

## Utilisation des cellules dendritiques en tant que biosenseurs pour la surveillance de la qualité biologique de l'air

Magali Boucher  
Pascale Blais Lecours  
Marc Veillette  
Caroline Duchaine  
David Marsolais

RAPPORTS  
SCIENTIFIQUES

R-1024

## NOS RECHERCHES travaillent pour vous !

**Solidement implanté au Québec depuis 1980, l'Institut de recherche Robert-Sauvé en santé et en sécurité du travail (IRSST) est un organisme de recherche scientifique reconnu internationalement pour la qualité de ses travaux.**

### **Mission**

Contribuer, par la recherche, à la prévention des accidents du travail et des maladies professionnelles ainsi qu'à la réadaptation des travailleurs qui en sont victimes;

Assurer la diffusion des connaissances et jouer un rôle de référence scientifique et d'expertise;

Offrir les services de laboratoires et l'expertise nécessaires à l'action du réseau public de prévention en santé et en sécurité du travail.

Doté d'un conseil d'administration paritaire où siègent en nombre égal des représentants des employeurs et des travailleurs, l'IRSST est financé par la Commission des normes, de l'équité, de la santé et de la sécurité du travail.

### **Pour en savoir plus**

Visitez notre site Web ! Vous y trouverez une information complète et à jour. De plus, toutes les publications éditées par l'IRSST peuvent être téléchargées gratuitement. [www.irsst.qc.ca](http://www.irsst.qc.ca)

Pour connaître l'actualité de la recherche menée ou financée par l'IRSST, abonnez-vous gratuitement :

- au magazine *Prévention au travail*, publié conjointement par l'Institut et la CNESST ([preventionautravail.com](http://preventionautravail.com))
- au bulletin électronique [InfoIRSST](#)

### **Dépôt légal**

Bibliothèque et Archives nationales du Québec  
2018  
ISBN : 978-2-89797-019-2  
ISSN : 0820-8395

IRSST - Direction des communications  
et de la valorisation de la recherche  
505, boul. De Maisonneuve Ouest  
Montréal (Québec)  
H3A 3C2  
Téléphone : 514 288-1551  
[publications@irsst.qc.ca](mailto:publications@irsst.qc.ca)  
[www.irsst.qc.ca](http://www.irsst.qc.ca)  
© Institut de recherche Robert-Sauvé  
en santé et en sécurité du travail,  
juillet 2018

# Utilisation des cellules dendritiques en tant que biosenseurs pour la surveillance de la qualité biologique de l'air

Magali Boucher<sup>1</sup>, Pascale Blais Lecours<sup>1</sup>, Marc Veillette<sup>1</sup>,  
Caroline Duchaine<sup>1, 2</sup>, David Marsolais<sup>1, 3</sup>

<sup>1</sup>Centre de recherche de l'Institut universitaire de cardiologie et de pneumologie de Québec

<sup>2</sup>Département de biochimie, de microbiologie et de bio-informatique, Faculté des sciences et de génie, Université Laval

<sup>3</sup>Département de médecine, Faculté de médecine, Université Laval

RAPPORTS  
SCIENTIFIQUES

R-1024



## Avis de non-responsabilité

L'IRSST ne donne aucune garantie relative à l'exactitude, la fiabilité ou le caractère exhaustif de l'information contenue dans ce document.

En aucun cas l'IRSST ne saurait être tenu responsable pour tout dommage corporel, moral ou matériel résultant de l'utilisation de cette information.

Notez que les contenus des documents sont protégés par les législations canadiennes applicables en matière de propriété intellectuelle.

Cette publication est disponible en version PDF sur le site Web de l'IRSST.



#### ÉVALUATION PAR DES PAIRS

Conformément aux politiques de l'IRSST, les résultats des travaux de recherche publiés dans ce document ont fait l'objet d'une évaluation par des pairs.

## REMERCIEMENTS

Les auteurs tiennent à remercier les personnes et les organismes suivants :

- L'institut de recherche Robert-Sauvé en santé et en sécurité du travail (IRSST) pour le financement de la recherche et le suivi du projet par des experts;
- Le Fonds de recherche du Québec-Santé (FRQS) pour avoir attribué une bourse salariale au D<sup>r</sup> David Marsolais de 2012 à 2016;
- L'Université Laval pour avoir assumé la gestion de la subvention et pour avoir accordé le soutien nécessaire aux activités de recherche;
- Le Centre de recherche de l'Institut universitaire de cardiologie et de pneumologie de Québec (IUCPQ) pour avoir mis à notre disposition les ressources nécessaires à l'avancement de nos recherches;
- Le Groupe de recherche en santé respiratoire (GESER) pour avoir offert des opportunités de diffusion des résultats à une tribune d'experts en santé respiratoire;
- Le Réseau en santé respiratoire et ses membres pour de nombreuses discussions relatives à l'avancement du projet;
- Les membres de l'équipe de la D<sup>re</sup> Caroline Duchaine pour leur aide à la récolte des échantillons-terrains;
- Le Conseil de recherches en sciences naturelles et en génie (CRSNG) pour le cofinancement des études *in vivo* réalisées au cours de ce projet;
- Le Réseau en santé respiratoire et l'IRSST qui ont octroyé des bourses d'études à madame Magali Boucher;
- MM. Serge Simard et Gaétan Daigle pour leurs contributions aux analyses statistiques.

Nous tenons aussi à exprimer notre reconnaissance envers les agriculteurs et les personnes en charge des usines de traitement des eaux usées qui nous ont permis de recueillir des échantillons dans leurs établissements.



## SOMMAIRE

Le nombre d'environnements de travail touchés par des problématiques de santé reliées aux bioaérosols est si considérable qu'il est difficile d'en faire un dénombrement précis. Les exemples les plus connus sont les porcheries, fermes laitières, tourbières, scieries et usines alimentaires. Aucune limite d'exposition n'existe pour les différentes composantes des bioaérosols, hormis les recommandations pour les endotoxines et certaines poussières. Toutefois, il est bien connu que l'état sanitaire de ces environnements diffère de site en site et selon leur classe. La nature des bioaérosols détectés dans ces environnements n'est que partiellement définie. Cette situation rend difficile la mise en place des mesures préventives adéquates. L'élaboration d'une méthode permettant d'établir des indices sanitaires ou d'améliorer notre compréhension des déterminants de la qualité de l'air pourrait donc contribuer à favoriser des conditions propices à la santé respiratoire des travailleurs. Les cellules dendritiques sont des cellules du système immunitaire qui expriment divers marqueurs d'activation en présence d'une multitude d'agents exogènes. Ainsi, l'hypothèse générale de cette étude s'appuie sur le fait que les cellules dendritiques puissent être utilisées en tant que biosenseurs afin d'évaluer la qualité de l'air des environnements de travail. Les objectifs sont : 1) établir une méthode de culture de cellules dendritiques permettant de discriminer les agents toxiques/immunogènes des agents inoffensifs; 2) tester l'impact inflammatoire d'échantillons environnementaux complexes; 3) évaluer la relation entre l'activation des cellules dendritiques *in vitro* et l'inflammation aiguë causée dans un modèle murin.

Des cultures de cellules dendritiques différenciées à partir de la moelle osseuse de souris ont été utilisées pour ce projet. Ces cellules ont été analysées pour l'expression de marqueurs d'activation en cytométrie de flux et pour la libération de facteur de nécrose tumorale (tumor necrosis factor - TNF) par la méthode ELISA (méthode immunoenzymatique à double détermination d'anticorps), suivant l'incubation avec divers agents immunogènes, dont des endotoxines, du peptidoglycane, du  $\beta$ -D-glucane ou des microorganismes entiers. À la suite de ces expériences de validation, les cellules dendritiques ont été utilisées pour évaluer des échantillons d'environnements de travail caractérisés sur le plan de la quantité totale de poussière, d'endotoxines, de bactéries totales et d'archées totales. Diverses dilutions de ces échantillons ont été soumises aux tests sur cellules dendritiques pour l'obtention d'une valeur maximale d'activation des cellules, et ce, en fonction d'un contrôle interne (endotoxines). Cela a fourni un indice d'activation des cellules dendritiques, dont la capacité à discerner des environnements de divers niveaux sanitaires a été explorée dans un modèle murin d'exposition aiguë des voies aériennes aux extraits d'échantillons-terrains.

La modulation de l'expression des marqueurs d'activation cellulaires et la mesure du TNF offrent une plage dynamique suffisante pour discriminer les agents fortement inflammatoires des agents moins inflammatoires et les effets combinés de ces agents. L'activation relative des cellules dendritiques a permis de stratifier les diverses catégories d'environnements de travail selon leur état sanitaire et leur impact inflammatoire *in vivo*. La caractérisation du contenu des échantillons a révélé que la poussière totale et les endotoxines sont les deux déterminants principaux de l'activation des cellules dendritiques dans les échantillons-terrains. Toutefois, les résultats démontrent que le contenu en endotoxines des échantillons d'air sous-estime presque invariablement l'activation des cellules dendritiques. De plus, l'importance des poussières

totales est augmentée en regard de l'activation des cellules dendritiques lorsque les endotoxines sont en faibles concentrations.

En somme, un test qui permet de comparer le potentiel d'agents simples, combinés et « terrains » à stimuler l'activation des cellules dendritiques a été mis au point. L'activation des cellules dendritiques concorde avec l'état sanitaire de différentes catégories d'environnements ainsi qu'avec leur impact immunogène *in vivo*. Le test sur cellules dendritiques a permis de jauger l'importance relative de diverses composantes des bioaérosols et de valider le concept que la mesure d'agents uniques n'est pas suffisante pour élaborer des indices sanitaires.

## TABLE DES MATIÈRES

REMERCIEMENTS .....	I
SOMMAIRE .....	III
TABLE DES MATIÈRES .....	V
LISTE DES TABLEAUX .....	VII
LISTE DES FIGURES.....	IX
LISTE DES ACRONYMES, SIGLES ET ABRÉVIATIONS .....	XI
1. INTRODUCTION .....	1
1.1 Les bioaérosols.....	1
1.2 Les maladies respiratoires associées à l'exposition aux bioaérosols .....	1
1.3 Les normes d'exposition aux bioaérosols.....	2
1.4 Problématique.....	2
2. ÉTAT DES CONNAISSANCES.....	3
2.1 Les cellules dendritiques : précurseurs de la réponse immunitaire.....	3
2.1.1 Utilisation des cellules dendritiques comme biosenseurs.....	3
2.1.2 Les cellules dendritiques et le potentiel immunogène des bioaérosols .....	4
3. OBJECTIFS DE RECHERCHE .....	5
4. MÉTHODOLOGIE.....	7
4.1 Culture des cellules dendritiques .....	7
4.2 Stimulation des cellules dendritiques .....	7
4.3 Analyse par cytométrie de flux .....	7
4.4 Récolte des échantillons d'air .....	8
4.5 Échantillonneurs .....	8
4.6 Traitement des échantillons .....	8
4.7 Quantification des endotoxines et de la poussière totale.....	8
4.8 Extraction d'ADN .....	8
4.9 PCR quantitative .....	9
4.10 ELISA .....	9
4.11 Expérimentations sur le modèle murin .....	9
4.12 Analyses statistiques .....	10
4.12.1 Modèle in vitro .....	10
4.12.2 Modèle in vivo .....	10

---

5.	RÉSULTATS.....	11
5.1	Les composantes des bioaérosols ont un impact différentiel sur l'activation des cellules dendritiques .....	11
5.2	La complexité des stimuli modifie quantitativement la maturation des cellules dendritiques .....	13
5.3	L'échantillonneur SASS 3100 produit des échantillons concentrés avec des taux d'endotoxine valides .....	15
5.4	L'activation relative des cellules dendritiques stratifie les échantillons environnementaux selon leur état sanitaire.....	16
5.5	Le contenu en endotoxines sous-estime le potentiel d'activation des cellules dendritiques par les échantillons d'air .....	19
5.6	L'indice d'activation des cellules dendritiques <i>in vitro</i> stratifie l'impact inflammatoire des échantillons-terrains selon leur groupe, et non pas sur une base individuelle .....	22
6.	DISCUSSION .....	25
6.1	Les cellules dendritiques stratifient adéquatement les catégories d'environnements selon leur état sanitaire .....	25
6.2	Robustesse de la technique d'échantillonnage utilisée et du modèle cellulaire choisi .....	26
6.3	Limites du modèle de cellules dendritiques pour évaluer l'état sanitaire d'un environnement .....	28
7.	CONCLUSION.....	29
8.	RETOMBÉES DU PROJET DE RECHERCHE .....	31
9.	PERSPECTIVES .....	33
	BIBLIOGRAPHIE .....	35
	ANNEXE A : OPTIMISATION DES CONDITIONS DE CULTURE DES CELLULES DENDRITIQUES.....	41
	A.I Choix des cellules.....	41
	A.II Conditions de culture .....	41

## **LISTE DES TABLEAUX**

Tableau 4-1 : Amorces, sondes et thermoprotocoles utilisés lors de l'étude .....9



## LISTE DES FIGURES

Figure 5-1 :	Des composantes individuelles des bioaérosols activent différemment des cellules dendritiques.....	12
Figure 5-2 :	La combinaison d'agents détectés dans les bioaérosols augmente la maturation des cellules dendritiques <i>in vitro</i> .....	14
Figure 5-3 :	Le SASS 3100 est efficace pour l'échantillonnage des endotoxines dans l'air.....	15
Figure 5-4 :	Quantification de composantes majeures des bioaérosols des environnements visités.....	17
Figure 5-5 :	Les cellules dendritiques peuvent stratifier les échantillons environnementaux selon leur état sanitaire.....	18
Figure 5-6 :	L'activation des cellules dendritiques par les échantillons-terrains corrèle avec leur contenu en endotoxines, en poussière totale, en bactéries totales et en archées totales.....	20
Figure 5-7 :	La maturation des cellules dendritiques s'explique en partie par le contenu en endotoxines. ....	21
Figure 5-8 :	Le potentiel inflammatoire des échantillons environnementaux diffère selon leur état sanitaire dans un modèle aigu d'exposition des voies respiratoires.....	23
Figure A-1 :	Cellules THP-1 stimulées des doses croissantes d'endotoxines (LPS). ....	41
Figure A-2 :	Le lot de FBS affecte la capacité de maturation des cellules dendritiques en réponse aux endotoxines. ....	42



## LISTE DES ACRONYMES, SIGLES ET ABRÉVIATIONS

ADN :	Acide désoxyribonucléique
AIC :	Akaike information criterion (critère d'information d'Akaike)
APR :	Appareil de protection respiratoire
CD :	Cluster of differentiation (cluster de différenciation)
CD :	Cellules dendritiques
ELISA :	Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (méthode immunoenzymatique à double détermination d'anticorps)
EU :	Endotoxin Unit (Unité d'endotoxine)
GM-CSF :	Granulocyte macrophage colony-stimulating factor (facteur de stimulation de colonies de macrophages granulocytes)
LAL :	<i>Limulus</i> Amebocyte Lysate (lysate d'amoebocyte de limule)
LBA :	Lavage bronchoalvéolaire
LPS :	Lipopolysaccharides
MBS :	<i>Methanobrevibacter smithii</i>
MHC :	Major histocompatibility complex (complexe majeur d'histocompatibilité)
MSS :	<i>Methanosphaera stadtmanae</i>
ND :	Non détectable
NIOSH :	National Institute for Occupational Safety and Health des États-Unis
NS :	Non stimulées
PBS :	Phosphate buffered saline (solution saline tamponnée au phosphate)
PCR :	Polymerase chain reaction (réaction en chaîne par polymérase)
PE :	Phycoérythrine
SASS :	Smart Air Sample System (système intelligent d'échantillonnage de l'air)
SDRA :	Syndrome de détresse respiratoire aigu
SEM :	Standard error of the mean (erreur type de la moyenne)
SR :	<i>Saccharopolyspora rectivirgula</i>
TNF :	Tumor necrosis factor (facteur de nécrose tumorale)



## 1. INTRODUCTION

### 1.1 Les bioaérosols

Plusieurs environnements de travail sont contaminés par des bioaérosols. Au Québec et ailleurs dans le monde, des quantités importantes de bioaérosols ont été observées dans les porcheries (Lavoie, Godbout, Lemay et Belzile, 2009; Nehme, Letourneau, Forster, Veillette et Duchaine, 2008), les fermes de production laitière (Blais Lecours, Veillette, Marsolais et Duchaine, 2012), les ateliers d'usinage (Gilbert *et al.*, 2010), les usines de transformation des aliments (Malo, Chretien, McCants et Lehrer, 1997; Weytjens *et al.*, 1999), et les tourbières (Letourneau *et al.*, 2010) pour ne nommer que ceux-ci. Ainsi, les travailleurs sont exposés à une variété de sources de bioaérosols, donc à des bioaérosols ayant des caractéristiques distinctes. Les bioaérosols peuvent être constitués de divers agents microbiens (bactéries, archées, moisissures, virus), de fragments de ces microorganismes, de toxines, de résidus métaboliques, etc. (Blais Lecours, Perrott et Duchaine, 2015; Eduard, Heederik, Duchaine et Green, 2012; Kirkhorn et Garry, 2000; Mayeux, 1997; Nehme *et al.*, 2009). Qui plus est, l'impact des composantes constituant les bioaérosols s'étendrait sur un vaste continuum se situant entre une absence d'effets délétères (Blais Lecours *et al.*, 2011; Du, Lin, Bian et Xu, 2015) et l'induction de fortes réactions inflammatoires (Dearman, Cumberbatch, Maxwell, Basketter et Kimber, 2009; Eduard *et al.*, 2012; Heederik *et al.*, 2007).

