

Faculté de pharmacie et des sciences biomédicales

**Étude des cellules dendritiques dans la
production d'interféron de type I induite par
la silice cristalline**

Auteure : BÜYÜKKAYA Feyza

Promoteur : HUAUX François

Lecteurs : BINDELS Laure et LIMAYE Nisha

Année Académique : 2024-2025

Master en sciences biomédicales - Toxicologie

TABLE DES MATIÈRES

Abréviations.....	5
Résumé	7
Abstract.....	8
Résumé graphique.....	9
I. Introduction.....	10
Silice.....	10
Généralités.....	10
Mécanismes de toxicité.....	12
Silice et pathologies.....	14
Silicose.....	14
Pathologies favorisées par l'exposition à la silice.....	14
Maladies auto-immunes.....	15
Réponse interférons de type I.....	15
Composition des IFN-I.....	16
Fonctions des IFN-I.....	16
Signalisation et induction des IFN-I.....	17
Signalisation et induction des ISGs.....	18
Cellules dendritiques.....	19
Cellules dendritiques conventionnelles de type 1.....	20
Cellules dendritiques conventionnelles de type 2.....	20
Cellules de Langerhans.....	20
Cellules dendritiques plasmacytoïdes.....	20
Cellules dendritiques dérivés des monocytes.....	21
Cellules dendritiques et silice cristalline.....	22
II. Hypothèse de travail et objectif.....	23
III. Matériels et méthodes.....	24
Culture et différenciation de la lignée monocyttaire THP-1.....	24
Isolation, culture et différenciation des monocytes sanguins humains.....	25

Isolation des cellules mononuclées du sang périphérique.....	25
Isolation des cellules CD2 négatives.....	26
Isolation des monocytes (CD14 ⁺) depuis les CD2 ⁻	27
Différenciation des monocytes en macrophages M1 et M2.....	28
Différenciation des monocytes en cellules dendritiques immatures et matures.....	29
Min-U-Sil-5.....	30
Poly(I:C).....	31
Cytométrie en flux.....	32
ELISA.....	34
Extraction d'ARN et RT-qPCR.....	35
Extraction de l'ADN.....	36
Transcription inverse.....	36
Standards PCR.....	37
qPCR.....	38
IV. Résultats.....	39
Analyse phénotypique des monocytes THP-1 et de leurs dérivés par cytométrie en flux.....	39
Évaluation de la libération des cytokines pro-inflammatoires par les monocytes THP-1 et leurs dérivés.....	40
Évaluation de l'implication de la silice cristalline dans la production des transcrits d'IFN- β au sein du modèle THP-1.....	42
Analyse phénotypique des monocytes sanguins humains et de leurs dérivés traités ou non à la SCR.....	43
Analyse phénotypique des cinq types cellulaires étudiés.....	44
Analyse des changements phénotypiques des cinq types cellulaires étudiés après exposition à la SCR.....	45
Évaluation de l'implication des DC dans la réponse inflammatoire à la SCR.....	48
Évaluation de l'implication des DC dans la réponse IFN-I à la SCR.....	50
V. Discussion.....	51
VI. Références.....	55

Abréviations

AA	Antibiotiques-Antimycotiques
ADN	Acide Désoxyribonucléique
ADNc	Acide Désoxyribonucléique complémentaire
ARN	Acide Ribonucléique
ARNdb	ARN Double Brin
BMDC	Bone-Marrow Derived Dendritic Cell
cDC	Conventional Dendritic Cell
CPA	Cellules Présentatrices d'Antigènes
DAMPs	Damage-Associated Molecular Patterns
DMSO	Diméthylsulfoxyde
CIRC	Centre International de Recherche sur le Cancer
ELISA	Enzyme-Linked Immunosorbent Assay
FBS	Fetal Bovine Serum
GM-CSF	Granulocyte-Macrophage Colony Stimulating Factor
JAK/STAT	Janus Kinase/Signal Transducer and Activator of Transcription
IFN	Interféron
IFN-I	Interféron de type I
IFN α/β	Interféron α et β
IFNAR	IFN α/β Receptors
IL	Interleukine
IRF	Interferon Regulatory Factor
ISG	Interferon-Stimulated Gene
ISGF3	Interferon-Stimulated Gene Factor 3
ISRE	Interferon-Stimulated Response Element
Jak	Janus Kinase
LC	Langerhans Cell
MAI	Maladie Auto-Immune
MAVS	Mitochondrial Antiviral-Signalling Protein 5
MCF	Macrophage Colony Stimulating Factor
Mo-DC	Monocyte-Derived Dendritic Cell
NF- κ B	Nuclear Factor- κ B

NFS	Nearly Free Silanols
NLRP3	NOD-like Receptor Protein 3
PAMP	Pathogen-Associated Molecular Pattern
PBS	Phosphate-Buffered Saline
pDC	Plasmacytoïd Dendritic Cell
PMA	Phorbol-12-Myristate 13-Acetate
PRR	Pathogen Recognition Receptor
RIG-I	Retinoic Acid-Inducible Gene I
ROS	Reactive Oxygen Species
RT-qPCR	Real Time quantitative Polymerase Chain Reaction
SCR	Silice Cristalline Respirable
TLR	Toll-Like Receptor
TMB	3,3',5,5'-Tétraméthylbenzidine
TNF α	Tumor Necrosis Factor α
STAT	Signal Transducer and Activator of Transcription
STING	Stimulator of Interferon Genes

Résumé

La silice cristalline, principalement sous sa forme de quartz, est l'un des minéraux les plus abondants de la croûte terrestre. Elle est libérée dans l'environnement à travers des processus industriels tels que le broyage et le fractionnement de matériaux comme les pierres et les roches. Une fois inhalées, les particules de silice cristalline atteignent les alvéoles pulmonaires, où elles induisent diverses pathologies. L'exposition à la silice cristalline est associée au développement d'une inflammation chronique, d'une fibrose pulmonaire, ainsi qu'à une augmentation du risque de cancers pulmonaires et de maladies auto-immunes. À l'heure actuelle, les macrophages sont établis comme étant responsables de l'inflammation induite par la silice cristalline, mais les mécanismes sous-jacents restent encore peu définis.

Par ailleurs, notre laboratoire a mis en évidence la présence d'interférons de type I (IFN-I) dans des homogénats pulmonaires murins. Cette observation est surprenante car les réponses IFN-I sont généralement induites par des virus. Les cellules dendritiques étant les principaux producteurs d'IFN-I, nous avons exploré leur capacités à exprimer les IFN-I après le traitement à la silice.

Nous avons dans un premier temps différencié des monocytes de la lignée THP-1 en macrophages et en cellules dendritiques puis comparé leur réponse inflammatoire ainsi que leur production d'IFN-I après une exposition à la silice. Ces expériences *in vitro* ont ensuite été reproduites avec des monocytes sanguins humains frais. Nos résultats ont montré que les macrophages exposés à la silice cristalline étaient responsables de l'inflammation, tandis que les DC traitées à la silice ne produisaient pas d'IFN-I. Nous avons donc conclu que les cellules dendritiques ne sont pas la source principale des IFN-I durant les premières réponses à la silice.

Abstract

Crystalline silica, primarily in its quartz form, is one of the most abundant minerals in the Earth's crust. It is released into the environment through industrial processes such as grinding and fragmentation of materials like stones and rocks. Once inhaled, crystalline silica particles reach the pulmonary alveoli, where they induce various pathologies. Exposure to crystalline silica is associated with the development of chronic inflammation, pulmonary fibrosis, as well as an increased risk of lung cancers and autoimmune diseases. Currently, macrophages are established as being responsible for the inflammation induced by crystalline silica, but the underlying mechanisms remain poorly understood.

Moreover, our laboratory has demonstrated the presence of type I interferons (IFN-I) in murine lung homogenates. This observation is surprising, as the IFN-I response induced by crystalline silica is considered sterile, meaning it occurs in the absence of any microorganism. Given that dendritic cells are the primary producers of IFN-I, we explored their potential role in this context.

To test their involvement, we first differentiated THP-1 monocytes into macrophages and dendritic cells and then evaluated their inflammatory response and IFN-I production after exposure to silica. These experiments were subsequently replicated with fresh human blood monocytes, as the use of this model provides a physiologically relevant system, allowing for a better understanding of the immune processes that may occur within the lung. Our results showed that macrophages exposed to crystalline silica were responsible for the inflammation, whereas silica-treated dendritic cells did not produce IFN-I. Thus, the role of dendritic cells in IFN-I production in response to silica could not be confirmed.

Résumé graphique

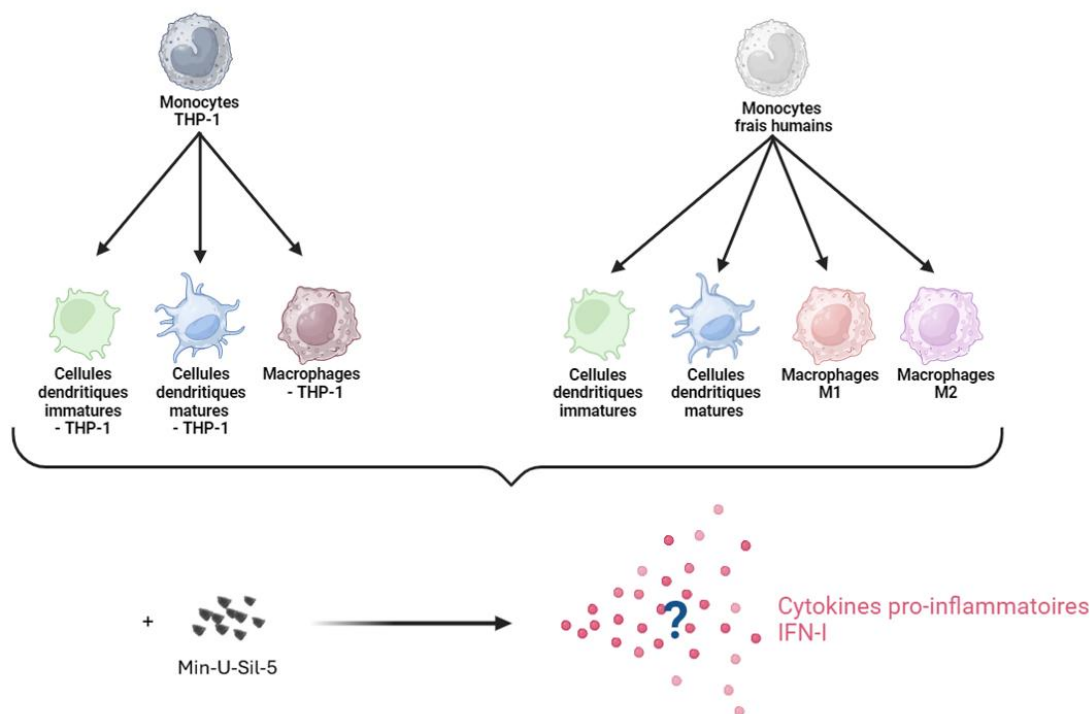


Figure 1 : La silice cristalline respirable (SCR) est phagocytée par différentes populations de cellules immunitaires, parmi lesquelles nous retrouvons les macrophages, qui sont le type cellulaire le plus étudié dans la réponse à la SCR, et les cellules dendritiques dont l'implication n'est que peu connue à ce jour. Dans les poumons de souris exposées, une production de cytokines pro-inflammatoires a été observée, accompagnée, de manière surprenante, d'une production d'IFN-I. Contrairement à la libération de cytokines pro-inflammatoires, la libération d'IFN-I n'a pas été observée dans notre modèle de macrophage *in vitro* exposé à la silice. Cette dernière observation nous laisse supposer l'implication d'un autre type cellulaire dans la réponse IFN-I à la silice. Nous avons décidé d'investiguer le rôle que les cellules dendritiques pourraient jouer dans la production d'IFN-I. Afin d'étudier la réponse des cellules dendritiques exposées à la silice, nous avons utilisé deux modèles de monocytes, des cellules THP-1 et des monocytes frais humains, différenciés en cellules dendritiques ou en macrophages dans lesquels nous avons quantifié la libération de cytokines pro-inflammatoires ainsi que la production de transcrits d'IFN- β , une cytokine de la famille des IFN-I.

I. INTRODUCTION

Silice

Généralités

La silice, ou dioxyde de silicium (SiO_2), représente la forme oxydée du silicium et constitue le minéral le plus abondant dans la croûte terrestre. Elle se présente majoritairement sous forme de quartz, cristobalite ou encore de tridymite, le quartz étant de loin la forme la plus courante (*Crystalline Silica - Cancer-Causing Substances - NCI*, 2015). Le dioxyde de silicium se présente sous deux formes principales : la forme amorphe et la forme cristalline, qui se distinguent par leur structure moléculaire (Baum & Arnold, 2024) (**Figure 2**). Aux concentrations que nous retrouvons dans l'environnement, la silice amorphe ne présente pas d'effets délétères pour la santé. En revanche, la silice cristalline, lorsqu'elle est présente sous forme de particules d'un diamètre aérodynamique inférieur à $5\text{ }\mu\text{m}$, est considérée comme biologiquement active et peut avoir des effets nocifs. Ces particules, appelées *silice cristalline respirables* (SCR) sont capables d'atteindre les bronchioles distales et les alvéoles pulmonaires, où elles interagissent avec les cellules des voies respiratoires (Pavan et al., 2020). Dans le cadre de ce travail, nous nous focaliserons essentiellement sur la silice sous sa forme cristalline.

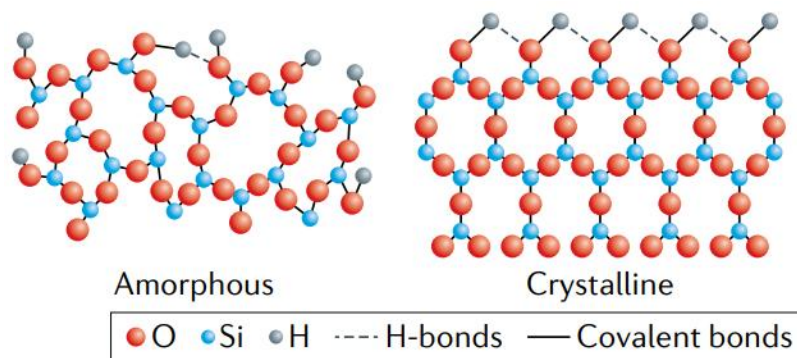


Figure 2 : Structure de la forme amorphe et cristalline de la silice.

Les formes amorphes de la silice sont composées d'atomes de silicium et d'oxygène arrangés de manière désordonnée et sans motif défini. En revanche, les formes cristallines de la silice se caractérisent par des motifs réguliers et répétitifs, où des atomes d'oxygène internes sont partagés entre deux atomes de silicium (Croissant et al., 2020).

Borm et al. (2018) ont mis en évidence que la toxicité de la silice dépendait non seulement de sa taille, mais aussi de ses propriétés de surface et structurales, telles que sa forme et sa porosité. Pavan et al. (2022) ont également démontré que la SCR fraîchement fracturée présentait une toxicité accrue par rapport aux particules « vieilles », et ce, en raison de l'abondance de radicaux libres à leur surface. Parmi ces radicaux, des fractions de surface spécifiques appelées « *nearly free silanols* » (NFS) ont été détectées.

Ces NFS sont des groupements silanols (-Si-OH) présents à la surface des particules de silice, capables d'établir des liaisons hydrogène avec d'autres silanols voisins. Toutefois, après fracturation, la distance entre ces groupements peut augmenter, réduisant ainsi leur capacité d'interaction directe (**Figure 3**). Ces NFS pourraient ainsi jouer un rôle clé dans les interactions entre les particules de silice et les membranes biologiques via leur liaison avec les têtes polaires des phosphatidylcholines, une classe de phospholipides constitutive des membranes biologiques (Pavan et al., 2020). L'activité toxique variable de la silice pourrait ainsi être liée à l'hétérogénéité chimique de sa surface.

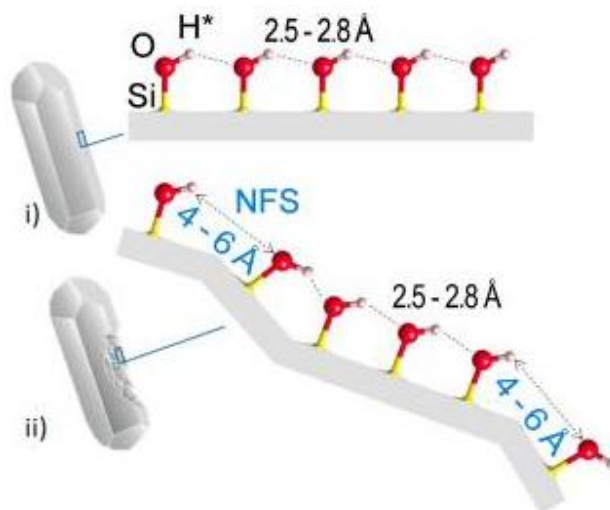


Figure 3 : Représentation des motifs de silanols sur les surfaces de cristaux de quartz (i) avant et (ii) après fracturation.

(i) Avant la fracturation, les silanols sont organisés de manière régulière, liés par des liaisons hydrogène, avec une faible distance interatomique entre eux. (ii) Après la fracturation, les silanols deviennent désorganisés, plus éloignés les uns des autres et faiblement interactifs, interrompant ainsi la régularité des chaînes de silanols initialement liées par des liaisons hydrogène. Les valeurs indiquées (en ångströms) correspondent à la distance oxygène-oxygène.

entre deux silanols (Pavan et al. 2020). Lorsque la distance entre deux silanols est assez grande, cela laisse de la place pour une potentielle interaction avec les membranes biologiques.

