

Lente translocation des particules biopersistantes CCL2-dépendante du muscle au cerveau

Zakir Khan, Christophe Combadière 1,2, 3,4,5 François-Jérôme Authier, 1,2,6 Valérie Itier, 1,2,11 François Lux, Christopher Exley 7,8, 9 Meriem Mahrouf-Yorgov, 1,2,11 Xavier Decrouy, 1,2 Philippe Moretto, 10 Tillement Olivier, Romain K. Gherardi 7,8, 1,2,6 * et Josette Cadusseau 1, 2,11 *

1 Inserm, U955, Créteil, 94000, France

2 Université Paris Est, Faculté de Médecine, Créteil, 94000, France

3 Inserm, U945-S, Paris, 75013, France

4 Université Pierre et Marie Curie, Faculté de Médecine, Paris, 75013 France

5 AP-HP, Groupe Hospitalier Pitié-Salpêtrière, Service d'Immunologie, Paris, 75013, France

6 AP-HP, Hôpital H. Mondor - A. Chenevier, Service d'Histologie, Centre de Référence neuromusculaire GNMH, Créteil, 94000, France

7 UMR CNRS 5620, Laboratoire de Physico-Chimie des Matériaux luminescents, Villeurbanne, 69622, France

8 Université Claude Bernard Lyon 1, Villeurbanne, 69622, France

9 Keele University, le Centre Birchall, de Lennard-Jones Laboratories, Staffordshire, ST5 5BG, Royaume-Uni

10 UMR CNRS 5797, Centre d'Etudes Nucléaires de Bordeaux Gradignan, Gradignan, 33175, France, 11 Faculté des Sciences et Technologie, UPEC, Créteil, France.

* Contribution égale

Auteurs correspondants: josette.cadusseau@inserm.fr ; romain.gherardi@hmn.aphp.fr

Pr. Josette Cadusseau & Pr. Romain Gherardi

IMRB Team 10

8 rue du Général Sarrail

Faculté de Médecine

F-94010 France

Téléphone: 33 1 49 81 37 10

RÉSUMÉ

Sujet :

La biodistribution sur le long terme des nanomatériaux utilisés en médecine est largement inconnue. C'est le cas de l'alun, l'adjuvant vaccinal le plus largement utilisé, qui est un composé nanocristallin qui forme spontanément des agglomérats micron/submicroniques. Bien que généralement bien toléré, l'alun est parfois détecté dans la lignée des cellules monocytes longtemps après la vaccination sans doute chez les personnes sensibles avec des réactions systémiques/neurologiques et des manifestations auto-immunes (inflammatoires), tel le syndrome induit par les adjuvants (ASIA).

Méthodes:

Sur la base des enquêtes préliminaires faites auprès de 252 patients atteints du syndrome Asia associé à l'alun montrant à la fois une augmentation sélective de la circulation de CCL2, le facteur chimiotactique majeur des monocytes, et une variation dans le gène CCL2, nous avons conçu des expériences sur des souris pour évaluer la biodistribution de l'aluminium dérivé des vaccins et de

substituts de particules fluorescentes d'alun injectées dans le muscle.

L'aluminium est détecté dans les tissus par coloration Morin et PIXE (Particle Induced X-ray Emission). Des billes de latex fluorescentes de 500nm et des vaccins nanohybrides d'alun aggloméré composés d'un noyau de rhodamine et d'une couche d'hydroxyde d'aluminium (Al-Rho) ont été utilisés.

Résultats:

L'injection intramusculaire d'un vaccin contenant l'alun a été associée à l'apparition de dépôts d'aluminium dans des organes éloignés tels que la rate et le cerveau où ils étaient encore détectés un an après l'injection. Les deux matériaux fluorescents injectés dans le muscle ont été transportés vers les ganglions lymphatiques (DLNS) et par la suite ont été détectés associés aux phagocytes dans le sang et la rate. Les particules accumulées linéairement dans le cerveau jusqu'à 6 mois après le début de l'étude, se trouvent d'abord dans les cellules périvasculaires CD11b + et ensuite dans la microglie et les autres cellules nerveuses.

L'ablation du ganglion ? réduit considérablement la biodistribution.

La translocation cérébrale n'a pas été observée directement après l'injection intraveineuse, mais est significativement augmentée chez les souris avec une barrière hémato-encéphalique chroniquement altérée. Le gain ou la perte de fonctions montrent toujours une implication des CCL2 dans la diffusion systémique des particules d'Al-Rho capturées par les monocytes, et ensuite dans le système neurologique. L'injection de particules stéréotaxiques a souligné la rétention par le cerveau comme un facteur de l'accumulation progressive des particules.

Conclusion:

Les nanomatériaux peuvent être transportés par les cellules de la lignée des monocytes vers les ganglions lymphatiques, le sang et la rate, et, pareillement au VIH, pourraient utiliser les CCL2 afin de pénétrer dans le cerveau. Cela se produit à très faible dose dans des conditions normales expliquant la bonne tolérance globale de l'alun en dépit de son fort potentiel neurotoxique. Cependant, l'augmentation continue des doses de cet adjuvant très peu biodégradable dans la population peut devenir insidieusement dangereuse, notamment en cas de sur-immunisation ou de barrière hémato-encéphalique immature ou altérée ou constitutive à une production élevée de CCL-2.

Fond :

Les nanomatériaux ont diverses applications médicales innovantes, y compris l'administration de médicaments et de gènes, l'imagerie par fluides contrastés, les antimicrobiens, les outils de chirurgie et dans les vaccins [1]. En raison du nombre croissant de nouveaux composés et formulations, les données sur leur biodistribution, la persistance et la toxicité spécifique font généralement défaut [1], et des précisions sur la façon dont le corps réagit à ces petites particules, en particulier celles qui interagissent avec les cellules immunitaires [2] est un besoin urgent. Une fois définis, ces mécanismes de base qui régissent les interactions hôte-particules devraient être intégrés avec des propriétés spécifiques des nanomatériaux (taille, forme, surface, et la solubilité) afin de permettre les prédictions de leurs effets bénéfiques ou néfastes.

L'utilisation de nanomatériaux dans le corps humain n'est pas aussi contemporain qu'il a été récemment dépeint. Pendant des décennies, l'alun, un composé nanocristallin formé d'oxyhydroxyde d'aluminium, a été l'adjuvant le plus couramment utilisé dans les vaccins. Le mécanisme par lequel il stimule la réponse immunitaire n'est pas complètement compris [3]. Alors que l'alun est généralement bien toléré, il est parfois rapporté comme étant la cause de problèmes de santé invalidants chez des personnes présentant des facteurs de susceptibilité mal définis [4,5,6]. Les manifestations cliniques attribuées à l'alun sont paradigmatiques du syndrome auto-immun /

inflammatoire (ASIA) induit par les adjuvants, un syndrome également observé chez les patients exposés à un gel de silicone [7]. Ils comprennent l'apparition retardée de myalgies diffuses [4], de fatigue chronique [8], et de dysfonctionnement cognitif stéréotypée [9]. La persistance de l'alun chargé dans les macrophages est généralement détectée dans les sites d'injections précédents (jusqu'à > 12 ans), ce qui entraîne un granulome spécifique appelé myofasciite à macrophages ou MMF [4]. Bien que la biopersistance des adjuvants est a priori indésirable, la signification exacte de celle-ci fait encore l'objet de débats puisque la biodistribution des particules biodégradables lentement après injection dans le muscle est actuellement inconnue.

Il semble y avoir un juste équilibre entre l'efficacité de l'adjuvant d'alun et sa toxicité potentielle, et il semble que ceux-ci peuvent être d'un seul et même effet [3]. A la fois l'efficacité et la toxicité potentielle de l'alun sera influencée par le fait que le nanomatériau bioactif reste localisée aux points d'injection ou plutôt se disperse et s'accumule dans les organes et les tissus éloignés. Une étude de référence sur la base de l'isotope Al26 ont montré une pauvre émission de l'AL26 dans les urines (6%) jusqu'au jour 28 (J28) dernier jour d'observations après l'injection intramusculaire d'alun isotopique chez les lapins, et une forme inconnue d'Al 26 a été détectée, dans les ganglions lymphatiques, la rate, le foie et le cerveau [10]. L'oxyhydroxyde d'aluminium est un composé de particules d'agrégats micron/submicroniques de taille nanométrique (environ 13 nm) et on pensait d'abord que ces agrégats restaient dans le milieu extra cellulaire jusqu'à ce que leur solubilisation complète dans les liquides interstitiels [10]. Nous savons maintenant que l'opposé arrive et que les cellules présentatrices d'antigènes (APC) prennent les particules d'alun avec avidité. [11], et, dans la pratique, deviennent des cellules à longue durée de vie [12], et empêchent la solubilisation de l'alun [4,13,14].

Les monocytes inflammatoires (MO) sont attirés dans le muscle par des signaux de danger par l'intermédiaire d'une protéine chimiotactique des monocytes-1 (MCP-1) / à commande du mécanisme chimiokine (CC motif) ligand 2 (CCL2), devenant des macrophages (MP) et des cellules dendritiques dérivées MO (CD), avant de migrer vers les ganglions lymphatiques drainants (DLNS) [15]. Une des fonctions de migration PED est de transférer du matériel antigénique vers un vaste réseau de résidents éloignés d'APC [16]. De plus, les injections d'alun induisent à elles seules des changements importants liés à l'activation du système immunitaire inné dans des organes éloignés [17]. Par conséquent, nous avons examiné si les nanomatériaux injectés dans le muscle pourrait subir une translocation vers des organes éloignés dans le cadre d'un mécanisme général lié à la phagocytose et à la signalisation CCL2/MCP-1.

Méthodes

Modèles de souris :

Toutes les expériences animales ont été menées en conformité avec les directives européennes pour les soins aux animaux. Pour faciliter les enquêtes mécanistes de la biodistribution des particules, les souris avec les gènes B57/B6, qui sont utilisées pour générer des modèles génétiquement manipulées, ont été préférées à d'autres souches de souris plus sensibles aux toxiques.

