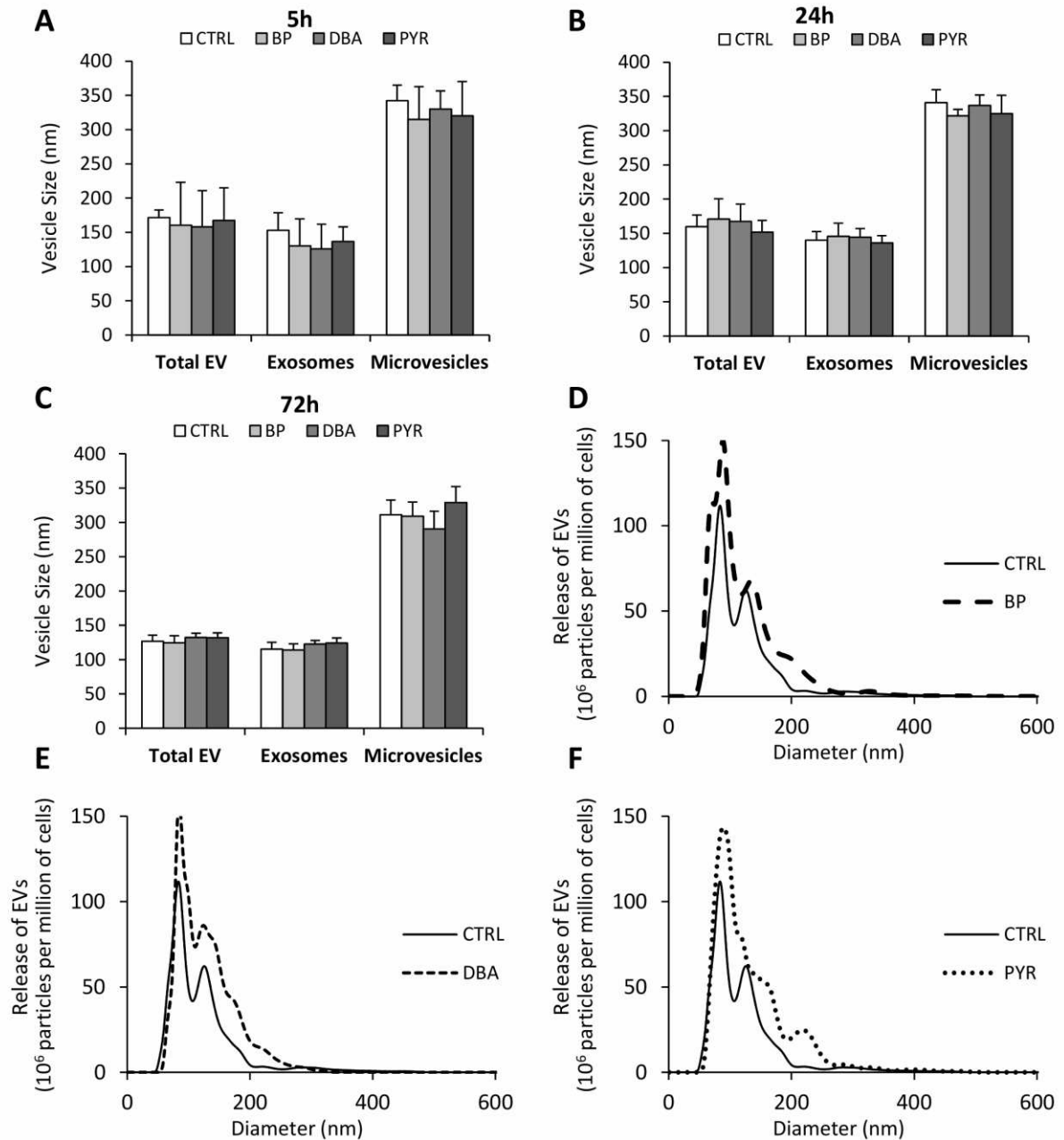


Figure S4 : PAHs do not affect the size of EVs released by primary rat hepatocytes. (A-C) NTA analysis of mean size of total EVs, exosomes (diameter of less than 200 nm) or microvesicles (diameter higher than 200 nm). Primary rat hepatocytes were exposed or not to 100 nM BP, DBA or PYR for 2 (A), 5 (B) or 18 hours (C). Values are given as means \pm standard deviation of 3 to 7 independent experiments. (D-F) Representative distribution patterns of EVs depending on their diameter estimated by NTA for primary rat hepatocytes treated or not with PAHs for 18 hours.

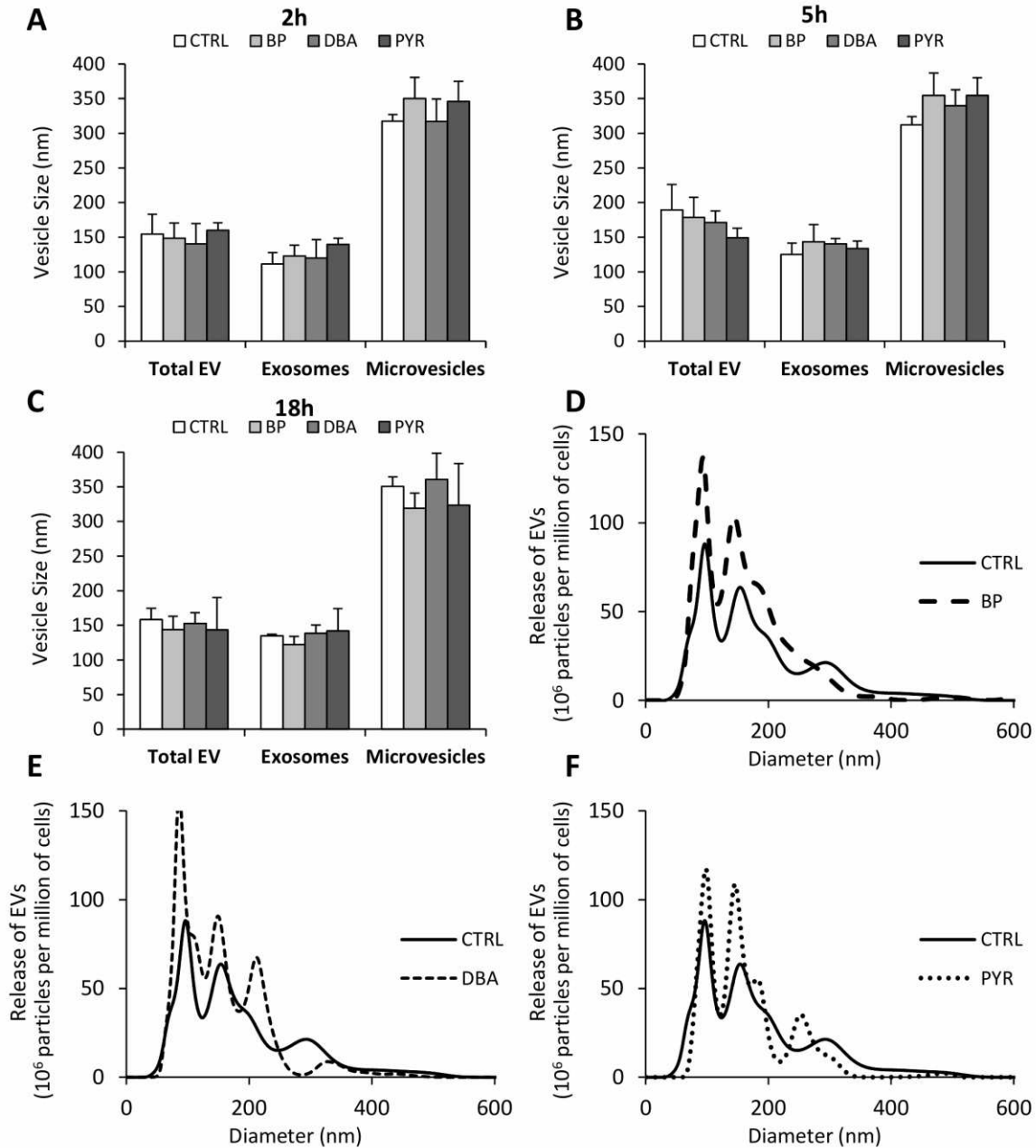


Figure S5 : mRNA expression of CYP1A1, CYP1A2, CYP1B1 and CYP2C6 in WIF-B9 cells and primary rat hepatocytes. mRNA levels were measured by RT-qPCR. WIF-B9 cells (A-D) and primary rat hepatocytes (E-G) were exposed or not to 100 nM BP, DBA or PYR for 72 hours and 18 hours, respectively. Results are means \pm SD for at least three independent cultures. Treated with PAHs versus CTRL : * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$. PYR versus BP or DBA: a $p < 0.01$.

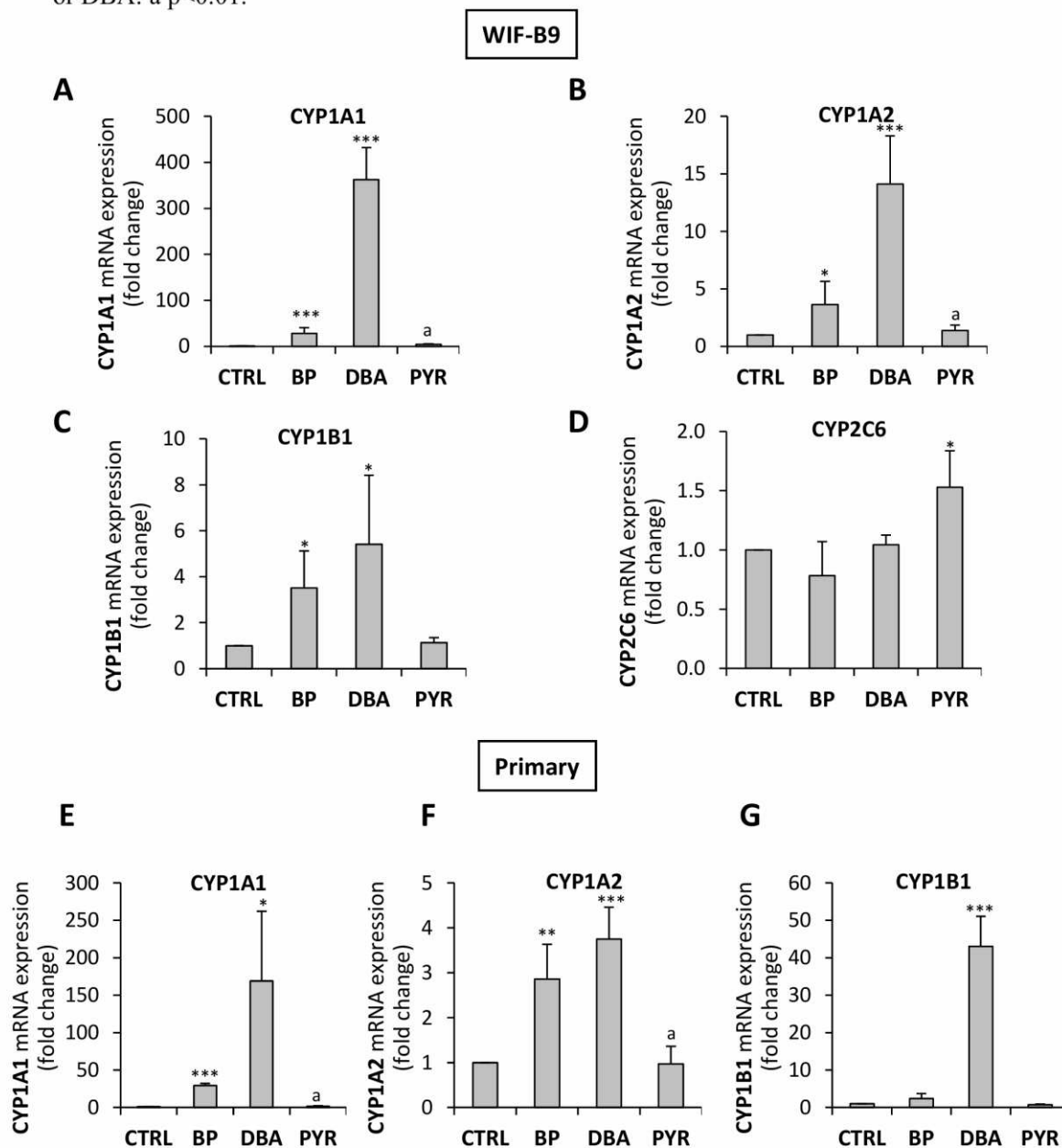


Figure S6 : CYP1 activity in WIF-B9 and primary rat hepatocytes. CYP1 enzyme activity was assessed by measuring EROD activity from intact cells by spectrofluorimetry. (A) WIF-B9 cells and primary rat hepatocytes were exposed or not to 100 nM BP, DBA or PYR for 5 and 18 hours (Primary and WIF-B9), 48 and 72 hours (only WIF-B9). Results are means \pm SD for at least three independent cultures. (B,C) Some cultures were pre-treated for 1 hour or not (-) with 10 μ M α -naphthoflavone (α NF), an inhibitor of CYP1 activity and antagonist of AhR, 3 μ M CH223191 (CH223191), a specific antagonist of AhR, or 0.3 μ M CINPA1 (CINPA1), a potential inhibitor of CAR. Values are given as means \pm standard deviation of 3 to 4 independent experiments. Treated with PAHs versus CTRL : * p <0.05 ; ** p <0.01 ; *** p <0.001; α NF, CH223191 pre-treated versus non pre-treated: # p <0.01. PYR versus BP or DBA: a p <0.01.

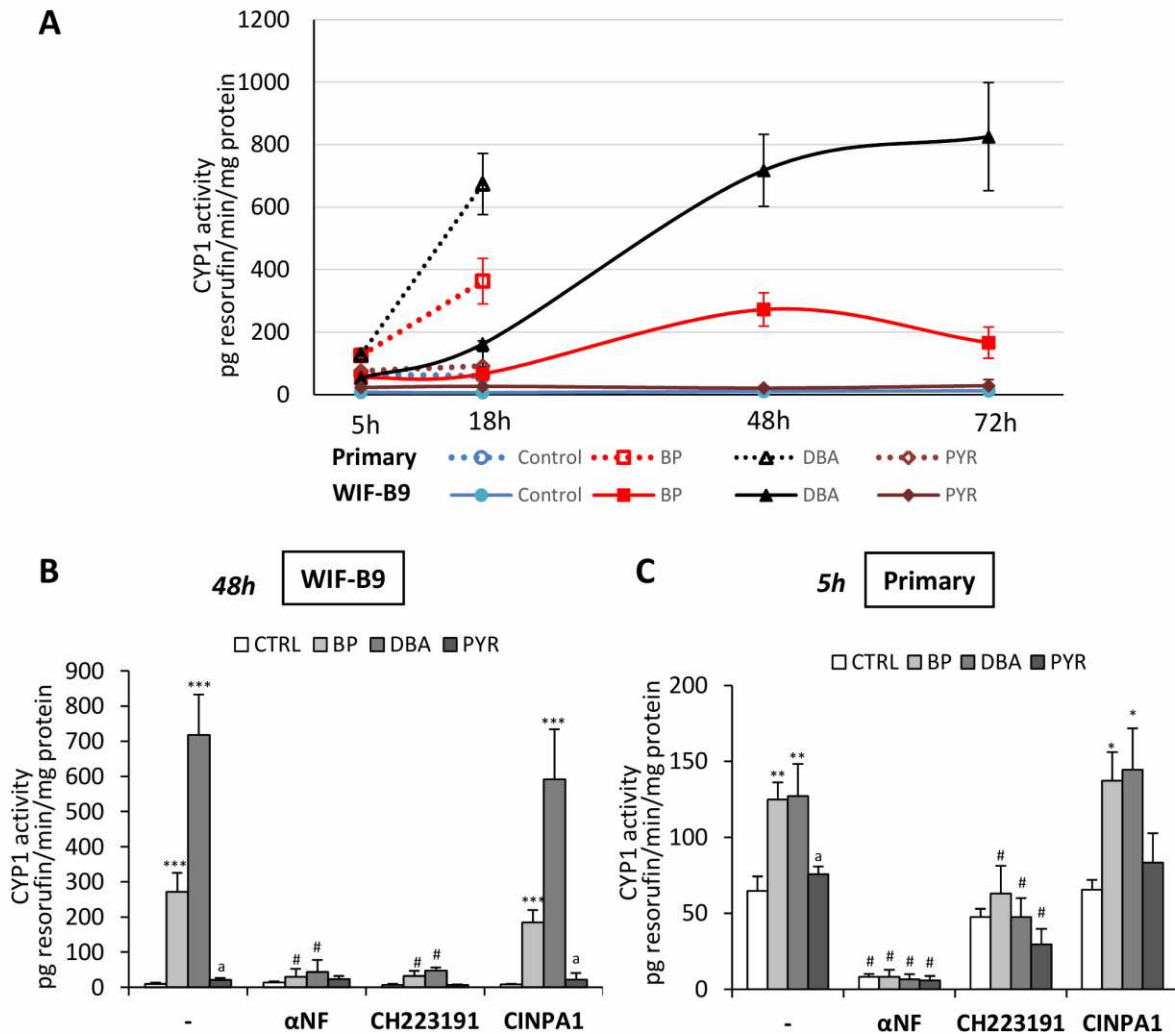


Figure S7 : Cell death and EV release of WIF-B9 cells and primary rat hepatocytes exposed to AhR agonist TCDD. Apoptosis was estimated by microscopic observation of the number of cells with condensed and/or fragmented chromatin after nuclear staining by Hoechst 33342 (A,B). EV release was evaluated by NTA (C,D) and membrane fluidity was measured by EPR (E,F). WIF-B9 (A,C,E) and primary rat hepatocytes (B,D,F) were exposed or not to 100 nM BP or 10 nM TCDD for 72 hours and 18 hours respectively. Some cultures were pre-treated for 1 hour or not (-) with 10 μ M α -naphthoflavone (α NF), an inhibitor of CYP1 activity and antagonist of AhR, and 3 μ M CH223191 (CH223191), a specific antagonist of AhR. Values are given as means \pm standard deviation of 3 to 4 independent experiments (except for TCDD in D : n=2 and in E and F : n=1). Treated with BP or TCDD versus CTRL : *p<0.05 ; **p<0.01 ; ***p<0.001; α NF or CH223191 pre-treated versus non pre-treated: #p<0.01.

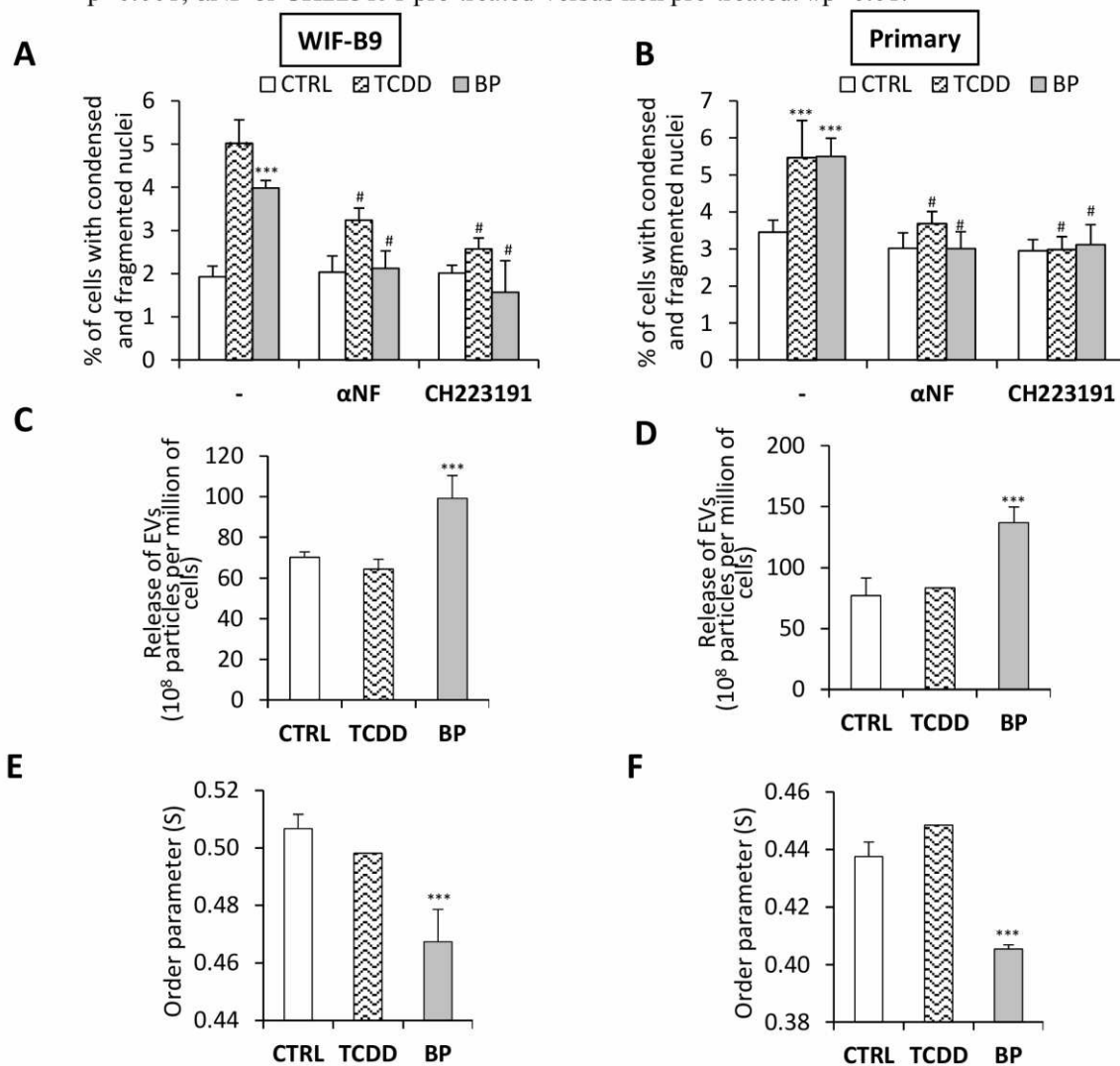


Figure S8 : Effects of pravastatin on cholesterol content of hepatocytes (A,B) and EVs (E) and also on bulk membrane fluidity (C,D) . WIF-B9 (A,C,E) and primary rat hepatocytes (B,D) were exposed or not to 100 nM BP, DBA or PYR for 72 hours and for 18 hours respectively. Some cultures were pre-treated for 1 hour or not (-) with 10 μ M pravastatin (Pra). Total amount of cholesterol was determined by spectrophotometry in cells and EVs. Changes in membrane fluidity were monitored by EPR in cells. Values are given as means +/- standard deviation of 3 to 7 independent experiments (except for Pra in E : n=2). Treated with PAHs versus CTRL : *p<0.05 ; **p<0.01 ; *p<0.001. Pra pre-treated versus non pre-treated: #p<0.01. PYR versus BP or DBA : a p< 0.001.**

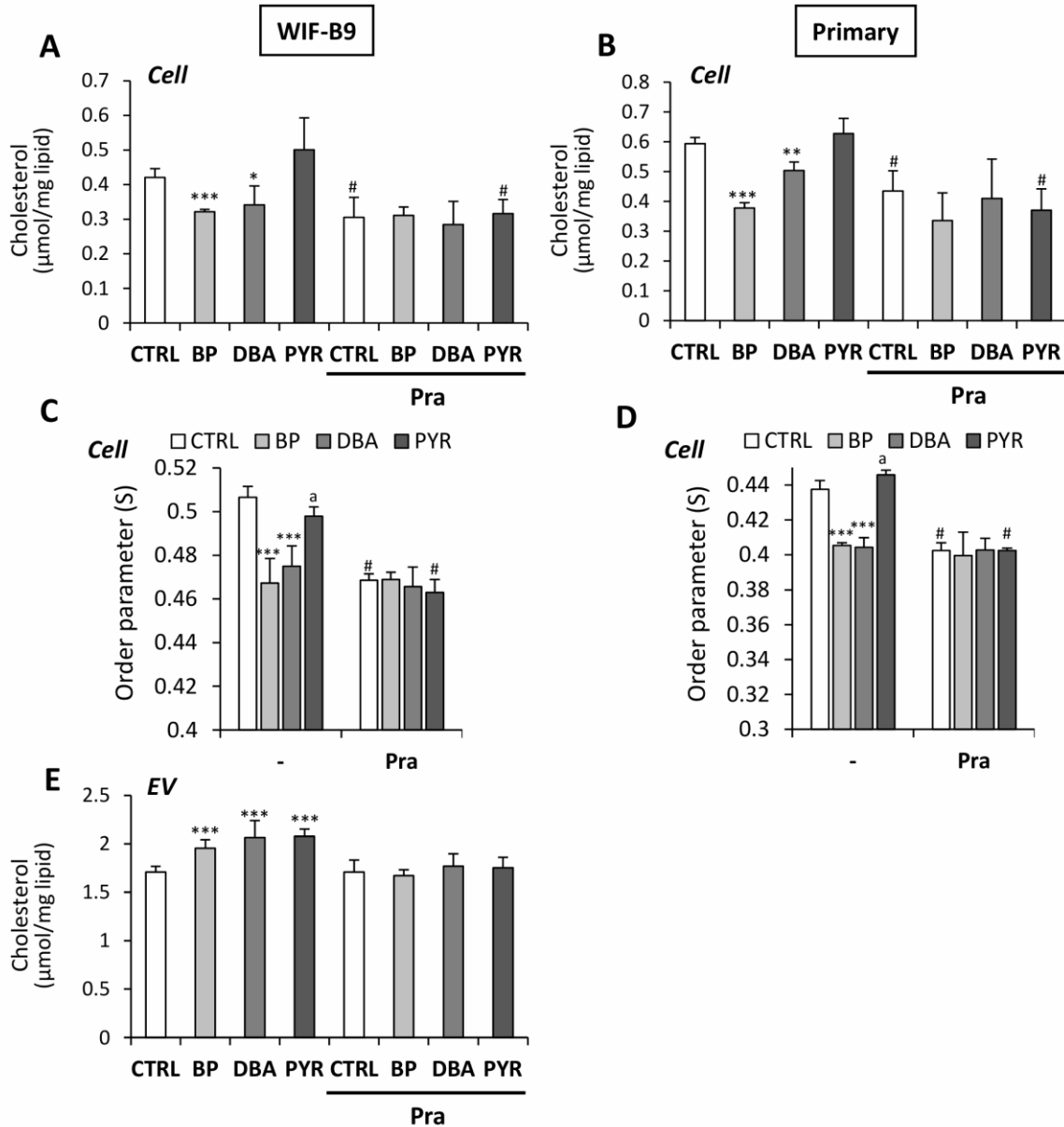


Table S1: Selected PAH properties.

	Benzo[a]pyrene (BP)	Dibenzo[a,h]anthracene (DBA)	Pyrene (PYR)
IARC classification	1	2A	3
Occurrence in food	++	+	++++
AhR affinity	+++	++++	+

Table S2: Concentration of PAHs in human serum and daily intake of PAHs.

PAHs in human serum (nM)				
References	Subjects	BP	DBA	PYR
<i>Luzardo et al, 2019</i>	121			2
<i>Neal et al, 2008</i>	10	0.9		1
<i>Walker et al, 2016</i>	30	13		
<i>Xia et al, 2016</i>	200	22	53.2	1.4
PAH daily intake (ng/day/person)				
References	Exposure source	BP	DBA	PYR
<i>Alexander et al, 2008</i>	Dietary intake	50-290	30-80	350-1090
<i>SCF, 2002</i>	Drinking water*	0.2-2	0.2-2	0.2-200
	Air	20	2	100

* : assuming an ingestion of 2 l/day

References :

- Alexander, J., Benford, D., Cockburn, A., Cravedi J.-P., Dogliotti, E., Di Domenico, A., Fernandez-Cruz, M.L., Fink-Gremmels, J., Fürst, P., Galli, C., et al. (2008). Polycyclic aromatic hydrocarbons in food. Scientific opinion of the panel on contaminants in the food chain. *EFSA Journal* **724**,1-114. <https://efsa.onlinelibrary.wiley.com/doi/epdf/10.2903/j.efsa.2008.724>
- Luzardo, O.P., Badea, M., Zumbado, M., Rogozea, L., Floroian, L., Ilea, A., Moga, M., Sechel, G., Boada, L.D. and Henriquez-Hernandez, L.A. (2019) Body burden of organohalogenated pollutants and polycyclic aromatic hydrocarbons in Romanian population: influence of age, gender, body mass index, and habitat. *Sci Total Environ.* **656**, 709-716.
- Neal, M.S., Zhu, J., 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.
- SCF (Scientific Committee on Food- European Commission). (2002) Polycyclic Aromatic Hydrocarbons – Occurrence in foods, dietary exposure and health effects, A1-A194. https://ec.europa.eu/food/sites/food/files/safety/docs/sci-com_scf_out154_en.pdf
- Walker, D.I., Pennell, K.D., Uppel, K., Xia, X., Hopke, P.K., Utell, M.J., Phipps, R.P., Sime; P.J., Rohrbeck, P., Mallon, T.M. and Jones, D.P. (2016) Pilot metabolome-wide association study of benzo(a)pyrene in serum from military personnel. *J. Occup. Environ. Med.* **58**(8 Suppl1), S44-S52.
- Xia, X., Carroll-Haddad, A., Brown, N., Utell, M.J., Mallon, T. and Hopke, P.K. (2016) Polycyclic aromatic hydrocarbons and polychlorinated dibenzo-p-dioxins/dibenzofurans in microliter samples of human serum as exposure indicators. *J. Occup. Environ. Med.* **58**, S72-S79.

Table S3: Pre-treatment of WIF-B9 and primary rat hepatocytes.

Compound	<i>Function</i>	Concentration (μM)
α-naphthoflavone (αNF)	<i>Inhibitor of CYP1 activity and antagonist of AhR</i>	10
Benzyl Alcohol (BenzAl)	<i>Membrane fluidizing agent</i>	10. 10 ³
Cholesterol (Chol)	<i>Supplementation in cholesterol</i>	77
CH223191	<i>Specific antagonist of AhR</i>	3
CINPA1	<i>Potent CAR inhibitor</i>	0.3
Mevalonate (Mev)	<i>Precursor of cholesterol</i>	25
Pravastatin (Pra)	<i>Competitive inhibitor of HMG-CoA reductase</i>	10
Ursodeoxycholic acid sodium salt (UDCA)	<i>Membrane stabilizing agent</i>	25 (WIF-B9) 100 (Primary)
Z-VAD-FMK (Z-VAD)	<i>Inhibitor of caspases 3/7 activity</i>	10

Table S4 : Culture medium volume needed for EV isolation

Culture medium volume (mL)	<i>Experiment</i>	Final volume of the EV suspension in PBS (μ L)
4 – 24	<i>Nanoparticle tracking analysis</i>	100
48	<i>Transmission electron microscopy</i>	25
48-72	<i>Protein assay</i>	200
144- 216	<i>Electron paramagnetic resonance</i>	60
96	<i>Cholesterol content</i>	100

Table S5 : List of primers used for RT-qPCR experiments

Gene	Accession Number	Forward primer	Reverse primer
CYP1A1	NM_012540.2	TCCTTCCTCACAGCCAAAGCAG	CCGGGTGGACTCTTCAGACC
CYP1A2	NM_012541.3	CCCTGCCCTTCAGTCGTACAG	CCGGGAGGACTCTTCAGAC
CYP1B1	XM_003748910.1	TCCTTGGGGACTCTCAGGTT	TGTTGGGTAGACAGCGAGC
CYP2C6	XM_003748910.1	CTGTGACCAACCAGCTAAAGTC CAG	CTCCATGCGGGCTAGGCCCT

II. Article 2

Nettie van Meteren, Dominique Lagadic-Gossmann, Normand Podechard, Dimitri Gobart, Martine Chevanne, Aurore Collin, Isabelle Gallais, Agnès Burel, Aurélien Dupont, Ludivine Rault, Soizic Chevance, Fabienne Gauffre, Eric Le Ferrec, et Odile Sergent

Les vésicules extracellulaires libérées par des hépatocytes exposés à des hydrocarbures aromatiques polycycliques déclenchent un stress oxydant par un transfert de fer

*publié dans le journal **FREE RADICAL BIOLOGY AND MEDICINE***

Free Radical Biology and Medicine, Volume 160, 20 November 2020, Pages 246-262,

<https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2020.08.001>

A. Introduction

Les vésicules extracellulaires (VE), nanostructures subcellulaires, entourées d'une bicouche lipidique, libérées par les cellules dans l'environnement extracellulaire, sont maintenant reconnues comme jouant un rôle important dans la communication intercellulaire. Selon le stimulus induisant leur production, les VE sont enrichies en cargos spécifiques, qui pourront par la suite être transférés dans des cellules cibles, modulant leur fonction. Ainsi, dans le contexte hépatique, les VE libérées par les hépatocytes ont été décrites comme capables d'activer les macrophages, les cellules étoilées ou les cellules endothéliales provoquant alors une inflammation, une fibrogenèse ou une angiogenèse, mécanismes bien connus pour participer au développement de maladies du foie. En revanche, aucune étude ne démontre une implication des VE hépatiques dans l'induction d'un stress oxydant ou d'une mort d'hépatocytes récepteurs. Ce sont pourtant des processus également impliqués dans les maladies du foie. Néanmoins, des VE isolées de cellules extra-hépatiques ont été identifiées comme pouvant générer des espèces réactives de l'oxygène (ERO) dans des cellules réceptrices ou entraîner leur mort. En ce qui concerne, la libération de VE, le rôle du développement d'un stress oxydant dans les cellules productrices a déjà été mis en évidence pour diverses cellules.

Bien que le stress oxydant et la mort cellulaire soient deux aspects-clés de la pathogénèse des maladies du foie, aucun rôle de VE libérées par des hépatocytes n'a encore été décrit dans le déclenchement de ces deux phénomènes. De façon intéressante, les HAP sont capables d'induire l'apoptose de cellules du foie par différents mécanismes, notamment le stress oxydant, et aussi de provoquer la libération de VE. Ces VE présentent une modification de structure et de contenu, reflétant les mécanismes impliqués dans la mort cellulaire induite par les HAP. Pour ces raisons, nous avons décidé de rechercher l'implication des VE issues d'hépatocytes exposés à des HAP dans l'induction d'un stress oxydant ou d'une mort cellulaire dans des hépatocytes récepteurs et non traités par les HAP.

B. Stratégie expérimentale

Les hépatocytes de la lignée WIF-B9 et les hépatocytes de rat en culture primaire sont traités par chacun des trois HAP [le benzo(a)pyrène (BP)¹, le dibenzo(a,h)anthracène (DBA)² ou le pyrène (PYR)], à la concentration de 100 nM pendant 72 h et 18 h respectivement. Les VE sont ensuite isolées du milieu de culture des hépatocytes, par ultracentrifugations à 100 000 x g pendant 1 h 45. Enfin les hépatocytes WIF-B9 ou primaires sont traités par les VE issues d'hépatocytes exposés

¹ Le **benzo(a)pyrène** noté **BaP** dans le corps de texte de la thèse est noté **BP** dans l'article 2

² Le **dibenzo(a,h)anthracène** noté **DBaA** dans le corps de texte de la thèse est noté **DBA** dans l'article 2

aux HAP (VE-HAP) ou non (VE-CTRL), à une concentration en VE de 5 µg/mL pendant 24 h et 18 h, respectivement.

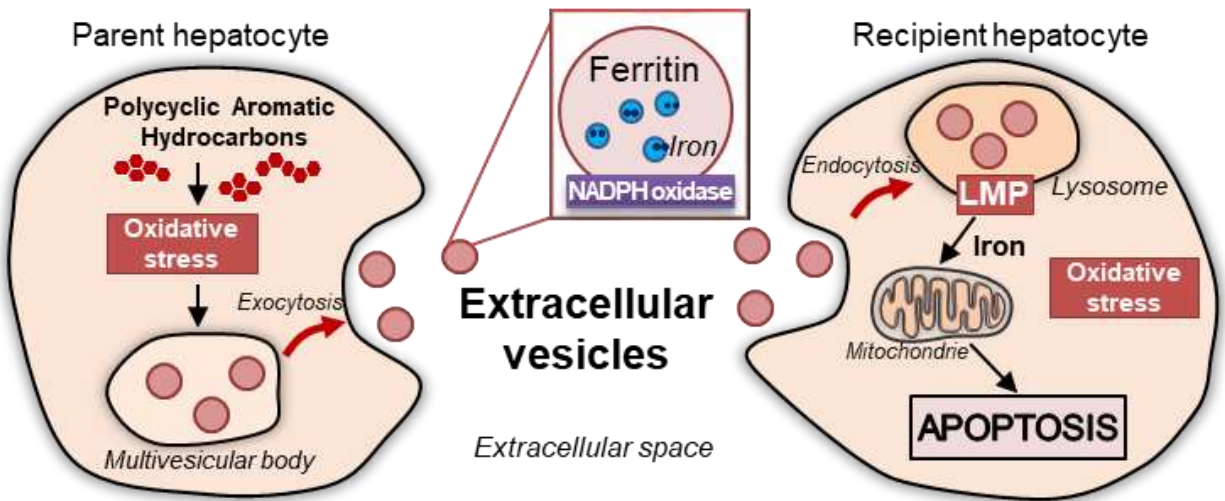
- Le stress oxydant a été évalué par la mesure de la production d'ERO, à l'aide du dihydroéthidium (DHE), une sonde fluorescente, et par la mesure de la peroxydation lipidique, grâce à la sonde fluorescente C11-BODIPY581/591.
- La libération de VE a été quantifiée par le NTA.
- Le contenu des VE a été révélé par western-blotting, cryo-microscopie électronique et par microscopie électronique couplée à un spectroscope aux rayons X.
- L'ultrastructure des hépatocytes récepteurs a été observée par microscopie électronique à transmission.
- La mort cellulaire par apoptose a été évaluée par marquage des noyaux par le fluorochrome Hoescht 33342 et par mesure fluorimétrique de l'activité des caspases 3/7.
- L'internalisation des VE dans les hépatocytes a été observée au microscope à fluorescence et quantifiée en spectrofluorimétrie suite à leur marquage avec la sonde fluorescente lipophile PKH67.

C. Résultats

La libération de VE par les hépatocytes traités par les HAP est dépendante du stress oxydant. Les VE-HAP sont enrichies en protéines liées au stress oxydant comme la NADPH oxydase, source d'anion superoxyde, et la ferritine stockant du fer. Ainsi, ces VE-HAP contiennent plus d'atomes de fer. Les VE-HAP induisent un stress oxydant dans les hépatocytes récepteurs, une altération de la structure de leurs mitochondries et de leurs lysosomes et une apoptose. De plus, les composés pro-oxydants, contenus dans les VE, se sont révélés essentiels dans cette apoptose. L'apoptose des hépatocytes, induite par les VE-HAP, est également dépendante de l'internalisation des VE par endocytose. Par le trafic intracellulaire, les VE-HAP atteignent les lysosomes et entraînent leur perméabilisation membranaire (LMP : *lysosomal membrane permeabilization*). Celle-ci pourrait être liée au contenu des VE. En effet, dans les lysosomes, la NADPH oxydase des VE permettrait la production d'anion superoxyde, puis de peroxyde d'hydrogène, et la digestion des membranes des VE par les hydrolases acides ce qui entraînerait la libération de fer. Le fer catalyse, à partir de peroxyde d'hydrogène, la production du radical hydroxyle, un oxydant puissant, capable de déclencher une peroxydation lipidique des membranes des lysosomes. La LMP qui s'ensuit serait à l'origine d'un stress oxydant de la cellule entière puis d'une apoptose.

Pour conclure, les VE libérées par les hépatocytes exposés aux HAP provoquent l'apoptose d'hépatocytes sains, par un mécanisme de transfert de molécules pro-oxydantes dans les lysosomes. Ces résultats suggèrent l'implication potentielle des VE dans les dommages hépatiques causés par les HAP.

Graphical abstract





Original article

Extracellular vesicles released by polycyclic aromatic hydrocarbons-treated hepatocytes trigger oxidative stress in recipient hepatocytes by delivering iron



Nettie van Meteren^a, Dominique Lagadic-Gossmann^a, Normand Podechard^a, Dimitri Gobart^a, Isabelle Gallais^a, Martine Chevance^a, Aurore Collin^{a,1}, Agnès Burel^b, Aurélien Dupont^b, Ludivine Rault^d, Soizic Chevance^c, Fabienne Gauffre^c, Eric Le Ferrec^a, Odile Sergent^{a,*}

^a Univ Rennes, Inserm, EHESP, Irset (Institut de Recherche en Santé Environnement et Travail), UMR_S 1085, F-35000, Rennes, France

^b Univ Rennes, Biosit, UMS 3480, US_S 018, F-35000, Rennes, France

^c Univ Rennes, CNRS, ISCR (Institut des Sciences Chimiques de Rennes) – UMR 6226, F-35000, Rennes, France

^d Univ Rennes, ScanMAT, UMS 2001, F-35000, Rennes, France

ARTICLE INFO

Keywords:

Polycyclic aromatic hydrocarbons
Extracellular vesicles
Hepatocytes
NADPH oxidase
Ferritin
LMW iron
Lipid peroxidation
Lysosomes
Mitochondria

ABSTRACT

A growing body of evidences indicate the major role of extracellular vesicles (EVs) as players of cell communication in the pathogenesis of liver diseases. EVs are membrane-enclosed vesicles released by cells into the extracellular environment. Oxidative stress is also a key component of liver disease pathogenesis, but no role for hepatocyte-derived EVs has yet been described in the development of this process. Recently, some polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs), widespread environmental contaminants, were demonstrated to induce EV release from hepatocytes. They are also well-known to trigger oxidative stress leading to cell death. Therefore, the aim of this work was to investigate the involvement of EVs derived from PAHs-treated hepatocytes (PAH-EVs) in possible oxidative damages of healthy recipient hepatocytes, using both WIF-B9 and primary rat hepatocytes. We first showed that the release of EVs from PAHs-treated hepatocytes depended on oxidative stress. PAH-EVs were enriched in proteins related to oxidative stress such as NADPH oxidase and ferritin. They were also demonstrated to contain more iron. PAH-EVs could then induce oxidative stress in recipient hepatocytes, thereby leading to apoptosis. Mitochondria and lysosomes of recipient hepatocytes exhibited significant structural alterations. All those damages were dependent on internalization of EVs that reached lysosomes with their cargoes. Lysosomes thus appeared as critical organelles for EVs to induce apoptosis. In addition, pro-oxidant components of PAH-EVs, e.g. NADPH oxidase and iron, were revealed to be necessary for this cell death.

1. Introduction

Extracellular vesicles (EVs), *i.e.* membrane-enclosed vesicles released by cells into the extracellular environment, are now recognized as important mediators of intercellular communication [1]. Depending on the initial stimulus of their production, EVs are specifically enriched in cargoes such as proteins, lipids, and nucleic acids that can be transferred into recipient cells [2,3], thereby modulating cell functions. As liver is a multicellular organ composed of hepatocytes and non-parenchymal cells, a role for EVs has emerged in the pathogenesis of liver diseases, such as hepatitis, cirrhosis and hepatocellular carcinoma [4–6]. Thus, hepatocyte-derived EVs have been described to activate

[7] or recruit [8,9] macrophages, to activate stellate cells [10,11] and endothelial cells [12,13], thus leading to inflammation, fibrogenesis and angiogenesis, processes well-known to participate in the development of liver diseases. Whereas oxidative stress is considered as a key event in the pathogenesis of liver diseases [14–16], nothing is known about its possible induction in cells targeted by hepatocyte-derived EVs. However, EVs isolated from some extrahepatic tissues have been reported to generate reactive oxygen species (ROS) in recipient cells. Thus, the large EVs, *i.e.* microvesicles, essentially isolated from circulating cells or from endothelial cells, have been recently reviewed as ROS producers in recipient cells [17]. Besides, exosomes, the smaller type of EVs, when released from skin keratinocytes [18], melanoma cell

* Corresponding author. IRSET, Faculté de Pharmacie, 2 av Pr. Léon Bernard, 35043, Rennes Cedex, France.

E-mail address: odile.sergent@univ-rennes1.fr (O. Sergent).

¹ Present address: Université Clermont-Auvergne, NEURO-DOL, Inserm U1107, 2, rue Braga, 63100 Clermont-Ferrand, France.

Abbreviations

AhR	aryl hydrocarbon receptor
APO	apocynin
BAF	bafilomycin A1
BP	benzo(a)pyrene
CyB	cytochalasin B
CYP1	cytochrome P450 family 1
DBA	dibenzo(a,h)anthracene
DFO	desferrioxamine
DFP	deferiprone
EDS	energy dispersive X-ray spectroscopy
EROD	ethoxyresorufin-O-deethylase

EV	extracellular vesicle
FTL	ferritin light chain
LMW	ironlow-molecular-weight iron
MCD	methyl- β -cyclodextrin
NTA	nanoparticle tracking analysis
PAH	polycyclic aromatic hydrocarbon
PAH-EVs	EVs derived from PAH-treated hepatocytes
PYR	pyrene
ROS	reactive oxygen species
Th	thiourea
VitE	vitamin E
Wort	wortmannin

lines [19] or breast cancer cells [20], were able to cause an increase in ROS levels in recipient cells. However, in all cases, no proof of an oxidative damage was provided. Regarding cells producing EVs, a role for oxidative stress in the EV release by pulmonary fibroblasts [21] or bronchial epithelial cells [21,22] has already been shown, but nothing is known yet concerning hepatocytes.

Recently, for the first time in the field of toxicant-associated liver diseases, some polycyclic aromatic hydrocarbons, widespread environmental contaminants, were demonstrated to stimulate hepatocytes to release EVs with a modified composition and structure, as a mirror of mechanisms involved in PAH-induced cell death [23]. Interestingly, PAHs have also been described to induce cell death by mechanisms that implicated oxidative stress. For instance, benzo(a)pyrene (BP) can promote ROS production in liver cells both *in vitro* [24,25] and *in vivo* [26], leading to oxidative damages such as lipid peroxidation in cultured liver cells [27,28] or in mice liver [29], as well as DNA oxidation in hepatocytes [30] or in rat liver [31]. Those oxidative damages were demonstrated to be responsible for cell death in liver [27,28,32,33]. Pyrene (PYR) can also trigger ROS production in hepatocytes along with a decrease in the expression of antioxidant enzymes, thus leading to a loss of viability [34]. In mice, the depletion in the antioxidant glutathione was associated to PYR-induced liver damage [35].

Although oxidative stress is a key component of the pathogenesis of liver diseases, no role for hepatocyte-derived EVs has yet been described in the development of this process. Therefore, we decided to investigate the involvement of EVs derived from hepatocytes treated by PAHs in possible oxidative effects in healthy recipient hepatocytes. Particular attention was also paid to the role of oxidative stress for their release. Using hepatocytes from both WIF-B9 cell line and primary rat cultures, we demonstrated that EVs derived from PAH-treated hepatocytes were able to induce oxidative stress in recipient hepatocytes notably *via* an iron enrichment of those EVs.

2. Materials and Methods

2.1. Chemicals

Benzo(a)pyrene (BP), dibenzo (a,h)anthracene (DBA), pyrene (PYR), *N*-acetyl-Asp-Glu-Val-Asp-7-amido-4 methylcoumarin (Ac-DEVD AMC), Hoechst 33342, dimethyl sulfoxide (DMSO), cytochalasin B (CyB), methyl- β -cyclodextrin (MCD), wortmannin (Wort), bafilomycin A1 (BAF), desferrioxamine (DFO), thiourea (Th) and vitamin E (VitE) were all purchased from Sigma–Aldrich (Saint Quentin Fallavier, France). SYTOX®Green was obtained from Life Technologies (Thermo Fisher Scientific Courtaboeuf, France) and deferiprone (DFP) from Acros (Thermo Fisher Scientific Courtaboeuf, France). Dihydroethidium (DHE), C11-BODIPY^{581/591}, LysoTracker Red DND-99 and LysoSensor Yellow/Blue DND-160, MitoTracker red FM were obtained from Molecular Probes (ThermoFisher Scientific, Courtaboeuf, France). Apocynin was acquired from Calbiochem (Millipore, Saint-Quentin Les

Yvelines, France). Mito-FerroGreen was obtained from Dojindo (Munich, Europe).

Goat polyclonal anti-FTL (ferritin light chain) antibody was purchased from Origene (Herford, Germany). Mouse monoclonal anti-HSC70, anti-gp91-phox and anti-p47-phox antibodies were acquired from Santa Cruz Biotechnology (Heidelberg, Germany). Rabbit monoclonal anti-ferritin heavy chain was purchased from Abcam (Paris, France). Horseradish peroxidase (HRP)-conjugated secondary antibodies were from Dako (Agilent Technologies, Courtaboeuf, France).

2.2. Cell isolation and culture

Two types of hepatocytes, primary rat hepatocytes and hybrid human/rat hepatocytes of the WIF-B9 cell line, were studied. Primary hepatocytes were used as they are physiologically and metabolically close to *in vivo* models. For longer incubation times, not suited for primary hepatocyte survival, the WIF-B9 cell line was also tested due to its high level of differentiation into hepatocytes, making it very sensitive to chemical toxicants, even at very low doses [36,37].

2.2.1. Primary rat hepatocytes

Adult hepatocytes were isolated from two-month-old male Sprague Dawley rats (Janvier labs, Le Genest-Saint-Isle, France) by perfusion of the liver with a 17 μ g/ml liberase (Roche Diagnostic, Meylan, France) solution to obtain liver dissociation. All protocols (project APAFIS 6675–2016) were approved by our local ethic committee CREEA (Comité Rennais d’Ethique en matière d’Expérimentation Animale), and were in agreement with the European Union regulations concerning the use and protection of experimental animals (Directive 2010/63/EU). Viability of the freshly isolated hepatocytes was routinely above 85%. Cells were seeded at densities of 1.5×10^6 cells in 35-mm petri dishes (Hoechst 33342 staining), 3×10^6 cells in 60-mm petri dishes (caspase-3/7 activity, EV isolation for NTA), 8×10^6 cells in 100-mm petri dishes (membrane fluidity determination and cholesterol measurement), and 15×10^6 cells in 150-mm petri dishes (EV isolation for protein, lipid, and EPR analysis). They were then cultured in a medium composed of 75% minimum Eagle’s medium and 25% medium 199 with Hanks salts (Sigma-Aldrich, Saint-Quentin-Fallavier, France), supplemented with 10% fetal calf serum (FCS) (Gibco, Illkirch, France) and containing 2.2 g/L NaHCO₃ and 5 μ g streptomycin, 5 UI penicillin (Gibco, Illkirch, France), 3.2 μ g bovine serum albumin (BSA) (Eurobio, Courtaboeuf, France), and 5 μ g bovine insulin (Sigma-Aldrich, Saint-Quentin-Fallavier, France) per milliliter. Cells were incubated at 37 °C under an atmosphere of 5% CO₂ and 95% air. The medium was changed 3 h following seeding and replaced by the same medium without FCS.

2.2.2. WIF-B9 cell line

WIF-B9 hybrid cells, obtained by fusion of Fao rat hepatoma cells and WI-38 human fibroblasts, were a generous gift from Doris Cassio (UMR Inserm S757, Université Paris-Sud, Orsay, France). WIF-B9 cells

were grown in F12 Ham Coon's nutrient medium (Sigma-Aldrich, Saint-Quentin-Fallavier, France) supplemented with 5% FCS (Gibco, Illkirch, France) and containing 2.2 g/L NaHCO₃, 100 UI penicillin, 10 µg streptomycin, and 0.25 µg amphotericin B (Sigma-Aldrich, Saint-Quentin-Fallavier, France) per milliliter, 2 mM glutamine (Gibco, Illkirch, France), and HAT supplement [sodium hypoxanthine (10 µM), aminopterin (40 nM), and thymidine (1.6 µM)] (Gibco, Illkirch, France). Cells were incubated at 37 °C in an atmosphere of 5% CO₂ and 95% air. Cells were seeded at 12.5×10^3 cells/cm² and cultured for seven days, until reaching approximately 80% of confluence, before PAH treatment. Before treatment, the medium was changed and replaced by the same medium but previously deprived of EVs. EV depletion was obtained by ultracentrifugation of the medium containing 25% FCS, at 100,000×g for 14 h at 4 °C.

2.3. Cell treatment

For this study, we selected the same PAHs as for our previous work [23] i.e. BP, DBA, and PYR based on their variable presence in food [38] and affinity for the aryl hydrocarbon receptor (AhR) [39]. In order to isolate EVs from PAH-treated hepatocytes, cells were exposed to 100 nM of each PAH, or 0.0005% dimethyl sulfoxide (DMSO) as control cultures, for 18 h for primary rat hepatocytes and 72 h for WIF-B9 hepatocytes. This PAH concentration was chosen based on results previously published [23]. Then, to test the impact of those EVs on healthy recipient hepatocytes, a preliminary study of dose and time response on cell death was conducted in both cell types. For this purpose, they were exposed to EVs at various concentrations (2.5, 5 or 15 µg of EV proteins/mL) for various incubation times (5, 24, 48 or 72 h for WIF-B9, and 5 or 18 h for primary rat hepatocytes). Those EV concentrations roughly corresponded to that found in culture media of WIF-B9 hepatocytes treated for 72 h by PAHs or of primary rat hepatocytes exposed during 18 h. As the levels of apoptosis induced by EVs derived from PAH-treated WIF-B9 and primary rat hepatocytes were the highest at 24 h and 18 h, respectively (Supplementary Fig. S1), the following experiments were performed using those exposure times. Concerning EV concentration, a highest apoptosis was obtained with the 5 and 15 µg/mL concentrations leading us to keep the 5 µg/mL concentration for the following experiments. In the experiments aimed at investigating the mechanisms underlying the effect of EVs on recipient hepatocytes, cultures were pre-treated with various compounds (Supplementary Table S1) for 30 min prior to co-exposure with the toxicants.

2.4. EV analysis

2.4.1. EV isolation from PAH-treated hepatocytes

After each treatment with toxicant, culture media were collected to isolate total EVs. The media were first centrifuged at 3650×g for 10 min to remove any cells, cell debris and apoptotic bodies. Total EVs were then pelleted by ultracentrifugation (Optima L-90 K Ultracentrifuge, Beckman Coulter, Villepinte, France) of the cleared supernatants at 100,000×g for 1 h 45 min at 4 °C in a SW28-1 swinging-bucket rotor (Beckman Coulter, Villepinte, France). Pellets were then washed with PBS and re-centrifuged at the same speed. Finally, EVs were re-suspended in 100–200 µL PBS, depending on the quantity.

2.4.2. Protein concentration

The protein concentrations of cell lysates and EVs were determined by the Pierce BCA protein assay kit (Thermo Fisher Scientific, Illkirch, France) using BSA as the standard. Hepatocytes were lysed in RIPA buffer (50 mM Tris buffer, 150 mM NaCl, 0.1% SDS, 1% Triton X-100, 0.5% sodium deoxycholate, 50 mM NaF, 5 mM EDTA pH 8) supplemented with protease inhibitors (1 mM orthovanadate, 1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride, 5 µg/ml leupeptin, 0.1 µg/ml aprotinin and

0.5 mM dithiothreitol) before sonication on ice.

2.4.3. Protein expression

Equal amounts of protein (at least 10 µg) were denatured for 5 min at 95 °C in RIPA buffer and then separated by sodium dodecyl sulfate (SDS) polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) using 12% or 15% polyacrylamide gels. After overnight transfer onto nitrocellulose membranes (Millipore, St Quentin-en-Yvelines, France) and blocking for 1 h at room temperature with a TBS solution containing 5% BSA, primary antibodies were added and the membranes incubated for 2 h at room temperature [anti-gp91-phox (1:100), anti-p47-phox (1:1000), anti-FTL (1:1000), and anti-HSC70 (1:10000)]. Then, membranes were washed three times with 0.1% Tween 20 in TBS for 10 min and incubated in blocking buffer containing appropriate horseradish peroxidase-conjugated secondary antibodies (1:2500) for 1 h at room temperature. Following incubation, they were washed six times with 0.1% Tween 20 in TBS for 5 min. Immunolabeled proteins were then visualized by chemiluminescence using an enhanced chemiluminescence (ECL) solution (Tris-HCl 0.1 M pH 8.5, 0.22 mM coumaric acid, 1.25 mM luminol, and 0.009% H₂O₂) and a ChemiDoc™ XRS + analyzer, and the images processed using Image Lab 6.0 (Bio-Rad, Marnes-la-Coquette, France). HSC70 primary antibodies were used to evaluate protein loading.

Independent experiments could not be run on the same gel. Thus, the relative density ratio was calculated. First, band densities of the protein of interest (FTL, gp91-phox, p47-phox) and that of the loading controls (Hsc70) were measured on every blot and the backgrounds subtracted. Then, the density of the protein of interest in each lane was divided by the respective density of the loading control on every blot. Finally, each normalized density of the protein of interest for the EVs was divided by the normalized density of the control EVs (first lane on the blots). Each value for the control EV from independent blots was set to one, as the density ratios were systematically relative to the control EV ratio. Differences in the means of relative density ratios allowed us to compare expression levels of the proteins of interest from different blots. For multiple bands, the densities of each band were added and the sum used as the density of the protein of interest.

2.4.4. Cryo-electron microscopy

Vitrification of EVs was performed using an automatic plunge freezer (EM GP, Leica) under controlled humidity and temperature [40]. The samples (i.e. 10 µL of EVs at a concentration of 10¹² particles/mL) were deposited on glow-discharged electron microscope grids followed by blotting and vitrification by rapid freezing into liquid ethane. Grids were transferred to a single-axis cryo-holder (model 626, Gatan) and were observed using a 200 kV electron microscope (Tecnai G2 T20 Sphera, FEI) equipped with a 4 k × 4 k CCD camera (model USC 4000, Gatan). Micrographs were acquired under low electron doses using the camera in binning mode 1 and at a nominal magnification of 25,000 X.

2.4.5. Iron measurement

Five microliters of the EV suspension were incubated for 20 min on formvar carbon-coated grids (Nickel Grid 300 mesh, Agar Scientific, Oxford Instruments, Gometz-la-Ville, France). Excess liquid was removed by blotting and the grid was then negatively stained with 2% uranyl acetate followed by blotting to remove excess liquid. Samples were imaged using a Jeol JEM 2100 HR microscope (JEOL Ltd, JEOL Europe SAS, Croissy-sur-Seine, France) operated at an acceleration voltage of 200 kV, equipped with a Gatan Orius SC200D camera (Gatan Inc) and coupled with an Energy Dispersive X-Ray Spectroscopy (EDS) analyzer EDX Oxford X-Max 80 T that characterizes the elemental composition.

2.4.6. EV uptake by recipient cells

EVs were first labelled using the PKH67 Green Fluorescent Cell Linker Kit (Sigma-Aldrich, Saint Quentin Fallavier, France). Briefly,

following the manufacturer's instructions, the washed EV pellets were resuspended in 250 μ L of Diluent C and then mixed with 250 μ L of a solution of 4 μ M PKH67 during 4 min. Then, 300 μ L 1% BSA were added to bind the excess PKH67 dye. Finally, the EVs were ultracentrifuged at 100,000 \times g during 1 h 45 min, and washed twice by ultracentrifugation. Samples without EVs or, with EVs but without PKH67, were also prepared following the same steps to be used as negative controls. For microscopy observation of EV uptake by hepatocytes, cells were seeded on glass coverslips and treated with 5 μ g/mL PKH67 labelled-EVs (PKH67-EVs) during 24 h. After treatment, cells were fixed in 4% paraformaldehyde for 20 min, washed with PBS 1X. Slides were then viewed using a confocal fluorescence microscope LEICA DMI 6000 CS (Leica Microsystems, Wetzlar, Germany) equipped with a 63 \times objective. A quantification by spectrophotometry was also performed. Approximately 1.5 million of hepatocytes were treated with 5 μ g/mL PKH67-EVs for 24 h. After treatment, cells were washed in PBS, centrifuged 5 min at 800 \times g, resuspended in 200 μ L PBS and finally lysed by sonication. Two hundred microliters of cell lysates were then transferred to 96-well plate and the PKH67 fluorescence was measured at 502 nm by spectrophotometry using a PerkinElmer Enspire 2300 multilabel reader (PerkinElmer, USA). PKH67 fluorescence in cells was normalized by the protein quantity.

2.5. Cell death evaluation of recipient hepatocytes

After treatment by hepatocyte-derived EVs, cells were tested for both apoptotic and necrotic cell death. Apoptotic cells were identified by chromatin condensation and morphological changes in the nucleus using the blue-fluorescence chromatin dye Hoechst 33342, while necrotic cells were evidenced by the SYTOX[®]Green nucleic acid stain, only permeant to cells with compromised plasma membranes. Briefly, WIF-B9 and primary rat hepatocytes were stained at 37 $^{\circ}$ C with 175 nM SYTOX[®]Green and also with 50 μ g/mL and 100 μ g/mL Hoechst 33342 for 20 and 30 min, respectively. Apoptotic and necrotic cells were then counted using a fluorescence microscope (Axio Scope A1, ZEISS, Marly le Roi, France); 400 cells in total were examined for each condition.