### 1.2 Les maladies respiratoires associées à l'exposition aux bioaérosols

Les travailleurs exposés aux bioaérosols courent un risque accru de développer des signes, des symptômes ou des pathologies. Par exemple, l'exposition à l'air de divers établissements de travail ruraux est associée à une inflammation des voies respiratoires, à une irritation des muqueuses, à de la fièvre, au développement de bronchite chronique, à de l'asthme allergique, à une hyperréactivité des voies respiratoires non associée à l'atopie, et au poumon de fermier (Greskevitch, Kullman, Bang et Mazurek, 2007; Larsson, Eklund, Hansson, Isaksson et Malmberg, 1994; Malmberg et Larsson, 1993; May, Romberger et Poole, 2012). Plusieurs de ces symptômes et de ces pathologies se manifestent d'ailleurs chez des travailleurs dans les milieux mentionnés ci-dessus (Piiirila *et al.*, 2002).

De manière importante, le National Institute for Occupational Safety and Health (NIOSH) des États-Unis a également noté une augmentation de la mortalité chez les travailleurs exposés aux bioaérosols (Greskevitch *et al.*, 2007). Malgré ces faits, l'adhésion aux mesures de prévention primaire est faible. Par exemple, moins de 50 % des fermiers porteront un appareil de protection respiratoire (APR), même si ce secteur économique fait partie d'un programme de prévention primaire (Donham, Lange, Kline, Rautiainen et Grafft, 2011). Aussi, dans le contexte actuel, le port d'un APR permet de réduire les conséquences de l'exposition aux bioaérosols, mais sans pour autant les éradiquer. Des mesures favorisant la détermination d'indices sanitaires associés à des niveaux d'exposition tolérables aux bioaérosols pourraient donc contribuer à améliorer les conditions de travail et de santé des travailleurs.

### 1.3 Les normes d'exposition aux bioaérosols

Les normes régissant les limites d'exposition des travailleurs sont peu nombreuses et imparfaites. Il n'existe en fait que 8 normes officielles d'exposition professionnelle, dont 7 qui sont basées uniquement sur la quantité de poussières totales (Eduard *et al.*, 2012). Pourtant, il est reconnu que des agents spécifiques comme les endotoxines, les peptidoglycane, les bêta-glucanes et les enzymes actives, par exemple, ont un potentiel immunogène et toxique important, tant chez l'humain que chez les animaux. Une recommandation européenne de 50 unités d'endotoxines par m<sup>3</sup> d'air pour 8 heures de travail existe (Heederik et Jeroen, 1997), mais elle est très difficilement applicable alors que de nombreux environnements de travail excèdent largement cette recommandation (Nehme *et al.*, 2008). Toutefois, et de manière surprenante, il est également difficile de corréliser le potentiel immunopathologique d'un environnement en n'utilisant qu'un seul de ces paramètres (Letourneau *et al.*, 2010). En effet, la nature des composés retrouvés dans les bioaérosols est souvent complexe et il est pour l'instant impossible de déterminer comment les interactions entre ces composantes influencent leur pathogénicité (Poole et Romberger, 2012).

### 1.4 Problématique

Les méthodes actuelles visant à déterminer la nature nocive de l'air des environnements de travail ne sont pas adéquates, ce qui se traduit par un impact négatif potentiel sur la santé des travailleurs. Ces lacunes sont vraisemblablement liées à notre mauvaise compréhension des bioaérosols, du rôle de leurs diverses composantes et de leurs interactions dans la pathogenèse des maladies professionnelles. Il existe ainsi un besoin urgent de développer des méthodes visant à mieux comprendre les mécanismes pro-inflammatoires et immunogènes des bioaérosols complexes, ce qui pourrait contribuer à l'avancement des connaissances visant à établir des indices sanitaires qui pourraient faciliter l'établissement de mesures de prévention primaire.

## 2. ÉTAT DES CONNAISSANCES

### 2.1 Les cellules dendritiques : précurseurs de la réponse immunitaire

Une large proportion des maladies causées par les bioaérosols est de nature immunopathologique, ce qui signifie que les contrecoups de la réponse immune envers des agents non infectieux et/ou normalement inoffensifs induisent des conséquences néfastes, voire dommageables, pour les tissus de l'hôte. Les cellules dendritiques sont situées à l'interface immunologique de l'hôte et de son environnement. Elles contribuent entre autres au processus visant à déterminer si un stimulus résulte en une réponse immune ou non et donc, en l'induction d'une réponse immunopathologique ou pas (Vermaelen et Pauwels, 2005).

Pour ce faire, ces cellules expriment une diversité remarquable de récepteurs qui leur permet de jauger le potentiel immunogène d'agents externes (Banchereau et Steinman, 1998; Mitchell *et al.*, 2010; Napolitani, Rinaldi, Bertoni, Sallusto et Lanzavecchia, 2005; Vermaelen et Pauwels, 2005). En présence d'agents nocifs, les cellules dendritiques surexpriment des molécules de stimulation (complexes majeurs d'histocompatibilité (CMH)) et de costimulation (dont le CD86) leur permettant d'induire une réponse immune acquise. Aussi, les médiateurs solubles que libèrent les cellules dendritiques peuvent stimuler la réponse inflammatoire immédiate. Par exemple, le TNF est une cytokine pro-inflammatoire puissante qui peut être synthétisée par les cellules dendritiques lors de l'initiation de la réponse immune et ainsi stimuler l'inflammation locale (Blanco, Palucka, Pascual et Banchereau, 2008). Ainsi, les cellules dendritiques sont extrêmement sensibles aux agents exogènes et sont susceptibles de déterminer la nature de la réponse immune. Il existe une panoplie de marqueurs d'activation mesurables pour lesquels l'état des connaissances est avancé (Dearman *et al.*, 2009). Ainsi, l'étude de ces cellules sensibles aux divers stimuli environnementaux et l'identification de marqueurs d'activation pertinents pourraient servir à développer une méthode permettant de détecter le potentiel inflammatoire de bioaérosols complexes, ce qui faciliterait l'étude des déterminants immunopathologiques des échantillons d'air.

#### 2.1.1 Utilisation des cellules dendritiques comme biosenseurs

Durant la dernière décennie, les cultures de cellules dendritiques en tant que biosenseurs ont été utilisées pour identifier les fractions immunogènes ou immunosuppressives de différentes composantes du lait; et pour discriminer les agents nocifs des agents inoffensifs dans divers contextes (Davies, McConnell, Slobbe, Haggarty et Buchan, 2005; Liu, Tran, Pan et Shen, 2009). Cette technologie prometteuse est relativement jeune et les preuves relatives à son utilité directe dans le contexte de la qualité de l'air sont encore limitées.

Divers protocoles sont couramment utilisés pour obtenir *in vitro* des cellules dendritiques en grande quantité. Ils sont relativement hétérogènes et l'on sait d'ailleurs que plusieurs paramètres influencent la qualité des cellules dendritiques obtenues *ex vivo* (Inaba, Kayo *et al.*, 1992; Ito *et al.*, 2005; Jonuleit, Knop et Enk, 1996; Syme et Gluck, 2001). Ainsi, les cellules dendritiques sont généralement dérivées de cellules de la moelle osseuse qui ont un caractère hétérogène. Une étape initiale d'adhérence des cellules au plastique est nécessaire afin d'éliminer les macrophages contaminants. Une population enrichie de cellules dendritiques immatures est obtenue après une incubation de 7 jours en présence d'additifs cruciaux comme

le facteur de stimulation de colonies de macrophages granulocytes (GM-CSF) et du sérum de bœuf fœtal, alors que la maturation est assurée par l'ajout d'un agent stimulant comme des endotoxines ou des cytokines pro-inflammatoires. Les conditions de culture comme la densité cellulaire, le nombre de passages cellulaires et le type de sérum de bœuf fœtal sont toutes susceptibles d'influencer les niveaux d'activation de base des cellules dendritiques immatures ainsi que leur capacité à répondre à un agent stimulant. Ainsi, l'établissement de méthodes standardisées de culture est nécessaire afin de maximiser la plage dynamique d'activation des cellules dendritiques en réponse à la présence potentielle de divers agents dans l'air des environnements de travail visés.

### **2.1.2 Les cellules dendritiques et le potentiel immunogène des bioaérosols**

Les travaux effectués *in vivo* par la présente équipe de recherche confirment que les cellules dendritiques reflètent le potentiel immunogène des bioaérosols. L'équipe a ainsi démontré que diverses espèces d'archées, récemment découvertes dans les bioaérosols de porcheries (Nehme *et al.*, 2009), de fermes laitières (Blais Lecours *et al.*, 2012) et d'usines d'épuration des eaux usées (Blais Lecours, Veillette, *et al.*, 2014), avaient des propriétés immunogènes différentes (Blais Lecours *et al.*, 2011). Il est important de souligner que ces propriétés diverses étaient corrélées avec leur habileté à activer des cellules dendritiques. Cependant, on s'interroge encore sur l'impact combiné de divers agents immunogènes sur l'état d'activation des cellules dendritiques.

En somme, la littérature scientifique actuelle indique un pouvoir discriminant des cellules dendritiques *in vitro* et atteste que ces dernières peuvent être utilisées pour jauger l'impact inflammatoire des bioaérosols de différents environnements de travail.

### 3. OBJECTIFS DE RECHERCHE

Plusieurs milieux de travail sont contaminés par des bioaérosols associés au développement de diverses réactions indésirables et de pathologies du système respiratoire. Cependant, il existe actuellement peu de normes limitatives de l'exposition. En fait, il est difficile d'établir des normes tant que notre compréhension des déterminants pathogéniques des bioaérosols complexes ne sera pas meilleure. Outre la concentration dans l'air, une multitude de facteurs peuvent influencer le potentiel nocif de ces bioaérosols, incluant leur nature, leur diversité, la présence de molécules fortement immunogènes, sans oublier toute interaction possible entre ces différents paramètres. Ainsi, le développement d'outils permettant d'apprécier le potentiel inflammatoire des bioaérosols et de mieux comprendre leurs mécanismes pathogènes faciliterait l'établissement d'indices visant à guider les méthodes de prévention primaire.

En raison de la complexité des bioaérosols, du manque d'outils pour déterminer leur potentiel nocif, du fait que les cellules dendritiques sont hautement sensibles à une variété d'agents exogènes, et que leur utilité en tant que biosenseurs est suggérée par une littérature émergente, **le but de ce projet de recherche était de décrire les éléments susceptibles de soutenir le potentiel des cultures de cellules dendritiques afin de détecter des signaux de danger dans l'air des environnements de travail.**

Pour atteindre ce but, trois objectifs complémentaires ont été poursuivis :

**Objectif 1 Établir une méthode de culture de cellules dendritiques permettant de discriminer les agents faiblement c. fortement activateurs de cellules dendritiques**

- Mettre au point des conditions optimales de culture;
- Identifier des marqueurs d'activation robustes dotés d'une plage dynamique élargie;
- Comparer les effets d'agents dont le potentiel d'activation des cellules dendritiques est différent;
- Caractériser l'impact de combinaisons d'agents sur l'activation des cellules dendritiques.

**Objectif 2 Tester l'impact d'échantillons environnementaux complexes sur l'activation des cellules dendritiques**

- Mettre au point une méthode d'échantillonnage compatible avec les tests biologiques;
- Échantillonner des environnements dont l'état sanitaire est différent;
- Caractériser les échantillons obtenus;
- Évaluer l'activation des cellules dendritiques en réponse à des échantillons-terrains.

**Objectif 3 Évaluer la relation entre l'activation des cellules dendritiques *in vitro* et l'inflammation aiguë déclenchée dans un modèle murin**

- Quantifier l'accumulation de cellules inflammatoires dans les lavages bronchoalvéolaires à la suite d'une instillation d'échantillons d'air dans les voies aériennes de souris;
- Comparer l'impact des divers types d'environnements échantillonnés sur des mesures d'inflammation et de dommage pulmonaire *in vivo*.

## 4. MÉTHODOLOGIE

### 4.1 Culture des cellules dendritiques

La moelle osseuse du tibia et du fémur de souris C57BL/6 femelles a été récoltée selon les procédures préconisées par Inaba et ses collègues (Inaba, Kayo *et al.*, 1992). Diverses variations de protocoles visant à générer de grandes quantités de cellules dendritiques ont été décrites (Inaba *et al.*, 1992; Lutz *et al.*, 1999). Dans la présente étude, les cellules de la moelle osseuse ont été différenciées en cellules dendritiques durant 7 jours dans un milieu complet comprenant du RPMI 1640 supplémenté de sérum foetal bovin inactivé (10 %) (Thermo Scientific, Watham, MA), de 1 % de pénicilline/streptomycine, de 1 mM de sodium pyruvate, de 10 mM d'HEPES, de 1 % d'une solution d'acides aminés non essentiels (Wisent Inc., Saint-Jean-Baptiste de Rouville, Canada), de 2 mM de L-glutamine (Wisent Inc.), de 40 µM β-mercaptoéthanol (Sigma-Aldrich, St Louis, MO) et de 20 ng/ml de GM-CSF murin (PeproTech, Rocky Hill, NJ). Au jour 7, les cellules non adhérentes ont été récoltées pour les expérimentations etensemencées à 300 000 cellules par ml dans les plaques de 24 puits.

### 4.2 Stimulation des cellules dendritiques

Les cellules ont été stimulées durant 24 h avec des agents simples retrouvés dans les bioaérosols, soit seuls ou en combinaison; ainsi qu'avec les échantillons d'air prélevés dans trois milieux de travail différents. Les agents simples sont les suivants : lipopolysaccharide de *Escherichia coli* O55:B5, β-D glucane de l'orge (Sigma-Aldrich), peptidoglycane de *Staphylococcus aureus* (InvivoGen, San Diego, CA) et des microorganismes entiers cultivés dans le laboratoire de l'équipe de recherche (*Methanosphaera stadtmanae* (MSS) (DSMZ #3091), *Methanobrevibacter smithii* (MBS) (DSMZ #11975), *Saccharopolyspora rectivirgula* (SR) (ATCC 15347), *Bacillus globigii* et *Pseudomonas sp.*). Le surnageant cellulaire a été récolté après la stimulation et entreposé à -80 °C. Les cellules ont été récoltées pour des analyses subséquentes en cytométrie de flux.

### 4.3 Analyse par cytométrie de flux

Les cellules ont été marquées avec des anticorps spécifiques à la souris, couplés à des fluorochromes contre les marqueurs CD11c (N418), CD11b (M1/70), MHC II (M5/114.15.2) et CD86 (GL1) (BioLegend, San Diego, CA; et BD Bioscience, San Jose, CA). La fluorescence des cellules a été générée par l'appareil FACSDiva (Becton, Dickinson and Co.) et analysée avec le logiciel FlowJo (Tree star, Inc., San Carlos, CA). Conformément à la littérature, et à la suite de diverses étapes de mise au point (données non incluses), les cellules exprimant fortement le CD86 (CD86-hi) et le MHC II (MHCII-hi) ont été sélectionnées en tant que déterminant d'activation de la population cellulaire. Cette mesure a été choisie pour des fins de simplicité puisqu'elle permettait la sélection d'une population facilement identifiable relativement aux cellules moins activées, ce qui n'était pas toujours possible en se fiant uniquement aux intensités de fluorescence des marqueurs individuels (figure 5-1A). Afin de combiner les résultats de différentes expériences, l'activation relative (%) des cellules dendritiques en réponse aux stimuli a été calculée en exprimant la fréquence des cellules dendritiques activées par l'échantillon expérimental relativement à la fréquence de cellules activées en réponse à un standard interne de 100 ng/ml d'endotoxines. Ceci a été effectué après avoir soustrait

l'activation de base (induite par une incubation avec un véhicule seulement) pour chaque expérience. Pour des protocoles différents, l'activation de base des cellules dendritiques était toujours inférieure à 10 % après incubation avec le véhicule.

#### **4.4 Récolte des échantillons d'air**

Des échantillons d'air ont été prélevés dans neuf porcheries, trois fermes laitières et trois usines d'épuration des eaux usées situées dans la province de Québec. L'échantillonnage s'est déroulé tout au long de l'année dans les aires où sont gardés les animaux pour ce qui est des établissements agricoles, et dans les sites de biofiltration, en ce qui a trait aux usines d'épuration des eaux usées. Les échantillonneurs d'air ont tous été positionnés à 1 m du sol.

#### **4.5 Échantillonneurs**

Deux échantillonneurs d'air ont été utilisés, soit le Smart Air Sampler System (SASS) 3100 (Research International, Monroe, WA) ayant une capacité de 300 litres par minute (lpm) durant 10 min, et le BioSampler (SKC, Eighty Four, PA), contenant 10 ml de PBS et utilisé à un débit de 12,5 lpm durant 10 min.

#### **4.6 Traitement des échantillons**

Les filtres du SASS 3100 contenant les échantillons ont été élués avec 5 ml de PBS (pH 7,4) avec l'extracteur de particules SASS 3010 (Research International) en suivant les recommandations du fabricant, afin d'obtenir un équivalent d'échantillon d'air de 600 litres par ml. Les échantillons provenant du BioSampler ont été soumis à une agitation induite par un appareil vortex durant 15 min afin de les homogénéiser. Une fraction de tous les échantillons a été centrifugée à 21 000 g durant 10 min et le culot a été conservé à -20 °C jusqu'à l'extraction de l'ADN. Le reste des échantillons a été aliquoté et entreposé à -20 °C en fractions de 0,5 ml dans des tubes dépyrogénés.