Des mâles de 8-10 semaines C57BL / 6 souris mdx (avec barrière hémato-encéphalique altérée), CX3CR1 GFP / + (avec l'insertion du gène rapporteur GFP permettant la visualisation de la microglie), et CCL2 ont été utilisés (Jackson, West Grove, PA). Les souris ont été protégées contre les matériaux contenant de l'aluminium, nourris avec des aliments préparés pour animaux et de l'eau ad libitum, et exposé à des cycles lumière/obscurité 12/12. Les expériences utilisant des particules fluorescentes ont été extrêmement laborieuses et coûteuse à réaliser. Elles ont toutes été effectuées en triple. L'homogénéité des résultats a rendu inutile l'utilisation de plus de 3 souris par point.

L'administration d'alun :

La dose d'alun contenue dans le vaccin administré aux souris a été calibrée pour imiter le nombre

moyen de doses reçus par les patients MMF. Une dose de vaccin anti-hépatite B contient 0,5 mg d'Al conformément à la feuille de données du produit. Basé sur une moyenne de poids du corps humain de 60 kg (la plupart des patients étant des femmes), le montant reçu pour chaque vaccination est de 8.33µg/kg. La conversion allométrique de l'homme à la souris (Conseils de la FDA 5541) donne un montant final d'environ 100µg/kg. 36µL de vaccin, ce qui correspond à 18µg d'Al, a été injecté pour imiter l'effet cumulatif des doses de 5,2 induit à l'homme à 35g souris (la moyenne poids à la midtime d180 de l'analyse du cerveau). Cette dose représente l'équivalent de 6,8 doses de l'homme dans le jeune animal (27g poids corporel, 11 semaines d'âge au moment du sacrifice) et de 4,3 dans la plus ancienne (42g à 62 semaines).

Spectrométrie d'absorption atomique avec four :

Les concentrations en Al ont été déterminées dans les muscles du jambier antérieur et le cerveau entier séchés à 37 °C et digéré avec du HNO₃ concentré (14 mol / L). Les résumés ont été mis à refroidir avant dilution à 10% HNO₃ avec une eau ultra-pure.

L'aluminium total dans chaque produit de digestion a été mesurée par THGA GFAAS, et les résultats ont été exprimés en poids du tissu Al mg/g de matière sèche.

PIXE :

Comme dans des conditions normales l'Al peut être détecté avec des variations interindividuelles marquées dans les tissus, de novo l'incorporation d'aluminium à des doses trop faibles ne provoque pas de changements facilement détectables lorsque les approches conventionnelles mondiales sont utilisées [10]. Ici, nous avons utilisé la méthode PIXE, une procédure qui analyse les radiations émises par l'interaction d'un faisceau de protons avec la matière [19], pour détecter les zones renfermant des petites taches Al. des sections d'épaisseur 20 µm

Soigneusement protégé contre l'environnement l'Al a été monté sur des films Formvar frais, conservés dans le cryostat pendant 6h et stocké dans un gel de silice. Les ions minéraux et les métaux ont été détectés à l'aide de la microsonde nucléaire du Centre d'Etudes Nucléaires de Bordeaux-Gradignan. Un faisceau de protons de 1 MeV centré verticalement à l'endroit de 2 µm était au hasard numérisé sur des coupes multiples de tissus de champs 500x500µm. Dans le cas d'un signal d'Al, un nouveau test de 100x100µm de cette zone d'intérêt était réalisée.

Les analyses PIXE et Rutherford par spectrométrie de rétrodiffusion ont été simultanément employées et les résultats quantitatifs ont été calculés, comme décrit précédemment [19]. Les points d'Al ont été considérés comme éligibles sur 3 critères: une taille de plus de 3 pixels (c'est à dire au-dessus du bruit de fond), un dépôt non colocalisé avec du Si, et un dépôt entouré d'un halo arrondi d'intensité diminuée (les caractéristiques limitant la confusion qui aurait pu être due à la contamination par la poussière externe qui aurait traversée malgré les procédures de protection).

Synthèse des particules d'Al-Rho :

Les nanohybrides d'oxyde de gadolinium avec une couche d'Al (OH)₃ ont été obtenus en trois étapes: (i) premièrement des nanoparticules d'oxyde de gadolinium ont été synthétisées, (ii) la croissance de la coquille de polysiloxane a ensuite été induite par hydrolysiscondensation de précurseurs appropriés de silane en présence des nanoparticules, et (iii) les nanohybrides étaient revêtue par l'addition d'une couche de nitrate d'aluminium et de sodium dans des conditions stoechiométriques.

Produits chimiques :

Hexahydraté chlorure de gadolinium ($[\text{GdCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}]$, 99,99%), de l'hydroxyde de sodium (NaOH, 99,99%), tétraéthyle orthosilicate ($\text{Si}(\text{OC}_2\text{H}_5)_4$, TEOS, 98%), (3-aminopropyl) triéthoxysilane ($\text{H}_2\text{N}(\text{CH}_2)_3\text{-Si}(\text{OC}_2\text{H}_5)_3$, APTES, 99%), triéthylamine (TEA, 99,5%), la rhodamine B isothiocyanate (RBITC), nonahydrate de nitrate d'aluminium ($\text{Al}(\text{NO}_3)_3 \cdot 9\text{H}_2\text{O}$, réactif ACS $\geq 98\%$) et le diméthylsulfoxyde (DMSO, 99,5%) ont été achetés chez Sigma-Aldrich (St Louis, MO). Le diéthylène glycol (DEG, 99%) a été acheté chez SDS Carlo Erba (France).

Préparation de base d'oxyde de gadolinium :

Une première solution a été préparée en dissolvant $[\text{GdCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}]$ (0,56 g) dans 50 ml de DEG (diéthylèneglycol) à la température ambiante. Une seconde solution a été préparée en ajoutant une solution de NaOH (0,49mL, 10M) dans 50 mL DEG. La deuxième solution était progressivement ajoutée à la première, à la température ambiante, pendant 15 heures. Un colloïde transparent de nanoparticules d'oxyde de gadolinium de DEG a été obtenu.

Encapsulation de Gd_2O_3 par Polysiloxane Shell :

105 μL d'APTES et 67 μL de TEOS ont été ajoutés à 100 ml de la solution de la nanoparticule d'oxyde de gadolinium sous agitation à 40 ° C. 5 μL d'APTES a déjà été couplé à 1mg RBITC dans le DMSO (1 ml) utilisée comme solvant et ensuite ajoutée à la solution colloïdale. Après 1h, 1,913 μL d'une solution de DEG (0,1 M de TEA, 10M de l'eau) a été ajoutée. Toute la procédure d'enrobage a été répétée complètement trois fois (avec l'ajout de plus RBITC), toutes les 24h. Le mélange final a été agité pendant 48h à 40°C. La solution obtenue peut être conservée à température ambiante pendant des semaines sans altération.

Enrobage des nanohybrides fluorescents avec une couche d'Al (OH) 3 :

2,5 ml de la solution colloïdale a été diluée par 2 pour obtenir une solution de 5 ml en DEG. 75mg de nitrate d'aluminium nonahydraté a été dissous dans 10 ml d'eau avant l'addition à la solution colloïdale. Le mélange résultant a été agité pendant 5 minutes et 4 ml d'une solution de soude (0,2 M) a été ajoutée avant d'agiter pendant 1 heure.

Purification :

La purification de Al-Rho a été réalisée par filtration tangentielle sur membranes de filtration Vivaspin (MWCO = 10 kDa) achetées auprès de Sartorius Stedim Biotech (France). La solution colloïdale a été introduite dans des tubes de 20 ml, Vivaspin et centrifugée à 4100rpm. Cette étape a été répétée à plusieurs reprises, par le remplissage des tubes avec de l'eau et centrifugée à nouveau, jusqu'à ce que le niveau de purification souhaité soit atteint (≥ 100). La solution colloïdale purifiée a été lyophilisée pour le stockage dans 5 boîtes à pilules, en utilisant un lyophilisateur Christ Alpha 1-2. Le composé contenait 4 μg Al par μL d'Al-Rho en suspension.

La transmission de la commande par microscopie électronique a montré des particules non fibreuses d'environ 10 nm, typiques d'hydroxyde d'aluminium (de l'alun traditionnel précipité). De même que pour le vaccin à l'alun, ils ont formé des agglomérats de particules submicroniques/micronique. Les propriétés immunologiques de tels précipités traditionnels de protéines d'alun sont assez semblables à ceux de l'adjuvant de référence approuvé par la FDA (Al oxyhydroxyde: AlhydrogelR) et différent des autres formulations non autorisés pour la consommation humaine (18).

Injections périphériques de nanomatériaux fluorescents :

Deux types de nanomatériaux fluorescents ont été utilisés: des billes d'exploration polychromes de latex fluorescentes (500nm fluorosphères, Polysciences, PA), et de confirmation de nanohybrides

d'Al-Rho construit avec un noyau contenant de la rhodamine et un enrobage d'Al (OH) ₃. Les FLB ont été utilisées en premier, car elles offrent plusieurs caractéristiques qui facilitent leur détection dans les tissus, y compris une forte fluorescence, l'allure sphérique et la taille homogène. Cela nous a permis de dégager une image de ce qui se passait en termes de biodistribution de ces particules avidement phagocytées.

Les particules d'Al Rho étaient moins fluorescentes, et plus hétérogènes dans la forme et dans la taille des FLB, mais représentaient mieux les substituts d'adjuvant aluminiques. Presque toutes les expériences de biodistribution réalisées avec les FLB chez les souris sauvages étaient également faites avec des particules d'Al-Rho. En contraste les FLB et Al Rho étaient différenciellement utilisées chez les souris génétiquement modifiées: les FLB ont été privilégiées pour étudier la biodistribution des particules chez la souris mdx avec des altérations de barrière hémato-encéphalique et quand le marqueur GFP a été utilisé (c'est à dire des souris CX3CR1 GFP /+ avec microglie fluorescente, GFP + études BMT); les particules d'Al-Rho étaient préférées en gain/perte de CCL2/MCP-1. Les études de la fonction conçues sur la base des résultats préliminaires de l'état CCL2 des humains intolérants à l'alun.