In order to further identify cell death mode, the caspase-3/7 activity assay was performed. Cells were lysed in the caspase activity buffer as previously described [27]. Eighty micrograms of protein were thus incubated with 80 μ M DEVD-AMC for 2 h at 37 $^{\circ}$ C. Caspase-mediated cleavage of DEVD-AMC was evaluated by spectrofluorimetry (Spectramax Gemini; Molecular Devices, San Jose, California, United States) using 380 nm excitation and 440 nm emission wavelengths.

2.6. Determination of organelle alteration

2.6.1. Electron microscopy of recipient hepatocytes

Ultrastructure changes of recipient WIF-B9 cells were visualized by transmission electron microscopy. After 24 h-exposure to EVs, hepatocytes were rinsed with 0.15 M cacodylate buffer, pH 7.4 and fixed by drop-wise addition of glutaraldehyde (2.5%) in 0.15 M cacodylate buffer, for 1 h. They were then washed with 0.15 M cacodylate buffer and postfixed with 1.5% osmium tetroxide solution containing 1.5% potassium ferrocyanide for 1 h. Samples were first washed with cacodylate buffer then with water, stained with 1% uranyl acetate for 1 h and washed again. Next, samples were dehydrated with graded alcohol series following standard procedure prior to inclusion in Epon-Araldite-DMP30 resin (polymerized at 60 $^{\circ}$ C for 48 h). Sections (0.5 μ m) were cut on a Leica UC7 microtome (Leica Microsystems, Wetzlar, Germany) and stained with toluidine blue. Ultrathin sections (80 nm) were obtained and mounted onto copper grids. Sample examination was performed with a JEOL 1400 transmission electron microscope (Jeol Co, Tokyo, Japan) operated at 120 kV and images were digitally captured with an Orius 1000 Gatan Camera (Gatan Ametek, Pleasanton, USA).

2.6.2. Fluorescence microscopy of lysosomes

Lysosomes were labelled by LysoTracker red, a red acidotropic fluorophore. After treatment with EVs, hepatocytes, seeded on glass coverslips, were incubated with 1 μ M LysoTracker in the culture medium, at 37 $^{\circ}$ C for 1 h (WIF-B9 hepatocytes) or for 10 min (primary rat hepatocytes). After labelling, cells were fixed in 4% paraformaldehyde for 20 min, washed with PBS. Slides were then viewed using a confocal fluorescence microscope LEICA DMI 6000 CS (Leica Microsystems, Wetzlar, Germany) equipped with a 40X objective.

2.6.3. Measurement of lysosomal pH

Adapted from a previous paper [41], changes in lysosomal pH were analyzed using the fluorescent ratiometric probe LysoSensor Yellow/Blue DND-160, which exclusively localizes within the lysosomes. The LysoSensor dye emits blue fluorescence in neutral environments, but switches to yellow fluorescence in more acidic environments. After treatment with EVs, hepatocytes, seeded on a 96-well plate, were incubated with 1 μ M LysoSensor for 2 min at 37 $^{\circ}$ C. As a positive control of lysosomal alkalization, some hepatocytes were treated, for 30 min prior to LysoSensor incubation, with 50 nM bafilomycin A1, a known inhibitor of lysosomal H⁺-ATPase (also known as V-ATPase). In parallel, a pH calibration curve was generated. Cells were incubated 2 min at 37 $^{\circ}$ C with 1 μ M LysoSensor and then 10 min at 37 $^{\circ}$ C with buffered solutions at pH 4, 5, 6 or 6.5 containing 125 mM KCl, 25 mM NaCl, 10 μ M monensin, 10 μ M nigericin and 25 mM 2-[N-morpholino] ethanesulfonic acid (MES). Finally, using a PerkinElmer Enspire 2300 multilabel reader (PerkinElmer, USA), fluorescence was measured at 440 nm and 540 nm.

2.7. Oxidative stress measurement in hepatocytes

2.7.1. ROS production

Intracellular ROS production was evaluated using dihydroethidium (DHE), as previously described [33]. Briefly, after treatment by hepatocyte-derived EVs, recipient cells were incubated with 25 μ M DHE for 1 h at 37 $^{\circ}$ C. Fluorescence (Ex 396 nm/Em 580 nm) was recorded using a microplate reader (EnSpire Multimode 2300 Plate Reader, PerkinElmer, Waltham, United States). Results were given as relative fluorescence units (RFU)/ μ g protein.

2.7.2. Analysis of lipid peroxidation

Lipid peroxidation was measured using the fluorophore C11-BODIPY^{581/591} (4,4-difluoro-5-[4-phenyl-1,3-butadienyl]-4-bora-3a,4a-diaza-s-indacine-3-undecanoic acid), as previously described [28]. C11-BODIPY^{581/591}, which incorporates into cell membranes, shifts from red to green fluorescence upon oxidation. Briefly, cells were incubated with 10 μ M C11-BODIPY^{581/591} for 1 h at 37 $^{\circ}$ C. Then, fluorescence was recorded by a SpectraMax Gemini spectrofluorimeter (Molecular Devices Sunnyvale, United States) using two pairs of wavelengths to measure the amount of reduced (λ_{ex} 590 nm, λ_{em} 635 nm) and oxidized probe (λ_{ex} 485 nm, λ_{em} 535 nm). Lipid peroxidation was then quantified by calculating the ratio of oxidized probe/total probe (oxidized + reduced probe).

2.7.3. Low-molecular-weight iron content

Measurement of intracellular low molecular weight (LMW) iron was based upon the capacity of deferiprone to chelate only LMW iron and to give a paramagnetic chelate, which can be directly detectable by electron paramagnetic resonance in whole hepatocytes, as previously described [42].

2.7.4. Mitochondrial free iron

Free iron content specifically located in mitochondria was detected using the cell-permeable fluorescent probe Mito-FerroGreen, while mitochondria themselves were visualized by staining with the fluorescent probe MitoTracker red FM.

After treatment with EVs, hepatocytes seeded on glass coverslips were washed with PBS and then incubated with 50 nM MitoTracker red FM and 5 μ M Mito-FerroGreen in PBS, at 37 °C for 30 min. After labelling, cells were washed with PBS. Slides were then viewed using a confocal fluorescence microscope LEICA DMI 6000 CS (Leica Microsystems, Wetzlar, Germany) equipped with a 40X objective. Mitochondrial iron content was quantified, cell by cell, by the relative ratio of green over red fluorescence; 100 cells in total were examined for each condition.

2.8. Cytochrome P450 1 activity

CYP1 activity was estimated by the ethoxyresorufin O-deethylase (EROD) assay that relies on the conversion of ethoxyresorufin into resorufin by CYP1 enzymes. Rapidly, after treatment, cells were

incubated with 1.5 mM salicylamide (inhibitor of phase II-conjugating enzymes) and 5 μ M ethoxyresorufin. Fluorescence of resorufin (excitation at 544 nm and emission at 584 nm) was monitored for 30 min at 37 °C using a microplate reader (EnSpire Multimode 2300 Plate Reader, PerkinElmer, Waltham, United States). EROD activity was expressed as pg resorufin per min and mg protein.

2.9. Statistical analysis

Values are presented as means \pm standard deviation from at least three independent experiments. Statistical analyses were performed using one-way analysis of variance (ANOVA) followed by a Newman-Keuls post-test. Significance was accepted at $p < 0.05$. All statistical analyses were performed using GraphPad Prism 5 software (San Diego, United States).

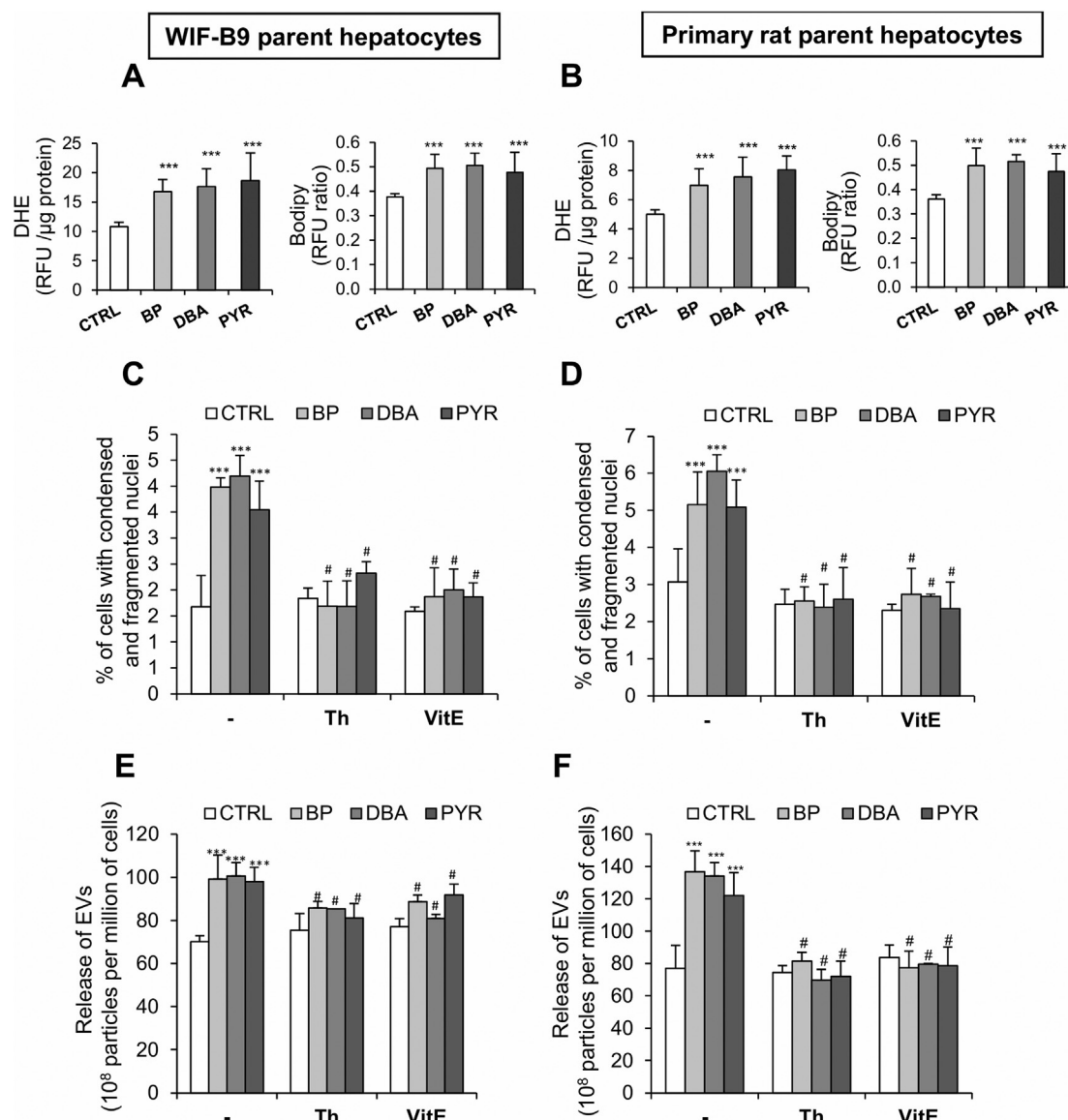


Fig. 1. Oxidative stress in parent hepatocytes is involved in their EV release when exposed to PAHs. (A, B) Oxidative stress followed by the evaluation of reactive oxygen species (ROS) production and lipid peroxidation. ROS production was measured by the fluorescence of oxidized dihydroethidium (DHE) (left panel) and lipid peroxidation by the fluorescence of oxidized C11-BODIPY^{581/591} relative to the total fluorescence (oxidized + reduced fluorochrome) (right panel). (C, D) Apoptosis estimated by microscopic observation of the number of cells with condensed and/or fragmented chromatin after nuclear staining by Hoechst 33342. (E, F) EV release was evaluated by Nanoparticle Tracking Analysis. WIF-B9 (A, C, E) and primary rat (B, D, F) hepatocytes were exposed or not to 100 nM BP, DBA or PYR for 72 h and 18 h, respectively. Untreated cultures were used as controls (CTRL). Some cultures were pre-treated for 30 min or not (-) with 6.25 mM thiourea (Th), a ROS scavenger or 100 μ M vitamin E (VitE), a free radical chain-breaking antioxidant. Values are given as means \pm standard deviation of 3–7 independent experiments. Treated *versus* CTRL: *** $p < 0.001$. Th or VitE pre-treated *versus* non pre-treated: # $p < 0.01$.

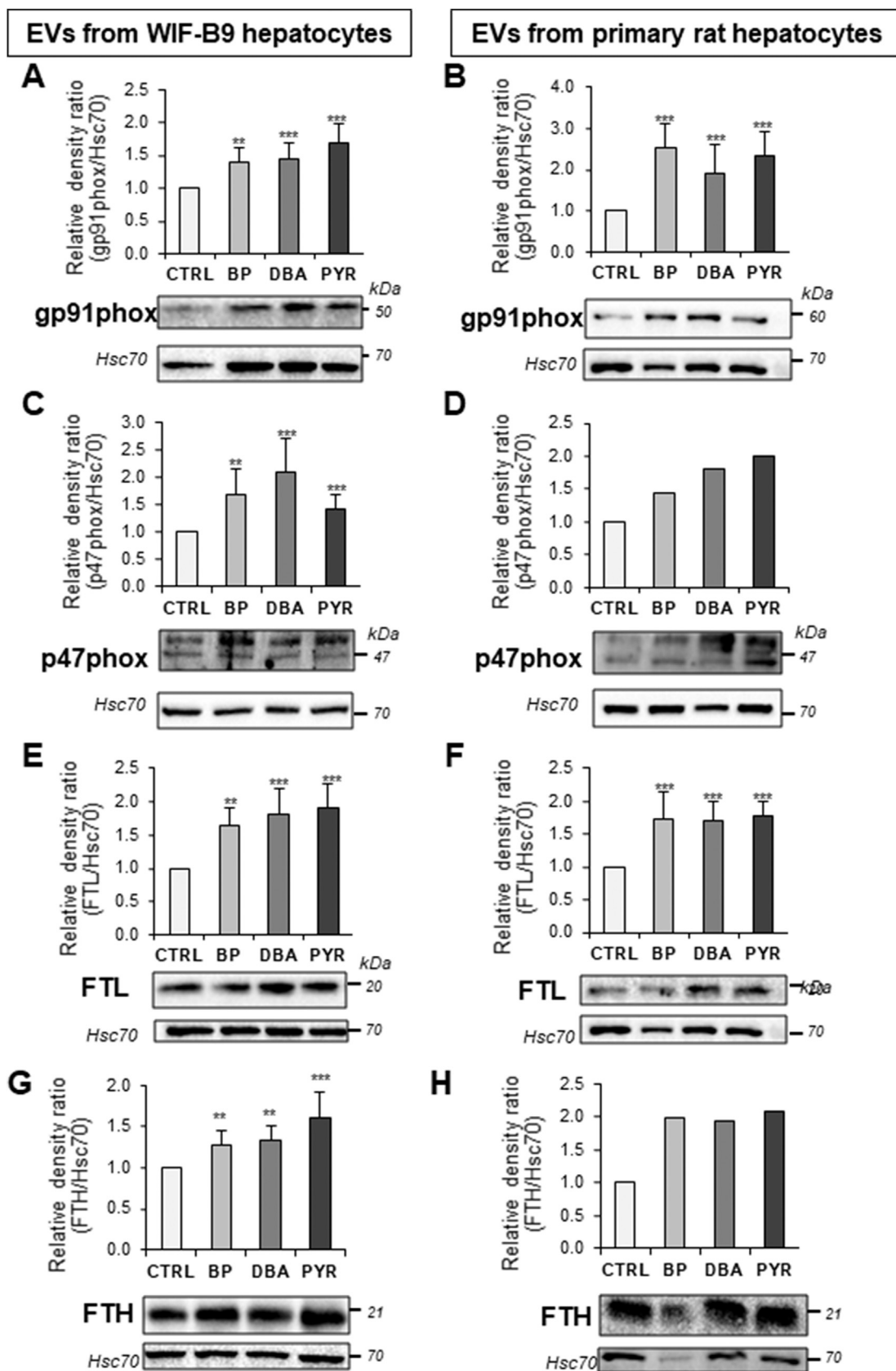


Fig. 2. EVs derived from PAH-treated hepatocytes are enriched in proteins related to oxidative stress. Protein expressions of NADPH oxidase subunits, gp91phox (A, B) and p47phox (C, D), and of ferritin subunit, the ferritin light chain FTL (E, F) and the ferritin heavy chain FTH (G, H), were studied in EVs by western blotting. EVs were isolated from WIF-B9 (A, C, E, G) and primary rat (B, D, F, H) hepatocytes exposed or not to 100 nM BP, DBA or PYR for 72 h and 18 h, respectively. Values are given as means \pm standard deviation of 3–5 independent experiments, except for p47 phox and FTH protein in primary rat hepatocytes, for which only one experiment was performed. Treated versus CTRL: **p < 0.01; ***p < 0.001.

3. Results

3.1. PAH treatment of hepatocytes induces a release of EVs depending on oxidative stress

BP was previously reported as capable of increasing ROS generation and lipid peroxidation in liver epithelial cells [28], primary rat hepatocytes [27] and WIF-B9 hepatocytes [33] leading to cell death. Therefore, we decided to evaluate the ability of the three selected PAHs to generate oxidative stress in WIF-B9 and primary rat hepatocytes. As expected, BP treatment caused an increase of ROS production and consequent lipid peroxidation after 72 h of exposure in WIF-B9 hepatocytes (Fig. 1A) or after 18 h in primary rat hepatocytes (Fig. 1B). Similar results were obtained with DBA and PYR (Fig. 1A–B). Using thiourea, a ROS scavenger, and vitamin E, a free radical chain breaking antioxidant, oxidative stress was demonstrated to be involved in PAH-induced cell death (Fig. 1C–D).

Given that oxidative stress has been demonstrated as inducing EV release in order to protect the producer cells from oxidative damages [43], we examined the effect of antioxidants, *i.e.* thiourea or vitamin E, on the EV release by PAH-treated hepatocytes. As described in Materials and Methods, EVs were isolated from the cell culture media by differential ultracentrifugation and quantified by NTA. Antioxidants significantly reduced the increase in EV release induced by all PAHs (Fig. 1E–F), thus indicating a role for PAH-induced oxidative stress in EV release by hepatocytes.

3.2. EVs derived from PAH-treated hepatocytes are enriched in proteins related to oxidative stress

As oxidative stress was involved in the release of EVs upon PAH exposure, this release was proposed as a cellular protective mechanism against oxidative stress by taking away deleterious molecules. Therefore, we decided to look for several proteins related to oxidative

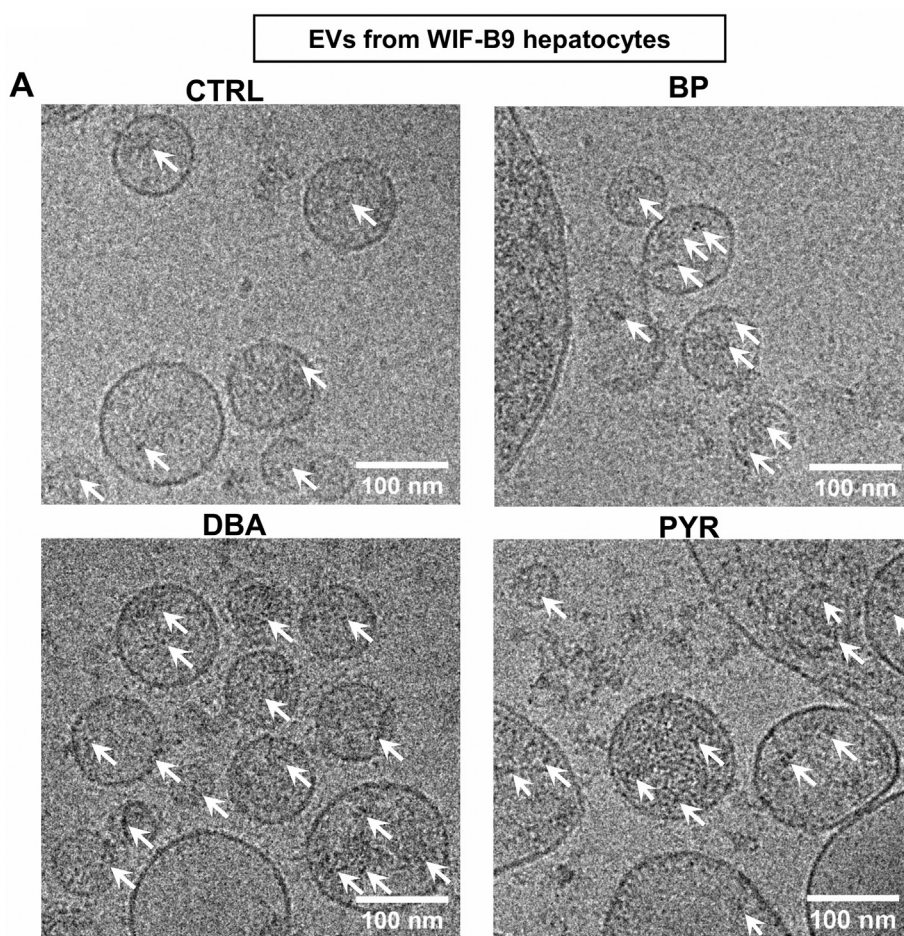
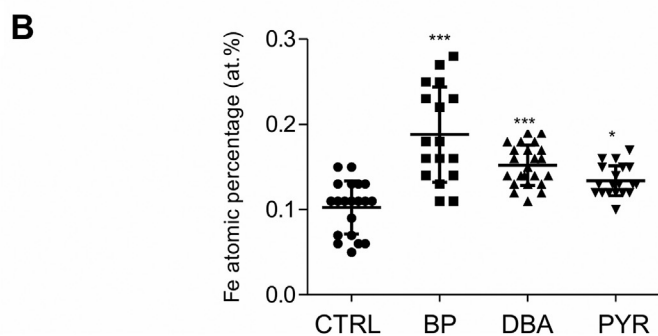


Fig. 3. EVs derived from PAH-treated hepatocytes are enriched in iron. (A) Ultrastructure of unstained EVs observed using cryo-electron microscopy. Vitrified samples were loaded to a Technai G2 T20 Sphera electron microscope operating at 200 kV. The white arrows point to dense structures supposed to be iron cores. Note that dense structures apparently outside vesicles are actually disrupted vesicles due to the vitrification process needed for cryo-electron microscopy. (B) Iron content of EVs measured using electron microscopy coupled with an Energy Dispersive X-Ray Spectroscopy (EDS) analyzer. EVs were isolated from WIF-B9 hepatocytes exposed or not to 100 nM BP, DBA or PYR for 72 h. Images of cryo-electron microscopy are representative of 2 independent experiments. For iron content measurement, values are given as means \pm standard deviation of 20–30 vesicles from 2 independent experiments. Treated *versus* CTRL: **p* < 0.05; ****p* < 0.001.



stress in EVs [43–46]. First, we examined the changes in the expression levels of NADPH oxidase subunits, gp91-phox (Fig. 2A–B) and p47-phox (Fig. 2C–D). Both NADPH oxidase subunits were higher in EVs derived from PAH-treated hepatocytes (PAH-EVs) than in EVs derived from untreated hepatocytes (CTRL-EVs). It is noteworthy that two bands were obtained for the p47-phox regulatory subunit. This could be ascribed to the phosphorylation of this subunit, thus suggesting a stronger activation of NADPH oxidase in PAH-EVs. Second, we explored protein expression of a subunit of ferritin, a storage protein of low-molecular-weight iron (LMW iron). This iron species is known to trigger oxidative stress by catalyzing the formation of a highly reactive free radical, the hydroxyl radical, *via* Fenton or Haber-Weiss reaction. Expression of both ferritin subunits, the ferritin light chain (FTL) and the ferritin heavy chain (FTH), was found to be markedly increased in PAH-EVs from both WIF-B9 and primary hepatocytes (by approximately 60–70% for FTL, 30–60% for FTH from WIF-B9 hepatocytes and 100% for FTH from primary hepatocytes) (Fig. 2E–H). Then, observing by cryo-electron microscopy the ultrastructure of EVs derived from WIF-B9 hepatocytes, large dense structures were found in EVs (Fig. 3A, white arrows). These structures may be assimilated to large protein complexes and have been suggested by Truman-Rosentsvit (2018) to be typical ferritin-iron cores [47]. Interestingly, PAH-EVs contained more of those structures (Fig. 3A), thus confirming the results obtained by western-blotting. In order to test a possible elevation of iron within the PAH-EVs, we measured iron atom levels in EVs by electron microscopy coupled with an Energy Dispersive X-Ray Spectroscopy (EDS) analyzer. This technique allows a characterization of the elemental composition of an analyzed volume. Levels of iron atom were increased in PAH-EVs compared to CTRL-EVs (Fig. 3B). It is noteworthy that iron atom was the only one with significantly modified levels in EVs when hepatocytes were treated by PAHs (Supplementary Fig. S2). Interestingly, alongside the release of ferritin in EVs, a decrease in LMW iron was detected at 96 h of exposure to BP, after a transient increase at 24 h (Supplementary Fig. S3). Those results collectively illustrated that PAH-EVs were enriched in iron most probably stored in ferritin complexes.

3.3. EV released by PAH-treated parent hepatocytes can induce oxidative stress and related damages in recipient hepatocytes

Due to their content in pro-oxidant components such as NADPH

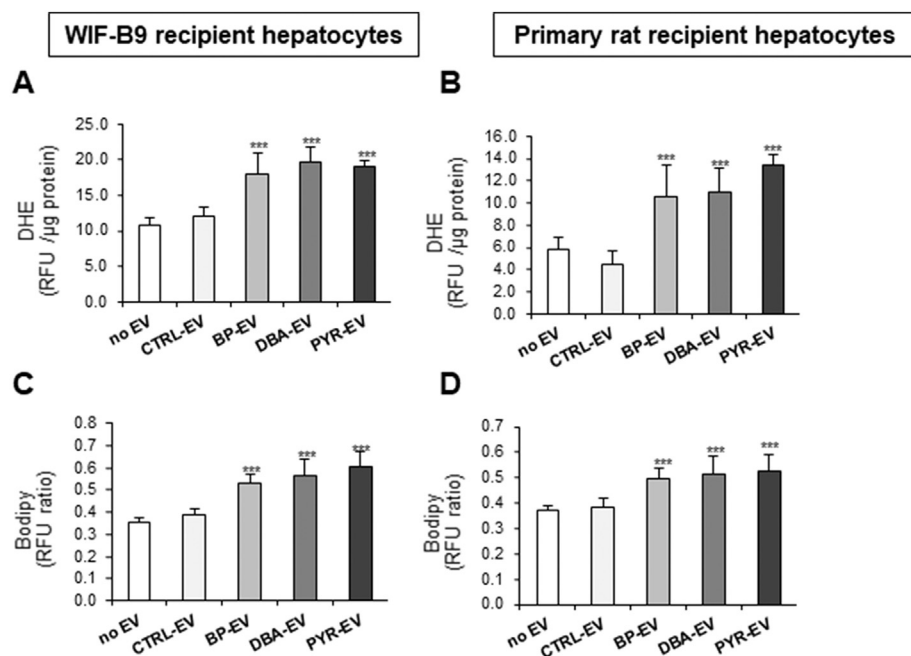


Fig. 4. EVs from PAH-treated parent hepatocytes induce oxidative stress in recipient healthy hepatocytes. Oxidative stress was followed by the evaluation of reactive oxygen species (ROS) production (A, B) and lipid peroxidation (C, D). ROS production was measured by the fluorescence of oxidized dihydroethidium (DHE) and lipid peroxidation by the fluorescence of oxidized C11-BODIPY^{581/591} relative to the total fluorescence (oxidized + reduced fluorochrome). WIF-B9 (A, C) and primary rat (B, D) healthy hepatocytes were treated or not (no EV) by 5 μg/mL EVs for 24 and 18 h, respectively. EVs were isolated from WIF-B9 or primary rat parent hepatocytes exposed or not (CTRL-EV) to 100 nM BP (BP-EV), DBA (DBA-EV) or PYR (PYR-EV) for 72 h and 18 h, respectively. Values are given as means ± standard deviation of 3–7 independent experiments. Treated with EVs *versus* untreated: ***p < 0.001.

oxidase and iron, PAH-EVs may transfer them in recipient hepatocytes. NADPH oxidase generates superoxide anion radical that can lead to the formation of hydrogen peroxide. Iron catalyzes the Fenton reaction that used hydrogen peroxide to produce the highly oxidant hydroxyl radical. Therefore, we wondered whether PAH-EVs could promote oxidative stress and hence harmful processes in recipient hepatocytes. For this purpose, WIF-B9 or primary rat hepatocytes were treated by PAH-EVs in comparison with CTRL-EVs for 24 or 18 h, respectively. CTRL-EVs did not induce any significant changes in ROS levels compared to hepatocytes without treatment by EVs (Fig. 4A–B). At the opposite, PAH-EVs increased the ROS levels compared to CTRL-EVs both in WIF-B9 and primary rat hepatocytes (Fig. 4A–B), thus resulting in a lipid peroxidation of recipient hepatocytes (Fig. 4C–D).

Consequently, we decided to search for oxidative damages of hepatocytes such as mitochondrial alteration and cell death. In WIF-B9 hepatocytes, mitochondrion ultrastructure was observed by transmission electron microscopy. When compared to CTRL-EV exposure, PAH-EV treatment induced a swelling of mitochondria (Fig. 5) and an overall increase in mitochondrion size (Supplementary Table S2). Mitochondria would also undergo cristae alterations (Fig. 5, white arrows) as well as fusion (Fig. 5, white asterisks) and fission (Fig. 5, solid black arrows) processes. These observations indicated alterations of mitochondria structure, suggestive of a possible ongoing cell death process.

Cell death was therefore estimated by Hoechst 33342 and Sytox[®]Green staining in order to determine by fluorescent microscopy the number of apoptotic and necrotic hepatocytes. Compared to untreated hepatocytes, cells exposed to CTRL-EVs did not exhibit any significant increase in apoptosis. In contrast, PAH-EVs led to a significant increase (by ≈ 100%) in the number of apoptotic cells for both WIF-B9 (Fig. 6A) and primary rat (Fig. 6B) hepatocytes. Apoptotic cell death was accompanied by a significant increase in caspase 3/7 activity in both hepatocyte types (by ≈ 50%) (Fig. 6C–D). Neither CTRL-EVs nor PAH-EVs changed the number of necrotic cells (data not shown). Finally, using the antioxidants, *i.e.* thiourea and vitamin E, PAH-EVs-induced cell death was prevented (Fig. 6E–F), suggesting a role for oxidative stress in this process.

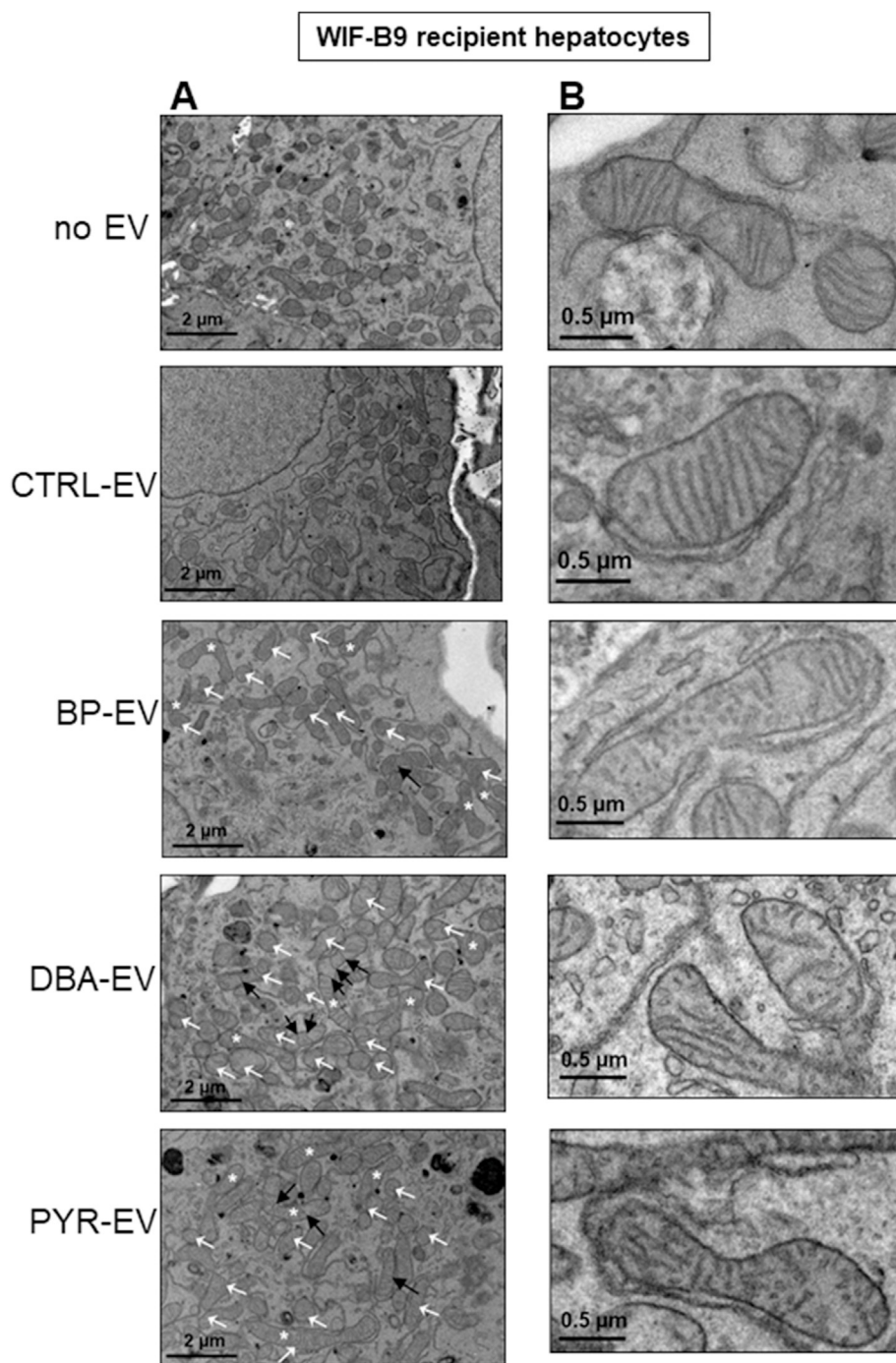


Fig. 5. EVs from PAH-treated parent hepatocytes alter mitochondrial ultrastructure of recipient hepatocytes. (A) Mitochondrial ultrastructure. (B) Mitochondrial crista ultrastructure. Ultra-thin sections (80 nm) of each sample were observed under transmission electron microscopy (TEM). White arrows, white asterisks and black solid arrows indicate crista alteration, fusion and fission of mitochondria, respectively. WIF-B9 healthy hepatocytes were treated or not (no EV) by 5 μg/mL EVs for 24 h. EVs were isolated from WIF-B9 hepatocytes exposed or not (CTRL-EV) to 100 nM BP (BP-EV), DBA (DBA-EV) or PYR (PYR-EV) for 72 h. The images are representative of 2 independent experiments.

3.4. PAH-EV-induced apoptosis of recipient hepatocytes is dependent on EV endocytosis and consecutive lysosome permeabilization

In order to understand how PAH-EVs could induce oxidative stress and hence apoptosis of recipient hepatocytes, we first decided to determine whether EVs were internalized by recipient cells. Indeed, uptake of EVs is generally necessary to obtain an effect on recipient cells [48]. The internalization of CTRL-EVs was tested after labelling of EVs with the lipophilic fluorochrome PKH-67. A transfer of PKH67 green fluorescence was observed indicating the EV incorporation within the recipient hepatocytes (Fig. 7A, left panel). We next quantified spectrophotometrically this PKH67-EV uptake. Thus, it appears that uptake of PAH-EVs was significantly increased as compared to CTRL-EVs (+50%) (Fig. 7A, right panel). Note that the fluorescence of PKH67-EV

was more specifically localized around the nucleus, thus suggesting an EV presence in lysosomes and hence a possible EV uptake via the intracellular vesicular traffic along the endocytic route (Fig. 7A, left panel).

Therefore, in order to check the possibility that EV could reach lysosomes, we investigated various mechanisms of EV engulfment by WIF-B9 hepatocytes; to do so, we used cytochalasin B (CyB) and wortmannin (Wort), two inhibitors of endocytosis and phagocytosis, or methyl-β-cyclodextrin (MCD), an inhibitor of a particular endocytosis dependent on lipid rafts. This latter endocytosis type was investigated because lipid rafts (*i.e.* cholesterol-enriched microdomains) have been shown to be involved in BP-induced apoptosis of liver epithelial cells [49] and of primary rat hepatocytes [27]; also an increase in cholesterol content has been previously described in PAH-EVs [23].

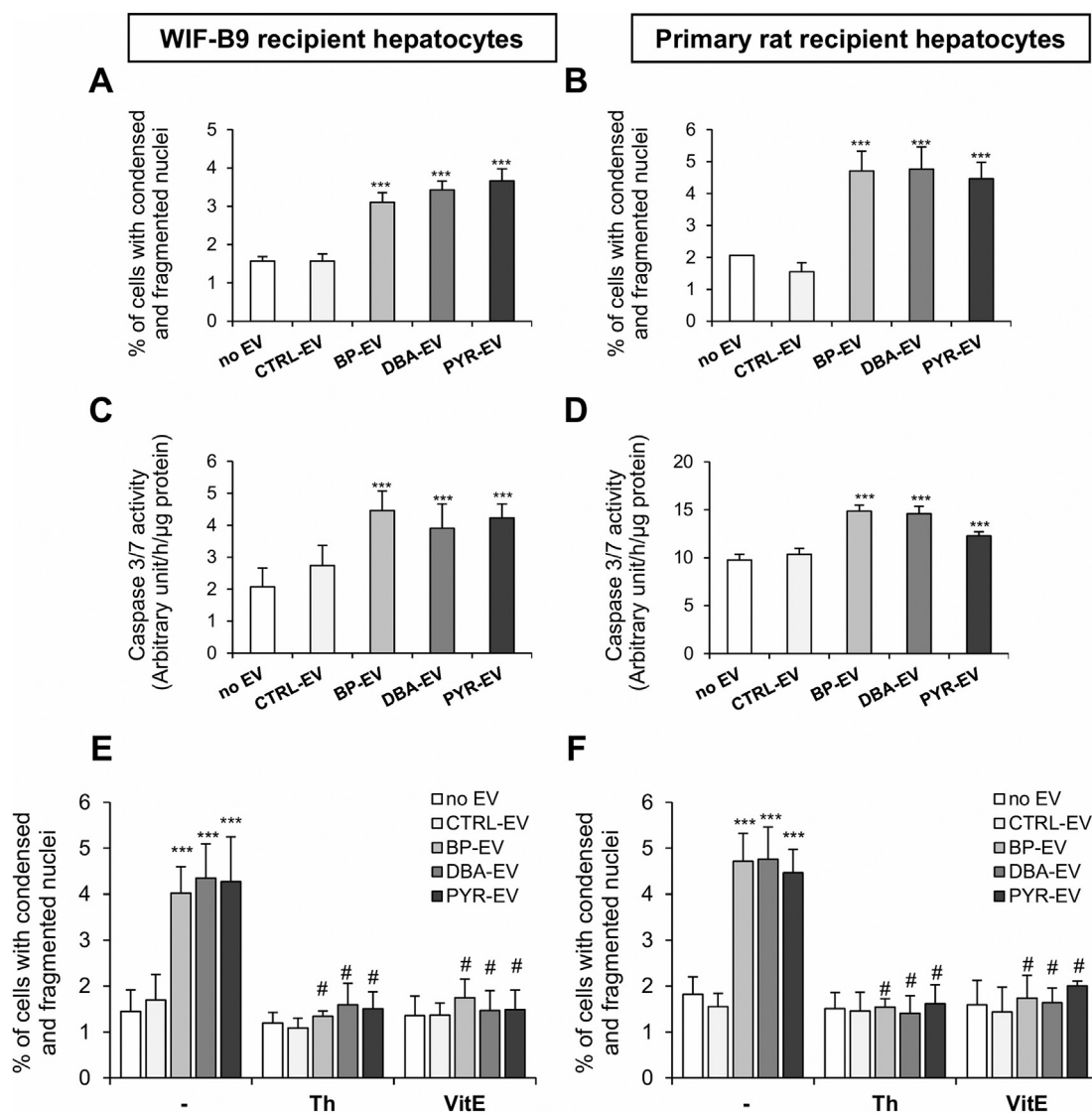


Fig. 6. EVs from PAH-treated parent hepatocytes induce apoptosis of recipient hepatocytes. Apoptosis was estimated by microscopic observation of the number of cells with condensed and/or fragmented chromatin after nuclear staining by Hoechst 33342 (A, B, E, F), and by measuring DEVDase activities of caspase-3/7 by spectrofluorimetry (C, D). WIF-B9 (A, C, E) and primary rat (B, D, F) healthy hepatocytes were treated or not (no EV) by 5 μg/mL EVs for 24 and 18 h, respectively. EVs were isolated from WIF-B9 or primary rat parent hepatocytes exposed or not (CTRL-EV) to 100 nM BP (BP-EV), DBA (DBA-EV) or PYR (PYR-EV) for 72 h and 18 h, respectively. Some cultures were pre-treated for 30 min or not (–) with 6.25 mM thiourea (Th), a ROS scavenger, or 100 μM vitamin E (VitE), a free radical chain-breaking antioxidant. Values are given as means ± standard deviation of 4–7 independent experiments. Treated with EVs *versus* untreated: ****p* < 0.001; Th, VitE pre-treated *versus* non pre-treated: #*p* < 0.01.

In this study, MCD affected neither CTRL-EV nor PAH-EV uptake (Fig. 7A, right panel), thus ruling out any possible implication of lipid rafts in EV uptake. In contrast, the reduction in uptake of both CTRL-EVs and PAH-EVs by CyB and Wort (Fig. 7A, right panel) highlighted the involvement of endocytosis or phagocytosis in this process. Finally, the same compounds were also tested on PAH-EV-induced apoptosis of recipient hepatocytes. Similarly, only CyB and Wort protected from apoptosis both WIF-B9 (Fig. 7B) and primary rat (Fig. 7C) hepatocytes, thus suggesting the key role of endocytosis or phagocytosis. These mechanisms of EV uptake therefore supported our assumption that hepatocyte-derived EVs could reach lysosomes within recipient hepatocytes following the classical vesicular traffic *via* endosomes.

We then hypothesized that the accumulation of EVs in lysosomes could alter those organelles leading to cell death. Using bafilomycin A1 (BAF), a selective inhibitor of V-ATPase, in order to reduce lysosome acidity and hence lysosomal hydrolase activity, the PAH-EVs-induced apoptosis of recipient hepatocytes was significantly decreased both in

WIF-B9 (Fig. 7B) and primary rat (Fig. 7C) hepatocytes. In addition, bafilomycin was able to protect from mitochondrial damages (Supplementary Fig. S4). Thus, lysosomes appeared as a key organelle in the development of PAH-EV-induced cell death. In this context, we questioned about possible alterations of lysosomes when hepatocytes were exposed to PAH-EVs. First, the red fluorescent probe LysoTracker Red DND-99, which specifically localizes in lysosomes, was used in both WIF-B9 (Fig. 8A) and primary rat (Fig. 8B) hepatocytes. PAH-EVs caused an increase in lysosome size or a diffusion of fluorescence throughout the whole cell, reflecting a possible lysosome membrane permeabilization in recipient hepatocytes (Fig. 8A–B). CTRL-EVs do not alter lysosome fluorescence unlike PAH-EVs. Second, to support those observations, lysosome ultrastructure of WIF-B9 hepatocytes was examined by transmission electron microscopy. After PAH-EVs treatment, an increase in lysosome size was also observed (Fig. 8C) and measured (Supplementary Table S3). Additionally, hepatocytes exposed to PAH-EVs displayed lysosome membrane permeabilization characterized by a

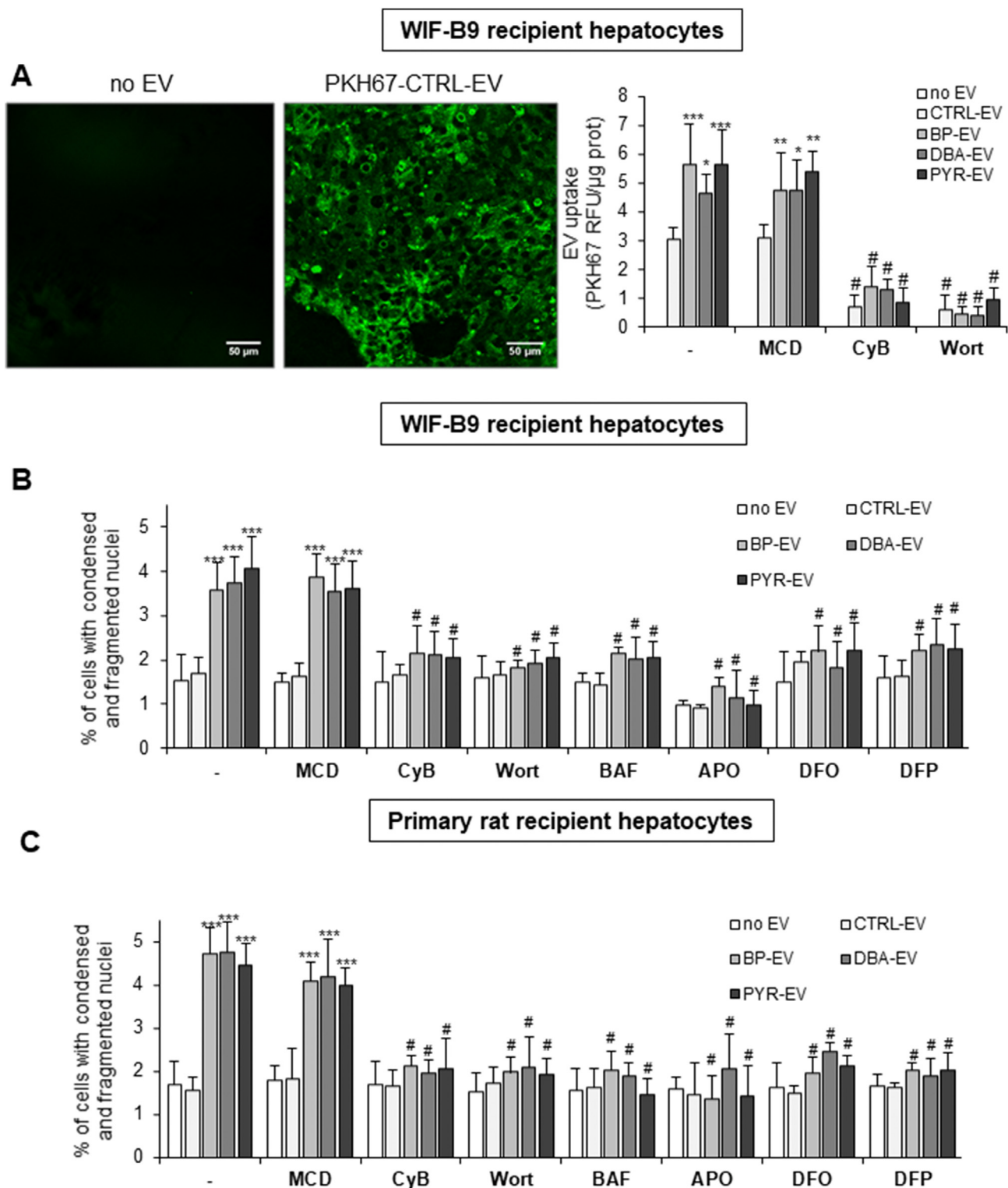


Fig. 7. Apoptosis of recipient hepatocytes is dependent on EV internalization by endocytosis and possibly on the pro-oxidant EV content, such as NADPH oxidase and iron. (A) Uptake of PKH-67-stained EVs by recipient WIF-B9 hepatocytes observed using confocal microscopy (left images) and quantified by spectrofluorimetry (right histogram). (B, C) Apoptosis estimated by microscopic observation of the number of cells with condensed and/or fragmented chromatin after nuclear staining by Hoechst 33342. WIF-B9 (A, C) and primary rat (C) healthy hepatocytes were treated or not (no EV) by 5 μg/mL EVs for 24 and 18 h, respectively. EVs were isolated from WIF-B9 or primary rat parent hepatocytes exposed or not (CTRL-EV) to 100 nM BP (BP-EV), DBA (DBA-EV) or PYR (PYR-EV) for 72 h and 18 h, respectively. Some cultures were pre-treated for 30 min or not (–) with 3 mM methyl-β-cyclodextrin (MCD), an inhibitor of lipid raft mediated endocytosis, 5 μg/mL cytochalasin B (CyB), 1 μM wortmannin (Wort), both inhibitors of endocytosis and phagocytosis, or 10 nM bafilomycin A (BAF), an inhibitor of lysosomal V-ATPase and hence lysosome activities. Some cultures were pre-treated for 30 min or not (–) with 300 μM apocynin (APO), an inhibitor of NADPH oxidase or 4 μM desferrioxamine (DFO), a lysosome specific LMW iron chelator, or 60 μM deferiprone (DFP), a LMW iron chelator in all cell compartments. Values are given as means ± standard deviation of 3–7 independent experiments. Treated with EVs versus untreated: *p < 0.05; **p < 0.01; ***p < 0.001; CyB, Wort, BAF, APO, DFO, DFP pre-treated versus non pre-treated: #p < 0.01.

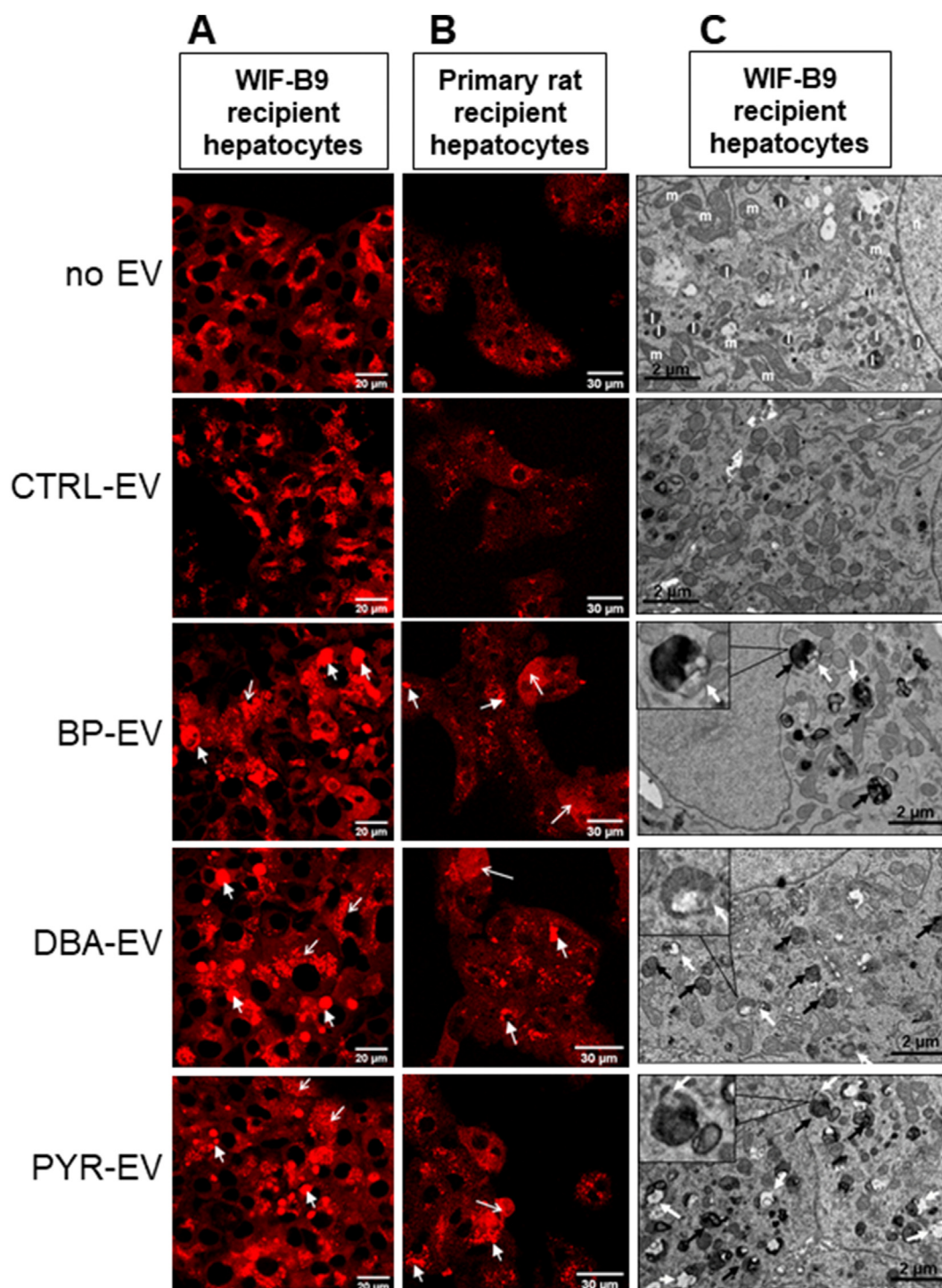


Fig. 8. EVs from PAH-treated parent hepatocytes alter lysosome morphology of recipient hepatocytes. (A, B) Confocal fluorescence microscopy after staining lysosomes of WIF-B9 (A) or primary rat (B) hepatocytes by the fluorescent probe LysoTracker. Punctuate red spots around the nucleus correspond to lysosomes with intact integrity. White arrows indicate lysosome permeabilization while solid white arrows show lysosome size increase. The images are representative of at least 4 independent experiments. (C) Transmission electron microscopy of WIF-B9 hepatocytes. Black and white arrows indicate lysosome size increase and lysosome membrane permeabilization, respectively. m: mitochondria l: lysosome n: nucleus. The images are representative of 2 independent experiments. WIF-B9 (A, C) and primary rat (B) healthy hepatocytes were treated or not (no EV) by 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ EVs for 24 and 18 h, respectively. EVs were isolated from WIF-B9 or primary rat parent hepatocytes exposed or not (CTRL-EV) to 100 nM BP (BP-EV), DBA (DBA-EV) or PYR (PYR-EV) for 72 h and 18 h, respectively. (For interpretation of the references to colour in this figure legend, the reader is referred to the Web version of this article.)

rupture of the lysosome membrane and a visible leak of content (Fig. 8C, white arrows).

Since alteration of lysosome membranes have been reported to affect V-ATPase and hence intraluminal pH [50], we measured lysosome pH using the LysoSensor Yellow/Blue DND-160 probe. A 0.2 increase in

pH was found (Supplementary Fig. S5) and ascertained the alteration of lysosome membrane.

Overall, these results demonstrated that PAH-EVs targeted lysosomes causing a membrane permeabilization and subsequent cell death.

3.5. The pro-oxidant components of EVs, NADPH oxidase and iron, could be involved in PAH-EV-induced apoptosis of recipient hepatocytes

Since PAH-EVs are enriched in proteins related to oxidative stress, such as NADPH oxidase and ferritin, their accumulation in lysosomes of recipient hepatocytes could participate to the alteration of those organelles and hence to apoptosis. To test this hypothesis, we first used two LMW-iron chelators, *i.e.* desferrioxamine and deferiprone. Whereas deferiprone chelates iron in all cell compartments, desferrioxamine is endocytosed and transported to lysosomes, making it a lysosome-specific iron chelator. The PAH-EVs-induced death of recipient WIF-B9 and primary rat hepatocytes was significantly attenuated by deferiprone or desferrioxamine (Fig. 7B and C). Additionally, the use of either chelator on recipient WIF-B9 hepatocytes limited the PAH-EV-induced lysosome membrane permeabilization (Supplementary Fig. S6). Finally, BP-EVs also significantly increased free iron in mitochondria (Fig. 9); such an increase was reduced by the lysosome-specific iron chelator, desferrioxamine. Logically, desferrioxamine also protected from PAH-induced mitochondria alterations (Supplementary Fig. S4). Altogether, these results suggested that LMW-iron overload in lysosomes is implicated in alterations of those organelles consequently leading to mitochondrial damages and cell death. In line with this, inhibition of NADPH oxidase by apocynin prevented the apoptosis induced by exposure to PAH-EVs in recipient hepatocytes (Fig. 7B and C).

As BP has already been described to induce oxidative stress and lysosome permeabilization by its own metabolism [27,51], one might argue that the above effects could be due to the presence of PAHs in EVs, thereby triggering oxidative stress in the recipient hepatocytes. In order to discard such a mechanism, we measured EROD activity, as an indicator of CYP1 activity. Indeed, the CYP1 enzymes, that are involved in the metabolism of BP and DBA, are known to exhibit a high increase

in activity in BP- or DBA-treated hepatocytes due to an elevation of their mRNA expression [23]. Here, CYP1 activity in recipient hepatocytes was not increased upon exposure to PAHs-EVs (Supplementary Fig. S7), thus suggesting that PAHs were not, or in a very negligible quantity, transferred to recipient cells through EVs.

4. Discussion

A growing body of evidences supports the major role of EVs as players of cell communication for the pathogenesis of liver diseases. Yet, nothing is known about their possible involvement in the onset of a key process in the course of liver diseases, namely oxidative stress of the parenchymal hepatic cells. Here, we report, for the first time in hepatocytes and also in the context of exposure to environmental contaminants, that EVs are able to trigger oxidative damages in healthy recipient cells through a requisite internalization of EVs. Thus, the only two published studies, about exposure of hepatocytes to EVs and a possible related oxidative stress, have limited their results to the evaluation of increased ROS levels [52,53]. In our work, in addition to ROS production in recipient hepatocytes, exposure to EVs was demonstrated to trigger lipid peroxidation that in turn caused cell death. In addition, as previously reported for ethanol [54] or ischemia-reperfusion [53], PAHs, by inducing oxidative stress in the producer hepatocytes, promoted EV release. This therefore suggests that oxidative stress is critical, in the context of PAH hepatotoxicity, for both EV release and EV-induced cell death.

In order to understand the mechanisms by which only PAH-EVs could induce oxidative damages in recipient hepatocytes, the specific content of these EVs with regards to compounds related to oxidative stress was compared to CTRL-EV content. Indeed, PAH-induced oxidative stress was clearly identified as the trigger of EV release by the

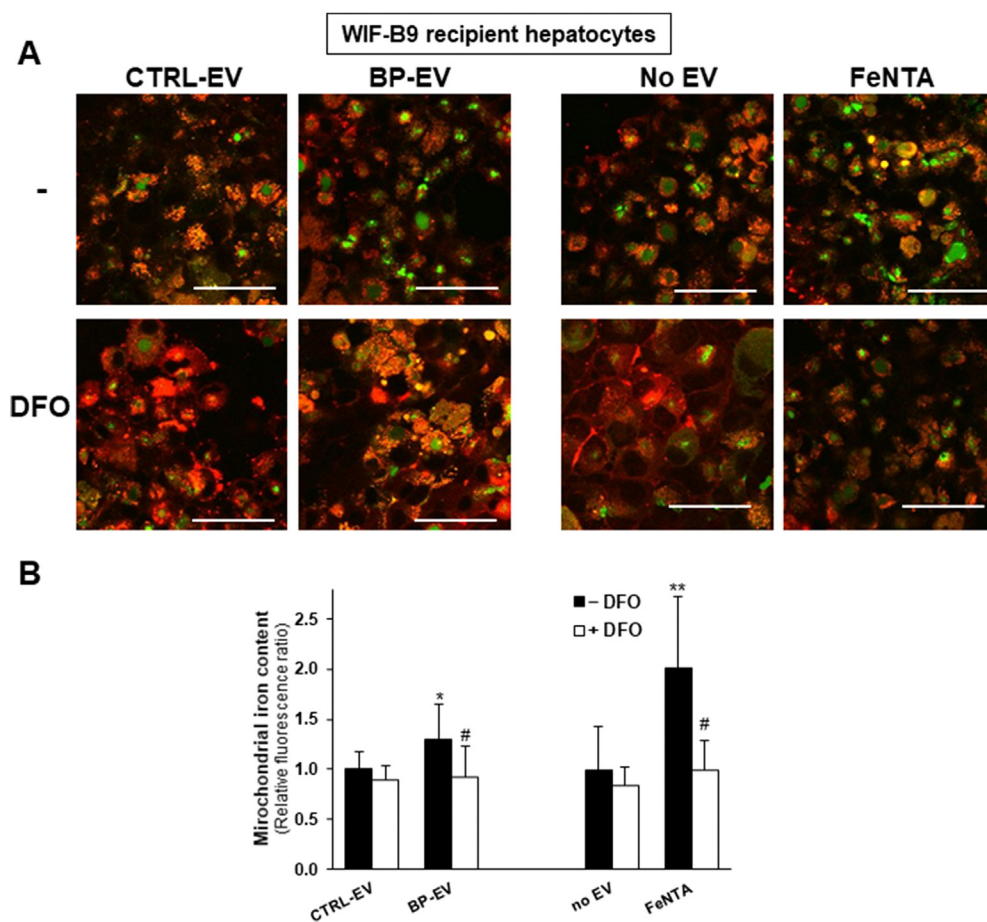


Fig. 9. Mitochondrial free iron content. (A) Confocal fluorescence microscopy after staining mitochondria of WIF-B9 hepatocytes by the fluorescent probes Mito-FerroGreen and MitoTracker red FM. Punctuate red spots correspond to mitochondria; green spots represent mitochondrial iron. (B) Mitochondrial iron content was quantified, cell by cell, by the relative ratio of green over red fluorescence. WIF-B9 hepatocytes were pre-treated for 30 min or not (–) with 4 μ M desferrioxamine (DFO) and were exposed or not (no EV) to 5 μ g/mL EVs for 24 h. EVs were isolated from WIF-B9 parent hepatocytes exposed or not (CTRL-EV) to 100 nM BP (BP-EV). Treatment of cells to nitrilotriacetate iron (FeNTA) was used as a positive control for iron accumulation in mitochondria. The images are representative of 3 independent experiments. Treated with EVs or FeNTA versus no EVs: * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$, DFO pre-treated versus non pre-treated: # $p < 0.05$. (For interpretation of the references to colour in this figure legend, the reader is referred to the Web version of this article.)

parent hepatocytes. Such an oxidation within the producer cell has been described to promote EV release by various mechanisms [43,55]. When studied, such a release is recurrently proposed as a protective mechanism to discard harmful molecules such as oxidized proteins, mtDNA, phospholipids and ROS production systems [43–46]. In our present work, NADPH oxidase, an enzyme that produces the free radical superoxide anion, was shown, for the first time in hepatocyte-derived EVs, to be more strongly expressed when producer hepatocytes exhibited an oxidative stress. Regarding other physiopathological conditions such as sepsis or inflammation, an increase in NADPH oxidase expression has also been reported in EVs isolated from bloodstream cells, which also exhibited an elevation of ROS levels [56,57]. Taken altogether, those results thus further support the possible role of EVs to protect the producer cells from oxidative stress. It is noteworthy that Gambim (2007) and Janizewski (2004) also showed that the NADPH oxidase of EVs was functional [56,57].