#### **4.7 Quantification des endotoxines et de la poussière totale**

L'essai cinétique chromogénique de lysat d'amœbocyte de limule (LAL) (Lonza, Walkersville, MD) a été utilisé pour quantifier les endotoxines selon les instructions du fabricant. Le bloqueur  $\beta$ -1,3-glucane a été utilisé afin d'assurer la spécificité de l'essai pour les endotoxines ( $\beta$ -g-Blocker, Lonza). Les données ont été colligées avec le lecteur de plaque VersaMAX (Molecular Devices, Sunnyvale, CA) et la quantité d'endotoxines par ml (EU/ml) a été calculée avec le logiciel SoftMax pro (Molecular Devices) et convertie en EU/m<sup>3</sup> d'air échantillonné. La poussière totale a été quantifiée directement sur le terrain avec le DustTrak™ II Aerosol Monitor 8532 (TSI Inc., St Paul, MN).

#### **4.8 Extraction d'ADN**

La trousse d'extraction PowerLyzer PowerSoil DNA (MO BIO, Carlsbad, CA) a été utilisée pour extraire l'ADN des échantillons d'air selon les instructions du fabricant. Une étape de lyse cellulaire mécanique (*bead beating*) a été effectuée avec le Mixer Mill MM300 (Retsch, Haan, Germany) à 20 Hz durant 20 minutes après avoir chauffé les échantillons à 70 °C pendant 10 min. Les extraits d'ADN ont été entreposés à une température de -20 °C.

## 4.9 PCR quantitative

Toutes les réactions en chaîne par polymérase (PCR) quantitatives en temps réel ont été effectuées en utilisant l'appareil DNA Engine CFX (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA). Les troupes iQ Supermix et iQ SYBR green Supermix (Bio-Rad Laboratories) ont été utilisées pour chacune des PCR. Le tableau 1 liste les amorces, sondes et thermoprotocoles divers auxquels les expérimentateurs ont eu recours.

**Tableau 4-1 : Amorces, sondes et thermoprotocoles utilisés lors de l'étude**

Gène cible	Amorce/sonde	Séquence nucléotidique (5' -3')	Référence
ARNr 16S bactérien	EUB F	GGT AGT CYA YGC MST AAA CG	(Bach, Hartmann, Schlöter et Munch, 2001)
	EUB R	GAC ARC CAT GCA SCA CCT G	
	Probe EUB	FAM-TKC GCG TTG CDT CGA ATT AAW CCA C-TAMRA	
ARNr 18S eucaryote	PenAspR1	GCC CGC CGA AGC AAC	(United States Environmental Protection Agency, 2014)
	PenAspF1	CGG AAG GAT CAT TAC TGA GTG	
	PenAspP1mgb	FAM- CCA ACC TCC CAC CCG TG- TAMRA	
ARNr 16S archéen	A751F	CCG ACG GTG AGR GRY GAA	(Baker, Smith et Cowan, 2003)
	A976R	YCC GGC GTT GAM TCC AAT T	(Reysenbach et Pace, 1995)
MtaB1 ( <i>M. stadmanae</i> )	MSS 122F	CTA ACA TCA AAG TAG CTC C	(Blais Lecours, Marsolais, et al., 2014)
	MSS 414R	TCC TCT AAG ACC GTT T	
NifH ( <i>M. smithii</i> )	Mnif 202 F	GAA AGC GGA GGT CCT GAA	(Johnston, Ufnar, Griffith, Gooch et Stewart, 2010)
	Mnif 353 R	ACT GAA AAA CCT CCG CAA AC	
	Mnif Probe	[FAM]- CCG GAC GTG GTG TAA CAG TAG CTA -[BHQ]-1	

## 4.10 ELISA

La cytokine pro-inflammatoire TNF a été quantifiée dans le surnageant cellulaire des cultures de cellules dendritiques stimulées avec les échantillons-terrains, ainsi que dans le lavage bronchoalvéolaire des souris, avec la trousse de quantification TNF- $\alpha$  ELISA MAX™ Standard (BioLegend). L'albumine a été quantifiée dans le surnageant cellulaire et dans les lavages bronchoalvéolaires avec la trousse de quantification Mouse Albumin ELISA Quantitation Set (Bethyl Laboratories, Montgomery, TX).

## 4.11 Expérimentations sur le modèle murin

Toutes les procédures exigeant l'utilisation de souris ont été approuvées par le Comité de protection des animaux de l'Université Laval (approbation # 2014084) sous l'autorité du Conseil canadien de protection des animaux. Des souris C57BL/6 femelles âgées de 8 semaines (Charles River Laboratories, St-Constant, Canada) ont été anesthésiées avec de l'isoflurane pour l'instillation de 50  $\mu$ l de PBS par voie intranasale, ou de 50  $\mu$ L de PBS dans lequel des échantillons-terrains (0,1 m<sup>3</sup> d'air) obtenus avec le SASS ont été dilués. Les souris ont été euthanasiées 24 h après l'instillation avec une surdose de kétamine-xylazine. La vasculature pulmonaire a été perfusée avec du PBS par le ventricule droit et les souris ont été trachéotomisées afin d'effectuer des lavages bronchoalvéolaires, à raison de trois fois 1 ml de PBS. Les échantillons ont été centrifugés à 500 x g. Le surnageant a été congelé pour analyse

ultérieure par ELISA. Quant au culot cellulaire, il a été resuspendu dans un volume connu de PBS pour effectuer des comptes de cellules totales (hémacymètre; crystal violet) et des comptes différentiels (Giemsa stain) (Gendron *et al.*, 2015; Huppe *et al.*, 2017).

## **4.12 Analyses statistiques**

### **4.12.1 Modèle *in vitro***

La relation entre la maturation des cellules dendritiques et chaque composante des bioaérosols a été étudiée en utilisant les coefficients de corrélation de Pearson. Les variables explicatives les plus importantes pour prédire la maturation ont été sélectionnées en utilisant des modèles de régression par étapes basés sur les valeurs p ou sur le critère d'information Akaike (AIC). Les relations entre la maturation des cellules dendritiques et les variables sélectionnées ont également été vérifiées afin de s'assurer qu'elles différaient selon une dichotomisation de la variable endotoxine. Cette étape a été effectuée à l'aide de la méthode de classification de Ward, qui maximise la variance du groupe et minimise la variance intragroupe. L'hypothèse de normalité a été vérifiée à l'aide de la statistique de Shapiro-Wilk, tandis que l'homogénéité de variance a été vérifiée visuellement avec les parcelles résiduelles. Toutes les analyses ont été réalisées à l'aide du logiciel SAS (SAS Institute Inc., NC) à un niveau de signification de 0,05.

### **4.12.2 Modèle *in vivo***

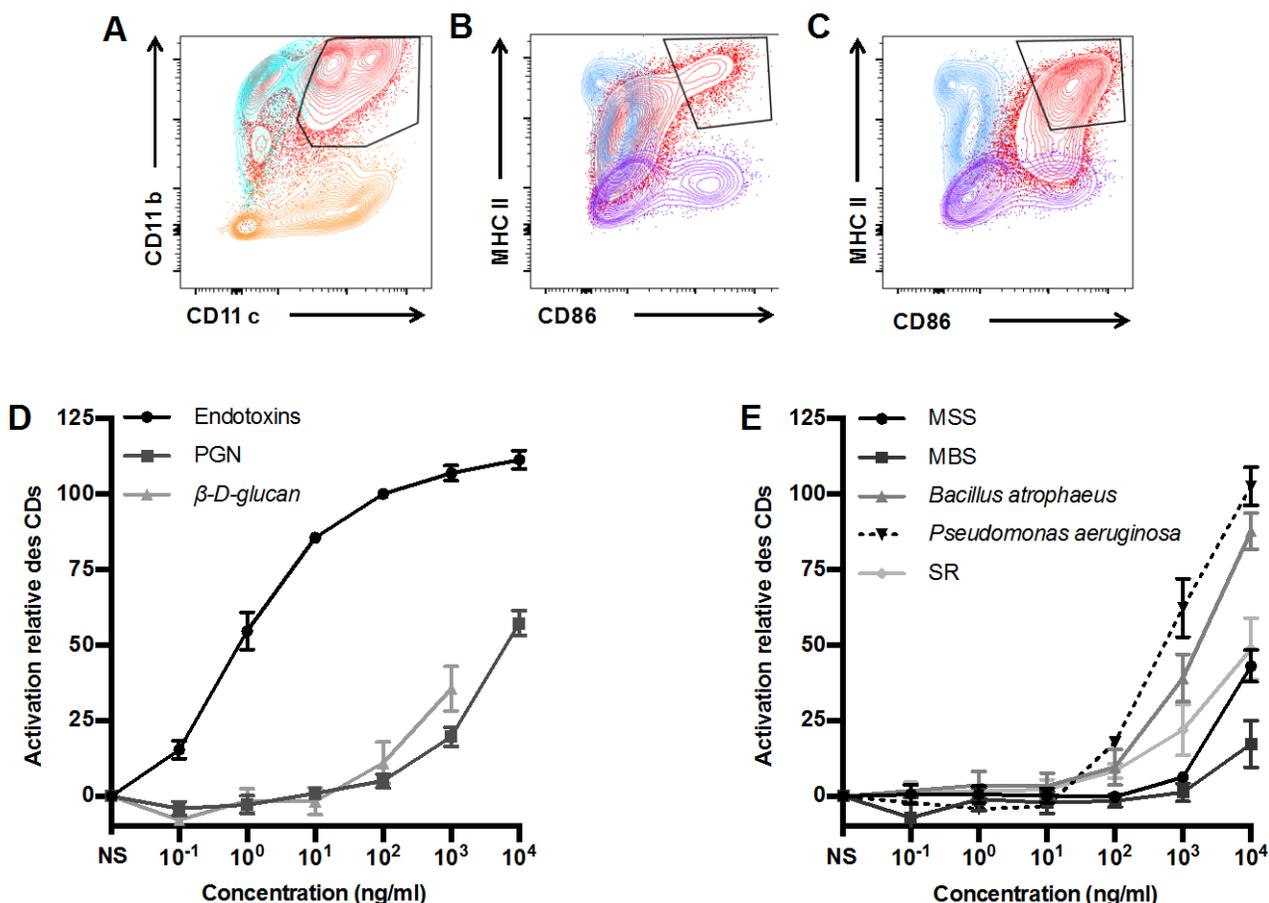
Les données sont exprimées en utilisant la moyenne et l'erreur standard de la moyenne (SEM). Une analyse de la variance (ANOVA) unidirectionnelle a été utilisée pour comparer les groupes à l'aide du logiciel GraphPad Prism. Les résultats sont considérés significatifs à des valeurs de  $p \leq 0,05$ .

## 5. RÉSULTATS

### 5.1 Les composantes des bioaérosols ont un impact différentiel sur l'activation des cellules dendritiques

Le potentiel des cellules dendritiques à discriminer les agents faiblement immunogènes des agents fortement immunogènes des bioaérosols a d'abord été évalué avec des agents simples (figure 5-1). Les agents testés ont activé différemment les cellules. En effet, les endotoxines utilisées comme agent standard fortement activateur ont induit une réponse maximale des cellules dendritiques qui était approximativement deux fois plus élevée que celle induite par d'autres agents simples des bioaérosols, soit le peptidoglycane (PGN) et le  $\beta$ -D glucane (figure 5-1B). Il convient de noter que le  $\beta$ -D glucane n'a pas pu être utilisé à une concentration supérieure à 1000 ng/ml en raison de sa solubilité.

Le potentiel des cellules dendritiques à détecter le potentiel d'activation de différents agents a aussi été testé avec des microorganismes entiers (figure 5-1C). À une concentration de 10  $\mu$ g/ml, *Bacillus globigii* et *Pseudomonas sp.* ont induit une activation relative des cellules dendritiques de  $87,7 \pm 6,0 \%$  et de  $102,5 \pm 6,2 \%$ , respectivement. *Saccharopolyspora rectivirgula* (SR) a, quant à lui, induit une activation maximale de  $48,7 \pm 10,2 \%$ . Les deux espèces d'archées testées, *Methanosphaera stadtmanae* (MSS) et *Methanobrevibacter smithii* (MBS), sont les microorganismes qui ont démontré les potentiels d'activation les plus faibles, induisant une activation relative des cellules dendritiques de  $43,1 \pm 5,3 \%$  et de  $17,2 \pm 7,8 \%$ , respectivement.



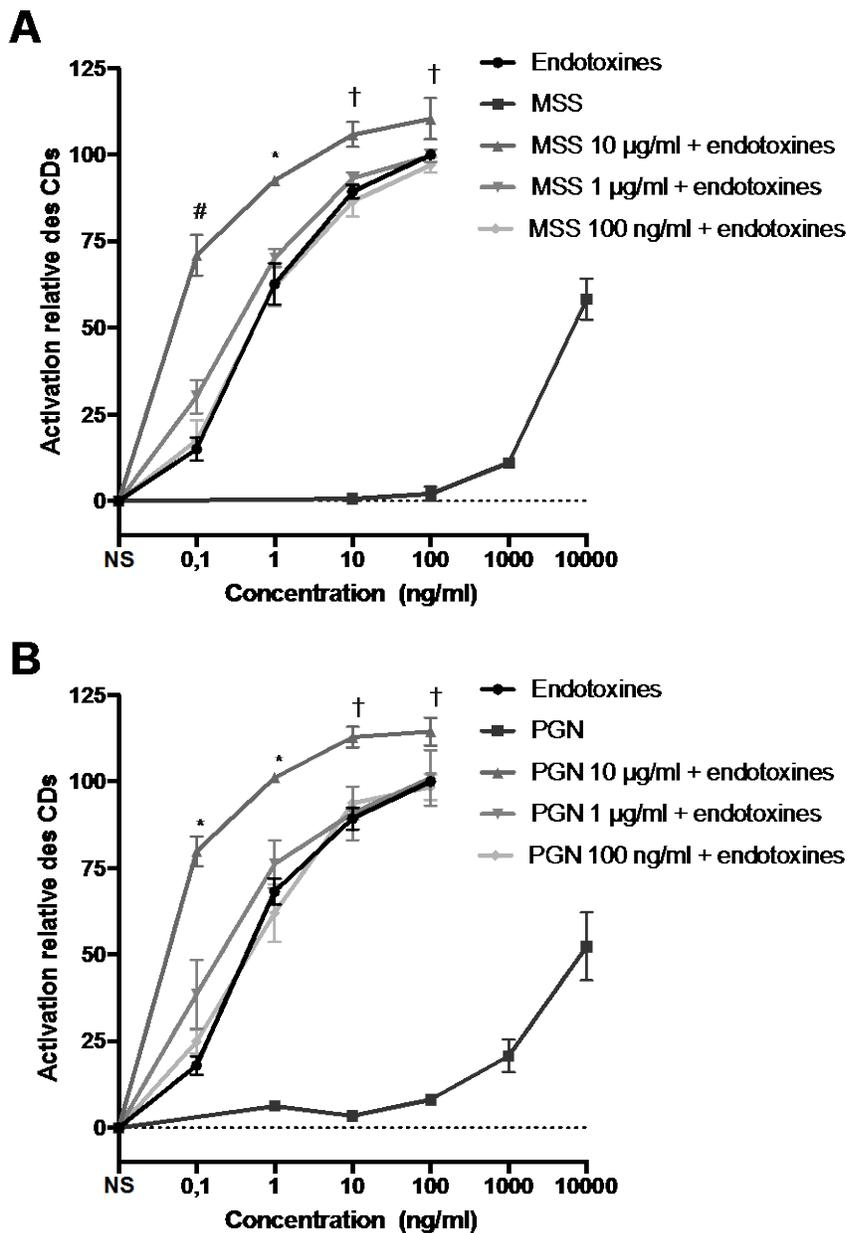
**Figure 5-1 : Des composants individuels des bioaérosols activent différemment des cellules dendritiques.**

(A) Au moment de l'analyse, la totalité des BMDC était initialement définie comme la population de cellules positives pour CD11c et CD11b. Les lignes de contour rouges représentent un échantillon incubé avec des endotoxines (0,1 ng/ml). Les courbes de couleur turquoise et orange représentent les contrôles de fluorescence PE-Cy7-CD11b et PE-CD11c, respectivement. (B-C) À partir de cette population, les cellules fortement positives pour MHC II et CD86 ont été sélectionnées, ce qui constitue l'indice d'activation. Les lignes de contour rouges montrent des cellules incubées avec (B) 0,1 et (C) 100 ng/ml d'endotoxines. Les lignes de contour bleues et les lignes de contour violettes représentent, respectivement, les contrôles PB-MHC II et Alexa Fluor 700-CD86. Les mêmes contrôles sont montrés en B et C. (D) Les cellules dendritiques ont été incubées avec des concentrations croissantes d'endotoxines (n = 11), de peptidoglycanes (n = 8) ou de  $\beta$ -D glucanes (n = 3) et (E) avec MSS (n = 10), MBS (n = 7), *Bacillus atrophaeus* (n = 5), *Pseudomonas aeruginosa* (n = 3) ou SR (n = 3) pendant 24h. L'activation relative des cellules dendritiques est exprimée en pourcentage de la condition d'endotoxine à 100 ng/ml. Les valeurs sont exprimées en tant que moyenne  $\pm$  SEM. NS : Non stimulées.