La suspension de FLB diluée à 1:1 dans du PBS contenait $1,8 \times 10^{11}$ particules par ml. Un volume total de 40 μ L (20 pi dans chaque muscle TA) a été injecté, correspondant à un montant total de $7,2 \times 10^9$ particules. Le même volume de suspension d'Al-Rho a été injecté dans les muscles du jambier antérieur. Les souris avec PBS-injectés ont été utilisées comme témoins. Les tissus, y compris ceux des ganglions poplités et inguinaux, la rate, le cerveau et le sang ont été prélevés à des moments différents après l'injection. Trois souris (n = 3) ont été incluses dans chaque groupe à chaque point temporel pour celles avec matériaux injectés et pour les témoins.

D'autres voies d'administration ont été comparées à la norme d'injection intramusculaire, notamment l'injection sous-cutanée de 20 pi de FLB dans chaque patte arrière, et l'injection intraveineuse de 40 uL de FLB dans la veine de la queue.

Les injections cérébrales stéréotaxiques :

Les souris ont été anesthésiées avec de la kétamine et de la xylazine. La suspension d'Al-Rho (0.5 μ L) a été injectée stéréotaxiquement dans le striatum en utilisant une seringue Hamilton de 1 microlitre. La biodistribution de la solution d'Al-Rho injectée aux ganglions lymphatiques dans la région cervicale, évaluée par des coupes sériées de l'ensemble de la région cervicale et de la rate, a été comparée à la biodistribution dans les ganglions lymphatiques poplités et la rate de la même quantité d'Al-Rho injecté dans le muscle du jambier antérieur.

Le blocus de la migration physique et pharmacologique :

La prostaglandine BW245C, un agoniste des récepteurs de la PGD₂, a été utilisé pour inhiber la migration des cellules présentatrices d'antigènes comme précédemment rapporté [20]. Comme le BW-245C est actif pendant 2 jours après l'injection, le BW245C (100 nM, Cat.no.12050, Cayman Chemical, MI, USA) il a été injecté deux fois dans le muscle jambier antérieur : il a d'abord été co-injectées avec du FLB à d0 et une deuxième fois seul à d2 et les ganglions lymphatiques ont été retirés pour examen à d4. Des souris non traitées par les FLB ont été utilisées comme contrôles. Dans une autre série d'expériences les ganglions lymphatiques ont été chirurgicalement enlevés et on a injecté immédiatement des FLB dans le muscle du jambier antérieur des souris.

Expériences sur la la perte et le gain de fonction des CCL2 :

Des analyses exploratoires réalisées chez des patients MMF avec le syndrome Asia (voir la section d'information supplémentaire) a donné un signal CCL2 sous forme de : (1) augmentation sélective de CCL2 dans le sérum des patients MMF par rapport aux patients sains de contrôles, et (2) un

haplotype donné dans le gène CCL2 avait tendance à être plus fréquente chez les patients avec MMF que dans la population en général. Ces résultats nous ont incités à utiliser des modèles de souris pour étudier le rôle de CCL2 dans la biodisposition de matières particulaires. Les études sur la perte de CCL2 ont été réalisées à l'aide de la fonction CCL2 sur des souris à qui ont fait une injection intra musculaire avec 40µL d'Al-Rho. Les expériences sur le gain de fonction des CCL2 a d'abord consisté à une co-injection intramusculaire de 10 ul murin rCCL2 (100µg/ml, R & D, MN) avec 40µL d' Al-Rho. Les ganglions lymphatiques ont été enlevés à d4, la rate, le cerveau et le sang à d21. Dans d'autres expériences du rCCL2 murin a été injecté dans le cerveau par un cathéter inséré stéréotaxiquement dans le striatum à d7 post-Al-Rho, alimenté par une micro-pompe osmotique implanté en sous-cutané dans le cou (0.25µL / h Alzet kit de perfusion cerveau Charles River, France). Des rCCL2 ont été perfusées pendant 14 jours (180pg/day taux de diffusion), avec ou sans injection intra musculaire de rCCL2 concomitante avec l' injection d'Al-Rho. À j21 après l'injection d'Al-Rho, les animaux ont été sacrifiés et le sang et les tissus ont été prélevés. Pour les contrôles, des pompes osmotiques remplis avec une solution tampon de phosphate de sodium (PBS) ont été utilisées.

Préparation des tissus et comptage de particules :

Les souris sous anesthésie terminale ont reçues une perfusion transcardiaque avec du PBS suivie par du paraformaldéhyde (PFA) à 4% glacé dans un tampon phosphate à 0,1 M. Les tissus et organes ont été enlevés, post-fixe en PFA pour 4 heures à 4 °C, plongé pendant une nuit à 4 °C dans une solution de saccharose à 30%, et rapidement congelé. Les cerveaux entiers ont été coupé en série de cryosections coronales de 40 µm, la rate et les muscles en 20 µm et les ganglions lymphatiques en 10 µm, et stockés à -20 °C jusqu'au comptage des particules ou le traitement. Les coupes de cerveau ont été déposées successivement sur 10 différentes tranches de SuperfrostR pour obtenir 10 séries identiques, ce qui a permis la détermination de la teneur totale en particules en multipliant par 10 le nombre de particules dans une série. Une approche similaire a été utilisée pour les ganglions lymphatiques et la rate. Le sang a été recueilli par ponction cardiaque et 100 pi ont été enduit pour le comptage des particules.

L'immunohistochimie et la coloration Morin :

L'immunomarquage a été effectué à l'aide d'anticorps commerciaux primaires utilisés en routine dans le laboratoire, soulevés contre CD11b (1/200, AbD Serotec, Oxford, Royaume-Uni), F4/80 (1/50, Abcam, Cambridge, Royaume-Uni), GFAP (1/200, DakoCytomation, France), la vimentine (1/500 DakoCytomation, Trappes, France), le collagène IV (1/100 Millipore, Temecula, CA), NG2 (1/200, Millipore, Molsheim, France), MAP2 (1/100, Sigma-Aldrich, Lyon, France), et IL1β (1/100, Abcam, Souris Paris, France) ou non spécifiques IgG (Jackson ImmunoResearch, Suffolk, Royaume-Uni). Puis, des anticorps anti-rat et anti-lapin biotinylés(1/200, Vector Laboratories, Paris, France) ont été utilisés en conséquence, et révélés à l'aide de fluor 488-conjugué avec de la streptavidine d'Alexa(1/200 Invitrogen, Cergy-Pontoise, France). L'étiquetage des neurones a été fait en utilisant un neurotraceur bleu fluorescent Nissl selon les instructions du fabricant (Invitrogen). L'Al était coloré par le Morin (M4008-2G, Sigma-Aldrich) utilisé à 0,2 g dissous dans une solution constituée d'acide acétique à 0,5% dans 85% d'éthanol [21]. La formation d'un complexe fluorescent avec Al a été détecté dans une longueur d'onde d'excitation 420 nm comme une fluorescence verte intense avec une émission de caractéristique 520 nm. Notamment des nanohybrides (Gd₂O₃) de base encapsulés dans des coquilles de polysiloxane n'ont pas été positivement colorées par Morin. En revanche, lorsqu'ils sont revêtu d'Al (OH) ₃, ces particules sont fortement positives au Morin. La microscopie à fluorescence et les analyses spectrales ont été effectuées en utilisant la lumière Carl Zeiss et une microscopie confocale.

Isolement des cellules du sang et des tissus et la cytométrie en flux :

Pour l'immunophénotypage des cellules sanguines, le sang a été traité avec 100 μ l d'acide diamine éthylène tétra acétique (EDTA) et colorées avec des anticorps conjugués à de l'isothiocyanate fluorescent (FITC). Les érythrocytes ont été lysés en utilisant une solution de lyse hypotonique, puis les cellules ont été lavées avec du DMEM et triées à l'aide d'un trieur MoFlo (Beckman Coulter, Villepinte, France). Les cellules ont été extraites de tissus de souris exsangues perfusés avec du PBS. Les tissus ont été enlevés et fraîchement dissociés dans du DMEM. Les ganglions lymphatiques et la rate ont été dissociés dans du DMEM contenant 0,2% de collagénase B (Roche Diagnostics, Meylan, France) et 0,2% de trypsine-EDTA à 37 °C pendant 45 min à deux reprises. Le tissu cérébral a été dissocié dans 1% de trypsine-HBSS (Thermo Scientific HyClone du Sud, Logan, Royaume-Uni) contenant 100U/ml DNase (Roche Diagnostics). Les suspensions de cellules ont été filtrées et comptées. Les cellules CD45⁺ ou CD11b⁺ ont été isolées à l'aide de tri magnétique des cellules (MACS, Miltenyi Biotec, Paris, France) et colorées avec l'un des anticorps suivants et leurs isotypes: anti-CD11b conjugué à l'isothiocyanate de fluorescéine FITC, anti-Ly-6C (GR1) conjugué à l'isothiocyanate fluorescent (FITC), anti-CD11c conjugué au FITC (BD Bioscience-Pharmingen, San Diego, CA). Les cellules ont été triées à l'aide d'un trieur de cellules. Les populations présentant une pureté >90% ont été utilisées. Les cellules triées ont été cytopspinées et colorées au Hoechst-33342 pour le noyau. Les particules chargées de cellules ont été comptées sous Microscope à fluorescence.

Les expériences de transplantation sur la moëlle osseuse :

Les cellules de moëlle osseuse avec la protéine fluorescente verte (GFP + BM) ont été obtenues en rinçant les fémurs des souris adultes ACG-GFP et injectées retro orbitalement (1x10⁶ puissance 7 cellules par souris) aux souris de 4 semaines C57BL/6, comme décrit précédemment [15]. Les souris receveuses ont été irradiées avec 9.0Gy par jour 1 avant la transplantation, et ont été traitées par la ciprofloxacine à 10mg/kg/jour pendant 10 jours. Le chimérisme du sang > 90% a été contrôlé à 3 et 4 semaines après la transplantation.

Les analyses statistiques :

Toutes les valeurs expérimentales sont présentées comme des moyennes avec écart-type, sauf lorsque cela est indiqué. Les analyses statistiques sont utilisées non appariées de Student t-test (génotypes), p < 0,05 était considérées comme significative.