Expression of another protein related to oxidative stress, namely ferritin, was investigated in PAH-EVs. Recently, it was demonstrated that an important pathway for iron-loaded ferritin secretion occurred through the specialized smaller EV types, that is, exosomes [47]. In our models, exosomes were previously shown to be the main EV type [23]. The ferritin protein complex composed of 24 heavy and light subunits is able to store up to 4500 atoms of the iron element in a nontoxic form from which iron could be released to trigger oxidative damages. Here, the ferritin light subunit was found to be more expressed in PAH-EVs than in CTRL-EVs. In contrast to NADPH oxidase expression in EVs, such an elevation of ferritin light subunit has already been described in EVs released by stressed primary rat hepatocytes [58]. However, so far, authors have not checked a possible co-precipitation of free ferritin with EVs during their ultracentrifugation isolation procedure. In our study, cryo-electron microscopy ascertained the increased presence in PAH-EVs of large dense structures, similar to the typical ferritin-iron cores identified in macrophage EVs [47]. Furthermore, for the first time in EVs released by cells exposed to oxidative stress, an elevation of the levels of iron atom was uncovered by EDS microscopy in PAH-EVs, in accordance with the increase in expression of the iron storage protein ferritin. This supports the assumption by Truman-Rosentsvit (2018) that secretion of ferritin *via* exosomes could be an export of ferric iron [47]. This release of iron *via* EVs could be related once again to a mean for the hepatocytes to discard harmful molecules capable of inducing oxidative stress and cell death. Indeed, Brown et al. (2019) [59] have evidence a possible resistance towards ferroptosis, a new cell death type recently considered for NASH [60], by the way of an iron expulsion in EVs, more specifically in exosomes. Ferroptosis is an iron-dependent, necrosis-like programmed cell death characterized by the accumulation of lipid reactive oxygen species, and hence inhibited by lipophilic antioxidant [61,62]. In our model of WIB-B9 hepatocytes exposed to BP, a transient increase in LMW iron levels has been demonstrated, by electron resonance spectroscopy, at an early time point (24 h) followed by a significant decrease later on (96 h). In addition, the lipophilic antioxidant, vitamin E inhibited the release of EVs. Both those results lead us to suggest that an onset of ferroptosis might be triggered by BP, but would be stopped by the release of exosomes containing iron-loaded ferritin. To sum up, it appears that hepatocytes when submitted to oxidative stress, can release harmful species *via* EVs in order to protect themselves.

However, EVs loaded with such harmful species could then be engulfed by neighboring hepatocytes. Regarding that point, hepatocytes exposed to PAH-EVs were thus demonstrated to sustain oxidative stress leading to cell death, provided that those EVs were internalized in the recipient hepatocytes. This uptake was more important with PAH-EVs than CTRL-EVs. This could be ascribed to their difference in composition formerly reported, notably the increase in cholesterol of PAH-EVs [23]. Indeed, a cholesterol enrichment of surfaces can promote cell adhesion [63,64]. Binding of EVs to recipient cells is now recognized to facilitate subsequent endocytosis [48,65]. EVs derived from

hepatocytes submitted to other types of stress such as heat shock [66] or ethanol exposure [54] have also been described to be internalized, but without indicating the prerequisite of an EV engulfment to obtain inflammation or apoptosis of the recipient hepatocytes, respectively. This requirement of an EV uptake is actually decisive to explain why PAH-EVs but not CTRL-EVs were able to induce oxidative stress in recipient hepatocytes. Indeed, when endocytosed, EVs containing harmful cargoes, can go along the classical pathway of intracellular vesicular traffic to reach lysosomes [65,67]. Up to now, the only relationship between lysosomes and EVs, reported in literature, has dealt with a possible increase in EV release due to lysosome alteration [68,69]. Here, the accumulation of PAH-EVs in lysosomes led to a structural alteration of lysosomes, especially a lysosomal membrane permeabilization, an event well-known as being involved in several types of cell death, including apoptosis [50]. To our knowledge, it is the first time, thanks to the use of bafilomycin A1, an inhibitor of V-ATPase and hence of hydrolase activity, that EVs were found to trigger cell death *via* lysosomal alteration. It is noteworthy to consider that protease leakage from lysosome [50] and lysosomal alkalization [70], can induce downstream mitochondrial damages, but also ROS generation and caspase 3/7 activation. Thus, we also demonstrate for the first time that EVs, notably PAH-EVs, can induce major structural damages of mitochondria such as swelling and cristae alterations. These results are in accordance with the increase in mitochondrial permeability previously found in hepatocytes treated by circulating EVs from injured mice [53]. Interestingly, mitochondrial fusion and fission, considered as adaptive responses towards severe mitochondrial stress [71,72], might possibly occur in hepatocytes treated by PAH-EVs. Those processes, notably fission, are known to lead to apoptosis depending on the context [73]. It is also interesting to emphasize that, in a context of excessive production of ROS, mitochondria are well-known to constitute a favorite target [74,75].

It was particularly striking that EV cargoes (ferritin and NADPH oxidase), carried away from the parent cells to protect themselves from oxidative stress, would be responsible for lysosome alterations in healthy recipient hepatocytes. Precisely, an oxidative reaction, known to occur in the acidic and hydrolase-enriched lysosome lumen [76], could be triggered by those cargoes. Thus, degradation of ferritin by lysosome hydrolases could provide LMW iron species involved in the catalysis of the Fenton reaction, that converts hydrogen peroxide to the highly oxidant hydroxyl radical. The latter can then cause lipid peroxidation of lysosome membranes and consecutive lysosome membrane permeabilization. The use of specific lysosomal iron chelator and NADPH oxidase inhibitor has led us to show the involvement of EV cargoes, more precisely ferritin and NADPH oxidase, in PAH-EVs-induced apoptosis of the recipient hepatocytes. While it is the first time that such a route for iron entry and related damage effects is proposed, the participation of NADPH oxidase to apoptosis has previously been reported in endothelial and vascular smooth muscle recipient cells exposed to circulating EVs [56,57]. However, no real explanation of the mechanism involved in the apoptosis induction was provided by those authors. We now propose that NADPH oxidase carried by EVs could be a source of superoxide anion and hence hydrogen peroxide to promote, with iron derived from ferritin, the Fenton reaction needed to induce lysosomal membrane permeabilization (Fig. 10).

Finally, iron appeared to have a pivotal role in the process of cell killing by EVs. Indeed, it can also be found in mitochondria of hepatocytes treated by BP-EVs after translocation from lysosomes. An iron translocation from lysosomes to mitochondria has already been described in several types of hepatocyte attack such as ischemia-reperfusion [77], oxidative stress [78] or drug intoxication [79]), but we show, for the first time, that it can also be related to an EV endocytosis. In all cases previously reported [77–79], this iron overload of mitochondria was responsible for mitochondrial ROS formation and permeability transition, and also apoptosis.

It could be confusing to consider EVs as key actors in the

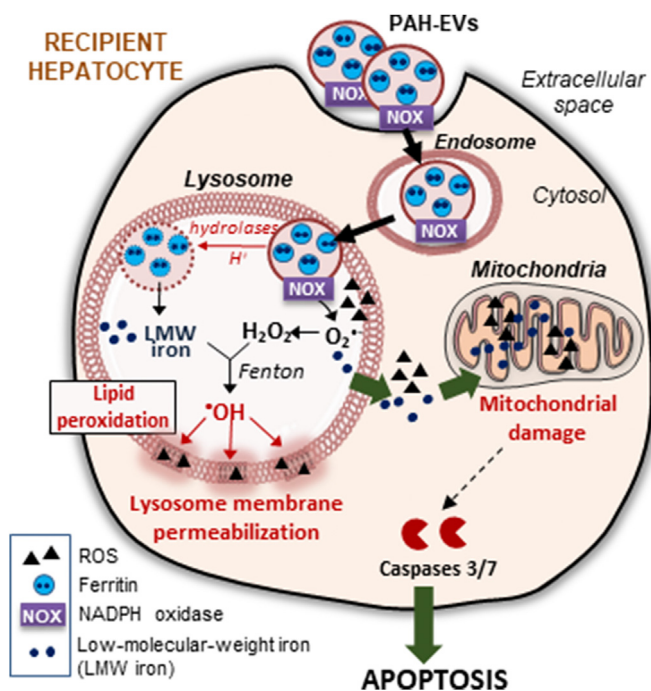


Fig. 10. Proposed mechanisms underlying the capacity of EVs derived from PAH-treated parent hepatocytes (PAH-EVs) to induce apoptosis in healthy recipient hepatocytes. PAH-EVs enriched in NADPH oxidase and ferritin are internalized in recipient hepatocytes, then trafficked towards lysosomes. In lysosomes, NADPH oxidase could be a source of superoxide anion that can be converted in H_2O_2 ; in parallel, hydrolases of lysosome lumen could degrade EV membrane and ferritin, thus providing LMW iron. H_2O_2 and iron can then promote the Fenton reaction leading to the highly oxidant free radical hydroxyl production and thus lipid peroxidation of lysosome membranes. The consecutive lysosomal membrane permeabilization could be upstream mitochondrial damages and apoptosis of recipient hepatocytes.

progression of PAH-induced oxidative stress leading to cell death, since hepatocytes exposed to those toxicants release EVs loaded with pro-oxidant compounds, likely to reduce the intensity of the damage in the parent cells. Thus, the increase in lipid peroxidation for PAH-exposed hepatocytes was restricted to only 35%. However, these EVs were able to induce oxidative stress in healthy untreated hepatocytes. To really appreciate the significance of such an effect, it is important to place this EV release in the particular context of the liver architecture, notably the hepatic lobule, and PAH exposure. First, the flow of blood entering into the lobules from the portal nodes towards the central vein through sinusoidal blood vessels lining hepatocytes contributes to a zonation of the liver. For instance, the pericentral AhR expression [80] and induction of CYP1 enzymes [81] result in increased exposure of the pericentral hepatocytes to toxic intermediates. The possible release of EVs by those hepatocytes into the bile flow [82] that circulate in the opposite direction of the blood flow could thus contribute to the spatial propagation of the PAH toxicity to healthy hepatocytes located in other zones notably in periportal zone. Second, another issue worth stressing is that human PAH exposure can be an environmental intermittent exposure, but EV release due to PAH exposure can propagate the potential hepatotoxicity over a period of several days even in the absence of PAHs. Therefore, EVs create a vicious cycle, thereby aggravating oxidative stress by a spatio and temporal way.

5. Conclusion

The present study reports, for the first time, that EVs released after PAH exposure can mediate lysosome membrane permeabilization of recipient hepatocytes, thereby leading to oxidative stress and ultimately

apoptosis. Considering all the present results, we can suggest that the EVs released in the extracellular environment by hepatocytes, possibly protecting themselves from oxidative damage by carrying away deleterious components, could be transferred with their harmful cargo to neighboring or even distant healthy hepatocytes and induce oxidative stress. Thus, EV cargoes, notably iron and NADPH oxidase, appeared as critical for both EV release and EV-induced oxidative damage. To conclude, hepatocyte-derived EVs could play a key role in the pathogenesis of liver diseases especially in the field of toxicant-associated oxidative stress.

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). Nettie van Meteren is recipient of a doctoral fellowship from the French Ministry for Higher Education and Research.

Acknowledgements

We thank the animal house platform ARCHE (SFR Biosit, Rennes, France) and Laurence Bernard-Touami for her assistance.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data to this article can be found online at <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2020.08.001>.

References

- [1] M. Yáñez-Mó, P.R.-M. Siljander, Z. Andreu, A. Bedina Zavec, F.E. Borrás, E.I. Buzas, K. Buzas, E. Casal, F. Cappello, J. Carvalho, E. Colás, A. Cordeiro-da Silva, S. Fais, J.M. Falcon-Perez, I.M. Ghobrial, B. Giebel, M. Gimona, M. Graner, I. Gursel, M. Gursel, N.H.H. Heegaard, A. Hendrix, P. Kierulf, K. Kokubun, M. Kusanovic, V. Kralj-Iglic, E.-M. Krämer-Albers, S. Laitinen, C. Lässer, T. Lener, E. Ligeti, A. Liné, G. Lipps, A. Llorente, J. Lötvall, M. Manček-Keber, A. Marcilla, M. Mittelbrunn, I. Nazarenko, E.N.M. Nolte't Hoen, T.A. Nyman, L. O'Driscoll, M. Olivan, C. Oliveira, É. Pállinger, H.A. del Portillo, J. Reventós, M. Rigau, E. Rohde, M. Sammar, F. Sánchez-Madrid, N. Santarém, K. Schallmoser, M. Stampe Ostenfeld, W. Stoorvogel, R. Stukelj, S.G. Van der Grein, M. Helena Vasconcelos, M.H.M. Wauben, O. De Wever, Biological properties of extracellular vesicles and their physiological functions, *J. Extracell. Vesicles* 4 (2015) 27066, <https://doi.org/10.3402/jev.v4.27066>.
- [2] M. Simons, G. Raposo, Exosomes – vesicular carriers for intercellular communication, *Curr. Opin. Cell Biol.* 21 (2009) 575–581, <https://doi.org/10.1016/j.cob.2009.03.007>.
- [3] G. van Niel, G. D'Angelo, G. Raposo, Shedding light on the cell biology of extracellular vesicles, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 19 (2018) 213–228, <https://doi.org/10.1038/nrm.2017.125>.
- [4] P.B. Devhare, R.B. Ray, Extracellular vesicles: novel mediator for cell to cell communications in liver pathogenesis, *Mol. Aspect. Med.* 60 (2018) 115–122, <https://doi.org/10.1016/j.mam.2017.11.001>.
- [5] P. Hirsova, S.H. Ibrahim, V.K. Verma, L.A. Morton, V.H. Shah, N.F. LaRusso, G.J. Gores, H. Malhi, Extracellular vesicles in liver pathobiology: small particles with big impact, *Hepatology* 64 (2016) 2219–2233, <https://doi.org/10.1002/hep.28814>.
- [6] K. Sato, L. Kennedy, S. Liangpunsakul, P. Kusumanchi, Z. Yang, F. Meng, S. Glaser, H. Francis, G. Alpini, Intercellular communication between hepatic cells in liver diseases, *Int. J. Mol. Sci.* 20 (2019) 2180, <https://doi.org/10.3390/ijms20092180>.
- [7] I. Garcia-Martinez, N. Santoro, Y. Chen, R. Hoque, X. Ouyang, S. Caprio, M.J. Shlomchik, R.L. Coffman, A. Candia, W.Z. Mehal, Hepatocyte mitochondrial DNA drives nonalcoholic steatohepatitis by activation of TLR9, *J. Clin. Invest.* 126 (2016) 859–864, <https://doi.org/10.1172/JCI83885>.
- [8] E. Kakazu, A.S. Mauer, M. Yin, H. Malhi, Hepatocytes release ceramide-enriched pro-inflammatory extracellular vesicles in an IRE1 α -dependent manner, *J. Lipid Res.* 57 (2016) 233–245, <https://doi.org/10.1194/jlr.M063412>.
- [9] C.-Y. Liao, M.J. Song, Y. Gao, A.S. Mauer, A. Revzin, H. Malhi, Hepatocyte-derived lipotoxic extracellular vesicle sphingosine 1-phosphate induces macrophage chemotaxis, *Front. Immunol.* 9 (2018), <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.02980>.
- [10] D. Povero, N. Panera, A. Eguchi, C.D. Johnson, B.G. Papouchado, L. de Araujo Horcel, E.M. Pinatel, A. Alisi, V. Nobili, A.E. Feldstein, Lipid-induced hepatocyte-derived extracellular vesicles regulate hepatic stellate cells via microRNA targeting peroxisome proliferator-activated receptor- γ , *Cell. Mol. Gastroenterol. Hepatol.* 1 (2015) 646–663.

- [11] Y.-S. Lee, S.Y. Kim, E. Ko, J.-H. Lee, H.-S. Yi, Y.J. Yoo, J. Je, S.J. Suh, Y.K. Jung, J.H. Kim, Y.S. Seo, H.J. Yim, W.-I. Jeong, J.E. Yeon, S.H. Um, K.S. Byun, Exosomes derived from palmitic acid-treated hepatocytes induce fibrotic activation of hepatic stellate cells, *Sci. Rep.* 7 (2017), <https://doi.org/10.1038/s41598-017-03389-2>.
- [12] F. Jiang, Q. Chen, W. Wang, Y. Ling, Y. Yan, P. Xia, Hepatocyte-derived extracellular vesicles promote endothelial inflammation and atherogenesis via microRNA-1, *J. Hepatol.* 72 (2020) 156–166, <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2019.09.014>.
- [13] D. Povero, A. Eguchi, I.R. Niesman, N. Andronikou, X. de Mollerat du Jeu, A. Mulya, M. Berk, M. Lazic, S. Thapaliya, M. Parola, H.H. Patel, A.E. Feldstein, Lipid-induced toxicity stimulates hepatocytes to release angiogenic microparticles that require vanin-1 for uptake by endothelial cells, *Sci. Signal.* 6 (2013), <https://doi.org/10.1126/scisignal.2004512.ra88-ra88>.
- [14] S. Li, M. Hong, H.-Y. Tan, N. Wang, Y. Feng, Insights into the role and interdependence of oxidative stress and inflammation in liver diseases, *Oxid. Med. Cell. Longev.* (2016) 1–21, <https://doi.org/10.1155/2016/4234061>.
- [15] M. Masarone, V. Rosato, M. Dallio, A.G. Gravina, A. Aglitti, C. Loguercio, A. Federico, M. Persico, Role of oxidative stress in pathophysiology of nonalcoholic fatty liver disease, *Oxid. Med. Cell. Longev.* (2018) 1–14, <https://doi.org/10.1155/2018/9547613>.
- [16] Z. Chen, R. Tian, Z. She, J. Cai, H. Li, Role of oxidative stress in the pathogenesis of nonalcoholic fatty liver disease, *Free Radic. Biol. Med.* 152 (2020) 116–141, <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2020.02.025>.
- [17] G. Bodega, M. Alique, L. Puebla, J. Carracedo, R.M. Ramírez, Microvesicles: ROS scavengers and ROS producers, *J. Extracell. Vesicles* 8 (2019) 1626654, <https://doi.org/10.1080/20013078.2019.1626654>.
- [18] W. Tan, Y. Zhang, M. Li, X. Zhu, X. Yang, J. Wang, S. Zhang, W. Zhu, J. Cao, H. Yang, L. Zhang, miR-27a-containing exosomes secreted by irradiated skin keratinocytes delayed the migration of unirradiated skin fibroblasts, *Int. J. Biol. Sci.* 15 (2019) 2240–2255, <https://doi.org/10.7150/ijbs.35356>.
- [19] A. Söderberg, A.M. Barral, M. Söderström, B. Sander, A. Rosén, Redox-signaling transmitted in trans to neighboring cells by melanoma-derived TNF-containing exosomes, *Free Radic. Biol. Med.* 43 (2007) 90–99, <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2007.03.026>.
- [20] S. Dutta, C. Warshall, C. Bandyopadhyay, D. Dutta, B. Chandran, Interactions between exosomes from breast cancer cells and primary mammary epithelial cells leads to generation of reactive oxygen species which induce DNA damage response, stabilization of p53 and autophagy in epithelial cells, *PLoS ONE* 9 (2014) e97580, <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0097580>.
- [21] F.R.M. Stassen, P.H. van Eijck, P.H.M. Savelkoul, E.F.M. Wouters, G.G.U. Rohde, J.J. Briedé, N.L. Reynaert, T.M. de Kok, B.J. Benedikter, Cell type- and exposure-specific modulation of CD63/CD81-positive and tissue factor-positive extracellular vesicle release in response to respiratory toxicants, *Oxid. Med. Cell. Longev.* (2019) 1–9, <https://doi.org/10.1155/2019/5204218>.
- [22] B.J. Benedikter, C. Volgers, P.H. van Eijck, E.F.M. Wouters, P.H.M. Savelkoul, N.L. Reynaert, G.R.M.M. Haenen, G.G.U. Rohde, A.R. Weseler, F.R.M. Stassen, 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 (2017) 334–344, <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2017.03.026>.
- [23] N. van Meteren, D. Lagadic-Gossmann, M. Chevanne, I. Gallais, D. Gobart, A. Burel, S. Bucher, N. Grova, B. Fromenty, B.M.R. Appenzeller, S. Chevance, F. Gauffre, E. Le Ferrec, O. Sergent, 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 (2019) 443–462, <https://doi.org/10.1093/toxsci/kfz157>.
- [24] S.-H. Cherg, S.-L. Hsu, J.-L. Yang, C.-T.R. Yu, H. Lee, Suppressive effect of 1-nitropyrene on benzo[a]pyrene-induced CYP1A1 protein expression in HepG2 cells, *Toxicol. Lett.* 161 (2006) 236–243, <https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2005.10.002>.
- [25] L. Huc, L. Sparfel, M. Rissel, M.-T. Dimanche-Boitrel, A. Guillouzo, O. Fardel, D. Lagadic-Gossmann, Identification of Na⁺/H⁺ exchange as a new target for toxic polycyclic aromatic hydrocarbons, *Faseb. J.* 18 (2004) 344–346.
- [26] J.-Q. Ma, C.-M. Liu, Z.-H. Qin, J.-H. Jiang, Y.-Z. Sun, Ganoderma applanatum terpenes protect mouse liver against benzo(a)pyrene-induced oxidative stress and inflammation, *Environ. Toxicol. Pharmacol.* 31 (2011) 460–468, <https://doi.org/10.1016/j.etap.2011.02.007>.
- [27] A. Collin, K. Hardonnière, M. Chevanne, J. Vuillemin, N. Podechard, A. Burel, M.-T. Dimanche-Boitrel, D. Lagadic-Gossmann, O. Sergent, Cooperative interaction of benzo[a]pyrene and ethanol on plasma membrane remodeling is responsible for enhanced oxidative stress and cell death in primary rat hepatocytes, *Free Radic. Biol. Med.* 72 (2014) 11–22, <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2014.03.029>.
- [28] M. Gorria, X. Tekpli, O. Sergent, L. Huc, F. Gaboriau, M. Rissel, M. Chevanne, M.-T. Dimanche-Boitrel, D. Lagadic-Gossmann, Membrane fluidity changes are associated with benzo[a]pyrene-induced apoptosis in F258 cells: protection by exogenous cholesterol, *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1090 (2006) 108–112, <https://doi.org/10.1196/annals.1378.011>.
- [29] M. Kumar, V.L. Sharma, A. Sehgal, M. Jain, Protective effects of green and white tea against benzo(a)pyrene induced oxidative stress and DNA damage in murine model, *Nutr. Canc.* 64 (2012) 300–306, <https://doi.org/10.1080/01635581.2012.648300>.
- [30] J.-H. Park, D. Mangal, A.J. Frey, R.G. Harvey, I.A. Blair, T.M. Penning, Aryl hydrocarbon receptor facilitates DNA strand breaks and 8-oxo-2'-deoxyguanosine formation by the aldo-keto reductase product benzo[a]pyrene-7,8-dione, *J. Biol. Chem.* 284 (2009) 29725–29734, <https://doi.org/10.1074/jbc.M109.042143>.
- [31] A. Sehgal, M. Kumar, M. Jain, D.K. Dhawan, Combined effects of curcumin and piperine in ameliorating benzo(a)pyrene induced DNA damage, *Food Chem. Toxicol.* 49 (2011) 3002–3006, <https://doi.org/10.1016/j.fct.2011.07.058>.
- [32] X. Tekpli, M. Rissel, L. Huc, D. Catheline, O. Sergent, V. Rioux, P. Legrand, J.A. Holme, M.-T. Dimanche-Boitrel, D. Lagadic-Gossmann, Membrane remodeling, an early event in benzo[a]pyrene-induced apoptosis, *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 243 (2010) 68–76, <https://doi.org/10.1016/j.taap.2009.11.014>.
- [33] A. Tête, I. Gallais, M. Imran, M. Chevanne, M. Liamin, L. Sparfel, S. Bucher, A. Burel, N. Podechard, B.M.R. Appenzeller, B. Fromenty, N. Grova, O. Sergent, D. Lagadic-Gossmann, Mechanisms involved in the death of steatotic WIF-B9 hepatocytes co-exposed to benzo[a]pyrene and ethanol: a possible key role for xenobiotic metabolism and nitric oxide, *Free Radic. Biol. Med.* 129 (2018) 323–337, <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2018.09.042>.
- [34] J.-K. Ma, W.F. Saad Eldin, W.R. El-Ghareeb, A.E. Elhelaly, M.H.E. Khedr, X. Li, X.-C. Huang, Effects of pyrene on human liver HepG2 cells: cytotoxicity, oxidative stress, and transcriptomic changes in xenobiotic metabolizing enzymes and inflammatory markers with protection trial using lycopene, *BioMed Res. Int.* (2019) 1–10, <https://doi.org/10.1155/2019/7604851>.
- [35] X.-J. Zhang, Z. Shi, J.-X. Lv, X. He, N.A. Englert, S.-Y. Zhang, Pyrene is a novel Constitutive Androstane Receptor (CAR) activator and causes hepatotoxicity by CAR, *Toxicol. Sci.* 147 (2015) 436–445, <https://doi.org/10.1093/toxsci/kfv142>.
- [36] C. Biagini, V. Bender, F. Borde, E. Boissel, M.-C. Bonnet, M.-T. Masson, D. Cassio, S. Chevalier, Cytochrome P450 expression—induction profile and chemically mediated alterations of the WIF-B9 cell line, *Biol. Cell.* 98 (2006) 23–32, <https://doi.org/10.1042/BC20050003>.
- [37] S. Bucher, A. Tête, N. Podechard, M. Liamin, D. Le Guillou, M. Chevanne, C. Coulouam, M. Imran, I. Gallais, M. Fernier, Q. Hamdaoui, M.-A. Robin, O. Sergent, B. Fromenty, D. Lagadic-Gossmann, Co-exposure to benzo[a]pyrene and ethanol induces a pathological progression of liver steatosis in vitro and in vivo, *Sci. Rep.* 8 (2018) 5963, <https://doi.org/10.1038/s41598-018-24403-1>.
- [38] EFSA, Polycyclic aromatic hydrocarbons in food - scientific opinion of the panel on contaminants in the food chain, *EFSA J* 6 (2008) 724, <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2008.724>.
- [39] M. Machala, J. Vondráček, L. Bláha, M. Ciganek, J. Neča, Aryl hydrocarbon receptor-mediated activity of mutagenic polycyclic aromatic hydrocarbons determined using in vitro reporter gene assay, *Mutat. Res. Toxicol. Environ. Mutagen.* 497 (2001) 49–62.
- [40] J. Dubochet, A.W. McDowell, Vitrification of pure water for electron microscopy, *J. Microsc.* 124 (1981) 3–4, <https://doi.org/10.1111/j.1365-2818.1981.tb02483.x>.
- [41] L. Ma, Q. Ouyang, G.C. Werthmann, H.M. Thompson, E.M. Morrow, Live-cell microscopy and fluorescence-based measurement of luminal pH in intracellular organelles, *Front. Cell Dev. Biol.* 5 (2017) 71, <https://doi.org/10.3389/fcell.2017.00071>.
- [42] O. Sergent, J.P. Anger, G. Lescoat, N. Padeloup, P. Cillard, J. Cillard, EPR determination of low molecular weight iron content applied to whole rat hepatocytes, *Cell. Mol. Biol. Noisy-Gd. Fr.* 43 (1997) 793–800.
- [43] B.J. Benedikter, A.R. Weseler, E.F.M. Wouters, P.H.M. Savelkoul, G.G.U. Rohde, F.R.M. Stassen, Redox-dependent thiol modifications: implications for the release of extracellular vesicles, *Cell. Mol. Life Sci.* 75 (2018) 2321–2337, <https://doi.org/10.1007/s00018-018-2806-z>.
- [44] C. Borrás, C. Mas-Bargues, J. Sanz-Ros, A. Román-Domínguez, L. Gimeno-Mallench, M. Inglés, J. Gambini, J. Viña, Extracellular vesicles and redox modulation in aging, *Free Radic. Biol. Med.* 149 (2020) 44–50, <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2019.11.032>.
- [45] K. Szabó-Taylor, B. Ryan, X. Osteikoetxea, T.G. Szabó, B. Sódar, M. Holub, A. Németh, K. Pálóczi, É. Pállinger, P. Winyard, E.I. Buzás, Oxidative and other posttranslational modifications in extracellular vesicle biology, *Semin. Cell Dev. Biol.* 40 (2015) 8–16, <https://doi.org/10.1016/j.semcdb.2015.02.012>.
- [46] C. Yarana, D. St Clair, Chemotherapy-induced tissue injury: an insight into the role of extracellular vesicles-mediated oxidative stress responses, *Antioxidants* 6 (2017) 75, <https://doi.org/10.3390/antiox6040075>.
- [47] M. Truman-Rosentsvit, D. Berenbaum, L. Spektor, L.A. Cohen, S. Belizowsky-Moshe, L. Lifshitz, J. Ma, W. Li, E. Kesselman, I. Abutbul-Ionita, D. Danino, L. Gutiérrez, H. Li, K. Li, H. Lou, M. Regoni, M. Poli, F. Glaser, T.A. Rouault, E.G. Meyron-Holtz, Ferritin is secreted via 2 distinct nonclassical vesicular pathways, *Blood* 131 (2018) 342–352, <https://doi.org/10.1182/blood-2017-02-768580>.
- [48] L.A. Mulcahy, R.C. Pink, D.R.F. Carter, Routes and mechanisms of extracellular vesicle uptake, *J. Extracell. Vesicles* 3 (2014) 24641, <https://doi.org/10.3402/jev.v3.24641>.
- [49] X. Tekpli, L. Huc, O. Sergent, B. Dendelé, M.-T. Dimanche-Boitrel, J.A. Holme, D. Lagadic-Gossmann, NHE-1 relocation outside cholesterol-rich membrane microdomains is associated with its benzo [a] pyrene-related apoptotic function, *Cell. Physiol. Biochem.* 29 (2012) 657–666.
- [50] F. Wang, R. Gómez-Sintes, P. Boya, Lysosomal membrane permeabilization and cell death, *Traffic* 19 (2018) 918–931, <https://doi.org/10.1111/tra.12613>.
- [51] M. Gorria, X. Tekpli, M. Rissel, O. Sergent, L. Huc, N. Landvik, O. Fardel, M.-T. Dimanche-Boitrel, J.A. Holme, D. Lagadic-Gossmann, A new lactoferrin- and iron-dependent lysosomal death pathway is induced by benzo[a]pyrene in hepatic epithelial cells, *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 228 (2008) 212–224, <https://doi.org/10.1016/j.taap.2007.12.021>.
- [52] Y.-E. Cho, W. Seo, D.-K. Kim, P.-G. Moon, S.-H. Kim, B.-H. Lee, B.-J. Song, M.-C. Baek, Exogenous exosomes from mice with acetaminophen-induced liver injury promote toxicity in the recipient hepatocytes and mice, *Sci. Rep.* 8 (2018), <https://doi.org/10.1038/s41598-018-34309-7>.
- [53] N.C. Teoh, H. Ajamieh, H.J. Wong, K. Croft, T. Mori, A.C. Allison, G.C. Farrell, Microparticles mediate hepatic ischemia-reperfusion injury and are the targets of dioxin (ASP8597), *PLoS ONE* 9 (2014) e104376, <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0104376>.
- [54] Y.-E. Cho, E. Mezey, J.P. Hardwick, N. Salem, D.L. Clemens, B.-J. Song, Increased

- ethanol-inducible cytochrome P450-2E1 and cytochrome P450 isoforms in exosomes of alcohol-exposed rodents and patients with alcoholism through oxidative and endoplasmic reticulum stress, *Hepatology*. **1** (2017) 675–690.
- [55] M.C. Larson, C.A. Hillery, N. Hogg, Circulating membrane-derived microvesicles in redox biology, *Free Radic. Biol. Med.* **73** (2014) 214–228, <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2014.04.017>.
- [56] M.H. Gambim, A.D.O. Do Carmo, L. Marti, S. Veríssimo-Filho, L.R. Lopes, M. Janiszewski, Platelet-derived exosomes induce endothelial cell apoptosis through peroxynitrite generation: experimental evidence for a novel mechanism of septic vascular dysfunction, *Crit. Care* **11** (2007) R107.
- [57] M. Janiszewski, A.O. do Carmo, M.A. Pedro, E. Silva, E. Knobel, F.R.M. Laurindo, Platelet-derived exosomes of septic individuals possess proapoptotic NAD(P)H oxidase activity: a novel vascular redox pathway*, *Crit. Care Med.* **32** (2004) 818–825, <https://doi.org/10.1097/01.CCM.0000114829.17746.19>.
- [58] E. Rodríguez-Suárez, E. Gonzalez, C. Hughes, J. Conde-Vancells, A. Rudella, F. Royo, L. Palomo, F. Elortza, S.C. Lu, J.M. Mato, J.P.C. Vissers, J.M. Falcón-Pérez, Quantitative proteomic analysis of hepatocyte-secreted extracellular vesicles reveals candidate markers for liver toxicity, *J. Proteomics*. **103** (2014) 227–240, <https://doi.org/10.1016/j.jprot.2014.04.008>.
- [59] C.W. Brown, J.J. Amante, P. Chhoy, A.L. Elaimy, H. Liu, L.J. Zhu, C.E. Baer, S.J. Dixon, A.M. Mercurio, Prominin 2 drives ferroptosis resistance by stimulating iron export, *Dev. Cell* **51** (2019) 575–586, <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2019.10.007> e4.
- [60] S. Aizawa, G. Brar, H. Tsukamoto, Cell death and liver disease, *Gut Liver* **14** (2020) 20–29, <https://doi.org/10.5009/gnl18486>.
- [61] S.J. Dixon, K.M. Lemberg, M.R. Lamprecht, R. Skouta, E.M. Zaitsev, C.E. Gleason, D.N. Patel, A.J. Bauer, A.M. Cantley, W.S. Yang, B. Morrison, B.R. Stockwell, Ferroptosis: an iron-dependent form of nonapoptotic cell death, *Cell* **149** (2012) 1060–1072, <https://doi.org/10.1016/j.cell.2012.03.042>.
- [62] M. Gao, P. Monian, N. Quadri, R. Ramasamy, X. Jiang, Glutaminolysis and transferrin regulate ferroptosis, *Mol. Cell*. **59** (2015) 298–308, <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2015.06.011>.
- [63] J.J. Hwang, S.N. Iyer, L.-S. Li, R. Claussen, D.A. Harrington, S.I. Stupp, Self-assembling biomaterials: liquid crystal phases of cholesteryl oligo(L-lactic acid) and their interactions with cells, *Proc. Natl. Acad. Sci. Unit. States Am.* **99** (2002) 9662–9667, <https://doi.org/10.1073/pnas.152667399>.
- [64] G. Yu, J. Ji, J. Shen, Synthesis and characterization of cholesterol-poly(ethylene glycol)-poly(D,L-lactic acid) copolymers for promoting osteoblast attachment and proliferation, *J. Mater. Sci. Mater. Med.* **17** (2006) 899–909, <https://doi.org/10.1007/s10856-006-0188-5>.
- [65] T. Tian, Y.-L. Zhu, F.-H. Hu, Y.-Y. Wang, N.-P. Huang, Z.-D. Xiao, Dynamics of exosome internalization and trafficking, *J. Cell. Physiol.* **228** (2013) 1487–1495, <https://doi.org/10.1002/jcp.24304>.
- [66] Y. Li, X. Zhu, M. Zhang, H. Tong, L. Su, Heatstroke-induced hepatocyte exosomes promote liver injury by activating the NOD-like receptor signaling pathway in mice, *PeerJ* **7** (2019) e8216, <https://doi.org/10.7717/peerj.8216>.
- [67] J. Zheng, J. Tan, Y.-Y. Miao, Q. Zhang, Extracellular Vesicles Degradation Pathway Based Autophagy Lysosome Pathway, (2019), p. 14.
- [68] L. Alvarez-Erviti, Y. Seow, A.H. Schapira, C. Gardiner, I.L. Sargent, M.J.A. Wood, J.M. Cooper, Lysosomal dysfunction increases exosome-mediated alpha-synuclein release and transmission, *Neurobiol. Dis.* **42** (2011) 360–367, <https://doi.org/10.1016/j.nbd.2011.01.029>.
- [69] A.M. Miranda, Z.M. Lasiecka, Y. Xu, J. Neufeld, S. Shahriar, S. Simoes, R.B. Chan, T.G. Oliveira, S.A. Small, G. Di Paolo, Neuronal lysosomal dysfunction releases exosomes harboring APP C-terminal fragments and unique lipid signatures, *Nat. Commun.* **9** (2018) 291, <https://doi.org/10.1038/s41467-017-02533-w>.
- [70] E.A. Assali, D. Shlomo, J. Zeng, E.P. Taddeo, K.M. Trudeau, K.A. Erion, A.H. Colby, M.W. Grinstaff, M. Liesa, G. Las, O.S. Shirihai, Nanoparticle-mediated lysosomal reacidification restores mitochondrial turnover and function in β cells under lipotoxicity, *Faseb. J.* **33** (2019) 4154–4165, <https://doi.org/10.1096/fj.201801292R>.
- [71] J.N. Meyer, T.C. Leuthner, A.L. Luz, Mitochondrial fusion, fission, and mitochondrial toxicity, *Toxicology* **391** (2017) 42–53, <https://doi.org/10.1016/j.tox.2017.07.019>.
- [72] A. Picca, F. Guerra, R. Calvani, C. Bucci, M. Lo Monaco, A. Bentivoglio, H. Coelho-Júnior, F. Landi, R. Bernabei, E. Marzetti, Mitochondrial dysfunction and aging: insights from the analysis of extracellular vesicles, *Int. J. Mol. Sci.* **20** (2019) 805, <https://doi.org/10.3390/ijms20040805>.
- [73] J.-L. Perfettini, T. Roumier, G. Kroemer, Mitochondrial fusion and fission in the control of apoptosis, *Trends Cell Biol.* **15** (2005) 179–183, <https://doi.org/10.1016/j.tcb.2005.02.005>.
- [74] G. Paradies, V. Paradies, F.M. Ruggiero, G. Petrosillo, Oxidative stress, cardiopilin and mitochondrial dysfunction in nonalcoholic fatty liver disease, *World J. Gastroenterol.* **20** (2014) 14205, <https://doi.org/10.3748/wjg.v20.i39.14205>.
- [75] A. Mansouri, C.-H. Gattolliat, T. Asselah, Mitochondrial dysfunction and signaling in chronic liver diseases, *Gastroenterology* **155** (2018) 629–647, <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2018.06.083>.
- [76] A. Terman, T. Kurz, Lysosomal iron, iron chelation, and cell death, *Antioxidants Redox Signal.* **18** (2013) 888–898, <https://doi.org/10.1089/ars.2012.4885>.
- [77] X. Zhang, J.J. Lemasters, Translocation of iron from lysosomes to mitochondria during ischemia predisposes to injury after reperfusion in rat hepatocytes, *Free Radic. Biol. Med.* **63** (2013) 243–253, <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2013.05.004>.
- [78] A. Uchiyama, J.-S. Kim, K. Kon, H. Jaeschke, K. Ikejima, S. Watanabe, J.J. Lemasters, Translocation of iron from lysosomes into mitochondria is a key event during oxidative stress-induced hepatocellular injury, *Hepatology*. **48** (2008) 1644–1654, <https://doi.org/10.1002/hep.22498>.
- [79] J. Hu, A. Kholmukhamedov, C.C. Lindsey, C.C. Beeson, H. Jaeschke, J.J. Lemasters, Translocation of iron from lysosomes to mitochondria during acetaminophen-induced hepatocellular injury: protection by starch-desferal and minocycline, *Free Radic. Biol. Med.* **97** (2016) 418–426, <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2016.06.024>.
- [80] K.O. Lindros, T. Oinonen, I. Johansson, M. Ingelman-Sundberg, Selective centrilobular expression of the aryl hydrocarbon receptor in rat liver, *J. Pharmacol. Exp. Therapeut.* **280** (1997) 506–511.
- [81] T. Oinonen, S. Saarikoski, K. Husgafvel-Pursiainen, A. Hirvonen, K.O. Lindros, Pretranslational induction of cytochrome P4501A enzymes by beta-naphthoflavone and 3-methylcholanthrene occurs in different liver zones, *Biochem. Pharmacol.* **48** (1994) 2189–2197, [https://doi.org/10.1016/0006-2952\(94\)00385-8](https://doi.org/10.1016/0006-2952(94)00385-8).
- [82] A.I. Masyuk, B.Q. Huang, C.J. Ward, S.A. Gradilone, J.M. Banales, T.V. Masyuk, B. Radtke, P.L. Splinter, N.F. LaRusso, Biliary exosomes influence cholangiocyte regulatory mechanisms and proliferation through interaction with primary cilia, *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* **299** (2010) G990–G999, <https://doi.org/10.1152/ajpgi.00093.2010>.

Supplementary Material Figure S1

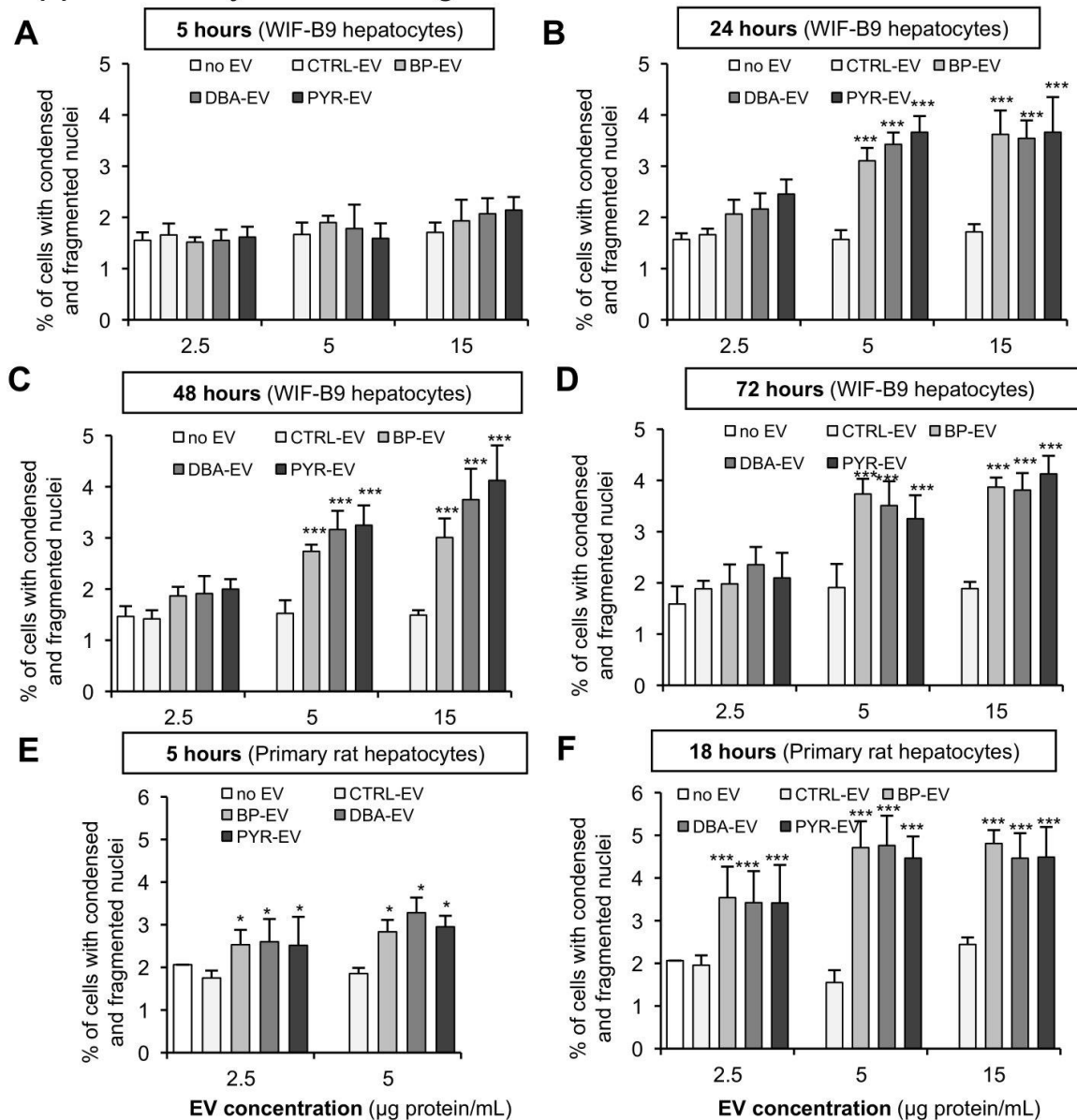


Figure S1: Concentration and time-dependent effect of PAH-EV exposure on apoptosis of recipient hepatocytes. Apoptosis was estimated by microscopic observation of the number of cells with condensed and/or fragmented chromatin after nuclear staining by Hoechst 33342. WIF-B9 (A-D) or primary rat (E, F) hepatocytes were exposed or not (no EV) to EVs at the concentration of 2.5, 5 or 15 µg protein/mL. EVs were isolated from WIF-B9 or primary rat parent hepatocytes exposed or not (CTRL-EV) to 100 nM BP (BP-EV), DBA (DBA-EV) or PYR (PYR-EV) for 72 hours and 18 hours, respectively. Values are given as means ± standard deviation of 3 to 5 independent experiments. Treated with PAH-EVs *versus* untreated : * $p < 0.05$; *** $p < 0.001$.

Supplementary Material Figure S2

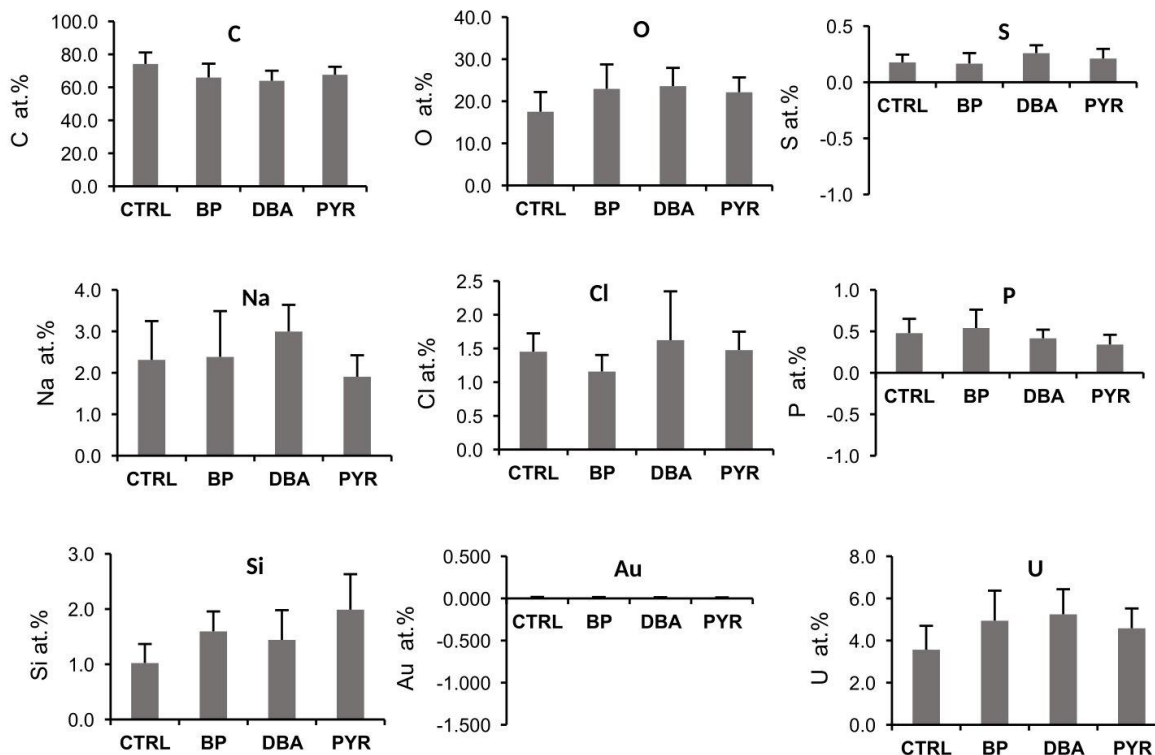


Figure S2 : Element content of EVs isolated from hepatocytes exposed to PAHs. Element content, expressed as atomic percentages (at.%), was determined using an electronic microscope coupled with an energy-dispersive X-ray spectroscopy (EDS) detector. EVs were isolated from WIF-B9 hepatocytes exposed or not (CTRL) to 100 nM BP, DBA or PYR for 72 hours. Iron atom was the only one with modified levels in EVs when hepatocytes were treated by PAHs (See figure 3B). Indeed, the other elements solely contained in EVs, i.e. C, O and S, did not exhibit significant variation upon PAH exposure. The other element levels did not change with PAHs and were mainly present due to the method used for sample preparation. Thus, Na, P and Cl are contained in the PBS buffer in which EVs are suspended ; Si is obtained after contamination with glassware ; Au is present in the microscope sample carrier and U is contained in the contrast agent.

Supplementary Material Figure S3

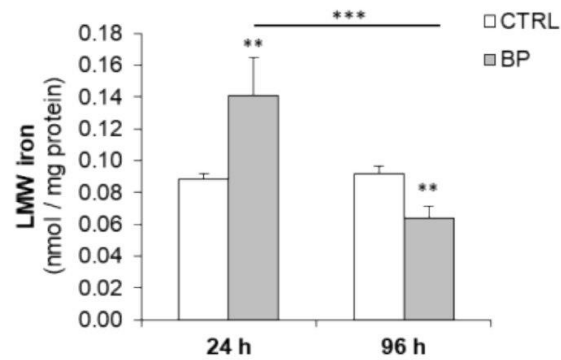


Figure S3: Changes in LMW iron pool in WIF-B9 hepatocytes treated by BaP. Intracellular LMW iron was determined by electron paramagnetic resonance analysis after chelation by 3 mM deferiprone. WIF-B9 hepatocytes were exposed or not to 100 nM BaP for 24 and 96 hours. Values are given as means \pm standard deviation of 3 to 4 independent experiments. Treated with BaP *versus* untreated : ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$.

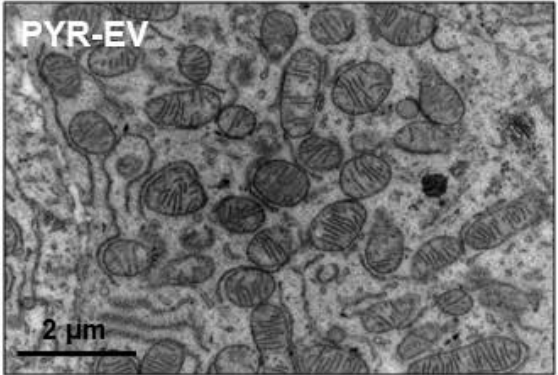
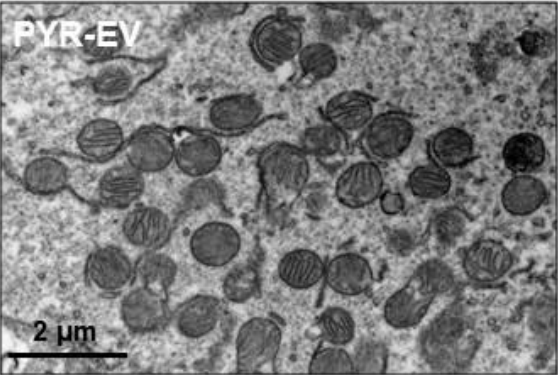
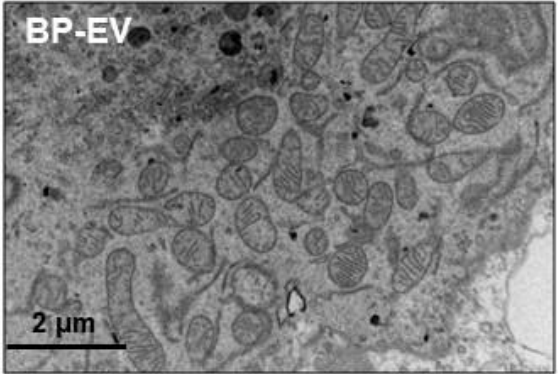
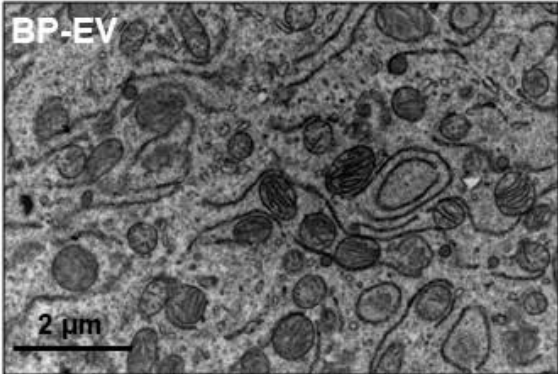
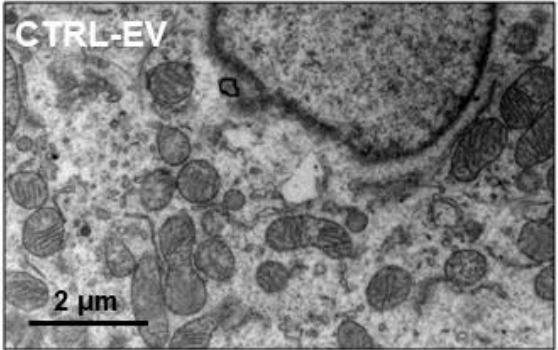
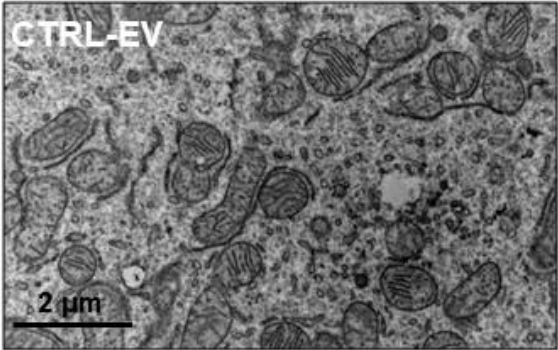
Supplementary Material Figure S4

WIF-B9 recipient hepatocytes

A

BAF

DFO



Supplementary Material Figure S4

WIF-B9 recipient hepatocytes

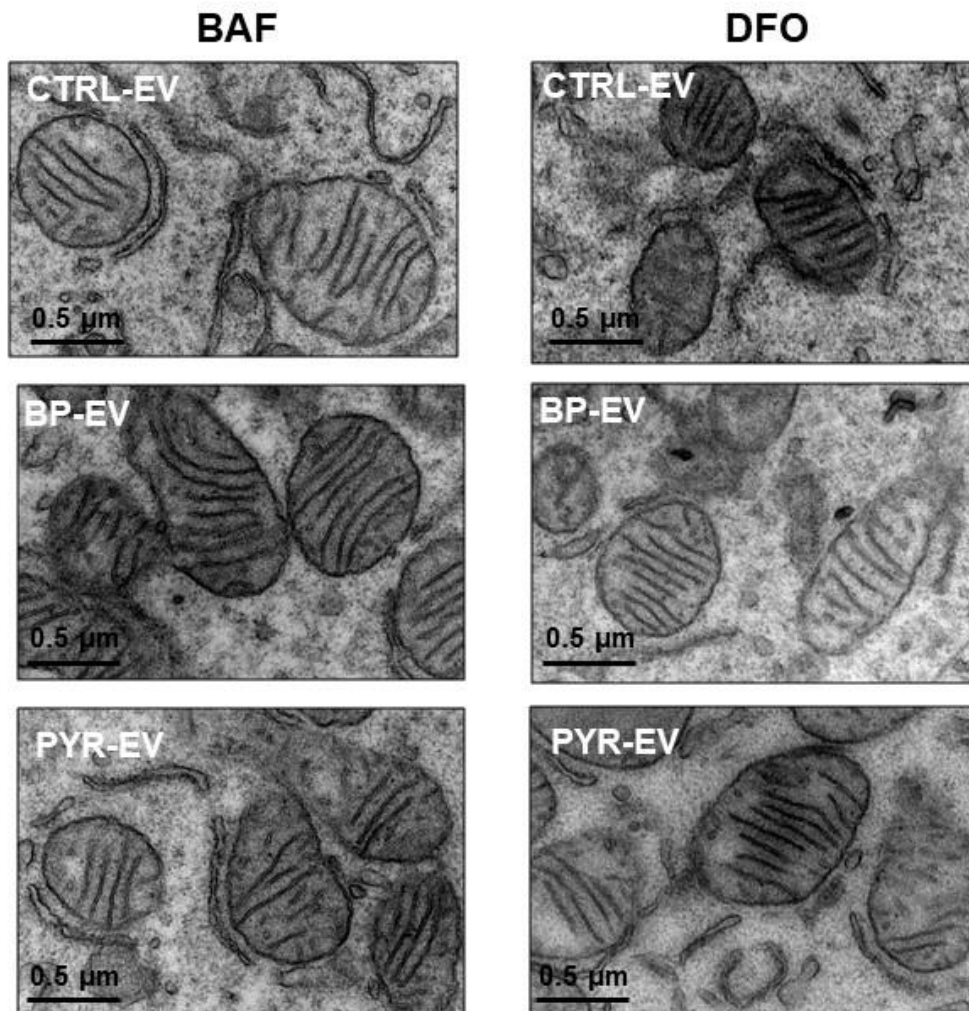
B

Figure S4: Effect of bafilomycin, an inhibitor of lysosomal activity, and desferrioxamine, a lysosome-specific LMW iron chelator, on mitochondrial ultrastructure of recipient hepatocytes, induced by PAH-EVs in target hepatocytes. (A) Mitochondrial ultrastructure. (B) Mitochondrial crista ultrastructure. Ultra-thin sections (80 nm) of each sample were observed under transmission electron microscopy (TEM). WIF-B9 healthy hepatocytes were treated or not (no EV) by 5 μg/mL EVs for 24 hours. EVs were isolated from WIF-B9 hepatocytes exposed or not (CTRL-EV) to 100 nM BP (BP-EV) or PYR (PYR-EV) for 72 hours. Some cultures were pre-treated for 30 minutes with 10 nM bafilomycine A (BAF) or 4 μM desferrioxamine (DFO). The images are representative of one experiment.