## **5.2 La complexité des stimuli modifie quantitativement la maturation des cellules dendritiques**

Puisque les agents retrouvés dans les bioaérosols peuvent agir de façon synergique sur le système immunitaire, le concept qu'une combinaison d'agents détectés dans les bioaérosols se traduise par une modulation de l'activation des cellules dendritiques a été testé. Les courbes dose-réponse d'endotoxines ont été effectuées en présence de 100 ng/ml, de 1 µg/ml et de 10 µg/ml de MSS (figure 5-2A) ou de PGN (figure 5-2B). Les concentrations sous le seuil d'activation des cellules dendritiques (100 ng/ml) et faiblement activatrices de ces cellules (1 µg/ml) de MSS et de PGN n'ont pas suffi à moduler la maturation des cellules dendritiques en réponse à des hausses de concentration d'endotoxines.

Par contre, des concentrations de MSS et de PGN suffisantes (10 µg/ml) pour induire une activation relative des cellules dendritiques d'environ 60 % ont produit un effet additif sur leur maturation lorsqu'elles étaient stimulées avec de faibles concentrations d'endotoxines. De plus, la co-incubation d'endotoxines et de MSS (10 µg/ml) ou de PGN (10 µg/ml) a toujours résulté en des pourcentages plus élevés de cellules dendritiques matures, peu importe la concentration d'endotoxines utilisée. Dans l'ensemble, ces résultats suggèrent que des combinaisons d'agents puissent agir de manière additive et ainsi augmenter l'ampleur de la maturation des cellules dendritiques.



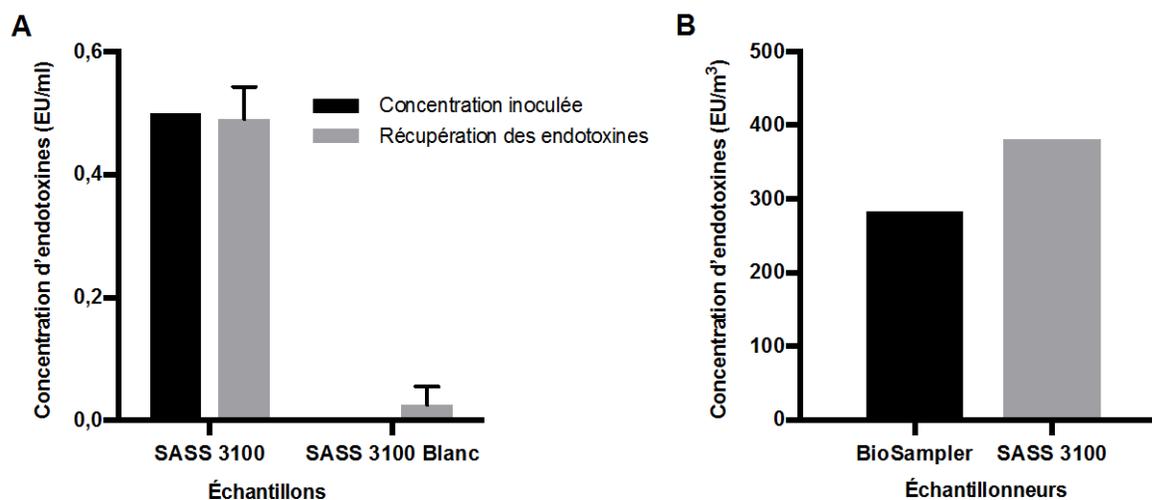
**Figure 5-2 : La combinaison d'agents détectés dans les bioaérosols augmente la maturation des cellules dendritiques *in vitro*.**

Les cellules dendritiques (CD) ont été stimulées avec des concentrations croissantes d'endotoxines (A-B), de MSS (A) ou de PGN (B) et, tel qu'indiqué dans les légendes, avec des concentrations croissantes d'endotoxines en combinaison avec des concentrations fixes de A) MSS (n=3) ou de B) PGN (n=2). NS : Non stimulées.

### 5.3 L'échantillonneur SASS 3100 produit des échantillons concentrés avec des taux d'endotoxine valides

Afin d'établir des essais *in vitro* avec des échantillons environnementaux, l'équipe de recherche a identifié des échantillonneurs d'air combinant la possibilité d'obtenir des éluats d'échantillons d'air hautement concentrés dans une solution physiologique à un échantillonnage fidèle des endotoxines. Ce dernier besoin est justifié par le fait que les endotoxines sont fréquemment utilisées pour jauger la qualité de l'air et répond à une nécessité d'évaluer l'impact de ces agents dans le système *in vitro*.

Bien que le Coriolis  $\mu$  permette de recueillir des échantillons concentrés dans des solutions physiologiques (Bertin Instruments, France), cette étude confirme qu'il sous-estime les niveaux d'endotoxines détectables dans les échantillons (données non présentées). Ensuite, les performances d'échantillonnage des endotoxines du SASS 3100, qui échantillonne des volumes d'air élevés, ont été comparées à celles du BioSampler, qui est l'échantillonneur standard pour la détection des endotoxines. Tout d'abord, l'éluion des filtres SASS 3100 avec du PBS a été testé dans le but d'une récupération efficace des endotoxines (figure 5-3A). Il a été établi que l'éluion avec du PBS permettait la récupération de  $98,0 \pm 5,3 \%$  des endotoxines inoculées dans les filtres. L'étude a aussi confirmé que les filtres non inoculés comportaient des niveaux d'endotoxines indétectables ( $0,03 \pm 0,01$  EU/ml). De plus, le SASS 3100 a permis une récupération supérieure des endotoxines par volume d'air échantillonné dans un environnement fortement contaminé par les bioaérosols (figure 5-3B), comparativement au BioSampler. Le SASS 3100 a donc été utilisé pour l'échantillonnage environnemental de ce projet.



**Figure 5-3 : Le SASS 3100 est efficace pour l'échantillonnage des endotoxines dans l'air.**

- A) Des filtres du SASS 3100 ont été inoculés avec 0,5 EU/ml d'endotoxines standard. L'air sous une hotte biologique à flux laminaire a été échantillonné avec les filtres inoculés à 300 lpm durant 10 min. Les filtres ont été élués et la récupération des endotoxines inoculées a été quantifiée (n=4). B) L'efficacité d'échantillonnage des endotoxines d'une porcherie par le BioSampler et le SASS 3100 a été comparée (n=1).

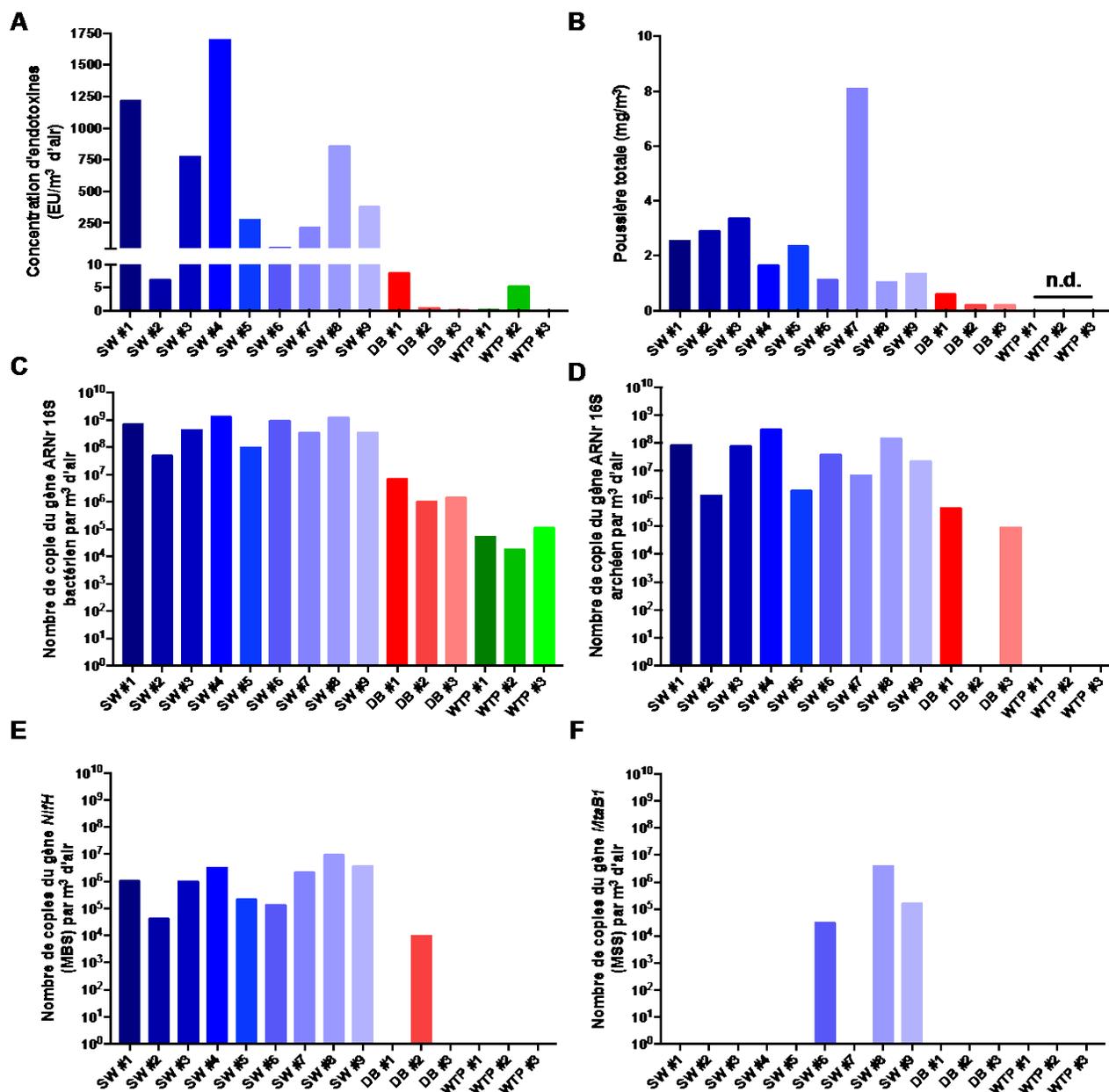
#### 5.4 L'activation relative des cellules dendritiques stratifie les échantillons environnementaux selon leur état sanitaire

L'impact des échantillons environnementaux complexes sur l'activation des cellules dendritiques a ensuite été évalué. Des échantillons d'air ont été prélevés dans des porcheries, des fermes laitières et des usines de traitement des eaux usées, compte tenu de l'hétérogénéité documentée de la charge en bioaérosols de ces milieux de travail (Blais-Lecours *et al.*, 2015). Pour confirmer l'état sanitaire des environnements de travail testés, une caractérisation sommaire du contenu des bioaérosols a d'abord été réalisée (figure 5-4). Les porcheries (SW#1 à SW#9) présentent des concentrations d'endotoxines allant de 6,7 à 1696,5 EU/m<sup>3</sup> d'air (figure 5-4A) et une moyenne des concentrations en poussière totale de  $2,7 \pm 2,2$  mg/m<sup>3</sup> (figure 5-4B). L'air des porcheries était également fortement contaminé par des bactéries totales ( $5,0 \times 10^7$  à  $1,3 \times 10^9$  gènes ARNr 16 S/m<sup>3</sup> d'air) (figure 5-4C) et par des archées totales ( $1,3 \times 10^6$  à  $3,1 \times 10^8$  gènes ARNr 16 S/m<sup>3</sup>) (figure 5-4D). Deux espèces d'archées retrouvées dans les bioaérosols (MSS et MBS) ont également été quantifiées par PCR en raison de leur potentiel immunogène différentiel (Blais Lecours *et al.*, 2011). Alors que MBS a été retrouvée dans toutes les porcheries visitées ( $4,2 \times 10^4$  à  $9,5 \times 10^6$  gènes *NifH*/m<sup>3</sup> d'air) (figure 5-4E), MSS n'a été détectée que dans trois porcheries (de  $0,2 \times 10^6$  à  $3,8 \times 10^6$  gènes *MtaB1*/m<sup>3</sup> d'air) (figure 5-4F).

L'air des fermes laitières (DB#1 à DB#3) comportait des concentrations d'endotoxines et de poussière totale plus faibles (0,1 à 8,2 EU/m<sup>3</sup> d'air et 0,2 à 0,6 mg/m<sup>3</sup> d'air, respectivement) par rapport aux porcheries. L'environnement des fermes montrait également une plus faible concentration de bactéries totales ( $1,0 \times 10^6$  à  $6,8 \times 10^6$  gènes ARNr 16 S/m<sup>3</sup> d'air) et d'archées totales ( $0,05 \times 10^6$  et  $0,1 \times 10^6$  gènes ARNr 16 S/m<sup>3</sup>). MBS n'a été retrouvée que dans une ferme laitière ( $9,8 \times 10^3$  gènes *NifH*/m<sup>3</sup> d'air). Seules des concentrations faibles d'endotoxines (0,2 à 5,3 EU/m<sup>3</sup>) (figure 5-4A) et de bactéries totales ( $0,05 \times 10^6$  à  $0,1 \times 10^6$  gènes ARNr 16 S/m<sup>3</sup> d'air) (figure 5-4C) ont été détectées dans des échantillons d'air provenant des usines d'épuration des eaux usées (WTP#1 à WTP#3).

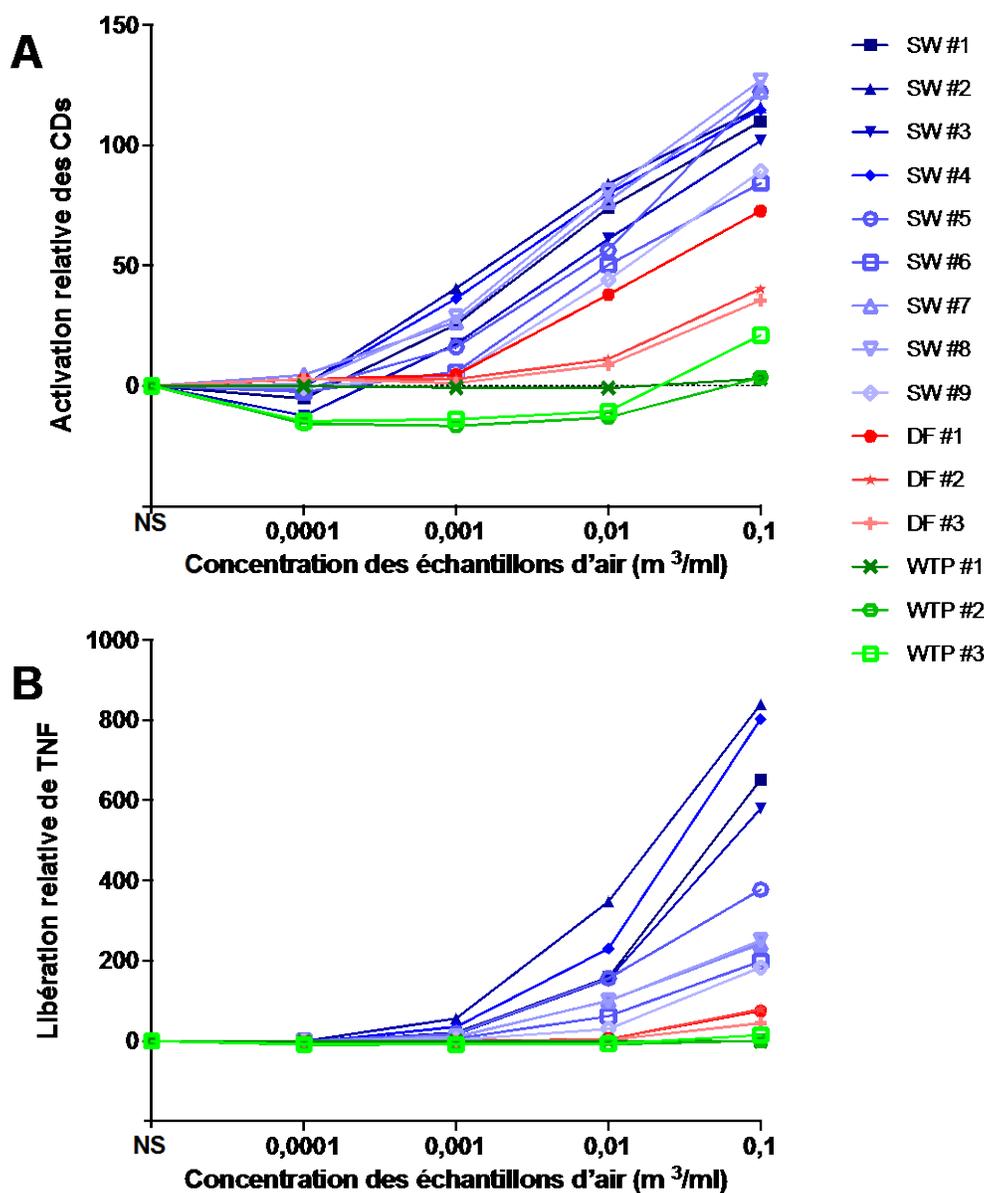
Pour la plupart des environnements testés, l'activation des cellules dendritiques a augmenté en réponse aux hausses de concentration des échantillons d'air; et l'activation relative des cellules dendritiques a varié de 3,0 à 126,9 % pour les concentrations d'échantillons d'air les plus élevées (figure 5-5A).

Les porcheries sont les environnements avec l'impact inflammatoire le plus élevé; elles ont induit une activation relative des cellules dendritiques de 84,1 à 126,9 % à une concentration de 0,1 m<sup>3</sup> d'air. Dans les mêmes conditions expérimentales, les fermes laitières ont induit une activation relative des cellules dendritiques allant de 35,5 à 72,7 %; et les usines d'épuration des eaux usées, de 3,0 à 21,1 %. De plus, la sécrétion de TNF, détectée dans le surnageant de culture cellulaire (figure 5-5B), s'est comportée similairement à la mesure de l'activation des cellules dendritiques. Plus précisément, la stimulation avec des échantillons concentrés à 0,1 m<sup>3</sup> d'air provenant de porcheries a généré une gamme de sécrétion de TNF variant de 183,6 à 839,8 % par rapport à la concentration de 100 ng/ml d'endotoxines; alors que celles des fermes laitières et des usines d'épuration des eaux usées étaient considérablement plus faibles (de 44,9 à 79,9 % et de 0,2 à 14,8 %, respectivement).



**Figure 5-4 : Quantification de composantes majeures des bioaérosols des environnements visités.**

Un essai cinétique chromogénique de lysat d'amoebocyte de limule (A), des mesures avec l'appareil DustTract (B) et des PCR quantitatives (C-F) ont été effectués afin de quantifier certaines composantes de l'air de trois milieux de travail. A) Endotoxines, B) Poussière totale, C) Gènes de l'ARNr 16S bactérien, D) Gènes de l'ARNr 16S archéen, E) Gènes *NifH* de MBS, F) Gènes *MtaB1* de MSS. Porcheries (SW) : n=9, fermes laitières (DB) : n=3, usines de traitement des eaux usées (WTP) : n=3, n. d. : non déterminé.



**Figure 5-5 : Les cellules dendritiques peuvent stratifier les échantillons environnementaux selon leur état sanitaire.**

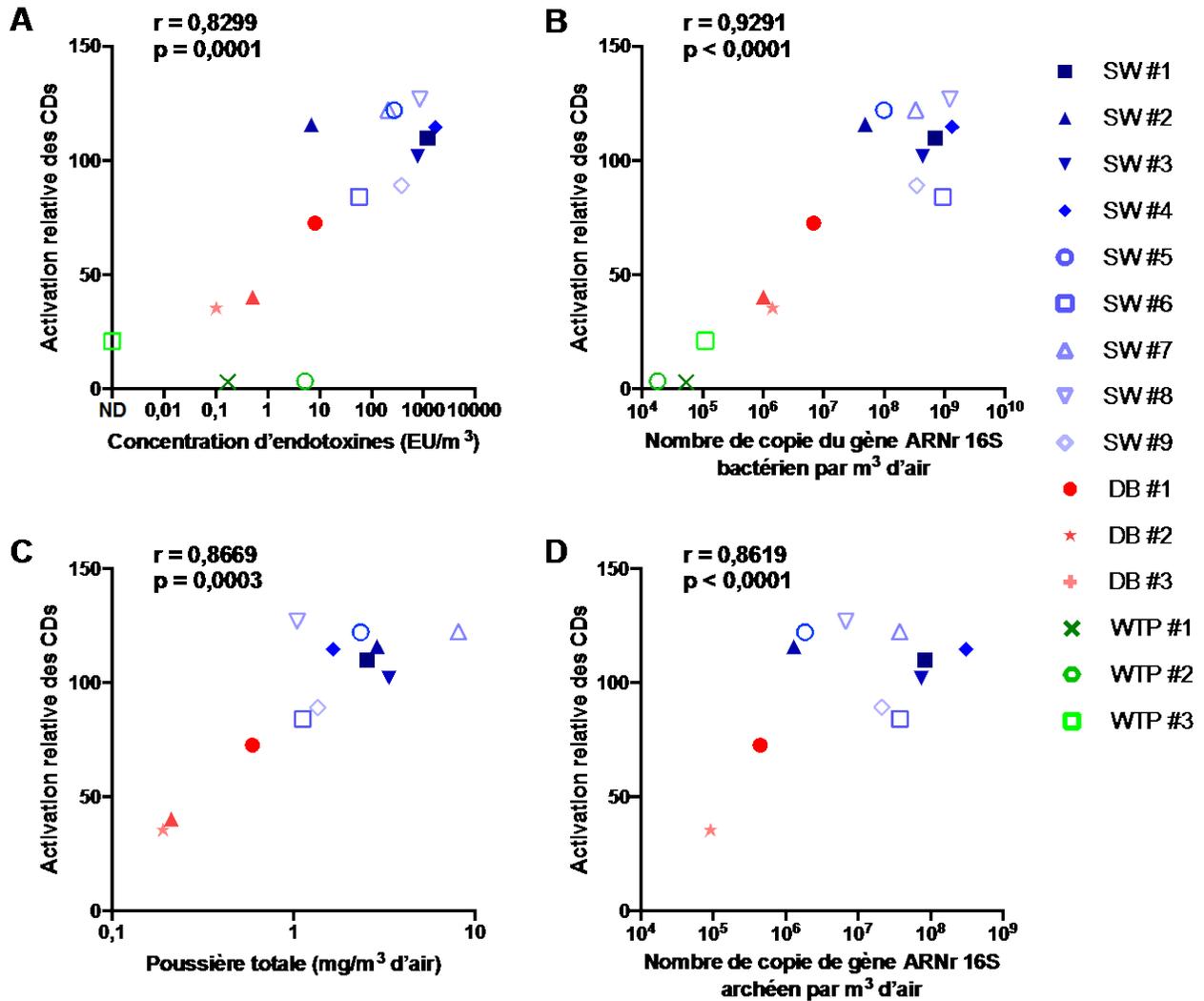
Des cellules dendritiques (CD) immatures ont été incubées durant 24 h avec des concentrations croissantes d'éluats d'échantillons environnementaux correspondant au volume d'air échantillonné par ml de milieu de culture. A) Le pourcentage d'activation des cellules dendritiques a été mesuré. B) La cytokine pro-inflammatoire TNF a été quantifiée dans le surnageant cellulaire. Chaque valeur est exprimée relativement à une activation de référence induite par 100 ng/ml endotoxines. Porcheries (SW) : n=9, fermes laitières (DB) : n=3, usines de traitement des eaux usées (WTP) : n=3. Chaque expérience a été effectuée en duplicata. NS : non stimulées.

## 5.5 Le contenu en endotoxines sous-estime le potentiel d'activation des cellules dendritiques par les échantillons d'air

Les endotoxines sont des activateurs puissants de la maturation des cellules dendritiques et causent de fortes réponses inflammatoires *in vivo*. Toutefois, tant les endotoxines (figure 5-6A), la poussière totale (figure 5-6B), les bactéries totales (figure 5-6C) et les archées totales (figure 5-6D) corrèlent avec l'activation des cellules dendritiques ( $r=0,83$ ,  $0,87$ ,  $0,93$  et  $0,86$ , respectivement). De manière à sonder le concept que des déterminants autres que les endotoxines contribuent à l'activation des cellules dendritiques en réponse à des échantillons complexes, nous avons exprimé l'activation relative des cellules dendritiques (figure 5-7A) et la libération relative de TNF (figure 5-7B), relativement à la courbe standard des endotoxines seules (courbe noire). Nous observons que pour la majorité des échantillons, leur capacité à induire une maturation des cellules dendritiques et la libération de TNF est différente de celle qui est prédite par leur teneur en endotoxines (ligne noire, figure 5-7). Par exemple, si on tentait de prévoir l'activation des cellules dendritiques des échantillons SW#2 et WTP#2 selon leur contenu en endotoxines, on attendrait une maturation relative d'un peu moins de 50 %. Cependant, on constate que la maturation des cellules dendritiques induite par SW#2 est presque nulle, tandis que celle qui est associée à WTP#2 est d'environ 120 %. Ainsi, il appert que bien que le contenu en endotoxines des échantillons corrèle généralement avec l'indice d'activation des cellules dendritiques, ce dernier n'est pas suffisant pour prédire l'impact des échantillons-terrains sur l'activation des cellules dendritiques. De plus, l'activation des cellules dendritiques par les échantillons-terrains est supérieure à ce qui aurait été prédit par le contenu en endotoxines. Ces données supportent le concept que dans la plupart des cas, divers éléments contenus dans les bioaérosols contribuent à augmenter l'activation des cellules dendritiques *in vitro*.

Ainsi, nous avons effectué des analyses sommaires de la contribution des différentes composantes mesurées à l'activation des cellules dendritiques. Nous avons pu déterminer que les deux paramètres majeurs pour l'activation des cellules dendritiques sont la poussière totale et les endotoxines, expliquant 75 % et 8 % de cette activation, respectivement. De plus, nos résultats démontrent que des échantillons avec de faibles niveaux d'endotoxines (WTP3, DB3 et DB2) conservent l'habileté à activer les cellules dendritiques. Si la variable endotoxines est dichotomisée pour des niveaux faibles ( $< 10 \text{ EU/m}^3$ ) contre des niveaux élevés ( $\geq 10 \text{ EU/m}^3$ ), alors la poussière totale comme facteur prédictif de l'activation des cellules dendritiques augmente à 95 % pour les échantillons faiblement contaminés en endotoxines. Cela valide la notion que les composantes autres que les endotoxines devraient être considérées lorsque les endotoxines sont en faible concentration dans l'air.

En effet, les poussières totales ont comptabilisé 95 % de la variance de la maturation des cellules dendritiques dans les échantillons contenant de faibles taux d'endotoxines ( $10 \text{ EU/m}^3$  et moins, comme déterminé par une analyse en grappe). Cependant, cette conclusion ne peut être appliquée aux échantillons des usines d'épuration des eaux usées étant donné l'absence de données sur les poussières totales. Ainsi, la poussière totale et les endotoxines sont des facteurs majeurs qui expliquent la maturation des cellules dendritiques en présence de contaminants dans les échantillons environnementaux.



**Figure 5-6 : L'activation des cellules dendritiques par les échantillons-terrains corrèle avec leur contenu en endotoxines, en poussière totale, en bactéries totales et en archées totales.**

Corrélation entre l'activation des cellules dendritiques (CD) et le contenu en A) endotoxines, B) bactéries totales, C) poussière totale des échantillons-terrains testés, D) archées totales.

ND : non détectable.

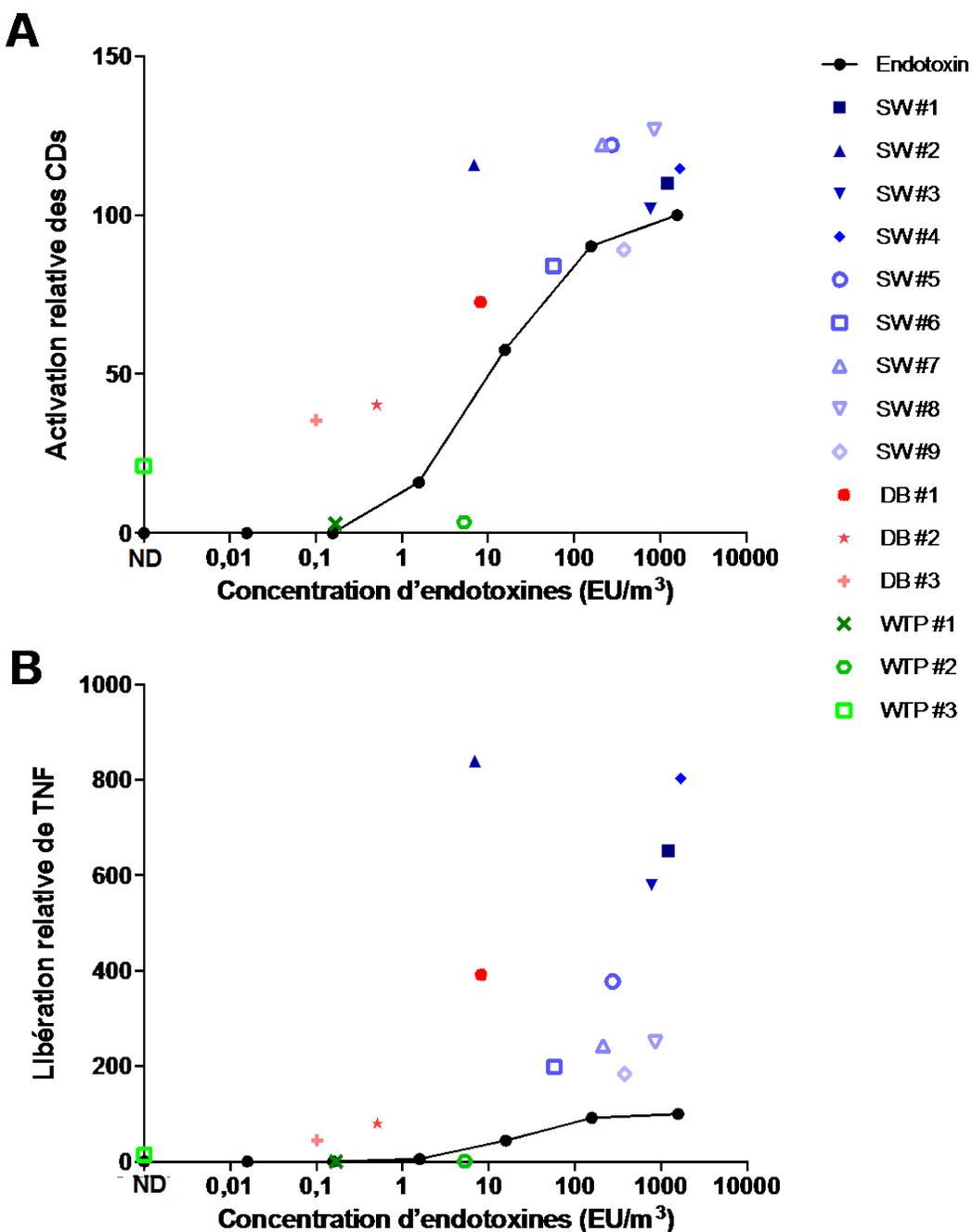


Figure 5-7 : La maturation des cellules dendritiques s'explique en partie par le contenu en endotoxines.

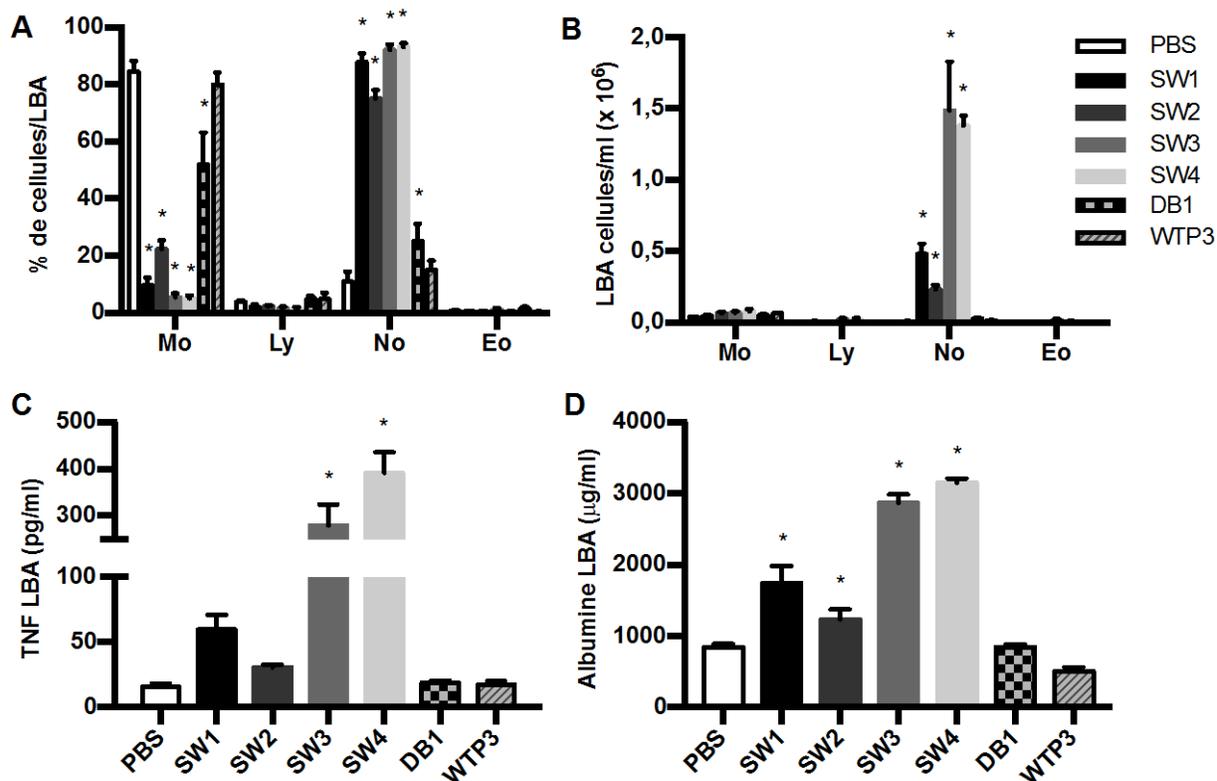
A) Maturation des cellules dendritiques (CD). B) TNF sécrété en présence d'un équivalent de 0,1 m<sup>3</sup> d'air pour chaque environnement échantillonné. La courbe en noir représente la courbe standard d'endotoxines (EU/ml). ND : non détectable.