Résultats

L'injection intramusculaire des vaccins contenant de l'alun chez la souris induit un dépôt d'Al dans les tissus éloignés :

Un vaccin contenant de l'Alun (correspondant à 18 μ g 36 μ L Al) a été injecté dans les jambiers antérieurs (TA) des muscles des souris C57BL/6. Il induit une réaction inflammatoire aiguë qui s'est stabilisée après d4 sous la forme de collections d'alun typiquement chargés avec des cytoplastes chargés de grand hématoxyline + et acide périodique de Schiff + dans les enveloppes musculaires (Fig. 1 a). En parallèle, la concentration tissulaire locale d'Al déterminée par spectrométrie d'absorption atomique a diminué de 50% de l'injection à d4, puis est restée stable jusqu'en d21 (2342, 1122, et 1180 mg/g de tissu musculaire sèche, respectivement). Des particules d'Al ont en outre été localisées dans les muscles et tissus distants induites par émission de rayons X (PIXE) [19]. Le balayage aléatoire de sections de 20 μ m d'épaisseur, échantillonnées et traitées avec attention pour les protéger contre l'Al de l'environnement, a révélé d'importants signaux d'Al dans les muscles, la rate et le cerveau (Fig. 1 bc). Dans le cerveau, les traces d'Al représentaient 38, 21, et 37% des champs 500x500 μ m testés à d21, 6 mois et 12 (MO6 et MO12) après injection, respectivement (moyenne = 31,5%; n = 73 champs, la figure 1 d). La baisse à 6 mois, était soit due

à des variations interindividuelles de la manutention en aluminium ou à des problèmes liés à l'échantillonnage des proportions variables de gris et blanc d'importance dans les zones balayées au hasard (voir ci-dessous). La taille du spot varie de 1 à 14µm. À titre de comparaison, 5 souris non vaccinées ont montré seulement 7 positif dans 94 domaines testés (moyenne = 7,4%). Ces résultats ont confirmé que l'Al dérivé de l'alun peut être transporté vers, pénétrer et persister dans les tissus du cerveau [21,22,23]. Les dépôts d'Al détectés dans la rate et le cerveau pourrait avoir résultés d'une translocation soit physique des particules d'alun, ou in situ par agrégation de l'Al soluble, ou les deux.

Les fluorosphères injectées dans le muscle des souris subissent la biodistribution lymphatique et systémique :

Afin d'examiner si des particules subissent la translocation vers des sites distants, nous avons ensuite injecté des billes polychromes de latex fluorescentes (FLB). Une taille de 500 nm a été choisie comme une approximation de la taille moyenne des agglomérats d'alun observées in vivo, permettant la visualisation des FLB comme des sphères individuelles par microscopie confocale et fluorescente (résolution >200 nm). Après l'injection intra musculaire de suspension de 20 pi, les FLB ont transitoirement culminées sous forme libre dans le sang (1200 400 FCS par 100 pi) à h1. Dès 1h après l'injection, certains FLB ont également atteint les ganglions lymphatiques. L'injection intra musculaire de cellules GFP + CD45 +, soit pré-chargé avec FLB ou co-injectés avec FLB, n'a pas montré de translocation des cellules GFP + aux ganglions lymphatiques à 1 h (Données non présentées), ce qui indique dès le début une translocation de particules de cellules indépendantes des ganglions lymphatiques par drainage lymphatique du fluide interstitiel musculaire [24]. Dans les ganglions lymphatiques, cependant, la plupart des FLB étaient associées aux cellules suggérant une capture rapide par les cellules résidents dans les ganglions. Après 24h, les FLB ont été phagocytées par les CD11b + MO / MP du muscle. Les phagocytes éloignent progressivement les particules loin de l'interstice pour former des collections (fig. 2a), situées principalement dans les enveloppes du muscle à d4. Au d4, les FLB ont considérablement augmenté en d4, formant des agglomérats intracellulaires dans la zone interfolliculaire (Fig. 2 b-e). Les cellules chargées des particules extraites des ganglions lymphatiques à d4 étaient CD45 +, CD11b +, et plus souvent GR1 + / Ly6C + (69% - 81%), et CD11c +, soit avec l'intensité intermédiaire (46%) ou élevé (22%) (Fig. 2a, C, D), correspondant ainsi à des dérivées de MO-DC inflammatoire et les députés [25]. Une co-injection de FLB avec l'analogue de la prostaglandine synthétique BW245C, un composé connu pour inhiber la migration des DC [20], inhibe la translocation des FLB aux ganglions lymphatiques à d4, de 32% dans la poplitée et 69% dans les glandes inguinales, respectivement (Fig. 2f). Ceci indique un transport de particules important au sein des cellules phagocytaires, au moins en aval de la glande poplitée (RAD). Plus tard, le nombre de cellules chargées de particules et la charge dans une cellule individuelle diminuent nettement dans les ganglions (Fig. 2e). Tout en diminuant dans les ganglions, les FLB augmentent de façon spectaculaire dans la rate de d4 à d21 (Fig. 3 a, b). Comme la rate n'est pas lié aux vaisseaux lymphatiques, le transfert des particules des ganglions lymphatiques à la rate implique une sortie du système lymphatique à travers le canal thoracique et dans la circulation sanguine. Constamment, les frottis ont montré un pic en d21 de cellules CD11b chargées de FLB- dans la circulation (Fig. 3 c, d). A partir de d4, les cellules étaient associées aux FLB (Fig. 3 d). La plupart des cellules chargées de FLB dans le sang, dans les ganglions et dans la rate exposaient quelques particules et étaient GR1 + / Ly6C + (figure 3 ef). Cependant, 22 à 33% étaient des GR1-/Ly6C- dans la rate et avaient souvent des FLB > 5 incorporé, ce qui suggère la phagocytose associée à la maturation des cellules dérivée des monocytes inflammatoires [20,25,26]. Les cellules chargées de FLB avaient nettement diminuées dans la rate à d90. Bien que diminuant après d21, les cellules chargées de FLB ont été encore détectées dans le sang à d45 et d90.

L'incorporation de la fluorosphère dans le cerveau est retardée et dépend de la charge

cellulaire précédemment présente dans les périphériques et les tissus lymphoïdes :

Les particules ont été détectées dans le cerveau principalement au jour 21 après l'injection. 21 jours après l'injection intra musculaire les FLB ont augmentées progressivement dans le cerveau jusqu'au point de terminaison d90 dans la souris C57BL6 (Fig. 4 a, b) et jusqu'au point de terminaison d180 chez les souris CX3CR1 GFP / + classiquement utilisée pour étudier les microglies (Fig. 4 5 bis,). Les FLB étaient principalement dans la substance grise (82-95%), quel que soit le montant de FLB injectées (4, 10, 20 ul), vaccin de co-injection (36µL), ou post-injection de d21 à D365. Certaines des FLB ont été détectées dans les leptoméninges (9%) et dans la substance blanche (9%) à d21, mais ces localisations sont devenues rares quelques temps plus tard. Les FLB étaient <5% dans le plexus choroïde (tableau 1). La comparaison de la distribution des FLB à 3 mois , 6 mois et 12 mois ne montre aucune accumulation de premier plan des particules à n'importe quel endroit neuroanatomiques (Fig. 4c). Les FLB ont été généralement détectées dans le cerveau sous forme de particules individuelles situées à l'intérieur ou à la surface des cellules; 37 à 62% des particules peut être attribué de façon fiable à un sous-ensemble de cellules données par dépistage immunohistochimique. À j 21, les particules étaient principalement associées à périvasculaire CD11b + , mais à j 90 elles étaient également trouvées profondément dans la microglie ramifiée des CX3CR1 +(fig. 5 a). Les particules ont été détectées dans les astrocytes GFAP + les neurones marqués par Neurotrace ou MAP2 + et les cellules vimentine + leptoméningées (Fig. 5 cas), et dans les progéniteurs oligodendrogliales/péricytes NG2 + (non représentés). L'incorporation de FLB dans les microglies ramifiées GFP + dans les souris CX3CR1 GFP / + a augmenté de jusqu'à 26 fois la valeur de j 21 à j 180.

Il est important de voir que, par rapport à l'injection intra musculaire, la quantité de FLB injectées dans la veine de la queue n'a entraîné pratiquement aucune entrée cérébrale à j 21 et j 90 dans des souris C57BL6 (fig. 6 a). De plus, l'ablation des ganglions poplités et inguinaux avant l'injection des FLB dans le muscle du jambier antérieur (TA) a entraîné une réduction de 60 à 80% de l'incorporation des FLB dans le sang, la rate et les compartiments du cerveau à j21 (fig. 6 b). Ainsi, l'absorption cellulaire, dans les muscles et dans les ganglions et le trafic cellulaire ultérieur dans le sang a cruciallement contribué à retarder la translocation des particules vers la rate et le cerveau (Fig. 6 af). Systématiquement, en injectant des FLB dans le muscle des souris chimériques de la moelle osseuse GFP + (BM) obtenues par la transplantation de cellules dérivée de moelle osseuse GFP + de souris syngéniques irradiées C56B16 [15], nous avons détecté des cellules GFP + chargées de FLB dans ces organes (Fig. 7 a, b, c), et observée une incorporation tardive des cellules donatrices dérivées dans le cerveau (Fig. 7 d, e).

Ce modèle de transplantation de moelle osseuse est connue pour être associée à une altération de la barrière hémato-encéphalique (BHE) induite par irradiation.

La dystrophine chez les souris déficientes mdx ont également une barrière hémato-encéphalique chroniquement modifiée[27]. En corollaire, comparativement aux témoins de même âge, ils montrent beaucoup plus de capillaires cérébraux CD31 +, et l'augmentation spectaculaire des macrophages périvasculaires CD11b + (Fig. 6c) au détriment de la microglie ramifiée profonde. L'injection des FLB dans le muscle de souris mdx conduit à une incorporation accrue de particules dans le cerveau à la fois en j 21 et j 90, évaluée à la fois par histologie et cytopins de CD45 + / CD11b + extrait de cellules du cerveau (fig. 6 d, e, f). Ainsi, la modification de la barrière hémato-encéphalique et/ou la réponse inflammatoire associée angiogénique favorise probablement l'incorporation de cellules chargées de particules circulantes dans le cerveau.