Supplementary Material Figure S5

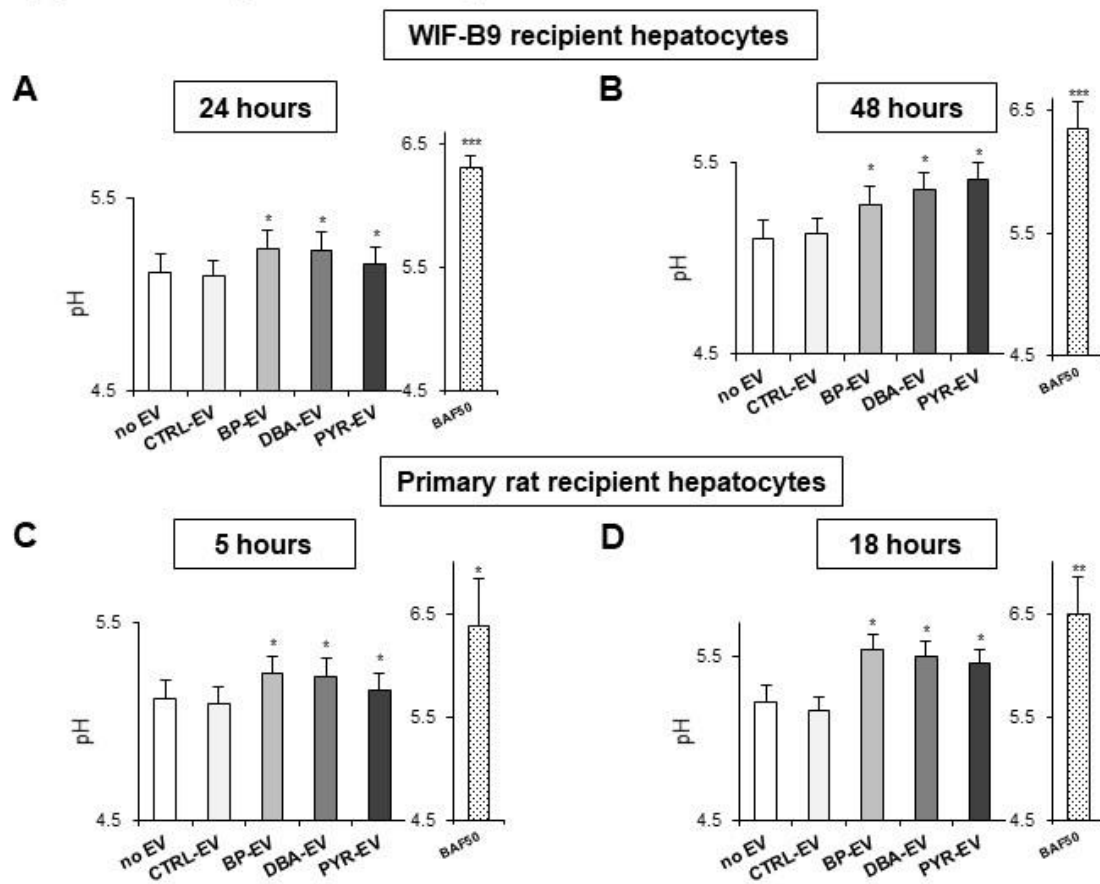
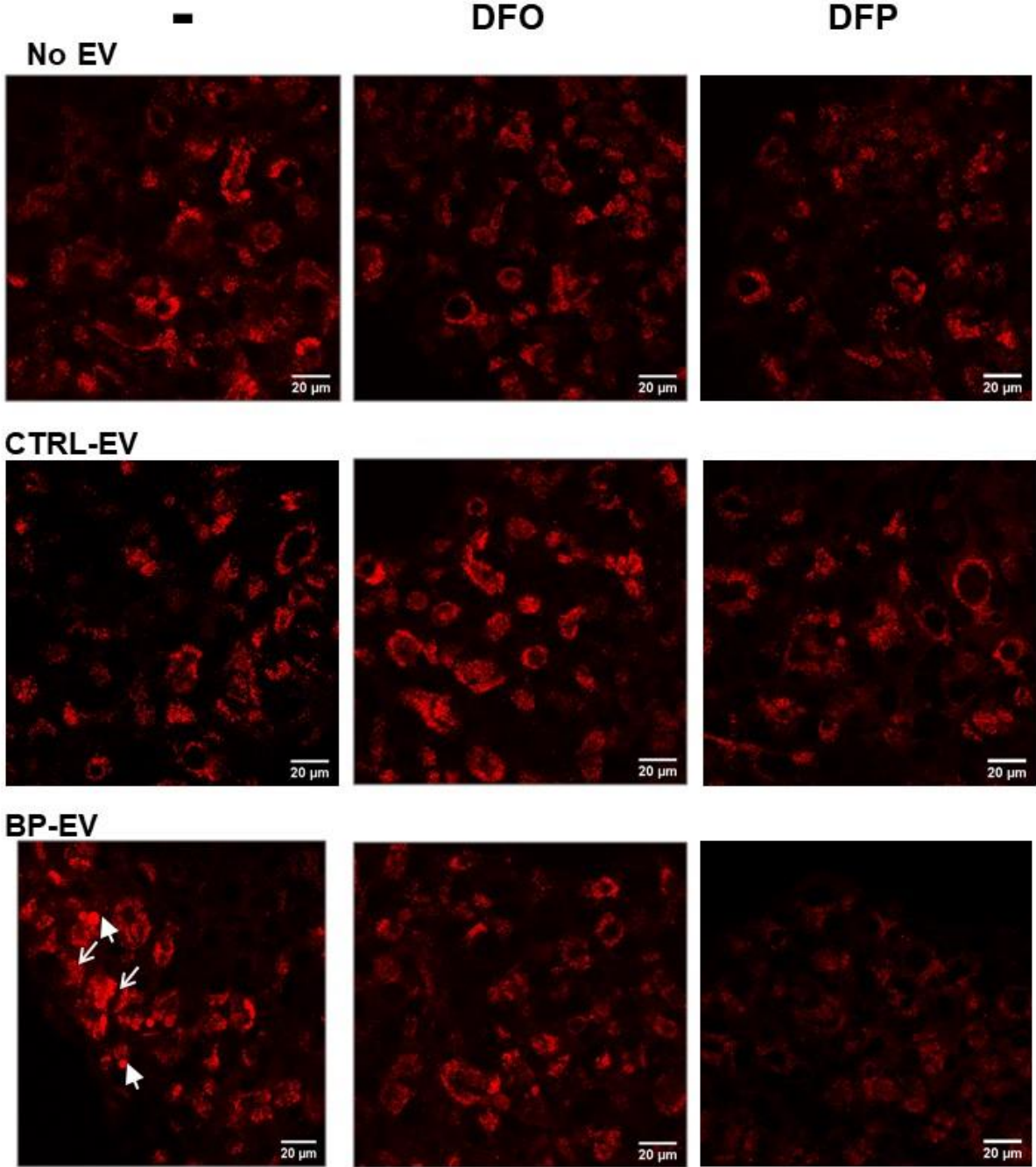


Figure S5: Increase in lysosome pH in hepatocytes treated by PAH-EVs. Lysosome pH was measured using the LysoSensor Yellow/Blue DND-160 ratiometric probe. WIF-B9 (A, B) and primary rat (C, D) healthy hepatocytes were treated or not (no EV) by 5 µg/mL EVs for 24 or 48 hours and 5 or 18 hours, respectively. Cells were also treated 30 min prior to pH measurement with 50 µM bafilomycin A1 (BAF50) as a positive control of alkalinization. EVs were isolated from WIF-B9 or primary rat parent hepatocytes exposed or not (CTRL-EV) to 100 nM BP (BP-EV), DBA (DBA-EV) or PYR (PYR-EV) for 72 hours and 18 hours, respectively. Values are given as means ± standard deviation of 3 or 4 independent experiments. Treated with EVs or BAF *versus* untreated : * p < 0.05 ; ***p < 0.001.

Supplementary Material Figure S6

WIF-B9 target hepatocytes



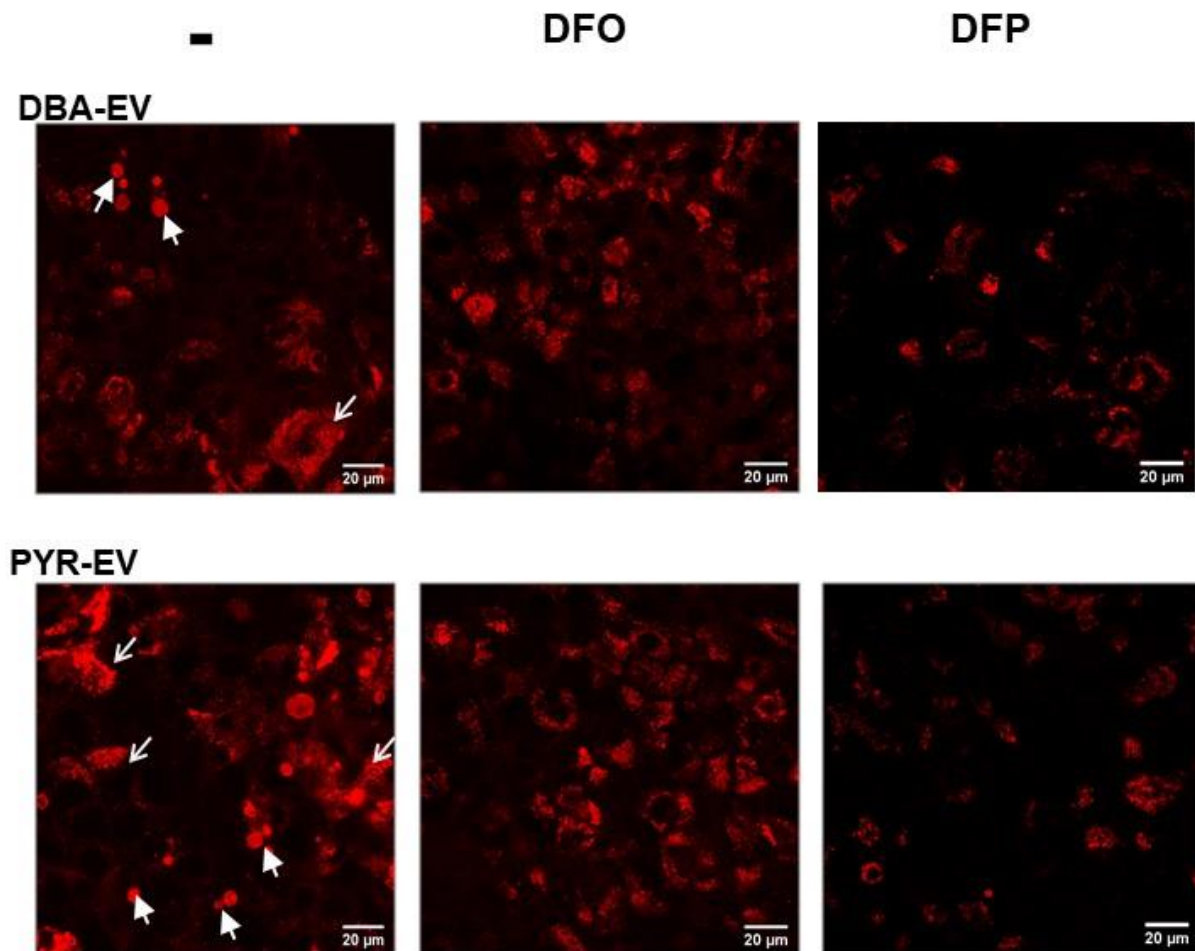


Figure S6: Effect of desferrioxamine, a specific chelator of LMW iron in lysosomes, and deferiprone, a whole cell LMW iron chelator, on lysosome disruption induced by PAH-EVs in target hepatocytes. Confocal fluorescence microscopy after staining lysosomes of WIFB9 hepatocytes by the fluorescent probe LysoTracker. Punctuate red spots around the nucleus correspond to lysosomes with intact integrity. White arrows indicate lysosome permeabilization, while solid white arrows show lysosome size increase. WIF-B9 hepatocytes were pre-treated for 30 minutes or not (-) with 4 μ M desferrioxamine (DFO) or 60 μ M deferiprone (DFP) and were exposed or not (no EV) to 5 μ g/mL EVs for 24 hours. EVs were isolated from WIF-B9 parent hepatocytes exposed or not (CTRL-EV) to 100 nM BP (BP-EV), DBA (DBA-EV) or PYR (PYR-EV) for 72 hours. The images are representative of 3 independent experiments.

Supplementary Material Figure S7

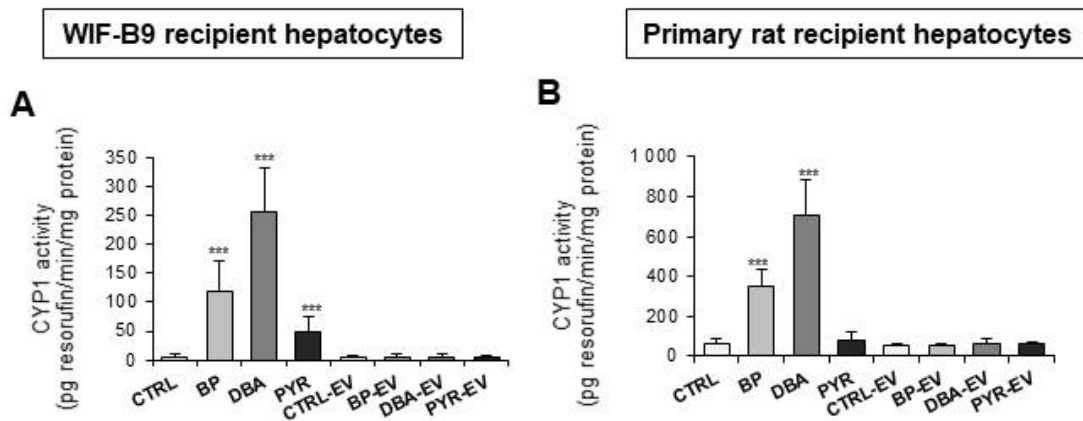


Figure S7: CYP1 activity in WIF-B9 and primary rat hepatocytes. CYP1 enzyme activity was assessed by measuring EROD activity from intact cells by spectrofluorimetry. WIF-B9 (A) and primary rat (B) hepatocytes were exposed or not (CTRL) to 100 nM BP, DBA, PYR or treated by 5 μ g/mL EVs for 24 and 18 hours, respectively. EVs were isolated from WIF-B9 or primary rat parent hepatocytes exposed or not (CTRL-EV) to 100 nM BP (BP-EV), DBA (DBA-EV) or PYR (PYR-EV) for 72 hours and 18 hours, respectively. Results are means \pm SD for at least three independent cultures. Values are given as means \pm standard deviation of 4 to 5 independent experiments. Treated with PAHs or EVs versus CTRL : *** $p < 0.001$.

Supplementary Material

Table S1: List of chemicals for pre-treatment of WIF-B9 and primary rat hepatocytes

Compound	Abbreviation	Function	Concentration
Apocynin	APO	<i>Inhibitor of NADPH oxidase</i>	300 μ M
Bafilomycin A1	BAF	<i>Inhibitor of V-ATPase (Inhibitor of lysosome activity)</i>	10 nM
Cytochalasin B	CyB	<i>Inhibitor of actin polymerization (Inhibitor of endocytosis and phagocytosis)</i>	5 μ g/mL
Deferiprone	DFP	<i>LMW iron chelator in all cell compartments</i>	60 μ M
Desferrioxamine	DFO	<i>LMW iron chelator in lysosomes</i>	4 μ M
Methyl-β-cyclodextrin	MCD	<i>Cholesterol depletion (Inhibitor of lipid raft-mediated endocytosis)</i>	3 mM
Thiourea	Th	<i>Scavenger of reactive oxygen species</i>	6.25 mM
Vitamin E	VitE	<i>Free radical chain-breaking antioxidant (Inhibitor of lipid peroxidation)</i>	100 μ M
Wortmannin	Wort	<i>Inhibitor of phosphoinositide 3 kinases (PI3Ks) (Inhibitor of phagocytosis)</i>	1 μ M

Supplementary Material

Table S2: Increase in size of mitochondria of WIF-B9 target hepatocytes exposed to PAH-EVs. Ultra-thin sections (80 nm) of each culture were observed under transmission electron microscopy (TEM) with a JEOL 1400 transmission electron microscope operated at 120 kV. WIF-B9 healthy hepatocytes were treated or not (no EV) by 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ EVs for 24 hours. EVs were isolated from WIF-B9 hepatocytes exposed or not (CTRL-EV) to 100 nM BP (BP-EV), DBA (DBA-EV) or PYR (PYR-EV) for 72 hours. Treated with EVs *versus* untreated : ^{n.s} non-significant; ^a $p < 0.001$; DBA-EV or PYR-EV treatment versus BP-EV : ^b $p < 0.05$.

Treatment	no EV	CTRL-EV	BP-EV	DBA-EV	PYR-EV
Mitochondrion size (nm)	410 \pm 94	427 \pm 111 ^{n.s}	438 \pm 90 ^a	455 \pm 93 ^{a,b}	480 \pm 95 ^{a,b}
Number of measured mitochondria	372	143	227	167	219

Supplementary Material

Table S3: Increase in size of lysosomes of WIF-B9 target hepatocytes exposed to PAH-EVs. Ultra-thin sections (80 nm) of each culture were observed under transmission electron microscopy (TEM) with a JEOL 1400 transmission electron microscope operated at 120 kV. WIF-B9 healthy hepatocytes were treated or not (no EV) by 5 µg/mL EVs for 24 hours. EVs were isolated from WIF-B9 hepatocytes exposed or not (CTRL-EV) to 100 nM BP (BP-EV), DBA (DBA-EV) or PYR (PYR-EV) for 72 hours. Treated with EVs *versus* untreated : ^{n.s} non-significant; ^a p<0.001.

Treatment	no EV	CTRL-EV	BP-EV	DBA-EV	PYR-EV
Lysosome size (nm)	353 +/-124	353 +/-179 ^{n.s}	540 +/-235 ^a	478 +/-220 ^a	480 +/-392 ^a
Number of measured lysosomes	127	66	179	129	58

PARTIE 3 : DISCUSSION ET CONCLUSION

L'exposition à des contaminants environnementaux est connue pour provoquer différents mécanismes toxiques à l'origine du développement de maladies du foie chez l'Homme. Plus particulièrement, les HAP, polluants persistants, très présents dans l'alimentation, pourraient participer au développement ou à la progression de NAFLD et de cancer du foie, notamment par leur capacité à induire une mort cellulaire des cellules du foie par apoptose. Pourtant, le rôle des VE, importants acteurs de la communication intercellulaire et médiateurs reconnus dans la pathogenèse de certaines maladies du foie, n'est pas encore étudié dans les mécanismes de toxicité de polluants environnementaux impliquant la mort cellulaire des cellules du foie.

Cette thèse s'est donc intéressée à l'impact des HAP sur la libération de VE par des hépatocytes, et au rôle de ces VE dans la toxicité hépatique, plus particulièrement dans la mort cellulaire des hépatocytes. Pour la première fois, la capacité de polluants chimiques à induire la libération de VE a été démontrée dans les milieux de culture des hépatocytes *in vitro* et dans la circulation sanguine *in vivo*. De plus, l'ensemble des trois HAP testés, quelle que soit leur affinité pour le récepteur AhR, est capable d'induire la libération de VE ainsi que l'apoptose des hépatocytes. Par ailleurs, nous montrons pour la première fois, l'induction de la mort cellulaire d'hépatocytes *in vitro* par des VE, lorsque celles-ci sont libérées par des hépatocytes dans un contexte d'exposition à des contaminants environnementaux.

I. Les HAP induisent l'apoptose et la libération de VE

Les trois HAP testés, entraînent parallèlement l'apoptose des hépatocytes et la libération de VE par ces mêmes cellules. Les mécanismes cellulaires impliqués dans la libération de VE et leur lien avec l'apoptose ont alors été recherchés.

A. L'apoptose à l'origine de la libération de VE ?

Nous nous sommes tout d'abord questionnées quant à l'implication de l'activité des caspases effectrices de l'apoptose, dans la libération de VE.

1. Capacité de différents HAP à induire l'apoptose des hépatocytes

Les trois molécules d'HAP testées, même à faible dose (50-100 nM), se révèlent capables d'induire l'apoptose à la fois dans les hépatocytes primaires de rat et ceux issus de la lignée WIF-B9 (**ART. 1 FIG. S1**). Cette apoptose reste limitée (seulement 4 % dans les WIF-B9 et 8 % dans les primaires) et se traduit par une élévation faible mais significative de l'activité des caspases (**ART. 1 FIG. 6**). Un tel niveau d'apoptose pourrait correspondre au concept de l'apoptose avortée (Ichim *et al.*, 2015), où les cellules déclenchent la signalisation pro-apoptotique, mais survivent tout en subissant des dommages à l'ADN. Ceci peut provoquer une instabilité génique favorable au développement de cancer du foie.

Bien que notre équipe de recherche ait largement décrit l'induction, par le BaP (cf I.C.2.a.i L'apoptose en page 54), d'une apoptose dans les cellules épithéliales du foie (Huc *et al.*, 2006; Tekpli *et al.*, 2010), dans les hépatocytes de rat en culture et plus récemment dans les cellules WIF-B9 (Collin *et al.*, 2014; Tête *et al.*, 2018), une seule étude avant la nôtre, avait rapporté une légère augmentation de l'apoptose de cellules épithéliales du foie par le DBahA, mais à très forte dose (10 μ M) (Topinka *et al.*, 2008). Ici, nous montrons également que l'apoptose induite par le DBahA est dépendante de l'activation du récepteur AhR.

Enfin, notre étude est la première à mentionner un effet pro-apoptotique de l'exposition de cellules du foie au PYR et ce de façon AhR indépendante. Jusqu'à maintenant, une seule étude avait mis en évidence la capacité du fluoranthène, un autre HAP à faible affinité pour l'AhR, à induire l'apoptose dans des lymphocytes T indépendamment de l'activation de l'AhR (Yamaguchi *et al.*, 1996). Toutefois, une augmentation faible des AST ou des ALT, enzymes libérées lors de la nécrose de cellules, notamment par le foie, a été mise en évidence dans le sérum de rongeurs exposés au PYR (Yoshikawa *et al.*, 1985) (Zhang *et al.*, 2015) et une dégénérescence des hépatocytes a été observée dans leur foie (Zhu *et al.*, 2018). De plus, une forte corrélation entre une exposition au PYR et des taux élevés d'AST/ALT dans le sérum a été détectée chez l'Homme (Chen *et al.*, 2006). Or, contrairement au BaP et au DBahA, aucun effet cancérigène n'est pour l'instant reconnu pour le PYR, d'après le CIRC (IARC, 2010). Cette reconnaissance repose essentiellement sur la capacité à induire des cancers chez les rongeurs et à former des adduits avec l'ADN. Par sa capacité, à induire une apoptose faible, l'exposition au PYR, très présent dans l'alimentation, mériterait donc une attention plus importante quant au risque de développement de cancer. Par ailleurs, bien que le PYR soit décrit dans de nombreuses publications comme n'induisant pas de cancer de poumon chez le rongeur (IARC, 2010), l'incidence des cancers du foie est augmentée après administration intra-péritonéale de PYR chez la souris (Wislocki *et al.*, 1986).

2. Capacité des différents HAP à induire la libération de VE

Les HAP sont capables d'induire l'augmentation de la quantité de VE dans la circulation sanguine *in vivo* et la libération de VE par les hépatocytes *in vitro*. L'ensemble des trois HAP testés, quelle que soit leur affinité pour le récepteur AhR, est capable d'induire la libération de VE ainsi que l'apoptose des hépatocytes. Deux études jusqu'à maintenant, suggéraient un lien potentiel entre exposition au HAP et formation de VE. La première mettait en évidence, sous l'effet d'une forte dose de BaP (10 μ M), une augmentation de l'expression de marqueurs protéiques spécifiques des EXO dans les cellules, mais ne s'est pas intéressée à isoler les VE (Wang *et al.*, 2009a). En plus, le modèle d'étude des cellules épithéliales du pigment rétinien était éloigné du foie (Wang *et al.*, 2009a). La deuxième étude s'intéressait directement aux VE isolées, dans un contexte de mélanges de toxiques contenant des HAP, mais dans un modèle éloigné du foie. Ainsi, une augmentation de la libération de VE par des cellules pulmonaires avait été détectée *in vitro* ou *in vivo*, suite à une

exposition à la fumée de cigarette (Benedikter *et al.*, 2017). Cette étude suggérait aussi la possibilité d'une implication des HAP, composés les plus toxiques parmi les 4 000 présents dans la fumée de cigarette, dans l'induction de la libération de VE.

3. Rôle de l'activation des caspases dans la libération de VE?

Dans nos deux modèles d'hépatocytes, les HAP induisent à la fois, une mort des hépatocytes par apoptose (**ART. 1 FIG. 6**), qui est dépendante de l'activation des caspases 3 effectrices, et une libération des VE (**ART. 1 FIG. 1**). Or, l'activation des caspases peut être impliquée dans la libération de VE par les hépatocytes de la lignée HepG2 après une exposition à l'éthanol (Hirsova *et al.*, 2016; Povero *et al.*, 2013), ou par les hépatocytes primaires de souris et de la lignée Huh7, traités avec l'acide palmitique ou ses métabolites (Verma *et al.*, 2016). Par ailleurs, dans d'autres modèles cellulaires non hépatiques, l'activation de la caspase-3, induite par divers composés pro-apoptotiques, est également initiatrice d'une augmentation de la libération de VE (*cf II.A.4.b Mort cellulaire et libération de VE en page 76*). Dans nos travaux, l'utilisation de l'inhibiteur pharmacologique des caspases effectrices 3/7, Z-VAD-FMK (Z-VAD), bien que capable de diminuer le nombre d'hépatocytes en apoptose, après une exposition aux HAP, n'a eu aucun effet sur la libération de VE (**ART. 1 FIG. 6**). Par conséquent, nos résultats ne sont pas en accord avec ceux décrits ci-dessus. Dans ces travaux, l'activation des caspases 3 permet l'activation de la kinase ROCK-1, protéine impliquée dans la régulation de la dynamique de l'actine pour former des microfilaments. Cette formation de microfilaments peut en effet participer à la biogénèse des VE, aboutissant finalement à la libération de VE.

La différence obtenue dans nos résultats pourrait partiellement s'expliquer par deux facteurs de variation : le premier serait le temps d'incubation des cellules avec les toxiques et le second serait l'origine cellulaire des VE étudiées (endosomale ou membranaire).

a. Effet temps de traitement

En effet, les études montrant l'implication des caspases utilisent des temps d'incubation plus courts, à savoir des incubations de 4 heures pour les hépatocytes de souris en culture primaire et de 16-24 heures pour les hépatocytes issus de lignées cellulaires, contre des incubations de 18 heures pour nos travaux sur les hépatocytes de rat en culture primaire et de 72 heures pour les hépatocytes de la lignée WIF-B9. Dans les WIF-B9, l'augmentation de la libération de VE n'est significative qu'à partir de 72 heures d'exposition. En revanche, dans notre modèle d'hépatocytes primaires, cette augmentation est également significative à temps plus courts de 2 et 5 heures d'incubation. Par conséquent, nos résultats ne peuvent pas exclure, à des temps d'incubation moins longs, une possibilité de l'implication de l'activation des caspases dans la libération des VE induite par les HAP, mais montrent, en revanche, l'intérêt de travailler sur des périodes d'incubation plus étendues et à faible dose de toxiques.

b. Différence entre MV et EXO

Par ailleurs, les VE isolées à 100 000 x g pendant 1 h 45 min à partir du milieu de culture de nos deux types d'hépatocytes, sont principalement des EXO, VE de petites tailles issues du compartiment endosomal. En plus, les HAP provoquent une augmentation spécifique de la libération de cette population (**FIGURE 41**) (van Meteren et al, *résultats non publiés*).

En revanche, l'activation de ROCK-1 par le clivage des caspases favorise plutôt le bourgeonnement de la membrane plasmique à l'origine de la biogénèse des MV (*cf II.A.1.b Biogénèse des microvésicules en page 71*), VE de plus grandes tailles. Ainsi, les équipes qui se sont intéressées à l'implication des caspases et de la kinase ROCK-1 dans la libération de VE, ont principalement isolé des MV (Eguchi *et al.*, 2015; Povero *et al.*, 2013) ou obtenu une augmentation de VE qui concerne uniquement les MV (Verma *et al.*, 2016).

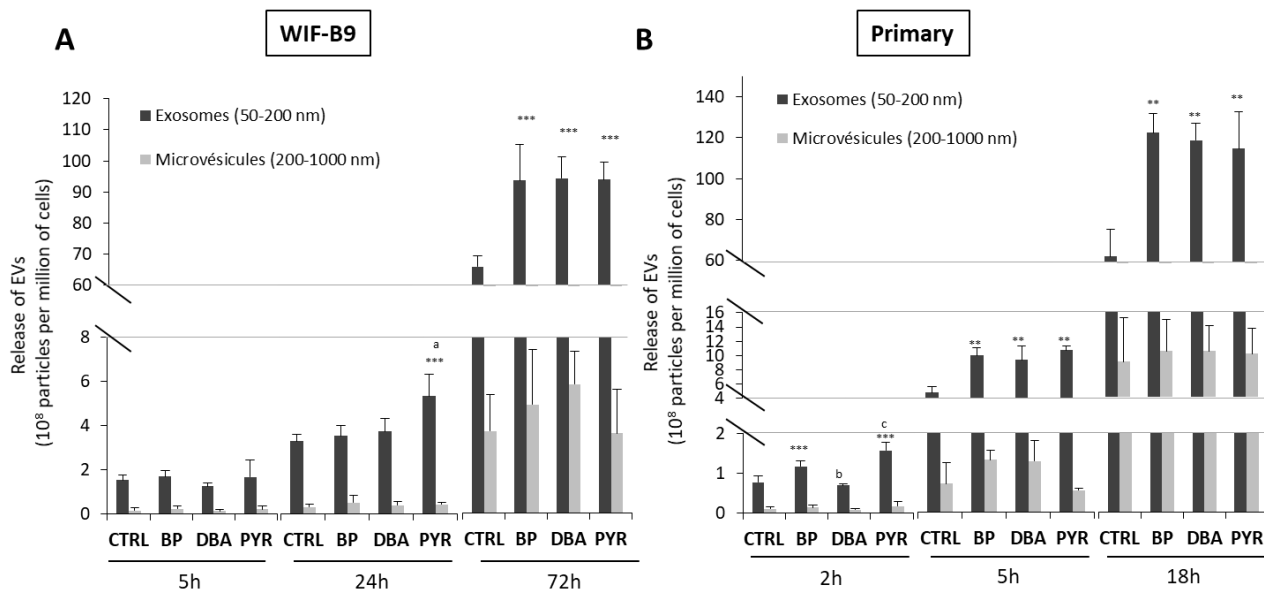


Figure 41 : Les HAP provoquent essentiellement l'augmentation de la libération des EXO

La quantité de VE a été mesurée par le NTA. Sont considérées comme des EXO les VE présentant une taille comprise entre 50 et 200 nm tandis que les MV sont des VE présentant une taille comprise entre 200 et 1000 nm. Les cellules WIF-B9 ont été exposées au BP, DBA, ou PYR à la concentration de 100 nM pendant 5, 24, ou 72h (**A**) et les hépatocytes de rat en culture primaire (primary) ont été traités pendant 2, 5, ou 18 h avec les mêmes HAP (**B**). Des cultures non traitées ont été utilisées comme témoins (CTRL). Les valeurs correspondent aux moyennes +/--erreurs standards de 3 à 7 expériences indépendantes. Traités versus CTRL: **p<.01, ***p<.001. PYR versus BP or DBA: a p < .01. DBA versus BP or PYR: b p < .001. PYR versus BP: c p < .01.

Dans notre étude, la limite reste l'isolement des VE qui n'est pas suffisamment sélective des MV. Il aurait fallu réaliser des centrifugations à des vitesses moins importantes ou sur gradient de densité pour espérer les séparer. En effet, la séparation entre EXO et MV présentée dans la **FIGURE 41** est basée uniquement sur une séparation en fonction de la taille qui n'est pas optimale car des MV peuvent présenter une taille inférieure à 200 nm.

B. Rôle des récepteurs aux xénobiotiques et du métabolisme

Il existe deux classes de HAP en fonction de leur affinité pour le récepteur nucléaire AhR : les ligands forts tels que le BaP ou le DBahA et les ligands faibles tels que le PYR (cf I.B.1.a.i Ligands de l'AhR en page 40). Le récepteur AhR est un facteur de transcription qui, après liaison à son ligand, est activé puis transloqué dans le noyau où il peut contrôler l'expression de gènes cibles. Ainsi, la liaison des HAP à forte affinité pour l'AhR permet son activation et permet notamment l'expression des CYP1. Ces CYP1 sont principalement à l'origine du métabolisme de ces HAP qui conduit à la production de métabolites réactifs et d'ERO capables d'induire la mort cellulaire (cf I.C.2.b.i Le stress oxydant en page 57). Ceci a particulièrement été mis en évidence pour les cellules épithéliales et hépatocytes traités avec le BaP (Collin *et al.*, 2014; Gorria *et al.*, 2006a; Holme *et al.*, 2007; Huc *et al.*, 2004, 2006; Tekpli *et al.*, 2010, 2012; Topinka *et al.*, 2008).

1. Impact des récepteurs nucléaires

a. Activation du récepteur AhR

La libération des VE induite par l'exposition des hépatocytes au BaP ou au DBahA, deux HAP à forte affinité pour le récepteur AhR, est dépendante de l'activation de l'AhR (ART. 1 FIG. 7). Un rôle possible pour l'AhR a, par la suite, aussi été décrit dans la libération de VE par les cellules endothéliales HMEC-1 exposées à 100 nM de BaP pendant 24 h, grâce à son inhibition par l'inhibiteur non spécifique de l'AhR, l' α -NF (Le Goff *et al.*, 2019). Ceci pourrait suggérer un mécanisme commun de libération de VE qui se déclencherait dans toutes les cellules exposées aux ligands forts d'AhR.

En réalité, le mécanisme serait plus complexe et la réponse à l'activation de l'AhR serait plus spécifique. En effet, la TCDD, une dioxine, ligand fort d'AhR, mais n'appartenant pas à la famille des HAP, ne provoque pas la même augmentation de la libération de VE par les hépatocytes (à la concentration de 10 nM et au temps d'exposition 72 h), bien qu'elle induise la mort de ces hépatocytes par apoptose (ART. 1 FIG. S7). En fait, les différents types de ligands de l'AhR pourraient activer le récepteur de manière différentielle et permettre l'expression de différents clusters de gènes (Larigot *et al.*, 2018). Cela a été particulièrement décrit pour la régulation positive par l'AhR, de l'expression de la paraoxonase 1, une enzyme associée aux lipoprotéines HDL (*High-density lipoprotein*) sécrétée par le foie et impliquée dans l'hydrolyse d'organophosphates (Gouédard *et al.*, 2004). Alors que l'activation de l'AhR par différents ligands forts comme le 3-MC, le BaP ou la quercétine permet l'expression de cette protéine dans des hépatocytes de la lignée Huh-7, l'activation de l'AhR par la TCDD ne le permet pas (Gouédard *et al.*, 2004). De façon similaire, la fluidification des membranes des hépatocytes induite par l'activation de l'AhR par le BaP et le DBahA n'est pas retrouvée pour les cellules traitées par la TCDD (ART. 1 FIG. S7). En revanche, bien qu'aucune augmentation du nombre de VE libérées suite à une exposition des

hépatocytes au TCDD n'ait été détectée par rapport au témoin, la TCDD pourrait avoir des effets sur la modification du contenu des VE.

La complexité du phénomène est aussi révélée par les travaux réalisés sur les cellules endothéliales. Ainsi, dans ces cellules, l'implication de l'AhR dans la libération de VE par les cellules endothéliales traitées par le BaP, ne concernerait que les VE de petites tailles ou EXO (Le Goff *et al.*, 2019). Une fois encore, la distinction lors de l'isolement entre des vésicules de petite et de grande taille serait intéressante à réaliser dans le cadre d'une libération par les hépatocytes pour vérifier l'effet d'AhR. Il est vrai que les hépatocytes produisent une très faible proportion de MV alors que les cellules endothéliales sont connues pour en libérer une proportion bien plus importante.

Cette orientation préférentielle par l'AhR, vers la production de VE de petites tailles, type EXO, apporte aussi des informations quant au rôle potentiel d'AhR dans les hépatocytes. Il pourrait agir sur l'expression de molécules impliquées dans la biogenèse des EXO. Il est possible qu'il participe directement ou indirectement à l'augmentation de l'expression des protéines Tsg101 et Alix, observée dans les hépatocytes suite à un traitement par le BaP et le DBaH (ART. 1 FIG. 4-5).

De façon surprenante, le PYR, HAP de faible affinité pour le récepteur AhR, est pourtant capable de favoriser la libération de VE, principalement des EXO. Or, récemment, un effet non génomique de l'AhR a été décrit pour le PYR. Le PYR serait capable de se lier à l'AhR dans sa conformation antagoniste, déclenchant une signalisation calcium dépendante dans les cellules endothéliales (*cf I.B.1.b.ii.b) Signalisation calcique en page 46*). L'utilisation de l'antagoniste de l'AhR, le CH223191 empêche l'augmentation de la concentration en calcium (Brinchmann *et al.*, 2018b). Cette liaison bloque sa translocation dans le noyau et l'expression de gènes cibles. Dans nos modèles d'hépatocytes, le CH223191 ne réduit pas la libération de VE induite par le PYR (ART. 1 FIG. 7), écartant l'hypothèse d'une liaison du PYR à la forme antagoniste de l'AhR.

b. Activation du récepteur CAR

Malgré sa faible affinité pour le récepteur nucléaire AhR, le PYR augmente la libération de VE par les hépatocytes. En fait, un autre récepteur nucléaire interviendrait, le récepteur CAR (*cf I.B.2 Mécanismes AhR indépendants en page 46*). En plus, l'activation de ce récepteur CAR semble caractéristique de l'exposition des hépatocytes au PYR, puisque le PYR est le seul HAP testé capable d'induire l'expression d'un gène sous le contrôle de CAR, le CYP2C6 (ART. 1 FIG. S5). Enfin, cette activation du récepteur CAR apparaît indispensable à l'induction d'une apoptose ou d'une libération de VE, puisque dans les cellules endothéliales HMEC-1 où le récepteur CAR n'est pas exprimé, le PYR n'est pas capable de déclencher une apoptose ou une libération de VE (Le Goff *et al.*, 2019).

2. Effets des récepteurs nucléaires

Les récepteurs nucléaires pourraient agir indirectement dans la libération de VE, en participant à la régulation de l'expression de gènes impliqués dans le métabolisme des HAP ou le métabolisme des lipides.

a. Métabolisme des HAP et stress oxydant

L'activation des récepteurs nucléaires peut entraîner leur translocation dans le noyau où ils contrôlent positivement l'expression de CYP comme les CYP1 pour AhR et CYP2B/2C pour CAR. Ces CYP sont à l'origine du métabolisme du BaP, du DBahA et du PYR. Concernant le BaP et le DBahA, l'activité des CYP1 entraînent la formation de métabolites réactifs et d'ERO (Hrycay and Bandiera, 2015), les métabolites réactifs pouvant aussi engendrer la production d'ERO (Sen et al., 2012), ce qui peut aboutir à la génération d'un stress oxydant. Pour le PYR, l'activité des CYP2B et 2C peut également conduire à la formation d'ERO (Nesnow *et al.*, 2011; Serron *et al.*, 2000; Shimamoto, 2013). Ainsi, l'activité de métabolisation des HAP par les CYP serait le mécanisme à l'origine de l'élévation des niveaux d'ERO et du stress oxydant généré dans les hépatocytes (**ART. 2 FIG. 1**). Or, les ERO et le stress oxydant sont bien décrits pour participer à l'apoptose (*cf I.C.2.b.i Le stress oxydant en page 57*) et à la libération des VE (*cf II.A.4.a Stress oxydant et libération de VE en page 74*).

Dans les hépatocytes traités par le BaP et le DBahA, une augmentation de l'expression des CYP1 est bien détectée et l'inhibiteur des CYP1, l' α -NF, même si non spécifique, protège bien de la libération de VE. En ce qui concerne le PYR, seule l'augmentation de l'expression du CYP2C6 est mise en évidence, mais aucun inhibiteur n'a été testé. Dans tous les cas, les antioxydants empêchent la libération de VE induite par les trois HAP (**ART. 2 FIG. 1**).

Dans l'ensemble, ces résultats suggèrent très fortement l'implication du métabolisme et consécutivement du stress oxydant dans la libération de VE par les HAP.

Cette relation avec le métabolisme des xénobiotiques est originale car seulement deux autres études s'y sont intéressées. Elles ont montré l'implication du métabolisme de l'éthanol par le CYP2E1, *via* également la production d'ERO, dans la libération de VE par des hépatocytes *in vitro* (Verma *et al.*, 2016) ou *in vivo* chez la souris (Cho *et al.*, 2017a).

b. Métabolisme des lipides

Même si le métabolisme et le stress oxydant seraient très certainement impliqués, d'autres effets des récepteurs nucléaires pourraient avoir lieu conjointement. Les HAP, *via* l'activation de l'AhR, sont aussi capables de moduler l'expression ou l'activité de protéines impliquées dans le métabolisme des lipides (*cf I.B.1.b.i.b Métabolisme des lipides en page 44*). Ainsi, les variations de concentrations en certains lipides, obtenues dans différents compartiments cellulaires, pourraient être à l'origine d'une biogenèse et d'une libération de VE.

i. Cholestérol

Le BaP *via* l'activation de l'AhR est capable de provoquer une diminution de l'expression de l'HMGC_oA réductase, enzyme participant à la synthèse du cholestérol (Tekpli *et al.*, 2010). Ceci entraîne une diminution du cholestérol dans les cellules du foie, ce qui conduit à l'apoptose (Collin *et al.*, 2014; Gorria *et al.*, 2006a; Tekpli *et al.*, 2010, 2012). Ainsi, dans nos modèles d'hépatocytes, le BaP induit une diminution du cholestérol total au niveau cellulaire comme attendu, et pour la première fois, nous démontrons que le DBaH_A provoque aussi une réduction de la teneur en cholestérol qui est impliquée dans l'apoptose des hépatocytes (**ART. 1 FIG 8**).

Le PYR n'entraîne pas la diminution des niveaux de cholestérol dans nos modèles. En fait, l'activation du récepteur CAR par des ligands forts comme le phénobarbital, déclenche l'expression de gènes impliqués dans le métabolisme du cholestérol par les cellules du foie, comme l'HMGC_oA synthase ou l'HMGC_oA réductase et une augmentation de la production de cholestérol par le foie (Kobayashi *et al.*, 2015).

Par ailleurs, les deux récepteurs aux xénobiotiques, AhR et CAR, ont été reconnus comme capables de participer à une accumulation de cholestérol vers le compartiment endosomal/lysosomal dans des macrophages (Podechard *et al.*, 2009) et d'inhiber la sortie de cholestérol en dehors du foie (Cheng *et al.*, 2017). En fait, l'activation du récepteur AhR par le BaP entraîne la diminution de l'expression de la protéine NPC1 (*Niemann–Pick type C1 protein*) qui permet le trafic du cholestérol de l'endosome vers la membrane plasmique (Podechard *et al.*, 2009) et l'activation de CAR par son agoniste, le TCPOBOP (*1,4-bis(2-(3,5-dichloropyridyloxy))benzene*), déclenche la diminution de l'expression des transporteurs d'efflux de cholestérol de la famille ABC (*ATP-binding cassette*), ABCG5 et ABCG8 dans les cellules du foie (Cheng *et al.*, 2017).

L'effet du cholestérol dans la libération de VE sera discuté dans le paragraphe **ci-dessous II**.

ii. Sphingosine-1-phosphate

L'activation de l'AhR par le BaP dans des mastocytes du foie entraîne l'élévation de la quantité de sphingosine-1-phosphate (S1P) (Wang *et al.*, 2019a). Cette élévation est due à la production d'ERO liée à l'activation de l'AhR. Cette production d'ERO provoque l'oxydation de la sphingosine-1-phosphate lyase et donc une diminution de son activité à l'origine de l'élévation des niveaux de S1P (Wang *et al.*, 2019a). Or, la S1P est un sphingolipide qui pourrait jouer un rôle dans la biogenèse des EXO (Skotland *et al.*, 2020). La synthèse de S1P a notamment été mise en évidence pour déclencher l'augmentation de la libération d'EXO par des cellules HeLa, par un mécanisme impliquant l'activation des récepteurs S1PR, l'activation de protéines G et la régulation de la formation de microfilaments d'actine (Park *et al.*, 2018).

Ainsi, la formation de S1P pourrait être un mécanisme par lequel les HAP à forte affinité pour le récepteur AhR participeraient à la biogénèse d'EXO, mais nous n'avons pas testé une telle hypothèse dans nos modèles.

3. Effet indépendants des récepteurs nucléaires ?

L'activation des récepteurs nucléaires par les HAP est un mécanisme important à l'origine de la libération de VE, suite à une exposition à des doses faibles et sur des périodes d'incubation relativement étendues (plusieurs jours).

En revanche, à l'image de l'activation des caspases, rien ne peut exclure, à des temps précoces d'exposition (de quelques minutes à quelques heures), une participation temporaire d'autres mécanismes indépendant de l'activation de l'AhR ou de CAR dans la formation de VE, notamment pour la formation des MV. Il est possible de prendre pour exemple la signalisation calcique. En effet, l'élévation du calcium dans le cytosol est un mécanisme bien connu pour déclencher le bourgeonnement de la membrane plasmique et la production de MV (Kalra *et al.*, 2012) (*cf II.A.1.b Biogénèse des microvésicules en page 71*). Or, le BaP entraîne une augmentation de la concentration cytosolique en calcium, dans les cellules du foie dès 2 h d'exposition. Cette augmentation de la concentration cytosolique en calcium pourrait être due à l'altération de la perméabilité des cellules par l'insertion des HAP lipophiles dans les membranes (Barhoumi, 2000), ou à l'activation des récepteurs adrénergiques comme décrit dans les cellules endothéliales HMEC1 (Mayati *et al.*, 2012). Une telle hypothèse n'a pas été testée, car nous n'avons pas observé une augmentation de la libération de MV à des temps précoces comme évoqué ci-dessus *I.A.3.b Différence entre MV et EXO*.

En conclusion, nos travaux sont les premiers à mettre en évidence un lien entre l'activation de récepteurs aux xénobiotiques, AhR et CAR, et la libération de VE, ainsi que l'importance du métabolisme des HAP dans la libération de VE par les hépatocytes.

II. Le cholestérol, lipide essentiel dans la libération de VE et l'interaction avec la cellule réceptrice

Le cholestérol est un lipide majeur structurant les membranes cellulaires mais aussi celles des VE. Plus particulièrement, les EXO sont enrichis en cholestérol, ce qui leur confère une certaine rigidité. D'une part, la dynamique du cholestérol au niveau cellulaire peut affecter les propriétés physico-chimiques des membranes cellulaires et donc potentiellement influencer la formation et la libération de VE. D'autre part, la teneur en cholestérol des VE pourrait participer à leur interaction avec les membranes de cellules réceptrices.

A. Libération de VE par les hépatocytes producteurs

La modulation des concentrations en cholestérol dans les hépatocytes pourrait être à l'origine de la libération de VE, et plus particulièrement d'EXO, suite à une exposition aux HAP.

1. Diminution de la concentration en cholestérol par les cellules productrices suite à l'activation de l'AhR

Les HAP à haute affinité pour l'AhR induisent une déplétion en cholestérol cellulaire dans les hépatocytes (cf I.B.2.b.i ci-dessus en page 240). Cette relation causale entre le déficit en cholestérol et la libération de VE a aussi été décrite : dans la libération de MV par les érythrocytes isolés du sang humain et les cellules épithéliales du cancer colorectal (Caco-2) (Marzesco *et al.*, 2009) ; ainsi que dans la libération d'EXO par les cellules cancéreuses du cancer de la prostate (PC-3) (Llorente *et al.*, 2007), par les cellules du foie de souris (Chen *et al.*, 2010). De façon similaire, une déplétion en cholestérol induite dans nos deux types d'hépatocytes grâce à la supplémentation par la pravastatine, un inhibiteur de la synthèse de cholestérol, entraîne la libération de VE par les hépatocytes, en conditions témoins, non traités par les HAP (**ART. 1 FIG 8**)

Par ailleurs, la déplétion en cholestérol pourrait participer à la modification du chargement des VE, puisqu'elle peut provoquer un enrichissement en LMP2A (*Latent membrane protein 2A*), protéine codée par le virus d'Epstein-Barr, des VE issues de cellules BJAB provenant d'un lymphome (Ikeda and Longnecker, 2007) ou un enrichissement en LOX-1 (*Lectin-like oxidized low-density lipoprotein receptor-1*), récepteur participant au dysfonctionnement endothélial et à l'inflammation dans les VE issues de cellules embryonnaires humaines du rein HEK-293 (Gioia *et al.*, 2015).

L'ensemble de ces résultats suggère un ou plusieurs mécanismes communs qui se déclencheraient systématiquement dans les cellules présentant un déficit en cholestérol. Certains d'entre eux sont décrits ci-dessous.

a. Fluidification des membranes par les HAP

Le cholestérol étant un stabilisant membranaire bien connu (Yang *et al.*, 2016), il est possible d'envisager que sa déplétion provoque une fluidification des membranes. Comme cela avait été décrit pour le BaP dans les cellules épithéliales du foie et les hépatocytes primaires de rat (Collin *et al.*, 2014; Gorria *et al.*, 2006a; Tekpli *et al.*, 2012), l'exposition au BaP, mais aussi au DBaH, un autre HAP à forte affinité pour l'AhR, provoque la fluidification des membranes dans les hépatocytes WIF-B9 et primaires de rat (**ART. 1 FIG 9**). L'importance de l'AhR est révélée, ici aussi, pour deux raisons : la fluidification est inhibée par le CH223191, antagoniste de l'AhR, et le PYR, HAP à faible affinité pour l'AhR, ne provoque pas de fluidification. En outre, nous montrons pour la première fois que la fluidification des membranes induite par le BaP et le DBaH est impliquée dans la libération des VE par les hépatocytes et aussi dans le déclenchement de l'apoptose.

Une seule autre étude avant la nôtre avait montré un rôle pour la fluidification des membranes dans la libération de VE par les fibroblastes BHK et les macrophages RAW, suite à une surexpression ABCA1, transporteur d'efflux du cholestérol (Nandi *et al.*, 2009).

Plusieurs effets de la fluidification des membranes permettent de comprendre son rôle dans la libération de VE :

- L'augmentation des **mouvements moléculaires** et donc des interactions lipides-lipides ou lipides-protéines (Nicolson, 2014). D'une part, cela peut stimuler les phénomènes de fusions ainsi que l'apparition de courbures positives ou négatives dans les membranes (Falasca, 2012). De tels phénomènes pourraient faciliter la formation d'ILV au sein de l'endosome, favoriser la fusion des MVB avec la membrane plasmique et donc la libération d'EXO ou bien le bourgeonnement de la membrane plasmique et la libération de MV. D'autre part, cela peut favoriser l'augmentation de la probabilité d'interaction de lipides de la membrane avec des protéines spécifiques, facilitant leur recrutement. Par exemple, la fluidification favorise le recrutement de kinases lipidiques comme la pyruvate déshydrogénase kinase (PDK) ou la protéine kinase B (PKB ou Akt), permettant la synthèse de nouveaux phosphoinositides (PIP) (Falasca, 2012). Les PIP sont des lipides essentiels dans le transport vésiculaire, d'endocytose ou d'exocytose (De Craene *et al.*, 2017), et qui par ailleurs ont été démontrés comme participant activement à la sécrétion d'EXO (Skotland *et al.*, 2019).
- L'augmentation de la **perméabilité membranaire** (Nicolson, 2014; Rodrigues *et al.*, 2002). Elle peut favoriser l'entrée dans les cellules d'éléments comme le calcium, impliqué dans la formation des MV mais également la libération des EXO par exocytose au niveau de la membrane plasmique.

b. Altération des radeaux lipidiques

La déplétion en cholestérol pourrait provoquer une déstructuration des microdomaines enrichis en cholestérol comme les radeaux lipidiques.

Notre équipe a ainsi déjà montré que la déplétion en cholestérol, observée suite à une exposition au BaP, est à l'origine d'une déstabilisation de la structure des radeaux lipidiques dans les hépatocytes de rat en culture primaire (Collin *et al.*, 2014) et dans les cellules épithéliales du foie F258 (Tekpli *et al.*, 2010). Dans notre modèle WIF-B9, nous avons confirmé ces résultats en observant une diffusion de la fluorescence, représentative de la déstructuration des radeaux lipidiques (**FIGURE 42**) (van Meteren *et al.*, *résultats non publiés*). En revanche, l'effet du traitement par le DBahA sur les radeaux lipidiques n'a pas été étudié. Au vue de la déplétion en cholestérol et l'augmentation de la fluidité des membranes que nous avons mises en évidence, il pourrait aussi provoquer une déstructuration similaire des radeaux lipidiques.

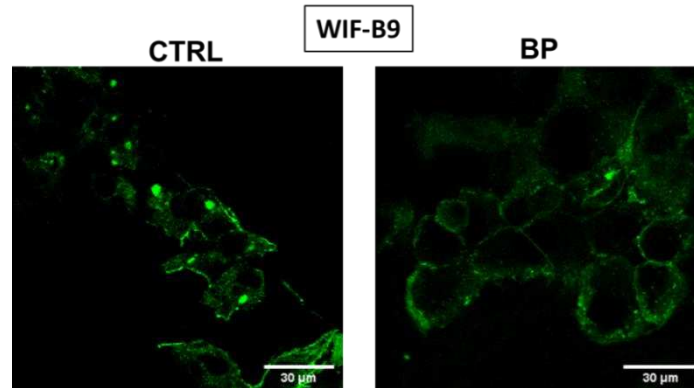


Figure 42 : Le BP provoque une déstructuration des radeaux lipidiques

Les radeaux lipidiques sont observés par microscopie confocale à fluorescence après marquage du ganglioside GM1 par la choléra toxine conjuguée au FITC. Les cellules WIF-B9 ont été exposées ou non au BP à la concentration de 100 nM pendant 72 h. Le BP provoque une diffusion de fluorescence, représentative de la destruction des radeaux lipidiques dans les hépatocytes. *La barre d'échelle correspond à 30 µm. Les images sont représentatives de deux expériences indépendantes*

Cette déstructuration de domaines enrichis en cholestérol pourrait être à l'origine d'une élévation de la libération de VE par plusieurs mécanismes. Le premier a été proposé à partir des résultats obtenus dans les cellules épithéliales Caco-2 et concerne les MV. Ainsi, la déstructuration des radeaux lipidiques contenant la protéine prominine1 (une protéine de structure des protubérances membranaires qui se lie au cholestérol), favoriserait la formation d'une courbure membranaire et entraînerait l'initiation de la formation de bourgeons au niveau des tubules membranaires des microvilli de ces cellules épithéliales.

Un autre mécanisme pourrait être la modulation de l'activité de protéines associées aux radeaux lipidiques, qui seraient impliquées dans la formation ou libération de VE (Llorente *et al.*, 2007). Ainsi la déstructuration des radeaux lipidiques peut favoriser l'activation de certaines protéines soit par leur translocation hors de ces domaines, soit par l'interruption de leur interaction avec des composés de ces domaines. Par exemple, la déstructuration des radeaux lipidiques peut entraîner l'activation de kinases comme : la protéine kinase A (Burgos *et al.*, 2004), la protéine kinase C (Cabrera-Poch *et al.*, 2004), impliquées dans les processus d'endocytose, d'exocytose et de trafic vésiculaire (Alvi *et al.*, 2007; Liberali *et al.*, 2008) et donc possiblement dans la formation et la libération d'EXO. La déstructuration des radeaux pourrait aussi activer la kinase ROCK (Wang *et al.*, 2013) permettant la formation de nouveaux microfilaments d'actine, le bourgeonnement de la membrane plasmique et donc la libération de MV.

c. Rôles possibles des échangeurs NHE et du pH

Les échangeurs sodium/proton NHE sont des transporteurs ioniques transmembranaires, qui permettent l'échange d'un ion H^+ avec un ion Na^+ ou K^+ et jouent un rôle essentiel dans la régulation

du pH au niveau intracellulaire. Il existe deux types de NHE : ceux présents dans la membrane plasmique, comme NHE-1, à l'origine de l'échange d'un H⁺ cytoplasmique avec un Na⁺ extracellulaire ; et ceux présents dans la membrane de différents compartiments intracellulaires des voies d'endocytose et de sécrétion, permettant la sortie de H⁺ de la lumière des organites (Ohgaki *et al.*, 2011).

Notre équipe a montré que la déstructuration des radeaux lipidiques était à l'origine d'une relocalisation du transporteur membranaire NHE-1 (cf I.C.2.b.iii.b) *Le remodelage membranaire induit par les HAP en page 65*) en dehors des radeaux lipidiques, déclenchant son activation et donc une alcalinisation précoce puis une acidification tardive du cytosol *via* l'altération de la mitochondrie des cellules épithéliales du foie F258 (Huc *et al.*, 2004; Tekpli *et al.*, 2012). Cette activation de NHE-1, est aussi en partie responsable de l'induction par le BaP de la fluidification des membranes et d'une apoptose (Gorria *et al.*, 2006a). Le rôle potentiel de l'activation de cet échangeur NHE-1 dans la libération de VE a donc été recherché, grâce à l'utilisation du cariporide, inhibiteur des NHE. Le cariporide permet, non seulement, d'inhiber la production de VE induite par le BaP et le DBaA, mais également l'apoptose induite par ces deux HAP à forte affinité pour le récepteur AhR (FIGURE 43) (van Meteren *et al.*, résultats non publiés). En revanche, le cariporide n'a aucun effet sur les effets produits par le PYR suggérant encore une fois le rôle déterminant du récepteur AhR.

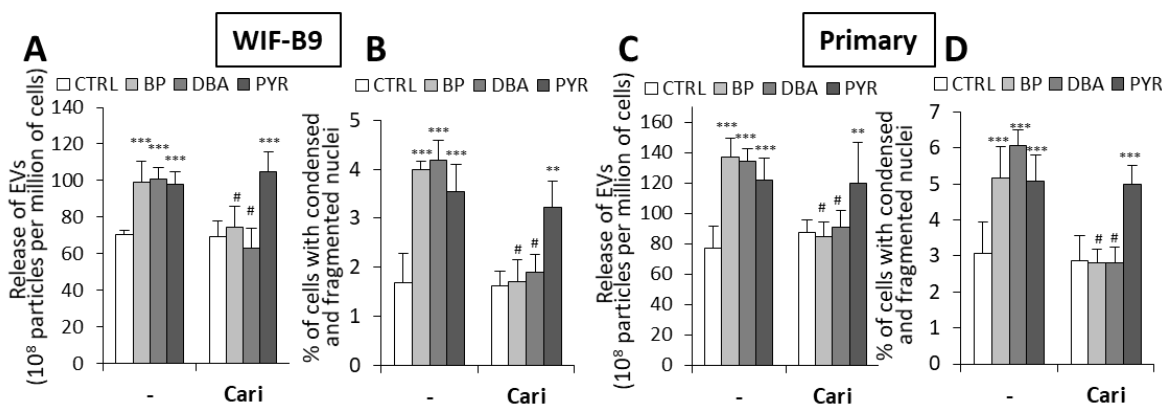


Figure 43 : Les transporteurs NHE pourraient être impliqués dans la libération de VE induite par le BP et le DBA

La quantité de VE a été mesurée par le NTA (A, C) et l'apoptose a été estimée par l'observation microscopique du nombre de cellules à chromatine condensée et/ou fragmentée après marquage par le Hoescht 33342 (B, D). Les hépatocytes WIF-B9 (A, B) et les hépatocytes primaires de rat (C, D) ont été exposés ou non au BP, DBA, ou PYR à la concentration de 100 nM pendant 72 h ou 18 h respectivement. Certaines cultures ont été pré-traitées pendant 1 h ou non (-) avec du cariporide (Cari) (10 μM), un inhibiteur spécifique de NHE-1. Les valeurs correspondent aux moyennes +/- erreurs standards de 5 à 7 expériences indépendantes. Traités versus CTRL: **p < .01, ***p < .001. Pré-traitement versus sans pré-traitement : # p < .01.

Plusieurs hypothèses reposant sur le pH ou la fluidité membranaire peuvent expliquer l'implication des échangeurs NHE dans la libération des VE sous l'effet des HAP de haute affinité pour l'AhR :

- **L'augmentation de fluidité membranaire** sous l'effet de NHE-1 (Gorria *et al.*, 2006a). Or, nous avons montré l'importance de cette fluidification dans la libération de VE.

- **L'acidification du cytosol** obtenu à plus long terme après exposition au BaP et l'activation de NHE-1. En effet, une acidification du cytosol dans des lignées cellulaires de mélanome (Parolini *et al.*, 2009) et dans plusieurs lignées cellulaires cancéreuses (Logozzi *et al.*, 2018) favorise la libération de VE et plus spécifiquement d'EXO dans le milieu extracellulaire. L'acidification du cytosol pourrait activer des protéines spécifiques participant à la biogénèse de VE ou, au contraire, pourrait simplement provoquer la mauvaise conformation de protéines et par conséquent l'augmentation de la libération de VE pour expulser ces « déchets toxiques » des cellules en faisant intervenir des voies de signalisation spécifiques de stress du réticulum par exemple.