## **5.6 L'indice d'activation des cellules dendritiques *in vitro* stratifie l'impact inflammatoire des échantillons-terrains selon leur groupe, et non pas sur une base individuelle**

Dans le but de déterminer si la maturation des cellules dendritiques correspond au potentiel inflammatoire *in vivo* des échantillons d'air, les voies respiratoires des souris ont été exposées aux échantillons d'air testés *in vitro* et l'inflammation a été évaluée 24 h plus tard dans les lavages bronchoalvéolaires (figure 5-8). Comme attendu, le contenu cellulaire des lavages bronchoalvéolaires des souris ayant reçu du PBS était principalement composé de macrophages alvéolaires (85 %) et contenait un faible nombre absolu de cellules ( $0,047 \times 10^6 \pm 0,007 \times 10^6$  cellules/ml), sans accumulation importante de neutrophiles ( $10,8 \pm 3,6$  %) ou d'éosinophiles ( $0,7 \pm 0,33$  %). Le nombre de cellules totales dans les lavages bronchoalvéolaires provenant des souris exposées aux échantillons prélevés dans des porcheries se situait entre  $0,31 \times 10^6$  et  $1,6 \times 10^6$  cellules/ml, et était plus élevé que celui des souris exposées à l'échantillon de ferme laitière ( $0,10 \times 10^6 \pm 0,01 \times 10^6$  cellules/ml), et à celui des souris exposées à l'échantillon d'usine de traitement des eaux usées ( $0,082 \times 10^6 \pm 0,006 \times 10^6$  cellules/ml).

Conformément à la nature aiguë du protocole, nous avons observé une accumulation prédominante de neutrophiles en réponse aux échantillons d'air des milieux de travail, ce qui concordait évidemment avec une diminution du contenu relatif des macrophages dans le lavage bronchoalvéolaire. Les porcheries sont les milieux qui ont généré la plus grande accumulation de neutrophiles dans les lavages (entre 75 et 93 %), suivies des fermes laitières ( $25,0 \pm 6,2$  %) et des usines d'épuration des eaux usées ( $15,0 \pm 3,2$  %) (figure 5-8B). La même tendance a été observée pour la quantité de TNF dans le lavage bronchoalvéolaire (figure 5-8C). Par ailleurs, l'intensité de la réponse neutrophilique était en adéquation avec l'accumulation d'albumine dans les lavages bronchoalvéolaires (figure 5-8D), qui est un indicateur d'une infiltration de plasma dans les voies aériennes et donc, un marqueur d'altérations vasculaires au poumon.

La réponse inflammatoire aux échantillons d'air recueillis dans ce projet concorde avec l'état sanitaire des différentes catégories d'environnements. Ainsi, les résultats suggèrent que l'activation des cellules dendritiques *in vitro* prédit le potentiel immunogène des échantillons d'air selon leur classe et non pas individuellement.



**Figure 5-8 : Le potentiel inflammatoire des échantillons environnementaux diffère selon leur état sanitaire dans un modèle aigu d'exposition des voies respiratoires.**

Des souris ont été instillées par voie intranasale avec du PBS (contrôle) ou avec  $0,1 \text{ m}^3$  d'air des environnements échantillonnés élués dans du PBS. Les souris ont été euthanasiées 24 h après l'instillation afin d'effectuer les analyses des lavages bronchoalvéolaires. Les comptes de macrophages (Mo), de lymphocytes (Ly), de neutrophiles (No) et d'éosinophiles (Eo) en A) pourcentage et en B) nombre de cellules/ml de lavage. La quantification C) du TNF et D) de l'albumine a été effectuée dans le surnageant de lavage bronchoalvéolaire. Les barres représentent les moyennes  $\pm$  SEM ( $n=5\sim 11$ ).

\* :  $p < 0,05$ ; \*\* :  $p < 0,01$ ; \*\*\*\* :  $p < 0,001$



## 6. DISCUSSION

La nature des bioaérosols prélevés dans les environnements de travail est complexe et la compréhension des déterminants immunogènes reste un défi. En effet, la caractérisation complète des agents trouvés dans l'air d'un environnement donné ne peut être effectuée de façon réaliste; et l'interaction entre ces agents est susceptible d'influencer leur impact inflammatoire. Dans cette étude, il a été déterminé que les combinaisons d'agents influent sur le processus de maturation d'un type de cellule centralement impliqué dans l'initiation de la réponse immunitaire, c'est-à-dire la cellule dendritique.

Il a également été constaté que l'activation des cellules dendritiques par des échantillons d'air de milieux de travail pouvait permettre la classification des environnements selon leur état sanitaire et leur capacité à induire une inflammation pulmonaire dans un modèle murin. Bien que de nombreux agents aient démontré une corrélation positive avec l'activation des cellules dendritiques, la poussière totale et les endotoxines ont eu une incidence indépendante sur la maturation des cellules dendritiques et sont demeurées les meilleurs facteurs prédictifs de la maturation de ces cellules en réponse aux échantillons d'air testés.

Cependant, comme cela a été observé lors des expériences *in vitro* combinant des stimulations d'endotoxines avec d'autres composants de bioaérosols, la maturation des cellules dendritiques induite par les échantillons d'air prélevés sur les différents terrains était presque toujours plus élevée que le niveau de maturation prédit par son contenu d'endotoxine mesuré. Cette observation valide le concept que les agents individuels ne sont pas des déterminants adéquats pour prédire le potentiel immunogène d'échantillons d'air.

### 6.1 Les cellules dendritiques stratifient adéquatement les catégories d'environnements selon leur état sanitaire

Les essais cellulaires gagnent en popularité dans le contexte de l'évaluation du potentiel inflammatoire d'agents simples ou complexes (Davies *et al.*, 2005; Letourneau *et al.*, 2010; Liebers, Stubel, Duser, Bruning et Raulf-Heimsoth, 2009; Liu *et al.*, 2009). Bien que des études portant sur des substances précises, comme les composantes du lait, aient permis de déterminer l'activation de mécanismes anti-inflammatoires, les résultats préliminaires de la présente étude n'ont pas laissé présager ce type de mécanisme en réponse à des composantes des bioaérosols. Par exemple, aucune modulation spectaculaire de l'IL-10 n'a été notée en présence d'une archée peu immunogène (données non présentées) et qui serait un marqueur de protection dans le contexte de certaines maladies inflammatoires (Blais Lecours, Marsolais, *et al.*, 2014). Ainsi, dans les cas d'agents complexes et notoirement immunogènes (Blais Lecours *et al.*, 2011; Dearman *et al.*, 2009; May *et al.*, 2012), les mesures se sont limitées à détecter des différences quantitatives dans les processus associés à l'induction de la réponse immune, comme la maturation des cellules dendritiques et la libération de TNF.

Toutefois, ces mesures « unidirectionnelles » ont suffi à répertorier les environnements avec divers états sanitaires, selon leur classe. Il est important de noter que les milieux de travail testés étaient tous caractérisés par une contamination de leur environnement à de fortes concentrations en bactéries et en endotoxines (Blais Lecours *et al.*, 2015; Thorne, Duchaine et Blais Lecours, 2016), bien que la quantité de poussière totale et la charge microbienne dans

l'air soient notoirement plus importantes dans les porcheries que dans les usines d'épuration des eaux usées qui ont fait l'objet de tests (Krauter et Stetzenbach, 2016).

Par ailleurs, comme les endotoxines sont des lipopolysaccharides (LPS) complexes trouvées dans la membrane externe des bactéries à Gram négatif, leur variété est grande et leurs propriétés immunogène et pyrogène diffèrent selon la source d'endotoxines (Matute-Bello, Frevert et Martin, 2008). Une simple mesure de la quantité d'endotoxines présentes dans l'air ne permettrait donc pas de stratifier adéquatement le potentiel immunogène d'échantillons d'air, ce qui justifie l'utilisation d'un modèle cellulaire comme celui développé dans la présente étude.

Enfin, les seuils de détection qui ont été retenus sont plus bas, ou comparables à ceux des autres modèles cellulaires utilisés pour la détermination de l'impact inflammatoire des bioaérosols. En effet, des échantillons-terrains contenant aussi peu que 5 pg/ml d'endotoxines (DB1, WTP2) ont permis d'activer les cellules dendritiques (figure 5-4 et 5-5) (Goyer, Lavoie, L. et Marchand, 2001; Schaumberger, Ladinig, Reisinger, Ritzmann et Schatzmayr, 2014), alors que des concentrations de 10 pg/ml et de 100 pg/ml d'endotoxines étaient suffisantes pour induire la libération de IL-1 $\beta$  et de TNF, respectivement, dans des modèles de stimulation des cellules totales du sang (Liebers *et al.*, 2009; Punsmann, Liebers, Stubel, Bruning et Raulf-Heimsoth, 2013).

## **6.2 Robustesse de la technique d'échantillonnage utilisée et du modèle cellulaire choisi**

Le SASS 3100 a permis de récolter des échantillons concentrés dans une solution compatible avec les essais cellulaires. Vu l'importance réelle et perçue des endotoxines en matière de qualité de l'air, une méthode d'échantillonnage compatible avec la culture cellulaire et assurant une excellente représentativité du contenu des bioaérosols devait être mise au point. L'échantillonneur d'air Coriolis  $\mu$  a d'ailleurs rapidement été exclu, malgré le fait qu'il s'agisse d'un appareil à haut débit en phase liquide, en raison de 1) la nécessité d'utiliser un volume fixe de tampon d'échantillonnage isotonique, 2) le besoin d'utiliser des détergents pour augmenter la récupération de certains agents, considérant leur adsorption au matériel des coupes d'échantillonnage.

D'ailleurs, les expériences de mise au point menées par l'équipe de recherche ont permis de démontrer que des concentrations aussi faibles que 0,00005 % de détergent provoquaient une très forte mortalité des cellules dendritiques en 24 h. Les données de la présente étude contrastent avec les résultats de Viegas *et al.* (2017) qui ont déterminé que la viabilité cellulaire n'était pas affectée par l'exposition à des échantillons d'air recueillis avec le Coriolis  $\mu$  en présence de 0,0025 % de Triton-x100. Toutefois, Viegas *et al.* ont mesuré la viabilité lors d'essais colorimétriques et les cellules utilisées étaient les macrophages THP1, qui sont relativement robustes.

Au regard des objectifs de la présente étude, les THP1 n'ont pas été retenues vu leur niveau basal d'activation élevé une fois différenciées en cellules dendritiques (annexe A). Par exemple, un test cellulaire impliquant des cellules THP1 est aussi utilisé pour évaluer l'impact de composés chimiques (Narita *et al.*, 2018) qui, toutefois, ne nécessitent pas l'expression de récepteurs de signaux de danger à la surface des THP1 pour en moduler l'activation. Dans les THP1, l'apparition de ces récepteurs est efficacement induite par des ionophores du calcium

(Berges *et al.*, 2005), mais ces derniers provoquent également une forte activation cellulaire. Cela diminue grandement notre capacité à détecter la réponse à d'autres agents, comme les endotoxines ou autres signaux de dangers retrouvés dans l'air et qui nécessitent souvent la présence des récepteurs de signaux de danger à la surface des cellules dendritiques. Néanmoins, les résultats de Tsukumo *et al.*, publiés en 2018, suggèrent que les THP1 pourraient être utilisées pour identifier le potentiel allergène de composés biologiques et seraient sensibles à des agonistes du TLR4, telles les endotoxines, lorsque non différenciées en cellules dendritiques (Tsukumo, Matsunari, Yamashita, Kojima et Itagaki, 2018). Cependant, cette sensibilité se baserait sur l'expression d'un marqueur d'activation non investigué dans la présente étude. Ainsi, bien que les conditions utilisées dans le cadre de notre étude ne l'aient pas permis, il appert que les THP1 pourraient éventuellement servir de lignée cellulaire commercialement disponible pour l'élaboration d'un test visant à tester l'impact inflammatoire des bioaérosols complexes, ce qui réduirait l'utilisation d'animaux de laboratoire, permettrait de diminuer la durée totale de la procédure, son nombre d'étapes, et ainsi réduirait potentiellement les sources de variabilité.

Une limite importante de notre étude réside en une caractérisation partielle des cellules *in vitro*, avant l'étape de la stimulation avec les divers agents. Par exemple, il est raisonnable de penser que seule une fraction des cellules présentes dans les puits de culture cellulaire avait la capacité de se différencier en cellules dendritiques. Toutefois, la proportion de ces cellules était égale dans toutes les conditions expérimentales. Ainsi, ce bruit de fond a certainement contribué à diminuer la plage dynamique de notre essai. Une meilleure caractérisation/sélection des cellules à stimuler pourrait ainsi augmenter la sensibilité de notre essai. De plus, l'augmentation de l'homogénéité de la population à stimuler permettrait vraisemblablement d'utiliser des indices d'activation cellulaire plus sensibles que le pourcentage de cellules matures, comme par exemple, l'intensité de la fluorescence des différents marqueurs utilisés dans cette étude. Malgré tout, l'essai d'activation des cellules dendritiques se compare avantageusement sur le plan de la sensibilité et de la robustesse par rapport aux systèmes préalablement décrits. Les cellules murines, de par la ressemblance de leur système de détection des agents-terrains avec celles des humains (Shortman et Liu, 2002), ne semblent d'ailleurs pas être un obstacle à l'élaboration de tests biologiques centrés sur la santé humaine.

Bien que les conditions qui ont été testées au cours de ce projet soient limitées, les résultats *in vitro* et *in vivo* suggèrent des effets additifs, et non synergiques, des composantes des bioaérosols, en ce qui a trait à l'activation des cellules dendritiques. Par exemple, on note que l'addition de MSS ou de PGN à une dose suffisante pour induire une activation des cellules dendritiques produit un effet additif avec la dose de 0,1 ng/ml d'endotoxines. De plus, les doses subliminaires de MSS et de PGN n'ont pas augmenté la réponse aux endotoxines, ce qui réfute la notion d'interaction synergique. Ces résultats s'arriment parfaitement avec ceux obtenus lors d'analyses des environnements-terrains. En effet, les deux facteurs prédictifs principaux en regard de l'activation des cellules dendritiques sont premièrement les poussières totales (75 %) et secondairement les endotoxines (8 %). Cependant, aucune interaction n'a été détectée entre ces 2 paramètres en regard de l'activation des cellules dendritiques, ce qui atteste encore ici un effet additif. De plus, en dichotomisant les échantillons sur la base de leur contenu en endotoxines, on découvre que le potentiel explicatif des poussières totales augmente à près de 95 % en regard de l'activation des cellules dendritiques. D'ailleurs, cette situation se rapproche fortement de la situation modélisée (figure 5-2), où les agents comme MSS et PGN expliquent une forte activation des cellules dendritiques à faible concentration d'endotoxines.

En somme, ces résultats mettent en évidence la nature des relations entre des composantes souvent mesurées dans le contexte de l'évaluation de la qualité de l'air. Ils suggèrent aussi que ces deux paramètres devraient être simultanément considérés pour l'établissement éventuel d'indices sanitaires. Il est bien sûr convenu qu'un avancement des connaissances relatives au contenu des poussières totales saurait raffiner la compréhension des mécanismes immunogènes des bioaérosols.

### **6.3 Limites du modèle de cellules dendritiques pour évaluer l'état sanitaire d'un environnement**

Bien que le test sur les cellules dendritiques semble prédire « par catégorie » l'impact inflammatoire des échantillons-terrains *in vivo*, il n'a pas su stratifier les échantillons d'air au sein de la catégorie des fermes porcines. Ici, il faut d'abord savoir que les environnements testés *in vivo* constituent l'entièreté des échantillons disponibles après avoir terminé les manipulations permettant d'atteindre l'objectif 2, ce qui a limité la capacité d'analyse. D'un point de vue qualitatif, on note toutefois que les résultats issus du test de maturation des cellules dendritiques correspondent à ceux des tests sur le modèle murin. Considérant que le nombre total de neutrophiles dans le lavage est un excellent marqueur de la réponse inflammatoire, il est facile de conclure que les environnements les plus immunogènes ont été les fermes porcines, suivies des fermes laitières et ensuite des usines d'épuration des eaux usées. Cependant, l'intensité de la réponse neutrophilique au sein des fermes porcines ne semble pas concorder avec les résultats du test sur cellules dendritiques. En fait, deux environnements semblent avoir déclenché une réponse toxique au poumon, ce qui se concrétise par un œdème pulmonaire aigu (accumulation d'albumine dans les lavages), une neutrophilie très sévère et une libération augmentée de TNF (Tang *et al.*, 2017; Weifeng *et al.*, 2016). Ce phénomène met en évidence que d'autres facteurs devraient être considérés dans ce modèle *in vitro*, incluant l'évaluation du potentiel cytotoxique des environnements-terrains (Douwes, Thorne, Pearce et Heederik, 2003), ce qui pourrait être aisément accompli par l'ajout de marqueurs de viabilité dans l'essai de culture cellulaire.