Les nanohybrides fluorescentes recouvertes d'Al (OH) 3 subissent une diffusion systémique et une pénétration cérébrale des CCL2 dépendants :

Pour les expériences de confirmation, nous avons construit des particules fluorescentes imitant

l'alun. Les nanohybrides de Rhodamine ont été revêtues d'une manière covalente d'une couche d'Al (OH) 3. Tel qu'évalué par le marquage Morin pour l'Aluminium, ces particules d'Al-Rho ont été avidement phagocytées après l'injection intra musculaire. et ont formé des agglomérats intracellulaires de taille similaire à l'adjuvant de vaccin (fig. 8 a, b). La biodistribution de substituts d'alun fluorescent injecté dans le muscle TA était remarquablement similaire à celle des FLB (tableau 2), y compris le pic dans les ganglions lymphatiques en d4, le pic dans la rate en d21, l'entrée retardée dans le cerveau, et l'association principale avec GR1 + / Ly6C + OM dans les tissus (Fig. 8 ch). Par rapport à l'injection sous-cutanée l'injection intra musculaire de particules d'Al-Rho a été associée à un taux encore plus élevé de diffusion dans les ganglions lymphatiques, (Fig. 8 f), une constatation compatible avec la présence d'abondantes PED migrants dans la peau.

Sur la base de l'étude de l'homme SNP, nous avons effectué des expériences de fonction sur le gain et la perte des CCL2 afin d'étudier le rôle des cellules CCL2 sensibles à la diffusion des particules et neurodélivrance. L'injection de particules d'Al-Rho dans le muscle TA de souris déficientes en CCL2 a diminué l'incorporation de particules de 35% dans les glandes poplitées et de 76% dans la glande inguinale à d4, et de 71%, 85% et 82% dans la rate, le sang et le cerveau, respectivement, à d21 (Fig. 9 a). Inversement, la biodistribution des particules d'Al-Rho a augmenté dans différent gain de CCL2 dans les expériences de fonction (Fig. 9 b-d). La co-injection intra musculaire d'Al-Rho avec CCL2 murine recombinante (rCCL2: 1 pg) a augmenté l'incorporation des particules de 47% dans les poplités et 163% dans la glande inguinale (d4), et de 180% dans la rate, 274% dans le sang, et 341% dans le cerveau (d21).

Par ailleurs, ralentir l'infusion intracérébrale (IC) de CCL2 par une pompe osmotique (180 pg / jour pendant 15 jours à partir de d7 après l'injection d'Al-Rho I.M.) a augmenté l'incorporation de particules de 74% dans le cerveau à j21 par rapport à PBS contrôle. La combinaison de l'injection intra musculaire et de l'infusion intracérébrale de rCCL2 a augmenté l'incorporation des particules dans le cerveau par 539%. Malgré d'importantes variations interindividuelles, une tendance constante de CCL2 dépendante à une augmentation niveaux d'Al dans le cerveau a été détecté 21 jours après l'injection intra musculaire de 40µL d'alun contenant du vaccin (fig. 9 e). Pris dans leur ensemble, ces résultats indiquent que, après l'injection intra musculaire, des particules associées aux monocytes inflammatoires peuvent pénétrer dans le cerveau en utilisant un mécanisme dépendant de CCL2, éventuellement par le biais d'un mécanisme de cheval de Troie. Surtout, les particules d'Al-Rho accédant au cerveau après l'injection intra musculaire sont restées intactes car elles étaient encore revêtues d'Al (OH) 3 comme évaluée par coloration Morin (fig. 10 a), et PIXE (fig. 10 b). Leur incorporation dans les cellules neurales a été constamment associée à l'expression de l'IL-1β (Fig. 10 c), un marqueur fiable de particule induite NALP3 inflammasome activation [29]. Les nanohybrides fluorescentes recouvertes d'Al (OH) 3 sont retenues dans le cerveau. Une accumulation apparemment irréversible des nanomatériaux après une injection intra musculaire est unique au tissu cérébral qui manque de voies lymphatiques conventionnels et peut retenir les cellules du système immunitaire [30].

Nous avons injecté stéréotaxiquement 0.5µL d'Al-Rho dans le striatum de souris C57BL6 et compté les particules dans les ganglions cervicaux, le sang et la rate à d4 et d21.

Par rapport à la même quantité d'Al-Rho injecté dans le muscle TA, injection sous cutanée a été associée avec presque pas de translocation de particules dans les ganglions régionaux (fig. 10 D), et l'apparence de 8 fois moins de particules dans la rate (Fig. 10 e).

Puisque plus de 25 particules libres d'Al-Rho par 100 pi ont été détectées dans le sang à h1, il est probable que les rares particules ensuite détectées dans la rate reflète le passage des particules directement dans le sang pendant l'injection intra cérébrale. Il semble donc que le manque de recirculation a probablement contribué à l'accumulation progressive de particules dans le cerveau.

Discussion :

Les particules injectées dans le circuit intra musculaire ou sous cutané ont eu accès à des tissus éloignés. Les particules de latex et d'Al-Rho ont montré une biodistribution très similaires, ce qui suggère un mécanisme de diffusion commun de base. L'absorption cellulaire initiale dans les régions périphériques et les tissus lymphatiques et le transport ultérieur au sein des cellules dérivées de monocytes inflammatoires a été gravement impliqué, comme indiqué par immunophénotypage, le bloc de migration cellulaire et l'ablation du RAD. Les cellules ont été lourdement chargées de particules peu après l'injection intra musculaire, mais généralement contenaient seulement 1 à 2 particules après d4 et en aval de la glande poplitée, pointant vers une dilution de la division cellulaire [31] ou l'envoi de particules à d'autres cellules [32] au sein des ganglions lymphatiques. Des études antérieures ont rapportées des transports de particule des cellules de la peau vers le lymphatique [25] mais en aval le sort des particules est resté largement inexploré [33]. Il existe des preuves solides que, dans des conditions inflammatoires, tous les contrôleurs atteignant les ganglions lymphatiques ne meurent pas, mais peuvent plutôt accéder au sang à travers les efférents lymphatiques et le canal thoracique, et des antigènes présents dans la rate et la moelle osseuse [33]. Les particules d'adjuvant ingérées renforcent ce phénomène qui à son tour favorise probablement leur translocation à partir du point d'injection vers des sites distants suivants: (i) l'alun induit la différenciation rapide de la lignée des cellules monocytes dans les APC [34], et stimule leur migration vers les ganglions lymphatiques [35], (ii) l'hydroxyde de béryllium, un adjuvant particulière très proche, stimule fortement sortie DC par les efférents lymphatiques [36], et, comme le montre le présent document, (iii) les dépôts d'Al peuvent être détectés par PIXE dans la rate et le cerveau après injection intra musculaire d'alun.

L'accumulation de particules est retardée et lentement progressive dans le cerveau intact. Les expériences utilisant la parabiose modèle [37] ou évitant une irradiation encéphalique avant la transplantation de moelle osseuse [38] ont montré que les microglies endogènes ne sont pas alimentés par la périphérie, dans des conditions normales du système nerveux central. Bien qu'un faible chimérisme inhérent à ces approches expérimentales peuvent conduire à une sous-estimation de la lenteur du renouvellement des microglies de la périphérie [39], une explication plus plausible de nos résultats est que les particules exercent un effet stimulant sur le trafic de cellules myéloïdes [36]. Les particules de latex et les agglomérats d'hydroxyde d'aluminium favorisent l'inflammation [40,41] et la stimulation immunitaire non spécifique peut augmenter jusqu'à 20 fois la migration de monocytes trans dans des modèles in vitro de la barrière hémato encéphalique [42]. Constamment, l'injection intra musculaire de rCCL2 augmente fortement l'incorporation des particules dans le cerveau intact alors que les souris déficientes en CCL2 ont une neurodélivrance diminuée .

Les RCCL2 induisent probablement l'inflammation des monocytes et des souches hématopoïétiques et des cellules progénitrices de moelle osseuse [43], suivie de leur transmigration du muscle injecté et aux ganglions lymphatiques [44], avant le chargement des particules et leur diffusion. La perfusion cérébrale de faibles doses de rCCL2, imitant les états pathologiques attirant les monocytes inflammatoires, a également augmenté la neurodélivrance des particules. Les particules intracérébrales transférées avec le temps des macrophages périvasculaires au réseau sentinelle de parenchyme microglie et à d'autres cellules neurales résidentes, et probablement ne réussissent pas à recirculer, ce qui explique leur accumulation cérébrale progressive.

Conclusion :

Pris dans leur ensemble, nos résultats indiquent que, comme pour les bactéries intracellulaires [45], les nanomatériaux peuvent être transportés par la lignée de monocytes des cellules aux ganglions lymphatiques, vers le sang et la rate, comme pour le VIH [46] et d'autres agents pathogènes [47], peuvent utiliser les CCL2 dépendants de la transmigration des monocytes à travers la barrière hémato-encéphalique pour entrer dans le cerveau. Cela se produit à très faible taux chez des souris normales, le pourcentage de particules injectées dans les tissus étant estimé à 1:105 en d21 la rate et le cerveau 1:107 dans d90, en conformité avec l'excellente tolérance de presque tous les individus à de faibles doses d'alun et d'autres particules injectées. La neurodélivrance des nanomatériaux

augmente de façon significative chez les souris avec soit une faible barrière hémato-encéphalique soit les taux tissulaires élevés de CCL2, comme précédemment soupçonné avec des agents pathogènes chez l'homme [48]. D'une part, une telle intégration cérébrale des nanomatériaux injectés dans les tissus doivent être considérée comme une intéressante caractéristique dans le cadre de stratégies thérapeutiques ciblant le système nerveux central. D'autre part l'alun a un grand potentiel neurotoxique [49] l'administration et la planification de doses croissantes en continu de ce adjuvant très pauvrement biodégradable dans la population doivent être soigneusement évaluées par les organismes de réglementation puisque le composé peut être insidieusement dangereux. Il est probable que la bonne tolérance à l'alun peut être contestée par une variété de facteurs, y compris sur immunisation, l'immaturation de la barrière hémato-encéphalique, les facteurs de susceptibilité individuelle et le vieillissement qui peut être associé à deux modifications subtiles l'altération de la barrière hémato-encéphalique et l'augmentation progressive de la production CCL2.