- **L'acidification des endosomes.** Les NHE localisés spécifiquement au niveau de ces endosomes n'interviendraient pas, car ils participent à l'alcalinisation intraluminaire par le transport de H⁺ de la lumière vers le cytosol. Par contre, les NHE de la membrane plasmique, une fois endocytés, peuvent faciliter l'acidification des organites, de concert avec les ATPases, en pompant des protons H⁺ vers la lumière (Brett *et al.*, 2005; Diering *et al.*, 2013). Cette acidification favoriserait la formation d'un gradient de pH facilitant le trafic intracellulaire, l'accélération de la maturation des endosomes (Weisz, 2003) et la formation des ILV dans les MVB, ceci sous contrôle de la protéine Alix (Matsuo, 2004), protéine de la voie ESCRT. Or, cette dernière protéine est surexprimée dans les vésicules et les cellules après exposition aux HAP. Ces événements faciliteraient spécifiquement la formation et la libération d'EXO.

Aucun mécanisme ou hypothèse n'a été fourni par les auteurs des études mentionnées ci-dessus, pour expliquer comment l'acidification ou le gradient de pH participent précisément à la libération de VE. Il serait donc intéressant d'étudier, dans les hépatocytes WIF-B9 et primaires de rat, la variation du pH cytosolique et aussi de certains organites d'intérêt, comme les endosomes, au cours de l'exposition aux HAP. En plus, l'utilisation de solutions tampons de pH pourrait ensuite permettre de réduire la libération de VE.

2. Augmentation de la concentration du cholestérol des VE

A l'inverse de la diminution du cholestérol dans les cellules, le traitement par chacun des trois HAP, y compris le PYR, provoque une augmentation du cholestérol dans les VE (**ART. 1 FIG 9**). Il se pourrait que les HAP provoquent une redistribution du cholestérol vers les compartiments endosomaux. De manière intéressante, l'activation des deux récepteurs AhR et CAR peut résulter en une accumulation de cholestérol au niveau des endosomes. En effet, l'AhR favorise

l'accumulation de cholestérol vers le compartiment endosomal/lysosomal dans des macrophages (Podechard *et al.*, 2009) et CAR peut inhiber la sortie de cholestérol en dehors du foie (Cheng *et al.*, 2017). En outre, dans les cellules oligodendrogiales, une accumulation de cholestérol dans l'endosome induit la formation d'ILV et augmente la libération d'EXO (Strauss *et al.*, 2010).

Cette redistribution du cholestérol vers les EXO pourrait s'expliquer par l'augmentation de l'expression de la protéine Alix, dans les cellules traitées par les HAP (**ART. 1 FIG 9**). En effet, la protéine Alix interagit avec un lipide spécifiquement localisé dans la membrane des endosomes, l'acide lysobisphosphatique (LBPA), aussi appelé bis(monoacylglycéro)phosphate (BMP) (Dikic, 2004; Matsuo, 2004), qui est impliqué dans le tri et la redistribution du cholestérol entre les différentes membranes des endosomes et des ILV (Chevallier *et al.*, 2008). En plus, l'interaction Alix - LBPA participe aussi à la fission et fusion des ILV avec la membrane des endosomes (Bissig and Gruenberg, 2014).

3. Le changement du contenu protéique des VE comme reflet du rôle clé du cholestérol dans leur libération

Le changement de l'expression des marqueurs protéiques spécifiques des EXO libérés par les hépatocytes traités par les HAP pourrait être le reflet du rôle clé joué par le cholestérol.

La diminution de l'expression de la flotilline-1 et de la phosphatase alcaline (PAL), protéines résidentes des radeaux lipidiques, et celle des tétraspanines CD81 et CD63, serait corrélée avec la diminution de la concentration en cholestérol de la membrane plasmique.

La structure des radeaux lipidiques repose, en grande partie, sur leur enrichissement en cholestérol. En plus, le cholestérol interagit avec les tétraspanines dans la membrane plasmique (Charrin *et al.*, 2003; Zimmerman *et al.*, 2016) pour former et assurer le maintien de microdomaines membranaires enrichis en tétraspanines (TEM : *Tetraspanin Enriched Microdomains*) (Yáñez-Mó *et al.*, 2009) et peut réguler le trafic des tétraspanines vers les endosomes (Xu *et al.*, 2009). Ainsi, une déplétion en cholestérol provoque une déstructuration des radeaux lipidiques qui entraîne la perte de protéines résidentes comme la flotilline-1 et la PAL et une déstructuration des TEM. Lors de l'endocytose, ces déstructurations se traduisent en une diminution de l'inclusion de leurs constituants dans les membranes des endosomes et des ILV, donc des EXO.

L'augmentation de l'expression des protéines Tsg101 et Alix, appartenant au système ESCRT, pourrait être liée à l'élévation des niveaux de cholestérol dans les VE (**ART. 1 FIG 8**). Le regroupement des protéines ESCRT au niveau endosomal a été décrit comme étant dépendant de la concentration en cholestérol (Boura *et al.*, 2012). Par ailleurs, ce regroupement qui provoque la formation de domaines membranaires plus rigides pourrait, en partie, être responsable de la rigidification des membranes des VE (**ART. 1 FIG 9**). De plus, la protéine Alix peut contrôler les niveaux de cholestérol au niveau des MVB par l'interaction avec le phospholipide LBPA (Chevallier

et al., 2008; Matsuo, 2004) uniquement présent dans les endosomes tardifs (Dikic, 2004) comme évoqué dans le paragraphe 2 ci-dessus.

B. Entrée des VE dans les hépatocytes récepteurs

Les VE issues des hépatocytes traités par les HAP sont enrichies en cholestérol par rapport aux VE issues d'hépatocytes non traités. Ceci peut influencer à la fois leur résistance à la dégradation et leur interaction avec les cellules réceptrices.

1. Résistance à la dégradation

La concentration en cholestérol dans les membranes est un paramètre important de leur stabilité et donc pour l'accès des hydrolases lipidiques à leur substrat (Gallala and Sandhoff, 2011), ce qui pourrait protéger les VE-HAP de la dégradation. En plus, l'augmentation de la concentration en cholestérol, dans les VE-HAP, serait à l'origine d'une augmentation de leur rigidité (**ART. 1 FIG 9**). Cette rigidité leur permettrait de résister à la dégradation, par des enzymes lipolytiques, dans la matrice extracellulaire (MEC) mais également dans le sang (Pfrieger and Vitale, 2018). Par conséquent, l'exposition aux HAP favoriserait la libération de vésicules plus persistantes dans le milieu extracellulaire et augmenterait leurs possibilités d'atteindre la cellule réceptrice dans le foie ou même la circulation générale avec éventuellement une propagation jusque d'autres tissus extra-hépatiques.

La mesure par AFM de la résistance ou l'élasticité des VE en fonction de la concentration en cholestérol en surface, permettrait de savoir si les VE-HAP sont effectivement plus résistantes et ainsi supposer plus persistantes dans les tissus ou dans la circulation sanguine.

2. Interaction avec les cellules réceptrices

Le cholestérol pourrait également favoriser l'entrée des VE dans les cellules réceptrices. Dans les hépatocytes, le mode d'internalisation des VE que nous avons mis en évidence est l'endocytose. En fait, un enrichissement des surfaces en cholestérol peut favoriser l'adhésion cellulaire (Hwang *et al.*, 2002; Yu *et al.*, 2006a) et donc probablement l'interaction des VE-HAP, elles-mêmes enrichies en cholestérol, avec la membrane plasmique des hépatocytes récepteurs, avant leur endocytose. Ainsi l'augmentation de l'entrée dans les hépatocytes récepteurs des VE libérées, suite à une exposition aux HAP, pourrait résulter de leur enrichissement en cholestérol par rapport à des VE témoins (**ART. 2 FIG 7**).

Il est fait état aussi qu'une augmentation de la concentration en cholestérol dans la cellule réceptrice favorise la fusion des VE avec la membrane plasmique de ces cellules (Parolini *et al.*, 2009), même si ce mode d'internalisation n'est pas celui de nos modèles d'étude.

Après avoir traité les VE-HAP par la méthyl- β -cyclodextrine, qui extrait le cholestérol des membranes, l'étude de leur endocytose permettrait de savoir si le cholestérol des VE intervient

dans ce phénomène. D'autre part, d'autres molécules de surface des VE pourraient intervenir également dans l'amarrage des VE aux cellules réceptrices, comme les intégrines ou les protéoglycanes (cf II.C.1.c.i *Fixation des VE sur les cellules réceptrices en page 96*). Ainsi, des expériences étudiant l'effet des HAP sur l'expression de telles molécules à la surface des VE et des possibles modifications d'expression sur l'endocytose des VE aideront à approfondir les mécanismes de l'internalisation des VE-HAP par les hépatocytes récepteurs.

III. Altération des lysosomes et/ou de l'autophagie sur la libération et l'effet des VE-HAP

L'activité d'autophagie et celle des lysosomes peut être à l'origine de la dégradation des ILV formées dans les MVB, ce qui participe ainsi à la réduction de la sécrétion d'EXO par des cellules productrices. En plus, les VE internalisées par des cellules réceptrices, suite à une endocytose, peuvent atteindre le compartiment lysosomal, ce qui pourrait avoir un effet sur sa fonction.

A. Balance entre la dégradation et la libération des EXO

Après leur formation, les MVB contenant les ILV sont destinées à fusionner soit avec les lysosomes où les ILV sont dégradées, soit avec la membrane plasmique ou les ILV, donc les EXO sont sécrétés. Les mécanismes d'adressage des MVB aux lysosomes ou à la membrane plasmique ne sont pas encore bien connus, mais il existerait une balance entre la dégradation et la libération d'EXO (Eitan *et al.*, 2016; Palmulli and van Niel, 2018) (FIGURE 44). Si les conditions sont en faveur de la dégradation, la libération d'EXO serait réduite et inversement.

1. Altération de la fonction lysosomale

Une altération de la fonction lysosomale est ainsi à l'origine d'un amarrage des MVB à la membrane plasmique et d'une augmentation de la libération d'EXO (Eitan *et al.*, 2016). Par exemple, l'inhibition de la fonction lysosomale par la bafilomycine A, un inhibiteur de la pompe à protons V-ATPase lysosomale, entraîne l'augmentation de la sécrétion d' α -synucléine dans les EXO issus de cellules neuronales SH-SY5Y (Alvarez-Erviti *et al.*, 2011) ; de la sécrétion d'EXO par des cellules épithéliales de la vessie 5637 infectées par *E.coli* (Miao *et al.*, 2015), par des cellules embryonnaires humaines du rein HEK293 (Villarroya-Beltri *et al.*, 2016), par des cellules HeLa (Edgar *et al.*, 2016) et par des cellules neuronales N2a (Miranda *et al.*, 2018).

Or, notre équipe a déjà montré que dans les cellules épithéliales du foie (Gorria *et al.*, 2008) et dans les hépatocytes primaires de rat (Collin *et al.*, 2014), le BaP provoque une altération de la fonction lysosomale telle qu'une alcalinisation des lysosomes (Gorria *et al.*, 2008) et une perméabilisation des membranes des lysosomes. Il est donc possible que la déstructuration des

lysosomes causée par le BaP participe à cette augmentation de la libération de VE, mise en évidence dans les deux types d'hépatocytes de notre étude.

2. Altération de l'autophagie

L'influence de la fonction lysosomale sur la biogenèse d'EXO suggère fortement une coordination entre la régulation de l'autophagie et la libération d'EXO.

En effet, l'autophagie est une voie de dégradation lysosomale essentielle dans le maintien de l'homéostasie cellulaire par la dégradation et le recyclage de protéines ou d'organites endommagés (Baixauli *et al.*, 2014). L'autophagie peut être induite en réponse à différents stress tels que des carences en nutriments, acides aminés ou ATP, une génération excessive d'ERO ou des dommages à l'ADN ou l'accumulation de mitochondries endommagées. Il existe plusieurs types d'autophagie dont la **macroautophagie** qui permet l'élimination de composants cytosoliques et des organites par la séquestration de régions entières du cytosol dans des vésicules appelées **autophagosomes** qui sont capables de fusionner avec le compartiment endosomal, dont les MVB, pour former des **amphisomes**, puis avec les lysosomes pour former des **autolysosomes** (FIGURE 44).

Une altération du phénomène d'autophagie pourrait aussi être impliquée dans la libération d'EXO (Baixauli *et al.*, 2014). Ainsi, le blocage de la fusion autophagosome-lysosome entraîne une élévation de la libération d'EXO par les cellules de Kupffer et les hépatocytes primaires (Babuta *et al.*, 2019). A l'inverse, l'induction de l'autophagie a été reliée à une inhibition de la sécrétion d'EXO par les cellules érythroleucémiques K562 (Fader *et al.*, 2008).

En fait, la perméabilisation des lysosomes, qui est à l'origine d'un défaut d'acidification et d'activité des hydrolases acides, peut perturber la fusion des autophagosomes et amphisomes avec les lysosomes, empêchant la maturation de ces structures autophagiques. Ce défaut dans la fusion est aussi à l'origine de l'accumulation de ces structures (autophagosomes et amphisomes) (Fader *et al.*, 2008). On parle alors de réduction du flux autophagique. Ainsi, le BaP, par sa capacité à induire la perméabilisation des lysosomes, pourrait également diminuer le flux autophagique dans les hépatocytes et de cette manière, limiter la fusion des MVB avec les autophagosomes, qui se redirigeraient vers la membrane plasmique pour la sécrétion des EXO.

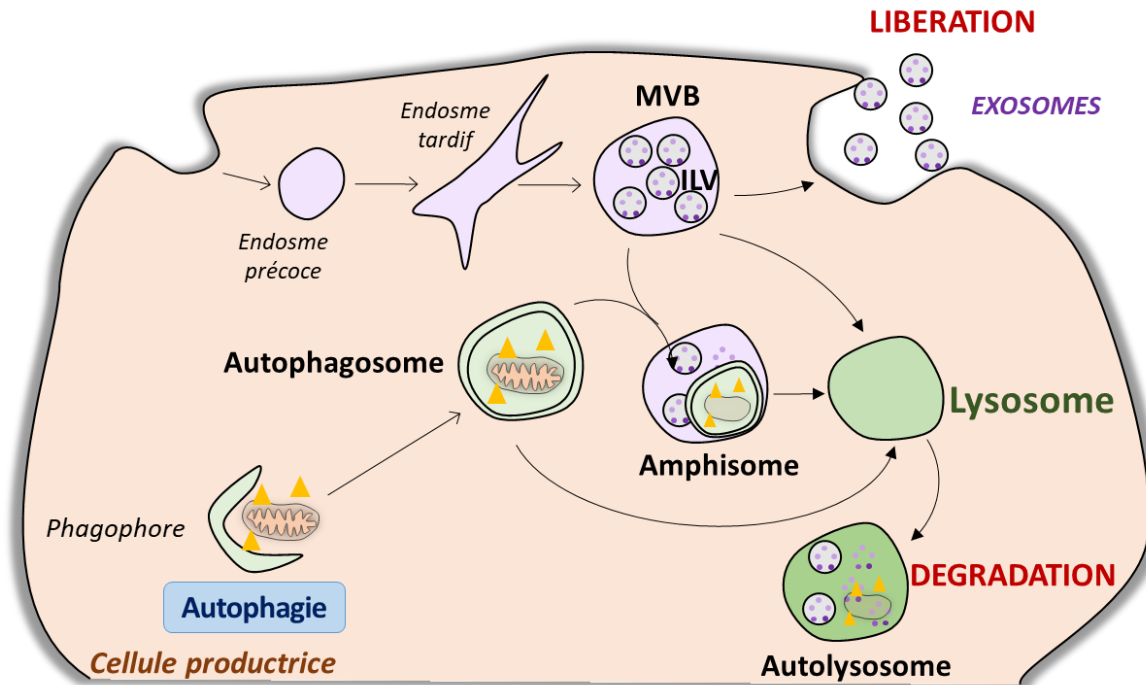


Figure 44 : Balance entre la dégradation et la libération d'EXO

B. Effet sur les cellules réceptrices

Dans les cellules réceptrices, les VE-HAP provoquent une perméabilisation des membranes des lysosomes (**ART. 2 FIG 8**), ainsi qu'une alcalinisation de leur pH (**ART. 2 FIG S4**). Par ailleurs, l'observation par MET des hépatocytes récepteurs des VE-HAP, révèle l'accumulation de structures de type autophagosomes et autolysosomes (**FIGURE 45**) (van Meteren et al, *résultats non publiés*). Ceci suggère un défaut dans le flux autophagique qui serait compatible avec l'altération des lysosomes, notamment l'alcalinisation du pH que nous avons mise en évidence (**ART. 2 FIG S4**). En fait, les lysosomes ne seraient plus fonctionnels et donc incapables de dégrader ces structures.

Il est intéressant de noter que cette inhibition du flux autophagique, déjà suggérée comme un facteur favorisant la libération de VE, par les hépatocytes exposés aux HAP, est déclenchée par ces mêmes VE dans les hépatocytes récepteurs. On pourrait donc se demander si les cellules réceptrices à leur tour ne pourraient pas produire des VE.

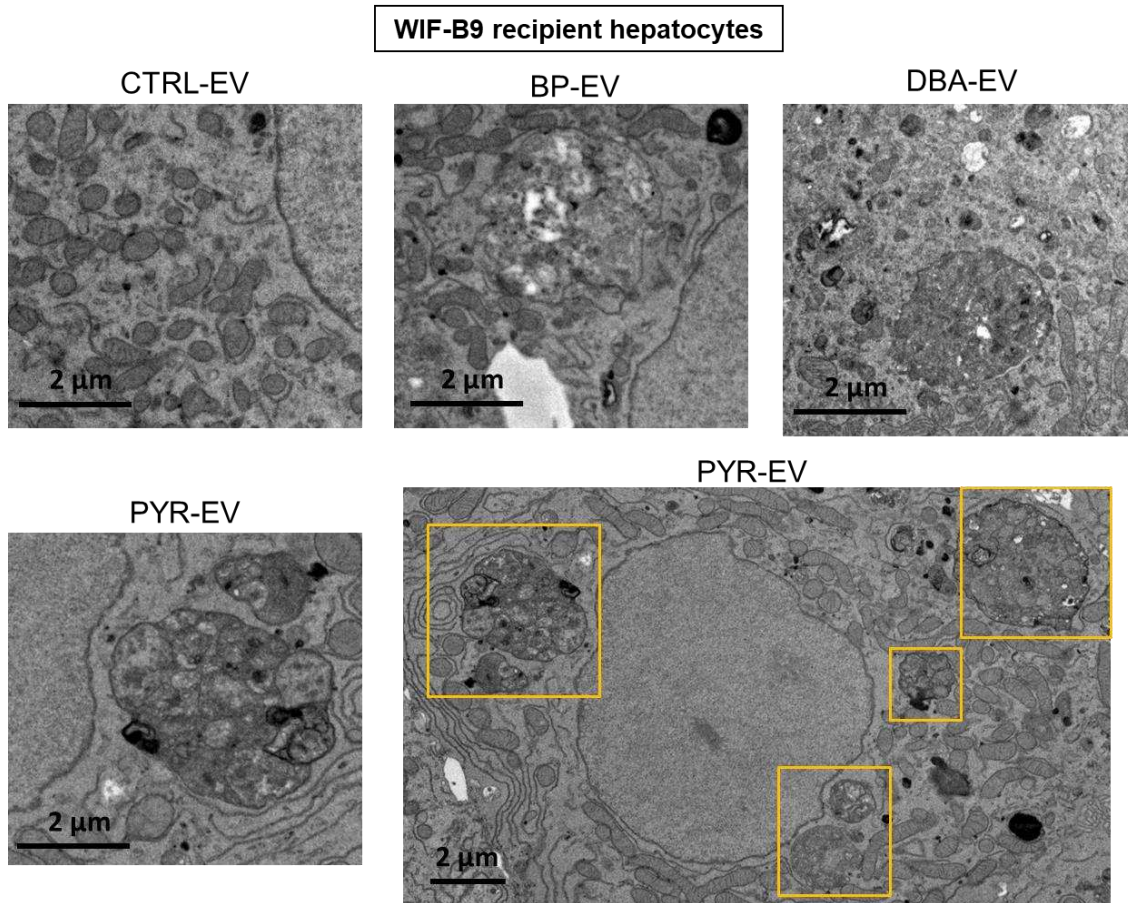


Figure 45 : Les VE-HAP pourraient provoquer une altération de l'autophagie des hépatocytes récepteurs

Les cellules WIF-B9 ont été exposées à des VE à la concentration de 5 µg/mL pendant 24 h. Les VE sont issues des WIF-B9 traitées ou non (CTRL-EV), par le BP (BP-EV), le DBA (DBA-EV) ou le PYR (PYR-EV) à la concentration de 100 nM pendant 72 h. La présence de structure d'autophagosomes ou d'autolysosomes dans les WIF-B9 a été observée par microscopie électronique à transmission suite à un traitement par les BP-EV, DBA-EV et PYR-EV. Dans l'image du bas à droite, les encadrés jaunes correspondent à la présence de multiples de ces structures dans une cellule exposée au PYR-EV. Les images sont représentatives de deux expériences indépendantes.

IV. Causes et conséquences d'un changement de contenu des VE dans un contexte toxicologique

A. Eliminer les molécules délétères, mais aussi les propager

La libération de VE par des cellules productrices, suite à un stress, pourrait correspondre à un mécanisme d'élimination de molécules délétères pour essayer de maintenir l'homéostasie cellulaire (Desdín-Micó and Mittelbrunn, 2016). Ainsi, il est possible que la libération de VE par les hépatocytes, suite à une exposition à des HAP, soit à l'origine d'une élimination de facteurs pro-oxydants, de facteurs pro-apoptotiques, de CYP, ou d'autres molécules potentiellement toxiques

pour la cellule productrice. Cette élimination pourrait expliquer les faibles taux d'apoptose observés suite à une exposition aux HAP, quelle que soit la concentration.

1. Facteurs pro-oxydants

L'exposition aux HAP induit un stress oxydant dans les hépatocytes. Ainsi, dans les VE issues d'hépatocytes traités par les HAP, une augmentation de l'expression de facteurs pro-oxydants est mise en évidence : la NADPH oxydase, une enzyme catalysant la production de l'anion superoxyde ; et la ferritine, complexe protéique capable de stocker jusqu'à 4 500 atomes de fer sous une forme non toxique, mais restant disponible pour une libération hors du complexe pour provoquer des dommages oxydatifs (**ART. 2 FIG 2**). En corrélation avec l'expression de la ferritine, une élévation du nombre d'atomes de fer est retrouvée dans les VE-HAP.

De la même manière, il est mis en évidence une augmentation des niveaux de **molécules pro-oxydantes** dans les VE libérées dans d'autres conditions inductrices de stress oxydant :

- la **ferritine** dans les VE libérées par des hépatocytes primaires de rat exposés à la galactosamine (Rodríguez-Suárez *et al.*, 2014)
- la **NADPH oxydase** active dans les VE isolées à partir de plaquettes (Gambim *et al.*, 2007; Janiszewski *et al.*, 2004) ou de cellules endothéliales (Burger *et al.*, 2016; Jansen *et al.*, 2013) après induction d'un stress oxydant.

Des **biomolécules oxydées** sont aussi détectées dans les VE libérées suite à un stress oxydant :

- des **protéines oxydées** comme la peroxirédoxine 1 oxydée dans les VE libérées par des monocytes stimulés par le LPS ou le TNF (Szabó-Taylor *et al.*, 2017) ;
- de l'**ADN mitochondrial oxydé** dans les VE isolées d'hépatocytes, traités par l'éthanol, et de sérum de souris, exposées à l'alcool (Cai *et al.*, 2017), et dans les VE libérées par des hépatocytes exposés au CCl₄ et à l'éthanol (Seo *et al.*, 2019) ;
- des **phospholipides oxydés** dans les VE dérivées des cellules embryonnaires du rein HEK293 après traitement par un ionophore de calcium (Manček-Keber *et al.*, 2015).

La libération de VE suite à un stress oxydant a ainsi été proposée comme la résultante d'un mécanisme de protection permettant l'élimination de molécules néfastes, telles que des protéines oxydées, de l'ADN mitochondrial, des phospholipides ou des systèmes de production de ROS (Benedikter *et al.*, 2018; Borrás *et al.*, 2019; Szabó-Taylor *et al.*, 2015; Yarana and St. Clair, 2017). En outre, une expulsion de fer par les EXO a été démontrée comme un mécanisme possible de résistance à la ferroptose (Brown *et al.*, 2019).

2. Facteurs pro-apoptotiques

Dans le but de se protéger face à la mort cellulaire, les cellules pourraient aussi libérer des facteurs pro-apoptotiques par l'intermédiaire des VE. Ainsi, dans les VE issues d'hépatocytes traités par les HAP, l'expression de protéines pro-apoptotiques, comme Bax, caspase 2 et la caspase 3

clivée donc active, est augmentée alors que l'expression de protéines anti-apoptotiques, comme Bcl-xL est réduite (**FIGURE 46**) (van Meteren et al, *résultats non publiés*). Il est intéressant de rappeler que l'activation de la caspase effectrice 3 est à l'origine de l'apoptose induite par les HAP et que la caspase 2 est une caspase initiatrice pouvant être activée par les ERO (Bouchier- Hayes, 2010) ; or, les trois HAP provoquent une génération d'ERO. De plus, la surexpression de la protéine Bax a été détectée dans les hépatocytes Hepa1c1c7 traités par le BaP (Holme *et al.*, 2007; Ko *et al.*, 2004; Solhaug *et al.*, 2004b).

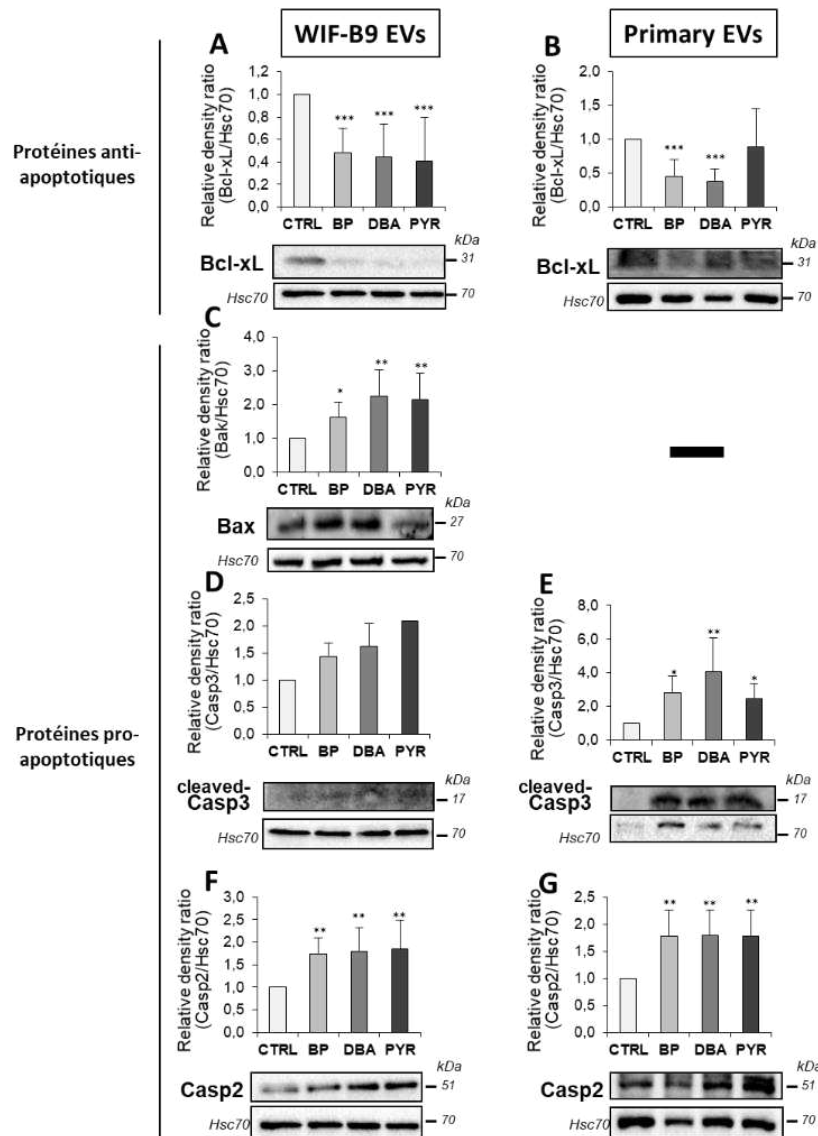


Figure 46 : Les VE libérées par les hépatocytes exposés aux HAP sont enrichies en protéines pro-apoptotiques

L'expression des protéines Bcl-xL (A, B), Bak (C), caspase 3-clivée (D, E) et caspase 2 (F, G) est mesurée par western-blotting. Les VE sont issues des hépatocytes WIF-B9 (A, C, D, F) ou des hépatocytes primaires de rat (B, E, G) témoins non traités (CTRL) ou exposés au BP, DBA, ou PYR à la concentration de 100 nM pendant 72 h ou 18 h respectivement. Les valeurs correspondent aux moyennes +/- erreurs standards de 2 à 7 expériences indépendantes. Traités versus CTRL: ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.

De façon similaire, des protéines pro-apoptotiques (protéines pro-apoptotiques de la famille Bcl-2, protéines de l'apoptosome et la caspase clivée 3) ont aussi été retrouvées dans des EXO libérés par des cellules épithéliales du pigment rétinien ARPE-1 après induction d'un stress oxydant (Biasutto *et al.*, 2013). La caspase 3 active est aussi présente dans des VE issues de cellules épithéliales pulmonaires après hypoxie (Moon *et al.*, 2015), des VE isolées du plasma rat après une hypoperfusion cérébrale (Schock *et al.*, 2014) ou du sang de patients présentant un lupus (Abid Hussein *et al.*, 2005).

3. Les CYP

Les CYP450 sont des enzymes indispensables au métabolisme des xénobiotiques pour permettre leur élimination, mais elles participent également à leur bio-activation et leur transformation en métabolites réactifs toxiques et à la génération d'ERO. L'exposition aux HAP à forte affinité pour le récepteur AhR entraîne notamment une augmentation de l'expression du CYP1A1 et de son activité (**ART. 1 FIG S5-6**). Ainsi, nous avons recherché une augmentation de l'expression du CYP1A1 dans les VE libérées par les hépatocytes exposés au BaP. Le **CYP1A1** est bien présent dans les VE issues d'hépatocytes et son expression semble être augmentée suite à une exposition au BaP (**FIGURE 47**) (van Meteren *et al.*, *résultats non publiés*).

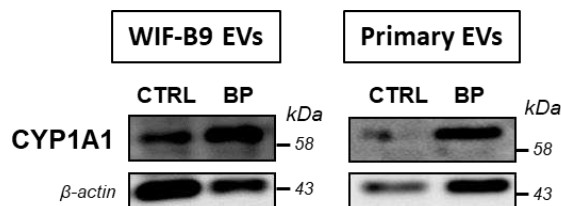


Figure 47 : Les VE libérées par les hépatocytes exposés aux HAP contiennent le CYP1A1

L'expression de la protéine CYP1A1 est mesurée par western-blotting. Les VE sont issues des WIF-B9 ou des hépatocytes primaires de rat, témoins (CTRL) ou exposés au BP à la concentration de 100 nM pendant 72 h ou 18 h respectivement. *Les images représentent d'une seule expérience.*

Une élévation de l'expression de différents CYP est aussi démontrée dans les VE issues d'hépatocytes ou isolées de la circulation sanguine de rongeurs après exposition à des xénobiotiques. Ainsi, on retrouve un enrichissement :

- en **CYP3A4** dans des VE issues d'hépatocytes traités par la rifampicine ou isolées de patients exposés au midazolam (Rowland *et al.*, 2019) ;
- en **CYP2D1** dans des VE libérées par les hépatocytes ou isolées du sérum de rats traités par la galactosamine (Palomo *et al.*, 2018) ;
- en **CYP2A1, 2B2/3, 2C11, 2D1** dans les VE dérivées d'hépatocytes exposés à la galactosamine (Rodríguez-Suárez *et al.*, 2014) ;
- en **CYP2E1** dans les VE dérivées d'hépatocytes exposés à l'alcool (Cho *et al.*, 2017a) ;
- en **CYP2E1, 2A3, 1A1/2, 4B** dans les VE isolées de la circulation sanguine de rats exposés à l'alcool ou de patients alcooliques (Cho *et al.*, 2017a).

Les mécanismes d'enrichissement spécifique des VE en CYP n'est pas encore connu (Gerth *et al.*, 2019). Une question intéressante serait de savoir si leur présence dans les VE pourrait : 1) servir à la diminution du métabolisme des cellules productrices exposées à un xénobiotique et donc à la protection des hépatocytes vis-à-vis de la formation de métabolites réactifs ou d'ERO, et en même temps 2) provoquer leur dissémination vers des sites éloignés du tissu hépatique, résultant en une propagation des effets délétères de leurs métabolites réactifs dans tout l'organisme.

4. Les toxiques eux-mêmes

Les VE pourraient aussi permettre l'expulsion de toxiques hors des cellules et ainsi constituer des réservoirs de toxiques potentiellement transportés vers différents tissus cibles dans l'organisme.

Nous nous sommes donc demandé si les HAP, toxiques lipophiles, ne pouvaient pas être transportés par les VE.

La mesure des concentrations en HAP ou métabolites réactifs n'a pas pu être effectuée dans les VE au cours de notre étude. En revanche, nous avons mesuré l'activité des CYP1, grâce à la mesure de l'activité EROD, dans les hépatocytes exposés aux VE-HAP. Aucune induction de l'activité des CYP1 n'a été détectée dans les cellules réceptrices par les VE-HAP par rapport aux VE-CTRL ou au témoin non traité, alors qu'un traitement par le DBahA et le BaP multiplie l'activité EROD par plus de 100. Ceci suggère que les VE-HAP ne transporterait pas de HAP. En revanche, il reste possible que les VE transportent des métabolites réactifs participant à la mort cellulaire des hépatocytes récepteurs, tels que le BPDE ou des molécules présentant des adduits spécifiques des HAP. Pour progresser dans cette hypothèse, il serait intéressant d'évaluer les dommages à l'ADN des hépatocytes suite à une exposition à des VE-HAP. En effet, l'ADN est une cible privilégiée des métabolites réactifs des HAP.

Jusqu'à présent, il n'existe pas d'information quant à la présence de xénobiotiques ou de leurs métabolites dans les VE libérées par des cellules exposées à ces xénobiotiques. Néanmoins, une étude met en évidence une absence de protéines présentant des adduits spécifiques du paracétamol dans les VE d'hépatocytes ou isolées de rongeurs traités par le paracétamol, alors que ces adduits sont bien détectés dans le milieu extracellulaire et dans le sérum (Duan *et al.*, 2019).

5. Les VE comme moyen de protection cellulaire face au stress

L'ensemble de ces données montre que :

- l'enrichissement spécifique du contenu des VE reflète les modifications du contenu des cellules productrices suite à un stress. Ces modifications pourraient donc servir de **biomarqueurs d'exposition et d'effet** ;

- les VE pourraient être un moyen pour les cellules de **résister au stress** subi en expulsant les éventuelles molécules responsables d'effets délétères. A ce sujet, deux études mettent en évidence que l'inhibition de la libération de VE provoque un effet délétère dans des cellules subissant un stress. La première, réalisée dans les cellules endothéliales HUVEC exposées à la staurosporine, inducteur d'apoptose, révèle que l'inhibition de la libération de MV provoque une accumulation de caspase 3 et une augmentation de l'apoptose (Abid Hussein *et al.*, 2007). La deuxième étude, réalisée *in vitro* et *in vivo*, met en évidence des altérations neuronales dépendantes du fer, après inhibition de la libération d'EXO contenant spécifiquement la ferritine (Mukherjee *et al.*, 2020).

Par la suite, des travaux portant sur l'inhibition de la libération de VE dans les hépatocytes traités par les HAP et les conséquences sur le stress oxydant et la mort cellulaire induits par les HAP seront essentiels pour savoir si la libération de VE reflète un mécanisme de protection ou non. Par ailleurs, une étude protéomique des VE-HAP permettrait d'évaluer leur enrichissement spécifique en protéines, ainsi que l'implication de ces protéines dans différents processus de protection ou de stress cellulaire.

B. Effets délétères pour les cellules réceptrices

Afin de se protéger, les hépatocytes exposés aux HAP libèreraient des VE-HAP qui sont enrichies en composés pro-oxydants et pro-apoptotiques. Néanmoins, ces VE, qui contiennent des molécules néfastes, pourraient être internalisées par des cellules réceptrices voisines ou distantes et y provoquer des effets délétères.

Ainsi, les VE-HAP délivrent leur contenu pro-oxydant dans les hépatocytes récepteurs, ce qui est à l'origine d'un stress oxydant et d'une perméabilisation des membranes des lysosomes de ces cellules, conduisant à leur apoptose (**ART. 2**). De la même manière, leur contenu pro-apoptotique (**FIGURE 46**), comme la caspase 2 et Bak, pourrait participer à l'altération des mitochondries observée en MET et la caspase 3 pourraient augmenter le pool intracellulaire de caspase 3 active, à l'origine de l'apoptose.

D'autres études ont également mis en évidence l'implication de cargo de VE dans la mort cellulaire. Par exemple, le transfert de la caspase 3 active des MV circulantes isolées de rats présentant une hypoperfusion cérébrale, ou le transfert de la NADPH oxydase des VE isolées de patients présentant un sepsis, sont à l'origine de l'apoptose de cellules endothéliales du cerveau (Schock *et al.*, 2014) ou de l'aorte (Gambim *et al.*, 2007; Janiszewski *et al.*, 2004) respectivement.

1. Mécanisme de transfert du chargement des VE

Le transfert de telles molécules, des VE vers le cytosol des cellules réceptrices, reste peu étudié et encore moins dans le contexte du foie.

Un premier mécanisme, par lequel le chargement des VE pourrait être transféré vers le cytosol, est celui que nous avons décrit pour l'exposition aux HAP. Les VE-HAP sont internalisées par endocytose dans les hépatocytes récepteurs ; par le trafic intracellulaire, elles peuvent atteindre le compartiment endosomal tardif, puis les lysosomes (**ART. 2 FIG 7**). Dans les lysosomes, la dégradation possible des membranes des VE par les hydrolases acides serait à l'origine de la libération du contenu pro-oxydant, qui à son tour, entraînerait par oxydation la **perméabilisation des membranes lysosomales** et donc la sortie dans le cytosol du contenu des VE.

Un autre mécanisme serait un phénomène appelé « **endosomal escape** » ou échappement endosomal, qui consiste en une fusion de la membrane des VE avec la membrane des endosomes tardifs ou des lysosomes à pH acide (Bissig and Gruenberg, 2014) (van Niel *et al.*, 2018; Somiya, 2020) (Joshi *et al.*, 2020) et donc une libération du contenu vers le cytosol. D'ailleurs, de façon intéressante, il faut remarquer que les VE-HAP sont enrichies en cholestérol, favorisant la fusion membranaire (Parolini *et al.*, 2009).

Un suivi en temps réel en microscopie à fluorescence permettra de suivre l'internalisation et le transfert du contenu des VE vers le cytosol afin d'approfondir les mécanismes impliqués.

2. Effet des VE potentiellement cellule spécifique

Dans cette étude, notre attention s'est concentrée sur l'effet des VE-HAP libérées par des hépatocytes traités par des HAP sur d'autres hépatocytes. Comme le foie est un organe composé de nombreux types cellulaires, il est donc important de s'interroger sur la **spécificité cellulaire** des effets des VE-HAP.

En fait, dans un contexte d'exposition à des acides gras lipotoxiques, les VE libérées par les hépatocytes peuvent être internalisées *in vitro* par des cellules étoilées (Lee *et al.*, 2017; Povero *et al.*, 2015), des macrophages (Ibrahim *et al.*, 2016; Kakazu *et al.*, 2016; Liao *et al.*, 2018) ou des cellules endothéliales (Jiang *et al.*, 2020; Povero *et al.*, 2013) provoquant leur activation cellulaire par des mécanismes différents. Ces mécanismes seraient très dépendants du chargement des VE. On peut donc considérer que tous ces chargements seraient contenus dans chaque VE libérée par les hépatocytes exposés et l'effet sur les cellules ne dépendrait que du type cellulaire rencontré par la VE.

Donc, l'étape clé dans la spécificité ou non, serait l'**adhérence des VE à la cellule réceptrice** et leur internalisation. En ce sens, les VE isolées d'hépatocytes et injectées dans des souris par voie intraveineuse se localisent préférentiellement dans les cellules étoilées quiescentes (Chen et

al, 2017). De même, pour les VE issues de cellules étoilées quiescentes (Chen and Brigstock, 2016) et celles issues de cholangiocytes (Liu *et al.*, 2019b), qui sont quasi-exclusivement présentes dans les cellules étoilées dans le foie de souris.

De manière intéressante, en situation pathologique, les interactions des VE avec les cellules réceptrices pourraient changer. Ainsi, après exposition de souris au CCl₄ à l'origine de dommages hépatiques et de fibrose, la capacité d'internalisation de VE, issues d'hépatocytes sains (Chen *et al.*, 2017a) ou de sérum de souris saines (Chen *et al.*, 2018), par les hépatocytes endommagés dans le foie est largement augmentée. Ce tropisme particulier peut être dû à une combinaison de molécules présentes à la surface des VE, comme les intégrines ou les protéoglycanes (Chen *et al.*, 2017a) facilitant leur interaction avec un type cellulaire particulier dans un environnement multicellulaire. Les interactions pourraient alors changer en conditions pathologiques, par la modification de protéines présentes dans la membrane des VE à la membrane des cellules réceptrices.

Suite à une exposition aux HAP, nous avons montré une surcharge en cholestérol dans les VE-HAP libérées par les hépatocytes. Or, une élévation de cholestérol pourrait être un mécanisme commun pour une internalisation par tous les autres types cellulaires du foie.

Par conséquent, il serait intéressant de traiter d'autres types cellulaires du foie, comme les cellules endothéliales, les cellules de Küpffer ou les cellules étoilées par les VE-HAP, puis voir si : 1) elles peuvent être internalisées, 2) si elles peuvent participer à des effets toxiques similaires ou non, particulièrement dans les cellules de Küpffer, fortement impliquées dans le métabolisme du fer ou les cellules endothéliales, très sensibles au stress oxydant. Inversement, une étude de l'effet de VE-HAP libérées par d'autres types cellulaires du foie sur les hépatocytes, principale population de cellules, pourra permettre de comprendre si la communication par les VE suite à une exposition aux HAP dans le foie est privilégiée pour médier des effets toxiques entre les types cellulaires.

3. Transport potentiel des VE jusqu'à la circulation générale et d'autres organes

Les VE libérées par les cellules du foie, représentent une faible proportion des VE présentes dans la circulation sanguine en conditions physiologiques (inférieure à 5 %) (Povero *et al.*, 2014). En revanche, en situation pathologique, une augmentation de la libération des VE par les cellules du foie se traduit, aussi, par une élévation de leur présence dans la circulation sanguine. Par exemple, une augmentation de 20 % des VE libérées par des hépatocytes est détectée dans le sérum de patients présentant une hépatite alcoolique par rapport aux sujets sains (Sukriti *et al.*, 2018). Chez la souris développant une NAFLD, l'élévation des VE d'origine hépatique atteint plus de 400 % dans le plasma (Povero *et al.*, 2014). Pour notre part, l'exposition de rongeurs aux HAP entraîne une élévation de près de 50 % dans le sérum ou le plasma de rongeurs exposés aux HAP

(ART. 1 FIG 3). Ces résultats seraient à compléter par une étude des VE par western blot ou par cytométrie, afin de vérifier l'expression du marqueur ASGPR1, spécifique des hépatocytes, ou d'autres marqueurs spécifiques des autres types cellulaires du foie et donc de confirmer une spécificité hépatique concernant l'origine des VE présentes.

Les VE d'origine hépatique pourraient ensuite être transportées vers des sites distants de leur lieu de production et y déclencher des effets potentiellement délétères. Les VE circulantes hépatiques libérées, suite à une exposition à des xénobiotiques, pourraient délivrer différentes enzymes CYP vers des tissus extra-hépatiques, où elles pourraient influencer le métabolisme des xénobiotiques des cellules réceptrices initialement dépourvues de l'équipement enzymatique nécessaire (Gerth *et al.*, 2019). Il sera alors possible que ces tissus métabolisent les xénobiotiques et provoquent la production de métabolites réactifs ou d'ERO, conduisant à une toxicité dans les cellules réceptrices. De façon similaire, ces VE chargées en composés potentiellement néfastes pourraient les transférer vers ces mêmes cellules réceptrices extra-hépatiques. On peut imaginer que les VE-HAP transfèrent leur contenu pro-oxydant et provoquer des effets pro-oxydatifs connus pour participer à de nombreux phénomènes comme l'inflammation, l'apoptose ou le dysfonctionnement endothélial.

De cette manière, les VE hépatiques pourraient potentiellement participer à la toxicité cellulaire extra-hépatique observée suite à l'exposition de xénobiotiques, comme l'éthanol notamment (Kumar *et al.*, 2017b).

Jusqu'à présent, les VE issues de cellules saines du foie, après injection par voie intraveineuse chez des rongeurs, ont été décrites comme se localisant exclusivement dans le foie (Chen and Brigstock, 2016; Chen *et al.*, 2017a, 2018) ou quasi-exclusivement dans le foie avec une accumulation plus faible dans les reins (Liu *et al.*, 2019b). En revanche, aucune information n'existe sur la localisation de VE libérées dans des conditions pathologiques. Il reste donc possible que, dans des situations pathologiques particulières, certaines VE puissent atteindre des tissus extra-hépatiques et induire différents effets.

Une étude *in vivo*, d'injection par voie intraveineuse de VE-HAP, serait très informative quant à leur possibilité d'être internalisées par des cellules de tissus extra-hépatiques ou non et d'y entraîner des effets toxiques. Le modèle "larve de poisson-zèbre" pourrait être envisagé car il est facile d'entretien, peu coûteux et sa transparence permet d'étudier facilement la localisation des VE marquées par fluorochrome.

Conclusion

Nous montrons, pour la première fois dans un contexte d'exposition à des contaminants de l'environnement, que des VE peuvent être libérées *in vitro* par des hépatocytes exposés aux HAP et *in vivo* dans la circulation générale de rongeurs exposés à des HAP en mélange ou pas. En outre, ces VE seraient impliquées dans le stress oxydant et la mort cellulaire, mécanismes toxiques, bien connus pour participer au développement des maladies hépatiques comme les NAFLD et les cancers.

L'exposition aux HAP provoque une augmentation de la libération de VE par les hépatocytes, ainsi qu'une modification de leur contenu. Cette modification du contenu est le reflet du stress oxydant et de la mort cellulaire, spécifiquement induits par les HAP, dans les hépatocytes producteurs. Ainsi, les VE pourraient être une piste intéressante en tant que biomarqueurs d'exposition et d'effet de ces HAP.

En plus, ces VE-HAP sont à l'origine d'un stress oxydant et d'une mort cellulaire dans les hépatocytes récepteurs. Les VE seraient donc des vecteurs de la toxicité des HAP et participeraient aux dommages hépatiques induits par les HAP. Les VE pourraient alors constituer une cible thérapeutique dans des maladies du foie associées à une exposition à ces HAP ou à d'autres contaminants de l'environnement faisant intervenir des événements de stress oxydant et de mort cellulaire.

Les mécanismes de libération de VE, par les HAP, font intervenir l'activation des récepteurs nucléaires, le métabolisme *via* l'activité des CYP, le stress oxydant et la modulation des concentrations cellulaires en cholestérol au niveau cellulaire, déclenchant notamment la fluidification de la membrane plasmique. Par ailleurs, les mécanismes de toxicité des VE-HAP font intervenir l'endocytose des VE, un transfert de facteurs pro-oxydants, notamment le fer, un stress oxydant et une perméabilisation de la membrane des lysosomes. L'utilisation d'inhibiteurs des récepteurs aux xénobiotiques, des CYP, de l'endocytose, d'antioxydants, de stabilisants membranaires ou de chélateurs du fer, permettrait d'empêcher : 1) soit la libération de VE toxiques par les hépatocytes induite par les HAP, 2) soit l'action de ces VE toxiques sur les hépatocytes, et pourrait être envisagée comme stratégie thérapeutique de maladies du foie associées aux HAP.

BIBLIOGRAPHIE

- Abbas, M., Jesel, L., Auger, C., Amoura, L., Messas, N., Manin, G., Rumig, C., León-González, A.J., Ribeiro, T.P., Silva, G.C., et al. (2017). Endothelial Microparticles from Acute Coronary Syndrome Patients Induce Premature Coronary Artery Endothelial Cell Aging and Thrombogenicity: Role of the Ang II/AT1 Receptor/NADPH Oxidase-Mediated Activation of Mapks and PI3-Kinase Pathways. *Circulation* *135*, 280–296.
- Abbate, V., Marcantoni, M., Giuliani, F., Vecchio, F., Gatto, I., Mele, C., Saviano, A., Arciuolo, D., Gaetani, E., Ferrari, M., et al. (2017). HepPar1-Positive Circulating Microparticles Are Increased in Subjects with Hepatocellular Carcinoma and Predict Early Recurrence after Liver Resection. *Int. J. Mol. Sci.* *18*, 1043.
- Abel, J., and Haarmann-Stemmann, T. (2010). An introduction to the molecular basics of aryl hydrocarbon receptor biology. *Biol. Chem.* *391*.
- Abid Hussein, M.N., Nieuwland, R., Hau, C.M., Evers, L.M., Meesters, E.W., and Sturk, A. (2005). Cell-derived microparticles contain caspase 3 in vitro and in vivo. *J. Thromb. Haemost.* *3*, 888–896.
- Abid Hussein, M.N., Böing, A.N., Sturk, A., Hau, C.M., and Nieuwland, R. (2007). Inhibition of microparticle release triggers endothelial cell apoptosis and detachment. *Thromb. Haemost.* *98*, 1096–1107.
- Abrahams, V.M., Straszewski, S.L., Kamsteeg, M., Hanczaruk, B., Schwartz, P.E., Rutherford, T.J., and Mor, G. (2003). Epithelial ovarian cancer cells secrete functional Fas ligand. *Cancer Res.* *63*, 5573–5581.
- Abramowicz, A., Wojakowska, A., Marczak, L., Lysek-Gladysinska, M., Smolarz, M., Story, M.D., Polanska, J., Widlak, P., and Pietrowska, M. (2019). Ionizing radiation affects the composition of the proteome of extracellular vesicles released by head-and-neck cancer cells in vitro. *J. Radiat. Res. (Tokyo)* *60*, 289–297.
- 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.
- Agouni, A., Ducluzeau, P.-H., Benameur, T., Faure, S., Sladkova, M., Duluc, L., Leftheriotis, G., Pechanova, O., Delibegovic, M., Martinez, M.C., et al. (2011). Microparticles from Patients with Metabolic Syndrome Induce Vascular Hypo-Reactivity via Fas/Fas-Ligand Pathway in Mice. *PLoS ONE* *6*, e27809.
- Ainola, M., Porola, P., Takakubo, Y., Przybyla, B., Kouri, V.P., Tolvanen, T.A., Hänninen, A., and Nordström, D.C. (2018). Activation of plasmacytoid dendritic cells by apoptotic particles - mechanism for the loss of immunological tolerance in Sjögren's syndrome: Dendritic cell activation by cell apoptosis. *Clin. Exp. Immunol.* *191*, 301–310.
- Al-Anati, L., Kadekar, S., Högberg, J., and Stenius, U. (2014). PCB153, TCDD and estradiol compromise the benzo[a]pyrene-induced p53-response via FoxO3a. *Chem. Biol. Interact.* *219*, 159–167.
- Al-Daghri, N.M., Alokail, M.S., Abd-Alrahman, S.H., and Draz, H.M. (2014). Polycyclic aromatic hydrocarbon distribution in serum of Saudi children using HPLC-FLD: marker elevations in children with asthma. *Environ. Sci. Pollut. Res.* *21*, 12085–12090.
- Allan, L.L., Mann, K.K., Matulka, R.A., Ryu, H.-Y., Schlezinger, J.J., and Sherr, D.H. (2003). Bone Marrow Stromal-B Cell Interactions in Polycyclic Aromatic Hydrocarbon-Induced Pro/Pre-B Cell Apoptosis. *Toxicol. Sci.* *76*, 357–365.
- Alonso, R., Rodríguez, M.C., Pindado, J., Merino, E., Mérida, I., and Izquierdo, M. (2005). Diacylglycerol Kinase α Regulates the Secretion of Lethal Exosomes Bearing Fas Ligand during Activation-induced Cell Death of T Lymphocytes. *J. Biol. Chem.* *280*, 28439–28450.
- Alvarez-Erviti, L., Seow, Y., Schapira, A.H., Gardiner, C., Sargent, I.L., Wood, M.J.A., and Cooper, J.M. (2011). Lysosomal dysfunction increases exosome-mediated alpha-synuclein release and transmission. *Neurobiol. Dis.* *42*, 360–367.

- Alvarez-Jiménez, V.D., Leyva-Paredes, K., García-Martínez, M., Vázquez-Flores, L., García-Paredes, V.G., Campillo-Navarro, M., Romo-Cruz, I., Rosales-García, V.H., Castañeda-Casimiro, J., González-Pozos, S., et al. (2018). Extracellular Vesicles Released from Mycobacterium tuberculosis-Infected Neutrophils Promote Macrophage Autophagy and Decrease Intracellular Mycobacterial Survival. *Front. Immunol.* *9*, 272.
- Alvi, F., Idkowiak-Baldys, J., Baldys, A., Raymond, J.R., and Hannun, Y.A. (2007). Regulation of membrane trafficking and endocytosis by protein kinase C: emerging role of the pericentration, a novel protein kinase C-dependent subset of recycling endosomes. *Cell. Mol. Life Sci. CMLS* *64*, 263–270.
- Amzallag, N., Passer, B.J., Allanic, D., Segura, E., Théry, C., Goud, B., Amson, R., and Telerman, A. (2004). TSAP6 Facilitates the Secretion of Translationally Controlled Tumor Protein/Histamine-releasing Factor via a Nonclassical Pathway. *J. Biol. Chem.* *279*, 46104–46112.
- Andreola, G., Rivoltini, L., Castelli, C., Huber, V., Perego, P., Deho, P., Squarcina, P., Accornero, P., Lozupone, F., Lugini, L., et al. (2002). Induction of Lymphocyte Apoptosis by Tumor Cell Secretion of FasL-bearing Microvesicles. *J. Exp. Med.* *195*, 1303–1316.
- Andres, J., Smith, L.C., Murray, A., Jin, Y., Businaro, R., Laskin, J.D., and Laskin, D.L. (2020). Role of extracellular vesicles in cell-cell communication and inflammation following exposure to pulmonary toxicants. *Cytokine Growth Factor Rev.* *51*, 12–18.
- Andreu, Z., and Yáñez-Mó, M. (2014). Tetraspanins in Extracellular Vesicle Formation and Function. *Front. Immunol.* *5*, 442.
- Andryšik, Z., Vondráček, J., Marvanová, S., Cigánek, M., Neča, J., Pěňčíková, K., Mahadevan, B., Topinka, J., Baird, W.M., Kozubík, A., et al. (2011). Activation of the aryl hydrocarbon receptor is the major toxic mode of action of an organic extract of a reference urban dust particulate matter mixture: The role of polycyclic aromatic hydrocarbons. *Mutat. Res. Mol. Mech. Mutagen.* *714*, 53–62.
- ANSES (2003). L'Anses pointe les risques cancérigènes des travailleurs exposés au bitume (Actu-environnement).
- Araujo, C. de S., Brito, L.D., Tarifa, M.O., Silva, N.J.F. da, Rodrigues, K.S., Cavalcante, D.G.S.M., Gomes, A.S., Zocoler, M.A., Yoshihara, E., Camparoto, M.L., et al. (2019). Protective effects of bark ethanolic extract from *Spondias dulcis* Forst F. against DNA damage induced by benzo[a]pyrene and cyclophosphamide. *Genet. Mol. Biol.* *42*, 643–654.
- Arbelaiz, A., Azkargorta, M., Krawczyk, M., Santos-Laso, A., Lapitz, A., Perugorria, M.J., Erice, O., Gonzalez, E., Jimenez-Agüero, R., Lacasta, A., et al. (2017). Serum extracellular vesicles contain protein biomarkers for primary sclerosing cholangitis and cholangiocarcinoma: Arbelaiz et al. *Hepatology* *66*, 1125–1143.
- Archibong, A.E., Inyang, F., Ramesh, A., Greenwood, M., Nayyar, T., Kopsombut, P., Hood, D.B., and Nyanda, A.M. (2002). Alteration of pregnancy related hormones and fetal survival in F-344 rats exposed by inhalation to benzo(a)pyrene. *Reprod. Toxicol.* *16*, 801–808.
- Arciello, M., Gori, M., Maggio, R., Barbaro, B., Tarocchi, M., Galli, A., and Balsano, C. (2013). Environmental Pollution: A Tangible Risk for NAFLD Pathogenesis. *Int. J. Mol. Sci.* *14*, 22052–22066.
- Arraud, N., Linares, R., Tan, S., Gounou, C., Pasquet, J.-M., Mornet, S., and Brisson, A.R. (2014). Extracellular vesicles from blood plasma: determination of their morphology, size, phenotype and concentration. *J. Thromb. Haemost.* *12*, 614–627.
- Attoub, S., Khan, G., Ahmed, W., and Philip, P.S. (2015). Epstein–Barr virus-infected cells release Fas ligand in exosomal fractions and induce apoptosis in recipient cells via the extrinsic pathway. *J. Gen. Virol.* *96*, 3646–3659.
- Augustine Daniel, Ayers Lisa V., Lima Eduardo, Newton Laura, Lewandowski Adam J., Davis Esther F., Ferry Berne, and Leeson Paul (2014). Dynamic Release and Clearance of Circulating Microparticles During Cardiac Stress. *Circ. Res.* *114*, 109–113.

- Ayers, L., Nieuwland, R., Kohler, M., Kraenkel, N., Ferry, B., and Leeson, P. (2015). Dynamic microvesicle release and clearance within the cardiovascular system: triggers and mechanisms. *Clin. Sci.* *129*, 915–931.
- Azzalini, L., Ferrer, E., Ramalho, L.N., Moreno, M., Domínguez, M., Colmenero, J., Peinado, V.I., Barberà, J.A., Arroyo, V., Ginès, P., et al. (2010). Cigarette smoking exacerbates nonalcoholic fatty liver disease in obese rats. *Hepatology* *51*, 1567–1576.
- Babuta, M., Furi, I., Bala, S., Bukong, T.N., Lowe, P., Catalano, D., Calenda, C., Kodys, K., and Szabo, G. (2019). Dysregulated Autophagy and Lysosome Function Are Linked to Exosome Production by Micro-RNA 155 in Alcoholic Liver Disease. *Hepatology*.
- Badrnya, S., Baumgartner, R., and Assinger, A. (2014). Smoking alters circulating plasma microvesicle pattern and microRNA signatures. *Thromb. Haemost.* *112*, 128–136.
- Bailey, S.M., Mantena, S.K., Millender-Swain, T., Cakir, Y., Jhala, N.C., Chhieng, D., Pinkerton, K.E., and Ballinger, S.W. (2009). Ethanol and tobacco smoke increase hepatic steatosis and hypoxia in the hypercholesterolemic apoE^{-/-} mouse: Implications for a “multihit” hypothesis of fatty liver disease. *Free Radic. Biol. Med.* *46*, 928–938.
- Baixaui, F., LÃ³pez-OtÃ¡n, C., and Mittelbrunn, M. (2014). Exosomes and Autophagy: Coordinated Mechanisms for the Maintenance of Cellular Fitness. *Front. Immunol.* *5*.
- Bala, S., Petrasek, J., Mundkur, S., Catalano, D., Levin, I., Ward, J., Alao, H., Kodys, K., and Szabo, G. (2012). Circulating microRNAs in exosomes indicate hepatocyte injury and inflammation in alcoholic, drug-induced and inflammatory liver diseases. *Hepatology*. *Baltimore, Md* *56*, 1946–1957.
- Barhoumi, R. (2000). Analysis of Benzo[a]pyrene Partitioning and Cellular Homeostasis in a Rat Liver Cell Line. *Toxicol. Sci.* *53*, 264–270.
- Barouki, R., Aggerbeck, M., Aggerbeck, L., and Coumoul, X. (2012). The aryl hydrocarbon receptor system. *Drug Metabol. Drug Interact.* *27*.
- Baxter, A.A., Phan, T.K., Hanssen, E., Liem, M., Hulett, M.D., Mathivanan, S., and Poon, I.K.H. (2019). Analysis of extracellular vesicles generated from monocytes under conditions of lytic cell death. *Sci. Rep.* *9*, 7538.
- Beischlag, T.V., Morales, J.L., 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.
- Bellingham, S.A., Coleman, B.M., and Hill, A.F. (2012). Small RNA deep sequencing reveals a distinct miRNA signature released in exosomes from prion-infected neuronal cells. *Nucleic Acids Res.* *40*, 10937–10949.
- Beloribi, S., Ristorcelli, E., Breuzard, G., Silvy, F., Bertrand-Michel, J., Beraud, E., Verine, A., and Lombardo, D. (2012). Exosomal Lipids Impact Notch Signaling and Induce Death of Human Pancreatic Tumoral SOJ-6 Cells. *PLoS ONE* *7*, e47480.
- Benedikter, B.J., Volgers, C., van Eijck, P.H., Wouters, E.F.M., Savelkoul, P.H.M., Reynaert, N.L., Haenen, G.R.M.M., Rohde, G.G.U., Weseler, A.R., and Stassen, F.R.M. (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., Weseler, A.R., Wouters, E.F.M., Savelkoul, P.H.M., Rohde, G.G.U., and Stassen, F.R.M. (2018). Redox-dependent thiol modifications: implications for the release of extracellular vesicles. *Cell. Mol. Life Sci.* *75*, 2321–2337.
- Benedikter, B.J., Bouwman, F.G., Heinzmann, A.C.A., Vajen, T., Mariman, E.C., Wouters, E.F.M., Savelkoul, P.H.M., Koenen, R.R., Rohde, G.G.U., van Oerle, R., et al. (2019). Proteomic analysis reveals procoagulant properties of cigarette smoke-induced extracellular vesicles. *J. Extracell. Vesicles* *8*, 1585163.