L'exposition à la silice cristalline survient principalement dans les environnements professionnels, notamment dans les industries utilisant des matériaux de construction, tels que le granite, le grès et les sables. Les émissions de SCR proviennent de processus industriels tels que le sciage, le ponçage et les procédés abrasifs comme le sablage utilisé notamment dans la production de verre et certaines activités de l'industrie du textile (Humans, 1997). L'utilisation généralisée de ces matériaux justifie une compréhension approfondie des propriétés toxicologiques du dioxyde de silicium cristallin.

Mécanismes de toxicité

À ce jour, le mécanisme précis qui explique la pathogénicité des particules de silice demeure peu défini.

La SCR est difficilement éliminée par les mécanismes de défenses respiratoire. Une fois inhalées, les particules atteignent les zones profondes des voies respiratoires, au niveau des alvéoles pulmonaires, où elles sont phagocytées par les macrophages alvéolaires (MA) et induisent une inflammation.

En effet, l'inflammation est une caractéristique clé de l'exposition à la SCR et a été observée à la fois dans des modèles animaux mais également dans les poumons des patients (Wei et al. 2023). Cette réponse inflammatoire est étroitement liée à un processus clé induit par la SCR : la pyroptose. Il s'agit d'un type de mort cellulaire programmée, caractérisé par une forte réponse inflammatoire. Elle est principalement déclenchée via l'activation de l'inflammasome NLRP3 « *NOD-like Receptor Protein 3* » composée de la protéine NLRP3, de la protéine ASC « *Apoptosis-associated Speck-13 like protein containing a CARD* » et de l'enzyme effectrice protéolytique caspase-1 (pro-caspase-1). L'inflammasome est activé en deux étapes. Une première avec un stimulus d'amorçage (PAMPs « *Pathogen Associated Molecular Patterns* », DAMPs

« *Damage Associated Molecular Patterns* ») qui induit l'expression de pro-IL-1 β et -18 via le facteur de transcription NF- κ B « *Nuclear Factor- κ B* », elle-même activée par la SCR. La deuxième étape consiste à l'activation, par un second stimulus (ROS « *Reactive Oxygen Species* », cathepsine B, ARNdb « *Acides Ribonucléiques à double brin* »), de la protéine NLRP3 qui s'oligomérisise. Son oligomérisation permet le recrutement d'ASC et de la pro-caspase-1. L'ensemble forme l'inflammasome NLRP3. Cet assemblage mène au clivage de la pro-caspase-1 en caspase-1 active, qui, une fois activée, clive les précurseurs pro-IL-1 β , pro-IL-18 et la gasdermine D (GSDMD) pour les convertir en formes biologiquement actives IL-1 β , IL-18 et GSDMD-NT. Cette dernière s'oligomérise et forme des pores à la membrane plasmique, provoquant la libération de facteurs inflammatoires, dont IL-1 β et IL-18, et peut finalement mener à la lyse de la cellule. (Galli et al., 2025 ; Wei et al., 2023) (**Figure 4**).

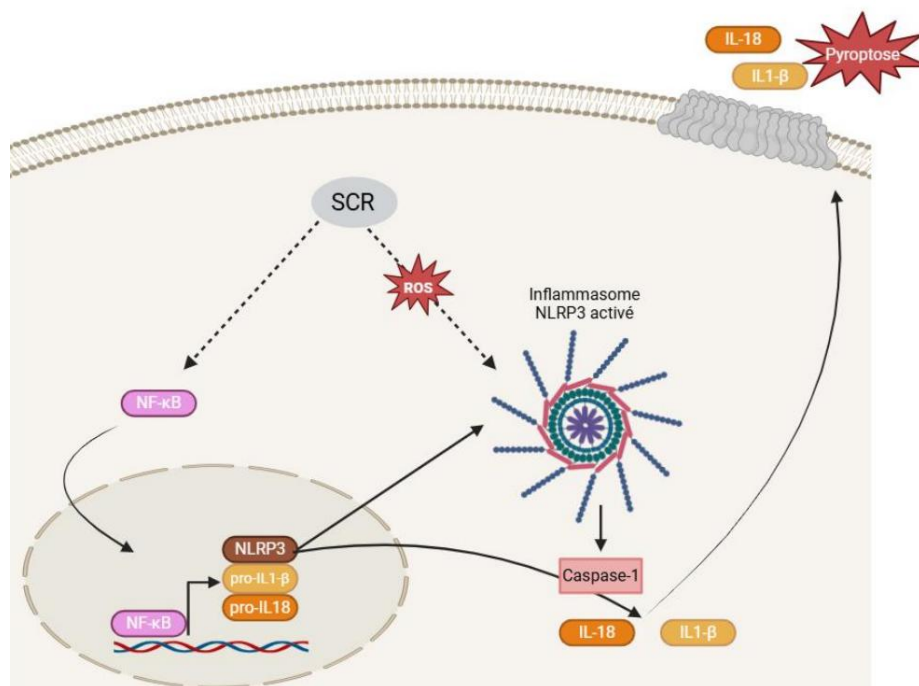


Figure 4 : Réponse inflammatoire induite par les particules de SCR

L'activation de la réponse inflammatoire par la SCR induit une série de processus moléculaires complexes. Initialement, la SCR active le facteur de transcription NF- κ B dans le cytoplasme. Ce dernier se transloque dans le noyau, où il se lie aux promoteurs des gènes codant pour des molécules clés telles que NLRP3, IL-1 β et IL-18. En parallèle, la SCR entraîne la génération de ROS, qui jouent un rôle crucial dans l'activation de l'inflammasome NLRP3. Une fois activé, l'inflammasome NLRP3 initie le clivage de la pro-caspase-1, entraînant l'auto-activation de la caspase-1. Cette enzyme, à son tour, clive les précurseurs des cytokines pro-inflamma-

toires pro-IL-1 β et pro-IL-18, les convertissant en leurs formes actives, IL-1 β et IL-18. Par ailleurs, la caspase-1 clive également la gasdermine D, libérant de la sorte sa forme active, la gasdermine-NT. Cette protéine active s'oligomérisse et forme des pores dans la membrane plasmique des cellules, ce qui permet la libération des cytokines pro-inflammatoires dans le milieu extracellulaire. En conséquence, ce mécanisme de signalisation conduit à la pyroptose, un type de mort cellulaire inflammatoire caractérisé par l'activation de l'inflammasome et la libération de substances inflammatoires.

Silice cristalline et pathologies

L'inhalation de SCR est responsable du développement de diverses pathologies pulmonaires, dont la fibrose pulmonaire, appelée silicose dans ce contexte (Hoy & Chambers, 2020).

Silicose

La silicose est une fibrose pulmonaire nodulaire résultant de la déposition de particules de SCR dans les sacs alvéolaires, où elles sont ensuite phagocytées par les macrophages et d'autres cellules phagocytaires. Il est établi que cette phagocytose entraîne une réponse inflammatoire au sein du macrophage, accompagnée de la formation de nodules silicotiques. La silicose se manifeste sous trois formes principales : la forme chronique, qui est la plus courante, la silicose accélérée et la silicose aiguë (*Silicose - Troubles pulmonaires*, Redlich C. et al., 2023).

Pathologies associées à l'exposition à la silice

Les patients atteints de silicose sont à risque de développer divers troubles respiratoires tels qu'une tuberculose, une bronchopneumopathie obstructive chronique ou encore un cancer du poumon. Par ailleurs, il est intéressant de noter qu'une exposition chronique aux particules de SCR a été associée au développement de divers types de maladies auto-immunes (Kawasaki, 2015 ; Hoy & Chambers, 2020).

Les maladies auto-immunes

Il a été démontré que les personnes atteintes de silicose présentaient un risque trois fois plus élevé de développer des MAI, telles que l'arthrite rhumatoïde, le lupus érythémateux systémique ou encore la sclérodermie, par rapport aux individus exempts de silicose (Hoy & Chambers, 2020).

Les réponses interférons de type I (IFN-I) jouent un rôle crucial dans le développement des MAI. En effet, les patients souffrant de lupus, sclérose systémique et de dermatomyosite présentent une augmentation de la signalisation des IFN-I, et la dérégulation de cette voie pourrait être impliquée dans le développement de ces pathologies (Fernandez-Ruiz & Niewold, 2022). Toutefois, l'implication exacte des IFN-I dans le cadre d'une exposition à la silice demeure encore à clarifier.

Réponse interféron de type I

Les interférons sont des glycoprotéines découvertes il y a 60 ans, jouant un rôle clé dans la défense de l'organisme contre les infections. Cette famille de cytokines multigéniques constitue une réponse clé du système immunitaire innée (Giordano et al., 2010).

Il existe trois familles d'IFN : les IFN-I, les IFN-II et les IFN-III. Les interférons de type I et III sont produits par les cellules lors d'une infection virale ou d'une infection par d'autres pathogènes, via les voies des PRRs « Pathogen Recognition Receptors », incluant RIG-I, MDA7, PKR, TLR3, TLR7, TLR9 et STING. En revanche, l'interféron de type II, l'IFN- γ , est principalement produit par les lymphocytes T activés par un antigène. Les interférons de type I et III sont donc des produits du système immunitaire inné, conçus pour mettre en place des états antiviraux directs et immédiats dans les cellules, tout en modulant les réponses immunitaires adaptatives. L'IFN- γ , quant à lui, est un produit de l'immunité adaptative qui agit sur les cellules de l'immunité innée, notamment les macrophages (Walter, 2020 ; McNab et al., 2015 ; Ivashkiv & Donlin, 2014).

Dans le cadre d'une exposition chronique à la SCR, une augmentation des IFN-I a été observée dans les homogénats de poumons de souris traités à la silice (Giordano et al., 2010). Ce travail se focalisera donc sur l'étude de ces cytokines.

Composition des IFN-I

Les IFN-I constituent une famille de cytokines structurellement et fonctionnellement apparentées. Cette famille inclut principalement les IFN- α et les IFN- β , mais comprend également les IFN- ω , ϵ et κ . Ces trois derniers sont moins bien caractérisés en raison de leur faible expression tissulaire, de fonctions chevauchantes avec les IFN- α et IFN- β , ainsi que de variations inter-espèces. La production des différents sous-types d'IFN-I dépend à la fois du type cellulaire ainsi que des caractéristiques du microenvironnement (Ali et al., 2019).

Fonctions des IFN-I

Les IFN-I sont des polypeptides sécrétés par les cellules du système immunitaire infectées, mais également par d'autres types cellulaires (cellules épithéliales, fibroblastes, etc.) et jouent un rôle central dans la réponse immunitaire. Ils remplissent trois fonctions principales : tout d'abord, ils induisent des états antimicrobiens intracellulaires dans les cellules infectées ainsi que dans les voisines, limitant ainsi la propagation des agents infectieux, en particulier les agents pathogènes viraux. Ensuite, les IFN-I modulent les réponses immunitaires innées de manière équilibrée, c'est-à-dire en favorisant la présentation des antigènes, en soutenant les fonctions des cellules NK (*Natural Killer*) tout en inhibant les voies pro-inflammatoires et la production excessive de cytokines. Enfin, ils activent le système immunitaire adaptatif, stimulant le développement des réponses spécifiques des lymphocytes B et T et contribuant à la formation de la mémoire immunologique (Ivashkiv & Donlin, 2014).

Signalisation et induction des IFN-I

L'IFN- β peut être produit par la plupart des types cellulaires de l'organisme, tandis que l'IFN- α est majoritairement produit par une classe particulière dérivant des cellules hématopoïétiques, les cellules dendritiques plasmacytoïdes (pDC). Certaines cellules du système immunitaire inné, telles que les macrophages et cellules dendritiques (DC), produisent les IFN-I après avoir détecté des composants du pathogène via différents PRRs localisés à la surface, dans le cytosol ou dans les compartiments endosomaux des cellules. Ces PRRs peuvent reconnaître des acides nucléiques étrangers ainsi qu'un nombre limité de mais également des acides nucléiques du soi lorsqu'ils se trouvent hors des cellules ou hors de leur compartiment physiologique (noyaux, mitochondrie). Parmi les voies conduisant à la production d'IFN- α/β , on retrouve l'activation des TLRs « *Toll-Like Receptors* », notamment le TLR4. Ce dernier reconnaît généralement les LPS « *Lipopolysaccharides* » bactériens et constitue le TLR le plus puissant pour l'induction des IFN- α/β (Ivashkiv L. & Donlin L., 2014). Divers articles décrivent la potentielle implication de TLR4 dans les réponses observées suite à une exposition à la SCR (Iwasaki, 2012).

Les IRF7 et IRF3 « *Interferon Regulatory Factor* » sont majoritairement responsables de la production des IFN-I. Suite à une infection virale, les cellules immunitaires innées entrent en contact avec des substances antigéniques spécifiques aux virus, telles que l'ADN ou l'ARN, via les PRRs, entraînant l'action de molécules de signalisation cytosoliques et transmembranaires responsables de la phosphorylation d'IRF7/3 dans le cytosol. Les dimères d'IRF7 ou les hétérodimères IRF3/IRF7 peuvent ensuite se transloquer dans le noyau pour initier l'expression des gènes de l'IFN-I (Ma et al., 2023) (**Figure 5**). Honda et Taniguchi ont rapporté que le dimère homodimérique d'IRF7 ou le dimère hétérodimérique IRF3/IRF7, plutôt que le dimère homodimérique d'IRF3, joue un rôle prépondérant dans la production d'IFN-I en réponse à une infection virale. IRF3 et IRF7 sont tous deux des ISGs « *Interferon-Stimulated Genes* », c'est-à-dire, des gènes dont la transcription est induite en réponse à la production des IFN-I.

Signalisation et induction des ISGs

L'IFN- β et tous les sous-types d'IFN- α exercent leurs effets en se liant à un récepteur transmembranaire hétéromérique constitué des sous-unités IFNAR1 et IFNAR2 « *Interferon α/β Receptor 1/2* ». Cette interaction déclenche l'activation des protéines associées au récepteur, JAK1 « *Janus Kinase-1* » et TYK2 « *Tyrosine Kinase-2* ». Dans la voie canonique de la signalisation médiée par IFN- α/β , JAK1 et TYK2 activés phosphorylent les protéines STAT1 et STAT2 « *Signal Transducers and Activators of Transcription* » présentes dans le cytosol. Cette phosphorylation conduit à leur dimérisation, suivie de leur translocation nucléaire après la liaison d'IRF9 pour former le complexe ISGF3 « *Interferon-Stimulated Gene Factor-3* ». Ce complexe se lie par la suite aux ISRE « *Interferon-Stimulated Response Element* » dans les promoteurs des ISGs, activant ainsi la transcription de ces derniers. Ainsi, les IFN- α/β induisent l'expression de certaines d'ISGs, dont de nombreux gènes jouent un rôle crucial dans l'établissement d'un état antiviral au sein de la cellule. Les protéines codées par les ISGs restreignent l'activité des pathogènes par divers mécanismes, notamment l'inhibition de la transcription, de la traduction et de la réplication virale, la dégradation des acides nucléiques viraux, ainsi que l'altération du métabolisme cellulaire des lipides (**Figure 5**) (Paludan & Bowie, 2013).

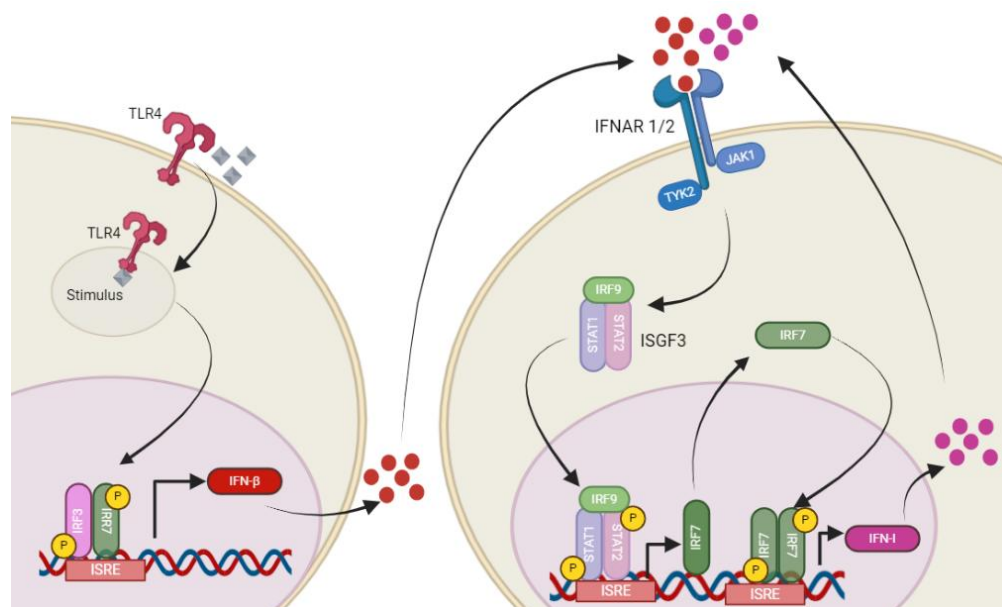


Figure 5 : Signalisation et production d'IFN-I et d'ISGs :

Après détection d'un stimulus par un PRR, ici le TLR4 endosomal, une cascade de signalisation entraîne la phosphorylation du complexe hétérodimérique IRF3/IRF7 suivie de sa translocation nucléaire. Le complexe se fixe sur les ISRE, induisant ainsi la transcription du gène

codant pour l'IFN- β . L'IFN- β se lie à son récepteur IFNAR1/2, activant la voie Jak/Stat. Cette voie implique la formation du complexe ISGF3, qui induit la transcription des ISGs, notamment IRF7. Phosphorylé et dimérisé, IRF7 se transloque dans le noyau pour stimuler la transcription des gènes codant pour les IFN-I, à savoir IFN- α/β ici.

Cellules dendritiques

Les cellules dendritiques (DC) sont des acteurs clés de l'initiation et l'orchestration de la réponse immunitaire, agissant en tant que cellules présentatrices d'antigènes (CPA) aux lymphocytes. Elles forment une population hétérogène de leucocytes dérivés de cellules souches hématopoïétiques (Balan et al., 2019).

Les DC sont les seules CPA capables d'activer les lymphocytes T naïfs, tout en régulant la réponse secondaire de manière spécifique à l'antigène. Leur fonction varie selon leur sous-type ainsi que du type de stimulus perçu. Elles interviennent dans la régulation des infections, l'initiation de la réponse inflammatoire et l'amorçage de la réponse immunitaire spécifique. De plus, elles contribuent à l'induction de la tolérance immunitaire et la régulation de l'homéostasie immunitaire (Granot et al., 2017). À leur état immature, les DC (iDC) sont présentes dans les tissus lymphoïdes et non lymphoïdes, où elles échantillonnent en permanence leur environnement afin de détecter la présence de pathogènes. Lorsqu'elles détectent un pathogène, elles subissent une maturation, migrent vers les ganglions lymphatiques et présentent les antigènes aux lymphocytes T qui s'y trouvent. Cette maturation s'accompagne de changements phénotypiques et fonctionnels distincts. Les DC immatures et matures jouent donc des rôles spécifiques et complémentaires dans l'initiation et la régulation des réponses immunitaires adaptatives (Yin et al., 2021 ; Leblanc-Hotte et al., 2023).

Grâce à l'utilisation de la technologie scRNA-seq « *Single-Cell RNA Sequencing* », il a été possible de classer les différents sous-types de DC. Ce classement a été effectué selon leur ontogenèse. En effet, les DC humains peuvent être distinguées en 5 sous-types : DC classiques de types 1 (cDC1), DC classiques de type 2 (cDC2), cellules de Langerhans (LC), DC plasmacytoïdes (pDC) et DC dérivées de monocytes (mo-DC) aussi appelées DC inflammatoires. (Segura, 2016). Un résumé des différents types de DC est repris dans le **Tableau 1**.

Cellules dendritiques classiques de type 1

Les cDC1 sont localisées dans les tissus périphériques ainsi que dans les organes lymphoïdes. Elles ont une capacité migratoire inférieure à celle des cDC2 et ont par ailleurs démontré leur capacité à polariser les lymphocytes T naïfs en sous populations Th1 et Th2, favorisant ainsi la réponse immunitaire cellulaire via les lymphocytes T CD4⁺ (Granot et al., 2017). Elles sont principalement spécialisées dans la production d'interféron de type III (IFN-III).

Cellules dendritiques classiques de type 2

De la même manière que les cDC1, les cDC2 sont présentes dans les tissus périphériques ainsi que dans les organes lymphoïdes et sont capables d'induire une polarisation des lymphocytes T naïfs CD4⁺ en lymphocytes Th1 et Th2 (Granot et al., 2017). Les cDC2 sont les DC les plus efficaces en ce qui concerne la synthèse d'un sous-type de l'interleukine-12, l'IL-12p70. Par ailleurs, les cDC2 se distinguent par leur abondance dans la circulation sanguine (Segura E., 2022).

Cellules de Langerhans

Les LC sont des DC résidentes et sont localisées dans la couche basale de l'épiderme ainsi que dans les épithéliums stratifiés squameux (Collin & Bigley, 2018). Selon certaines hypothèses, ils pourraient être considérés comme des phagocytes épidermiques, les classifiant ainsi parmi les macrophages cutanés (Segura E., 2022).

Cellules dendritiques plasmacytoïdes

Les pDC se localisent principalement dans les organes lymphoïdes. Ce sous-type de DC est responsable d'une grande production de cytokines en réponse aux infections virales (Macri et al, 2017). En effet, leur majeure caractéristique est leur spécialisation dans la production et sécrétion d'IFN-I, surtout l'IFN- α (Segura, 2016).

Les pDC se distinguent par leur noyau excentrique ainsi que leur réticulum endoplasmique et appareil de Golgi proéminent, et ce, pour l'importante production d'IFN-I

Cependant, en raison de leur rôle clé dans la production d'IFN-I et leur capacité à reconnaître les acides nucléiques du soi, les pDC sont impliquées dans de nombreuses MAI telles que le psoriasis ou le lupus érythémateux systémique (Collin & Bigley, 2018). Ces pDC ne sont toutefois pas efficaces dans la stimulation de la différenciation de lymphocytes T CD8⁺ (Segura E, 2022).

Cellules dendritiques dérivées des monocytes

Les cellules dendritiques dérivées de monocytes sont recrutées lors de processus inflammatoires, ce qui explique qu'elles sont également connues sous le nom de « DC inflammatoires », bien que d'autres cellules dendritiques soient également présentes durant l'inflammation. La présence de ces cellules myéloïdes inflammatoires a été signalée dans divers contextes pathologiques chez l'humain, tels que l'eczéma, le psoriasis, la sensibilisation cutanée, la rhinite allergique, la maladie cœliaque, la synovite ou encore la péritonite. Il a été démontré que ces mo-DC prédominent parmi les cellules myéloïdes inflammatoires accumulées. Le fait que les mo-DC n'expriment pas CD1c et FcεR1 les rend plus proches des macrophages en termes de phénotype (Collin & Bigley, 2018) mais leur morphologie ressemblant à celle des DC facilite la distinction entre les deux types cellulaires (Segura, 2016). De manière similaire aux cDC2, les mo-DC sont spécialisés dans la sécrétion d'IL-12p70. Une des caractéristiques des mo-DC est leur efficacité en ce qui concerne la différenciation des lymphocytes T en lymphocyte T cytotoxique CD8⁺ (Segura E. 2022).

	cDC1	cDC2	pDC	Mo-DC	LC
Fonctions principales	Activation de l'immunité cellulaire via les lymphocytes T DC4+. Importante production d'IFN-III.	Production d'IL-12p70. Sous-type le plus présent dans le sang.	Producteurs majeurs d'IFN-I suite aux infections virales.	Recrutées durant l'inflammation, rôle clé dans l'activation des lymphocytes T.	Cellules présentatrices d'antigènes résidant dans les épithéliums.

Tableau 1 : Résumé des différents sous-types de cellules dendritiques

Cellules dendritiques et silice cristalline

La silice cristalline inhalée affecte plusieurs types de cellules, notamment les macrophages, les cellules dendritiques, les neutrophiles, les fibroblastes et les cellules épithéliales, entraînant une activation cellulaire, une inflammation et un stress oxydatif (Giordano et al., 2010). À ce jour, l'implication des DC dans la prise en charge de la SCR inhalée demeure encore peu comprise. Toutefois, de nombreuses interrogations subsistent concernant leur implication dans les réponses inflammatoires et immunitaires déclenchées dans le poumon suite à l'inhalation de SCR.

Kang et Lim (2012) ont montré que l'exposition des DCs de souris (lignée DC2.4) aux nanoparticules de silice mésoporeux entraînait une augmentation de la production de cytokines pro-inflammatoires, telle que le TNF α . Ils ont noté que cette inflammation était d'autant plus marquée en réponse à des nanoparticules ultrafines (10-50 nm), contrairement aux particules de plus grande taille (1-5 μ m), ce qui souligne l'importance de la taille des particules dans leur potentiel inflammatoire.

D'autre part, Benmerzoug et al. (2018) ont élucidé des mécanismes clés concernant la réponse des DCs aux particules de SCR *in vitro*. En effet, ils ont démontré que les DC dérivées de moelle osseuse (BMDCs), après exposition à la SCR pendant 24 heures, subissaient un stress mitochondrial accompagné d'une production accrue de ROS (*Reactive Oxygen Species*) et d'une mort cellulaire par apoptose, dépendante de la voie STING. Cette dernière serait induite par la libération d'ADN double-brin (dsDNA) et mitochondrial (ADNmt) par les BMDCs. De plus, les BMDCs déficientes en cGAS présentaient une réponse interféron de type I significativement diminuée après exposition.

Bien que des avancées importantes aient été faites, il reste nécessaire d'approfondir les recherches sur l'implication des DCs dans la prise en charge des particules de SCR inhalées. Cela permettrait d'éclairer les pathologies pulmonaires liées à cette exposition et potentiellement de développer des approches thérapeutiques.

II. HYPOTHÈSE DE TRAVAIL ET OBJECTIFS

Jusqu'à présent, les macrophages ont été le principal type cellulaire étudié en ce qui concerne la prise en charge des particules de SCR par le système immunitaire. En effet, il est établi que les particules de SCR, en raison de leur persistance, activent l'inflammasome NLRP3 au sein des macrophages, ce qui entraîne une libération de cytokines pro-inflammatoires dans le milieu extracellulaire.

Par ailleurs, des études préliminaires réalisées au laboratoire ont révélé que, dans les poumons de souris exposées, l'inflammation était également accompagnée d'une production d'IFN-I. Cependant, la libération d'IFN-I n'a pas été observée dans nos modèles *in vitro* de macrophages alvéolaires ou dérivants des monocytes THP-1 exposés à la silice cristalline. Cela laisse donc supposer que d'autres types cellulaires pourraient être impliqués dans la réponse IFN-I observée *in vivo*.

Étant donné le rôle clé des cellules dendritiques dans la production d'IFN-I, l'objectif principal de ce travail a été d'investiguer leurs réponses suite à une exposition à la SCR et à identifier les différences potentielles entre les DC, les macrophages et monocytes THP-1, déjà bien étudiés au laboratoire.

Pour ce faire, des monocytes de lignée THP-1 ont été différenciés en macrophages ainsi qu'en iDC et mDC. A partir de ces cultures, nous avons effectué :

- a) Une analyse par cytométrie en flux pour confirmer la présence des quatre types cellulaires ;
- b) Des dosages ELISA pour quantifier les concentrations de cytokines pro-inflammatoires, IL-1 β et TNF- α , dans les surnageants suite au traitement à la SCR ;
- c) Des analyses par RTq-PCR pour quantifier les transcrits codant pour IFN- β suite à une exposition à la SCR.

Parallèlement, des expériences similaires ont été réalisées avec des monocytes sanguins frais isolés à partir d'une poche de sang, puis différenciés en macrophages ainsi qu'en iDC et mDC. En effet, bien que les cellules THP-1 constituent un modèle cellulaire humain reconnu, elles ne reflètent pas toujours fidèlement les réponses immunitaires et les caractéristiques biologiques des monocytes sanguins. Utiliser des

monocytes sanguins frais offre un modèle physiologiquement pertinent, permettant une compréhension des processus immunitaires qui pourraient se dérouler au sein du poumon.

III. MATÉRIELS ET MÉTHODES

Culture et différenciation de la lignée monocyttaire THP-1

La lignée humaine monocyttaire THP-1 (ATCC TIB-202), dérivée d'un patient atteint d'une leucémie monocyttaire aiguë a été utilisée pour des expériences préliminaires. Les cellules ont été maintenues en culture ($2,5 \cdot 10^5$ cellules/mL) à 37°C et 5% de CO₂ dans du milieu RPMI 1640 (Thermo Fisher Scientific, Cat #52400025) supplémenté avec 10% de FBS décomplémenté (fetal bovin serum, Thermofisher, Cat #A3381901), 1% d'antibiotiques et antimycotiques (AA) (Thermo Fischer, Cat #15240062) et 0,05 mM de β -mercaptoéthanol (Thermo Fisher, Cat #21985023). Les cellules ont été passées deux fois par semaine.

Des différenciations en différents types cellulaires ont été réalisées ($3,75 \cdot 10^5$ c/w de plaques 48 puits). Pour différencier les monocytes THP-1 en macrophages THP-1, les cellules ont été traitées avec 100 nM de phorbol-12-myristate 13-acetate (PMA) (ATCC, LC laboratories, Cat #P-1680) dans leur milieu de culture pendant 48 heures à 37°C et 5% de CO₂. Pour la différenciation en cellules dendritiques immatures THP-1, un traitement avec du Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factor (GM-CSF) (Thermo Fischer, Cat #17831823) à 100 ng/mL et de l'IL-4 (Fischer Scientific, Cat #17840813) à 100 ng/mL a été réalisé, avec un changement de milieu tous les 48 heures pendant 6 jours à 37°C et 5% CO₂. Finalement, pour la différenciation en cellules dendritiques matures THP-1, les monocytes THP-1 ont été traités pendant 72 heures à 37°C et 5% CO₂ avec du GM-CSF à 100 ng/mL, de l'IL-4 à 200 ng/mL, du Tumor Necrosis Factor α (TNF α) (Fischer Scientific, Cat #17840043) à 20 ng/mL et de l'ionomycine (Sigma Aldrich, Cat #I0634-1MG) à 200 ng/mL. Le protocole de différenciation des monocytes THP-1 en cellules dendritiques a été repris du groupe de Hölken et al. (2023).

Isolation, culture et différenciation des monocytes sanguins humains

Des monocytes sanguins humains frais ont été différenciés en macrophages M1 et M2, ainsi qu'en cellules dendritiques immatures et matures afin d'étudier leurs réponses à l'exposition à la silice cristalline.

Les cellules utilisées ont été isolées à partir de poches de sang de donneurs sains. Après récupération de la fraction leucocytaire, une étape de rosetting a permis d'isoler les cellules CD2⁻, comportant la population monocyttaire. Ces cellules ont ensuite été purifiées par tri magnétique (MACS) en ciblant les cellules exprimant l'antigène CD14⁺.

Les monocytes purifiés ont été cultivés en présence de cytokines, à des concentrations définies, pour induire leur différenciation. Une période d'incubation de sept jours a été nécessaire pour obtenir des macrophages et des cellules dendritiques différenciés et matures.

Ce protocole est basé sur les travaux de Delhez et al. (2024) qui décrivent en détail les étapes nécessaires pour obtenir des macrophages et cellules dendritiques à partir de monocytes sanguins humains.

Isolation des cellules mononucléées du sang périphérique

Les poches de sang utilisées ont été prélevées auprès de donneurs sains au sein des Cliniques Universitaires Saint Luc. Après centrifugation à 3 274 g pendant 20 minutes à 4°C, le sang est séparé en trois phases distinctes : le plasma en surface, les leucocytes au centre (buffy coat) et les érythrocytes au fond. Les leucocytes, correspondant aux cellules mononucléées du sang périphérique (PBMC) ont été isolés à l'aide d'un extracteur manuel. Cette population cellulaire comprend principalement des monocytes et des lymphocytes.

Ces PBMC ont été purifiées selon leur gradient de densité, éliminant les résidus de plaquettes, globules rouges et neutrophiles restants, en utilisant une Lymphoprep (Stemcell Technologies, Cat #07851). Pour ce faire, la suspension cellulaire a été diluée de moitié dans du D-PBS 1X (ITW Reagents, Cat #A0964,9050) contenant 1mM d'acide éthylène-diamine-tétra-acétique (EDTA) (Thermo Fisher Scientific, Cat

#15575-038). La suspension obtenue a ensuite été déposée délicatement sur une couche de Lymphoprep. Une centrifugation à 900 g pendant 20 minutes à température ambiante, avec une accélération et une décélération douce, a permis de séparer efficacement les cellules selon leur densité.

Après centrifugation, les différentes fractions cellulaires se sont réparties dans le tube selon leur densité. De la partie supérieure vers le culot, nous pouvons distinguer : le plasma et les plaquettes ; un mince anneau blanc de faible densité contenant les cellules mononucléées et quelques neutrophiles ; un anneau plus large contenant principalement les éosinophiles et neutrophiles plus denses ; et, au fond, le culot composé des érythrocytes.

Le mince anneau blanc contenant les PBMC a soigneusement été prélevés et transférés dans un tube préalablement enrobé de FBS pendant 24 heures à 4°C afin de limiter l'adhésion non-spécifique des cellules. Les PBMC ont ensuite été lavés pour éliminer les résidus de Lymphoprep à l'aide de plusieurs centrifugations successives à 400 g pendant 10 minutes à température ambiante, suivies de resuspensions dans une solution tamponnée de D-PBS 1X contenant 1 mM d'EDTA.

Enfin, ces cellules ont été re suspendues dans du milieu RPMI 1640 et un comptage a été réalisé avec la solution de Türké (Merck, Cat #109277), un colorant permettant de compter les leucocytes tout en lysant les plaquettes et les globules rouges résiduels.

Isolation des cellules CD2 négatives

La population cellulaire de PBMC précédemment isolée se compose de deux grandes catégories de cellules : celles positives pour le marqueur CD2, correspondant aux lymphocytes, et celles négatives pour ce marqueur, correspondant aux monocytes. Ces deux populations cellulaires sont séparées par une technique appelée « *ro-setting* », basée sur l'affinité entre les cellules CD2⁺ et des globules rouges de moutons.

Les cellules, resuspendues dans du milieu RPMI 1640 à 10⁷ cellules/mL ont été mises en contact avec des globules rouges de moutons (Labor Dr. Merk, Cat #E-410) à raison de 1 mL de globules rouges pour 5.10⁷ PBMC. Après une incubation de 5

minutes à température ambiante, cette suspension cellulaire a de nouveau été séparée par centrifugation à 900 g, à température ambiante, pendant 20 minutes, à l'aide d'un gradient de densité (Lymphoprep). À ce stade, les cellules CD2⁻ contenant les monocytes se trouvent dans l'anneau blanc de faible densité, tandis que les cellules CD2⁺ liées aux globules rouges forment le culot. Ces dernières correspondent donc aux lymphocytes T et aux cellules NK, et pourront être utilisées pour d'autres expériences.

La fraction CD2⁻ a ensuite été récupérée dans un tube préalablement enduit de FBS et comptée à l'aide de la solution de Türké avant d'être resuspendue dans du milieu RPMI 1640.

Isolation des monocytes (CD14⁺) depuis les CD2⁻

Les cellules négatives pour le marqueur CD2 contiennent la population monocyttaire positive pour le marqueur CD14.

Pour isoler ces monocytes, la technique MACS (*Magnetic Activated Cell Sorting*) a été utilisée. Cette méthode consiste en une incubation de la fraction CD2⁻ pendant 20 minutes à 4°C avec des anticorps anti-CD14, marqués de billes magnétiques (Miltenyi Biotec, Cat #130-050-201). La suspension cellulaire a ensuite été purifiée par un séparateur automatique, l'AutoMACS. Ce dispositif permet, à l'aide d'un aimant, la rétention dans la colonne des cellules marquées avec l'anticorps, donc CD14⁺. Les cellules non marquées, donc les CD14⁻, sont éluées en premier. Après retrait des aimants, les monocytes positifs pour CD14 ont aussi été élués.

Les monocytes obtenus sont comptés au Bleu de Trypan et resuspendus dans du RPMI 1640. Ces cellules peuvent être conservées à -80°C dans un milieu comprenant 50% de RPMI 1640, 40% de FBS et 10% de diméthyl-sulfoxyde (DMSO) (Sigma-Aldrich, Cat #D4540).

Différenciation des monocytes en macrophages M1 et M2

Les monocytes ont été exposés à différentes cytokines avec des changements de milieu réguliers afin d'aboutir à leur différenciation en macrophages M1 ou en macrophages M2 (**Figure 6**).

Le milieu utilisé a été du milieu RPMI 1640 contenant de la L-Glutamine et du HEPES (Thermo Fischer Scientific, Cat #22400089) complémenté avec 10% de FBS décomplémenté, 1% de AA (Thermo Fischer Scientific, Cat #15240062) et 1,5 mM de GlutaMAX (Thermo Fischer Scientific, Cat #35050061).

Les monocytes frais ont été mis en plaque de 48 puits à raison de $2,5 \cdot 10^5$ cellules/puits dans un volume final de 1 mL. Pour les macrophages M1, le milieu de culture a été supplémenté de 50 ng/mL de GM-CSF (Thermo Fischer Scientific, Cat #17831823). Pour les M2, 50 ng/mL de *Macrophage Colony-Stimulating Factor* (M-CSF) (Thermo Fischer Scientific, Cat #17882763) a été ajouté dans leur milieu de culture.

Après une incubation pendant 72 heures à 37°C et 5% de CO₂, le milieu de culture a été changé. Pour cela, les cellules ont été centrifugées pendant 7 minutes à 300 g, leur milieu a été aspiré et remplacé par du milieu frais contenant 50 ng/mL de GM-CSF pour les M1 et 50 ng/mL de M-CSF pour les M2.

Une incubation de 72 heures à 37°C et 5% de CO₂ a de nouveau été nécessaire pour poursuivre sur leur polarisation. Pour cela, un changement complet du milieu de culture a été nécessaire afin d'être remplacé par des solutions de milieu enrichies en cytokines. Celle des M1 était composée de 20 ng/mL d'interféron-gamma (IFN- γ) (Thermo Fischer Scientific, Cat #300-02-20UG) et de 50 ng/mL de lipopolysaccharide (LPS). Et celle des M2 était composée de 20 ng/mL d'IL-4 et de 20 ng/mL d'IL-10. Une incubation de 24 heures à 37°C et 5% de CO₂ a permis une polarisation complète des macrophages.

Différenciation des monocytes en cellules dendritiques immatures et matures

Les monocytes ont été exposés à différentes cytokines avec des changements de milieu réguliers afin d'aboutir à leurs différenciations en iDC. Leur maturation a été réalisée avec un cocktail de cytokines différent (**Figure 6**).

Le milieu de culture est le même que celui utilisé dans le protocole de différenciation des monocytes en macrophages.

Les monocytes frais ont été mis en plaque de 48 puits à raison de $2,5 \cdot 10^5$ cellules/puits dans un volume final de 500 μ L. Ce milieu a été enrichi en cytokines à raison de 60 ng/mL d'IL-4 et 200 ng/mL de GM-CSF. Les cellules ont été incubées pendant 48 heures à 37°C et 5% de CO₂ avant d'ajouter à nouveau supplémenter leur milieu avec 60 ng/mL d'IL-4 et 100 ng/mL de GM-CSF pour atteindre un volume final de 1 mL. Une nouvelle incubation de 72 heures à 37°C et 5% de CO₂ a permis d'obtenir des cellules dendritiques immatures. De là, une partie de ces cellules ont été maturées durant 24 heures en ajoutant directement le cocktail de réactifs suivant dans les milieux de culture : de l'IL-4 à 30 ng/mL, du GM-CSF à 50 ng/mL, du TNF α à 10 ng/mL et du Poly(I:C) (InvivoGen, Cat# tlrl-pic) à 50 μ g/mL.

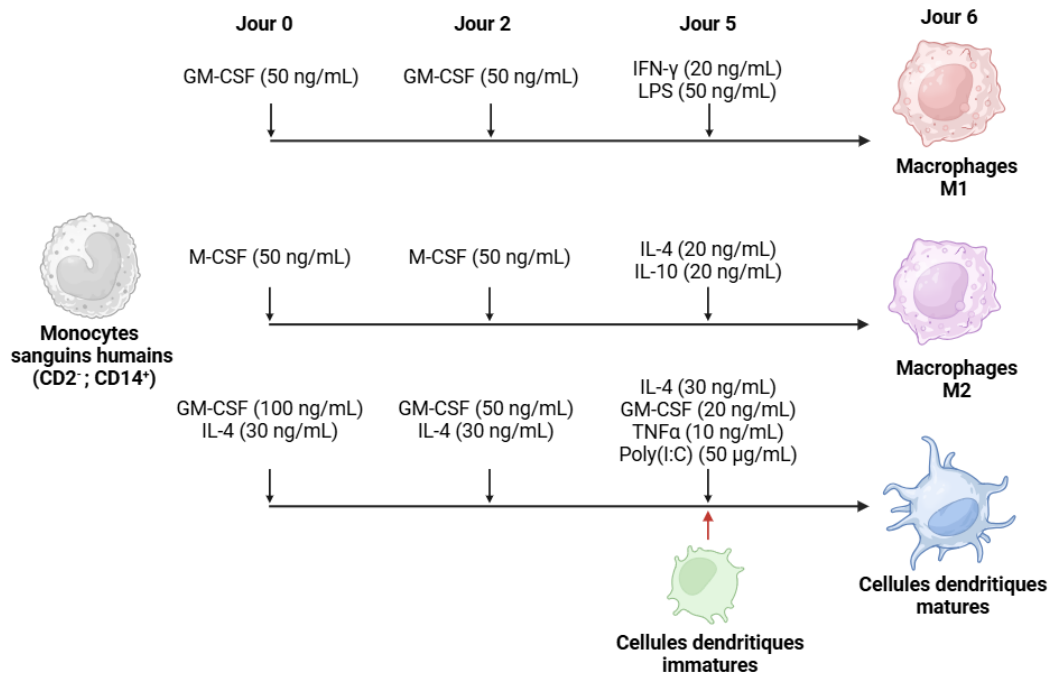


Figure 6 : Protocole de différenciation des monocytes sanguins humains en macrophages M1 et M2 et en cellules dendritiques immatures et matures.

Les monocytes sanguins précédemment isolés grâce aux marqueurs CD2 et CD14, ont été mis en culture avec des cocktails de cytokines spécifiques à chaque type cellulaire. Les macrophages M1 ont été stimulés avec du GM-CSF puis de l'IFN- γ et du LPS ; les macrophages M2 avec du M-CSF puis de l'IL-4 et de l'IL-10 ; les cellules dendritiques immatures avec du GM-CSF et de l'IL-4, une partie de ces dernières ont été maturées par stimulation avec de l'IL-4, du GM-CSF, du TNF- α et du Poly(I:C) (Protocole repris de Delhez et al (2024)).

Min-U-Sil-5

Les particules de Min-U-Sil-5 (US Silica, Cat #15062696) ont préalablement été stérilisés dans un four (200°C, 2 heures). Les particules ont été resuspendues dans du milieu RPMI 1640 (supplémenté avec 1% d'AA pour THP-1 et de l'Hepes, 10% de FBS décomplémenté, 1% d'AA et 1,5 mM de GlutaMAX pour les monocytes sanguins) pour obtenir une solution stock de 40 cm²/mL pour les THP-1 et 10 cm²/mL pour les monocytes sanguins. Les solutions stock ont ensuite été soniquées (4°C, 3 minutes, 30% d'amplitude). Les cellules ont été exposées à la silice cristalline pendant 24h à

10 cm²/mL pour les THP-1 et à 5 cm²/mL pour les monocytes sanguins dans l'incubateur stérile à 37°C et 5% CO₂. Suite à l'incubation, les surnageants ont été collectés (1200 rpm, 5 minutes) et ont été stockés à -80°C.

Poly (I:C)

L'utilisation de Poly (I:C) (Polyinosinic-polycytidylic acid, Invivogen, tlr1-pic) nous a servi de contrôle positif à la production de transcrits d'IFN- β (Chera et al., 2023). Il s'agit d'un analogue synthétique d'ARN double brin (ARNdb) qui est reconnu par les senseurs d'ARNdb et induit leur activation. Le Poly(I:C) a été transfecté (2,5 μ g/mL) dans les cellules à l'aide de Lipofectamine 2000 (LF2000) (Thermofisher, Cat #11668019). Pour réaliser la transfection, le milieu de culture a été remplacé par du milieu Opti-MEM afin de limiter le taux de FBS, capable d'interférer avec la transfection (Peng et al., 2015) (Thermofisher, Cat #31985070). Une solution stock de Poly (I:C) a été utilisée et 5 μ L on été ajouté à 495 μ L d'Opti-MEM (pour chaque puits d'une plaque 48 puits). En parallèle, 250 μ L de LF2000 ont été ajouté à 250 μ L d'Opti-MEM (pour chaque puits d'une plaque 48 puits). Après une incubation de 5 minutes à température ambiante, les deux solutions ont été incubé ensemble durant 10 minutes à température ambiante. 1mL de ce mélange a été ajouté à chaque puits. Une incubation de 24h dans un incubateur stérile à 37°C et 5% de CO₂ s'en est suivie. Le milieu a été changé après 4 heures par du milieu complet.

Cytométrie en flux

La cytométrie en flux est une méthode immunologique permettant une analyse qualitative et quantitative de protéines d'intérêt localisées à la membrane, en intracellulaire ou encore en intranucléaire. La technique repose sur le marquage des cellules avec des anticorps spécifiques de la protéine cible, couplés à des fluorochromes. Les cellules marquées passent individuellement dans le cytomètre en flux, où elles sont exposées à des lasers spécifiques. Ces lasers excitent les fluorochromes, permettant ainsi la détection des anticorps liés. La présence de la protéine d'intérêt est déterminée en fonction du signal de fluorescence émis par chaque cellule analysée. L'intensité de

fluorescence est proportionnelle à la quantité d'anticorps liés, ce qui fournit une mesure quantitative de l'expression de la protéine cible au sein d'un groupe cellulaire

Les cellules ont d'abord été transférées dans des tubes FACS (VWR, Cat #352063), puis lavées deux fois avec du D-PBS 1X, avant d'être centrifugées (1 500 rpm, 5 minutes). Les récepteurs Fc sont présents en grande quantité sur les monocytes (Junker et al., 2020), ces récepteurs ont été bloqués avec 1 µL d'anticorps anti-FcBlock (Biolegend, Cat #422301) par tube, puis incubés (10 minutes, température ambiante) afin d'éviter tout marquage aspécifique. Les cellules THP-1 ont ensuite été marquées avec les anticorps suivants à raison de 1µL par tube FACS : anti-CD14 (PE anti-human CD14 Antibody, BD Biosciences, Cat #301805), anti-CD11c (PE anti-human CD11c Antibody, BD Biosciences, Cat #31605) et anti-CD83 (FITC anti-human CD83 Antibody, BD Biosciences, Cat #305305). Les cellules ont été incubées avec les anticorps (10 minutes, température ambiante). Un lavage final avec du D-PBS 1X a été réalisé afin d'éliminer l'excédent d'anticorps, et les cellules ont été maintenues sur glace, à l'abri de la lumière, dans le volume résiduel de D-PBS 1X jusqu'à leur analyse.

Les analyses ont été réalisées à l'aide du cytomètre en flux FACS Canto II, en utilisant le logiciel FACS Diva pour l'acquisition des données et FlowJo pour leur traitement.

Le protocole de marquage utilisé pour les monocytes humain est celui expliqué pour le modèle THP-1. Seuls les cocktails d'anticorps et le marqueur de viabilité diffèrent. En effet, 100µL des différents master mix ont été ajoutés dans les tubes. Les master mix sont des solutions de D-PBS 1X dans lesquelles ont été diluées le marqueur de viabilité eFluor780 à raison de 1/400 (Thermo Fischer, #Cat 65-0865-14) et les anticorps anticorps comme indiqués dans le **Tableau 2**.

Panel de détection des cellules dendritiques			Panel de détection des macrophages		
Antigène cible	Fluoro-chrome	Concentration de marquage (µg/mL)	Antigène cible	Fluoro-chrome	Concentration de marquage (µg/mL)
CD1a (BD Biosciences, Cat #563938)	BV421	0,5	CD163 (Biolegend, Cat #333612)	BV421	1
CD11c (Biolegend, Cat #301605)	PE	2	CD206 (BD Biosciences, Cat #551135)	FITC	0,13
CD83 (Biolegend, Cat #561960)	APC	0,19	CD80 (Biolegend, Cat #305227)	BV650	1
CD14 (BD Biosciences, Cat #340660)	PercP	0,25	CD14 (BD Biosciences, Cat #340660)	PercP	0,25
			CD86 (Biolegend, Cat #305406)	PE	1

Tableau 2 : Panel de détection utilisé pour les mo-DC et mo-macrophages

Les analyses des monocytes ont été réalisées sur le cytomètre en flux Novocyte Quanteon et le logiciel de traitement des données FlowJo. Ces marqueurs cellulaires ont servi à caractériser les différents types cellulaires obtenus sur base de leur expression reprise dans le **Tableau 3**.

Marqueurs cellulaires	Types cellulaires				
	Monocytes	Macrophages M1	Macrophages M2	Cellules dendritiques immatures	Cellules dendritiques matures
CD14	+	-	-	-	-
CD11c	-	+	+	+	+
CD80	-	+	-	-	+
CD86	-	+	-	-	+
CD163	-	-	+	-	-
CD206	-	-	+	+	-
CD1a	-	-	-	+	-
CD83	-	-	-	-	+

Tableau 3 : Expression de marqueurs cellulaires par les monocytes, les macrophages M1 et M2 et les cellules dendritiques immatures et matures.

ELISA

Principe

Le test ELISA (Enzyme-Linked Immuno Assay) est une méthode de dosage immuno-enzymatique permettant de quantifier de manière précise la concentration d'une protéine libérée dans le surnageant de culture cellulaire. L'ELISA « sandwich » utilise deux anticorps qui reconnaissent le même antigène. Le premier, l'anticorps de capture, est enrobé au fond des puits d'une plaque 96 puits (Greiner, Cat #655061), suivi du blocage des sites de liaisons aspécifiques (PBS + 1% BSA, 1 heure). Les échantillons à analyser ou les solutions standards du kit (dilués aux concentrations souhaitées dans du PBS + 1% BSA) ont été ajoutés (100 µL/w, 2 heures d'incubation). Les puits ont ensuite été incubés avec l'anticorps de détection couplé à la biotine (2 heures), suivi de l'ajout de la peroxydase de Raifort (HRP) couplé à la streptavidine. La streptavidine a une forte affinité pour la biotine lui permettant de se lier à l'anticorps de détection. Chacune des étapes a été suivie de 3 lavages (H₂O, 10 % PBS et 0,005% Tween 20, 300 µL/w). Finalement, la HRP reconnaît son substrat chromogène, le TMB (3,3',5,5'-tétraméthylbenzidine), ajouté en dernier lieu (100 µL/w), qui produit une couleur bleue

lorsqu'il est oxydé avec du peroxyde d'hydrogène. La réaction de coloration a été arrêtée par l'ajout d'un acide fort, le H₂SO₄, faisant passer la couleur au jaune (Abs max = 450 nm). La quantité de coloration générée a été dosée par spectroscopie permettant de quantifier la présence de la protéine d'intérêt (loi de Lambert-Beer)

Les surnageants de culture cellulaire ont été utilisés pour le dosage de TNF- α (ELISA Human TNF α DuoSet, Biotechne, Cat #DY210) et d'IL-1 β (ELISA Human IL-1 beta/IL-1F2 DuoSet, Biotechne, Cat #DY-201). Les échantillons utilisés lors du dosage d'IL-1 β ont été dilués (1:5) dans du PBS + 1% BSA.

Extraction d'ARN et RT-qPCR

La RT-qPCR (Real Time quantitative Polymerase Chain reaction) est une technique qui permet de mesurer l'expression d'un gène précis. Elle commence par une étape de transcription inverse de l'ARN extrait des cellules en ADN complémentaire (ADNc). Ensuite, un couple d'amorces spécifiques permet l'amplification d'une portion ciblée de l'ADNc (amplicon). La quantification des amplicons se fait grâce à la détection de fluorescence émise par le complexe SYBER Green – ADNc double brin.

Afin d'amplifier notre gène d'intérêt (IFN- β), des amorces sens et anti-sens spécifiques sont nécessaires. Les différents couples d'amorces ont été conçus à l'aide du programme BLAST en utilisant le code FASTA du gène d'intérêt, et leur spécificité a été confirmée par le logiciel BLAT. Le nom et séquences du gène d'intérêt se trouve dans le **Tableau 4**

Nom	Séquence
IFNB1 sens	5' -ATG AGC AGT CTG CAC CTG AAA-3'
IFNB1 antisens	5' -TCT GAC TAT GGT CCA GGC AC-3'

Tableau 4 : Nom et séquence du gène d'intérêt.

Extraction de l'ARN

L'extraction de l'ARN à partir des cellules traitées à la SCR a été réalisée à l'aide du réactif Tripure (Roche Diagnostics, Cat. #11667165001). $3,75 \times 10^5$ cellules par puits ont été traitées avec 200 μ L de Tripure et placées à -80°C . Après décongélation, les lysats ont été récupérés et le volume de Tripure a été ajusté à 1 mL par échantillon. À ces 1 mL de Tripure, 200 μ L de chloroforme (Sigma-Aldrich, Cat. #708976-8IN) ont été ajoutés. Après agitation, les échantillons ont été centrifugés pendant 15 minutes (12 000 rcf à 4°C) pour séparer la phase aqueuse supérieure de la phase organique inférieure. 400 μ L de la phase aqueuse ont été récupérés par échantillon, auxquels 500 μ L de propan-2-ol (Sigma-Aldrich, Cat #8.18766) ont été ajoutés. Les échantillons ont été incubés à température ambiante pendant 10 minutes afin de faire précipiter l'ARN. Une nouvelle phase de centrifugation pendant 10 minutes (12 000 rcf et 4°C) s'en est suivi, et le surnageant a été écarté. Le culot a ensuite été lavé une fois avec 950 μ L d'éthanol à 70% avant d'être centrifugé pendant 5 minutes (7 500 rcf et 4°C) et le surnageant a été encore une fois écarté. Après 5 à 10 minutes d'incubation sur plaque chauffante à 60°C , les échantillons ont été incubés à température ambiante pendant une heure. Finalement, le culot a été resuspendu dans 13,5 μ L d'eau Ultra-Pure™ (Invitrogen, Cat #10977-035).

Transcription inverse

À partir de l'ARN extrait et suspendu dans de l'eau UltraPure™, 1 μ L d'hexamères aléatoires (700 picomoles/U, Eurogentec) ont été ajoutés, puis les échantillons ont été incubés pendant 5 minutes à 65°C avant d'être refroidis sur glace. Ensuite, suite à une brève centrifugation, un mélange de réactifs pour la transcription inverse a été ajouté à chaque échantillon.

Mixte (volume par échantillon) :

- 5 μ L Buffer 5x (first strand buffer, Invitrogen, Cat #28025-013)
- 2,5 μ L DTT 0.1 M (Invitrogen, Cat #28025-013)
- 2,5 μ L dNTPs 5 mM (Eurogentec Cat #NU-0010-100)
- 1 μ L RT-M-MLV 200 U/ μ L (Thermo Fischer scientific, Cat #28025-013)

Le mélange a été incubé pendant 10 minutes à température ambiante, puis 1 heure à 37°C dans un bain-marie. L'activité de la reverse transcriptase a ensuite été inhibée par une incubation des échantillons (15 minutes, 70°C) avant d'être refroidie sur glace et centrifugé brièvement. L'ADN complémentaire obtenu a finalement été dilué 5 fois dans de l'eau UltraPure™.

Standards PCR

Pour réaliser les standards de notre gène d'intérêt, des échantillons d'ADNc isolé à partir de THP-1 traités 18h à l'IFN- α . Les PCR ont été réalisées avec l'enzyme polymérase AmpliTaq Gold (AmpliTaq Gold™ DNA Polymerase, Thermo Fischer Scientific, Cat. #N8080241) en suivant le programme de température suivant : 10 minutes à 95°C, suivi de 40 cycles de 15 secondes à 95°C et 1 minute à 60°C. Pour cela, 20 μ L du mixte PCR, suivi de l'ajout de 5 μ L de l'ADNc désiré, ont été ajoutés dans chaque puits de la plaque PCR (**Tableau 5**).

<u>Volumes</u>	<u>Composants</u>
12,5 μ L	H ₂ O
2,5 μ L	Tampon 10x (kit AmpliTaq Gold™)
3 μ L	MgCl ₂ 25 mM (kit AmpliTaq Gold™)
1 μ L	dNTPs 5 mM (kit AmpliTaq Gold™)
0,38 μ L	Primer sens 20 μ M
0,38 μ L	Primer antisens 20 μ M
0,25 μ L	AmpliTaq Gold 5 U/ μ L

Tableau 5 : Composants et volumes de mixte PCR par échantillon

Les fragments d'ADN amplifiés ont ensuite été purifiés par migration sur un gel d'agarose 2% (E-Gel EX-agarose 2%, precasted, Cat #G402002). Les bandes correspondant au gène d'intérêt ont été isolées et l'ADN amplifié a été extrait à l'aide du kit NucleoSpin Gel and PCR Clean-up (Macherey-Nagel, Cat #MN740609.50). L'ADN a ensuite été quantifié (SpectraMax ID3, Molecular devices, USA) et l'absorbance obtenue a été convertie en nombre de copies d'ADN par μ L (Nbr de copies/ μ L =

$$\frac{(Abs_{260}-Abs_{320}) \times 50 \times 10^{-3} \times 10^{-6} \times 6,02 \times 10^{23}}{660 \times L(pb)}$$
). Des dilutions 1:10 en série ont ensuite été réalisées pour obtenir une droite d'étalonnage de 10^8 copies ADN/ μ L à 10^2 copies ADN/ μ L.

qPCR

Les standards obtenus ont été utilisés pour réaliser la qPCR, permettant de la sorte une quantification des ADNc provenant des différents échantillons. La technologie SYBR Green a été utilisée avec le thermocycleur StepOnePlus (ThermoFischer). Le SYBR Green est un agent intercalant fluorescent qui se fixe sur l'ADNc double brin et émet de la fluorescence uniquement une fois lié au double brin d'ADNc. Pour chaque échantillon, 20 μ L du mixte qPCR ont été préparés (**Tableau 6**), suivis de l'ajout de 5 μ L de l'ADNc souhaité dans chaque puits de la plaque PCR. Nous avons donc travaillé avec un volume final de 25 μ L. Le programme de température suivant a été utilisé : 2 minutes à 50°C, 10 minutes à 95°C, puis 40 cycles de 15 secondes à 95°C et 1 minute à 60°C. Afin de vérifier la spécificité de l'amplification, une courbe de dissociation a été générée en augmentant progressivement la température, de 95°C (15 sec à 95°C, 20 sec à 60°C, 15 sec à 95°C). Ce processus a été répété pendant 20 minutes. Les résultats ont été exprimés sous forme de rapport entre l'expression du gène d'intérêt et l'expression du gène de référence, l'ARN 18S.

<u>Volumes</u>	<u>Composants</u>
6,75 μ L	H ₂ O nano stérile
0,38 μ L	Primer sens 20 μ M
0,38 μ L	Primer antisens 20 μ M
12,5 μ L	SyberGreen Master Mix

Tableau 6 : Composants et volumes de mixte qPCR par échantillon

IV. Résultats

Analyse phénotypique des monocytes THP-1 et de leurs dérivés par cytométrie en flux

Le traitement des monocytes humains THP-1 à la PMA pour leur différenciation en macrophages est fréquemment utilisé au laboratoire selon un protocole bien établi, notamment pour étudier la réponse aux particules. Ainsi, nous avons décidé de caractériser les monocytes et les macrophages THP-1 à l'aide de la cytométrie en flux à deux paramètres (CD14 et CD11c) afin de confirmer leur identité cellulaire. CD14, un marqueur typique de monocytes humains et CD11c, marqueur de cellules présentatrice d'antigène (CPA), ont permis d'établir les profils de ces populations.

Ensuite, nous avons entrepris de différencier les monocytes THP-1 en cellules dendritiques immatures et matures d'après un article de Hölken et al. (2023). Ce modèle a pour intérêt d'étudier l'implication des DC dans la réponse aux particules à partir d'un modèle in-vitro reproductible, et dans la continuité de nos études, sur le modèle de macrophages THP-1. Afin d'analyser la différenciation des monocytes THP-1 en iDC et mDC, une autre analyse par cytométrie en flux a été réalisée avec les marqueurs CD14 et CD83, fortement exprimé par les mDC et plus faiblement par les iDC. Les résultats, exprimés en médian intensité fluorescence (MFI), reflètent le niveau d'expression des marqueurs, en comparant les populations marquées aux cellules non marquées servant de seuil.

Les résultats indiquent que CD14 est exprimé par tous les types cellulaires à l'exception des macrophages THP-1. L'expression de CD11c est exprimé au sein des macrophages THP-1, confirmant leur phénotype. CD11c est également détecté à un niveau moindre dans les cellules dendritiques immatures (iDC) et matures (mDC) (*données non représentées*). Comme attendu, CD83 est exprimé par les DC, avec une expression plus importante au sein des mDC et sans être exprimé par les monocytes THP-1 (**Figure 7**).

Sur base de ces marqueurs cellulaires, nous pouvons valider le phénotype des monocytes THP-1 ainsi que leur forme différenciée en macrophages THP-1 et en cellules dendritiques matures et immatures.

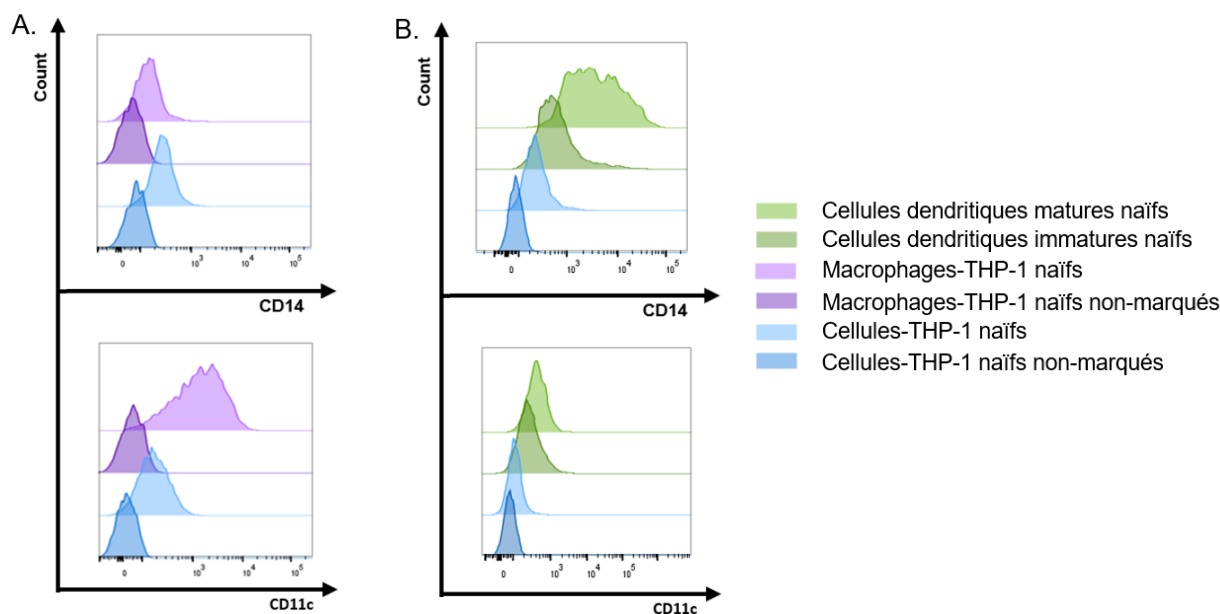


Figure 7 : Expression des marqueurs de surface des monocytes THP-1, des macrophages (M) et des cellules dendritiques matures et immatures dérivées de monocytes THP-1.

(A) Expression de CD14 et CD11c par les monocytes THP-1 naïfs et les M, les monocytes THP-1 ont été traité à la PMA pendant 48 heures pour la génération des M. **(B)** Expression de CD14 et CD83 par les monocytes THP-1 naïfs et les iDC et mDC naïves dérivées de monocytes THP-1, les monocytes THP-1 ont été traité à l'IL-4 et au GM-CSF pendant 6 jours, avec un changement de cytokines au jour 3 pour la génération des iDC, et les monocytes ont été traité au GM-CSF, à l'IL-4, au TNF- α et à l'ionomycine pendant 3 jours pour la génération de mDC.

Evaluation de la libération des cytokines pro-inflammatoires par les monocytes THP-1 et leurs dérivés

Nous avons ensuite étudié et comparé les réponses à la silice cristalline des macrophages THP-1 et des DC THP-1. Dans un premier temps, nous avons mesuré la libération de cytokines pro-inflammatoires, en l'occurrence l'IL-1 β et le TNF α , dans les surnageants cellulaires.

Les résultats indiquent que les macrophages THP-1, après une exposition de 24 heures à la SCR, libèrent significativement plus d'IL-1 β et de TNF α que des le groupe non-traité. L'effet de la silice n'est cependant pas observé dans les cultures de cellules dendritiques THP-1, qu'elles soient matures ou immatures, bien qu'une libération significativement plus élevée soit détectée lorsque les DC matures sont traités à la SCR par rapport au groupe non traité (**Figure 8**).

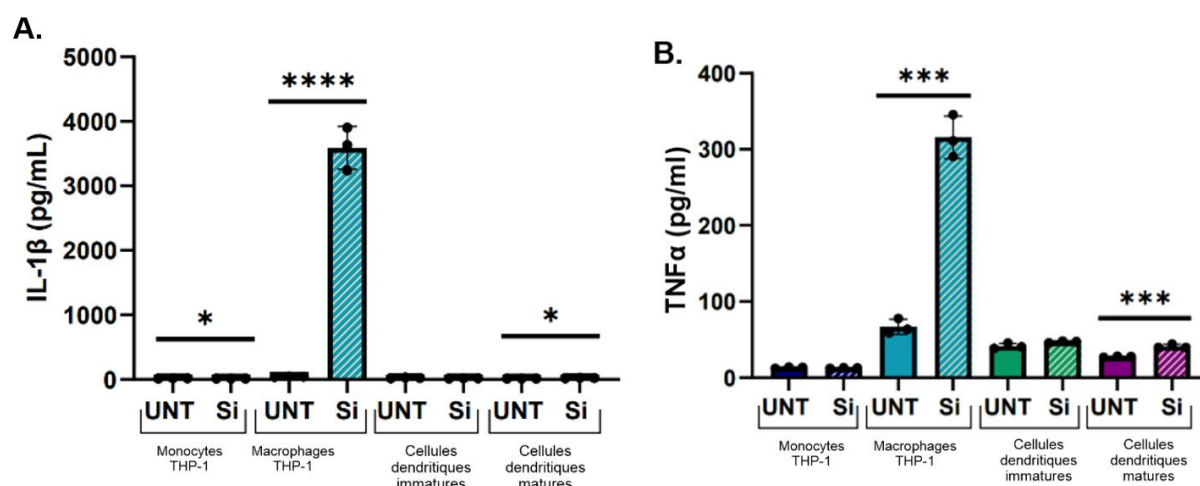


Figure 8 : Les macrophages THP-1 libèrent plus d'IL-1- β et de TNF- α comparativement aux DC THP-1.

(A) Teneur en IL-1 β , et en (B) TNF- α au sein des surnageants de monocytes THP-1, de macrophages (M), de cellules dendritiques immatures (iDC) et matures (mDC) dérivés de monocytes THP-1, traité et non traités avec 10 cm²/mL de Min-U-Sil 5 pendant 24 heures. Les monocytes THP-1 ont été traité à la PMA pendant 2 jours pour la génération des M-THP-1, à l'IL-4 et au GM-CSF pendant 6 jours avec un changement de cytokines au jour 3 pour la génération des iDC-THP-1, et finalement, les monocytes THP-1 ont été traité au GM-CSF, à l'IL-4, au TNF- α et à l'ionomycine pendant 3 jours pour la génération de mDC-THP-1.

Chaque barre mesure la moyenne de 3 réplicats $\pm$ SD (standard deviation). Les résultats ont été analysés statistiquement par l'utilisation d'un test t de Student sur le logiciel GraphPad Prism. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$ indiquent une différence statistiquement significative entre les groupes non traités (UNT) et traités (Si).

Evaluation de l'implication de la silice cristalline dans la production des transcrits d'IFN- β au sein du modèle THP-1

Nous nous sommes ensuite intéressés à la réponse IFN-I. Pour ce faire, nous avons comparé la production des transcrits d'IFN- β dans les monocytes, macrophages, iDC et mDC dérivés de la lignée THP-1. Trois conditions expérimentales ont

été analysées : un groupe non traité (UNT), un groupe exposé à la SCR (10 cm²/mL de Min-U-Sil-5) (Si), et un groupe contrôle positif, constitué de cellules traitées avec du Poly(I:C) (PIC ; 2,5 µg/mL), un analogue synthétique d'ARN double brin connu pour induire la production des transcrits d'IFN-I (Chera et al., 2023). Les traitements ont été effectués durant 24 heures.

Seuls les groupes de cellules traitées avec le Poly(I:C) ont produit des transcrits d'IFN-β, confirmant l'efficacité de ce traitement comme contrôle positif. En revanche, aucune production détectable de transcrits d'IFN-β n'a été observée dans les groupes non traités (UNT) ou exposés à la silice (Si), quel que soit le type cellulaire analysé (**Figure 9**).

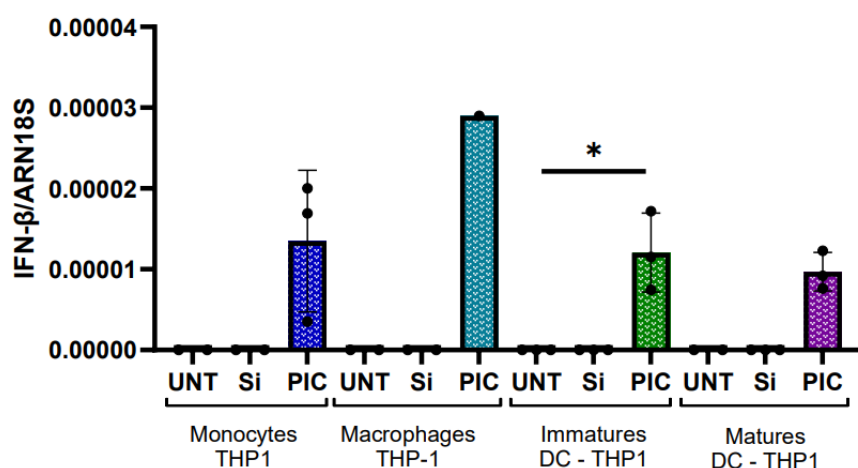


Figure 9 : La silice n'induit pas de production de transcrits d'IFN-β au sein des cellules dérivées de la lignée cellulaire THP-1.

Production de transcrits d'IFN-β au sein des monocytes THP-1, de macrophages (M), de cellules dendritiques immatures (iDC) et matures (mDC) dérivés de monocytes THP-1, traités et non traités avec 10 cm²/mL de Min-U-Sil 5 ou du poly(I:C) pendant 24 heures, avec un remplacement du milieu au bout de 4 heures pour le groupe Poly(I:C). Chaque barre mesure la moyenne de 3 réplicats ± SD (standard deviation). Les comparaisons des différents résultats au groupe contrôle ont été effectuées par une analyse statistique de variance à un facteur (ANOVA), suivi d'un test de comparaison multiple de Dunnett. sur le logiciel GraphPad Prism. *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001, ****p<0,0001 indiquent une différence statistiquement significative entre les groupes non traités (UNT), traités (Si) et contrôle positif (PIC).

Analyse phénoypique des monocytes sanguins humains différenciés et de leurs dérivés traités ou non à la SCR

Analyse phénotypique des cinq types cellulaires étudiés

Afin de confirmer les résultats obtenus sur les cellules THP-1 différenciées, nous avons décidé de répéter les expériences en utilisant des monocytes sanguins humains frais. En effet, il s'agit d'un modèle fréquemment utilisé dans la recherche fondamentale et le protocole de différenciation de ces monocytes en DC est bien développé. De plus, l'utilisation de cellules primaires est plus pertinente que l'utilisation de cellules de lignées.

À cette fin, nous avons réalisé une cytométrie en flux à huit paramètres sur les cinq types cellulaires étudiés : les macrophages M1 et M2, les cellules dendritiques matures et immatures, tous dérivés de monocytes humains frais, ainsi que les monocytes eux-mêmes. Les profils d'expression attendus des huit marqueurs analysés sont récapitulés dans le **Tableau 3**. Tout d'abord, comme expliqué précédemment, CD14 est un marqueur typique de monocytes. CD80 et CD86 sont tous les deux des marqueurs de CPA, toutefois plus exprimés sur les macrophages M1 comparativement aux macrophages M2. CD206 et CD163 sont également des marqueurs de macrophages, tout en étant plus largement exprimé à la surface des macrophages M2. Cependant, CD206 est un marqueur qui est également exprimé par les iDC. CD1a est un marqueur de cellules dendritiques plus exprimé sur les formes immatures que matures. CD11c est exprimé sur les deux formes de DC, mais également sur les macrophages comme décrit précédemment, avec une plus grande proportion sur les M1. Finalement quant à CD83, il s'agit d'un marqueur spécifique des cellules dendritiques matures, pouvant toutefois être exprimé dans une moindre mesure sur les formes immatures (Chávez-Galán et al., 2015 ; Coillard & Segura, 2019 ; Delhez et al., 2024) (**Figure 10**).

Dans un premier temps, l'expression du marqueur de monocytes CD14 a été analysée par cytométrie en flux sur les monocytes sanguins humains après leur purification. Comparée à des monocytes non marqués considérés comme contrôle négatif de fluorescence, la valeur médiane d'intensité de fluorescence nous indique que les monocytes expriment le marqueur CD14.

Ensuite, les monocytes ont été différenciés en macrophages M1 et M2. Concernant CD14, son expression est plus faible sur les macrophages M1 comparativement aux macrophages M2. Le marqueur CD80 est davantage exprimé par les macrophages M1 et M2. CD86, à l'inverse, semble être plus exprimé sur les macrophages M2 que les M1. L'expression de CD206 est légèrement plus élevée sur les macrophages M2 que les M1. Pour CD163 et CD83, leur expression est équivalente entre les deux sous-types de macrophages. Quant à l'expression de CD11c, celle-ci est faiblement augmentée chez les M2 par rapport aux M1. Finalement, CD1a est plus fortement exprimé sur les macrophages M1 comparativement aux M2 **(Figure 10A.)**. Concernant l'aspect morphologique des cellules, nous observons des macrophages adhérents et allongés contrairement aux monocytes qui sont plutôt flottants et ronds **(Figure 10B.)**.

Les monocytes ont ensuite été différenciés en cellules dendritiques immatures et matures. Le marqueur CD14 est moins exprimé sur les cellules dendritiques immatures que sur les cellules dendritiques matures. CD80 et CD86 sont plus exprimés sur les cellules matures que sur les immatures et les macrophages. L'expression de CD206 est semblable entre les DC immatures et matures. CD163, quant à lui, ne semble pas être très exprimé à la surface des DC. Ensuite, le marqueur CD1a semble légèrement plus exprimé sur les DC matures que sur les immatures. Concernant CD11c, son expression est supérieure à celle des macrophages et est similaire entre les deux formes de cellules dendritiques. Le marqueur CD83 n'est pas exprimé par les cellules dendritiques matures et immatures mais il est présent sur les macrophages **(Figure 10A.)**. D'un point de vue morphologique, la différenciation a induit leur allongement, bien que cela soit moins marqué que pour les macrophages **(Figure 10B.)**. Elles ont aussi des contours irréguliers suggérant la présence de dendrites que nous n'observons pas sur les monocytes.

En conclusion, les monocytes expriment bien leur marqueur CD14. Pour les cellules différenciées, sur base de leur morphologie et de l'expression de marqueurs cellulaires, nos résultats suggèrent que nous sommes parvenus à différencier des macrophages et des cellules dendritiques. Cependant, la distinction claire entre les macrophages M1 et M2 et les iDC et mDC n'a pas pu être obtenue.

Analyse des changements phénotypiques des cinq types cellulaires étudiés après exposition à la SCR.

L'analyse des effets phénotypiques de la SCR a été réalisée sur les cinq types cellulaires précédemment décrits.

Au sein des monocytes, nos résultats révèlent que l'exposition à la SCR entraîne une augmentation de l'expression de CD206, CD83 et CD11c. Une hausse notable de l'expression de CD14 a également été observée. L'effet sur CD83, le marqueur clé des cellules dendritiques matures, est particulièrement prononcé, avec un shift positif intense. Par ailleurs, une population négative pour CD163 semble émerger, tandis qu'une faible proportion de cellules commence à exprimer CD86 suite à l'exposition à la SCR. Finalement, l'expression de CD80 reste inchangée au sein des monocytes.

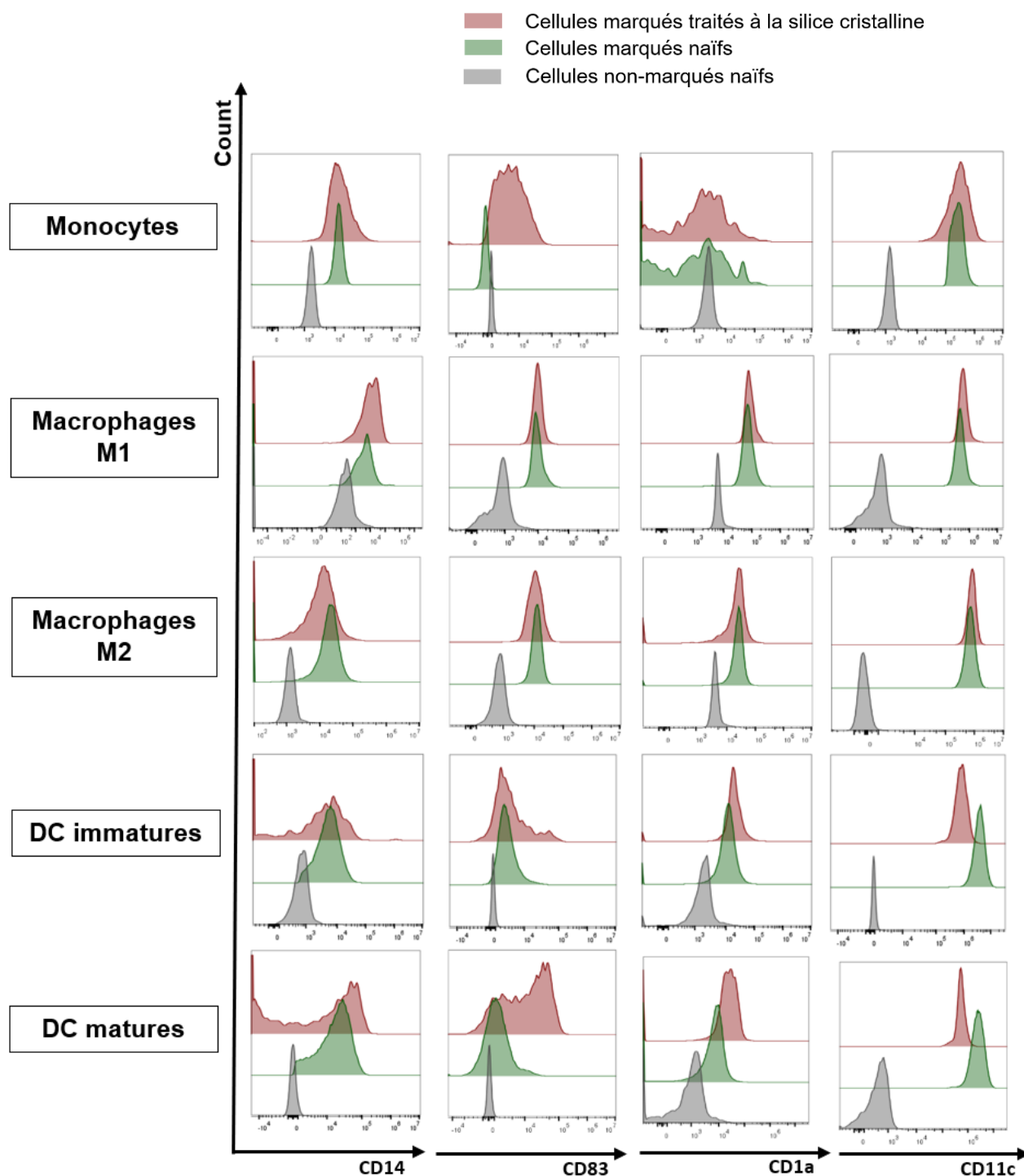
Au niveau des macrophages M1, l'exposition à la SCR n'a entraîné aucune modification notable concernant l'expression des marqueurs CD83, CD1a et CD11c. En revanche, un shift positif a été observé pour CD14 et CD86 et à l'inverse, un shift négatif est apparu pour CD80, CD206 et CD163.

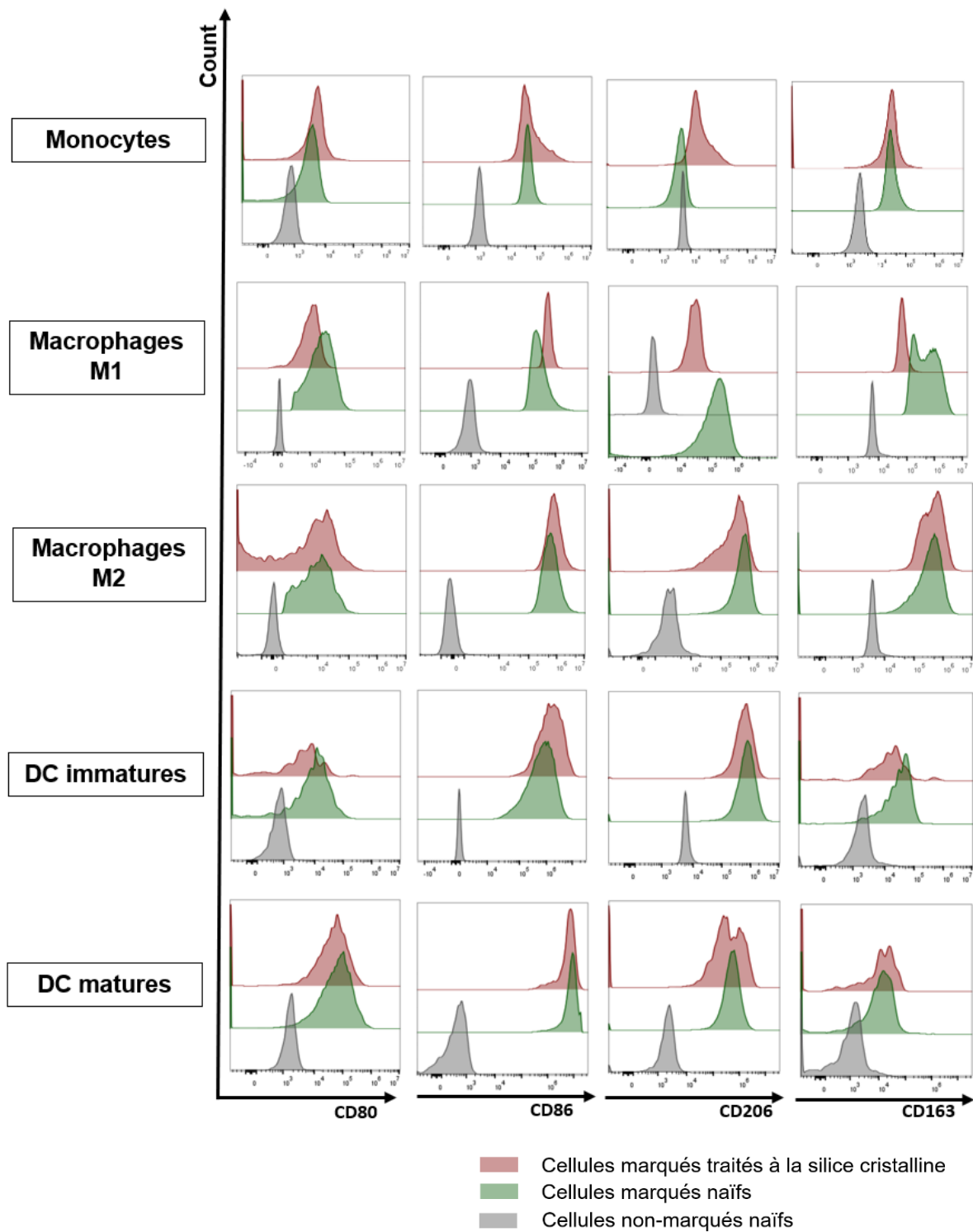
Des effets similaires ont été observés au niveau des macrophages M2, avec une légère diminution de l'expression de CD14 et une perte du marqueur CD80, sans changement notable concernant l'expression de CD83, CD86, CD1a et CD11c suite à l'exposition à la SCR. Toutefois, la silice semble induire l'apparition d'une faible population négative pour CD206 et CD80.

Au sein des iDC, l'exposition à la silice a entraîné un léger shift positif pour CD83, CD1a et CD86, mais une diminution de l'expression de CD14, CD11c, CD80 et CD163 a été notée. L'expression de CD206, quant à elle, est restée inchangée.

Finalement, l'exposition à la SCR dans les cultures mDC a entraîné l'apparition d'une population négative pour CD14 et a fait émerger plusieurs populations distinctes concernant CD206 et CD83. Une augmentation d'une population positive pour CD83 a été constatée, ainsi qu'une augmentation de l'expression de CD11c. En revanche, aucun impact n'a été relevé pour CD80, CD86 ou encore CD163 (**Figure 10A.**).

En conclusion, ces résultats mettent en évidence des effets hétérogènes de la silice cristalline sur les différents types cellulaires étudiés, en fonction de leur état de différenciation. La SCR semble particulièrement influencer l'expression des marqueurs liés à la maturation et à l'activation des CPA, notamment CD83, CD86 et CD206. Ces observations suggèrent que la silice cristalline module les réponses phénotypiques des cellules immunitaires innées, favorisant l'apparition de populations de CPA.





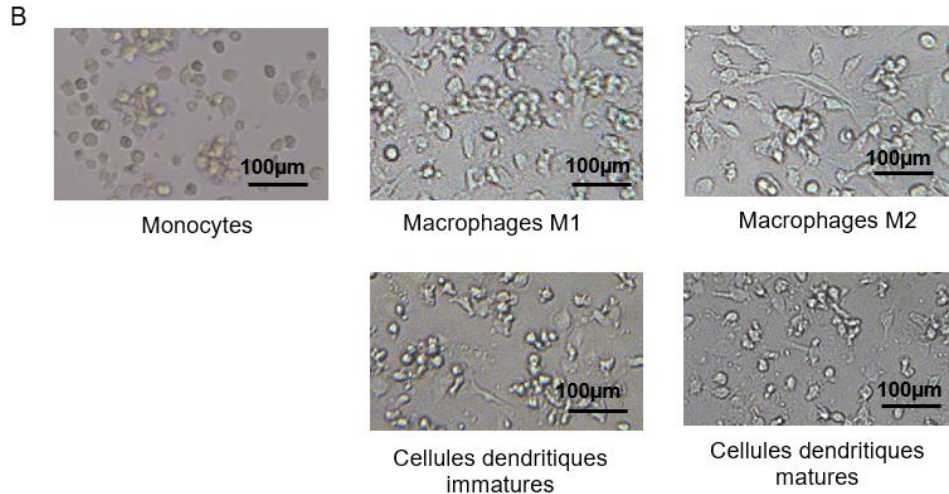


Figure 10 : La silice influence le phénotype des cellules exposées à celle-ci

A : L'expression des marqueurs CD14, CD80, CD86, CD163, CD206, CD1a, CD11c et CD83 a été analysée sur les monocytes sanguins humains après leur isolation par MACS ainsi que sur leur forme différenciée en macrophages M1 et M2 et en cellules dendritiques immatures et matures avant et après traitement à 5 cm²/mL de silice cristalline pendant 24 heures (abscisse = MFI (Median Fluorescence Intensity)) (*FlowJo*). **B** : Les différents types cellulaires naïfs ont été photographiés directement sur plaque à un grossissement x20 (Microscope inverse Nikon Eclipse Ti2A).

Evaluation de l'implication des DC dans la réponse inflammatoire à la SCR

Nous avons ensuite évalué la capacité des monocytes, des macrophages M1 et M2 et des DC matures et immatures à libérer des cytokines pro-inflammatoires, l'IL-1 β et le TNF α . Les cytokines ont été mesurées dans les surnageants cellulaires suite à l'exposition à la SCR.

Les résultats indiquent une augmentation significative des niveaux d'IL-1 β au sein des monocytes et des macrophages M2 traités à la silice et au Poly(I:C). Cependant, une augmentation de la libération d'IL-1 β est observée au sein des macrophages M1 suite au traitement à la silice. Les cellules exposées au Poly(I:C) ont libéré significativement plus de cytokines dans le milieu extracellulaire comparativement aux groupes silice ou encore non-traités (**Figure 11A.**). Toutes les cellules

semblent libérer du TNF α , toutefois, la libération de TNF α suite au traitement Poly(I:C) est significativement plus élevée que dans les groupes silice ou non traités. Les monocytes et DC matures traitées 50 à la silice libèrent elles aussi du TNF α comparativement au groupe non traité, dans une moindre mesure (**Figure 11B**).

En conclusion, nous pouvons dire que la silice n'induit pas d'effets majeurs sur les cellules dérivées de monocytes sanguins frais.

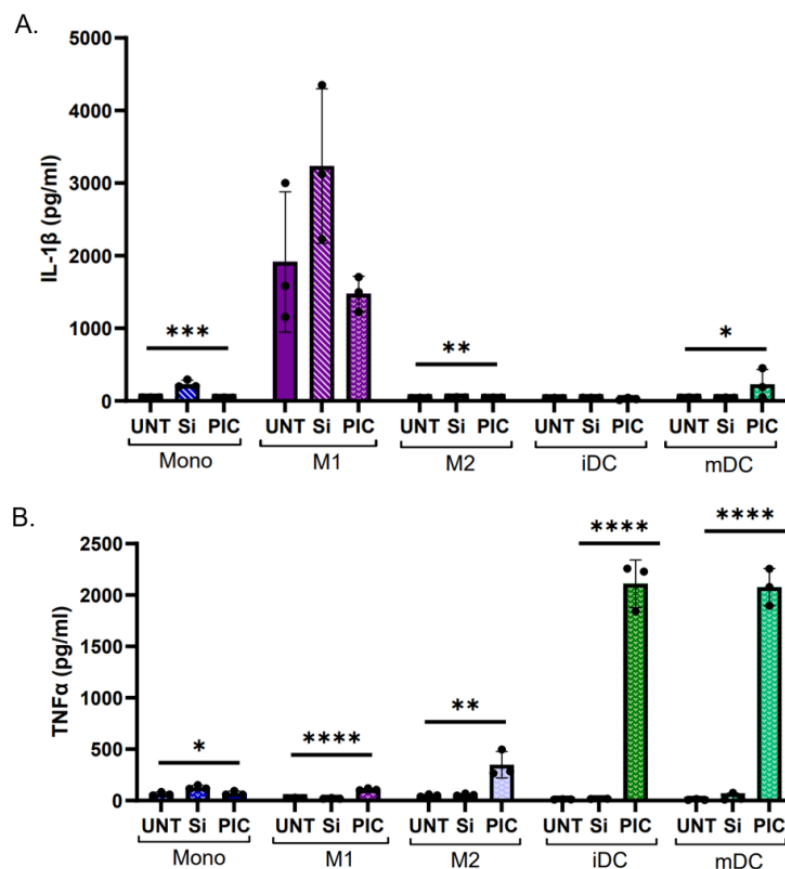


Figure 11 : Les macrophages M1 libèrent plus d'IL-1 β comparativement aux DC, traités ou non traités.

(A) Teneur en IL-1 β , et en (B) TNF- α au sein des surnageants de monocytes frais, de macrophages M1 (M1), de macrophages M2 (M2), de cellules dendritiques immatures (iDC) et matures (mDC) dérivés de monocytes frais, traités et non traités avec 5 cm²/mL de Min-U-Sil 5 ou Polyinosinic:polycytidylic acid (poly(I:C) pendant 24 heures. Les monocytes frais ont été traité au GM-SCF pendant 4 jours suivi d'un traitement de 2 jours à l'IFN- γ et LPS pour la génération des M1, au M-CSF, IL-10 et à l'IL-4 pour la génération des M2, les monocytes ont été traités au GM-CSF et à l'IL-4 pendant 4 jours, pour générer des iDC dont une partie a été maturée suite à une stimulation au GM-CSF, IL-4, TNF α et au poly(I:C). Chaque barre mesure la moyenne de 3 réplicats $\pm$ SD (standard deviation). Les comparai-

sons des différents résultats au groupe contrôle ont été effectuées par une analyse statistique de variance à un facteur (ANOVA), suivi d'un test de comparaison multiple de Dunnett sur le logiciel GraphPad Prism. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, **** $p < 0,0001$ indiquent une différence statistiquement significative entre les groupe non traités (UNT) et traités (Si, PIC).

Evaluation de l'implication des DC dans la réponse IFN-I à la SCR

Enfin, nous avons comparé la production des transcrits d'IFN- β dans les monocytes, macrophages, iDC et mDC, tous dérivés de monocytes humains frais. Trois conditions expérimentales ont été testées : un groupe non traité (UNT), un groupe exposé à la silice (10 cm^2/mL de Min-U-Sil-5 (Si)), et un groupe contrôle positif, constitué de cellules traitées avec du Poly(I:C) (PIC ; 2,5 $\mu\text{g}/\text{mL}$). Les traitements ont été réalisés durant 24 heures.

Les résultats sont similaires à ceux obtenus sur les THP-1. En effet, seules les cellules traitées avec le Poly(I:C) ont montré une production détectable de transcrits d'IFN- β . Aucun transcrit d'IFN- β n'a été détecté dans les groupes non traités (UNT) ou exposés à la silice (Si), quel que soit le type cellulaire analysé (**Figure 12**).

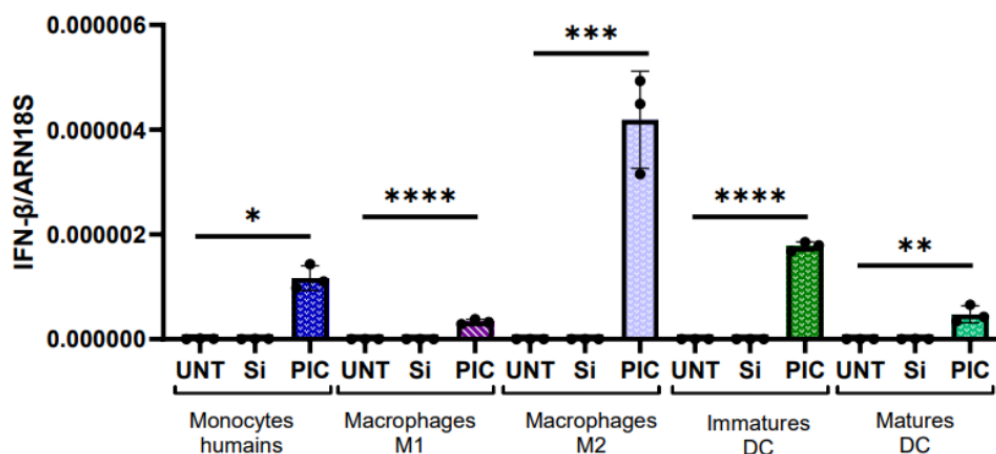


Figure 12 : La silice n'induit pas de production de transcrits d'IFN- β au sein des cellules dérivées des monocytes humains

Production de transcrits d'IFN- β au sein des monocytes THP-1, de macrophages (M), de cellules dendritiques immatures (iDC) et matures (mDC) dérivées de monocytes THP-1, traités et non traités avec 5 cm^2/mL de Min-U-Sil 5 ou 2,5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de Poly(I:C) pendant 24 heures, avec un remplacement du milieu au bout de 4 heures pour le groupe Poly(I:C). Chaque barre mesure la moyenne de 3 réplicats $\pm$ SD (standard deviation). Les comparaisons des différents résultats au groupe contrôle ont été effectuées par une analyse statistique de variance à un facteur (ANOVA), suivi d'un test de comparaison

*multiple de Dunnett. sur le logiciel GraphPad Prism. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$ indiquent une différence statistiquement significative entre les groupes non traités (UNT), traités (Si) et contrôle positif (PIC).*

V. Discussion

La silicose est une pneumoconiose ancienne et potentiellement mortelle, causée par l'exposition à la SCR. Historiquement liée aux mineurs, cette maladie réémerge aujourd'hui en raison de pratiques professionnelles contemporaines telles que le sablage de jeans ou la fabrication de plans de travail en pierre artificielle (Hoy & Chambers, 2020). Malgré ces observations, les mécanismes immunologiques impliqués restent peu définis.

Les cellules dendritiques sont des cellules présentatrices d'antigènes essentielles qui participent à l'initiation et la régulation des réponses immunitaires, jouent un rôle clé dans l'activation des lymphocytes T et la modulation de leur polarisation Th1/Th2 (Balan et al., 2019 ; Yin et al., 2021). Morin et al. (2025) affirment que les DCs sont fortement recrutées dans les poumons exposés à la SCR, principalement au cours de la phase fibrosante, et contribuent à un déséquilibre du rapport des lymphocytes T auxiliaires de type 1 Th1/Th2. Des études *in vitro* ont établi que des mo-DC exposées à des particules de silice cristalline présentent une diminution des marqueurs CD80 et CD86 (Kang & Lim, 2012 ; Liu et al., 2019). De plus, une augmentation significative de l'expression de gènes pro-inflammatoires (IL-12p70, IL-18, TLR4, TLR9, Myd88, NF- κ B) a été rapportée (Kang & Lim, 2012 ; Liu et al., 2019 ; Galli et al., 2025)

Par ailleurs, il est essentiel de noter que les IFN-I contribuent aux réponses inflammatoires induites par la silice cristalline. Bien que ces cytokines soient classiquement associées aux infections virales, leur implication a également été mise en évidence dans des modèles murins exposés à la SCR (Benmerzoug et al., 2018 ; Giordano et al., 2010). Étant des producteurs majeurs d'IFN-I, les DC pourraient contribuer à ces mécanismes. Dans ce contexte, nous avons exploré leur rôle potentiel.

Pour ce faire, nous avons utilisé la lignée monocyttaire THP-1 pour sa capacité à facilement se différencier en macrophages et pour sa pertinence dans des études liées à l'inflammation (Mohd Yasin et al., 2022). Nous avons donc pu développer un modèle *in vitro* de cette lignée différenciée en macrophages-THP-1 et cellules dendritiques-THP-1, en nous basant sur l'article de Hölken et al. (2023). La nature de chaque population cellulaire a été validée par cytométrie en flux. Les monocytes THP-1 ont été identifiés par leur expression de CD14, un co-récepteur des TLRs impliqué dans la détection des PAMPs (Na et al., 2023). Les macrophages, quant à eux, ont été caractérisés par une perte d'expression de CD14 et un intense gain d'expression de CD11c, un marqueur classique des macrophages inflammatoires (Corbin et al., 2020). Les iDC et mDC ont conservé une expression de CD14 tout en exprimant CD83, un marqueur caractéristique des cellules dendritiques, permettant leur identification. Il est toutefois nécessaire de noter que la distinction entre les deux types de cellules dendritiques repose uniquement sur un marqueur unique, le CD83. Cela limite la robustesse de leur identification et nécessite des analyses complémentaires pour confirmer ces résultats, notamment avec l'utilisation d'un marqueur complémentaire, comme le CD80 ou encore le CD86 (Kim & Kim, 2019). De plus, Cao et al. (2005) affirment que CD83 n'est pas sensé être exprimé à la surface iDC, étant un marqueur de mDC uniquement.

Il est bien établi que les macrophages jouent un rôle clé dans la réponse inflammatoire à la silice cristalline, notamment via l'activation de l'inflammasome NLRP3 qui se traduit par une libération de cytokines pro-inflammatoires telles que l'IL-18 et IL-1 β (Marrocco & Ortiz, 2022). Pour évaluer l'implication des DC dans la réponse inflammatoire induite par la silice cristalline, des dosages ELISA ont été réalisés dans les surnageants cellulaires afin de mesurer les concentrations des cytokines pro-inflammatoires IL-1 β et TNF α . Nos résultats confirment les observations de Marrocco & Ortiz (2022) ; les macrophages-THP1 semblent libérer des quantités importantes d'IL-1 β en réponse à la silice. En revanche, les DC-THP-1 ne semblent pas constituer les principaux acteurs dans la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires suite à une exposition à la silice cristalline. Nos résultats concernant la libération d'IL-1 β contrastent avec les travaux de Lai et al. (2018), qui ont démontré que les mo-DC infectées par le virus de la dengue pouvaient activer l'inflammasome NLRP3 et induire la libération d'IL-1 β . Cela suggère que, bien que les DC soient capables d'activer l'inflammasome NLRP3

dans certains contextes, leur rôle dans la réponse inflammatoire à la silice cristalline semble être limité.

Pour approfondir notre analyse, nous avons évalué la production des transcrits d'IFN- β au sein de nos quatre types cellulaires. Nous avons travaillé avec un groupe de cellules non traité, un groupe de cellules traité à la silice et un troisième traité au Poly(I:C), capable d'induire la production d'IFN-I (Chera et al., 2023). Les résultats ont montré que seul le Poly(I:C) induisait la production d'IFN- β . L'ensemble des cellules traitées à la silice cristalline ne produisaient pas plus de ces transcrits après 24 heures de traitement. Ces résultats soulignent l'absence d'activation de la voie des IFN-I en réponse à la silice cristalline dans les cellules testées, et renforcent l'idée que les mécanismes immunitaires déclenchés par la silice diffèrent de ceux observés lors de certaines infections virales.

Afin de surmonter les limitations liées à l'utilisation des cellules de lignée, nous avons reproduit ces expériences sur des monocytes sanguins humains frais. En effet, bien que la lignée cellulaire THP-1 soit couramment utilisées pour étudier les mécanismes immunitaires, elle présente certaines limites. En effet, ces cellules présentent des différences notables par rapport aux monocytes humains frais, notamment en termes de profils d'expression génique et de réponse aux stimuli (Qin, 2012 ; Schildberges et al., 2013 ; Liu et al., 2021). Les monocytes humains frais ont été différenciés selon le protocole de l'article de Delhez et al (2024) en macrophages polarisés en M1/M2 et en i/mDC. Nous avons réussi à obtenir des macrophages et des cellules dendritiques à partir des monocytes humains. Cependant, la distinction claire entre les macrophages de type M1 et M2 reste difficile en raison de la co-expression de certains marqueurs caractéristiques des macrophages M2 (CD206, CD163) sur les macrophages M1, et inversement, de la présence de marqueurs typiques des macrophages M1 (CD80, CD86) dans les cellules M2. Cette co-expression de marqueurs a rendu l'identification des sous-populations difficile et a démontré la présence de populations de macrophages très hétérogènes au sein de chacun des deux groupes (Jha et al., 2024). De même, pour les cellules dendritiques, il n'a pas été possible de différencier distinctement les formes immatures des formes matures, en raison de la présence de marqueurs partagés entre ces deux sous-population. Toutefois, ces analyses ont permis de confirmer que l'exposition à la silice cristalline induit une augmentation de l'expression de certaines protéines membranaires caractéristiques des phagocytes, telles

que CD83, CD86 et CD206, avec une surexpression marquée du marqueur typique des cellules dendritiques matures, CD83. Ceci pourrait suggérer que les DC pourraient être activées par des particules de silice cristalline au sein du poumon.

Les dosages de cytokines pro-inflammatoire, IL-1 β et TNF α ont confirmé les résultats obtenus sur la lignée cellulaire THP-1. Les macrophages M1, mais pas les DC, semblent jouer un rôle clé dans la réponse inflammatoire induite par la silice cristalline. Par ailleurs, le traitement par Poly(I:C) a induit la libération de TNF α dans tous les types cellulaires, en accord avec les observations de Reimer et al. (2008).

Pour finaliser nos recherches, nous avons évalué la production des transcrits d'IFN- β au sein des monocytes humains frais et leurs dérivés. Nos résultats sur monocytes frais ont confirmé nos résultats THP-1 ; l'absence de transcription détectable après une exposition de 24 heures à la silice cristalline, renforçant ainsi les observations obtenues avec les cellules THP-1.

Il est intéressant de noter que ces résultats proviennent d'expériences in vitro, de cultures monocellulaires, sans co-culture de différentes populations cellulaires comme les cellules épithéliales ou les fibroblastes. Notre approche (un seul type cellulaire étudié à chaque fois) est utile pour identifier les effets spécifiques de la silice cristalline sur les types cellulaires distincts mais ne reflète définitivement pas les interactions cellulaires complexes qui pourraient avoir lieu dans un microenvironnement pulmonaire. Ces limitations pourraient expliquer en partie les résultats observés, notamment l'absence de production d'IFN- β et le rôle limité des cellules dendritiques dans la réponse inflammatoire induit par la silice.

Par ailleurs, l'IFN- β est une cytokine difficile à détecter en raison de ses faibles niveaux d'expression dans les cellules, ce qui constitue un défi analytique important. En revanche, les ISGs sont généralement exprimés à des niveaux beaucoup plus élevés, facilitant ainsi leur détection, comme rapporté par Hamilton et al. (2018). De ce fait, l'étude de la transcription d'ISGs spécifiques tels que MxA, OASL2 ou IRF7 pourrait fournir des informations pertinentes sur la réponse IFN médiée. Une approche pertinente pourrait être le développement d'une PCR multiplex ciblant simultanément des ISGs, afin de permettre une quantification précise et une analyse comparative des niveaux de transcription de ces gènes (Richtsteiger et al., 2003).

Enfin, il serait intéressant d'étudier d'autres types cellulaires présents dans le poumon et qui ont la capacité à produire des IFN-I comme les cellules épithéliales.

VI. Références

- Aldo, P. B., Craveiro, V., Guller, S., & Mor, G. (2013). Effect of culture conditions on the phenotype of THP-1 monocyte cell line. *American journal of reproductive immunology (New York, N.Y. : 1989)*, 70(1), 80-86. <https://doi.org/10.1111/aji.12129>
- Ali, S., Mann-Nüttel, R., Schulze, A., Richter, L., Alferink, J., & Scheu, S. (2019). Sources of Type I Interferons in Infectious Immunity : Plasmacytoid Dendritic Cells Not Always in the Driver's Seat. *Frontiers in Immunology*, 10, 778. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.00778>
- Balan, S., Saxena, M., & Bhardwaj, N. (2019). Dendritic cell subsets and locations. In *International Review of Cell and Molecular Biology* (Vol. 348, p. 1-68). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/bs.ircmb.2019.07.004>
- Baum, L., & Arnold, T. C. (2024). Silicosis. In *StatPearls*. StatPearls Publishing. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK594245/>
- Borm, P. J. A., Fowler, P., & Kirkland, D. (2018). An updated review of the genotoxicity of respirable crystalline silica. *Particle and Fibre Toxicology*, 15, 23. <https://doi.org/10.1186/s12989-018-0259-z>
- Byrne, J. D., & Baugh, J. A. (2008). The significance of nanoparticles in particle-induced pulmonary fibrosis. *McGill Journal of Medicine : MJM*, 11(1), 43-50.
- Cao, W., Lee, S. H., & Lu, J. (2005). CD83 is preformed inside monocytes, macrophages and dendritic cells, but it is only stably expressed on activated dendritic cells. *Biochemical Journal*, 385(Pt 1), 85-93. <https://doi.org/10.1042/BJ200>
- Chávez-Galán, L., Olleros, M. L., Vesin, D., & Garcia, I. (2015). Much More than M1 and M2 Macrophages, There are also CD169+ and TCR+ Macrophages. *Frontiers in Immunology*, 6, 263. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2015.00263>

Chera, J. S., Kumar, S., Bairagi, A. K., Kumar, A., Chandra, P., Vats, A., Ali, M., Roshan, M., Kataria, R. S., & De, S. (2023). Poly(I:C), a double stranded RNA analog, activates the anti-viral DNA sensors in buffalo fibroblasts. *Veterinary Vaccine*, 2(1), 100016. <https://doi.org/10.1016/j.vetvac.2023.100016>

CHEMICAL AND PHYSICAL INFORMATION. (2019). In *Toxicological Profile for Silica*. Agency for Toxic Substances and Disease Registry (US). <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK592829/>

Choi, J., & Ki, C. S. (2024). Differentiation, maturation, and collection of THP-1-derived dendritic cells based on a PEG hydrogel culture platform. *Biotechnology Letters*, 46(2), 235-247. <https://doi.org/10.1007/s10529-023-03457-w>

Collin, M., & Bigley, V. (2018). Human dendritic cell subsets : An update. *Immunology*, 154(1), 3-20. <https://doi.org/10.1111/imm.12888>

Coillard, A., & Segura, E. (2019). In vivo Differentiation of Human Monocytes. *Frontiers in Immunology*, 10, 1907. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.01907>

Corbin, A. L., Gomez-Vazquez, M., Berthold, D. L., Attar, M., Arnold, I. C., Powrie, F. M., Sansom, S. N., & Udalova, I. A. (2020). IRF5 guides monocytes towards an inflammatory CD11c+ macrophage phenotype and promotes intestinal inflammation. *Science immunology*, 5(47), eaax6085. <https://doi.org/10.1126/sciimmunol.aax6085>

Croissant, J. G., Butler, K. S., Zink, J. I., & Brinker, C. J. (2020). Synthetic amorphous silica nanoparticles : Toxicity, biomedical and environmental implications. *Nature Reviews Materials*, 5(12), 886-909. <https://doi.org/10.1038/s41578-020-0230-0>

Fernandez-Ruiz, R., & Niewold, T. B. (2022). Type I IFNs in Autoimmunity. *The Journal of investigative dermatology*, 142(3 Pt B), 793-803. <https://doi.org/10.1016/j.jid.2021.11.031>

Galli, G., Leleu, D., Depaire, A., Blanco, P., Contin-Bordes, C., & Truchetet, M.-E. (2025). Crystalline silica on the lung–environment interface : Impact on immunity, epithelial cells, and therapeutic perspectives for autoimmunity. *Autoimmunity Reviews*, 24(3), 103730. <https://doi.org/10.1016/j.autrev.2024.103730>

- Giordano, G., Van Den Brûle, S., Lo Re, S., Triqueneaux, P., Uwambayinema, F., Yakoub, Y., Couillin, I., Ryffel, B., Michiels, T., Renauld, J.-C., Lison, D., & Huaux, F. (2010). Type I Interferon Signaling Contributes to Chronic Inflammation in a Murine Model of Silicosis. *Toxicological Sciences*, 116(2), 682-692. <https://doi.org/10.1093/tox-sci/kfq158>
- Granot, T., Senda, T., Carpenter, D. J., Matsuoka, N., Weiner, J., Gordon, C. L., Miron, M., Kumar, B. V., Griesemer, A., Ho, S.-H., Lerner, H., Thome, J. J. C., Connors, T., Reizis, B., & Farber, D. L. (2017). Dendritic Cells Display Subset and Tissue-Specific Maturation Dynamics over Human Life. *Immunity*, 46(3), 504-515. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2017.02.019>
- Hamilton, J. A., Wu, Q., Yang, P., Luo, B., Liu, S., Li, J., Mattheyses, A., Sanz, I., Chatham, W. W., Hsu, H.-C., & Mountz, J. D. (2018). Intracellular interferon- β and distinct type I IFN expression patterns in circulating SLE B cells. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 201(8), 2203-2208. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1800791>
- Hölken, J. M., & Teusch, N. (2023). The Monocytic Cell Line THP-1 as a Validated and Robust Surrogate Model for Human Dendritic Cells. *International Journal of Molecular Sciences*, 24(2), 1452. <https://doi.org/10.3390/ijms24021452>
- Hoy, R. F., & Chambers, D. C. (2020). Silica-related diseases in the modern world. *Allergy*, 75(11), 2805-2817. <https://doi.org/10.1111/all.14202>
- Humans, I. W. G. on the E. of C. R. to. (1997). Para-Aramid Fibrils. In *Silica, Some Silicates, Coal Dust and para-Aramid Fibrils*. International Agency for Research on Cancer. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK410034/>
- Ivashkiv, L. B., & Donlin, L. T. (2014). Regulation of type I interferon responses. *Nature reviews. Immunology*, 14(1), 36-49. <https://doi.org/10.1038/nri3581>
- Iwasaki, A. (2012). A Virological View of Innate Immune Recognition. *Annual Review of Microbiology*, 66(Volume 66, 2012), 177-196. <https://doi.org/10.1146/annurev-micro-092611-150203>
- Jha, P. K., Aikawa, M., & Aikawa, E. (2024). Macrophage heterogeneity and efferocytosis : Beyond the M1/M2 dichotomy. *Circulation research*, 134(2), 186-188. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.123.324011>

- Junker, F., Gordon, J., & Qureshi, O. (2020). Fc Gamma Receptors and Their Role in Antigen Uptake, Presentation, and T Cell Activation. *Frontiers in Immunology*, 11, 1393. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.01393>
- Kang, K., & Lim, J.-S. (2012). Induction of Functional Changes of Dendritic Cells by Silica Nanoparticles. *Immune Network*, 12(3), 104-112. <https://doi.org/10.4110/in.2012.12.3.104>
- Kawasaki, H. (2015). A mechanistic review of silica-induced inhalation toxicity. *Inhalation Toxicology*, 27(8), 363-377. <https://doi.org/10.3109/08958378.2015.1066905>
- Kim, M. K., & Kim, J. (2019). Properties of immature and mature dendritic cells : Phenotype, morphology, phagocytosis, and migration. *RSC Advances*, 9(20), 11230-11238. <https://doi.org/10.1039/C9RA00818G>
- Lai, J., Wang, M., Huang, C., Wu, C., Hung, L., Yang, C., Ke, P., Luo, S., Liu, S., & Ho, L. (2018). Infection with the dengue RNA virus activates TLR9 signaling in human dendritic cells. *EMBO Reports*, 19(8), e46182. <https://doi.org/10.15252/embr.201>
- Leblanc-Hotte, A., Audiger, C., Chabot-Roy, G., Lombard-Vadnais, F., Delisle, J.-S., Peter, Y.-A., & Lesage, S. (2023). Immature and mature bone marrow-derived dendritic cells exhibit distinct intracellular mechanical properties. *Scientific Reports*, 13, 1967. <https://doi.org/10.1038/s41598-023-28625-w>
- Lee, S., Hayashi, H., Mastuzaki, H., Kumagai-Takei, N., & Otsuki, T. (2017). Silicosis and autoimmunity. *Current Opinion in Allergy and Clinical Immunology*, 17(2), 78. <https://doi.org/10.1097/ACI.0000000000000350>
- Leinardi, R., Longo Sanchez-Calero, C., & Huaux, F. (2022). Think Beyond Particle Cytotoxicity : When Self-Cellular Components Released After Immunogenic Cell Death Explain Chronic Disease Development. *Frontiers in Toxicology*, 4, 887228. <https://doi.org/10.3389/ftox.2022.887228>
- Liu, Y., Li, H., Czajkowsky, D. M., & Shao, Z. (2021). Monocytic THP-1 cells diverge significantly from their primary counterparts : A comparative examination of the chromosomal conformations and transcriptomes. *Hereditas*, 158(1), 43. <https://doi.org/10.1186/s41065-021-00205-w>

- Ma, W., Huang, G., Wang, Z., Wang, L., & Gao, Q. (2023). IRF7 : Role and regulation in immunity and autoimmunity. *Frontiers in Immunology*, 14. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2023.1236923>
- Marrocco, A., & Ortiz, L. A. (2022). Role of metabolic reprogramming in pro-inflammatory cytokine secretion from LPS or silica-activated macrophages. *Frontiers in Immunology*, 13, 936167. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2022.936167>
- McNab, F., Mayer-Barber, K., Sher, A., Wack, A., & O'Garra, A. (2015). Type I interferons in infectious disease. *Nature Reviews Immunology*, 15(2), 87-103. <https://doi.org/10.1038/nri3787>
- Morin, L., Zimmermann, F., Lelong, M., Ferrant, J., Hemon, P., Patry, S., Le Tallec, E., Uwambayinema, F., Yakoub, Y., Dumontet, E., Huaux, F., Lescoat, A., & Lecureur, V. (2025). Pulmonary and systemic effects of inhaled crystalline silica in the HOCl-induced mouse model of systemic sclerosis : An experimental model of Erasmus syndrome. *Clinical Immunology*, 271, 110423. <https://doi.org/10.1016/j.clim.2024.110>
- Na, K., Oh, B.-C., & Jung, Y. (2023). Multifaceted role of CD14 in innate immunity and tissue homeostasis. *Cytokine & Growth Factor Reviews*, 74, 100-107. <https://doi.org/10.1016/j.cytogfr.2023.08.008>
- Paludan, S. R., & Bowie, A. G. (2013). Immune sensing of DNA. *Immunity*, 38(5), 870. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2013.05.004>
- Pavan, C., Delle Piane, M., Gullo, M., Filippi, F., Fubini, B., Hoet, P., Horwell, C. J., Huaux, F., Lison, D., Lo Giudice, C., Martra, G., Montfort, E., Schins, R., Sulpizi, M., Wegner, K., Wyart-Remy, M., Ziemann, C., & Turci, F. (2019). The puzzling issue of silica toxicity : Are silanols bridging the gaps between surface states and pathogenicity? *Particle and Fibre Toxicology*, 16, 32. <https://doi.org/10.1186/s12989-019-0315-3>
- Pavan, C., Santalucia, R., Leinardi, R., Fabbiani, M., Yakoub, Y., Uwambayinema, F., Ugliengo, P., Tomatis, M., Martra, G., Turci, F., Lison, D., & Fubini, B. (2020). Nearly free surface silanols are the critical molecular moieties that initiate the toxicity of silica particles. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 117(45), 27836-27846. <https://doi.org/10.1073/pnas.2008006117>

- Peng, S.-W., Ko, W.-H., Yeh, M.-K., Chiang, C.-H., & Chen, J.-L. (2015). The mechanism of high transfection efficiency of human serum albumin conjugated polyethylenimine in A549 cells. *Journal of Medical Sciences*, 35(2), 57. <https://doi.org/10.4103/1011-4564.156009>
- Pfeffer, P. E., Ho, T. R., Mann, E. H., Kelly, F. J., Sehlstedt, M., Pourazar, J., Dove, R. E., Sandstrom, T., Mudway, I. S., & Hawrylowicz, C. M. (2018). Urban particulate matter stimulation of human dendritic cells enhances priming of naive CD8 T lymphocytes. *Immunology*, 153(4), 502-512. <https://doi.org/10.1111/imm.12852>
- Provoost, S., Maes, T., Willart, M. A. M., Joos, G. F., Lambrecht, B. N., & Tournoy, K. G. (2009). Diesel Exhaust Particles Stimulate Adaptive Immunity by Acting on Pulmonary Dendritic Cells. *The Journal of Immunology*, 184(1), 426-432. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.0902564>
- Qin, Z. (2012). The use of THP-1 cells as a model for mimicking the function and regulation of monocytes and macrophages in the vasculature. *Atherosclerosis*, 221(1), 2-11. <https://doi.org/10.1016/j.atherosclerosis.2011.09.003>
- Richtsteiger, R., Henke-Gendo, C., Schmidtke, M., Harste, G., & Heim, A. (2003). Quantitative multiplex real-time PCR for the sensitive detection of interferon β gene induction and viral suppression of interferon β expression. *Cytokine*, 24(5), 190-200. <https://doi.org/10.1016/j.cyto.2003.09.001>
- Redlich C., James Efi S., & Linde Brien. (2023). *Silicose—Troubles pulmonaires*. Édition professionnelle du Manuel MSD. <https://www.msmanuals.com/fr/professional/troubles-pulmonaires/maladies-pulmonaires-liées-à-l-environnement-et-au-travail/silicose>
- Reimer, T., Brcic, M., Schweizer, M., & Jungi, T. W. (2008). Poly(I:C) and LPS induce distinct IRF3 and NF- κ B signaling during type-I IFN and TNF responses in human macrophages. *Journal of Leukocyte Biology*, 83(5), 1249-1257. <https://doi.org/10.1189/jlb.0607412>
- Segura, E. (2016). Review of Mouse and Human Dendritic Cell Subsets. In E. Segura & N. Onai (Éds.), *Dendritic Cell Protocols* (p. 3-15). Springer. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-3606-9_1

- Schildberger, A., Rossmanith, E., Eichhorn, T., Strassl, K., & Weber, V. (2013). Monocytes, Peripheral Blood Mononuclear Cells, and THP-1 Cells Exhibit Different Cytokine Expression Patterns following Stimulation with Lipopolysaccharide. *Mediators of Inflammation*, 2013, 697972. <https://doi.org/10.1155/2013/697972>
- Toxicological Profile for Silica*. (2019). Agency for Toxic Substances and Disease Registry (US). <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK592827/>
- Yin, X., Chen, S., & Eisenbarth, S. C. (2021). Dendritic Cell Regulation of T Helper Cells. *Annual Review of Immunology*, 39, 759-790. <https://doi.org/10.1146/annurev-immunol-101819-025146>
- Walter, M. R. (2020). The Role of Structure in the Biology of Interferon Signaling. *Frontiers in Immunology*, 11, 606489. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.606489>
- Wei, Y., You, Y., Zhang, J., Ban, J., Min, H., Li, C., & Chen, J. (2023). Crystalline silica induced macrophage pyroptosis interacting with mitophagy contributes to pulmonary fibrosis via modulating mitochondria homeostasis. *Journal of Hazardous Materials*, 454, 131562. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2023.131562>

English abstract

Crystalline silica, primarily in its quartz form, is one of the most abundant minerals in the Earth's crust. It is released into the environment through industrial processes such as grinding and fragmentation of materials like stones and rocks. Once inhaled, crystalline silica particles reach the pulmonary alveoli, where they induce various pathologies. Exposure to crystalline silica is associated with the development of chronic inflammation, pulmonary fibrosis, as well as an increased risk of lung cancers and autoimmune diseases. Currently, macrophages are established as being responsible for the inflammation induced by crystalline silica, but the underlying mechanisms remain poorly understood.

Moreover, our laboratory has demonstrated the presence of type I interferons (IFN-I) in murine lung homogenates. This observation is surprising, as the IFN-I response induced by crystalline silica is considered sterile, meaning it occurs in the absence of any microorganism. Given that dendritic cells are the primary producers of IFN-I, we explored their potential role in this context.

To test their involvement, we first differentiated THP-1 monocytes into macrophages and dendritic cells and then evaluated their inflammatory response and IFN-I production after exposure to silica. These experiments were subsequently replicated with fresh human blood monocytes, as the use of this model provides a physiologically relevant system, allowing for a better understanding of the immune processes that may occur within the lung. Our results showed that macrophages exposed to crystalline silica were responsible for the inflammation, whereas silica-treated dendritic cells did not produce IFN-I. Thus, the role of dendritic cells in IFN-I production in response to silica could not be confirmed.

UNIVERSITÉ CATHOLIQUE DE LOUVAIN

Faculté de pharmacie et des sciences biomédicales

Avenue Mounier, 73 bte B1.73.06, 1200 Woluwe-Saint-Lambert, Belgique | www.uclouvain.be/fasb