Abréviations:

Al-Rho: Al (OH) 3 rhodamine nanohybride;

ASIE: auto-immune / inflammatoire induite par le syndrome adjuvant;

BBB: barrière hémato-encéphalique;

CCL2: chimiokine (CC motif) ligand 2;

SNC: système nerveux central;

d: jour;

FLB: fluorescent billes de latex;

mdx: la dystrophine de souris déficiente;

MCP1: monocytes protéines chimio-attractives 1;

MMF: myofasciite à macrophages;

MO: monocytes, mo: mois;

MP: macrophage;

PIXE: protons induite par émission de rayons X;

SNP: single nucleotide polymorphism;

TA: muscle tibial antérieur.

Intérêts concurrents:

Les auteurs ne déclarent aucun conflit d'intérêts.

ZK a effectué l'expérimentation animale et le traitement des tissus et a participé à l'analyse des données; CC a effectué les études génétiques moléculaires; CMF ont fourni des données cliniques; VI le traitement des tissus pour PIXE et a participé à leur analyse; FL a participé à la production de particules de substitution; CE a effectué la d'Al dans tissus; MMY et PM ont participé à l'analyse PIXE, XD a effectué une analyse confocale; OT a conçu et contribué aux particules de substitution; RKG a conçu et coordonné l'étude, a analysé les données et rédigé le manuscrit; JC a conçu l'étude, les expériences réalisées sur l'animal, les données analysées et préparé les chiffres, et a participé à la rédaction du manuscrit. Tous les auteurs ont lu et approuvé le manuscrit final.

R.K.G. et J.C. Ont écrit le journal.

Accusé de réception

Ce travail de recherche a bénéficié du financement de deux associations de patients: E3M (Entraide aux Malades de Myofasciite un macrophages) "Neurodelivrance des particules injectées par voie intra musculaire et sécurité des adjuvants aluminiques ",et l'AFM (Association Française Contre les Myopathies) "Etude des Mécanismes de la myofasciite à macrophages » et Dwoskin Foundation (Nano dans le cerveau); de la Région Ile-de-France à travers un programme PICRI (Partenariat

Institutions-Citoyens pour la Recherche et l'Innovation) «Recherche de polymorphismes de gènes codant pour des facteurs inflammatoires (chimiokines) dans la myofasciite à macrophages », et à travers deux positions post-doctorales de NERF (Neuropôle de recherche Francilien) sur le thème «Le macrophage comme un cheval de Troie pour la délivrance dans le cerveau» et « La délivrance des nanoparticules injectées intra musculairement dans le cerveau : pertinence pour la sécurité des vaccins contenant des adjuvants aluminiques ", et du Septième programme-cadre la Communauté européenne dans le projet EndoStem «Activation des cellules souches vasculaires associées et des cellules souches musculaires pour la réparation et l'entretien du tissu musculaire "(numéro de contrat de subvention 241 440).

Nous tenons à remercier pour leurs contributions les plus utiles: Dr Sophie Hue, le Dr Fabrice Chrétien, le Dr Brigitte Madly, Dr Anne Hulin, Lucie Poupel, Emilie House, Yasmine Baba-Amer, et Mathieu Surenaud.

RÉFÉRENCES

- [1] « Les Comités sur la toxicité, la mutagénicité et la cancérogénicité des produits chimiques dans les aliments, les produits de consommation et la l'environnement (COT, COM, COC). Déclaration conjointe sur la toxicologie des nanomatériaux », Décembre 2005. Disponible à l'adresse <http://www.food.gov.uk/multimedia/pdfs/cotstatements2005nanomats.pdf>.
- [2] Dobrovolskaia MA, Aggarwal P, Hall JB, McNeil SE. « Les études précliniques pour comprendre l'interaction des nanoparticules avec le système immunitaire et ses effets potentiels sur la biodistribution des nanoparticules. » *Mol Pharm* 2008; 5:487 -495.
- [3] Exley C, Siesjo P, Eriksson H. « L'immunobiologie des adjuvants aluminiques: comment sont-ils vraiment efficaces? » *Tendances Immunol* 2010; 31:103-109.
- [4] RK Gherardi, Coquet M, P Cherin, Belec L, P Moretto, Dreyfus PA, JF Pelissier, Chariot P, Authier FJ. « La Lésion myofasciite à macrophages à évaluer la persistance sur le long terme d'hydroxyde d'aluminium du vaccin dans muscle ». *Cerveau* 2001; 124:1821-1831.
- [5] FJ Authier, Cherin P, Créange A, B Bonnotte, Ferrer X, A Abdelmoumni, Ranoux D, J Pelletier, Figarella-Branger D, B Granel, Maisonobe T, M Coquet, JD Degos, Gherardi RK. « Les pathologies du système nerveux central chez les patients atteints de myofasciite à macrophages. » *Cerveau* 2001; 124:974-983.
- [6] RK Gherardi, Authier FJ. « L'inclusion d'Aluminium dans la myofasciite à macrophages: une condition récemment identifiée ». *Immunol. Allergy Clin North Am* 2003; 23:699-712.
- [7] Shoenfeld Y, « Le syndrome auto-immun /inflammatoire "ASIA" induit par les adjuvants. » *J.Agmon-Levin N. Autoimmunité* 2010; 36:4-8.
- [8] FJ Authier, Sauvat S, J Champey, Drogou I, M Coquet, Gherardi RK. « Syndrome de fatigue chronique chez les patients atteints de myofasciite à macrophages. » *Arthritis Rheum* 2003; 48:569-570.
- [9] Couette M, MF Boisse, Maison P, P Brugières, Cesaro P, Chevalier X, Gherardi RK, Bachoud-Levi AC, Authier FJ. « Persistance à long terme d'hydroxyde d'aluminium du vaccin est associé à un dysfonctionnement cognitif chronique. *J Biochem Inorg* 2009; 103:1571-1578.

- [10] Flarend RE, SL Hem, Blanc JL, Elmore D, Suckow MA, Rudy AC, Dandashli EA.
« L'absorption in vivo des adjuvants aluminiques des vaccins à l'aide Al₂O₃. »
Vaccin 1997; 15:1314-1318.
- [11] Morefield GL, Sokolovska A, D Jiang, HogenEsch H, JP Robinson, SL Hem. «
« Le rôle des adjuvants aluminiques dans l'internalisation d'antigène par les cellules dendritiques in vitro. » Vaccin 2005; 23:1588-1595.
- [12] J.Hamilton, R Byrne, G.Whitty
« Les particules d'adjuvants peuvent induire la survie des macrophages, la synthèse de l'ADN, et un effet synergique, la réponse proliférative de GM-CSF et CSF-1. » J Biol Leukoc 2000; 67:226-232.
- [13] Verdier F, R Burnett, Michelet-Habchi C, P Moretto, Fievet-épi F, E. Sauzeat
« Dosage de l'aluminium et évaluation de la réaction locale à différents moments après l'administration intramusculaire de vaccins contenant de l'aluminium chez le singe cynomolgus. »
Vaccin 2005; 23:1359-1367.
- [14] FJ Authier, Sauvat S, C Christov, Chariot P, G Raisbeck, Poron MF, Yiou F, Gherardi R.
« Le vaccin adjuvanté par l'Al(OH)₃ induisant la myofasciite à macrophages chez le rat est influencée par le bagage génétique. » NeuromusculDisord 2006; 16:347-352.
- [15] Brigitte M, C Schilte, Plonquet A, Baba-Amer Y, Henri A, C Charlier, Tajbakhsh S, M Albert, Gherardi RK, F. Chrétien
« Les macrophages résidants dans le muscle contrôlent la réaction immunitaire cellulaire chez un modèle de souris avec des blessures musculaires induites par de notexin. »
Arthritis Rheum 2010; 62:268-279.
- [16] Carbone FR, Belz GT, Heath WR.
« Transfert de l'antigène entre migration et ganglions lymphatiques-résidents dans les cellules PED T périphériques tolérance et l'immunité. Tendances Immunol 2004; 25:655-658.
- [17] Wang XY, X Yao, Wan YM, Wang B, Xu JQ, Wen YM.
« Les réponses aux multi-injections avec l'alun seul par rapport aux injections avec l'alun adsorbés sur protéines chez la souris. » Immunol Lett 2012; 149:88-92.
- [18] DW Cain, Sanders SE, MM Cunningham, G.Kelsoe
« Propriétés disparates des adjuvants entre les trois formulations d'«alun». »
Vaccin. 2013; 31:653-660.
- [19] P. Moretto
« La microsonde nucléaire: une technique de micro-analytique en biologie. »
Mol Cell. Biol. 1996; 42:1-16.
- [20] M. Wen GY, Wisniewski HM. «
« Localisation histochimique de l'aluminium dans le système nerveux central chez le lapin. »
Acta Neuropathol1985; 68:175-184.
- [21] Redhead K, Quinlan GJ, RG Das, Gutteridge JM.
«L' adjuvant Aluminium des vaccins augmente transitoirement les niveaux d'aluminium dans le tissu cérébral de souris ».
Toxicol Pharmacol 1992; 70:278-280.