- Biagini, C., Bender, V., Borde, F., Boissel, E., Bonnet, M.-C., Masson, M.-T., Cassio, D., and Chevalier, S. (2006). Cytochrome P450 expression—induction profile and chemically mediated alterations of the WIF-B9 cell line. *Biol. Cell* *98*, 23–32.
- Biasutto, L., Chiechi, A., Couch, R., Liotta, L.A., and Espina, V. (2013). Retinal pigment epithelium (RPE) exosomes contain signaling phosphoproteins affected by oxidative stress. *Exp. Cell Res.* *319*, 2113–2123.
- Bissig, C., and Gruenberg, J. (2014). ALIX and the multivesicular endosome: ALIX in Wonderland. *Trends Cell Biol.* *24*, 19–25.
- Blaha, L. (2002). Inhibition of Gap-Junctional Intercellular Communication by Environmentally Occurring Polycyclic Aromatic Hydrocarbons. *Toxicol. Sci.* *65*, 43–51.
- Bock, K.W., and Köhle, C. (2009). The mammalian aryl hydrocarbon (Ah) receptor: from mediator of dioxin toxicity toward physiological functions in skin and liver. *Biol. Chem.* *390*.
- Böing, A.N., van der Pol, E., Grootemaat, A.E., Coumans, F.A.W., Sturk, A., and Nieuwland, R. (2014). Single-step isolation of extracellular vesicles by size-exclusion chromatography. *J. Extracell. Vesicles* *3*, 23430.
- Bojes, H.K., and Pope, P.G. (2007). Characterization of EPA's 16 priority pollutant polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in tank bottom solids and associated contaminated soils at oil exploration and production sites in Texas. *Regul. Toxicol. Pharmacol.* *47*, 288–295.
- Bolisetty, S., and Jaimes, E. (2013). Mitochondria and Reactive Oxygen Species: Physiology and Pathophysiology. *Int. J. Mol. Sci.* *14*, 6306–6344.
- Bollati, V., Angelici, L., Rizzo, G., Pergoli, L., Rota, F., Hoxha, M., Nordio, F., Bonzini, M., Tarantini, L., Cantone, L., et al. (2015). Microvesicle-associated microRNA expression is altered upon particulate matter exposure in healthy workers and in A549 cells: Particulate matter exposure and microvesicles. *J. Appl. Toxicol.* *35*, 59–67.
- Bolotina, N.A., Sharovskaya, Yu.Yu., and Kobliakov, V.A. (2009). Ah receptor-independent inhibition of gap junction intercellular communications in hepatoma 27 cell culture by polycyclic aromatic hydrocarbons. *Cell Tissue Biol.* *3*, 243–248.
- Bonner, C., Bacon, S., Concannon, C.G., Rizvi, S.R., Baquié, M., Farrelly, A.M., Kilbride, S.M., Dussmann, H., Ward, M.W., Boulanger, C.M., et al. (2010). INS-1 cells undergoing caspase-dependent apoptosis enhance the regenerative capacity of neighboring cells. *Diabetes* *59*, 2799–2808.
- Bonzini, M., Pergoli, L., Cantone, L., Hoxha, M., Spinazzè, A., Del Buono, L., Favero, C., Carugno, M., Angelici, L., Broggi, L., et al. (2017). Short-term particulate matter exposure induces extracellular vesicle release in overweight subjects. *Environ. Res.* *155*, 228–234.
- Borras, C., Mas-Bargues, C., Sanz-Ros, J., Román-Domínguez, A., Gimeno-Mallench, L., Inglés, M., Gambini, J., and Viña, J. (2019). Extracellular vesicles and redox modulation in aging. *Free Radic. Biol. Med.* S0891584919314169.
- Bouchier-Hayes, L. (2010). The role of caspase-2 in stress-induced apoptosis. *J. Cell. Mol. Med.* *14*, 1212–1224.
- Boura, E., Ivanov, V., Carlson, L.-A., Mizuuchi, K., and Hurley, J.H. (2012). Endosomal Sorting Complex Required for Transport (ESCRT) Complexes Induce Phase-separated Microdomains in Supported Lipid Bilayers. *J. Biol. Chem.* *287*, 28144–28151.
- Bourdrel, T., Bind, M.-A., Béjot, Y., Morel, O., and Argacha, J.-F. (2017). Cardiovascular effects of air pollution. *Arch. Cardiovasc. Dis.* *110*, 634–642.
- Bresgen, N., and Eckl, P. (2015). Oxidative Stress and the Homeodynamics of Iron Metabolism. *Biomolecules* *5*, 808–847.
- Brett, C.L., Donowitz, M., and Rao, R. (2005). Evolutionary origins of eukaryotic sodium/proton exchangers. *Am. J. Physiol.-Cell Physiol.* *288*, C223–C239.

- Brinchmann, B., Le Ferrec, E., Podechard, N., Lagadic-Gossman, D., Shoji, K., Penna, A., Kukowski, K., Kubátová, A., Holme, J., and Øvrevik, J. (2018a). 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., Le Ferrec, E., Bisson, W.H., Podechard, N., Huitfeldt, H.S., Gallais, I., Sergent, O., Holme, J.A., Lagadic-Gossman, D., and Øvrevik, J. (2018b). Evidence of selective activation of aryl hydrocarbon receptor nongenomic calcium signaling by pyrene. *Biochem. Pharmacol.* *158*, 1–12.
- Brinchmann, B.C., Le Ferrec, E., Podechard, N., Lagadic-Gossman, D., Holme, J.A., and Øvrevik, J. (2019). Organic chemicals from diesel exhaust particles affects intracellular calcium, inflammation and β -adrenoceptors in endothelial cells. *Toxicol. Lett.* *302*, 18–27.
- Brodsky, S.V., Facciuto, M.E., Heydt, D., Chen, J., Islam, H.K., Kajstura, M., and Aguero-Rosenfeld, M. (2008). Dynamics of Circulating Microparticles in Liver Transplant Patients. *8*.
- Brown, C.W., Amante, J.J., Chhoy, P., Elaimy, A.L., Liu, H., Zhu, L.J., Baer, C.E., Dixon, S.J., and Mercurio, A.M. (2019). Prominin2 Drives Ferroptosis Resistance by Stimulating Iron Export. *Dev. Cell* *51*, 575–586.e4.
- Brownlee, Z., Lynn, K.D., Thorpe, P.E., and Schroit, A.J. (2014). A novel “salting-out” procedure for the isolation of tumor-derived exosomes. *J. Immunol. Methods* *407*, 120–126.
- Bucher, S., Tête, A., Podechard, N., Lamin, M., Le Guillou, D., Chevanne, M., Coulouarn, C., Imran, M., Gallais, I., Fernier, M., et al. (2018). Co-exposure to benzo[a]pyrene and ethanol induces a pathological progression of liver steatosis in vitro and in vivo. *Sci. Rep.* *8*, 5963.
- Bukong, T.N., Momen-Heravi, F., Kodys, K., Bala, S., and Szabo, G. (2014). Exosomes from hepatitis C infected patients transmit HCV infection and contain replication competent viral RNA in complex with Ago2-miR122-HSP90. *PLoS Pathog* *10*.
- Burger, D., Kwart, D.G., Montezano, A.C., Read, N.C., Kennedy, C.R.J., Thompson, C.S., and Touyz, R.M. (2012). Microparticles Induce Cell Cycle Arrest Through Redox-Sensitive Processes in Endothelial Cells: Implications in Vascular Senescence. *J. Am. Heart Assoc.* *1*.
- Burger, D., Turner, M., Munkonda, M.N., and Touyz, R.M. (2016). Endothelial Microparticle-Derived Reactive Oxygen Species: Role in Endothelial Signaling and Vascular Function. *Oxid. Med. Cell. Longev.* *2016*, 1–10.
- Burgos, P., Klattenhoff C, de la Fuente E, Rigotti A, and González A (2004). Cholesterol depletion induces PKA-mediated basolateral-to-apical transcytosis of the scavenger receptor class B type I in MDCK cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *101*, 3845–3850.
- Cabrera-Poch, N., Sánchez-Ruiloba, L., Rodríguez-Martínez, M., and Iglesias, T. (2004). Lipid Raft Disruption Triggers Protein Kinase C and Src-dependent Protein Kinase D Activation and Kidins220 Phosphorylation in Neuronal Cells. *J. Biol. Chem.* *279*, 28592–28602.
- Cai, Y., Pan, L., and Miao, J. (2016). Molecular evidence for the existence of an aryl hydrocarbon receptor pathway in scallops *Chlamys farreri*. *Comp. Biochem. Physiol. B Biochem. Mol. Biol.* *196–197*, 74–84.
- Cai, Y., Xu, M.-J., Koritzinsky, E.H., Zhou, Z., Wang, W., Cao, H., Yuen, P.S.T., Ross, R.A., Star, R.A., Liangpunsakul, S., et al. (2017). Mitochondrial DNA-enriched microparticles promote acute-on-chronic alcoholic neutrophilia and hepatotoxicity. *JCI Insight* *2*.
- Cañas, J.A., Sastre, B., Mazzeo, C., Fernández-Nieto, M., Rodrigo-Muñoz, J.M., González-Guerra, A., Izquierdo, M., Barranco, P., Quirce, S., Sastre, J., et al. (2017). Exosomes from eosinophils autoregulate and promote eosinophil functions. *J. Leukoc. Biol.* *101*, 1191–1199.
- Carvalho, R.N., and Lettieri, T. (2011). Proteomic analysis of the marine diatom *Thalassiosira pseudonana* upon exposure to benzo(a)pyrene. *BMC Genomics* *12*, 159.
- Carver, K.A., and Yang, D. (2016). *N*-Acetylcysteine Amide Protects Against Oxidative Stress-Induced Microparticle Release From Human Retinal Pigment Epithelial Cells. *Investig. Ophthalmology Vis. Sci.* *57*, 360.

- Chapuy-Regaud, S., Dubois, M., Plisson-Chastang, C., Bonnefois, T., Lhomme, S., Bertrand-Michel, J., You, B., Simoneau, S., Gleizes, P.-E., Flan, B., et al. (2017). Characterization of the lipid envelope of exosome encapsulated HEV particles protected from the immune response. *Biochimie* 141, 70–79.
- Charles, G.D., Bartels, M.J., Zacharewski, T.R., Gollapudi, B.B., Freshour, N.L., and Carney, E.W. (2000). Activity of Benzo[a]pyrene and Its Hydroxylated Metabolites in an Estrogen Receptor- α Reporter Gene Assay.
- Charrier, A., Chen, R., Chen, L., Kemper, S., Hattori, T., Takigawa, M., and Brigstock, D.R. (2014). Exosomes mediate intercellular transfer of pro-fibrogenic connective tissue growth factor (CCN2) between hepatic stellate cells, the principal fibrotic cells in the liver. *Surgery* 156, 548–555.
- Charrin, S., Manié, S., Thiele, C., Billard, M., Gerlier, D., Boucheix, C., and Rubinstein, E. (2003). A physical and functional link between cholesterol and tetraspanins. *Eur. J. Immunol.* 33, 2479–2489.
- Chen, L., and Brigstock, D.R. (2016). Integrins and heparan sulfate proteoglycans on hepatic stellate cells (HSC) are novel receptors for HSC-derived exosomes. *FEBS Lett.* 590, 4263–4274.
- Chen, B., Zheng, L.-X., Pan, J.-S., and Wang, X.-J. (2006). [Elevation of some serum liver enzymes in coke oven workers and the possible relationship with exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons]. *Wei Sheng Yan Jiu* 35, 264–268.
- Chen, F.W., Li, C., and Ioannou, Y.A. (2010). Cyclodextrin Induces Calcium-Dependent Lysosomal Exocytosis. *PLoS ONE* 5.
- Chen, H., Kasagi, S., Chia, C., Zhang, D., Tu, E., Wu, R., Zanvit, P., Goldberg, N., Jin, W., and Chen, W. (2019). Extracellular Vesicles from Apoptotic Cells Promote TGF β Production in Macrophages and Suppress Experimental Colitis. *Sci. Rep.* 9, 5875.
- Chen, L., Charrier, A., Zhou, Y., Chen, R., Yu, B., Agarwal, K., Tsukamoto, H., Lee, L.J., Paulaitis, M.E., and Brigstock, D.R. (2014). Epigenetic regulation of connective tissue growth factor by MicroRNA-214 delivery in exosomes from mouse or human hepatic stellate cells: Chen et al. *Hepatology* 59, 1118–1129.
- Chen, L., Chen, R., Kemper, S., and Brigstock, D.R. (2017a). Pathways of production and delivery of hepatocyte exosomes. *J. Cell Commun. Signal.*
- Chen, L., Yang, W., Guo, Y., Chen, W., Zheng, P., Zeng, J., and Tong, W. (2017b). Exosomal lncRNA GAS5 regulates the apoptosis of macrophages and vascular endothelial cells in atherosclerosis. *PLOS ONE* 12, e0185406.
- Chen, L., Chen, R., Kemper, S., Cong, M., You, H., and Brigstock, D.R. (2018). Therapeutic effects of serum extracellular vesicles in liver fibrosis. *J. Extracell. Vesicles* 7, 1461505.
- Chen, S., Nguyen, N., Tamura, K., Karin, M., and Tukey, R.H. (2003a). The Role of the Ah Receptor and p38 in Benzo[*a*]pyrene-7,8-dihydrodiol and Benzo[*a*]pyrene-7,8-dihydrodiol-9,10-epoxide-induced Apoptosis. *J. Biol. Chem.* 278, 19526–19533.
- Chen, S.-Y., Wang, L.-Y., Lunn, R.M., Tsai, W.-Y., Lee, P.-H., Lee, C.-S., Ahsan, H., Zhang, Y.-J., Chen, C.-J., and Santella, R.M. (2002). Polycyclic aromatic hydrocarbon-DNA adducts in liver tissues of hepatocellular carcinoma patients and controls. *Int. J. Cancer* 99, 14–21.
- Chen, Y., Li, G., Liu, Y., Werth, V.P., Williams, K.J., and Liu, M.-L. (2016). Translocation of Endogenous Danger Signal HMGB1 from Nucleus to Membrane Microvesicles in Macrophages: Translocation of Nuclear Hmgb1 to Membrane Microvesicles. *J. Cell. Physiol.* 231, 2319–2326.
- Chen, Z., Liu, B., Boreham, J., Wu, Y., Chen, J., and Peto, R. (2003b). Smoking and liver cancer in China: Case-control comparison of 36,000 liver cancer deaths vs. 17,000 cirrhosis deaths. *Int. J. Cancer* 107, 106–112.
- Cheng, S., Zou, M., Liu, Q., Kuang, J., Shen, J., Pu, S., Chen, L., Li, H., Wu, T., Li, R., et al. (2017). Activation of Constitutive Androstane Receptor Prevents Cholesterol Gallstone Formation. *Am. J. Pathol.* 187, 808–818.

- Chettimada, S., Lorenz, D.R., Misra, V., Dillon, S.T., Reeves, R.K., Manickam, C., Morgello, S., Kirk, G.D., Mehta, S.H., and Gabuzda, D. (2018). Exosome markers associated with immune activation and oxidative stress in HIV patients on antiretroviral therapy. *Sci. Rep.* *8*, 7227.
- Chevallier, J., Chamoun, Z., Jiang, G., Prestwich, G., Sakai, N., Matile, S., Parton, R.G., and Gruenberg, J. (2008). Lysobisphosphatidic Acid Controls Endosomal Cholesterol Levels. *J. Biol. Chem.* *283*, 27871–27880.
- Chiba, M., Watanabe, N., Watanabe, M., Sakamoto, M., Sato, A., Fujisaki, M., Kubota, S., Monzen, S., Maruyama, A., Nanashima, N., et al. (2016). Exosomes derived from SW480 colorectal cancer cells promote cell migration in HepG2 hepatocellular cancer cells via the mitogen-activated protein kinase pathway. *Int. J. Oncol.* *48*, 305–312.
- Cho, Y.-E., Mezey, E., Hardwick, J.P., Salem, N., Clemens, D.L., and Song, B.-J. (2017a). Increased ethanol-inducible cytochrome P450-2E1 and cytochrome P450 isoforms in exosomes of alcohol-exposed rodents and patients with alcoholism through oxidative and endoplasmic reticulum stress. *Hepatol. Commun.* *1*, 675–690.
- Cho, Y.-E., Im, E.-J., Moon, P.-G., Mezey, E., Song, B.-J., and Baek, M.-C. (2017b). Increased liver-specific proteins in circulating extracellular vesicles as potential biomarkers for drug- and alcohol-induced liver injury. *PLOS ONE* *12*, e0172463.
- Cho, Y.-E., Kim, S.-H., Lee, B.-H., and Baek, M.-C. (2017c). Circulating Plasma and Exosomal microRNAs as Indicators of Drug-Induced Organ Injury in Rodent Models. *Biomol. Ther.* *25*, 367–373.
- Cho, Y.-E., Seo, W., Kim, D.-K., Moon, P.-G., Kim, S.-H., Lee, B.-H., Song, B.-J., and Baek, M.-C. (2018). Exogenous exosomes from mice with acetaminophen-induced liver injury promote toxicity in the recipient hepatocytes and mice. *Sci. Rep.* *8*.
- Chramostová, K., Vondráček, J., Šindlerová, L., Vojtěšek, B., Kozubík, A., and Machala, M. (2004). Polycyclic aromatic hydrocarbons modulate cell proliferation in rat hepatic epithelial stem-like WB-F344 cells. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* *196*, 136–148.
- Christianson, H.C., Svensson, K.J., Kuppevelt, T.H. van, Li, J.-P., and Belting, M. (2013). Cancer cell exosomes depend on cell-surface heparan sulfate proteoglycans for their internalization and functional activity. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *110*, 17380–17385.
- Chung, J., Kim, J., Kim, W., Lee, S., Kim, Y., Park, J., Hong, Y., Chun, Y., Park, Y., and Oh, S. (2007). Abundance of aryl hydrocarbon receptor potentiates benzo[a]pyrene-induced apoptosis in Hepa1c1c7 cells via CYP1A1 activation. *Toxicology* *235*, 62–72.
- CITEPA (2015). Inventaire des émissions de polluants atmosphériques et de gaz à effet de serre en France –Format Secten.
- CITEPA (2019). Inventaire des émissions de polluants atmosphériques et de gaz à effet de serre en France –Format Secten.
- Cocucci, E., and Meldolesi, J. (2015). Ectosomes and exosomes: shedding the confusion between extracellular vesicles. *Trends Cell Biol.* *25*, 364–372.
- Cohen, A.J., Brauer, M., Burnett, R., Anderson, H.R., Frostad, J., Estep, K., Balakrishnan, K., Brunekreef, B., Dandona, L., Dandona, R., et al. (2017). Estimates and 25-year trends of the global burden of disease attributable to ambient air pollution: an analysis of data from the Global Burden of Diseases Study 2015. *The Lancet* *389*, 1907–1918.
- Colao, A., Muscogiuri, G., and Piscitelli, P. (2016). Environment and Health: Not Only Cancer. *Int. J. Environ. Res. Public Health* *13*.
- Collin, A. (2013). Mort cellulaire induite par la co-exposition benzo[a]pyrène / éthanol dans les hépatocytes : rôle du remodelage membranaire. thesis. Rennes 1.
- Collin, A., Hardonnière, K., Chevanne, M., Vuillemin, J., Podechard, N., Burel, A., Dimanche-Boitrel, M.-T., Lagadic-Gossmann, D., and Sergent, O. (2014). Cooperative interaction of benzo[a]pyrene and ethanol

on plasma membrane remodeling is responsible for enhanced oxidative stress and cell death in primary rat hepatocytes. *Free Radic. Biol. Med.* 72, 11–22.

- Colombo, G., Clerici, M., Giustarini, D., Portinaro, N.M., Aldini, G., Rossi, R., Milzani, A., and Dalle-Donne, I. (2014a). Pathophysiology of Tobacco Smoke Exposure: Recent Insights from Comparative and Redox Proteomics: Proteomics of Smoke-Related Protein Oxidation. *Mass Spectrom. Rev.* 33, 183–218.
- Colombo, M., Raposo, G., and Théry, C. (2014b). 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., Rodriguez-Suarez, E., Embade, N., Gil, D., Matthiesen, R., Valle, M., Elortza, F., Lu, S.C., Mato, J.M., and Falcon-Perez, J.M. (2008). Characterization and comprehensive proteome profiling of exosomes secreted by hepatocytes. *J. Proteome Res.* 7, 5157–5166.
- 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.
- Cordazzo, C., Petrini, S., Neri, T., Lombardi, S., Carmazzi, Y., Pedrinelli, R., Paggiaro, P., and Celi, A. (2014). Rapid shedding of proinflammatory microparticles by human mononuclear cells exposed to cigarette smoke is dependent on Ca²⁺ mobilization. *Inflamm. Res.* 63, 539–547.
- Coumans, F.A.W., Brisson, A.R., Buzas, E.I., Dignat-George, F., Drees, E.E.E., El-Andaloussi, S., Emanuelli, C., Gasecka, A., Hendrix, A., Hill, A.F., et al. (2017). Methodological Guidelines to Study Extracellular Vesicles. *Circ. Res.* 120, 1632–1648.
- Cvjetkovic, A., Lötvall, J., and Lässer, C. (2014). The influence of rotor type and centrifugation time on the yield and purity of extracellular vesicles. *J. Extracell. Vesicles* 3, 23111.
- Dachary-Prigent, J., Freyssinet, J.-M., Pasquet, J.-M., and Carron, J.-C. (2013). Annexin V as a Probe of Aminophospholipid Exposure and Platelet Membrane Vesiculation: A Flow Cytometry Study Showing a Role for Free Sulfhydryl Groups. 13.
- D'Agostino, S., Salamone, M., Di Liegro, I., and Vittorelli, M.L. (2006). Membrane vesicles shed by oligodendroglioma cells induce neuronal apoptosis. *Int. J. Oncol.* 29, 1075–1085.
- Dai, X., Chen, C., Xue, J., Xiao, T., Mostofa, G., Wang, D., Chen, X., Xu, H., Sun, Q., Li, J., et al. (2019). Exosomal MALAT1 derived from hepatic cells is involved in the activation of hepatic stellate cells via miRNA-26b in fibrosis induced by arsenite. *Toxicol. Lett.* 316, 73–84.
- 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 Craene, J.-O., Bertazzi, D., Bär, S., and Friant, S. (2017). Phosphoinositides, Major Actors in Membrane Trafficking and Lipid Signaling Pathways. *Int. J. Mol. Sci.* 18, 634.
- Debiane, D., Calonne, M., Fontaine, J., Laruelle, F., Grandmougin-Ferjani, A., and Lounes-Hadj Sahraoui, A. (2011). Lipid content disturbance in the arbuscular mycorrhizal, *Glomus irregulare* grown in monoxenic conditions under PAHs pollution. *Fungal Biol.* 115, 782–792.
- Deierlein, A.L., Rock, S., and Park, S. (2017). Persistent Endocrine-Disrupting Chemicals and Fatty Liver Disease. *Curr. Environ. Health Rep.* 4, 439–449.
- Dendelé, B., Tekpli, X., Sergent, O., Dimanche-Boitrel, M.-T., Holme, J.A., Huc, L., and Lagadic-Gossmann, D. (2012). Identification of the couple GSK3 α /c-Myc as a new regulator of hexokinase II in benzo[a]pyrene-induced apoptosis. *Toxicol. In Vitro* 26, 94–101.
- Deng, C., Dang, F., Gao, J., Zhao, H., Qi, S., and Gao, M. (2018). Acute benzo[a]pyrene treatment causes different antioxidant response and DNA damage in liver, lung, brain, stomach and kidney. *Heliyon* 4, e00898.

- Deng, Z., Liu, Y., Liu, C., Xiang, X., Wang, J., Cheng, Z., Shah, S.V., Zhang, S., Zhang, L., Zhuang, X., et al. (2009). Immature myeloid cells induced by a high-fat diet contribute to liver inflammation. *Hepatology* 50, 1412–1420.
- Desdín-Micó, G., and Mittelbrunn, M. (2016). Role of exosomes in the protection of cellular homeostasis. *Cell Adhes. Migr.* 11, 127–134.
- Devhare, P.B., Sasaki, R., Shrivastava, S., Di Bisceglie, A.M., Ray, R., and Ray, R.B. (2017). Exosome-Mediated Intercellular Communication between Hepatitis C Virus-Infected Hepatocytes and Hepatic Stellate Cells. *J. Virol.* 91, e02225-16.
- Di Liegro, I. (2011). Oligodendrogloma cells shed microvesicles which contain TRAIL as well as molecular chaperones and induce cell death in astrocytes. *Int. J. Oncol.*
- Dieker, J., Tel, J., Pieterse, E., Thielen, A., Rother, N., Bakker, M., Fransen, J., Dijkman, H.B.P.M., Berden, J.H., de Vries, J.M., et al. (2016). Circulating Apoptotic Microparticles in Systemic Lupus Erythematosus Patients Drive the Activation of Dendritic Cell Subsets and Prime Neutrophils for NETosis: Proinflammatory Effects of Circulating Microparticles in SLE. *Arthritis Rheumatol.* 68, 462–472.
- Diering, G.H., Numata, Y., Fan, S., Church, J., and Numata, M. (2013). Endosomal acidification by Na⁺/H⁺ exchanger NHE5 regulates TrkA cell-surface targeting and NGF-induced PI3K signaling. *Mol. Biol. Cell* 24, 3435–3448.
- Dieudé, M., Bell, C., Turgeon, J., Beillevaire, D., Pomerleau, L., Yang, B., Hamelin, K., Qi, S., Pallet, N., Béland, C., et al. (2015). The 20 S proteasome core, active within apoptotic exosome-like vesicles, induces autoantibody production and accelerates rejection. *Sci. Transl. Med.* 7, 318ra200-318ra200.
- DiGiacomo, S., Jazayeri, M.-A., Barua, R., and Ambrose, J. (2018). Environmental Tobacco Smoke and Cardiovascular Disease. *Int. J. Environ. Res. Public. Health* 16, 96.
- Dikic, I. (2004). ALIX-ing phospholipids with endosome biogenesis. *BioEssays* 26, 604–607.
- Ding, Y., Cao, F., Sun, H., Wang, Y., Liu, S., Wu, Y., Cui, Q., Mei, W., and Li, F. (2019). Exosomes derived from human umbilical cord mesenchymal stromal cells deliver exogenous miR-145-5p to inhibit pancreatic ductal adenocarcinoma progression. *Cancer Lett.* 442, 351–361.
- Distler, J.H.W., Huber, L.C., Hueber, A.J., Reich, C.F., Gay, S., Distler, O., and Pisetsky, D.S. (2005). The release of microparticles by apoptotic cells and their effects on macrophages. *Apoptosis* 10, 731–741.
- Distler, J.H.W., Akhmetshina, A., Dees, C., Jüngel, A., Stürzl, M., Gay, S., Pisetsky, D.S., Schett, G., and Distler, O. (2011). Induction of apoptosis in circulating angiogenic cells by microparticles. *Arthritis Rheum.* 63, 2067–2077.
- Downs, C.A., Dang, V.D., Johnson, N.M., Denslow, N.D., and Alli, A.A. (2018). Hydrogen Peroxide Stimulates Exosomal Cathepsin B Regulation of the Receptor for Advanced Glycation End-Products (RAGE): Exosomal cathepsin B regulate RAGE. *J. Cell. Biochem.* 119, 599–606.
- Doyle, L., and Wang, M. (2019). Overview of Extracellular Vesicles, Their Origin, Composition, Purpose, and Methods for Exosome Isolation and Analysis. *Cells* 8, 727.
- Dragovic, R.A., Gardiner, C., Brooks, A.S., Tannetta, D.S., Ferguson, D.J.P., Hole, P., Carr, B., Redman, C.W.G., Harris, A.L., Dobson, P.J., et al. (2011). Sizing and phenotyping of cellular vesicles using Nanoparticle Tracking Analysis. *Nanomedicine Nanotechnol. Biol. Med.* 7, 780–788.
- Duan, L., Ramachandran, A., Akakpo, J.Y., Weemhoff, J.L., Curry, S.C., and Jaeschke, H. (2019). Role of extracellular vesicles in release of protein adducts after acetaminophen-induced liver injury in mice and humans. *Toxicol. Lett.* 301, 125–132.
- Durcin, M., Fleury, A., Taillebois, E., Hilairet, G., Krupova, Z., Henry, C., Truchet, S., Trötz Müller, M., Köfeler, H., Mabileau, G., et al. (2017). Characterisation of adipocyte-derived extracellular vesicle subtypes identifies distinct protein and lipid signatures for large and small extracellular vesicles. *J. Extracell. Vesicles* 6, 1305677.

- Dutta, S., Warshall, C., Bandyopadhyay, C., Dutta, D., and Chandran, B. (2014). Interactions between Exosomes from Breast Cancer Cells and Primary Mammary Epithelial Cells Leads to Generation of Reactive Oxygen Species Which Induce DNA Damage Response, Stabilization of p53 and Autophagy in Epithelial Cells. *PLoS ONE* 9, e97580.
- Dutta, S., Reamtong, O., Panvongsa, W., Kitdumrongthum, S., Janpipatkul, K., Sangvanich, P., Piyachaturawat, P., and Chairoungdua, A. (2015). Proteomics profiling of cholangiocarcinoma exosomes: A potential role of oncogenic protein transferring in cancer progression. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Mol. Basis Dis.* 1852, 1989–1999.
- Ebert, B., Seidel, A., and Lampen, A. (2005). Identification of BCRP as transporter of benzo[*a*]pyrene conjugates metabolically formed in Caco-2 cells and its induction by Ah-receptor agonists. *Carcinogenesis* 26, 1754–1763.
- Edgar, J.R., Manna, P.T., Nishimura, S., Banting, G., and Robinson, M.S. (2016). Tetherin is an exosomal tether. *ELife* 5, e17180.
- EFSA (2008). Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in Food - Scientific Opinion of the Panel on Contaminants in the Food Chain. *EFSA J.* 6, 724.
- Eguchi, A., Mulya, A., Lazic, M., Radhakrishnan, D., Berk, M.P., Povero, D., Gornicka, A., and Feldstein, A.E. (2015). Microparticles Release by Adipocytes Act as “Find-Me” Signals to Promote Macrophage Migration. *PLOS ONE* 10, e0123110.
- Eguchi, A., Lazaro, R.G., Wang, J., Kim, J., Povero, D., Williams, B., Ho, S.B., Stärkel, P., Schnabl, B., Ohno-Machado, L., et al. (2017). Extracellular vesicles released by hepatocytes from gastric infusion model of alcoholic liver disease contain a MicroRNA barcode that can be detected in blood. *Hepatology* 65, 475–490.
- Eitan, E., Suire, C., Zhang, S., and Mattson, M.P. (2016). Impact of lysosome status on extracellular vesicle content and release. *Ageing Res. Rev.* 32, 65–74.
- Elmore, S. (2007). Apoptosis: a review of programmed cell death. *Toxicol. Pathol.* 35, 495–516.
- El-Zayadi, A.-R. (2006). Heavy smoking and liver. *World J. Gastroenterol.* 12, 6098.
- Endo, K., Uno, S., Seki, T., Ariga, T., Kusumi, Y., Mitsumata, M., Yamada, S., and Makishima, M. (2008). Inhibition of aryl hydrocarbon receptor transactivation and DNA adduct formation by CYP1 isoform-selective metabolic deactivation of benzo[*a*]pyrene. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 230, 135–143.
- Engelmann, C., Splith, K., Krohn, S., Herber, A., Boehlig, A., Boehm, S., Pratschke, J., Berg, T., and Schmelzle, M. (2017). Absolute quantification of microparticles by flow cytometry in ascites of patients with decompensated cirrhosis: a cohort study. *J. Transl. Med.* 15, 188.
- Esser, C., and Rannug, A. (2015). The Aryl Hydrocarbon Receptor in Barrier Organ Physiology, Immunology, and Toxicology. *Pharmacol. Rev.* 67, 259–279.
- EV-TRACK Consortium, Van Deun, J., Mestdagh, P., Agostinis, P., Akay, Ö., Anand, S., Anckaert, J., Martinez, Z.A., Baetens, T., Beghein, E., et al. (2017). EV-TRACK: transparent reporting and centralizing knowledge in extracellular vesicle research. *Nat. Methods* 14, 228–232.
- Ewa, B., and Danuta, M.-Š. (2017). Polycyclic aromatic hydrocarbons and PAH-related DNA adducts. *J. Appl. Genet.* 58, 321–330.
- Exline, M.C., Justiniano, S., Hollyfield, J.L., Berhe, F., Besecker, B.Y., Das, S., Wewers, M.D., and Sarkar, A. (2014). Microvesicular Caspase-1 Mediates Lymphocyte Apoptosis in Sepsis. *PLoS ONE* 9, e90968.
- Factor, P., Akhmedov, A.T., McDonald, J.D., Qu, A., Wu, J., Jiang, H., Dasgupta, T., Panettieri, R.A., Perera, F., and Miller, R.L. (2011). Polycyclic Aromatic Hydrocarbons Impair Function of β_2 -Adrenergic Receptors in Airway Epithelial and Smooth Muscle Cells. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 45, 1045–1049.
- Fader, C.M., Sánchez, D., Furlán, M., and Colombo, M.I. (2008). Induction of Autophagy Promotes Fusion of Multivesicular Bodies with Autophagic Vacuoles in K562 Cells. *Traffic* 9, 230–250.

- Falasca, M. (2012). *Phosphoinositides and Disease* (Springer Science & Business Media).
- Fang, J., Zhang, Z., Shang, L., Luo, Y., Lin, Y., Yuan, Y., and Zhuang, S. (2018a). Hepatoma cell-secreted exosomal microRNA-103 increases vascular permeability and promotes metastasis by targeting junction proteins. *Hepatology* *68*, 1459–1475.
- Fang, T., Lv, H., Lv, G., Li, T., Wang, C., Han, Q., Yu, L., Su, B., Guo, L., Huang, S., et al. (2018b). Tumor-derived exosomal miR-1247-3p induces cancer-associated fibroblast activation to foster lung metastasis of liver cancer. *Nat. Commun.* *9*, 191.
- Farinacci, M., Weber, S., and Kaufmann, S.H.E. (2012). The recombinant tuberculosis vaccine rBCG ΔureC::hly+ induces apoptotic vesicles for improved priming of CD4+ and CD8+ T cells. *Vaccine* *30*, 7608–7614.
- Feller, D., Kun, J., Ruzsics, I., Rapp, J., Sarosi, V., Kvell, K., Helyes, Z., and Pongracz, J.E. (2018). Cigarette Smoke-Induced Pulmonary Inflammation Becomes Systemic by Circulating Extracellular Vesicles Containing Wnt5a and Inflammatory Cytokines. *Front. Immunol.* *9*.
- Fiordelisi, A., Piscitelli, P., Trimarco, B., Coscioni, E., Iaccarino, G., and Sorriento, D. (2017). The mechanisms of air pollution and particulate matter in cardiovascular diseases. *Heart Fail. Rev.* *22*, 337–347.
- Foulds, C.E., Treviño, L.S., York, B., and Walker, C.L. (2017). Endocrine-disrupting chemicals and fatty liver disease. *Nat. Rev. Endocrinol.* *13*, 445–457.
- Freeman, C.M., Quillin, R.C., Wilson, G.C., Nojima, H., Johnson, B.L., Sutton, J.M., Schuster, R.M., Blanchard, J., Edwards, M.J., Caldwell, C.C., et al. (2014). Characterization of Microparticles after Hepatic Ischemia-Reperfusion Injury. *PLoS ONE* *9*, e97945.
- French, K.C., Antonyak, M.A., and Cerione, R.A. (2017). Extracellular Vesicle Docking at the Cellular Port: Extracellular Vesicle Binding and Uptake. *Semin. Cell Dev. Biol.* *67*, 48–55.
- Fu, P.P., Von Tungeln, L.S., Chiu, L.-H., Zhan, D.-J., Deck, J., Bucci, T., and Wang, J.-C. (1998). Structure, tumorigenicity, microsomal metabolism, and DNA binding of 7-nitrodibenz [a, h] anthracene. *Chem. Res. Toxicol.* *11*, 937–945.
- Fu, Q., Zhang, Q., Lou, Y., Yang, J., Nie, G., Chen, Q., Chen, Y., Zhang, J., Wang, J., Wei, T., et al. (2018). Primary tumor-derived exosomes facilitate metastasis by regulating adhesion of circulating tumor cells via SMAD3 in liver cancer. *Oncogene* *37*, 6105–6118.
- Fujita, Y., Araya, J., Ito, S., Kobayashi, K., Kosaka, N., Yoshioka, Y., Kadota, T., Hara, H., Kuwano, K., and Ochiya, T. (2015). Suppression of autophagy by extracellular vesicles promotes myofibroblast differentiation in COPD pathogenesis. *J. Extracell. Vesicles* *4*, 28388.
- Furlan-Freguia, C., Marchese, P., Gruber, A., Ruggeri, Z.M., and Ruf, W. (2011). P2X7 receptor signaling contributes to tissue factor-dependent thrombosis in mice. *J. Clin. Invest.* *121*, 2932–2944.
- Gakidou, E., Afshin, A., Abajobir, A.A., Abate, K.H., Abbafati, C., Abbas, K.M., Abd-Allah, F., Abdulle, A.M., Abera, S.F., Aboyans, V., et al. (2017). Global, regional, and national comparative risk assessment of 84 behavioural, environmental and occupational, and metabolic risks or clusters of risks, 1990–2016: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2016. *The Lancet* *390*, 1345–1422.
- Galaris, D., and Pantopoulos, K. (2008). Oxidative Stress and Iron Homeostasis: Mechanistic and Health Aspects. *Crit. Rev. Clin. Lab. Sci.* *45*, 1–23.
- Gallala, H.D., and Sandhoff, K. (2011). Biological Function of the Cellular Lipid BMP—BMP as a Key Activator for Cholesterol Sorting and Membrane Digestion. *Neurochem. Res.* *36*, 1594–1600.
- Galluzzi, L., Vitale, I., Aaronson, S.A., Abrams, J.M., Adam, D., Agostinis, P., Alnemri, E.S., Altucci, L., Amelio, I., Andrews, D.W., et al. (2018). Molecular mechanisms of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2018. *Cell Death Differ.* *25*, 486–541.

- Gambim, M.H., Do Carmo, A.D.O., Marti, L., Veríssimo-Filho, S., Lopes, L.R., and Janiszewski, M. (2007). Platelet-derived exosomes induce endothelial cell apoptosis through peroxynitrite generation: experimental evidence for a novel mechanism of septic vascular dysfunction. *Crit. Care* 11, R107.
- Garcia-Martinez, I., Santoro, N., Chen, Y., Hoque, R., Ouyang, X., Caprio, S., Shlomchik, M.J., Coffman, R.L., Candia, A., and Mehal, W.Z. (2016). Hepatocyte mitochondrial DNA drives nonalcoholic steatohepatitis by activation of TLR9. *J. Clin. Invest.* 126, 859–864.
- Gardiner, C., Ferreira, Y.J., Dragovic, R.A., Redman, C.W.G., and Sargent, I.L. (2013). Extracellular vesicle sizing and enumeration by nanoparticle tracking analysis. *J. Extracell. Vesicles* 2, 19671.
- Ge, X., Wang, Y., Nie, J., Li, Q., Tang, L., Deng, X., Wang, F., Xu, B., Wu, X., Zhang, X., et al. (2017). The diagnostic/prognostic potential and molecular functions of long non-coding RNAs in the exosomes derived from the bile of human cholangiocarcinoma. *Oncotarget* 8.
- Gelhaus, S.L., Gilad, O., Hwang, W.-T., Penning, T.M., and Blair, I.A. (2012). Multidrug Resistance Protein (MRP) 4 Attenuates Benzo[a]Pyrene-Mediated DNA-adduct Formation in Human Bronchoalveolar H358 Cells. *Toxicol. Lett.* 209, 58–66.
- Gercel-Taylor, C., O'Connor, S.M., Lam, G.K., and Taylor, D.D. (2002). Shed membrane fragment modulation of CD3-zeta during pregnancy: link with induction of apoptosis. *J. Reprod. Immunol.* 56, 29–44.
- Gerde, P., Muggenburg, B.A., Lundborg, M., and Dahl, A.R. (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.
- Gerth, K., Kodidela, S., Mahon, M., Haque, S., Verma, N., and Kumar, S. (2019). Circulating Extracellular Vesicles Containing Xenobiotic Metabolizing CYP Enzymes and Their Potential Roles in Extrahepatic Cells Via Cell–Cell Interactions. *Int. J. Mol. Sci.* 20, 6178.
- Gioia, M., Vindigni, G., Testa, B., Raniolo, S., Fasciglione, G.F., Coletta, M., and Biocca, S. (2015). Membrane Cholesterol Modulates LOX-1 Shedding in Endothelial Cells. *PLOS ONE* 10, e0141270.
- Goitre, L., Pergolizzi, B., Ferro, E., Trabalzini, L., and Retta, S.F. (2012). Molecular Crosstalk between Integrins and Cadherins: Do Reactive Oxygen Species Set the Talk? (Hindawi).
- Golstein, P., and Kroemer, G. (2007). Cell death by necrosis: towards a molecular definition. *Trends Biochem. Sci.* 32, 37–43.
- Gorria, M., Tekpli, X., Sergent, O., Huc, L., Gaboriau, F., Rissel, M., Chevanne, M., Dimanche-Boitrel, M.-T., and Lagadic-Gossmann, D. (2006a). Membrane Fluidity Changes Are Associated with Benzo[a]Pyrene-Induced Apoptosis in F258 Cells: Protection by Exogenous Cholesterol. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1090, 108–112.
- Gorria, M., Huc, L., Sergent, O., Rebillard, A., Gaboriau, F., Dimanche-Boitrel, M.-T., and Lagadic-Gossmann, D. (2006b). Protective effect of monosialoganglioside GM1 against chemically induced apoptosis through targeting of mitochondrial function and iron transport. *Biochem. Pharmacol.* 72, 1343–1353.
- Gorria, M., Tekpli, X., Rissel, M., Sergent, O., Huc, L., Landvik, N., Fardel, O., Dimanche-Boitrel, M.-T., Holme, J.A., and Lagadic-Gossmann, D. (2008). A new lactoferrin- and iron-dependent lysosomal death pathway is induced by benzo[a]pyrene in hepatic epithelial cells. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 228, 212–224.
- Gouédard, C., Barouki, R., and Morel, Y. (2004). Dietary Polyphenols Increase Paraoxonase 1 Gene Expression by an Aryl Hydrocarbon Receptor-Dependent Mechanism. *Mol. Cell. Biol.* 24, 5209–5222.
- Guay, C., Menoud, V., Rome, S., and Regazzi, R. (2015). Horizontal transfer of exosomal microRNAs transduce apoptotic signals between pancreatic beta-cells. *Cell Commun. Signal.* 13.
- Guay, C., Kruit, J.K., Rome, S., Menoud, V., Mulder, N.L., Jurdzinski, A., Mancarella, F., Sebastiani, G., Donda, A., Gonzalez, B.J., et al. (2018). Lymphocyte-Derived Exosomal MicroRNAs Promote Pancreatic β Cell Death and May Contribute to Type 1 Diabetes Development. *Cell Metab.*

- Gudbergsson, J.M., Johnsen, K.B., Skov, M.N., and Duroux, M. (2016). Systematic review of factors influencing extracellular vesicle yield from cell cultures. *Cytotechnology* 68, 579–592.
- Guicciardi, M.E., and Gores, G.J. (2005). Cholestatic hepatocellular injury: what do we know and how should we proceed. *J. Hepatol.* 42, 297–300.
- Guo, J., Wang, C., Guo, Z., and Zuo, Z. (2018). Exposure to environmental level phenanthrene induces a NASH-like phenotype in new born rat. *Environ. Pollut.* 239, 261–271.
- Guo, Q., Furuta, K., Lucien, F., Gutierrez Sanchez, L.H., Hirsova, P., Krishnan, A., Kabashima, A., Pavelko, K.D., Madden, B., Alhuwaish, H., et al. (2019). Integrin β 1-enriched extracellular vesicles mediate monocyte adhesion and promote liver inflammation in murine NASH. *J. Hepatol.* 71, 1193–1205.
- Gurunathan, S., Kang, M.-H., Jeyaraj, M., Qasim, M., and Kim, J.-H. (2019). Review of the Isolation, Characterization, Biological Function, and Multifarious Therapeutic Approaches of Exosomes. *Cells* 8, 307.
- Haga, H., Yan, I.K., Takahashi, K., Wood, J., Zubair, A., and Patel, T. (2015). Tumour cell-derived extracellular vesicles interact with mesenchymal stem cells to modulate the microenvironment and enhance cholangiocarcinoma growth. *J. Extracell. Vesicles* 4, 24900.
- Hakkola, J., Bernasconi, C., Coecke, S., Richert, L., Andersson, T.B., and Pelkonen, O. (2018). Cytochrome P450 Induction and Xeno-Sensing Receptors Pregnane X Receptor, Constitutive Androstane Receptor, Aryl Hydrocarbon Receptor and Peroxisome Proliferator-Activated Receptor α at the Crossroads of Toxicokinetics and Toxicodynamics. *Basic Clin. Pharmacol. Toxicol.* 123, 42–50.
- Haraszi, R.A., Didiot, M.-C., Sapp, E., Leszyk, J., Shaffer, S.A., Rockwell, H.E., Gao, F., Narain, N.R., DiFiglia, M., Kiebish, M.A., et al. (2016). High-resolution proteomic and lipidomic analysis of exosomes and microvesicles from different cell sources. *J. Extracell. Vesicles* 5, 32570.
- Hardij, J., Cecchet, F., Berquand, A., Gheldof, D., Chatelain, C., Mullier, F., Chatelain, B., and Dogné, J.-M. (2013). Characterisation of tissue factor-bearing extracellular vesicles with AFM: comparison of air-tapping-mode AFM and liquid Peak Force AFM. *J. Extracell. Vesicles* 2, 21045.
- 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.
- Hardy, M.-P., Audemard, É., Migneault, F., Feghaly, A., Brochu, S., Gendron, P., Boilard, É., Major, F., Dieudé, M., Hébert, M.-J., et al. (2019). Apoptotic endothelial cells release small extracellular vesicles loaded with immunostimulatory viral-like RNAs. *Sci. Rep.* 9, 7203.
- Harischandra, D.S., Lawana, V., Rhokad, D., Jin, H., Anantharam, V., Kanthasamy, A., and Kanthasamy, A. (2015). Lysosomal dysfunction caused by the environmental neurotoxicant manganese increases exosome-mediated cell-to-cell transfer of α -synuclein by a prion-like mechanism. *Neurotoxicol. Teratol.* 49, 109.
- Harischandra, D.S., Ghaisas, S., Rokad, D., Zamanian, M., Jin, H., Anantharam, V., Kimber, M., Kanthasamy, A., and Kanthasamy, A.G. (2018). Environmental neurotoxicant manganese regulates exosome-mediated extracellular miRNAs in cell culture model of Parkinson's disease: Relevance to α -synuclein misfolding in metal neurotoxicity. *NeuroToxicology* 64, 267–277.
- Harischandra, D.S., Rokad, D., Neal, M.L., Ghaisas, S., Manne, S., Sarkar, S., Panicker, N., Zenitsky, G., Jin, H., Lewis, M., et al. (2019). Manganese promotes the aggregation and prion-like cell-to-cell exosomal transmission of α -synuclein. *Sci. Signal.* 12, eaau4543.
- Hartjes, T., Mytnyk, S., Jenster, G., van Steijn, V., and van Royen, M. (2019). Extracellular Vesicle Quantification and Characterization: Common Methods and Emerging Approaches. *Bioengineering* 6, 7.
- He, M., Qin, H., Poon, T.C.W., Sze, S.-C., Ding, X., Co, N.N., Ngai, S.-M., Chan, T.-F., and Wong, N. (2015). Hepatocellular carcinoma-derived exosomes promote motility of immortalized hepatocyte through transfer of oncogenic proteins and RNAs. *Carcinogenesis* 36, 1008–1018.

- Heindel, J.J., Blumberg, B., Cave, M., Machtiger, R., Mantovani, A., Mendez, M.A., Nadal, A., Palanza, P., Panzica, G., Sargis, R., et al. (2017). Metabolism disrupting chemicals and metabolic disorders. *Reprod. Toxicol.* *68*, 3–33.
- Héliot, A., Landkocz, Y., Roy Saint-Georges, F., Gosset, P., Billet, S., Shirali, P., Courcot, D., and Martin, P.J. (2017). Smoker extracellular vesicles influence status of human bronchial epithelial cells. *Int. J. Hyg. Environ. Health* *220*, 445–454.
- Herrera, M.B., Fonsato, V., Gatti, S., Deregibus, M.C., Sordi, A., Cantarella, D., Calogero, R., Bussolati, B., Tetta, C., and Camussi, G. (2010). Human liver stem cell-derived microvesicles accelerate hepatic regeneration in hepatectomized rats. *J. Cell. Mol. Med.* *14*, 1605.
- Hervera, A., De Virgiliis, F., Palmisano, I., Zhou, L., Tantardini, E., Kong, G., Hutson, T., Danzi, M.C., Perry, R.B.-T., Santos, C.X.C., et al. (2018). Reactive oxygen species regulate axonal regeneration through the release of exosomal NADPH oxidase 2 complexes into injured axons. *Nat. Cell Biol.* *20*, 307–319.
- Hessel, S., John, A., Seidel, A., and Lampen, A. (2013). Multidrug resistance-associated proteins are involved in the transport of the glutathione conjugates of the ultimate carcinogen of benzo[a]pyrene in human Caco-2 cells. *Arch. Toxicol.* *87*, 269–280.
- Hessvik, N.P., and Llorente, A. (2018). Current knowledge on exosome biogenesis and release. *Cell. Mol. Life Sci.* *75*, 193–208.
- Hirsova, P., Ibrahim, S.H., Krishnan, A., Verma, V.K., Bronk, S.F., Werneburg, N.W., Charlton, M.R., Shah, V.H., Malhi, H., and Gores, G.J. (2016). Lipid-Induced Signaling Causes Release of Inflammatory Extracellular Vesicles From Hepatocytes. *Gastroenterology* *150*, 956–967.
- Holman, N.S., Mosedale, M., Wolf, K.K., LeCluyse, E.L., and Watkins, P.B. (2016). Subtoxic Alterations in Hepatocyte-Derived Exosomes: An Early Step in Drug-Induced Liver Injury? *Toxicol. Sci.* *151*, 365–375.
- Holman, N.S., Church, R.J., Nautiyal, M., Rose, K.A., Thacker, S.E., Otieno, M.A., Wolf, K.K., LeCluyse, E., Watkins, P.B., and Mosedale, M. (2019). Hepatocyte-Derived Exosomes Promote Liver Immune Tolerance: Possible Implications for Idiosyncratic Drug-Induced Liver Injury. *Toxicol. Sci.*
- Holme, J.A., Gorria, M., Arlt, V.M., Øvrebø, S., Solhaug, A., Tekpli, X., Landvik, N.E., Huc, L., Fardel, O., and Lagadic-Gossman, D. (2007). Different mechanisms involved in apoptosis following exposure to benzo[a]pyrene in F258 and Hepa1c1c7 cells. *Chem. Biol. Interact.* *167*, 41–55.
- Höög, J.L., and Lötval, J. (2015). Diversity of extracellular vesicles in human ejaculates revealed by cryo-electron microscopy. *J. Extracell. Vesicles* *4*, 28680.
- Hoshino, A., Costa-Silva, B., Shen, T.-L., Rodrigues, G., Hashimoto, A., Tesic Mark, M., Molina, H., Kohsaka, S., Di Giannatale, A., Ceder, S., et al. (2015). Tumour exosome integrins determine organotropic metastasis. *Nature* *527*, 329–335.
- Hrycay, E.G., and Bandiera, S.M. (2015). Involvement of Cytochrome P450 in Reactive Oxygen Species Formation and Cancer. In *Advances in Pharmacology*, (Elsevier), pp. 35–84.
- Hu, T., Pan, Z., Yu, Q., Mo, X., Song, N., Yan, M., Zouboulis, C.C., Xia, L., and Ju, Q. (2016). Benzo(a)pyrene induces interleukin (IL)-6 production and reduces lipid synthesis in human SZ95 sebocytes via the aryl hydrocarbon receptor signaling pathway. *Environ. Toxicol. Pharmacol.* *43*, 54–60.
- Huber, V., Fais, S., Iero, M., Lugini, L., Canese, P., Squarcina, P., Zaccheddu, A., Colone, M., Arancia, G., Gentile, M., et al. (2005). Human Colorectal Cancer Cells Induce T-Cell Death Through Release of Proapoptotic Microvesicles: Role in Immune Escape. *Gastroenterology* *128*, 1796–1804.
- Huc, L., Gilot, D., Gardyn, C., Rissel, M., Dimanche-Boitrel, M.-T., Guillouzo, A., Fardel, O., and Lagadic-Gossman, D. (2003). Apoptotic Mitochondrial Dysfunction Induced by Benzo(a)pyrene in Liver Epithelial Cells: Role of p53 and pH_i Changes. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* *1010*, 167–170.
- Huc, L., Sparfel, L., Rissel, M., Dimanche-Boitrel, M.-T., Guillouzo, A., Fardel, O., and Lagadic-Gossman, D. (2004). Identification of Na⁺/H⁺ exchange as a new target for toxic polycyclic aromatic hydrocarbons. *FASEB J.* *18*, 344–346.

- Huc, L., Rissel, M., Solhaug, A., Tekpli, X., Gorria, M., Torriglia, A., Holme, J.A., Dimanche-Boitrel, M.-T., and Lagadic-Gossmann, D. (2006). Multiple apoptotic pathways induced by p53-dependent acidification in benzo[a]pyrene-exposed hepatic F258 cells. *J. Cell. Physiol.* *208*, 527–537.
- Huc, L., Tekpli, X., Holme, J.A., Rissel, M., Solhaug, A., Gardyn, C., Le Moigne, G., Gorria, M., Dimanche-Boitrel, M.-T., and Lagadic-Gossmann, D. (2007). c-Jun NH2-Terminal Kinase-Related Na⁺/H⁺ Exchanger Isoform 1 Activation Controls Hexokinase II Expression in Benzo(a)Pyrene-Induced Apoptosis. *Cancer Res.* *67*, 1696–1705.
- Hurwitz, S.N., Conlon, M.M., Rider, M.A., Brownstein, N.C., and Meckes, D.G. (2016). Nanoparticle analysis sheds budding insights into genetic drivers of extracellular vesicle biogenesis. *J. Extracell. Vesicles* *5*, 31295.
- Hwang, J.J., Iyer, S.N., Li, L.-S., Claussen, R., Harrington, D.A., and Stupp, S.I. (2002). Self-assembling biomaterials: Liquid crystal phases of cholesteryl oligo(L-lactic acid) and their interactions with cells. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *99*, 9662–9667.
- IARC (2010). Some non-heterocyclic polycyclic aromatic hydrocarbons and some related occupational exposures (Lyon, France : Geneva: IARC Press ; Distributed by World Health Organization).
- Ibrahim, S.H., Hirsova, P., Tomita, K., Bronk, S.F., Werneburg, N.W., Harrison, S.A., Goodfellow, V.S., Malhi, H., and Gores, G.J. (2016). Mixed lineage kinase 3 mediates release of C-X-C motif ligand 10-bearing chemotactic extracellular vesicles from lipotoxic hepatocytes: Ibrahim et al. *Hepatology* *63*, 731–744.
- Ichim, G., and Tait, S.W. (2016). A fate worse than death: apoptosis as an oncogenic process. *Nat. Rev. Cancer* *16*, 539.
- Ichim, G., Lopez, J., Ahmed, S.U., Muthalagu, N., Giampazolias, E., Delgado, M.E., Haller, M., Riley, J.S., Mason, S.M., Athineos, D., et al. (2015). Limited Mitochondrial Permeabilization Causes DNA Damage and Genomic Instability in the Absence of Cell Death. *Mol. Cell* *57*, 860–872.
- Ikeda, M., and Longnecker, R. (2007). Cholesterol is critical for Epstein-Barr virus latent membrane protein 2A trafficking and protein stability. *Virology* *360*, 461–468.
- Imai, T., Takahashi, Y., Nishikawa, M., Kato, K., Morishita, M., Yamashita, T., Matsumoto, A., Charoenviriyakul, C., and Takakura, Y. (2015). Macrophage-dependent clearance of systemically administered B16BL6-derived exosomes from the blood circulation in mice. *J. Extracell. Vesicles* *4*, 26238.
- INERIS (2006a). Fiche de données toxicologiques et environnementales des substances chimiques - dibenzo[a,h]anthracène - INERIS –DRC-01-25590-01DR125.doc.
- INERIS (2006b). Fiche de données toxicologiques et environnementales des substances chimiques - pyrène - INERIS –DRC-02-25590-02DF51.doc.
- INERIS (2006c). Fiche de données toxicologiques et environnementales des substances chimiques - benzo[a]pyrène - INERIS –DRC-01-25590-00DF252.doc.
- IPCS (1998). Polycyclic aromatic hydrocarbons, selected non-heterocyclic. Environmental Health Criteria 202. International Programme on Chemical Safety, World Health Organization, Geneva.
- Irigaray, P., Ogier, V., Jacquenet, S., Notet, V., Sibille, P., Mejean, L., Bihain, B.E., and Yen, F.T. (2006). Benzo[a]pyrene impairs beta-adrenergic stimulation of adipose tissue lipolysis and causes weight gain in mice. A novel molecular mechanism of toxicity for a common food pollutant. *FEBS J.* *273*, 1362–1372.
- Janiszewski, M., do Carmo, A.O., Pedro, M.A., Silva, E., Knobel, E., and Laurindo, F.R.M. (2004). Platelet-derived exosomes of septic individuals possess proapoptotic NAD(P)H oxidase activity: A novel vascular redox pathway*. *Crit. Care Med.* *32*, 818–825.
- Jansen, F., Yang, X., Franklin, B.S., Hoelscher, M., Schmitz, T., Bedorf, J., Nickenig, G., and Werner, N. (2013). High glucose condition increases NADPH oxidase activity in endothelial microparticles that promote vascular inflammation. *Cardiovasc. Res.* *98*, 94–106.