Les concentrations des échantillons-terrains ont été choisies sur la base de leur équivalent en endotoxines. On sait par ailleurs que des concentrations de 40 µg d'endotoxines peuvent induire un syndrome de détresse respiratoire aigu (SDRA) (Jacobson *et al.*, 2005; Matute-Bello *et al.*, 2011), tandis que des concentrations inférieures à 1 µg sont tolérables pendant plus de 24 h chez la souris (Delayre-Orthez, de Blay, Frossard et Pons, 2004). Ainsi, les souris exposées aux échantillons SW#3 et SW#4 ont reçu des niveaux de 10 à 20 ng d'endotoxines et il était difficile de prévoir ce type de réaction. En perspective, la mesure d'impacts toxiques sur les cellules dendritiques bonifierait probablement le potentiel prédictif de tests sur cellules dendritiques, considérant que des effets toxiques *in vitro* peuvent se traduire par des phénomènes de blessures tissulaires *in vivo* (Szarka, Wang, Gordon, Nation et Smith, 1997).

Pour des raisons de disponibilité d'échantillons, les éluats des échantillons-terrains n'ont pas été testés dans un modèle murin subchronique qui serait susceptible de modéliser l'exposition continue des travailleurs aux environnements contaminés (Blais Lecours *et al.*, 2011; Blanchet, Israel-Assayag et Cormier, 2004). Ce type de protocole nécessitant de faibles doses répétées d'agents immunogènes permettrait vraisemblablement de contourner les obstacles liés à l'induction du SDRA qui sont inhérents aux modèles aigus; et de comparer l'impact prédictif du modèle de culture de cellules dendritiques en contexte aigu et chronique.

## 7. CONCLUSION

Les travaux décrits dans ce rapport ont permis l'élaboration d'un nouvel outil biologique pour évaluer le potentiel immunogène d'échantillons d'air prélevés dans des environnements de travail. Les résultats obtenus avec le modèle cellulaire développé ont permis de valider l'impact majeur de la charge en poussières totales et en endotoxines dans l'air, mais ont aussi mis en lumière la nécessité de prendre en compte l'échantillon et ses composantes de façon globale lors d'études d'évaluation des risques d'un environnement de travail. D'ailleurs, ces résultats valident le concept que les endotoxines et les poussières totales sont des mesures significatives pour l'évaluation de la qualité de l'air, mais que leur interaction devrait éventuellement être prise en compte pour la formulation de recommandations. De plus, ce projet a permis de valider l'utilisation d'un nouvel échantillonneur, le SASS 3100, pour la quantification des endotoxines dans l'air. En somme, ces résultats attestent de la validité des cultures cellulaires de cellules dendritiques murines pour l'étude et l'identification potentielle de nouveaux déterminants de la qualité de l'air.



## 8. RETOMBÉES DU PROJET DE RECHERCHE

Le problème majeur dans l'évaluation des risques associés à l'exposition aux agents biologiques en milieu de travail réside dans le fait que les données d'évaluation de l'exposition sont plus souvent qu'autrement difficiles à interpréter; et que les risques encourus par le travailleur sont très difficilement prévisibles. Les retombées de ce projet s'inscrivent ainsi dans le contexte de l'amélioration des méthodes d'évaluation des risques pour la santé des travailleurs évoluant dans des environnements dans lesquelles les problématiques de santé associées à une mauvaise qualité de l'air sont prédominantes.

La procédure mise au point au cours de ce projet permet de tester aisément de multiples échantillons d'air et d'en comparer le potentiel immunogène. Elle est le cœur de ce rapport de recherche publié par l'Institut de recherche Robert-Sauvé en santé et en sécurité du travail. Les paramètres régissant l'utilisation des cultures de cellules dendritiques pour l'évaluation de l'impact immunogène des échantillons d'air sont ainsi disponibles et peuvent contribuer à l'avancement des connaissances dans le domaine de la recherche en qualité de l'air.

Les exemples d'application sont multiples. Par exemple, ce modèle pourrait s'appliquer à l'étude de l'impact immunogène d'autres types d'environnements. De plus, en conjonction avec des méthodes de plus en plus sophistiquées de caractérisation du contenu des bioaérosols, cette procédure, rapide et relativement simple à mettre en œuvre, pourrait permettre d'identifier des combinaisons d'agents pouvant prédire le potentiel immunogène d'une grande quantité d'environnements, ce qui aurait un impact direct sur la puissance statistique des études, et permettrait ainsi d'augmenter la quantité de paramètres à étudier afin d'établir des mesures prédictives. Il s'agirait éventuellement d'identifier des paramètres précis dont la mesure pondérée, par l'intermédiaire d'algorithmes semblables à des modèles de régressions multiples, pourrait constituer des indices sanitaires plus fiables que ceux auxquels on recourt actuellement.

Au cours de ce projet, une nouvelle méthode pour l'évaluation du contenu des endotoxines dans l'air a également été décrite. Qui plus est, cette méthode s'effectue par échantillonnage à haut débit, ce qui constitue un avantage certain dans divers domaines prometteurs comme les approches de type « omique ». Par exemple, cette méthode d'échantillonnage est susceptible de fournir des échantillons suffisamment concentrés pour les approches ciblées ou non ciblées en spectrométrie de masse et en métagénomique. Ainsi, cette trouvaille relative à la validité de l'échantillonnage des endotoxines est en adéquation avec des résultats récemment publiés (Dybwad, Granum, Bruheim et Blatny, 2012; Dybwad, Skogan et Blatny, 2014a, 2014b) qui attestent l'utilité du SASS-3100 dans le cadre des études sur la qualité de l'air même si cet échantillonneur est relativement nouveau sur le marché.

Les présents travaux corroborent l'idée que l'évaluation d'agents simples n'est pas suffisante pour formuler des indices sanitaires dans une problématique de qualité de l'air. Une des conclusions majeures du rapport est que l'importance des poussières totales comme déterminant de la qualité de l'air est accrue en conditions de faible contamination en endotoxines, et ce type de trouvaille contribuera vraisemblablement à l'avancement des concepts visant à développer des méthodes fiables pour prédire l'impact immunopathologique d'environnements de travail variés. D'ailleurs, cette notion est non seulement supportée par nos analyses des échantillons-terrains, mais aussi par l'approche modélisée *in vitro*, ce qui ajoute à la validité de ces conclusions



## 9. PERSPECTIVES

Ces travaux démontrent que la mesure de la maturation des cellules dendritiques murines permet de stratifier les environnements selon leur état sanitaire théorique, ce qui a été confirmé par une caractérisation sommaire des échantillons-terrains. Toutefois, ces travaux ont fait appel à une quantité limitée d'échantillons. Considérant la capacité surprenante de ce test à répertorier les échantillons-terrains par classe, il devient crucial de valider cette avancée en ayant recours à une cohorte d'une plus grande échelle. Puisque l'optimisation des méthodes d'échantillonnage et de culture des cellules dendritiques n'est plus à faire, une étude à grande échelle est facilement envisageable. Il faut se rappeler que la mesure des poussières totales est une représentation de l'ensemble des composantes des bioaérosols, et que les résultats démontrent une association pour certaines de ces composantes avec l'activation des cellules dendritiques. Ainsi, une caractérisation plus précise des échantillons par des méthodes de séquençage ou de spectrométrie permettrait de raffiner les déterminants immunogènes des poussières totales. Ce type d'étude favoriserait l'association de nouveaux déterminants de la qualité de l'air à des environnements précis et aussi une amélioration de notre compréhension des mécanismes sous-jacents aux effets délétères de l'exposition aux environnements contaminés par les bioaérosols.

Bien que la méthode *in vitro*, qui fait appel à des méthodes spécialisées, identifie relativement rapidement le potentiel immunogène des bioaérosols, il serait possible de l'accélérer davantage en ayant recours à des cellules génétiquement modifiées. D'ailleurs la mise au point de ce modèle à partir de cellules de souris est un facteur clé permettant l'avancement vers cet éventuel objectif. Ainsi, il serait possible de sevrer le modèle des étapes de marquage par anticorps fluorescents et analyses par cytométrie de flux, en utilisant des cellules de souris génétiquement modifiées pour exprimer des protéines fluorescentes en réponse à une activation par des agents-terrains. D'ailleurs des souris exprimant une protéine fluorescente simultanément à l'expression du MHCII ou au TNF sont disponibles commercialement. L'utilisation de cette technologie permettrait d'effectuer les tests de manière cinétique et à moyen et haut rendements, à l'aide de lecteurs de fluorescence en format 96 puits, et éventuellement en 384 puits. Cette approche serait plus susceptible de se traduire en une méthode standardisée pour utilisation à grande échelle.

Les résultats *in vitro* faisant appel à des combinaisons d'agents corroborent le concept que la cinétique de maturation des cellules dendritiques puisse être altérée par des agents combinés. Il sera important d'investiguer cette hypothèse puisque la vitesse de maturation des cellules dendritiques est associée avec le type de réponse inflammatoire qui sera induite (Langenkamp, Messi, Lanzavecchia et Sallusto, 2000), ce qui se traduit par une altération du profil de sécrétion des cytokines par les cellules dendritiques. Ainsi, il devient important de caractériser comment divers types d'environnements influencent la vitesse de maturation des cellules dendritiques et une caractérisation plus détaillée de leur sécrétome pourrait révéler de nouveaux mécanismes de pathogenèse.

Une limite significative de notre étude est l'utilisation d'un modèle aigu d'inflammation pulmonaire faisant appel à des instillations de doses relativement élevées d'échantillons. Cette étape était nécessaire afin de déterminer avec quelle concentration les éluats issus de l'échantillonneur SASS pouvaient être administrés à des souris par voie intranasale. Bien que

ce modèle mime bien les pathologies aiguës, il s'applique toutefois difficilement aux conditions chroniques. Il sera ainsi déterminant de valider l'adéquation entre les tests sur cellules dendritiques avec un modèle subchronique *in vivo* faisant appel à des instillations d'environnements-terrains de plus faibles concentrations, ce qui représente de manière plus fidèle la réalité quotidienne des travailleurs évoluant dans des environnements contaminés par les bioaérosols. Ce type de protocole permettra d'éviter l'induction de signes s'apparentant au syndrome de détresse respiratoire aigu (SDRA), ce qui a certainement nui à l'interprétation des résultats *in vivo* de cette étude.

De plus, le concept de cytotoxicité dans ce modèle n'a pas été exploité. Il va sans dire que les impacts cytotoxiques des échantillons-terrains sont également susceptibles de modifier la réponse immune pulmonaire en causant des blessures tissulaires. De par la nature du test sur les cellules dendritiques, et considérant la disponibilité de marqueurs de survie compatibles avec l'essai développé, il serait avantageux de mettre au point une méthode d'analyse de survie cellulaire, en conjonction avec la mesure actuelle de l'activation cellulaire, ce qui fournirait une donnée précieuse sur le potentiel toxique des particules prélevées dans l'air.

Pour des raisons techniques et de faisabilité, la taille aérodynamique des bioaérosols n'a pas été considérée dans cette étude. Il est toutefois bien documenté que ce paramètre influence la pénétration des bioaérosols dans l'arbre respiratoire, ce qui est susceptible d'influencer la réponse immune pulmonaire. Ainsi, la caractérisation de leur taille aérodynamique pourrait révéler que des particules de certaines dimensions sont responsables d'inconvénients reliés à un environnement contaminé. Cela serait confirmé grâce au tri et à la récupération des particules de différentes tailles pour évaluation dans le modèle murin. Puisque la taille des particules dans l'air est un paramètre crucial pour le choix des méthodes de prévention des risques, ce type de projet saurait guider le choix de méthodes de protection des travailleurs vers les moyens les plus efficaces. À long terme, il sera éventuellement possible de raffiner les modèles murins en réalisant des expositions des voies aériennes selon des méthodes d'aérosolisation, et non pas d'instillation, ce qui contribuera à mieux comprendre les mécanismes immunogènes des particules présentant des pouvoirs de pénétration différentiels des voies aériennes du poumon.

## BIBLIOGRAPHIE

- Bach, H. J., Hartmann, A., Schloter, M. *et al.* (2001). PCR primers and functional probes for amplification and detection of bacterial genes for extracellular peptidases in single strains and in soil. *J Microbiol Methods*, 44(2), 173-182. doi: S0167701200002396 [pii]
- Baker, G. C., Smith, J. J. et Cowan, D. A. (2003). Review and re-analysis of domain-specific 16S primers. *J Microbiol Methods*, 55(3), 541-555. doi: S0167701203002276 [pii]
- Banchereau, J. et Steinman, R. M. (1998). Dendritic cells and the control of immunity. *Nature*, 392(6673), 245-252. doi: 10.1038/32588
- Berges, C., Naujokat, C., Tinapp, S. *et al.* (2005). A cell line model for the differentiation of human dendritic cells. *Biochem Biophys Res Commun*, 333(3), 896-907. doi: 10.1016/j.bbrc.2005.05.171
- Blais Lecours, P., Duchaine, C., Taillefer, M. *et al.* (2011). Immunogenic properties of archaeal species found in bioaerosols. *PLoS One*, 6(8), e23326. doi: 10.1371/journal.pone.0023326
- Blais Lecours, P., Marsolais, D., Cormier, Y. *et al.* (2014). Increased prevalence of *Methanosphaera stadtmanae* in inflammatory bowel diseases. *PLoS One*, 9(2), e87734. doi: 10.1371/journal.pone.0087734
- Blais Lecours, P., Perrott, P. et Duchaine, C. (2015). Non-culturable bioaerosols in indoor settings: Impact on health and molecular approaches for detection. *Atmospheric Environment*, 110 45-53.
- Blais Lecours, P., Veillette, M., Marsolais, D. *et al.* (2014). *Archaea des bioaérosols de fermes laitières, de poulaillers et d'usines d'épuration des eaux usées : leur rôle dans l'inflammation pulmonaire*. Montréal: IRSST.
- Blais Lecours, P., Veillette, M., Marsolais, D. *et al.* (2012). Characterization of bioaerosols from dairy barns: reconstructing the puzzle of occupational respiratory diseases by using molecular approaches. *Appl Environ Microbiol*, 78(9), 3242-3248. doi: 10.1128/AEM.07661-11
- Blanchet, M. R., Israel-Assayag, E. et Cormier, Y. (2004). Inhibitory effect of nicotine on experimental hypersensitivity pneumonitis in vivo and in vitro. *Am J Respir Crit Care Med*, 169(8), 903-909. doi: 10.1164/rccm.200210-1154OC
- Blanco, P., Palucka, A. K., Pascual, V. *et al.* (2008). Dendritic cells and cytokines in human inflammatory and autoimmune diseases. *Cytokine Growth Factor Rev*, 19(1), 41-52. doi: 10.1016/j.cytogfr.2007.10.004
- Davies, C., McConnell, M., Slobbe, L. *et al.* (2005). Murine antigen-presenting cells are multifunctional in vitro biosensors for detecting the immunoactive potential of bovine milk products. *J Nutr*, 135(11), 2651-2656. Tiré de <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16251625>
- Dearman, R. J., Cumberbatch, M., Maxwell, G. *et al.* (2009). Toll-like receptor ligand activation of murine bone marrow-derived dendritic cells. *Immunology*, 126(4), 475-484. doi: 10.1111/j.1365-2567.2008.02922.x

- Delayre-Orthez, C., de Blay, F., Frossard, N. *et al.* (2004). Dose-dependent effects of endotoxins on allergen sensitization and challenge in the mouse. *Clin Exp Allergy*, 34(11), 1789-1795. doi: 10.1111/j.1365-2222.2004.02082.x
- Donham, K. J., Lange, J. L., Kline, A. *et al.* (2011). Prevention of occupational respiratory symptoms among certified safe farm intervention participants. *J Agromedicine*, 16(1), 40-51. doi: 10.1080/1059924X.2011.532761
- Douwes, J., Thorne, P., Pearce, N. *et al.* (2003). Bioaerosol health effects and exposure assessment: progress and prospects. *Ann Occup Hyg*, 47(3), 187-200. Tiré de <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12639832>
- Du, B., Lin, C., Bian, Z. *et al.* (2015). An insight into anti-inflammatory effects of fungal beta-glucans. *Trends in Food Science & Technology*, 41(1), 49-59.
- Dybwad, M., Granum, P. E., Bruheim, P. *et al.* (2012). Characterization of airborne bacteria at an underground subway station. *Appl Environ Microbiol*, 78(6), 1917-1929. doi: 10.1128/AEM.07212-11
- Dybwad, M., Skogan, G. et Blatny, J. M. (2014a). Comparative testing and evaluation of nine different air samplers: end-to-end sampling efficiencies as specific performance measurements for bioaerosol applications. *Aerosol Science and Technology*, 48(3), 282-295.
- Dybwad, M., Skogan, G. et Blatny, J. M. (2014b). Temporal variability of the bioaerosol background at a subway station: concentration level, size distribution, and diversity of airborne bacteria. *Appl Environ Microbiol*, 80(1), 257-270. doi: 10.1128/AEM.02849-13
- Eduard, W., Heederik, D., Duchaine, C. *et al.* (2012). Bioaerosol exposure assessment in the workplace: the past, present and recent advances. *J Environ Monit*, 14(2), 334-339. doi: 10.1039/c2em10717a
- Gendron, D., Lemay, A. M., Tremblay, C. *et al.* (2015). Treatment with a sphingosine analog after the inception of house dust mite-induced airway inflammation alleviates key features of experimental asthma. *Respir Res*, 16 7. doi: 10.1186/s12931-015-0180-z
- Gilbert, Y., Veillette, M., Meriaux, A. *et al.* (2010). Metalworking fluid-related aerosols in machining plants. *J Occup Environ Hyg*, 7(5), 280-289. doi: 10.1080/15459621003680227
- Goyer, N., Lavoie, J., L., L. *et al.* (2001). *Les bioaérosols en milieu de travail : guide d'évaluation, de contrôle et de prévention*. Montréal: IRSST.
- Greskevitch, M., Kullman, G., Bang, K. M. *et al.* (2007). Respiratory disease in agricultural workers: mortality and morbidity statistics. *J Agromedicine*, 12(3), 5-10. Tiré de <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19042666>
- Heederik, D. et Jeroen, D. (1997). Towards an occupational exposure limit for endotoxins. *Annals of agricultural and environmental medicine*, 4 17-19.
- Heederik, D., Sigsgaard, T., Thorne, P. S. *et al.* (2007). Health effects of airborne exposures from concentrated animal feeding operations. *Environ Health Perspect*, 115(2), 298-302. doi: 10.1289/ehp.8835

- Huppe, C. A., Blais Lecours, P., Lechasseur, A. *et al.* (2017). A sphingosine-1-phosphate receptor 1 agonist inhibits tertiary lymphoid tissue reactivation and hypersensitivity in the lung. *Mucosal Immunol*. doi: 10.1038/mi.2017.37
- Inaba, K., Inaba, M., Romani, N. *et al.* (1992). Generation of large number of dendritic cells from mouse bone marrow cultures supplemented with granulocyte/macrophage colony-stimulating factor. 176 1693-1702.
- Inaba, K., Inaba, M., Romani, N. *et al.* (1992). Generation of large numbers of dendritic cells from mouse bone marrow cultures supplemented with granulocyte/macrophage colony-stimulating factor. *J Exp Med*, 176(6), 1693-1702. Tiré de <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1460426>
- Ito, T., Wang, Y. H., Duramad, O. *et al.* (2005). TSLP-activated dendritic cells induce an inflammatory T helper type 2 cell response through OX40 ligand. *J Exp Med*, 202(9), 1213-1223. doi: 10.1084/jem.20051135
- Jacobson, J. R., Barnard, J. W., Grigoryev, D. N. *et al.* (2005). Simvastatin attenuates vascular leak and inflammation in murine inflammatory lung injury. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 288(6), L1026-1032. doi: 10.1152/ajplung.00354.2004
- Johnston, C., Ufnar, J. A., Griffith, J. F. *et al.* (2010). A real-time qPCR assay for the detection of the nifH gene of *Methanobrevibacter smithii*, a potential indicator of sewage pollution. *J Appl Microbiol*, 109(6), 1946-1956. doi: 10.1111/j.1365-2672.2010.04824.x
- Jonuleit, H., Knop, J. et Enk, A. H. (1996). Cytokines and their effects on maturation, differentiation and migration of dendritic cells. *Arch Dermatol Res*, 289(1), 1-8. Tiré de <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9017128>
- Kirkhorn, S. R. et Garry, V. F. (2000). Agricultural lung diseases. *Environ Health Perspect*, 108 Suppl 4 705-712. Tiré de <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10931789>
- Krauter, P. et Stetzenbach, L. D. (2016). Introduction to Aerobiology. Dans M. V. Yates (Édit.), *Manual of Environmental Microbiology* (Fourth Edition<sup>e</sup> éd.). Washington, DC: American Society for Microbiology Press.
- Langenkamp, A., Messi, M., Lanzavecchia, A. *et al.* (2000). Kinetics of dendritic cell activation: impact on priming of TH1, TH2 and nonpolarized T cells. *Nat Immunol*, 1(4), 311-316. doi: 10.1038/79758
- Larsson, K. A., Eklund, A. G., Hansson, L. O. *et al.* (1994). Swine dust causes intense airways inflammation in healthy subjects. *Am J Respir Crit Care Med*, 150(4), 973-977. doi: 10.1164/ajrccm.150.4.7921472
- Lavoie, J., Godbout, S., Lemay, S. P. *et al.* (2009). Impact of in-barn manure separation on biological air quality in an experimental setup identical to that in swine buildings. *J Agric Saf Health*, 15(3), 225-240. Tiré de <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19728546>
- Letourneau, V., Meriaux, A., Goyer, N. *et al.* (2010). Biological activities of respirable dust from Eastern Canadian peat moss factories. *Toxicol In Vitro*, 24(4), 1273-1278. doi: 10.1016/j.tiv.2010.03.019
- Liebers, V., Stubel, H., Duser, M. *et al.* (2009). Standardization of whole blood assay for determination of pyrogenic activity in organic dust samples. *Int J Hyg Environ Health*, 212(5), 547-556. doi: 10.1016/j.ijheh.2009.03.003

- Liu, S., Tran, K. K., Pan, S. *et al.* (2009). Detecting and differentiating microbes by dendritic cells for the development of cell-based biosensors. *Biosens Bioelectron*, 24(8), 2598-2603. doi: 10.1016/j.bios.2009.01.017
- Lutz, M. B., Kukutsch, N., Ogilvie, A. L. *et al.* (1999). An advanced culture method for generating large quantities of highly pure dendritic cells from mouse bone marrow. *J Immunol Methods*, 223(1), 77-92. Tiré de <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10037236>
- Malmberg, P. et Larsson, K. (1993). Acute exposure to swine dust causes bronchial hyperresponsiveness in healthy subjects. *Eur Respir J*, 6(3), 400-404. Tiré de <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8472831>
- Malo, J. L., Chretien, P., McCants, M. *et al.* (1997). Detection of snow-crab antigens by air sampling of a snow-crab production plant. *Clin Exp Allergy*, 27(1), 75-78. Tiré de <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9117885>
- Matute-Bello, G., Downey, G., Moore, B. B. *et al.* (2011). An official American Thoracic Society workshop report: features and measurements of experimental acute lung injury in animals. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 44(5), 725-738. doi: 10.1165/rcmb.2009-0210ST
- Matute-Bello, G., Frevert, C. W. et Martin, T. R. (2008). Animal models of acute lung injury. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 295(3), L379-399. doi: 10.1152/ajplung.00010.2008
- May, S., Romberger, D. J. et Poole, J. A. (2012). Respiratory health effects of large animal farming environments. *J Toxicol Environ Health B Crit Rev*, 15(8), 524-541. doi: 10.1080/10937404.2012.744288
- Mayeux, P. R. (1997). Pathobiology of lipopolysaccharide. *J Toxicol Environ Health*, 51(5), 415-435. doi: 10.1080/00984109708984034
- Mitchell, D., Yong, M., Schroder, W. *et al.* (2010). Dual stimulation of MyD88-dependent Toll-like receptors induces synergistically enhanced production of inflammatory cytokines in murine bone marrow-derived dendritic cells. *J Infect Dis*, 202(2), 318-329. doi: 10.1086/653499
- Napolitani, G., Rinaldi, A., Bertoni, F. *et al.* (2005). Selected Toll-like receptor agonist combinations synergistically trigger a T helper type 1-polarizing program in dendritic cells. *Nat Immunol*, 6(8), 769-776. doi: 10.1038/ni1223
- Narita, K., Ishii, Y., Vo, P. T. H. *et al.* (2018). Improvement of human cell line activation test (h-CLAT) using short-time exposure methods for prevention of false-negative results. *J Toxicol Sci*, 43(3), 229-240. doi: 10.2131/jts.43.229
- Nehme, B., Gilbert, Y., Letourneau, V. *et al.* (2009). Culture-independent characterization of archaeal biodiversity in swine confinement building bioaerosols. *Appl Environ Microbiol*, 75(17), 5445-5450. doi: 10.1128/AEM.00726-09
- Nehme, B., Letourneau, V., Forster, R. J. *et al.* (2008). Culture-independent approach of the bacterial bioaerosol diversity in the standard swine confinement buildings, and assessment of the seasonal effect. *Environ Microbiol*, 10(3), 665-675. doi: 10.1111/j.1462-2920.2007.01489.x

- Piirila, P., Hodgson, U., Estlander, T. *et al.* (2002). Occupational respiratory hypersensitivity in dental personnel. *Int Arch Occup Environ Health*, 75(4), 209-216. doi: 10.1007/s00420-001-0302-4
- Poole, J. A. et Romberger, D. J. (2012). Immunological and inflammatory responses to organic dust in agriculture. *Curr Opin Allergy Clin Immunol*, 12(2), 126-132. doi: 10.1097/ACI.0b013e3283511d0e
- Punsmann, S., Liebers, V., Stubel, H. *et al.* (2013). Determination of inflammatory responses to *Aspergillus versicolor* and endotoxin with human cryo-preserved blood as a suitable tool. *Int J Hyg Environ Health*, 216(4), 402-407. doi: 10.1016/j.ijheh.2012.11.001
- Reysenbach, A.-L. et Pace, N. R. (1995). *Archaea: A Laboratory Manual-Thermophiles*. New York: Cold Spring Harbour Laboratory Press.
- Schaumberger, S., Ladinig, A., Reisinger, N. *et al.* (2014). Evaluation of the endotoxin binding efficiency of clay minerals using the *Limulus* Amebocyte lysate test: an in vitro study. *AMB Express*, 4(1), 1. doi: 10.1186/2191-0855-4-1
- Shortman, K. et Liu, Y. J. (2002). Mouse and human dendritic cell subtypes. *Nat Rev Immunol*, 2(3), 151-161. doi: 10.1038/nri746
- Syme, R. et Gluck, S. (2001). Generation of dendritic cells: role of cytokines and potential clinical applications. *Transfus Apher Sci*, 24(2), 117-124. Tiré de <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11501570>
- Szarka, R. J., Wang, N., Gordon, L. *et al.* (1997). A murine model of pulmonary damage induced by lipopolysaccharide via intranasal instillation. *J Immunol Methods*, 202(1), 49-57. Tiré de <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9075771>
- Tang, X. D., Shi, L., Monsel, A. *et al.* (2017). Mesenchymal Stem Cell Microvesicles Attenuate Acute Lung Injury in Mice Partly Mediated by Ang-1 mRNA. *Stem Cells*. doi: 10.1002/stem.2619
- Thorne, P. S., Duchaine, C. et Blais Lecours, P. (2016). Airborne Bacteria, Archaea, and Endotoxin. Dans M. V. Yates (Édit.), *Manual of Environmental Microbiology* (Fourth Edition<sup>e</sup> éd.). Washington, DC: American Society of Microbiology Press.
- Tsukumo, H., Matsunari, N., Yamashita, K. *et al.* (2018). Lipopolysaccharide interferes with the use of the human Cell Line Activation Test to determine the allergic potential of proteins. *J Pharmacol Toxicol Methods*, 92 34-42. doi: 10.1016/j.vascn.2018.02.003
- United States Environmental Protection Agency. (2014). *EPA Technology for Mold Identification and Enumeration; Microbiological and Chemical Exposure Assessment*. EPA
- Vermaelen, K. et Pauwels, R. (2005). Pulmonary dendritic cells. *Am J Respir Crit Care Med*, 172(5), 530-551. doi: 10.1164/rccm.200410-1384SO
- Weifeng, Y., Li, L., Yujie, H. *et al.* (2016). Inhibition of Acute Lung Injury by TNFR-Fc through Regulation of an Inflammation-Oxidative Stress Pathway. *PLoS One*, 11(3), e0151672. doi: 10.1371/journal.pone.0151672
- Weytjens, K., Cartier, A., Malo, J. L. *et al.* (1999). Aerosolized snow-crab allergens in a processing facility. *Allergy*, 54(8), 892-893. Tiré de <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10485396>



## ANNEXE A : OPTIMISATION DES CONDITIONS DE CULTURE DES CELLULES DENDRITIQUES

Les méthodes de culture de cellules dendritiques sont variées et hétérogènes. Dans le but de maximiser la plage dynamique des essais, il a d'abord été nécessaire de standardiser une méthode permettant d'obtenir une grande quantité de cellules dendritiques minimalement activées.

### A.I Choix des cellules

Différentes sources de cellules dendritiques ont d'abord été testées. En effet, l'activation des cellules dendritiques murines (souris C57Bl/6) différenciées à partir de la moelle osseuse (utilisées dans le présent projet) (Inaba, K. *et al.*, 1992; Lutz *et al.*, 1999) a été comparée à celle d'une lignée cellulaire humaine (THP-1) disponible commercialement. Malgré la meilleure « transférabilité » des résultats à l'humain des cellules THP-1, la plage dynamique d'activation de ces cellules n'offrait pas assez de modulation à la suite d'une stimulation allant de 1 ng/ml à 100 ng/ml d'endotoxines pour les marqueurs CMH II et CD86. De plus, seulement 10 à 25 % des cellules étaient positives pour les marqueurs CD11b et CD11c retrouvés sur les cellules dendritiques par rapport à 70 pour les cellules dérivées de la moelle osseuse murine.

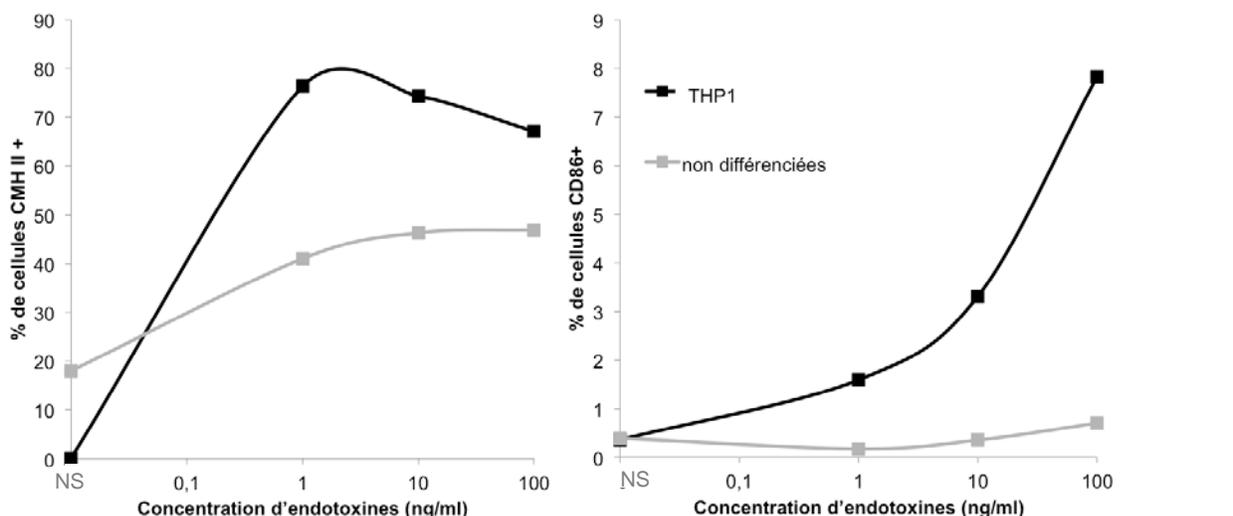


Figure A-1 : Cellules THP-1 stimulées des doses croissantes d'endotoxines (LPS).

### A.II Conditions de culture

Une variété de conditions pouvant influencer les niveaux d'activation de base des cultures cellulaires a été testée, dont la densité cellulaire, la durée de stimulation des cellules, les types de pétris et de plaques et les lots de sérum fœtal bovin utilisés. Les conditions sélectionnées sont celles selon lesquelles les cultures ont présenté une faible expression de molécules d'activation de manière basale, mais qui permettaient l'observation d'une forte augmentation de l'expression des marqueurs de maturation en réponse à une dose de 1 µg/ml d'endotoxines (Lutz *et al.*, 1999).

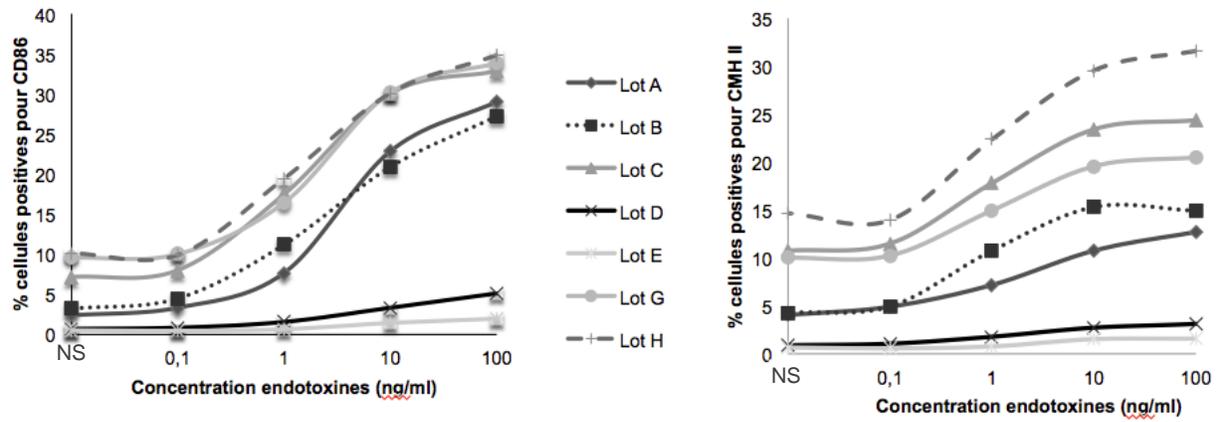


Figure A-2 : Le lot de FBS affecte la capacité de maturation des cellules dendritiques en réponse aux endotoxines.