- [22] Sahin G, I Varol, A Temizer, K Benli, R Demirdamar, S Duru.
« Détermination des niveaux d'aluminium dans le rein, le foie, le cerveau de souris traitées avec de l'hydroxyde d'aluminium. »
Biol. Trace Elem Res 1994; 41:129-135.
- [23] Kivela R, M. Silvennoinen, M. Lehti, H. Kainulainen, Vihko V.
« Effets de l'exercice aigu, de l'entraînement physique, et du diabète sur l'expression des facteurs de croissance lymphangiogéniques et des vaisseaux lymphatiques dans le muscle squelettique. »
Am.J. Physiol. Circ Physiol Cœur 2007; 293: H2573-H259.
- [24] Randolph GJ, Inaba K, Robbiani DF, RM Steinman, Muller WA.
« Différenciation des monocytes phagocytaires dans les cellules ganglionnaires dendritiques in vivo. » Immunité 1999; 11:753-761.
- [25] Allan RS, Waithman J, S Bedoui, CM Jones, Villadangos JA, Zhan Y, Lew AM, Shortman K, Heath WR, Carbone FR.
« Des cellules dendritiques migratoires transfèrent des antigènes à une population de cellules dendritiques résidant dans les ganglions lymphatiques pour la stimulation efficace de CTL. »
Immunité 2006; 25:153-162.
- [26] L Arnold, Henry A, F Poron, Baba-Amer Y, van Rooijen N, Plonquet A, Gherardi RK, Chazaud B. « Les monocytes inflammatoires recrutées après des blessures du muscle squelettique passent aux macrophages inflammatoires pour soutenir la myogenèse ». J Exp Med 2007; 204:1057-1069.
- [27] Nico B, Frigeri A, Nicchia GP, P Corsi, Ribatti D, F Quondamatteo, Herken R, Girolamo F, Marzullo A, Svelto M, L. Roncali
« Les modifications graves de cellules endothéliales et gliales dans la barrière hémato-encéphalique de souris dystrophiques mdx »
Glia 2003; 42, 235-251.
- [28] Fizet J, Rivière C, Bridot L, N Charvet, Louis C, C Billotey, Raccurt M, Morel G, S Roux, Perriat P, O. Tillement
« Multi-luminescente des nanoparticules hybrides d'oxyde de gadolinium comme marqueur cellulaire potentiel. » J NanoSci nanotechnologie 2009; 9:5717-5725.
- [29] Hornung V, F Bauernfeind, Halle A, Samstad EO, Kono H, Rock KL, Fitzgerald KA, Latz et E.
« Les cristaux de silice et les sels d'aluminium activent l'inflammasome NALP3 à travers la déstabilisation du phagosome. » Nat Immunol 2008; 9,847-56.
- [30] Weller RO, Djuanda E, Yow HY, Carare RO.
« Le drainage lymphatique du cerveau et la physiopathologie de la maladie neurologique. »
Acta Neuropathol 2009; 117:1-14.
- [31] Kabashima K, Banks TA, Ansel KM, Lu TT, Ware FC, Cyster JG.
« La nécessité des récepteurs lymphotoxine-bêta Intrinsèques pour l'homéostasie des cellules dendritiques des tissus lymphoïdes. »
Immunité 2005; 22:439-450.
- [32] Angeli V, Ginhoux F, J Llodra, Quemeneur L, Frenette PS, Skobe M, Jessberger R, M Merad, Randolph GJ. B
« La lymphangiogenèse de cellules β dans les ganglions lymphatiques enflammés améliore la mobilisation des cellules dendritiques. » Immunité 2006; 24:203-215.

- [33] Cavanagh LL, Bonasio R, Mazo IB, Halin C, Cheng G, van der Velden AW, Cariappa A, C Chase, Russell P, Starnbach MN, Koni PA, S Pillai, Weninger W, von Andrian UH.
« L'activation des Lymphocytes T mémoires de la moelle osseuse par les cellules dendritiques circulation portant un antigène. » *Nat Immunol* 2005; 6:1029-1037.
- [34] Rimaniol AC, Gras G, Verdier F, F Capel, VB Grigoriev, F Porcheray, E Sauzeat, JG Fournier, P Clayette, CA Siegrist, D Dormont.
« L'hydroxyde d'aluminium induit la différenciation des macrophages vers des cellules spécialisées de type présentatrices d'antigène ». *Vaccine* 2004; 22:3127-3135.
- [35] Kool M, Soullie T, M van Nimwegen, Willart MA, Muskens F, S Jung, Hoogsteden HC, Hammad H, NE Lambrecht.
« L'adjuvant d'alun stimule l'immunité adaptative en induisant l'acide urique et l'activation des cellules dendritiques inflammatoires ». *J Exp Med* 2008; 205:869-882.
- [36] Hall JG
« Etudes sur l'action de l'adjuvant de béryllium. Effets indésirables sur les ganglions lymphatiques individuels. » *Immunologie* 1998; 53:105-113.
- [37] Ajami B, JL Bennett, Krieger C, W Tetzlaff, Rossi FM.
« L'auto-renouvellement Local peut soutenir l'entretien et le fonctionnement de la microglie SNC tout au long de la vie adulte. » *Nat Neurosci* 2007; 10:1538-1543.
- [38] Mildner A, H Schmidt, Nitsche M, D Merkler, Hanisch Royaume-Uni, Mack M, Heikenwälder M, W Bruck, Priller J, M. Prinz
« Les microglies dans le cerveau d'un adulte proviennent de Ly-6ChiCCR2 + monocytes seulement dans des conditions définies ». *Nat Neurosci* 2007; 10:1544-1553.
- [39] M Prinz, Mildner A.
«« La microglie dans le SNC: immigrants en provenance d'un autre monde. »
Glia 2011; 59:177-187
- [40] Inoue K, H Takano, Yanagisawa R, E Koike, Shimada A.
« L'importance des effets des nanomatériaux de latex sur l'inflammation du poumon chez les souris. »
Toxicol Appl Pharmacol 2009; 234:68-76.
- [41] J. Pauluhn
« Toxicité pulmonaire et sort de l'oxyhydroxyde d'aluminium aggloméré de 10 et de 40 nm après 4 semaines d'exposition à l'inhalation chez le rat: les effets toxiques sont déterminés par aggloméré, et non par la taille primaire des particules. » *Toxicol Sci* 2009; 109:152-167.
- [42] Y Persidsky, STINS M, D Way, Witte MH, M Weinand, Kim KS, P Bock, Gendelman HE, M. Fiala
« Un modèle pour la migration des monocytes à travers la barrière hémato-encéphalique au cours de l'encéphalite du VIH-1. »
J Immunol 1997; 158, 3499 -3510.
- [43] Si Y, Tsou CL, K Croft, Charo SI.
« CCR2 médiateur souches hématopoïétiques et le trafic des cellules souches à des sites inflammation chez la souris. » *J Clin Invest* 2010; 120:1192-1203.

[44] Palframan RT, Jung S, Cheng G, Weninger W, Luo Y, Dorf M, Littman DR, BJ de Rollins, Zweerink H, Rot A von, Andrian UH.

« Le transport des chimiokines inflammatoires et la présentation de VHE: un mécanisme de contrôle à distance pour recrutement des monocytes vers les ganglions lymphatiques dans les tissus enflammés ». *J Exp Med* 2001; 5:1361-1373.

[45] Chackerian AA, Alt JM, Perera TV, Dascher CC, Behar SM.

« Diffusion de *Mycobacterium tuberculosis* est dépend des caractéristiques et précède l'initiation de l'immunité cellulaire T-. *Infect Immun* 2002; 70:4501-4509.

[46] Drevets DA, MJ Dillon, JS Schawang, N Van Rooijen, J Ehrchen, C Sunderkotter, PJ Leenen.

« Le Ly-6 Chigh sous-population de monocytes transporte la bactérie *Listeria monocytogenes* dans le cerveau lors d'une infection systémique de souris. » *J Immunol* 2004; 172:4418-4424.

[47] Eugenin EA, Osiecki K, L Lopez, Goldstein H, Calderon TM, Berman JW. Chemoattractant CCL2/monocyte

« La protéine chimiotactique 1 medie CCL2/monocyte augmente la transmigration du virus de l'immunodéficience humaine des leucocytes infectés par le VIH à travers la barrière hémato-encéphalique : un mécanisme potentiel de lutte contre l'invasion du VIH-CNS et neurosida. » *NeuroSIDA J Neurosci* 2006; 26:1098-1106.

[48] Gonzalez E, Rovin BH, Sen L, G Cooke, Dhanda R, S Mummidi, Kulkarni H, Bamshad MJ, Telles V, Anderson SA, Walter EA, Stephan KT, Deucher M, Mangano A, Bologne R, SS Ahuja, Dolan MJ, Ahuja SK.

« L'infection du VIH-1 et la démence du SIDA sont influencés par un allèle mutant lié à l'imprégnation augmenté de monocytes des tissus et de MCP-1. » *Proc Natl Acad Sci USA* 2002; 99:13795-13800.

[49] Shaw CA, Petrik MSJ.

« Injections d'hydroxyde d'aluminium conduisent à des déficits moteurs et à la dégénérescence des neurones moteurs. » *J Biochem Inorg* 2009; 103:1555-1562.

[50] Galimberti D, C Fenoglio, Lovati C, E Venturelli, je Guidi, Corr `a B, D Scalabrini, Clerici F, C Mariani, Bresolin N, Scarpini E.

« Les taux de sérum MCP-1 augmentent dans la déficience cognitive légère et la maladie légère d'Alzheimer. » *Neurobiol vieillissement* 2006; 27: 1763-8.

Légendes des figures

Figure 1: dépôts d'aluminium dans les tissus après l'injection vaccin contenant de l'alun dans le muscle TA.

a-Un granulome composé de cellules PAS + est formé dans l'enveloppe du muscle injecté.

b-La cartographie PIXE montre des dépôts Al en pseudocouleurs dans le muscle, avec confirmation d'une émission d'un spectre d'Al (d21);

c-La section de tissu de la rate (panneau de gauche) affiche le grand champ protoné de 500x500µm et le restreint de 100x100µm correspondant à la carte PIXE (panneau du milieu et à droite, respectivement) renfermant les traces admissibles d'Al (d21);

d-La section de tissu cérébral (à gauche panneau de gauche) affiche le champ restreint 100x100µm protoné correspondant à la carte PIXE (panneau central) renfermant les traces admissibles d'Al (d21), le nombre ou les champs contenant une ou plusieurs taches d'Al ont été augmentées à tous les temps testés par rapport aux non vaccinés (panneau de droite) chez la souris. (Bars: 100 um).