- Ji, X., Li, Y., He, J., Shah, W., Xue, X., Feng, G., Zhang, H., and Gao, M. (2016). Depletion of mitochondrial enzyme system in liver, lung, brain, stomach and kidney induced by benzo(a)pyrene. *Environ. Toxicol. Pharmacol.* *43*, 83–93.
- Jiang, F., Chen, Q., Wang, W., Ling, Y., Yan, Y., and Xia, P. (2020). Hepatocyte-derived extracellular vesicles promote endothelial inflammation and atherogenesis via microRNA-1. *J. Hepatol.* *72*, 156–166.
- Jiang, Y., Zhou, X., Chen, X., Yang, G., Wang, Q., Rao, K., Xiong, W., and Yuan, J. (2011). Benzo(a)pyrene-induced mitochondrial dysfunction and cell death in p53-null Hep3B cells. *Mutat. Res. Toxicol. Environ. Mutagen.* *726*, 75–83.
- Jiao, C., Jiao, X., Zhu, A., Ge, J., and Xu, X. (2017). Exosomal miR-34s panel as potential novel diagnostic and prognostic biomarker in patients with hepatoblastoma. *J. Pediatr. Surg.* *52*, 618–624.
- Jin, Y., Miao, W., Lin, X., Wu, T., Shen, H., Chen, S., Li, Y., Pan, Q., and Fu, Z. (2014). Sub-chronically exposing mice to a polycyclic aromatic hydrocarbon increases lipid accumulation in their livers. *Environ. Toxicol. Pharmacol.* *38*, 353–363.
- Jodo, S., Xiao, S., Hohlbaum, A., Strehlow, D., Marshak-Rothstein, A., and Ju, S.-T. (2001). Apoptosis-Inducing Membrane Vesicles: A Novel Agent with Unique Properties. *J. Biol. Chem.* *276*, 39938–39944.
- Joshi, B.S., de Beer, M.A., Giepmans, B.N.G., and Zuhorn, I.S. (2020). Endocytosis of Extracellular Vesicles and Release of Their Cargo from Endosomes. *ACS Nano* *14*, 4444–4455.
- Juan, T., and Fürthauer, M. (2018). Biogenesis and function of ESCRT-dependent extracellular vesicles. *Semin. Cell Dev. Biol.* *74*, 66–77.
- Julich-Haertel, H., Urban, S.K., Krawczyk, M., Willms, A., Jankowski, K., Patkowski, W., Kruk, B., Krasnodębski, M., Ligocka, J., Schwab, R., et al. (2017). Cancer-associated circulating large extracellular vesicles in cholangiocarcinoma and hepatocellular carcinoma. *J. Hepatol.* *67*, 282–292.
- Julio C. Davila, and Dale L. Morris (1999). Analysis of Cytochrome P450 and Phase II Conjugating Enzyme Expression in Adult Male Rat Hepatocytes. *In Vitro Cell. Dev. Biol. Anim.* *35*, 120–130.
- Kakazu, E., Mauer, A.S., Yin, M., and Malhi, H. (2016). Hepatocytes release ceramide-enriched pro-inflammatory extracellular vesicles in an IRE1 α -dependent manner. *J. Lipid Res.* *57*, 233–245.
- Kakhlon, O., and Cabantchik, Z.I. Guest Editor: Mario Comporti. *10*.
- Kalra, H., Simpson, R.J., Ji, H., Aikawa, E., Altevogt, P., Askenase, P., Bond, V.C., Borràs, F.E., Breakefield, X., Budnik, V., et al. (2012). Vesiclepedia: A Compendium for Extracellular Vesicles with Continuous Community Annotation. *PLOS Biol.* *10*, e1001450.
- Kalra, H., Drummen, G., and Mathivanan, S. (2016). Focus on Extracellular Vesicles: Introducing the Next Small Big Thing. *Int. J. Mol. Sci.* *17*, 170.
- Kamiya, M., Toriba, A., Onoda, Y., Kizu, R., and Hayakawa, K. (2005). Evaluation of estrogenic activities of hydroxylated polycyclic aromatic hydrocarbons in cigarette smoke condensate. *Food Chem. Toxicol.* *43*, 1017–1027.
- Kapoor, N.R., Chadha, R., Kumar, S., Choedon, T., Reddy, V.S., and Kumar, V. (2017). The HBx gene of hepatitis B virus can influence hepatic microenvironment via exosomes by transferring its mRNA and protein. *Virus Res.* *240*, 166–174.
- Kastenhuber, E.R., and Lowe, S.W. (2017). Putting p53 in Context. *Cell* *170*, 1062–1078.
- Katsumi, T., Guicciardi, M.E., Azad, A., Bronk, S.F., Krishnan, A., and Gores, G.J. (2019). Activated cholangiocytes release macrophage-polarizing extracellular vesicles bearing the DAMP S100A11. *Am. J. Physiol.-Cell Physiol.* *317*, C788–C799.
- Kawano, Y., Nishiumi, S., Tanaka, S., Nobutani, K., Miki, A., Yano, Y., Seo, Y., Kutsumi, H., Ashida, H., Azuma, T., et al. (2010). Activation of the aryl hydrocarbon receptor induces hepatic steatosis via the upregulation of fatty acid transport. *Arch. Biochem. Biophys.* *504*, 221–227.

- Keerthikumar, S., Chisanga, D., Ariyaratne, D., Al Saffar, H., Anand, S., Zhao, K., Samuel, M., Pathan, M., Jois, M., Chilamkurti, N., et al. (2016). ExoCarta: A Web-Based Compendium of Exosomal Cargo. *J. Mol. Biol.* *428*, 688–692.
- Kim, K.B., and Lee, B.M. (1997). Oxidative stress to DNA, protein, and antioxidant enzymes (superoxide dismutase and catalase) in rats treated with benzo(a)pyrene. *Cancer Lett.* *113*, 205–212.
- Kim, J.W., Wieckowski, E., Taylor, D.D., Reichert, T.E., Watkins, S., and Whiteside, T.L. (2005a). Fas ligand-positive membranous vesicles isolated from sera of patients with oral cancer induce apoptosis of activated T lymphocytes. *Clin. Cancer Res.* *11*, 1010–1020.
- Kim, S.J., Ko, C.-B., Park, C., Kim, B.-R., Sung, T.-H., Koh, D.-H., Kim, N.-S., Oh, K.-J., Chung, S.-Y., and Park, R. (2005b). p38 MAP kinase regulates benzo(a)pyrene-induced apoptosis through the regulation of p53 activation. *Arch. Biochem. Biophys.* *444*, 121–129.
- Klaunig, J.E., Wang, Z., Pu, X., and Zhou, S. (2011). Oxidative stress and oxidative damage in chemical carcinogenesis. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* *254*, 86–99.
- Klibi, J., Niki, T., Riedel, A., Pioche-Durieu, C., Souquere, S., Rubinstein, E., Le Moulec, S., Guigay, J., Hirashima, M., and Guemira, F. (2009). Blood diffusion and Th1-suppressive effects of galectin-9-containing exosomes released by Epstein-Barr virus-infected nasopharyngeal carcinoma cells. *Blood* *113*, 1957–1966.
- Klinker, M.W., Lizzio, V., Reed, T.J., Fox, D.A., and Lundy, S.K. (2014). Human B Cell-Derived Lymphoblastoid Cell Lines Constitutively Produce Fas Ligand and Secrete MHCII+FasL+ Killer Exosomes. *Front. Immunol.* *5*.
- Ko, C.-B., Kim, S.-J., Park, C., Kim, B.-R., Shin, C.-H., Choi, S., Chung, S.-Y., Noh, J.-H., Jeun, J.-H., Kim, N.-S., et al. (2004). Benzo(a)pyrene-induced apoptotic death of mouse hepatoma Hepa1c1c7 cells via activation of intrinsic caspase cascade and mitochondrial dysfunction. *Toxicology* *199*, 35–46.
- Kobayashi, K., Hashimoto, M., Honkakoski, P., and Negishi, M. (2015). Regulation of gene expression by CAR: an update. *Arch. Toxicol.* *89*, 1045–1055.
- Kodidela, S., Ranjit, S., Sinha, N., McArthur, C., Kumar, A., and Kumar, S. (2018). Cytokine profiling of exosomes derived from the plasma of HIV-infected alcohol drinkers and cigarette smokers. *PLoS One* *13*, e0201144.
- Kogure, T., Lin, W.-L., Yan, I.K., Braconi, C., and Patel, T. (2011). Intercellular nanovesicle-mediated microRNA transfer: A mechanism of environmental modulation of hepatocellular cancer cell growth. *Hepatology* *54*, 1237–1248.
- Kogure, T., Yan, I.K., Lin, W.-L., and Patel, T. (2013). Extracellular Vesicle-Mediated Transfer of a Novel Long Noncoding RNA TUC339: A Mechanism of Intercellular Signaling in Human Hepatocellular Cancer. *Genes Cancer* *4*, 261–272.
- Koh, W.-P., Robien, K., Wang, R., Govindarajan, S., Yuan, J.-M., and Yu, M.C. (2011). Smoking as an independent risk factor for hepatocellular carcinoma: the Singapore Chinese Health Study. *Br. J. Cancer* *105*, 1430–1435.
- Konoshenko, M.Yu., Lekchnov, E.A., Vlassov, A.V., and Laktionov, P.P. (2018). Isolation of Extracellular Vesicles: General Methodologies and Latest Trends. *BioMed Res. Int.* *2018*, 1–27.
- Kornek, M., Popov, Y., Libermann, T.A., Afdhal, N.H., and Schuppan, D. (2011). Human T cell microparticles circulate in blood of hepatitis patients and induce fibrolytic activation of hepatic stellate cells. *Hepatology* *53*, 230–242.
- Kornek, M., Lynch, M., Mehta, S.H., Lai, M., Exley, M., Afdhal, N.H., and Schuppan, D. (2012). Circulating Microparticles as Disease-Specific Biomarkers of Severity of Inflammation in Patients With Hepatitis C or Nonalcoholic Steatohepatitis. *Gastroenterology* *143*, 448–458.
- Kostallari, E., Hirsova, P., Prasnicka, A., Verma, V.K., Yaqoob, U., Wongjarupong, N., Roberts, L.R., and Shah, V.H. (2018). Hepatic stellate cell-derived platelet-derived growth factor receptor-alpha-enriched extracellular vesicles promote liver fibrosis in mice through SHP2. *Hepatology* *68*, 333–348.

- Kouwaki, T., Fukushima, Y., Daito, T., Sanada, T., Yamamoto, N., Mifsud, E.J., Leong, C.R., Tsukiyama-Kohara, K., Kohara, M., Matsumoto, M., et al. (2016). Extracellular Vesicles Including Exosomes Regulate Innate Immune Responses to Hepatitis B Virus Infection. *Front. Immunol.* 7.
- Kowal, J., Tkach, M., and Théry, C. (2014). Biogenesis and secretion of exosomes. *Curr. Opin. Cell Biol.* 29, 116–125.
- Krauss, M., and Wilcke, W. (2001). Predicting Soil–Water Partitioning of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons and Polychlorinated Biphenyls by Desorption with Methanol–Water Mixtures at Different Temperatures. *Environ. Sci. Technol.* 35, 2319–2325.
- Kroese, E.D., Muller, J.J.A., Mohn, G.R., Dortant, P.M., and Wester, P.W. (2001). Tumorigenic effects in Wistar rats orally administered benzo[a]pyrene for two years (gavage studies): Implications for human cancer risks associated with oral exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons (Bilthoven, The Netherlands: National Institute for Public Health and the Environment (RIVM)).
- Kruszewski, M. (2003). Labile iron pool: the main determinant of cellular response to oxidative stress. *Mutat. Res. Mol. Mech. Mutagen.* 531, 81–92.
- 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.
- Kumagai, T., Suzuki, H., Sasaki, T., Sakaguchi, S., Miyairi, S., Yamazoe, Y., and Nagata, K. (2012). Polycyclic Aromatic Hydrocarbons Activate CYP3A4 Gene Transcription through Human Pregnane X Receptor. *Drug Metab. Pharmacokinet.* 27, 200–206.
- Kumar, M., Sharma, V.L., Sehgal, A., and Jain, M. (2012). Protective Effects of Green and White Tea Against Benzo(a)pyrene Induced Oxidative Stress and DNA Damage in Murine Model. *Nutr. Cancer* 64, 300–306.
- Kumar, M., Singh, G., Bhardwaj, P., Dhatwalia, S.K., and Dhawan, D.K. (2017a). Understanding the role of 3-O-Acetyl-11-keto- β -boswellic acid in conditions of oxidative-stress mediated hepatic dysfunction during benzo(a)pyrene induced toxicity. *Food Chem. Toxicol.* 109, 871–878.
- Kumar, S., Sinha, N., Gerth, K.A., Rahman, M.A., Yallapu, M.M., and Midde, N.M. (2017b). Specific packaging and circulation of cytochromes P450, especially 2E1 isozyme, in human plasma exosomes and their implications in cellular communications. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 491, 675–680.
- Kurt, O.K., Zhang, J., and Pinkerton, K.E. (2016). Pulmonary health effects of air pollution: *Curr. Opin. Pulm. Med.* 22, 138–143.
- Lai, C.P., Mardini, O., Ericsson, M., Prabhakar, S., Maguire, C., Chen, J.W., Tannous, B.A., and Breakefield, X.O. (2014). Dynamic Biodistribution of Extracellular Vesicles In Vivo Using a Multimodal Imaging Reporter. *ACS Nano* 8, 483–494.
- 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 Lötval, 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.
- Lavoie, E.J., Braley, J., Rice, J.E., and Rivenson, A. (1987). Tumorigenic activity of non-alternant polynuclear aromatic hydrocarbons in newborn mice. *Cancer Lett.* 34, 15–20.

- 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. (2019). PAHs increase the production of extracellular vesicles both in vitro in endothelial cells and in vivo in urines from rats. *Environ. Pollut.* *255*, 113171.
- Lee, C.-H., Ito, Y., Yanagiba, Y., Yamanoshita, O., Kim, H., Zhang, S.-Y., Kamijima, M., Gonzalez, F.J., and Nakajima, T. (2007). Pyrene-induced CYP1A2 and SULT1A1 may be regulated by CAR and not by AhR. *Toxicology* *238*, 147–156.
- Lee, Y.-S., Kim, S.Y., Ko, E., Lee, J.-H., Yi, H.-S., Yoo, Y.J., Je, J., Suh, S.J., Jung, Y.K., Kim, J.H., et al. (2017). Exosomes derived from palmitic acid-treated hepatocytes induce fibrotic activation of hepatic stellate cells. *Sci. Rep.* *7*.
- Lei, W., Yu, R., Mandlekar, S., and Kong, A.-N.T. Induction of Apoptosis and Activation of Interleukin 1/8-Converting Enzyme/Ced-3 Protease (Caspase-3) and c-Jun NH2-Terminal Kinase 1 by Benzo(a)pyrene. *6*.
- Lemoine, S., Cadoret, A., Rautou, P.-E., El Mourabit, H., Ratzu, V., Corpechot, C., Rey, C., Bosselut, N., Barbu, V., Wendum, D., et al. (2015). Portal myofibroblasts promote vascular remodeling underlying cirrhosis formation through the release of microparticles. *Hepatology* *61*, 1041–1055.
- Lenassi, M., Cagney, G., Liao, M., Vaupotič, T., Bartholomeeusen, K., Cheng, Y., Krogan, N.J., Plemenitaš, A., and Peterlin, B.M. (2010). HIV Nef is Secreted in Exosomes and Triggers Apoptosis in Bystander CD4+ T Cells. *Traffic* *11*, 110–122.
- Lespagnol, A., Duflaut, D., Beekman, C., Blanc, L., Fiucci, G., Marine, J.-C., Vidal, M., Amson, R., and Telerman, A. (2008). Exosome secretion, including the DNA damage-induced p53-dependent secretory pathway, is severely compromised in TSAP6/Steap3-null mice. *Cell Death Differ.* *15*, 1723.
- Li, C.-J., Liu, Y., Chen, Y., Yu, D., Williams, K.J., and Liu, M.-L. (2013). Novel proteolytic microvesicles released from human macrophages after exposure to tobacco smoke. *Am. J. Pathol.* *182*, 1552–1562.
- Li, L., Masica, D., Ishida, M., Tomuleasa, C., Umegaki, S., Kalloo, A.N., Georgiades, C., Singh, V.K., Khashab, M., Amateau, S., et al. (2014). Human bile contains MicroRNA-laden extracellular vesicles that can be used for cholangiocarcinoma diagnosis. *Hepatology* *60*, 896–907.
- Li, M., Yu, D., Williams, K.J., and Liu, M.-L. (2010). Tobacco Smoke Induces the Generation of Procoagulant Microvesicles From Human Monocytes/Macrophages. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* *30*, 1818–1824.
- Li, R., Wang, Y., Zhang, X., Feng, M., Ma, J., Li, J., Yang, X., Fang, F., Xia, Q., Zhang, Z., et al. (2019a). Exosome-mediated secretion of LOXL4 promotes hepatocellular carcinoma cell invasion and metastasis. *Mol. Cancer* *18*.
- Li, X., Lei, Y., Wu, M., and Li, N. (2018a). Regulation of Macrophage Activation and Polarization by HCC-Derived Exosomal lncRNA TUC339. *Int. J. Mol. Sci.* *19*, 2958.
- Li, X., Liu, R., Huang, Z., Gurley, E.C., Wang, X., Wang, J., He, H., Yang, H., Lai, G., Zhang, L., et al. (2018b). Cholangiocyte-derived exosomal long noncoding RNA H19 promotes cholestatic liver injury in mouse and humans. *Hepatology* *68*, 599–615.
- Li, X., Liu, R., Wang, Y., Zhu, W., Zhao, D., Wang, X., Yang, H., Gurley, E.C., Chen, W., Hylemon, P.B., et al. (2020). Cholangiocyte-Derived Exosomal lncRNA H19 Promotes Macrophage Activation and Hepatic Inflammation under Cholestatic Conditions. *Cells* *9*, 190.
- Li, Y., Xiang, G.-M., Liu, L.-L., Liu, C., Liu, F., Jiang, D.-N., and Pu, X.-Y. (2015). Assessment of endogenous reference gene suitability for serum exosomal microRNA expression analysis in liver carcinoma resection studies. *Mol. Med. Rep.* *12*, 4683–4691.
- Li, Y., Zhu, X., Zhang, M., Tong, H., and Su, L. (2019b). Heatstroke-induced hepatocyte exosomes promote liver injury by activating the NOD-like receptor signaling pathway in mice. *PeerJ* *7*, e8216.
- Liao, C.-Y., Song, M.J., Gao, Y., Mauer, A.S., Revzin, A., and Malhi, H. (2018). Hepatocyte-Derived Lipotoxic Extracellular Vesicle Sphingosine 1-Phosphate Induces Macrophage Chemotaxis. *Front. Immunol.* *9*.

- Liberali, P., Rämö, P., and Pelkmans, L. (2008). Protein Kinases: Starting a Molecular Systems View of Endocytosis. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* *24*, 501–523.
- Lim, J., Song, M.-K., Cho, Y., Kim, W., Han, S.O., and Ryu, J.-C. (2017). Comparative analysis of microRNA and mRNA expression profiles in cells and exosomes under toluene exposure. *Toxicol. In Vitro* *41*, 92–101.
- Lim, K.-M., Kim, S., Noh, J.-Y., Kim, K., Jang, W.-H., Bae, O.-N., Chung, S.-M., and Chung, J.-H. (2010). Low-Level Mercury Can Enhance Procoagulant Activity of Erythrocytes: A New Contributing Factor for Mercury-Related Thrombotic Disease. *Environ. Health Perspect.* *118*, 928–935.
- Lim, S.S., Vos, T., Flaxman, A.D., Danaei, G., Shibuya, K., Adair-Rohani, H., AlMazroa, M.A., Amann, M., Anderson, H.R., Andrews, K.G., et al. (2012). A comparative risk assessment of burden of disease and injury attributable to 67 risk factors and risk factor clusters in 21 regions, 1990–2010: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2010. *The Lancet* *380*, 2224–2260.
- Lin, T., and Yang, M.S. (2008). Benzo[a]pyrene-induced necrosis in the HepG2 cells via PARP-1 activation and NAD⁺ depletion. *Toxicology* *245*, 147–153.
- Lin, C.-Y., Chen, P.-C., Lo, S.-C., Tornng, P.-L., Sung, F.-C., and Su, T.-C. (2016). The association of carotid intima-media thickness with serum Level of perfluorinated chemicals and endothelium-platelet microparticles in adolescents and young adults. *Environ. Int.* *94*, 292–299.
- Lin, T., Mak, N.K., and Yang, M.S. (2008). MAPK regulate p53-dependent cell death induced by benzo[a]pyrene: Involvement of p53 phosphorylation and acetylation. *Toxicology* *247*, 145–153.
- Lin, X.-J., Fang, J.-H., Yang, X.-J., Zhang, C., Yuan, Y., Zheng, L., and Zhuang, S.-M. (2018). Hepatocellular Carcinoma Cell-Secreted Exosomal MicroRNA-210 Promotes Angiogenesis In Vitro and In Vivo. *Mol. Ther. - Nucleic Acids* *11*, 243–252.
- Liu, J., Fan, L., Yu, H., Zhang, J., He, Y., Feng, D., Wang, F., Li, X., Liu, Q., Li, Y., et al. (2019a). Endoplasmic Reticulum Stress Causes Liver Cancer Cells to Release Exosomal miR-23a-3p and Up-regulate Programmed Death Ligand 1 Expression in Macrophages. *Hepatology* hep.30607.
- Liu, R., Li, X., Zhu, W., Wang, Y., Zhao, D., Wang, X., Gurley, E.C., Liang, G., Chen, W., Lai, G., et al. (2019b). Cholangiocyte-Derived Exosomal Long Noncoding RNA H19 Promotes Hepatic Stellate Cell Activation and Cholestatic Liver Fibrosis. *Hepatology* *70*, 1317–1335.
- Liu, W., Chen, S., and Liu, B. (2016). Diagnostic and prognostic values of serum exosomal microRNA-21 in children with hepatoblastoma: a Chinese population-based study. *Pediatr. Surg. Int.* *32*, 1059–1065.
- Livshits, M.A., Khomyakova, E., Evtushenko, E.G., Lazarev, V.N., Kulemin, N.A., Semina, S.E., Generozov, E.V., and Govorun, V.M. (2015). Isolation of exosomes by differential centrifugation: Theoretical analysis of a commonly used protocol. *Sci. Rep.* *5*, 17319.
- Llorente, A., van Deurs, B., and Sandvig, K. (2007). Cholesterol regulates prostatesome release from secretory lysosomes in PC-3 human prostate cancer cells. *Eur. J. Cell Biol.* *86*, 405–415.
- Llorente, A., Skotland, T., Sylvänne, T., Kauhanen, D., Róg, T., Orłowski, A., Vattulainen, I., Ekroos, K., and Sandvig, K. (2013). Molecular lipidomics of exosomes released by PC-3 prostate cancer cells. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Mol. Cell Biol. Lipids* *1831*, 1302–1309.
- Lodovici, M., Akpan, V., Evangelisti, C., and Dolaro, P. (2004). Sidestream tobacco smoke as the main predictor of exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons. *J. Appl. Toxicol.* *24*, 277–281.
- Logozzi, M., Mizzone, D., Angelini, D.F., Di Raimo, R., Falchi, M., Battistini, L., and Fais, S. (2018). Microenvironmental pH and Exosome Levels Interplay in Human Cancer Cell Lines of Different Histotypes. *Cancers* *10*.
- Loutfy, N.M., Malhat, F., and Ahmed, M.T. (2017). Polycyclic aromatic hydrocarbon residues in blood serum and human milk in Egypt, A pilot case study. *Hum. Ecol. Risk Assess. Int. J.* *23*, 1573–1584.
- Luckert, C., Ehlers, A., Buhrke, T., Seidel, A., Lampen, A., and Hessel, S. (2013). Polycyclic aromatic hydrocarbons stimulate human CYP3A4 promoter activity via PXR. *Toxicol. Lett.* *222*, 180–188.

- Ludwig, S., Sharma, P., Theodoraki, M.-N., Pietrowska, M., Yerneni, S.S., Lang, S., Ferrone, S., and Whiteside, T.L. (2018). Molecular and Functional Profiles of Exosomes From HPV(+) and HPV(-) Head and Neck Cancer Cell Lines. *Front. Oncol.* 8.
- Luedde, T., Kaplowitz, N., and Schwabe, R.F. (2014). Cell Death and Cell Death Responses in Liver Disease: Mechanisms and Clinical Relevance. *Gastroenterology* 147, 765-783.e4.
- Luzardo, O.P., Badea, M., Zumbado, M., Rogozea, L., Floroian, L., Ilea, A., Moga, M., Sechel, G., Boada, L.D., and Henríquez-Hernández, L.A. (2019). Body burden of organohalogenated pollutants and polycyclic aromatic hydrocarbons in Romanian population: Influence of age, gender, body mass index, and habitat. *Sci. Total Environ.* 656, 709–716.
- Ma, J.-Q., Liu, C.-M., Qin, Z.-H., Jiang, J.-H., and Sun, Y.-Z. (2011). Ganoderma applanatum terpenes protect mouse liver against benzo(a)pyren-induced oxidative stress and inflammation. *Environ. Toxicol. Pharmacol.* 31, 460–468.
- Machala, M., Vondráček, J., Bláha, L., Ciganek, M., and Neča, J. (2001). Aryl hydrocarbon receptor-mediated activity of mutagenic polycyclic aromatic hydrocarbons determined using in vitro reporter gene assay. *Mutat. Res. Toxicol. Environ. Mutagen.* 497, 49–62.
- Madeen, E.P., and Williams, D.E. (2017). Environmental PAH exposure and male idiopathic infertility: a review on early life exposures and adult diagnosis. *Rev. Environ. Health* 32, 73–81.
- Manček-Keber, M., Frank-Bertoncelj, M., Hafner-Bratkovič, I., Smole, A., Zorko, M., Pirher, N., Hayer, S., Kralj-Iglič, V., Rozman, B., Ilc, N., et al. (2015). Toll-like receptor 4 senses oxidative stress mediated by the oxidation of phospholipids in extracellular vesicles. *Sci. Signal.* 8, ra60–ra60.
- Mandrekar, P., Catalano, D., Jeliaskova, V., and Kodys, K. (2008). Alcohol exposure regulates heat shock transcription factor binding and heat shock proteins 70 and 90 in monocytes and macrophages: implication for TNF- α regulation. *J. Leukoc. Biol.* 84, 1335–1345.
- Mann, K.K., Matulka, R.A., Hahn, M.E., Trombino, A.F., Lawrence, B.P., Kerkvliet, N.I., and Sherr, D.H. (1999). The Role of Polycyclic Aromatic Hydrocarbon Metabolism in Dimethylbenz[a]anthracene-Induced Pre-B Lymphocyte Apoptosis. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 161, 10–22.
- Marrero, J.A., Fontana, R.J., Fu, S., Conjeevaram, H.S., Su, G.L., and Lok, A.S. (2005). Alcohol, tobacco and obesity are synergistic risk factors for hepatocellular carcinoma. *J. Hepatol.* 42, 218–224.
- Martin, P.J., Hélot, A., Trémolet, G., Landkocz, Y., Dewaele, D., Cazier, F., Ledoux, F., and Courcot, D. (2019). Cellular response and extracellular vesicles characterization of human macrophages exposed to fine atmospheric particulate matter. *Environ. Pollut.* 254, 112933.
- Martínez-Lorenzo, M.J., Anel, A., Alava, M.A., Piñeiro, A., Naval, J., Lasiera, P., and Larrad, L. (2004). The human melanoma cell line MelJuSo secretes bioactive FasL and APO2L/TRAIL on the surface of microvesicles. Possible contribution to tumor counterattack. *Exp. Cell Res.* 295, 315–329.
- Marzesco, A.-M., Wilsch-Bräuninger, M., Dubreuil, V., Janich, P., Langenfeld, K., Thiele, C., Huttner, W.B., and Corbeil, D. (2009). Release of extracellular membrane vesicles from microvilli of epithelial cells is enhanced by depleting membrane cholesterol. *FEBS Lett.* 583, 897–902.
- Masyuk, A.I., Huang, B.Q., Ward, C.J., Gradilone, S.A., Banales, J.M., Masyuk, T.V., Radtke, B., Splinter, P.L., and LaRusso, N.F. (2010). Biliary exosomes influence cholangiocyte regulatory mechanisms and proliferation through interaction with primary cilia. *Am. J. Physiol.-Gastrointest. Liver Physiol.* 299, G990–G999.
- Mathivanan, S., Ji, H., and Simpson, R.J. (2010). Exosomes: Extracellular organelles important in intercellular communication. *J. Proteomics* 73, 1907–1920.
- Matikainen, T.M., Moriyama, T., Morita, Y., Perez, G.I., Korsmeyer, S.J., Sherr, D.H., and Tilly, J.L. (2002). Ligand Activation of the Aromatic Hydrocarbon Receptor Transcription Factor Drives Bax-Dependent Apoptosis in Developing Fetal Ovarian Germ Cells. 6.
- Matsumoto, A., Takahashi, Y., Nishikawa, M., Sano, K., Morishita, M., Charoenviriyakul, C., Saji, H., and Takakura, Y. (2017). Role of Phosphatidylserine-Derived Negative Surface Charges in the Recognition

- and Uptake of Intravenously Injected B16BL6-Derived Exosomes by Macrophages. *J. Pharm. Sci.* *106*, 168–175.
- 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.
- Matsuo, H. (2004). Role of LBPA and Alix in Multivesicular Liposome Formation and Endosome Organization. *Science* *303*, 531–534.
- Mayati, A., Levoine, N., Paris, H., N'Diaye, M., Courtois, A., Uriac, P., Lagadic-Gossmann, D., Fardel, O., and Le Ferrec, E. (2012). Induction of Intracellular Calcium Concentration by Environmental Benzo(a)pyrene Involves a β 2-Adrenergic Receptor/Adenylyl Cyclase/Epac-1/Inositol 1,4,5-Trisphosphate Pathway in Endothelial Cells. *J. Biol. Chem.* *287*, 4041–4052.
- Mayati, A., Le Ferrec, E., Holme, J.A., Fardel, O., Lagadic-Gossmann, D., and Øvrevik, J. (2014). Calcium signaling and β 2-adrenergic receptors regulate 1-nitropyrene induced CXCL8 responses in BEAS-2B cells. *Toxicol. In Vitro* *28*, 1153–1157.
- Mayati, A., Podechard, N., Rineau, M., Sparfel, L., Lagadic-Gossmann, D., Fardel, O., and Le Ferrec, E. (2017). Benzo(a)pyrene triggers desensitization of β 2-adrenergic pathway. *Sci. Rep.* *7*, 3262.
- Meneghini, R. (1997). Iron Homeostasis, Oxidative Stress, and DNA Damage. *Free Radic. Biol. Med.* *23*, 783–792.
- 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.
- Miao, Y., Li, G., Zhang, X., Xu, H., and Abraham, S.N. (2015). A TRP Channel Senses Lysosome Neutralization by Pathogens to Trigger Their Expulsion. *Cell* *161*, 1306–1319.
- Michaelson, J.J., Trump, S., Rudzok, S., Gräbsch, C., Madureira, D.J., Dautel, F., Mai, J., Attinger, S., Schirmer, K., von Bergen, M., et al. (2011). Transcriptional signatures of regulatory and toxic responses to benzo[a]-pyrene exposure. *BMC Genomics* *12*, 502.
- 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.
- Miranda, A.M., Lasiacka, Z.M., Xu, Y., Neufeld, J., Shahriar, S., Simoes, S., Chan, R.B., Oliveira, T.G., Small, S.A., and Di Paolo, G. (2018). Neuronal lysosomal dysfunction releases exosomes harboring APP C-terminal fragments and unique lipid signatures. *Nat. Commun.* *9*, 291.
- Mitra, S., Wewers, M.D., and Sarkar, A. (2015). Mononuclear Phagocyte-Derived Microparticulate Caspase-1 Induces Pulmonary Vascular Endothelial Cell Injury. *PLOS ONE* *10*, e0145607.
- Mobarrez, F., Antoniewicz, L., Bosson, J.A., Kuhl, J., Pisetsky, D.S., and Lundbäck, M. (2014). The Effects of Smoking on Levels of Endothelial Progenitor Cells and Microparticles in the Blood of Healthy Volunteers. *PLoS ONE* *9*, e90314.
- Momen-Heravi, F., Balaj, L., Alian, S., Tigges, J., Toxavidis, V., and Ericsson, M. (2012). Alternative methods for characterization of extracellular vesicles. *Front Physiol* *3*.
- Momen-Heravi, F., Bala, S., Kodys, K., and Szabo, G. (2015a). Exosomes derived from alcohol-treated hepatocytes horizontally transfer liver specific miRNA-122 and sensitize monocytes to LPS. *Sci. Rep.* *5*.
- Momen-Heravi, F., Saha, B., Kodys, K., Catalano, D., Satishchandran, A., and Szabo, G. (2015b). Increased number of circulating exosomes and their microRNA cargos are potential novel biomarkers in alcoholic hepatitis. *J. Transl. Med.* *13*, 261.
- Monguió-Tortajada, M., Gálvez-Montón, C., Bayes-Genis, A., Roura, S., and Borràs, F.E. (2019). Extracellular vesicle isolation methods: rising impact of size-exclusion chromatography. *Cell. Mol. Life Sci.* *76*, 2369–2382.

- Monleon, I., Martinez-Lorenzo, M.J., Monteagudo, L., Lasierra, P., Taules, M., Iturralde, M., Pineiro, A., Larrad, L., Alava, M.A., Naval, J., et al. (2001). Differential Secretion of Fas Ligand- or APO2 Ligand/TNF-Related Apoptosis-Inducing Ligand-Carrying Microvesicles During Activation-Induced Death of Human T Cells. *J. Immunol.* *167*, 6736–6744.
- Montecalvo, A., Larregina, A.T., Shufesky, W.J., Beer Stolz, D., Sullivan, M.L.G., Karlsson, J.M., Baty, C.J., Gibson, G.A., Erdos, G., Wang, Z., et al. (2012). Mechanism of transfer of functional microRNAs between mouse dendritic cells via exosomes. *Blood* *119*, 756–766.
- Moon, H.-G., Kim, S.-H., Gao, J., Quan, T., Qin, Z., Osorio, J.C., Rosas, I.O., Wu, M., Tesfaigzi, Y., and Jin, Y. (2014). CCN1 secretion and cleavage regulate the lung epithelial cell functions after cigarette smoke. *Am. J. Physiol.-Lung Cell. Mol. Physiol.* *307*, L326–L337.
- Moon, H.-G., Cao, Y., Yang, J., Lee, J.H., Choi, H.S., and Jin, Y. (2015). Lung epithelial cell-derived extracellular vesicles activate macrophage-mediated inflammatory responses via ROCK1 pathway. *Cell Death Dis.* *6*, e2016.
- Morel, O., Jesel, L., Hugel, B., Douchet, M.-P., Zupan, M., Chauvin, M., Freyssinet, J.-M., and Toti, F. (2003). Protective effects of vitamin C on endothelium damage and platelet activation during myocardial infarction in patients with sustained generation of circulating microparticles: Vitamin C, procoagulant microparticles and MI. *J. Thromb. Haemost.* *1*, 171–177.
- Morelli, A.E., Larregina, A.T., Shufesky, W.J., Sullivan, M.L.G., Stolz, D.B., Papworth, G.D., Zahorchak, A.F., Logar, A.J., Wang, Z., Watkins, S.C., et al. (2004). Endocytosis, intracellular sorting, and processing of exosomes by dendritic cells. *Blood* *104*, 3257–3266.
- Mukherjee, C., Kling, T., Russo, B., Miebach, K., Kess, E., Schifferer, M., Pedro, L.D., Weikert, U., Fard, M.K., Kannaiyan, N., et al. (2020). Oligodendrocytes Provide Antioxidant Defense Function for Neurons by Secreting Ferritin Heavy Chain. *Cell Metab.*
- Mulcahy, L.A., Pink, R.C., and Carter, D.R.F. (2014). Routes and mechanisms of extracellular vesicle uptake. *J. Extracell. Vesicles* *3*, 24641.
- Munich, S., Sobo-Vujanovic, A., Buchser, W.J., Beer-Stolz, D., and Vujanovic, N.L. (2012). Dendritic cell exosomes directly kill tumor cells and activate natural killer cells via TNF superfamily ligands. *Oncolmmunology* *1*, 1074–1083.
- Murakami, Y., Toyoda, H., Tanahashi, T., Tanaka, J., Kumada, T., Yoshioka, Y., Kosaka, N., Ochiya, T., and Taguchi, Y. (2012). Comprehensive miRNA Expression Analysis in Peripheral Blood Can Diagnose Liver Disease. *PLoS ONE* *7*, e48366.
- Murawska-CiaŁowicz, E., Jethon, Z., Magdalan, J., Januszewska, L., Podhorska-OkoŁów, M., Zawadzki, M., Sozański, T., and Dzięgiel, P. (2011). Effects of melatonin on lipid peroxidation and antioxidative enzyme activities in the liver, kidneys and brain of rats administered with benzo(a)pyrene. *Exp. Toxicol. Pathol.* *63*, 97–103.
- 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.
- Nandi, S., Ma, L., Denis, M., Karwatsky, J., Li, Z., Jiang, X.-C., and Zha, X. (2009). ABCA1-mediated cholesterol efflux generates microparticles in addition to HDL through processes governed by membrane rigidity. *J. Lipid Res.* *50*, 456–466.
- Näslund, T.I., Paquin-Proulx, D., Paredes, P.T., Vallhov, H., Sandberg, J.K., and Gabrielsson, S. (2014). Exosomes from breast milk inhibit HIV-1 infection of dendritic cells and subsequent viral transfer to CD4+ T cells. *AIDS Lond. Engl.* *28*, 171–180.
- Nazarenko, I., Rana, S., Baumann, A., McAlear, J., Hellwig, A., Trendelenburg, M., Lochnit, G., Preissner, K.T., and Zöller, M. (2010). Cell surface tetraspanin Tspan8 contributes to molecular pathways of exosome-induced endothelial cell activation. *Cancer Res.* *70*, 1668–1678.
- 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.

- Nebert, D.W., Dalton, T.P., Okey, A.B., and Gonzalez, F.J. (2004). Role of Aryl Hydrocarbon Receptor-mediated Induction of the CYP1 Enzymes in Environmental Toxicity and Cancer. *J. Biol. Chem.* *279*, 23847–23850.
- Neri, T., Pergoli, L., Petrini, S., Gravendonk, L., Balia, C., Scalise, V., Amoroso, A., Pedrinelli, R., Paggiaro, P., Bollati, V., et al. (2016). Particulate matter induces prothrombotic microparticle shedding by human mononuclear and endothelial cells. *Toxicol. In Vitro* *32*, 333–338.
- Nesnow, S., Grindstaff, R.D., Lambert, G., Padgett, W.T., Bruno, M., Ge, Y., Chen, P.-J., Wood, C.E., and Murphy, L. (2011). Propiconazole increases reactive oxygen species levels in mouse hepatic cells in culture and in mouse liver by a cytochrome P450 enzyme mediated process. *Chem. Biol. Interact.* *194*, 79–89.
- Neuschäfer-Rube, F., Schraplau, A., Schewe, B., Lieske, S., Krützfeldt, J.-M., Ringel, S., Henkel, J., Birkenfeld, A.L., and Püschel, G.P. (2015). Arylhydrocarbon receptor-dependent mIndy (Slc13a5) induction as possible contributor to benzo[a]pyrene-induced lipid accumulation in hepatocytes. *Toxicology* *337*, 1–9.
- Ngalame, N.N.O., Luz, A.L., Makia, N., and Tokar, E.J. (2018). Arsenic Alters Exosome Quantity and Cargo to Mediate Stem Cell Recruitment Into a Cancer Stem Cell-Like Phenotype. *Toxicol. Sci.* *165*, 40–49.
- Nicolson, G.L. (2014). The Fluid—Mosaic Model of Membrane Structure: Still relevant to understanding the structure, function and dynamics of biological membranes after more than 40years. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Biomembr.* *1838*, 1451–1466.
- 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.
- N'jai, A.U., Larsen, M.C., Bushkofsky, J.R., Czuprynski, C.J., and Jefcoate, C.R. (2011). Acute Disruption of Bone Marrow Hematopoiesis by Benzo(a)pyrene Is Selectively Reversed by Aryl Hydrocarbon Receptor-Mediated Processes. *Mol. Pharmacol.* *79*, 724–734.
- Nojima, H., Freeman, C.M., Schuster, R.M., Japtok, L., Kleuser, B., Edwards, M.J., Gulbins, E., and Lentsch, A.B. (2016). Hepatocyte exosomes mediate liver repair and regeneration via sphingosine-1-phosphate. *J. Hepatol.* *64*, 60–68.
- Nolte-'t Hoen, E.N.M., Buermans, H.P.J., Waasdorp, M., Stoorvogel, W., Wauben, M.H.M., and 't Hoen, P.A.C. (2012). Deep sequencing of RNA from immune cell-derived vesicles uncovers the selective incorporation of small non-coding RNA biotypes with potential regulatory functions. *Nucleic Acids Res.* *40*, 9272–9285.
- Novelli, F., Neri, T., Tavanti, L., Armani, C., Noce, C., Falaschi, F., Bartoli, M.L., Martino, F., Palla, A., Celi, A., et al. (2014). Procoagulant, Tissue Factor-Bearing Microparticles in Bronchoalveolar Lavage of Interstitial Lung Disease Patients: An Observational Study. *PLoS ONE* *9*, e95013.
- Obana, H., Hori, S., Kashimoto, T., and Kunita, N. (1981). Polycyclic aromatic hydrocarbons in human fat and liver. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* *27*, 23–27.
- Ogese, M.O., Jenkins, R.E., Adair, K., Tailor, A., Meng, X., Faulkner, L.L., Enyindah, B.O., Schofield, A., Diaz-Nieto, R., Ressel, L., et al. (2019). Exosomal transport of hepatocyte-derived drug-modified proteins to the immune system. *Hepatology*.
- Ohgaki, R., van IJzendoorn, S.C.D., Matsushita, M., Hoekstra, D., and Kanazawa, H. (2011). Organellar Na⁺/H⁺ Exchangers: Novel Players in Organelle pH Regulation and Their Emerging Functions. *Biochemistry* *50*, 443–450.
- Ohta, R., Takagi, A., Ohmukai, H., Marumo, H., Ono, A., Matsushima, Y., Inoue, T., Ono, H., and Kanno, J. (2012). Ovariectomized mouse uterotrophic assay of 36 chemicals. *J. Toxicol. Sci.* *37*, 879–889.
- Olabanji, I.O., Asubiojo, O.I., Komolafe, M.A., Akintomide, A., and Adeniji, A.O. (2019). Determination of polycyclic aromatic hydrocarbons in blood plasma of neurology patients. *J. Toxicol. Environ. Health Sci.* *11*, 1–8.

- Onódi, Z., Pelyhe, C., Terézia Nagy, C., Brenner, G.B., Almási, L., Kittel, Á., Manček-Keber, M., Ferdinandy, P., Buzás, E.I., and Giricz, Z. (2018). Isolation of High-Purity Extracellular Vesicles by the Combination of Iodixanol Density Gradient Ultracentrifugation and Bind-Elute Chromatography From Blood Plasma. *Front. Physiol.* *9*, 1479.
- Ortiz, L., Nakamura, B., Li, X., Blumberg, B., and Luderer, U. (2014). Reprint of “In utero exposure to benzo[a]pyrene increases adiposity and causes hepatic steatosis in female mice, and glutathione deficiency is protective.” *Toxicol. Lett.* *230*, 314–321.
- Osteikoetxea, X., Sódar, B., Németh, A., Szabó-Taylor, K., Pálóczi, K., Vukman, K.V., Tamási, V., Balogh, A., Kittel, Á., Pállinger, É., et al. (2015a). Differential detergent sensitivity of extracellular vesicle subpopulations. *Org. Biomol. Chem.* *13*, 9775–9782.
- Osteikoetxea, X., Balogh, A., Szabó-Taylor, K., Németh, A., Szabó, T.G., Pálóczi, K., Sódar, B., Kittel, Á., György, B., and Pállinger, É. (2015b). Improved characterization of EV preparations based on protein to lipid ratio and lipid properties. *PLoS One* *10*, e0121184.
- Palmulli, R., and van Niel, G. (2018). To be or not to be... secreted as exosomes, a balance finely tuned by the mechanisms of biogenesis. *Essays Biochem.* *62*, 177–191.
- Palomo, L., Mleczko, J.E., Azkargorta, M., Conde-Vancells, J., González, E., Elortza, F., Royo, F., and Falcon-Perez, J.M. (2018). Abundance of Cytochromes in Hepatic Extracellular Vesicles Is Altered by Drugs Related With Drug-Induced Liver Injury. *Hepatol. Commun.* *2*, 1064–1079.
- Pan-Montojo, F., Schwarz, M., Winkler, C., Arnhold, M., O’Sullivan, G.A., Pal, A., Said, J., Marsico, G., Verbavatz, J.-M., Rodrigo-Angulo, M., et al. (2012). Environmental toxins trigger PD-like progression via increased alpha-synuclein release from enteric neurons in mice. *Sci. Rep.* *2*, 898.
- Park, J.-H., Mangal, D., Frey, A.J., Harvey, R.G., Blair, I.A., and Penning, T.M. (2009). Aryl Hydrocarbon Receptor Facilitates DNA Strand Breaks and 8-Oxo-2'-deoxyguanosine Formation by the Aldo-Keto Reductase Product Benzo[a]pyrene-7,8-dione. *J. Biol. Chem.* *284*, 29725–29734.
- Park, S.J., Kim, J.M., Kim, J., Hur, J., Park, S., Kim, K., Shin, H.-J., and Chwae, Y.-J. (2018). Molecular mechanisms of biogenesis of apoptotic exosome-like vesicles and their roles as damage-associated molecular patterns. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *115*, E11721–E11730.
- Park, S.-Y., Lee, S.-M., Ye, S.-K., Yoon, S.-H., Chung, M.-H., and Choi, J. (2006). Benzo[a]pyrene-induced DNA damage and p53 modulation in human hepatoma HepG2 cells for the identification of potential biomarkers for PAH monitoring and risk assessment. *Toxicol. Lett.* *167*, 27–33.
- Parodi, S., Merlo, D.F., Ranucci, A., Miligi, L., Benvenuti, A., Rondelli, R., Magnani, C., and Haupt, R. (2014). Risk of neuroblastoma, maternal characteristics and perinatal exposures: The SETIL study. *Cancer Epidemiol.* *38*, 686–694.
- Parolini, I., Federici, C., Raggi, C., Lugini, L., Palleschi, S., De Milito, A., Coscia, C., Iessi, E., Logozzi, M., Molinari, A., et al. (2009). Microenvironmental pH Is a Key Factor for Exosome Traffic in Tumor Cells. *J. Biol. Chem.* *284*, 34211–34222.
- Patel, G.K., Khan, M.A., Zubair, H., Srivastava, S.K., Khushman, M., Singh, S., and Singh, A.P. (2019). Comparative analysis of exosome isolation methods using culture supernatant for optimum yield, purity and downstream applications. *Sci. Rep.* *9*, 5335.
- Pavanello, S., Bonzini, M., Angelici, L., Motta, V., Pergoli, L., Hoxha, M., Cantone, L., Pesatori, A.C., Apostoli, P., Tripodi, A., et al. (2016). Extracellular vesicle-driven information mediates the long-term effects of particulate matter exposure on coagulation and inflammation pathways. *Toxicol. Lett.* *259*, 143–150.
- Pavlyukov, M.S., Yu, H., Bastola, S., Minata, M., Shender, V.O., Lee, Y., Zhang, S., Wang, J., Komarova, S., Wang, J., et al. (2018). Apoptotic Cell-Derived Extracellular Vesicles Promote Malignancy of Glioblastoma Via Intercellular Transfer of Splicing Factors. *Cancer Cell* *34*, 119-135.e10.

- Pergoli, L., Cantone, L., Favero, C., Angelici, L., Iodice, S., Pinatel, E., Hoxha, M., Dioni, L., Letizia, M., Albetti, B., et al. (2017). Extracellular vesicle-packaged miRNA release after short-term exposure to particulate matter is associated with increased coagulation. *Part. Fibre Toxicol.* *14*.
- Petrick, J.L., Campbell, P.T., Koshiol, J., Thistle, J.E., Andreotti, G., Beane-Freeman, L.E., Buring, J.E., Chan, A.T., Chong, D.Q., Doody, M.M., et al. (2018). Tobacco, alcohol use and risk of hepatocellular carcinoma and intrahepatic cholangiocarcinoma: The Liver Cancer Pooling Project. *Br. J. Cancer* *118*, 1005–1012.
- Pfriege, F.W., and Vitale, N. (2018). Cholesterol and the journey of extracellular vesicles. *J. Lipid Res.* *59*, 2255–2261.
- Phillips, T.D., Richardson, M., Lisa Cheng, Y.-S., He, L., McDonald, T.J., Cizmas, L.H., Safe, S.H., Donnelly, K.C., Wang, F., Moorthy, B., et al. (2015). Mechanistic relationships between hepatic genotoxicity and carcinogenicity in male B6C3F1 mice treated with polycyclic aromatic hydrocarbon mixtures. *Arch. Toxicol.* *89*, 967–977.
- Phuyal, S., Hessvik, N.P., Skotland, T., Sandvig, K., and Llorente, A. (2014). Regulation of exosome release by glycosphingolipids and flotillins. *FEBS J.* *281*, 2214–2227.
- Pierce, L.M., Kurata, W.E., Matsumoto, K.W., Clark, M.E., and Farmer, D.M. (2016). Long-term epigenetic alterations in a rat model of Gulf War Illness. *NeuroToxicology* *55*, 20–32.
- Pleil, J.D., Stiegel, M.A., Sobus, J.R., Tabucchi, S., Ghio, A.J., and Madden, M.C. (2010). Cumulative exposure assessment for trace-level polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) using human blood and plasma analysis. *J. Chromatogr. B* *878*, 1753–1760.
- Podbielska, M., Szulc, Z.M., Kurowska, E., Hogan, E.L., Bielawski, J., Bielawska, A., and Bhat, N.R. (2016). Cytokine-induced release of ceramide-enriched exosomes as a mediator of cell death signaling in an oligodendrogloma cell line. *J. Lipid Res.* *57*, 2028–2039.
- Podechard, N., Fardel, O., Corolleur, M., Bernard, M., and Lecureur, V. (2009). Inhibition of human mesenchymal stem cell-derived adipogenesis by the environmental contaminant benzo(a)pyrene. *Toxicol. In Vitro* *23*, 1139–1144.
- Podechard, N., Tekpli, X., Catheline, D., Holme, J.A., Rioux, V., Legrand, P., Rialland, M., Fardel, O., Lagadic-Gossmann, D., and Lecureur, V. (2011). Mechanisms involved in lipid accumulation and apoptosis induced by 1-nitropyrene in Hepa1c1c7 cells. *Toxicol. Lett.* *206*, 289–299.
- van der Pol, E., Hoekstra, A.G., Sturk, A., Otto, C., Leeuwen, T.G.V., and Nieuwland, R. (2010). Optical and non-optical methods for detection and characterization of microparticles and exosomes. *J. Thromb. Haemost.* *8*, 2596–2607.
- van der Pol, E., Boing, A.N., Harrison, P., Sturk, A., and Nieuwland, R. (2012). Classification, Functions, and Clinical Relevance of Extracellular Vesicles. *Pharmacol. Rev.* *64*, 676–705.
- van der Pol, E., Böing, A.N., Gool, E.L., and Nieuwland, R. (2016). Recent developments in the nomenclature, presence, isolation, detection and clinical impact of extracellular vesicles. *J. Thromb. Haemost.* *14*, 48–56.
- 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.
- Potratz, S., Jungnickel, H., Grabiger, S., Tarnow, P., Otto, W., Fritsche, E., von Bergen, M., and Luch, A. (2016). Differential cellular metabolite alterations in HaCaT cells caused by exposure to the aryl hydrocarbon receptor-binding polycyclic aromatic hydrocarbons chrysene, benzo[a]pyrene and dibenzof[a, l]pyrene. *Toxicol. Rep.* *3*, 763–773.
- Povero, D., Eguchi, A., Niesman, I.R., Andronikou, N., de Mollerat du Jeu, X., Mulya, A., Berk, M., Lazic, M., Thapaliya, S., Parola, M., et al. (2013). Lipid-Induced Toxicity Stimulates Hepatocytes to Release Angiogenic Microparticles That Require Vanin-1 for Uptake by Endothelial Cells. *Sci. Signal.* *6*, ra88–ra88.

- Povero, D., Eguchi, A., Li, H., Johnson, C.D., Papouchado, B.G., and Wree, A. (2014). Circulating extracellular vesicles with specific proteome and liver microRNAs are potential biomarkers for liver injury in experimental fatty liver disease. *PLoS One* 9.
- Povero, D., Panera, N., Eguchi, A., Johnson, C.D., Papouchado, B.G., de Araujo Horcel, L., Pinatel, E.M., Alisi, A., Nobili, V., and Feldstein, A.E. (2015). Lipid-induced hepatocyte-derived extracellular vesicles regulate hepatic stellate cells via microRNA targeting peroxisome proliferator-activated receptor- γ . *Cell. Mol. Gastroenterol. Hepatol.* 1, 646–663.
- Purushothaman, A., Bandari, S.K., Liu, J., Mobley, J.A., Brown, E.E., and Sanderson, R.D. (2016). Fibronectin on the Surface of Myeloma Cell-derived Exosomes Mediates Exosome-Cell Interactions. *J. Biol. Chem.* 291, 1652–1663.
- Qin, G., Wu, M., and Sang, N. (2015). Sulfur dioxide and benzo(a)pyrene trigger apoptotic and anti-apoptotic signals at different post-exposure times in mouse liver. *Chemosphere* 139, 318–325.
- 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.
- Qiu, Q., Xiong, W., Yang, C., Dai, X., Dan, X., Yang, Z., Jiao, Y., Xiang, Y., Liu, G., and Hardy, P. (2014). Lymphocyte-derived microparticles induce apoptosis of airway epithelial cells through activation of p38 MAPK and production of arachidonic acid. *Apoptosis* 19, 1113–1127.
- Qu, J.-L., Qu, X.-J., Qu, J.-L., Qu, X.-J., Zhao, M.-F., Teng, Y.-E., Zhang, Y., Hou, K.-Z., Jiang, Y.-H., Yang, X.-H., et al. (2009). The role of cbl family of ubiquitin ligases in gastric cancer exosome-induced apoptosis of Jurkat T cells. *Acta Oncol.* 48, 1173–1180.
- Qu, Z., Wu, J., Wu, J., Ji, A., Qiang, G., Jiang, Y., Jiang, C., and Ding, Y. (2017). Exosomal miR-665 as a novel minimally invasive biomarker for hepatocellular carcinoma diagnosis and prognosis. *Oncotarget* 8.
- Ramakrishnaiah, V., Thumann, C., Fofana, I., Habersetzer, F., Pan, Q., de Ruyter, P.E., Willemsen, R., Demmers, J.A., Raj, V.S., and Jenster, G. (2013). Exosome-mediated transmission of hepatitis C virus between human hepatoma Huh7. 5 cells. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 110, 13109–13113.
- 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.
- Ramesh, A., Harris, K.J., and Archibong, A.E. (2017). Chapter 40 - Reproductive Toxicity of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons. In *Reproductive and Developmental Toxicology (Second Edition)*, R.C. Gupta, ed. (Academic Press), pp. 745–763.
- Ramya, D., Siddikuzzaman, Manjamalai, A., and Berlin Grace, V.M. (2012). Chemoprotective effect of all-trans retinoic acid (ATRA) on oxidative stress and lung metastasis induced by benzo(a)pyrene. *Immunopharmacol. Immunotoxicol.* 34, 317–325.
- Rana, S., Yue, S., Stadel, D., and Zöller, M. (2012). Toward tailored exosomes: The exosomal tetraspanin web contributes to target cell selection. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 44, 1574–1584.
- Ratajczak, J., Miekus, K., Kucia, M., Zhang, J., Reca, R., Dvorak, P., and Ratajczak, M.Z. (2006). Embryonic stem cell-derived microvesicles reprogram hematopoietic progenitors: evidence for horizontal transfer of mRNA and protein delivery. *Leukemia* 20, 847–856.
- Rautou, P., Bresson, J., Sainte-Marie, Y., Vion, A., Paradis, V., Renard, J., Devue, C., Heymes, C., Letteron, P., Elkrief, L., et al. (2012). Abnormal Plasma Microparticles Impair Vasoconstrictor Responses in Patients With Cirrhosis. *Gastroenterology* 143, 166-176.e6.

- Record, M., Carayon, K., Poirot, M., and Silvente-Poirot, S. (2014). Exosomes as new vesicular lipid transporters involved in cell–cell communication and various pathophysiologicals. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Mol. Cell Biol. Lipids* 1841, 108–120.
- Record, M., Silvente-Poirot, S., Poirot, M., and Wakelam, M.J.O. (2018). Extracellular vesicles: lipids as key components of their biogenesis and functions. *J. Lipid Res.* 59, 1316–1324.
- Reed, L., Arlt, V.M., and Phillips, D.H. (2018). The role of cytochrome P450 enzymes in carcinogen activation and detoxication: an in vivo–in vitro paradox. *Carcinogenesis* 39, 851–859.
- Regnault, C., Willison, J., Veyrenc, S., Airieau, A., Méresse, P., Fortier, M., Fournier, M., Brousseau, P., Raveton, M., and Reynaud, S. (2016). Metabolic and immune impairments induced by the endocrine disruptors benzo[a]pyrene and triclosan in *Xenopus tropicalis*. *Chemosphere* 155, 519–527.
- Rey-Barroso, J., Alvarez-Barrientos, A., Rico-Leo, E., Contador-Troca, M., Carvajal-Gonzalez, J.M., and Echarri, A. (2014). The Dioxin receptor modulates Caveolin-1 mobilization during directional migration: role of cholesterol. 19.
- Ridolfi, A., Brucale, M., Montis, C., Caselli, L., Paolini, L., Borup, A., Boysen, A.T., Loria, F., van Herwijnen, M.J.C., Kleinjan, M., et al. (2019). AFM-based High-Throughput Nanomechanical Screening of Single Extracellular Vesicles (Biophysics).
- Ristorcelli, E., Beraud, E., Verrando, P., Villard, C., Lafitte, D., Sbarra, V., Lombardo, D., and Verine, A. (2008). Human tumor nanoparticles induce apoptosis of pancreatic cancer cells. *FASEB J.* 22, 3358–3369.
- Ristorcelli, E., Beraud, E., Mathieu, S., Lombardo, D., and Verine, A. (2009). Essential role of Notch signaling in apoptosis of human pancreatic tumoral cells mediated by exosomal nanoparticles. *Int. J. Cancer* 125, 1016–1026.
- Rivoltini, L., Chiodoni, C., Squarcina, P., Tortoreto, M., Villa, A., Vergani, B., Buredek, M., Botti, L., Arioli, I., Cova, A., et al. (2016). TNF-Related Apoptosis-Inducing Ligand (TRAIL)-Armed Exosomes Deliver Proapoptotic Signals to Tumor Site. *Clin. Cancer Res.* 22, 3499–3512.
- Rodosthenous, R.S., Coull, B.A., Lu, Q., Vokonas, P.S., Schwartz, J.D., and Baccarelli, A.A. (2015). Ambient particulate matter and microRNAs in extracellular vesicles: a pilot study of older individuals. *Part. Fibre Toxicol.* 13.
- Rodosthenous, R.S., Kloog, I., Colicino, E., Zhong, J., Herrera, L.A., Vokonas, P., Schwartz, J., Baccarelli, A.A., and Prada, D. (2018). Extracellular vesicle-enriched microRNAs interact in the association between long-term particulate matter and blood pressure in elderly men. *Environ. Res.* 167, 640–649.
- Rodrigues, C.M.P., Solá, S., Brito, M.A., Brites, D., and Moura, J.J.G. (2002). Bilirubin directly disrupts membrane lipid polarity and fluidity, protein order, and redox status in rat mitochondria. *J. Hepatol.* 36, 335–341.
- Rodrigues, M.L., Nakayasu, E.S., Oliveira, D.L., Nimrichter, L., Nosanchuk, J.D., Almeida, I.C., and Casadevall, A. (2008). Extracellular Vesicles Produced by *Cryptococcus neoformans* Contain Protein Components Associated with Virulence. *Eukaryot. Cell* 7, 58–67.
- Rodriguez, L. et al. (1997). Carcinogenicity of benzo[a]pyrene and manufactured gas plant residues in infant mice. *Carcinogenesis* 18, 127–135.
- Rodríguez-Suárez, E., Gonzalez, E., Hughes, C., Conde-Vancells, J., Rudella, A., and Royo, F. (2014). Quantitative proteomic analysis of hepatocyte-secreted extracellular vesicles reveals candidate markers for liver toxicity. *J. Proteom* 103.
- Rossi, M., Scarselli, M., Fasciani, I., Maggio, R., and Giorgi, F. (2017). Dichlorodiphenyltrichloroethane (DDT) induced extracellular vesicle formation: a potential role in organochlorine increased risk of Parkinson's disease. *Acta Neurobiol Exp* 77, 113–117.
- Rowland, A., Ruanglertboon, W., Dyk, M., Wijayakumara, D., Wood, L.S., Meech, R., Mackenzie, P.I., Rodrigues, A.D., Marshall, J., and Sorich, M.J. (2019). Plasma extracellular nanovesicle (exosome)-

- derived biomarkers for drug metabolism pathways: a novel approach to characterize variability in drug exposure. *Br. J. Clin. Pharmacol.* *85*, 216–226.
- Royo, F., Schlangen, K., Palomo, L., Gonzalez, E., Conde-Vancells, J., Berisa, A., Aransay, A.M., and Falcon-Perez, J.M. (2013). Transcriptome of Extracellular Vesicles Released by Hepatocytes. *PLOS ONE* *8*, e68693.
- Royo, F., Palomo, L., Mleczo, J., Gonzalez, E., Alonso, C., Martínez, I., Pérez-Cormenzana, M., Castro, A., and Falcon-Perez, J.M. (2017). Metabolically active extracellular vesicles released from hepatocytes under drug-induced liver-damaging conditions modify serum metabolome and might affect different pathophysiological processes. *Eur. J. Pharm. Sci.* *98*, 51–57.
- Royo, F., Gil-Carton, D., Gonzalez, E., Mleczo, J., Palomo, L., Perez-Cormenzana, M., Mayo, R., Alonso, C., and Falcon-Perez, J.M. (2019). Differences in the metabolite composition and mechanical properties of extracellular vesicles secreted by hepatic cellular models. *J. Extracell. Vesicles* *8*, 1575678.
- Saha, B., Momen-Heravi, F., Kodys, K., and Szabo, G. (2016). MicroRNA Cargo of Extracellular Vesicles from Alcohol-exposed Monocytes Signals Naive Monocytes to Differentiate into M2 Macrophages. *J. Biol. Chem.* *291*, 149–159.
- Saha, B., Momen-Heravi, F., Furi, I., Kodys, K., Catalano, D., Gangopadhyay, A., Haraszti, R., Satishchandran, A., Iracheta-Vellve, A., Adejumo, A., et al. (2018). Extracellular vesicles from mice with alcoholic liver disease carry a distinct protein cargo and induce macrophage activation through heat shock protein 90. *Hepatology* *67*, 1986–2000.
- Sarkar, A., Mitra, S., Mehta, S., Raices, R., and Wewers, M.D. (2009). Monocyte Derived Microvesicles Deliver a Cell Death Message via Encapsulated Caspase-1. *PLoS ONE* *4*, e7140.
- Sarkar, S., Rokad, D., Malovic, E., Luo, J., Harischandra, D.S., Jin, H., Anantharam, V., Huang, X., Lewis, M., Kanthasamy, A., et al. (2019). Manganese activates NLRP3 inflammasome signaling and propagates exosomal release of ASC in microglial cells. *Sci. Signal.* *12*, eaat9900.
- Sato, K., Meng, F., Venter, J., Giang, T., Glaser, S., and Alpini, G. (2017). The role of the secretin/secretin receptor axis in inflammatory cholangiocyte communication via extracellular vesicles. *Sci. Rep.* *7*, 11183.
- Saunderson, S.C., Dunn, A.C., Crocker, P.R., and McLellan, A.D. (2014). CD169 mediates the capture of exosomes in spleen and lymph node. *Blood* *123*, 208–216.
- SCF (2002). Opinion of the Scientific Committee on Food on the risks to human health of polycyclic aromatic hydrocarbons in food. (Brussels: Scientific Committee on Food SCF).
- Schmelzle, M., Splith, K., Andersen, L.W., Kornek, M., Schuppan, D., Jones-Bamman, C., Nowak, M., Toxavidis, V., Salhanick, S.D., Han, L., et al. (2013). Increased Plasma Levels of Microparticles Expressing CD39 and CD133 in Acute Liver Injury: *Transplant. J.* *95*, 63–69.
- Schneider, J., Chromik, A.M., Uhl, W., Mügge, A., and Bulut, D. (2012). Apoptosis in esophagus and pancreas carcinoma cells induced by circulating microparticles is related to phosphatidyl serine and microparticle-associated caspases. *Med. Oncol.* *29*, 962–969.
- Schock, S.C., Edrissi, H., Burger, D., Cadonic, R., Hakim, A., and Thompson, C. (2014). Microparticles generated during chronic cerebral ischemia deliver proapoptotic signals to cultured endothelial cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *450*, 912–917.
- Sehgal, A., Kumar, M., Jain, M., and Dhawan, D.K. (2011). Combined effects of curcumin and piperine in ameliorating benzo(a)pyrene induced DNA damage. *Food Chem. Toxicol.* *49*, 3002–3006.
- 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, W., Eun, H.S., Kim, S.Y., Yi, H.-S., Lee, Y.-S., Park, S.-H., Jang, M.-J., Jo, E., Kim, S.C., and Han, Y.-M. (2016). Exosome-mediated activation of toll-like receptor 3 in stellate cells stimulates interleukin-17 production by $\gamma\delta$ T cells in liver fibrosis. *Hepatology* *64*, 616–631.

- Seo, W., Gao, Y., He, Y., Sun, J., Xu, H., Feng, D., Park, S.H., Cho, Y.-E., Guillot, A., Ren, T., et al. (2019). ALDH2 deficiency promotes alcohol-associated liver cancer by activating oncogenic pathways via oxidized DNA-enriched extracellular vesicles. *J. Hepatol.*
- Serban, K.A., Reznica, S., Petrusca, D.N., Poirier, C., Cao, D., Justice, M.J., Patel, M., Tsvetkova, I., Kamocki, K., Mikosz, A., et al. (2016). Structural and functional characterization of endothelial microparticles released by cigarette smoke. *Sci. Rep.* 6.
- Serron, S.C., Dwivedi, N., and Backes, W.L. (2000). Ethylbenzene Induces Microsomal Oxygen Free Radical Generation: Antibody-Directed Characterization of the Responsible Cytochrome P450 Enzymes. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 164, 305–311.
- Sezgin, E., Levental, I., Mayor, S., and Eggeling, C. (2017). The mystery of membrane organization: composition, regulation and roles of lipid rafts. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 18, 361–374.
- Shah, N., Ishii, M., Brandon, C., Ablonczy, Z., Cai, J., Liu, Y., Chou, C.J., and Rohrer, B. (2018). Extracellular vesicle-mediated long-range communication in stressed retinal pigment epithelial cell monolayers. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Mol. Basis Dis.* 1864, 2610–2622.
- Sharma, S., Das, K., Woo, J., and Gimzewski, J.K. (2014). Nanofilaments on glioblastoma exosomes revealed by peak force microscopy. *J. R. Soc. Interface* 11, 20131150–20131150.
- Sharovskaja, Ju.Ju., Vaiman, A.V., Solomatina, N.A., and Kobliakov, V.A. (2004). Inhibition of Gap Junction Intercellular Communications in Cell Culture by Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAH) in the Absence of PAH Metabolism. *Biochem. Mosc.* 69, 413–419.
- Sheller, S., Papaconstantinou, J., Urrabaz-Garza, R., Richardson, L., Saade, G., Salomon, C., and Menon, R. (2016). Amnion-Epithelial-Cell-Derived Exosomes Demonstrate Physiologic State of Cell under Oxidative Stress. *PLOS ONE* 11, e0157614.
- Shiau, J.-Y., Chang, Y.-Q., Nakagawa-Goto, K., Lee, K.-H., and Shyur, L.-F. (2017). Phytoagent Deoxyelephantopin and Its Derivative Inhibit Triple Negative Breast Cancer Cell Activity through ROS-Mediated Exosomal Activity and Protein Functions. *Front. Pharmacol.* 8, 398.
- Shiizaki, K., Kawanishi, M., and Yagi, T. (2017). Modulation of benzo[a]pyrene–DNA adduct formation by CYP1 inducer and inhibitor. *Genes Environ.* 39.
- Shimada, T., and Guengerich, F.P. (2006). Inhibition of human cytochrome P450 1A1-, 1A2-, and 1B1-mediated activation of procarcinogens to genotoxic metabolites by polycyclic aromatic hydrocarbons. *Chem. Res. Toxicol.* 19, 288–294.
- Shimamoto, N. (2013). [A pathophysiological role of cytochrome p450 involved in production of reactive oxygen species]. *Yakugaku Zasshi* 133, 435–450.
- Singh, V.K., Patel, D.K., Ram, S., Mathur, N., Siddiqui, M.K.J., and Behari, J.R. (2008a). Blood Levels of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in Children of Lucknow, India. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 54, 348–354.
- Singh, V.K., Patel, D.K., Jyoti, Ram, S., Mathur, N., and Siddiqui, M.K.J. (2008b). Blood levels of polycyclic aromatic hydrocarbons in children and their association with oxidative stress indices: An Indian perspective. *Clin. Biochem.* 41, 152–161.
- Sirois, I., Raymond, M.-A., Brassard, N., Cailhier, J.-F., Fedjaev, M., Hamelin, K., Londono, I., Bendayan, M., Pshezhetsky, A.V., and Hébert, M.-J. (2011). Caspase-3-dependent export of TCTP: a novel pathway for antiapoptotic intercellular communication. *Cell Death Differ.* 18, 549–562.
- Skotland, T., Sandvig, K., and Llorente, A. (2017). Lipids in exosomes: Current knowledge and the way forward. *Prog. Lipid Res.* 66, 30–41.
- Skotland, T., Hessvik, N.P., Sandvig, K., and Llorente, A. (2019). Exosomal lipid composition and the role of ether lipids and phosphoinositides in exosome biology. *J. Lipid Res.* 60, 9–18.
- Skotland, T., Sagini, K., Sandvig, K., and Llorente, A. (2020). An emerging focus on lipids in extracellular vesicles. *Adv. Drug Deliv. Rev.*

- Söderberg, A., Barral, A.M., Söderström, M., Sander, B., and Rosén, A. (2007). Redox-signaling transmitted in trans to neighboring cells by melanoma-derived TNF-containing exosomes. *Free Radic. Biol. Med.* *43*, 90–99.
- Sohn, W., Kim, J., Kang, S.H., Yang, S.R., Cho, J.-Y., Cho, H.C., Shim, S.G., and Paik, Y.-H. (2015). Serum exosomal microRNAs as novel biomarkers for hepatocellular carcinoma. *Exp. Mol. Med.* *47*, e184–e184.
- Solhaug, A., Refsnes, M., and Holme, J.A. (2004a). Role of cell signalling involved in induction of apoptosis by benzo[a]pyrene and cyclopenta[c,d]pyrene in Hepa1c1c7 cells. *J. Cell. Biochem.* *93*, 1143–1154.
- Solhaug, A., Refsnes, M., Låg, M., Schwarze, P.E., Husøy, T., and Holme, J.A. (2004b). Polycyclic aromatic hydrocarbons induce both apoptotic and anti-apoptotic signals in Hepa1c1c7 cells. *Carcinogenesis* *25*, 809–819.
- Solhaug, A., Øvrebø, S., Mollerup, S., Låg, M., Schwarze, P.E., Nesnow, S., and Holme, J.A. (2005). Role of cell signaling in B[a]P-induced apoptosis: characterization of unspecific effects of cell signaling inhibitors and apoptotic effects of B[a]P metabolites. *Chem. Biol. Interact.* *151*, 101–119.
- Söllvander, S., Nikitidou, E., Brolin, R., Söderberg, L., Sehlin, D., Lannfelt, L., and Erlandsson, A. (2016). Accumulation of amyloid- β by astrocytes result in enlarged endosomes and microvesicle-induced apoptosis of neurons. *Mol. Neurodegener.* *11*.
- Somiya, M. (2020). Where does the cargo go?: Solutions to provide experimental support for the “extracellular vesicle cargo transfer hypothesis.” *J. Cell Commun. Signal.*
- Song, X.F., Chen, Z.Y., Zang, Z.J., Zhang, Y.N., Zeng, F., Peng, Y.P., and Yang, C. (2013). Investigation of polycyclic aromatic hydrocarbon level in blood and semen quality for residents in Pearl River Delta Region in China. *Environ. Int.* *60*, 97–105.
- Stassen, F.R.M., van Eijck, P.H., Savelkoul, P.H.M., Wouters, E.F.M., Rohde, G.G.U., Briedé, J.J., Reynaert, N.L., de Kok, T.M., and Benedikter, B.J. (2019). Cell Type- and Exposure-Specific Modulation of CD63/CD81-Positive and Tissue Factor-Positive Extracellular Vesicle Release in response to Respiratory Toxicants. *Oxid. Med. Cell. Longev.* *2019*, 1–9.
- Stenqvist, A.-C., Nagaeva, O., Baranov, V., and Mincheva-Nilsson, L. (2013). Exosomes Secreted by Human Placenta Carry Functional Fas Ligand and TRAIL Molecules and Convey Apoptosis in Activated Immune Cells, Suggesting Exosome-Mediated Immune Privilege of the Fetus. *J. Immunol.* *191*, 5515–5523.
- Stępnik, M., Spryszyńska, S., Smok-Pieniążek, A., Ferlińska, M., Roszak, J., and Nocuń, M. (2015). The modulating effect of ATM, ATR, DNA-PK inhibitors on the cytotoxicity and genotoxicity of benzo[a]pyrene in human hepatocellular cancer cell line HepG2. *Environ. Toxicol. Pharmacol.* *40*, 988–996.
- Stoock, A., Keller, S., Riedle, S., Sanderson, M.P., Runz, S., Le Naour, F., Gutwein, P., Ludwig, A., Rubinstein, E., and Altevogt, P. (2006). A role for exosomes in the constitutive and stimulus-induced ectodomain cleavage of L1 and CD44. *Biochem. J.* *393*, 609–618.
- Stogiannidis, E., and Laane, R. (2015). Source Characterization of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons by Using Their Molecular Indices: An Overview of Possibilities. In *Reviews of Environmental Contamination and Toxicology*, D.M. Whitacre, ed. (Cham: Springer International Publishing), pp. 49–133.
- Strauss, K., Goebel, C., Runz, H., Möbius, W., Weiss, S., Feussner, I., Simons, M., and Schneider, A. (2010). Exosome Secretion Ameliorates Lysosomal Storage of Cholesterol in Niemann-Pick Type C Disease. *J. Biol. Chem.* *285*, 26279–26288.
- Strimbu, K., and Tavel, J.A. (2010). What are biomarkers?: *Curr. Opin. HIV AIDS* *5*, 463–466.
- Strzelak, A., Ratajczak, A., Adamiec, A., and Feleszko, W. (2018). Tobacco Smoke Induces and Alters Immune Responses in the Lung Triggering Inflammation, Allergy, Asthma and Other Lung Diseases: A Mechanistic Review. *Int. J. Environ. Res. Public Health* *15*, 1033.
- Su, J.-G.J., Liao, P.-J., Huang, M.-C., Chu, W.-C., Lin, S.-C., and Chang, Y.-J. (2008). Aldo-keto reductase 1C2 is essential for 1-nitropyrene's but not for benzo[a]pyrene's induction of p53 phosphorylation and apoptosis. *Toxicology* *244*, 257–270.

- Su, Y., Zhao, B., Guo, F., Bin, Z., Yang, Y., Liu, S., Han, Y., Niu, J., Ke, X., Wang, N., et al. (2014). Interaction of benzo[a]pyrene with other risk factors in hepatocellular carcinoma: a case-control study in Xiamen, China. *Ann. Epidemiol.* *24*, 98–103.
- 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.
- Sugimachi, K., Matsumura, T., Hirata, H., Uchi, R., Ueda, M., Ueo, H., Shinden, Y., Iguchi, T., Eguchi, H., Shirabe, K., et al. (2015). Identification of a bona fide microRNA biomarker in serum exosomes that predicts hepatocellular carcinoma recurrence after liver transplantation. *Br. J. Cancer* *112*, 532–538.
- Sukriti, S., Maras, J.S., Bihari, C., Das, S., Vyas, A.K., Sharma, S., Hussain, S., Shasthry, S., Choudhary, A., Premkumar, M., et al. (2018). Microvesicles in hepatic and peripheral vein can predict nonresponse to corticosteroid therapy in severe alcoholic hepatitis. *Aliment. Pharmacol. Ther.* *47*, 1151–1161.
- Sullivan, K.D., Galbraith, M.D., Andrysiak, Z., and Espinosa, J.M. (2018). Mechanisms of transcriptional regulation by p53. *Cell Death Differ.* *25*, 133–143.
- Sundar, I.K., Li, D., and Rahman, I. (2019). Proteomic Analysis of Plasma-Derived Extracellular Vesicles in Smokers and Patients with Chronic Obstructive Pulmonary Disease. *ACS Omega* *4*, 10649–10661.
- Szabo, G., and Momen-Heravi, F. (2017). Extracellular vesicles in liver disease and potential as biomarkers and therapeutic targets. *Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol.*
- Szabó-Taylor, K., Ryan, B., Osteikoetxea, X., Szabó, T.G., Sódar, B., Holub, M., Németh, A., Pálóczi, K., Pállinger, É., Winyard, P., et al. (2015). Oxidative and other posttranslational modifications in extracellular vesicle biology. *Semin. Cell Dev. Biol.* *40*, 8–16.
- Szabó-Taylor, K.É., Tóth, E.Á., Balogh, A.M., Sódar, B.W., Kádár, L., Pálóczi, K., Fekete, N., Németh, A., Osteikoetxea, X., Vukman, K.V., et al. (2017). Monocyte activation drives preservation of membrane thiols by promoting release of oxidised membrane moieties via extracellular vesicles. *Free Radic. Biol. Med.* *108*, 56–65.
- Takahashi, A., Okada, R., Nagao, K., Kawamata, Y., Hanyu, A., Yoshimoto, S., Takasugi, M., Watanabe, S., Kanemaki, M.T., Obuse, C., et al. (2017). Exosomes maintain cellular homeostasis by excreting harmful DNA from cells. *Nat. Commun.* *8*, 15287.
- Takahashi, Y., Nishikawa, M., Shinotsuka, H., Matsui, Y., Ohara, S., Imai, T., and Takakura, Y. (2013). Visualization and in vivo tracking of the exosomes of murine melanoma B16-BL6 cells in mice after intravenous injection. *J. Biotechnol.* *165*, 77–84.
- Tan, W., Zhang, Y., Li, M., Zhu, X., Yang, X., Wang, J., Zhang, S., Zhu, W., Cao, J., Yang, H., et al. (2019). miR-27a-containing Exosomes Secreted by Irradiated Skin Keratinocytes Delayed the Migration of Unirradiated Skin Fibroblasts. *Int. J. Biol. Sci.* *15*, 2240–2255.
- Tanaka, K., Tsuji, I., Wakai, K., Nagata, C., Mizoue, T., Inoue, M., and Tsugane, S. (2006). Cigarette Smoking and Liver Cancer Risk: An Evaluation Based on a Systematic Review of Epidemiologic Evidence among Japanese. *Jpn. J. Clin. Oncol.* *36*, 445–456.
- Tang, J., Li, Y., Liu, K., Zhu, Q., Yang, W.-H., Xiong, L.-K., and Guo, D.-L. (2018). Exosomal miR-9-3p suppresses HBGF-5 expression and is a functional biomarker in hepatocellular carcinoma. *Minerva Med.* *109*, 15–23.
- Tarnow, P., Tralau, T., and Luch, A. (2019). Chemical activation of estrogen and aryl hydrocarbon receptor signaling pathways and their interaction in toxicology and metabolism. *Expert Opin. Drug Metab. Toxicol.* *15*, 219–229.
- Taylor, D.D., and Gerçel-Taylor, C. (2005). Tumour-derived exosomes and their role in cancer-associated T-cell signalling defects. *Br. J. Cancer* *92*, 305–311.
- Tekpli, X., Rissel, M., Huc, L., Catheline, D., Sergent, O., Rioux, V., Legrand, P., Holme, J.A., Dimanche-Boitreil, M.-T., and Lagadic-Gossmann, D. (2010). Membrane remodeling, an early event in benzo[α]pyrene-induced apoptosis. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* *243*, 68–76.

- Tekpli, X., Huc, L., Sergent, O., Dendelé, B., Dimanche-Boitrel, M.-T., Holme, J.A., and Lagadic-Gossman, D. (2012). NHE-1 relocation outside cholesterol-rich membrane microdomains is associated with its benzo [a] pyrene-related apoptotic function. *Cell. Physiol. Biochem.* 29, 657–666.
- Teoh, N.C., Ajamieh, H., Wong, H.J., Croft, K., Mori, T., Allison, A.C., and Farrell, G.C. (2014). Microparticles Mediate Hepatic Ischemia-Reperfusion Injury and Are the Targets of Diannexin (ASP8597). *PLoS ONE* 9, e104376.
- Terman, A., and Kurz, T. (2013). Lysosomal Iron, Iron Chelation, and Cell Death. *Antioxid. Redox Signal.* 18, 888–898.
- Tête, A., Gallais, I., Imran, M., Chevanne, M., Lamin, M., Sparfel, L., Bucher, S., Burel, A., Podechard, N., Appenzeller, B.M.R., et al. (2018). Mechanisms involved in the death of steatotic WIF-B9 hepatocytes co-exposed to benzo[a]pyrene and ethanol: a possible key role for xenobiotic metabolism and nitric oxide. *Free Radic. Biol. Med.* 129, 323–337.
- Théry, C., Boussac, M., Véron, P., Ricciardi-Castagnoli, P., Raposo, G., and Garin, J. (2001). Proteomic analysis of dendritic cell-derived exosomes: a secreted subcellular compartment distinct from apoptotic vesicles. *J Immunol* 166.
- Théry, C., Amigorena, S., Raposo, G., and 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.
- 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.
- Thom, S.R., Bhopale, V.M., and Yang, M. (2014). Neutrophils Generate Microparticles during Exposure to Inert Gases Due to Cytoskeletal Oxidative Stress. *J. Biol. Chem.* 289, 18831–18845.
- Thom, S.R., Bhopale, V.M., Hu, J., and Yang, M. (2017). Increased carbon dioxide levels stimulate neutrophils to produce microparticles and activate the nucleotide-binding domain-like receptor 3 inflammasome. *Free Radic. Biol. Med.* 106, 406–416.
- Tian, C., Gao, L., Zimmerman, M.C., and Zucker, I.H. (2018). Myocardial infarction-induced microRNA-enriched exosomes contribute to cardiac Nrf2 dysregulation in chronic heart failure. *Am. J. Physiol.-Heart Circ. Physiol.* 314, H928–H939.
- Tian, M., Zhao, B., Zhang, J., Martin, F.L., Huang, Q., Liu, L., and Shen, H. (2016). Association of environmental benzo[a]pyrene exposure and DNA methylation alterations in hepatocellular carcinoma: A Chinese case–control study. *Sci. Total Environ.* 541, 1243–1252.
- Tian, T., Zhu, Y.-L., Hu, F.-H., Wang, Y.-Y., Huang, N.-P., and Xiao, Z.-D. (2013). Dynamics of exosome internalization and trafficking. *J. Cell. Physiol.* 228, 1487–1495.
- Topinka, J., Marvanová, S., Vondráček, J., Sevastyanova, O., Nováková, Z., Krčmář, P., Pěňčíková, K., and Machala, M. (2008). DNA adducts formation and induction of apoptosis in rat liver epithelial ‘stem-like’ cells exposed to carcinogenic polycyclic aromatic hydrocarbons. *Mutat. Res. Mol. Mech. Mutagen.* 638, 122–132.
- Trajkovic, K., Hsu, C., Chiantia, S., Rajendran, L., Wenzel, D., Wieland, F., Schwille, P., Brügger, B., and Simons, M. (2008). Ceramide triggers budding of exosome vesicles into multivesicular endosomes. *Science* 319, 1244–1247.
- Tricarico, C., Clancy, J., and D’Souza-Schorey, C. (2017). Biology and biogenesis of shed microvesicles. *Small GTPases* 8, 220–232.
- Tucher, C., Bode, K., Schiller, P., Claßen, L., Birr, C., Souto-Carneiro, M.M., Blank, N., Lorenz, H.-M., and Schiller, M. (2018). Extracellular Vesicle Subtypes Released From Activated or Apoptotic T-Lymphocytes Carry a Specific and Stimulus-Dependent Protein Cargo. *Front. Immunol.* 9, 534.
- Turchinovich, A., Drapkina, O., and Tonevitsky, A. (2019). Transcriptome of Extracellular Vesicles: State-of-the-Art. *Front. Immunol.* 10.

- Uno, S., Dalton, T.P., Dragin, N., Curran, C.P., Derkenne, S., Miller, M.L., Shertzer, H.G., Gonzalez, F.J., and Nebert, D.W. (2006). Oral Benzo[*a*]pyrene in *Cyp1* Knockout Mouse Lines: CYP1A1 Important in Detoxication, CYP1B1 Metabolism Required for Immune Damage Independent of Total-Body Burden and Clearance Rate. *Mol. Pharmacol.* *69*, 1103–1114.
- Uno, S., Nebert, D.W., and Makishima, M. (2018). Cytochrome P450 1A1 (CYP1A1) protects against nonalcoholic fatty liver disease caused by Western diet containing benzo[*a*]pyrene in mice. *Food Chem. Toxicol.* *113*, 73–82.
- 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.
- Vatsyayan, R., Kothari, H., Pendurthi, U.R., and Rao, L.V.M. (2013). 4-Hydroxy-2-Nonenal Enhances Tissue Factor Activity in Human Monocytic Cells via p38 Mitogen-Activated Protein Kinase Activation-Dependent Phosphatidylserine Exposure. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* *33*, 1601–1611.
- Vázquez-Gómez, G., Rocha-Zavaleta, L., Rodríguez-Sosa, M., Petrosyan, P., and Rubio-Lightbourn, J. (2018). Benzo[*a*]pyrene activates an AhR/Src/ERK axis that contributes to CYP1A1 induction and stable DNA adducts formation in lung cells. *Toxicol. Lett.* *289*, 54–62.
- 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, V.K., Li, H., Wang, R., Hirsova, P., Mushref, M., Liu, Y., Cao, S., Contreras, P.C., Malhi, H., Kamath, P.S., et al. (2016). Alcohol stimulates macrophage activation through caspase-dependent hepatocyte derived release of CD40L containing extracellular vesicles. *J. Hepatol.* *64*, 651–660.
- Vesselinovitch et al. (1976). Conditions Modifying Development of Tumors in Mice at Various Sites by Benzo(*a*)pyrene: *J. Occup. Environ. Med.* *18*, 576.
- Villarroya-Beltri, C., Baixauli, F., Mittelbrunn, M., Fernández-Delgado, I., Torralba, D., Moreno-Gonzalo, O., Baldanta, S., Enrich, C., Guerra, S., and Sánchez-Madrid, F. (2016). ISGylation controls exosome secretion by promoting lysosomal degradation of MVB proteins. *Nat. Commun.* *7*, 13588.
- Vondráček, J., Krčmář, P., Procházková, J., Trilecová, L., Gavelová, M., Skálová, L., Sztóková, B., Bunčák, M., Radilová, H., Kozubík, A., et al. (2009). The role of aryl hydrocarbon receptor in regulation of enzymes involved in metabolic activation of polycyclic aromatic hydrocarbons in a model of rat liver progenitor cells. *Chem. Biol. Interact.* *180*, 226–237.
- Vondráček, J., Pěnčíková, K., Neča, J., Ciganek, M., Grycová, A., Dvořák, Z., and Machala, M. (2017). Assessment of the aryl hydrocarbon receptor-mediated activities of polycyclic aromatic hydrocarbons in a human cell-based reporter gene assay. *Environ. Pollut.* *220*, 307–316.
- Vorselen, D., van Dommelen, S.M., Sorkin, R., Piontek, M.C., Schiller, J., Döpp, S.T., Kooijmans, S.A.A., van Oirschot, B.A., Versluijs, B.A., Bierings, M.B., et al. (2018). The fluid membrane determines mechanics of erythrocyte extracellular vesicles and is softened in hereditary spherocytosis. *Nat. Commun.* *9*, 4960.
- Wahlang, B., Jin, J., Beier, J.I., Hardesty, J.E., Daly, E.F., Schnegelberger, R.D., Falkner, K.C., Prough, R.A., Kirpich, I.A., and Cave, M.C. (2019). Mechanisms of Environmental Contributions to Fatty Liver Disease. *Curr. Environ. Health Rep.* *6*, 80–94.
- Walker, D.I., Pennell, K.D., Uppal, K., Xia, X., Hopke, P.K., Utell, M.J., Phipps, R.P., Sime, P.J., Rohrbeck, P., Mallon, C.T.M., et al. (2016). Pilot Metabolome-Wide Association Study of Benzo(*a*)pyrene in Serum From Military Personnel: *J. Occup. Environ. Med.* *58*, S44–S52.
- Wan, L., Xia, T., Du, Y., Liu, J., Xie, Y., Zhang, Y., Guan, F., Wu, J., Wang, X., and Shi, C. (2019). Exosomes from activated hepatic stellate cells contain GLUT1 and PKM2: a role for exosomes in metabolic switch of liver nonparenchymal cells. *FASEB J.* *fj.201802675R*.
- Wang, Q., and Xue, Y. (2015). Characterization of Solid Tumors Induced by Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in Mice. *Med. Sci. Monit. Basic Res.* *21*, 81–85.

- Wang, A.L., Lukas, T.J., Yuan, M., Du, N., Handa, J.T., and Neufeld, A.H. (2009a). Changes in Retinal Pigment Epithelium Related to Cigarette Smoke: Possible Relevance to Smoking as a Risk Factor for Age-Related Macular Degeneration. *PLoS ONE* 4, e5304.
- Wang, F., Gómez-Sintes, R., and Boya, P. (2018a). Lysosomal membrane permeabilization and cell death. *Traffic* 19, 918–931.
- Wang, G., Dinkins, M., He, Q., Zhu, G., Poirier, C., Campbell, A., Mayer-Proschel, M., and Bieberich, E. (2012a). Astrocytes Secrete Exosomes Enriched with Proapoptotic Ceramide and Prostate Apoptosis Response 4 (PAR-4): POTENTIAL MECHANISM OF APOPTOSIS INDUCTION IN ALZHEIMER DISEASE (AD). *J. Biol. Chem.* 287, 21384–21395.
- Wang, H., Wang, Z.-H., Kong, J., Yang, M.-Y., Jiang, G.-H., Wang, X.-P., Zhong, M., Zhang, Y., Deng, J.-T., and Zhang, W. (2012b). Oxidized Low-Density Lipoprotein-Dependent Platelet-Derived Microvesicles Trigger Procoagulant Effects and Amplify Oxidative Stress. *Mol. Med.* 18, 159–166.
- Wang, H., Hou, L., Li, A., Duan, Y., Gao, H., and Song, X. (2014). Expression of Serum Exosomal MicroRNA-21 in Human Hepatocellular Carcinoma. *BioMed Res. Int.* 2014, 1–5.
- 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. (2019a). 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, I.-J., Karmaus, W.J.J., and Yang, C.-C. (2017). Polycyclic aromatic hydrocarbons exposure, oxidative stress, and asthma in children. *Int. Arch. Occup. Environ. Health* 90, 297–303.
- Wang, J.-J., Wang, Z.-Y., Chen, R., Xiong, J., Yao, Y.-L., Wu, J.-H., and Li, G.-X. (2015a). Macrophage-secreted Exosomes Delivering miRNA-21 Inhibitor can Regulate BGC-823 Cell Proliferation. *Asian Pac. J. Cancer Prev.* 16, 4203–4209.
- Wang, R., Bi, J., Ampah, K.K., Ba, X., Liu, W., and Zeng, X. (2013). Lipid rafts control human melanoma cell migration by regulating focal adhesion disassembly. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Mol. Cell Res.* 1833, 3195–3205.
- Wang, R., Ding, Q., Yaqoob, U., de Assuncao, T.M., Verma, V.K., Hirsova, P., Cao, S., Mukhopadhyay, D., Huebert, R.C., and Shah, V.H. (2015b). Exosome Adherence and Internalization by Hepatic Stellate Cells Triggers Sphingosine 1-Phosphate-dependent Migration. *J. Biol. Chem.* 290, 30684–30696.
- Wang, X., Cheng, Z., Dai, L., Jiang, T., Jia, L., Jing, X., An, L., Wang, H., and Liu, M. (2019b). Knockdown of Long Noncoding RNA H19 Represses the Progress of Pulmonary Fibrosis through the Transforming Growth Factor β /Smad3 Pathway by Regulating MicroRNA 140. *Mol. Cell. Biol.* 39.
- Wang, Y., Zhang, C., Zhang, P., Guo, G., Jiang, T., Zhao, X., Jiang, J., Huang, X., Tong, H., and Tian, Y. (2018b). Serum exosomal microRNAs combined with alpha-fetoprotein as diagnostic markers of hepatocellular carcinoma. *Cancer Med.* 7, 1670–1679.
- Wang, Z., Yang, H., Ramesh, A., Roberts, L.J., Zhou, L., Lin, X., Zhao, Y., and Guo, Z. (2009b). Overexpression of Cu/Zn-superoxide dismutase and/or catalase accelerates benzo(a)pyrene detoxification by upregulation of the aryl hydrocarbon receptor in mouse endothelial cells. *Free Radic. Biol. Med.* 47, 1221–1229.
- Webber, J., and Clayton, A. (2013). How pure are your vesicles? *J. Extracell. Vesicles* 2, 19861.
- Wei, P., Zhang, J., Egan-Ha, M., and Moore, D.D. (2000). The nuclear receptor CAR mediates specific xenobiotic induction of drug metabolism. *407*, 4.
- Wei, P., Zhang, J., Dowhan, D.H., Han, Y., and Moore, D.D. (2002). Specific and overlapping functions of the nuclear hormone receptors CAR and PXR in xenobiotic response. *Pharmacogenomics J.* 2, 117–126.
- Weisz (2003). Acidification and protein traffic. *Int. Rev. Cytol.* 226, 259–319.

- Welsh, J.A., Scorletti, E., Clough, G.F., Englyst, N.A., and Byrne, C.D. (2018). Leukocyte extracellular vesicle concentration is inversely associated with liver fibrosis severity in NAFLD. *J. Leukoc. Biol.* *104*, 631–639.
- Wenger, D., Gerecke, A.C., Heeb, N.V., Schmid, P., Hueglin, C., Naegeli, H., and Zenobi, R. (2009). *In vitro* estrogenicity of ambient particulate matter: contribution of hydroxylated polycyclic aromatic hydrocarbons. *J. Appl. Toxicol.* *29*, 223–232.
- Wester, P.W., Muller, J.J.A., Slob, W., Mohn, G.R., Dortant, P.M., and Kroese, E.D. (2012). Carcinogenic activity of benzo[a]pyrene in a 2 year oral study in Wistar rats. *Food Chem. Toxicol.* *50*, 927–935.
- Westman, O., Nordén, M., Larsson, M., Johansson, J., Venizelos, N., Hollert, H., and Engwall, M. (2013). Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) reduce hepatic β -oxidation of fatty acids in chick embryos. *Environ. Sci. Pollut. Res.* *20*, 1881–1888.
- Wetmore, B.A., Brees, D.J., Singh, R., Watkins, P.B., Andersen, M.E., Loy, J., and Thomas, R.S. (2010). Quantitative analyses and transcriptomic profiling of circulating messenger RNAs as biomarkers of rat liver injury. *Hepatology* *51*, 2127–2139.
- WHO (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).
- Wieckowski, E.U., Visus, C., Szajnik, M., Szczepanski, M.J., Storkus, W.J., and Whiteside, T.L. (2009). Tumor-Derived Microvesicles Promote Regulatory T Cell Expansion and Induce Apoptosis in Tumor-Reactive Activated CD8+ T Lymphocytes. *J. Immunol.* *183*, 3720–3730.
- Wills, L.P., Jung, D., Koehn, K., Zhu, S., Willett, K.L., Hinton, D.E., and Di Giulio, R.T. (2010). Comparative Chronic Liver Toxicity of Benzo[a]pyrene in Two Populations of the Atlantic Killifish (*Fundulus heteroclitus*) with Different Exposure Histories. *Environ. Health Perspect.* *118*, 1376–1381.
- Winberg, L.K., Jacobsen, S., and Nielsen, C.H. (2017). Microparticles from patients with systemic lupus erythematosus induce production of reactive oxygen species and degranulation of polymorphonuclear leukocytes. *Arthritis Res. Ther.* *19*, 230.
- Wislocki, P.G., Bagan, E.S., Lu, A.Y.H., Dooley, K.L., Fu, PeterP., Han-Hsu, H., Beland, F.A., and Kadlubar, F.F. (1986). Tumorigenicity of nitrated derivatives of pyrene, benz[a]anthracene, chrysene and benzo[a]pyrene in the newborn mouse assay. *Carcinogenesis* *7*, 1317–1322.
- Witek, R.P., Yang, L., Liu, R., Jung, Y., Omenetti, A., Syn, W., Choi, S.S., Cheong, Y., Fearing, C.M., Agboola, K.M., et al. (2009). Liver Cell-Derived Microparticles Activate Hedgehog Signaling and Alter Gene Expression in Hepatic Endothelial Cells. *Gastroenterology* *136*, 320-330.e2.
- Wu, H.-C., Wang, Q., Wang, L.-W., Yang, H.-I., Ahsan, H., Tsai, W.-Y., Wang, L.-Y., Chen, S.-Y., Chen, C.-J., and Santella, R.M. (2007). Polycyclic aromatic hydrocarbon- and aflatoxin-albumin adducts, hepatitis B virus infection and hepatocellular carcinoma in Taiwan. *Cancer Lett.* *252*, 104–114.
- Xia, X., Carroll-Haddad, A., Brown, N., Utell, M.J., Mallon, C.T.M., and Hopke, P.K. (2016). Polycyclic Aromatic Hydrocarbons and Polychlorinated Dibenzo-p-Dioxins/Dibenzofurans in Microliter Samples of Human Serum as Exposure Indicators: *J. Occup. Environ. Med.* *58*, S72–S79.
- Xu, C., Zhang, Y.H., Thangavel, M., Richardson, M.M., Liu, L., Zhou, B., Zheng, Y., Ostrom, R.S., and Zhang, X.A. (2009). CD82 endocytosis and cholesterol-dependent reorganization of tetraspanin webs and lipid rafts. *FASEB J.* *23*, 3273–3288.
- Xu, H., Ling, M., Xue, J., Dai, X., Sun, Q., Chen, C., Liu, Y., Zhou, L., Liu, J., Luo, F., et al. (2018). Exosomal microRNA-21 derived from bronchial epithelial cells is involved in aberrant epithelium-fibroblast cross-talk in COPD induced by cigarette smoking. *Theranostics* *8*, 5419–5433.
- Xu, Y., Luo, F., Liu, Y., Shi, L., Lu, X., Xu, W., and Liu, Q. (2015). Exosomal miR-21 derived from arsenite-transformed human bronchial epithelial cells promotes cell proliferation associated with arsenite carcinogenesis. *Arch. Toxicol.* *89*, 1071–1082.
- 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.

- Xue, X., Wang, X., Zhao, Y., Hu, R., and Qin, L. (2018). Exosomal miR-93 promotes proliferation and invasion in hepatocellular carcinoma by directly inhibiting TIMP2/TP53INP1/CDKN1A. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *502*, 515–521.
- Yamaguchi, K., Near, R., Shneider, A., Cui, H., Ju, S.-T., and Sherr, D.H. (1996). Fluoranthene-Induced Apoptosis in Murine T Cell Hybridomas Is Independent of the Aromatic Hydrocarbon Receptor. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* *139*, 144–152.
- Yamaguchi, K., Near, R.I., Matulka, R.A., Shneider, A., Toselli, P., Trombino, A.F., and Sherr, D.H. (1997). Activation of the aryl hydrocarbon receptor/transcription factor and bone marrow stromal cell-dependent preB cell apoptosis. *J. Immunol.* *158*, 2165.
- Yáñez-Mó, M., Barreiro, O., Gordon-Alonso, M., Sala-Valdés, M., and Sánchez-Madrid, F. (2009). Tetraspanin-enriched microdomains: a functional unit in cell plasma membranes. *Trends Cell Biol.* *19*, 434–446.
- Yáñez-Mó, M., Siljander, P.R.-M., Andreu, Z., Bedina Zavec, A., Borràs, F.E., Buzas, E.I., Buzas, K., Casal, E., Cappello, F., Carvalho, J., et al. (2015). Biological properties of extracellular vesicles and their physiological functions. *J. Extracell. Vesicles* *4*, 27066.
- Yang, H., Shi, Z., Wang, X.-X., Cheng, R., Lu, M., Zhu, J., Deng, W., Zeng, Y., Zhao, L.-Y., and Zhang, S.-Y. (2019). Phenanthrene, but not its isomer anthracene, effectively activates both human and mouse nuclear receptor constitutive androstane receptor (CAR) and induces hepatotoxicity in mice. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* *378*, 114618.
- Yang, L., Wu, X.-H., Wang, D., Luo, C.-L., and Chen, L.-X. (2013). Bladder cancer cell-derived exosomes inhibit tumor cell apoptosis and induce cell proliferation in vitro. *Mol. Med. Rep.* *8*, 1272–1278.
- Yang, S.-T., Kreutzberger, A.J.B., Lee, J., Kiessling, V., and Tamm, L.K. (2016). The role of cholesterol in membrane fusion. *Chem. Phys. Lipids* *199*, 136–143.
- Yarana, C., and St. Clair, D. (2017). Chemotherapy-Induced Tissue Injury: An Insight into the Role of Extracellular Vesicles-Mediated Oxidative Stress Responses. *Antioxidants* *6*, 75.
- Yoshikawa, T., Ruhr, L.P., Flory, W., Giamalva, D., Church, D.F., and Pryor, W.A. (1985). Toxicity of polycyclic aromatic hydrocarbons. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* *79*, 218–226.
- Yu, G., Ji, J., and Shen, J. (2006a). Synthesis and characterization of cholesterol-poly(ethylene glycol)-poly(D,L-lactic acid) copolymers for promoting osteoblast attachment and proliferation. *J. Mater. Sci. Mater. Med.* *17*, 899–909.
- Yu, X., Harris, S.L., and Levine, A.J. (2006b). The Regulation of Exosome Secretion: a Novel Function of the p53 Protein. *Cancer Res.* *66*, 4795–4801.
- Yuan, J., Lu, W.-Q., Zou, Y.-L., Wei, W., Zhang, C., Xie, H., and Chen, X.-M. (2009). Influence of aroclor 1254 on benzo(a)pyrene-induced DNA breakage, oxidative DNA damage, and cytochrome P4501A activity in human hepatoma cell line. *Environ. Toxicol.* *24*, 327–333.
- Zha, J., Hong, X., Rao, H., Yuan, L., Wang, Z., and Kumaran, S.S. (2017). Benzo(a)pyrene-induced a mitochondria-independent apoptosis of liver in juvenile Chinese rare minnows (*Gobiocypris rarus*). *Environ. Pollut.* *231*, 191–199.
- Zhang, J., Wang, X., Vikash, V., Ye, Q., Wu, D., Liu, Y., and Dong, W. (2016a). ROS and ROS-Mediated Cellular Signaling. *Oxid. Med. Cell. Longev.* *2016*, 1–18.
- Zhang, M., Jin, K., Gao, L., Zhang, Z., Li, F., Zhou, F., and Zhang, L. (2018). Methods and Technologies for Exosome Isolation and Characterization. *Small Methods* *2*, 1800021.
- Zhang, Q., Shang, M., Zhang, M., Wang, Y., Chen, Y., Wu, Y., Liu, M., Song, J., and Liu, Y. (2016b). Microvesicles derived from hypoxia/reoxygenation-treated human umbilical vein endothelial cells promote apoptosis and oxidative stress in H9c2 cardiomyocytes. *BMC Cell Biol.* *17*.

- Zhang, W., Ma, Y., Zhang, Y., Yang, J., He, G., and Chen, S. (2019). Photo-Oxidative Blue-Light Stimulation in Retinal Pigment Epithelium Cells Promotes Exosome Secretion and Increases the Activity of the NLRP3 Inflammasome. *Curr. Eye Res.* *44*, 67–75.
- Zhang, X.-J., Shi, Z., Lyv, J.-X., He, X., Englert, N.A., and Zhang, S.-Y. (2015). Pyrene is a Novel Constitutive Androstane Receptor (CAR) Activator and Causes Hepatotoxicity by CAR. *Toxicol. Sci.* *147*, 436–445.
- Zhang, Y., Dong, S., Wang, H., Tao, S., and Kiyama, R. (2016c). Biological impact of environmental polycyclic aromatic hydrocarbons (ePAHs) as endocrine disruptors. *Environ. Pollut.* *213*, 809–824.
- Zhao, A., Kong, F., Liu, C.-J., Yan, G., Gao, F., Guo, H., Guo, A.-Y., Chen, Z., and Li, Q. (2017). Tumor Cell-Derived Microvesicles Induced Not Epithelial-Mesenchymal Transition but Apoptosis in Human Proximal Tubular (HK-2) Cells: Implications for Renal Impairment in Multiple Myeloma. *Int. J. Mol. Sci.* *18*, 513.
- Zheng, J., Tan, J., Miao, Y.-Y., and Zhang, Q. (2019). Extracellular vesicles degradation pathway based autophagy lysosome pathway. *14*.
- Zheng, R., Du, M., Wang, X., Xu, W., Liang, J., Wang, W., Lv, Q., Qin, C., Chu, H., Wang, M., et al. (2018). Exosome-transmitted long non-coding RNA PTENP1 suppresses bladder cancer progression. *Mol. Cancer* *17*.
- Zhou, J., Li, H., Fu, Y., Shi, J., Hou, J., Zhang, Y., Liu, X., and Song, P. (2011). Arsenic trioxide induces procoagulant activity through phosphatidylserine exposure and microparticle generation in endothelial cells. *Thromb. Res.* *127*, 466–472.
- Zhou, J., Yang, Y., Wang, W., Zhang, Y., Chen, Z., Hao, C., and Zhang, J. (2018a). Melanoma-released exosomes directly activate the mitochondrial apoptotic pathway of CD4+ T cells through their microRNA cargo. *Exp. Cell Res.* *371*, 364–371.
- Zhou, P., Xiong, T., Yao, L., and Yuan, J. (2020). MicroRNA-665 promotes the proliferation of ovarian cancer cells by targeting SRCIN1. *Exp. Ther. Med.* *19*, 1112–1120.
- Zhou, Y., Ren, H., Dai, B., Li, J., Shang, L., Huang, J., and Shi, X. (2018b). Hepatocellular carcinoma-derived exosomal miRNA-21 contributes to tumor progression by converting hepatocyte stellate cells to cancer-associated fibroblasts. *J. Exp. Clin. Cancer Res.* *37*.
- Zhu, J., Zhao, L.-Y., Wang, X.-X., Shi, Z., Zhang, Y., Wu, G., and Zhang, S.-Y. (2018). Identification of hepatotoxicity and renal dysfunction of pyrene in adult male rats. *Environ. Toxicol.* *33*, 1304–1311.
- Zhu, L., Xiao, R., Zhang, X., Lang, Y., Liu, F., Yu, Z., Zhang, J., Su, Y., Lu, Y., and Wang, T. (2019). Spermine on Endothelial Extracellular Vesicles Mediates Smoking-Induced Pulmonary Hypertension Partially Through Calcium-Sensing Receptor. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* *39*, 482–495.
- Zhu, X.-Y., Xia, H.-G., Wang, Z.-H., Li, B., Jiang, H.-Y., Li, D.-L., Jin, R., and Jin, Y. (2020). In vitro and in vivo approaches for identifying the role of aryl hydrocarbon receptor in the development of nonalcoholic fatty liver disease. *Toxicol. Lett.* *319*, 85–94.
- 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.

ANNEXES

Liste des formations

- 2017**
- Formation à l'**expérimentation animale, niveau concepteurs et réalisations** – Oniris, Nantes *Module Lapins/Rongeurs*, Octobre) : 65 h
- 2018**
- Cours en ligne « **Basics of Extracellular Vesicles** » University of California, Irvine offered through Coursera (Février-Mars) : 5 semaines x 3 h
 - Formation Numérique « **First steps with Zotero** » UBL (janvier) : 2 h
 - Formation **Enseignement supérieur & Pédagogie et Pratique** « Parcours pédagogie universitaire » UBL, 19 heures
 - ✓ Module A : **Connaître l'enseignement supérieur : son contexte, ses étudiants** (approche programme) - février : 3 h
 - ✓ Module B : **Améliorer l'organisation de son cours pour faciliter l'apprentissage des étudiants** (structurer ses contenus et définir ses objectifs pédagogiques) - février : 6 h
 - ✓ Module C : **Choisir des stratégies d'enseignement actives pour soutenir la motivation et l'apprentissage en profondeur** - mars : 4 h
 - ✓ Module D : **Développer ses méthodes d'évaluation des apprentissages des étudiants** - avril : 3 h
 - ✓ Module E : **Usages des outils numériques en enseignement ?** Diversifier et améliorer ses pratiques - mai : 3 h
 - Formation **Team Management**, UBL, Juin, 12 h
 - Formation-Action **Regards croisés 2018**, UBL, Novembre, 16 h
- 2019**
- Formation **Ways and means from one's PHD to a career out of academic world**, UBL, février, 6 h *Préparer sa poursuite de carrière*
 - Formation **Gestion des conflits**, UBL, mars, 6 h
 - Formation-Action **Doctoriales Bretagne Loire 2019**, UBL, mai, 40 h
 - Formation **Sensibilisation à l'éthique de la recherche et à l'intégrité scientifique**, UBL, juin, 3 h
- 2020**
- Cours en ligne « **Introduction à l'économie de l'innovation** » Université de Bordeaux proposé par FUN-MOOC (Janvier-Février: 5 semaines x 5-10 h
 - Cours en ligne « **Financement de l'innovation** » Université de Montpellier proposé par FUN-MOOC (Mars-Avril) : 5 semaines x 3 h

Liste des enseignements

2018-2019 | **Vacation/mission** | Université de Rennes 1, UFR Sciences de la Matière et UFR Pharmacie

- 4h TD Biochimie - licence 2 Chimie
- 2 x 64h TP Biologie cellulaire - 2ème année Pharmacie (2018-2019)
- Corrections de compte-rendu
- 2h CM Communication cellulaire – Master 2 Biologie

2017-2019 | **Co-encadrante de stage** | Université de Rennes 1, IRSET

- 3 Stagiaires de 2ème année de Pharmacie (1 semaine) + participation au jury de l'oral de stage
- Stagiaire de 1ère année d'IUT Biologie (1 mois)
- Stagiaire de 4ème année de Pharmacie (1mois)
- Stagiaire de Master 1 Biologie (2 mois)

Liste des communications

Posters

2017 E. Le Ferrec, M. Le Goff, **N. Van Meteren**, R. Latour, N. Podechard, M. Fernier, M. Chevanne, F. Descaves, S. Chevanne, F. Gauffre, A. Burel, D. Lagadic-Gossmann et 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, Cancéropôle Grand Ouest** (Mars 2017, Rennes)
- **11èmes Journées du Cancéropôle Grand Ouest** (Juin, Vannes)

N. van Meteren, M. Chevanne, F. Descaves, F. Gauffre, S. Chevanne, A. Burel, D. Lagadic-Gossmann, E. Le Ferrec et O. Sergent

Cell death induced by polycyclic aromatic hydrocarbons, environmental pollutants : extracellular vesicles as biomarkers?

- **1er Congrès FSEV (Société Française des Vésicules Extracellulaires)** (Novembre, Paris)

2018 **N. van Meteren**, M. Chevanne, F. Descaves, F. Gauffre, S. Chevanne, A. Burel, D. Lagadic-Gossmann, E. Le Ferrec et O. Sergent

Cell death induced by polycyclic aromatic hydrocarbons, environmental pollutants : extracellular vesicles as biomarkers?

- **8ème "Journée recherche" sur le campus Santé de Villejean «Chimie, Biologie, Mathématiques et Physique, la recherche fondamentale au service du Médicament et de la Santé »** (Janvier, Rennes)

→Prix Jeune Chercheur-SFR Biosit de la Meilleure Affiche

N. van Meteren, M. Chevanne, F. Gauffre, S. Chevanne, A. Burel, I. Gallais, D. Lagadic-Gossmann, E. Le Ferrec et O. Sergent

Les vésicules extracellulaires, biomarqueurs précoces du risque de développement d'un hépatocarcinome induit par l'exposition chronique aux hydrocarbures aromatiques polycycliques

- **12èmes Journées du Cancéropôle Grand Ouest** (Juillet, Vannes)

2019 *N. van Meteren, M. Chevanne, F. Gauffre, S. Chevance, A. Burel, I. Gallais, D. Lagadic-Gossmann, E. Le Ferrec et O. Sergent*

Polycyclic aromatic hydrocarbons can trigger a hepatocyte release of cytotoxic extracellular vesicles

- **The International Liver Congress ILC 2019** (Avril, Vienne, Autriche)

Abstract : Journal of Hepatology, Volume 70, Issue 1, Supplement, 2019, Page e811, ISSN 0168-8278, [https://doi.org/10.1016/S0618-8278\(19\)31622-6](https://doi.org/10.1016/S0618-8278(19)31622-6)

N. van Meteren, D. Gobart, I. Gallais, E. Le Ferrec, D. Lagadic-Gossmann et O. Sergent

Extracellular vesicles are involved in polycyclic aromatic hydrocarbon hepatotoxicity

- **Eurotox 2019 55th Congress of the European Societies of Toxicology** (Septembre, Helsinki Finlande)

Abstract : Toxicology Letters, Elsevier, 2019, 314, pp.S187-S188

N. van Meteren, M. Chevanne, I. Gallais, F. Gauffre, S. Chevance, S. Bucher, N. Grova, B. Fromenty, B.M R Appenzeller, A. Burel, E. Le Ferrec, D. Lagadic-Gossmann et O. Sergent

Cholesterol could participate in hepatocyte release of extracellular vesicles by polycyclic aromatic hydrocarbons

- **2ème Congrès FSEV (Société Française des Vésicules Extracellulaires)** (Octobre, Nantes)

Communications orales

2018 *N. van Meteren, M. Chevanne, F. Gauffre, S. Chevance, A. Burel, D. Lagadic-Gossmann, E. Le Ferrec et O. Sergent*

Cell death induced by polycyclic aromatic hydrocarbons, environmental pollutants : extracellular vesicles as biomarkers?

- **6ème Journée des Jeunes Chercheurs de l'IRSET** (Janvier, Rennes)

N. van Meteren, M. Chevanne, F. Gauffre, S. Chevance, A. Burel, D. Lagadic-Gossmann, Er. Le Ferrec et O. Sergent

Extracellular vesicles, biomarkers and/or vectors of polycyclic aromatic hydrocarbon toxicity ?

- **Réunion d'unité IRSET** (Mars, Rennes)

N. van Meteren, M. Chevanne, F. Gauffre, S. Chevance, A. Burel, I. Gallais, D. Lagadic-Gossmann, E. Le Ferrec et O. Sergent

Les vésicules extracellulaires, biomarqueurs et/ou vecteurs de la toxicité hépatique des hydrocarbures aromatiques polycycliques

- **Visite de la direction de la recherche et de l'innovation de l'UR1 à l'IRSET** (Juin, Rennes)

N. van Meteren, M. Chevanne, F. Gauffre, S. Chevance, A. Burel, I. Gallais, D. Lagadic-Gossmann, E. Le Ferrec et O. Sergent

Extracellular vesicles, biomarkers and/or vectors of polycyclic aromatic hydrocarbon toxicity ?

- **4th GO-EV (grand-ouest extracellular vesicles) network meeting** (Octobre, Rennes)

- 2019** *N. van Meteren, D. Lagadic-Gossmann, I. Gallais, D. Gobart, F. Gauffre, S. Chevance, A. Burel, E. Le Ferrec et O. Sergent*
Polycyclic aromatic hydrocarbons induced extracellular vesicle release by hepatocytes : cellular and molecular mechanisms
- **Réunion d'unité IRSET** (Février, Rennes)
- N. van Meteren, D. Gobart, I. Gallais, E. Le Ferrec, D. Lagadic-Gossmann et O. Sergent*
Extracellular vesicles : vectors of polycyclic aromatic hydrocarbons hepatotoxicity?
- **Printemps de la recherche** (Mars, Rennes) → **Prix de la meilleure communication orale**
- N. van Meteren, D. Gobart, I. Gallais, E. Le Ferrec, D. Lagadic-Gossmann et O. Sergent*
Polycyclic aromatic hydrocarbons trigger a hepatocyte release of pro-apoptotic extracellular vesicles
- **2ème Congrès FSEV (Société Française des Vésicules Extracellulaires)** (Octobre, Nantes)
 → **Prix de la meilleure communication orale**
- 2020** *N. van Meteren, D. Gobart, A. Burel, I. Gallais, E. Le Ferrec, D. Lagadic-Gossmann et O. Sergent*
Polycyclic aromatic hydrocarbons trigger a hepatocyte release of pro-apoptotic extracellular vesicles
- **10ème "Journée recherche" sur le campus Santé de Villejean «Chimie, Biologie, Mathématiques et Physique, la recherche fondamentale au service du Médicament et de la Santé »** (Janvier, Rennes)
- N. van Meteren, D. Gobart, A. Burel, I. Gallais, E. Le Ferrec, D. Lagadic-Gossmann et O. Sergent*
Extracellular vesicles released by hepatocytes exposed to polycyclic aromatic hydrocarbons trigger apoptosis of target hepatocytes via iron
- **Liver Week 2020, 8^{ème} édition du colloque de Génomique Fonctionnelle du Foie** (Février, Rennes)

Liste des publications

- 2019** *N. van Meteren, D. Lagadic-Gossmann, M. Chevanne, I. Gallais, D. Gobart, A. Burel, S. Bucher, N. Grova, B. Fromenty, B.M.R. Appenzeller, S. Chevance, F. Gauffre, E. Le Ferrec, O. Sergent*, **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** (2019) 443–462.
<https://doi.org/10.1093/toxsci/kfz1576>
- 2020** *N. van Meteren, D. Lagadic-Gossmann, N. Podechard, D. Gobart, M. Chevanne, A. Collin, I. Gallais, A. Burel, A. Dupont, L. Rault, S. Chevance, F. Gauffre, E. Le Ferrec, O. Sergent*, **Extracellular vesicles released by polycyclic aromatic hydrocarbons-treated hepatocytes trigger oxidative stress in recipient hepatocytes by delivering iron**, in revision *Free Raf. Biol. Med.* (2020)

Titre : Les vésicules extracellulaires dans l'hépatotoxicité des hydrocarbures aromatiques polycycliques : biomarqueurs et/ou vecteurs?

Mots clés : hydrocarbures aromatiques polycycliques, vésicules extracellulaires, hépatocytes, apoptose, stress oxydant, hépatotoxicité, contaminants de l'environnement

Résumé : Les hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP) sont des toxiques de l'environnement, considérés pour certains comme hépatotoxiques. Les vésicules extracellulaires (VE) sont des nanostructures membranaires libérées par les cellules dans l'environnement extracellulaire, transportant des biomolécules pouvant être spécifiques de la cellule d'origine et du stress subi. Elles sont reconnues comme des acteurs majeurs de la communication intercellulaire et des médiateurs de la pathogénèse des maladies du foie. Concernant une exposition aux xénobiotiques, les VE apparaissent comme des biomarqueurs et des acteurs potentiels des dommages induits par les médicaments, mais à l'heure actuelle, rien n'est connu sur les maladies du foie liées à des toxiques chimiques.

Dans ce contexte, nous nous sommes intéressés à l'impact de trois HAP [*benzo(a)pyrène (BP)*, *dibenzo(a,h)anthracène (DBA)*, *pyrène (PYR)*] sur la libération de VE par deux types d'hépatocytes

(de la lignée WIF-B9 et de rat en culture primaire) et au rôle de ces VE dans les dommages hépatiques, en prêtant une attention particulière à la mort cellulaire, caractéristique clé des maladies du foie liées à des toxiques.

L'ensemble des trois HAP provoquent une mort des hépatocytes par apoptose, une augmentation de la libération de VE ainsi qu'une modification de leur contenu. L'augmentation de la production de VE est dépendante des mécanismes à l'origine de l'initiation de l'apoptose des hépatocytes par les HAP, à savoir l'activation des récepteurs aux xénobiotiques, le remodelage membranaire et le stress oxydant. Ces VE sont capables de provoquer la mort cellulaire par apoptose d'hépatocytes récepteurs non traités par les HAP, par un mécanisme impliquant l'endocytose des VE, le transfert de contenu pro-oxydant dont le fer, la génération d'un stress oxydant et une perméabilisation de la membrane des lysosomes.

Titre : Extracellular vesicles in polycyclic aromatic hydrocarbons hepatotoxicity : biomarkers and/or vectors ?

Keywords : polycyclic aromatic hydrocarbons, extracellular vesicles, hepatocytes, apoptosis, oxidative stress, hepatotoxicity, environmental contaminants

Abstract : Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) are environmental toxicants, that are considered for some of them as hepatotoxicants. Extracellular vesicles (EVs) are membrane-surrounded nanostructures released by cells into the extracellular environment transporting biomolecules, that can reflect their cellular origin and stress. EV are now recognized as major actors of intercellular communication and as pathogenic mediators in several liver diseases. Regarding xenobiotic liver injury, EVs emerge as potential biomarkers and actors of drug induced liver injury, yet nothing is known concerning toxicant-associated liver diseases.

In this context, we studied the effect of three PAH [*benzo(a)pyrene (BP)*, *dibenzo(a,h)anthracene (DBA)* and *pyrene (PYR)*] on EV release by two

hepatocytes models (*WIF-B9 cells and primary rat hepatocytes*) and the role of those EVs in liver damages with a special focus on cell death, key characteristic of toxicant-associated liver diseases

Exposure to any three PAH led to hepatocyte death by apoptosis, EV release and modified EV content. The increase in EV production was dependent on the mechanisms responsible for PAH-induced hepatocyte apoptosis namely activation of xenobiotic receptors, membrane remodelling and oxidative stress. Those EV were capable of causing apoptosis of recipient healthy hepatocytes by a mechanism involving EV endocytosis, transfer of pro-oxidant content including iron, oxidative stress generation and lysosome membrane permeabilization.