Figure 2: translocation des FLB suite à l'injection dans le muscle TA.

a-Le sort local des FLB injectées dans le muscle. Les FLB sont d'abord extra cellulaire dans le tissu interstitiel tel qu'évalué avec très peu de co-localisation avec des noyaux (à gauche). Après la phagocytose et la formation de granulomes dans le périnysium, elles sont colocalisées avec des noyaux abondants (à droite). (Bars: 50 pm)

Marque de translocation des FLB dans les zones des zones parafolliculaires des ganglions poplités (d4);

b-Cytométrie en flux montrant que les cellules les plus chargées en FLB extraites des ganglions montrent des CD11c soit un niveau intermédiaire ou fort (d4);

c- Immunocytochimie des CD11b + sur des cellules extraites de DLNS étaient généralement des Ly6C/Gr1 +, en particulier quand ils avaient ingéré quelques particules (à gauche), alors que les lourdes charges étaient souvent des Ly6C/Gr1- (À droite)

d-Le nombre de cellules chargées en FLB a culminé à d4 post-injection dans les deux glandes poplités et inguinaux

e-La migration de l'inhibiteur BW245C co-injecté avec des FLB dans le muscle a nettement diminué le nombre de cellules chargées en FLB détectées dans les ganglions à d4 post-injection. L'effet était plus prononcé dans les ganglions en aval inguinale;

f- La migration de l'inhibiteur BW245C co-injecté avec des FLB dans le muscle a nettement diminué le nombre de cellules chargées en FLB détectées dans les ganglions à d4 post-injection. L'effet était plus prononcé dans les ganglions en aval inguinale.

(Histogrammes: n = 3 par groupe, moyenne ± SD, * p <0,05, ** p <0,01, *** p <0,005; bars: 50 pm [a]; 100 um [B]; 5 pm [d]).

Figure 3: biodistribution des FLB dans la rate et le sang après injection dans le muscle TA.

a-Le nombre de cellules chargées en FLB a culminé à d21 dans la rate;

b-Dans la rate, les FLB ont été détectées dans les cellules CD11b + évaluée par immunohistochimie (à gauche) ou après le tri cellulaire (à droite);

c-Sur le frottis sanguin, la plupart des FLB étaient associées aux cellules de d4, et a culminé à j21 après l'injection; des cellules chargées en FLB ont été encore détectée dans la circulation au point final d90

d- Les cellules chargées en FLB circulantes étaient des CD11b + (d21);

e, f- L'immunophénotypage GR1/Ly6C des cellules CD11b + qui ont ingéré des FLB. La plupart sont Gr1 + / + Ly6C à la fois dans les gaglions lymphatiques à d4 (a) et dans la rate à d21 (b).

(Histogrammes n = 3 par groupe, moyenne ± SD, * p <0,05, ** p <0,01, *** p <0,005; barres: 5 um).

Figure 4 translocation des FLB dans le cerveau après l'injection dans le TA.

a- La translocation cérébrale des FLB a été retardée mais implacable jusqu'au point final d90 chez les souris C57 et jusqu'au point final d180 chez les souris CX3CR1GFP / + ;

b-La section du tronc cérébral non marquée chez la souris C57 à d21 post-injection montrant la plupart du temps des FLB distribuées dans la région subpial comme indiqué sur la photo en haut à droite;

c- La distribution dans le cerveau des FLB : les zones enrichies en FLB ont été signalées sur des entretiens semi-série rostrocaudal des sections de cerveau de souris colorées par violet de crésyl (A à G), en utilisant des points de différentes couleurs selon le point de temps considéré (d21 à D365) après l'injection intra musculaire. Le rapport a été fait quel que soit le nombre de particules fermées dans chaque zone sélectionnée. Notez que les FLB étaient toujours principalement dans la matière grise, sans accumulations importantes à aucun site neuroanatomique particulier.

(Histogrammes: n = 3 par groupe, moyenne ± SD, * p <0,05, ** p <0,01, *** p <0,005; bar en b: 50

microns).

Figure 5: les FLB dans diverses cellules neuronales.

a-Section du parenchyme cérébral non marqué d'une souris CX3CR1GFP / + à d90 post-injection montrant une proportion significative de FLB individuelles dans les cellules microgliales ramifiées de la GFP +;
b à e- Dans le cerveau de souris C57 à d21 post-injection, les FLB ont été détectées dans les macrophages périvasculaire F4/80 + (b), les astrocytes GFAP + (c), neurotrace β + neurones (d), et la vimentine + cellules piales (e); (Bars: 10 microns).

Figure 6: Les mécanismes de translocation des FLB

a-Par rapport à l'injection intra musculaire, l'injection directe de FLB dans la veine de la queue des souris C57 a été associée avec presque pas de translocation au cerveau à la fois à d21 et d90 post-injection;
b- L'ablation des ganglions poplités et inguinaux a été associée à une diminution marquée des cellules chargées en FLB dans le sang, la rate et le cerveau à j21 post-injection;
c-La souris mdx avec altération de la barrière hémato-encéphalique ont montré une augmentation marquée des cellules périvasculaire CD11b + et une angiogenèse significative évaluée par une augmentation des cellules endothéliales CD31 +, par rapport à la normale des souris C57;
d- Des souris mdx ont montrées une incorporation accrue des FLB dans le cerveau; par rapport à des souris C57, les souris mdx avait augmenté la neurodélivrance des FLB à la fois en d21 et d90, évaluée à la fois par l'histologie (d) ou après tri cellulaire des CD11b + (e);
f-A d21, les FLB ont été principalement détectées en dehors des membranes basales capillaires immunocolorées par collagen IV (panneau supérieur), étroitement associées aux macrophages périvasculaires CD11b + (plus bas Panneau);
(Histogrammes: n = 3 par groupe, moyenne \pm SD, * p <0,05, ** p <0,01, *** p <0,005; bar d: 10 microns).

Figure 7: souris chimériques moelle épinière GFP +

Les souris chimériques injectée intramusculairement avec des FLB a montré des cellules de moelle osseuse GFP + dérivées joignant les FLB parmi les cellules inflammatoires extraite du muscle injecté (a) à d4 après injection de FLB, dans la rate (b) et le cerveau (c) à d33 après injection des FLB.

L'incorporation de cellules GFP + dans le cerveau de souris chimériques ont montré, principalement sous forme de cellules périvasculaires du cortex (d), et parfois plus profondément situé dans les cellules ramifiées CD11b + (e, flèche) à d180 post-transplantation de moelle osseuse. (Bars: 10 microns)

Figure 8: biodistribution de particules d'Al.

a- La marque Morin d'aluminium montre des agglomérats d'alun cytoplasmiques arrondis dans les macrophages du muscle après l'administration du vaccin intra musculaire chez les souris C57 ;
b- La marque Morin confirme que les nanohybrides d'Al-Rho phagocytées sont associées à l'Al et la forme des particules de taille similaire à des agglomérats d'alun;
c à e- Les nanohybrides d'Al-Rho montrent une relation dépendante entre le temps et la distribution dans les ganglions lymphatiques, la rate et le cerveau remarquablement semblable à celui des FLB;
f- La translocation d'Al-Rho injecté par voie sous cutanée vers les ganglions et la rate, comme on l'observe avec l'injection intra musculaire;
g,h- Ly6C immunophénotypage des cellules CD11b + qui ont ingéré l'Al-Rho: la plupart sont Gr1 + / Ly6C + à la fois dans les ganglions lymphatique à d4 (g) et dans la rate à d21 (h).

(Histogrammes: n = 3 par groupe, moyenne \pm SD, * p <0,05, ** p <0,01, *** p <0,005; dans un bar: 10 microns).

Figure 9: la translocation systémique des particules d'Al- dépendante des CCL2 :

a- Une souris déficiente en CCL2 montrent une baisse spectaculaire de la translocation d'Al-Rho du muscle injecté vers les ganglions inguinales, le sang, la rate et le cerveau, par rapport à leurs témoins respectifs (100%). Noter, cette différence est significative, mais moins prononcée pour le ganglion poplité;

b- La co-injection de RCCL-2 avec de l'Al-Rho est associée à une augmentation marquée de la translocation d'Al-Rho du muscle injecté vers les glandes inguinales, le sang, la rate et le cerveau, par rapport aux contrôles respectifs (100%). Notez que la différence est significative, mais moins prononcée pour le ganglion poplité;

c- Les 2-RCCL perfusés par une micro-pompe osmotique dans le striatum durant 15 jours est associée à l'augmentation significative de la translocation d'Al-Rho du muscle injecté au cerveau;

d- L'injection intra musculaire combinée l'injection combustion interne de rCCL2 est associée à une augmentation dramatique de la translocation des FLB du muscle à la fois dans le sang et le cerveau;

e- Le vaccin contenant de l'Alum injecté dans le muscle de la souris déficiente en CCL-2, souris normale, et souris RCCL-2 était associé à une tendance d'une augmentation des niveaux de concentration en Al dans le cerveau dépendant aux CCL-2

(Histogrammes: n = 3 par groupe, moyenne \pm SD, * p <0,05, ** p <0,01, *** p <0,005, sauf [e]: n = 10 groupe, moyenne \pm SEM).

Figure 10: les particules d'Al-Rho restent dans le cerveau et peuvent provoquer une inflammation.

A- Les nanomatériaux d'Al-Rho détecté dans le cerveau par la rhodamine fluorescente (rangée supérieure et d'émission spectre à 560 nm) reste associé à l'Al évaluée par coloration Morin (rangée du milieu et spectre d'émission à 520 nm)

b- Les nanomatériaux d'Al-Rho détectés dans le cerveau par PIXE. Revêtement Al colocalisé dans le noyau de base évalue l'intégrité des nanohybrides d'Al-Rho après le transfert

c- Chez les souris ayant reçu une co-injection intra musculaire d'Al-Rho et RCCL-2, l'incorporation des particules dans les cellules neurales était associée à l'expression immunohistochimique de IL1beta

d- L'injection stéréotaxique d'Al-Rho dans le striatum a été associée à aucune translocation vers les ganglions lymphatiques cervicaux (CLN) à d4, ce qui contraste avec la translocation vers les ganglions poplités lorsque la quantité de particules même a été injectée dans le muscle TA;

e- L'injection stéréotaxique d'Al-Rho dans le striatum, par rapport à l'injection semblable dans le muscle, était associée à la translocation très peu dans la rate à la fois en d4 et d21.;

(Histogrammes: n = 3 par groupe, moyenne \pm SD, * p <0,05, ** p <0,01, *** p <0,005; bar dans c: