



Translocation lente CCL2-dépendante de particules biopersistantes du muscle vers le cerveau

(Traduction E3M)

Zakir Khan^{1,2}, Christophe Combadière^{3,4,5}, François-Jérôme Authier^{1,2,6}, Valérie Itier^{1,2,11}, François Lux^{7,8}, Christopher Exley⁹, Meriem Mahrouf-Yorgov^{1,2,11}, Xavier Decrouy^{1,2}, Philippe Moretto¹⁰, Olivier Tillement^{7,8}, Romain K. Gherardi^{1,2,6} * et Josette Cadusseau^{1,2,11} *

RÉSUMÉ

Sujet : La biodistribution sur le long terme des nanomatériaux utilisés en médecine est largement inconnue. C'est le cas de l'hydroxyde d'aluminium (alun), l'adjuvant vaccinal le plus largement utilisé, qui est un composé nanocristallin formant spontanément des agglomérats de dimension micronique. Bien que généralement bien toléré, l'alun est parfois détecté dans les macrophages longtemps après la vaccination, chez des personnes sans doute prédisposées à développer des réactions systémiques/neurologiques du syndrome auto-immun (inflammatoire) induit par les adjuvants (ASIA).

Méthodes : Sur la base d'études préliminaires sur 252 patients atteints du syndrome ASIA associé à l'alun, montrant une augmentation sélective de CCL2, le principal chimioattractant des monocytes, dans la circulation et une variation dans le gène CCL2, nous avons mené des expériences sur des souris pour évaluer la biodistribution de l'aluminium utilisé dans les vaccins et de particules fluorescentes 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 nanohybrides fluorescents composés d'un noyau de rhodamine et d'une couche d'hydroxyde d'aluminium (Al-Rho) ont été utilisées.

Résultats : L'injection intramusculaire d'un vaccin contenant de l'aluminium est 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 migré vers les ganglions lymphatiques (DLNs) et par la suite ont été détectés associés aux phagocytes dans le sang et la rate. Les particules se sont lentement accumulées dans le cerveau pendant les 6 mois de l'étude, se trouvant d'abord dans les cellules périvasculaires CD11b + et ensuite dans la microglie profonde et les autres cellules du système nerveux. L'ablation préalable du ganglion réduit considérablement la biodistribution systémique et nerveuse. La translocation cérébrale n'est pas observée après injection intraveineuse directe. Elle est significativement augmentée chez les souris avec une barrière hémato-encéphalique chroniquement altérée. Les expérimentations de type gain ou perte de fonction de CCL2 montrent l'implication majeure de cette signalisation dans la diffusion systémique des particules d'Al-Rho capturées par les monocytes, et dans leur neurodélivrance ultérieure. L'injection de particules par stéréotaxie a souligné la fonction de rétention du cerveau comme un facteur de l'accumulation cérébrale progressive des particules.

Conclusion : Les nanomatériaux sont transportés par les cellules de la lignée des monocytes vers les ganglions lymphatiques, le sang et la rate, et, de même que le VIH, peuvent pénétrer dans le cerveau par un mécanisme médié par la chimiokine CCL2. Cela se produit en très faible quantité dans des conditions normales, ce qui explique la bonne tolérance globale à l'alun en dépit de son fort potentiel neurotoxique. Cependant, l'augmentation continue du nombre d'injections de cet adjuvant peu biodégradable peut devenir insidieusement dangereuse pour la population, notamment en cas de sur-vaccination, de barrière hémato-encéphalique immature ou altérée, ou de production élevée de CCL-2.

Mots clés : aluminium, effets secondaires des vaccins, adjuvant vaccinal, biodistribution des nanomatériaux, neurodélivrance des nanomatériaux, macrophages, myofasciite à macrophages, CCL-2, polymorphisme génétique

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

* Contribution égale

1. Inserm, U955, Créteil, 94000, France

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

La liste complète des auteurs est disponible à la fin de l'article



Considérations générales

Les nanomatériaux ont diverses applications médicales innovantes dont la délivrance de médicaments et de gène, les produits de contraste d'imagerie, les antimicrobiens topiques, les instruments chirurgicaux et les vaccins [1]. En raison du nombre croissant de nouveaux composés et de nouvelles formulations, les données sur leur biodistribution spécifique, leur persistance et leur toxicité font généralement défaut [1] et des précisions concernant la façon dont le corps réagit à des petites particules, en particulier celles qui interagissent avec les cellules immunitaires [2], est nécessaire de manière urgente. Une fois définis, ces mécanismes de base qui régissent les interactions hôtes-particules devraient être intégrés aux propriétés spécifiques des nanomatériaux (taille, forme, surface et solubilité) pour permettre les prévisions de leurs effets bénéfiques ou indésirables.

L'utilisation des nanomatériaux dans le corps humain n'est pas aussi contemporaine que ce qui est récemment décrit. Pendant des décennies, un composé nanocristallin formé d'oxyhydroxyde d'aluminium (alun) a été l'adjuvant le plus communément utilisé dans les vaccins. Le mécanisme par lequel il stimule la réponse immunitaire reste incomplètement compris [3]. Bien que l'alun soit généralement bien toléré, il est parfois rapporté comme étant la cause de problèmes de santé handicapants chez des individus présentant des facteurs de prédisposition mal définis [4-6]. Les signes cliniques attribués à l'alun sont paradigmatiques du syndrome auto-immun/inflammatoire induit par les adjuvants (ASIA), un syndrome observé également chez les patients exposés au gel de silicone [7]. Ils comprennent l'apparition retardée de myalgies diffuses [4], de fatigue chronique [8] et de troubles cognitifs stéréotypés [9]. La persistance des macrophages chargés d'alun est généralement détectée aux sites d'injections antérieures (jusqu'à > 12 ans plus tard), ce qui entraîne un granulome spécifique appelé myofasciite à macrophages ou MFM [4]. Bien que la biopersistance des adjuvants soit *a priori* indésirable, la signification exacte de celle-ci fait encore l'objet de débats puisque la biodistribution des particules lentement biodégradables suite à une 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 des preuves concluantes montrent qu'elles peuvent avoir le seul et même effet [3]. L'efficacité et la toxicité potentielle de l'alun seront influencées par le fait que le nanomatériau bioactif reste localisé aux sites d'injection ou qu'il se disperse et s'accumule dans les organes et les tissus éloignés. Une étude de référence basée sur l'isotope Al^{26} a montré une faible élimination de l' Al^{26} dans les urines (6 %) au jour 28 (J28), dernier jour d'observations après injection intramusculaire de l'alun isotopique chez les lapins (6% au final) et a détecté de l' Al^{26} sous une forme inconnue, dans les ganglions lymphatiques, la rate, le foie, et le cerveau [10]. L'oxyhydroxyde d'aluminium est composé d'agrégats (de dimension micrométrique/sous-micrométrique) de particules de taille nanométrique (environ 13 nm), et l'on croyait initialement que ces agrégats restaient extracellulaires jusqu'à leur solubilisation complète dans le fluide interstitiel [10]. Nous savons maintenant qu'il s'agit tout à fait du contraire. Les cellules présentatrices d'antigène (CPA) absorbent avidement les particules d'alun [11] et, ce faisant, deviennent des cellules à longue durée de vie [12], empêchant la solubilisation de l'alun [4,13,14]. Les monocytes inflammatoires (MI) sont attirés dans le muscle par des signaux d'alerte par l'intermédiaire d'un mécanisme d'entraînement de la protéine chimioattractante monocyte (MCP-1)/chimiochine (à motif C-C) ligand 2 (CCL2), devenant des macrophages (MP) et des cellules dendritiques (CD) dérivées de monocytes avant de migrer vers les ganglions lymphatiques drainants (GLD) [15]. Une fonction des CD migrantes est de transférer du matériel antigénique à un vaste réseau de CPA résidentes distantes [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 [17,18]. Nous avons donc cherché à savoir si des nanomatériaux injectés dans le muscle pourraient être transférés 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 concernant les soins aux animaux. Pour faciliter les recherches sur le mécanisme de la biodistribution des particules, les souris porteuses des gènes B57/B6, qui sont utilisées pour générer des modèles génétiquement manipulés, ont été préférées à d'autres souches de souris plus sensibles à la toxicité. Des souris mâles C57BL/6 âgées de 8 à 10 semaines, mdx (avec barrière hémato-encéphalique altérée), CX3CR1^{GFP/+} (avec insertion du gène rapporteur GFP permettant la visualisation de la microglie), et CCL2^{-/-} ont été utilisées (Jackson, West Grove, PA, États-Unis). Les souris ont été protégées contre les matériaux contenant de l'aluminium, nourries avec des aliments préparés pour animaux et de l'eau en libre accès et ont été exposées à des cycles lumière/obscurité 12:12. Les expériences utilisant des particules fluorescentes ont été extrêmement laborieuses et coûteuses à réaliser. Elles ont toutes été effectuées en triple exemplaire. L'homogénéité des résultats a rendu inutile l'utilisation de plus de 3 souris par expérience.

Administration de l'alun

La dose de vaccin contenant de l'alun administrée aux souris a été calibrée pour imiter le nombre moyen de doses reçues par les patients atteints de MFM. Une dose de vaccin anti-hépatite B contient 0,5 mg d'Al conformément à la fiche technique du produit. En se basant sur une moyenne du poids du corps humain de 60 kg (la plupart des patients étant des femmes), la quantité reçue pour chaque vaccination est de 8,33 µg/kg. La conversion allométrique de l'homme à la souris (recommandation 5541 de la FDA) donne une quantité finale d'environ 100 µg/kg. Une dose de 36 µl de vaccin, ce qui correspond à 18 µg d'Al, a été injectée pour imiter l'effet cumulatif induit par 5,2 doses humaines pour des souris de 35 g (poids moyen à J180 = la moitié de la durée pour l'analyse du cerveau). Cette dose représente l'équivalent de 6,8 doses humaines pour le plus jeune animal (poids corporel de 27 g, âgé de 11 semaines au moment du sacrifice) et de 4,3 pour le plus vieux (42 g à 62 semaines).

Spectrométrie d'absorption atomique au four

Les concentrations en Al ont été déterminées dans l'ensemble des muscles tibiaux antérieurs (TA) et du cerveau séchés à 37 °C et dissous avec du HNO₃ concentré (14 mol/l). Les solutions ont été refroidies avant d'être diluées à 10 % de HNO₃ avec de l'eau ultra pure. L'aluminium total dans chaque solution a été mesuré par spectrométrie d'absorption atomique au four à graphite (TH GFAAS) et les résultats ont été exprimés en mg d'Al/g de poids sec des tissus).

PIXE

Étant donné que, dans des conditions normales, l'Al peut être détecté dans les tissus avec des variations interindividuelles prononcées, l'incorporation de novo d'aluminium à des doses trop faibles ne provoque pas de changement facilement détectable lorsque les approches conventionnelles globales sont utilisées [10]. Ici, nous avons utilisé la méthode d'émission de photons X induite par particules (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 petits points d'Al. Des sections (de 20 µm d'épaisseur) soigneusement protégées de l'Al environnemental ont été montées sur des membranes de Formvar fraîches, conservées dans le cryostat pendant 6 h et stockées dans un gel de silice sans aluminium. Des ions minéraux et métalliques ont été détectés en utilisant la microsonde nucléaire du Centre d'Études Nucléaires de Bordeaux-Gradignan. Un faisceau de protons de 1 MeV concentré sur un point de 2 µm a numérisé aléatoirement plusieurs champs de 500 x 500 µm de coupes de tissus. Dans le cas d'un signal d'Al, un nouveau test de zones d'intérêt de 100 x 100 µm était réalisé. Les analyses par PIXE et par spectroscopie de rétrodiffusion ont été simultanément employées et les résultats quantitatifs ont été calculés, comme décrit précédemment [19]. Les points d'Al étaient considérés éligibles sur la base de 3 critères : une taille de plus de 3 pixels (c'est-à-dire au-dessus du bruit de fond), un dépôt non colocalisé avec Si et un dépôt entouré d'un halo arrondi d'intensité plus faible (ces deux caractéristiques limitant la confusion avec la contamination par la poussière externe qui aurait traversé 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) des nanoparticules d'oxyde de gadolinium ont d'abord été synthétisées, (ii) la croissance de la coque de polysiloxane a ensuite été induite par condensation/hydrolyse de précurseurs de silane appropriés en présence des nanoparticules, puis (iii) les nanohybrides ont été enrobés par l'ajout de nitrate d'aluminium et de soude dans des conditions stœchiométriques.

Produits chimiques

Le chlorure de gadolinium hexahydrate ((GdCl₃, 6H₂O]) 99,99 %), l'hydroxyde de sodium (NaOH, 99,99 %), l'orthosilicate de tétraéthyle (Si(OC₂H₅)₄, TEOS, 98 %), le (3-aminopropyl) triéthoxysilane (H₂N(CH₂)₃-Si(OC₂H₅)₃, APTES, 99 %), la triéthylamine (TEA, 99,5 %), la rhodamine B isothiocyanate (RBITC), le nitrate d'aluminium nonahydraté (Al(NO₃)₃.9H₂O, réactif ACS ≥ 98 %) et le diméthylsulfoxyde (DMSO, 99,5 %) ont été achetés chez Sigma-Aldrich (St Louis, MO, États-Unis). Le diéthylène glycol (DEG, 99 %) a été acheté chez SDS Carlo Erba, Val de Reuil (France).

Préparation du cœur d'oxyde de gadolinium

Une première solution a été préparée en dissolvant du GdCl₃.6H₂O (0,56 g) dans 50 ml de DEG (diéthylène glycol) à température ambiante. Une deuxième solution a été préparée en ajoutant une solution de NaOH (0,49 ml, 10 M) dans 50 ml de DEG. La deuxième solution a été progressivement ajoutée à la première, à température ambiante, pendant 15 heures. Un colloïde transparent de nanoparticules d'oxyde de gadolinium dans le DEG a été obtenu.

Encapsulation des cœurs de Gd₂O₃ par coque de polysiloxane

Un total de 105 µl de APTES et 67 µl de TEOS ont été ajoutés à 100 ml de la solution de nanoparticule d'oxyde de gadolinium sous agitation à 40 °C. Un total de 5 µl de APTES a été au préalable couplé avec 1 mg de RBITC dans le DMSO (1 ml) utilisé comme solvant, puis ajouté à la solution colloïdale. Après une heure, 1,913 µl d'une solution de DEG (0,1 M de TEA, 10 M d'eau) a été ajoutée. Toute la procédure d'enrobage a été répétée trois fois de plus (sans ajouter de RBITC), toutes les 24 heures. Le mélange final a été agité pendant 48 h à 40°C.

La solution obtenue pouvait être conservée à température ambiante pendant des semaines sans altération.

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

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

Purification

La purification d'Al-Rho a été réalisée par filtration tangentielle sur membranes de filtration Vivaspin (MWCO = 10 kDa) achetée chez Sartorius Stedim Biotech (Aubagne, France). La solution colloïdale a été introduite dans des tubes Vivaspin de 20 ml et centrifugée à 4 100 tr/min. Cette étape a été répétée plusieurs fois, en remplissant les tubes avec de l'eau et en centrifugeant à nouveau, jusqu'à ce que le taux de purification souhaité soit atteint (≥100). La solution colloïdale purifiée a été lyophilisée pour le

stockage dans cinq boîtes à pilules, en utilisant un lyophilisateur Christ Alpha 1-2. Le composé contenait 4 µg d'Al par µl de suspension Al-Rho. La microscopie électronique en transmission de contrôle a montré des particules non fibreuses d'environ 10 nm, typiques de l'hydroxyde d'aluminium (alun précipité traditionnel).

De même que pour le vaccin à l'alun, elles ont formé des agglomérats de taille sous-micronique/micronique. Les propriétés immunologiques de ces précipités de protéines d'alun traditionnels sont assez semblables à celles de l'adjuvant de référence approuvé par la FDA (oxyhydroxyde d'Al : Alhydrogel®, Invivogen, Toulouse France) et diffèrent d'autres formules non autorisées pour la consommation humaine (18).

Injections périphériques de nanomatériaux fluorescents

Deux types de nanomatériaux fluorescents ont été utilisés : des billes de latex fluorescentes polychromes d'exploration (BLF) (fluosphères de 500 nm, Polysciences, Warrington, PA, États-Unis) et des nanohybrides Al-Rho de confirmation composés d'un noyau de rhodamine et d'une couche d'Al(OH)₃. Les BLF ont été utilisées en premier car elles offrent plusieurs caractéristiques qui facilitent leur détection dans les tissus, dont une forte fluorescence, une apparence sphérique et une taille homogène. Cela nous a permis d'obtenir une image claire de ce qui se passait en termes de biodistribution de ces particules avidement phagocytées. Les particules Al-Rho étaient moins fluorescentes et plus hétérogènes dans leur forme et leur taille que les BLF mais représentaient mieux des substituts de l'adjuvant aluminique. Presque toutes les expériences de biodistribution réalisées avec les BLF chez les souris de type sauvage ont également été réalisées avec des particules Al-Rho. Par contre, les BLF et l'Al-Rho ont été utilisés différemment chez les souris mutées/génétiquement modifiées : Les BLF étaient préférées pour l'étude de la biodistribution des particules chez les souris mdx avec des altérations de la BHE et lorsque le marqueur GFP était utilisé (c'est-à-dire des souris CX3CR1^{GFP/+} avec microglie fluorescente, études GFP + BMT) ; les particules Al-Rho étaient préférées pour les études de gain/perte de fonctions CCL2/MCP-1 sur la base de résultats préliminaires concernant l'état CCL2 d'humains intolérants à l'alun.

La suspension de BLF diluée à 1/1 dans le PBS contenait $1,8 \times 10^{11}$ particules par ml. Un volume total de 40 µl (20 µl dans chaque muscle tibial antérieur) a été injecté, ce qui correspond à une quantité totale de $7,2 \times 10^9$ particules. Le même volume de suspension d'Al-Rho a été injecté dans les muscles tibiaux antérieurs. Les souris ayant subi une injection de PBS ont été utilisées comme groupe témoin. Les tissus, dont les ganglions poplités et inguinaux, la rate, le cerveau et le sang, ont été prélevés à des moments différents après l'injection. Trois souris ont été incluses par groupe à chaque repère de temps pour les matériaux injectés et leurs contrôles. D'autres voies d'administration ont été comparées à l'injection intramusculaire standard, dont l'injection sous-cutanée de 20 µl de BLF dans chaque patte arrière et l'injection intraveineuse de 40 µl de BLF dans la veine de la queue.

Injections cérébrales stéréotaxiques.

Les souris ont été anesthésiées avec de la kétamine et de la xylazine. La suspension d'Al-Rho (0,5 µl) a été injectée stéréotaxiquement dans le striatum en utilisant une seringue Hamilton de 1 µl. La biodistribution de l'Al-Rho injecté en intramusculaire dans les GLD cervicaux, indiquée par la section en série de la région cervicale entière et de la rate, a été comparée à la biodistribution dans le GLD poplité et la rate d'une même quantité d'Al-Rho injectée dans le muscle TA.

Blocage de la migration pharmacologique et physique

L'analogue de la prostaglandine BW245C, un agoniste du récepteur PGD₂, a été utilisé pour empêcher la migration de l'APC comme rapporté précédemment [20]. Comme BW245C est actif pendant deux jours après l'injection, BW245C (100 nM, Cat.no.12050, Cayman Chemical, Ann Arbor, MI, États-Unis) a été injecté deux fois dans le muscle TA : d'abord avec des BLF à J0, puis une seconde fois seul à J2 et enfin les ganglions ont été retirés pour examen à J4. Les souris non traitées ayant subi une injection de BLF ont été utilisées comme groupe témoin. Dans une autre série d'expérience, les GLD étaient chirurgicalement enlevés et les souris recevaient immédiatement une injection de BLF dans le muscle TA.

Expériences sur la perte et le gain de fonction du CCL2

Des analyses exploratoires réalisées chez des patients atteints de MFM avec le syndrome ASIA (voir le fichier complémentaire 1 : section d'information supplémentaire) ont donné un signal de CCL2 sous forme de : (1) une augmentation sélective de CCL2 dans le taux sérique des patients atteints de MFM par rapport aux patients sains du groupe témoin, et (2) un haplotype particulier dans le gène CCL2 avait tendance à être plus fréquent chez les patients atteints de MFM que dans la population générale. Ces résultats nous ont incités à utiliser des modèles de souris pour explorer le rôle du CCL2 dans la biodisposition des matériaux particuliers. Les études sur la perte de fonction du CCL2 ont été réalisées en utilisant des souris CCL2^{-/-} ayant subi une injection intramusculaire de 40 µl d'Al-Rho.

Les expériences sur le gain de fonction du CCL2 consistaient d'abord en une co-injection de 10 µl de rCCL2 pour murin (100 µg/ml, R&D, Minneapolis, MN, États-Unis) avec 40 µl d'Al-Rho. Les ganglions ont été retirés à J4, la rate, le cerveau et le sang à J21. Lors d'autres expériences la rCCL2 pour murin a été perfusée dans le cerveau par un cathéter inséré stéréotaxiquement dans le striatum à J7 après injection de l'Al-Rho, alimenté à l'aide d'une micropompe osmotique implantée en sous-cutané fixée dans le cou (Kit de perfusion cérébrale 0,25 µl/heure, Charles River, L'Arbresle, France). Le rCCL2 a été perfusé pendant 14 jours (taux de perfusion 180 pg/jour), avec ou sans injection intramusculaire de rCCL2 concomitante avec l'injection d'Al-Rho. A J21 après l'injection d'Al-Rho, les animaux ont été sacrifiés et le sang et les tissus prélevés. Pour les témoins, des pompes osmotiques remplies de PBS ont été utilisées.

Préparation des tissus et comptage des particules

Les souris sous anesthésie terminale ont été sous perfusion transcardiaque avec du PBS suivi de paraformaldéhyde (PFA) à 4 % glacé, dans un tampon phosphate 0,1 M. Les tissus et les organes ont été retirés, fixés dans le PFA pendant 4 heures à 4 °C, immergés le lendemain dans une solution de sucrose à 30 % à 4 °C, puis congelés rapidement. Les cerveaux entiers ont été coupés en série de sections coronales de 40 µm (dans un cryostat), de 20 µm pour la rate et le muscle et de 10 µm pour les ganglions. Ces sections ont ensuite été stockées à -20 °C jusqu'au traitement ou au comptage des particules. Les coupes de cerveau ont été déposées successivement sur 10 lames Superfrost® différentes afin d'obtenir 10 séries identiques, permettant ainsi de déterminer la teneur totale en particules en multipliant par 10 le nombre de particules trouvées dans une série. Une approche similaire a été utilisée pour les ganglions et la rate. Le sang a été prélevé par ponction cardiaque et 100 µl ont été prélevés pour le comptage des particules.

Immunohistochimie et coloration Morin

L'immunocoloration a été effectuée à l'aide d'anticorps primaires du commerce utilisés habituellement en laboratoire, dirigés contre les antigènes CD11b (1/200, AbD Serotec, Oxford, Royaume-Uni), F4/80 (1/50, AbCam, Cambridge, UK), GFAP (1/200, DakoCytomation, Trappes, France), vimentine (1/500 DakoCytomation), collagène IV (1/100 Millipore, Temecula, CA, États-Unis), NG2 (1/200, Millipore, Molsheim, France), MAP2 (1/100, Sigma- Aldrich, Lyon, France), et IL1β (1/100, AbCam, Paris, France) ou de IgG de souris non spécifiques (JacksonImmunoResearch, Suffolk, Royaume-Uni). Puis les anticorps de rat et de lapin biotinylés (1/200, Vector Laboratories, Paris, France) ont été utilisés en conséquence et ont été révélés à l'aide de streptavidine conjuguée à de l'Alexa fluor 488 (1/200 Invitrogen, Cergy-Pontoise, France). Le marquage des neurones a été réalisé à l'aide du colorant Nissl fluorescent bleu NeuroTrace®, en suivant les instructions du fabricant (Invitrogen). L'aluminium a été coloré avec du colorant Morin (M4008-2 G, Sigma-Aldrich) en 0,2 g dissous dans une solution composée d'acide acétique à 0,5 % et d'éthanol à 85 % [21]. La formation d'un complexe fluorescent avec de l'aluminium a été détectée sous une longueur d'onde d'excitation de 420 nm sous forme d'une fluorescence vert intense avec une émission caractéristique de 520 nm. Les cœurs des nanohybrides (Gd2O3) enrobés dans une coque de polysiloxane n'ont notamment pas été colorés positivement par la coloration Morin.

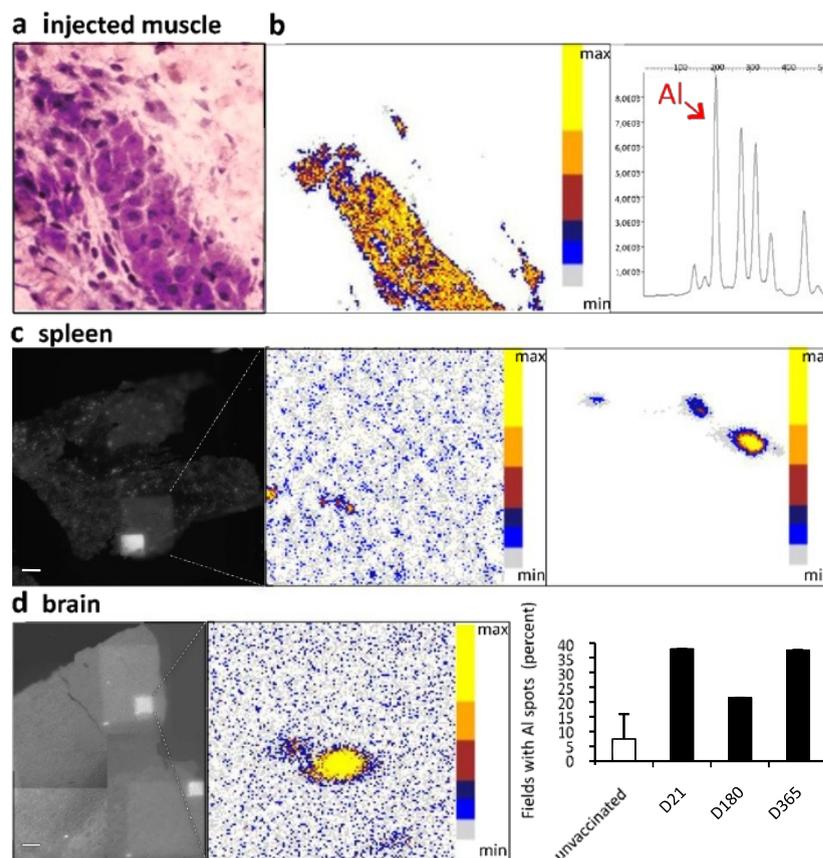


Figure 1 : dépôts d'aluminium dans les tissus après l'injection du vaccin contenant de l'alun dans le muscle TA. a) Un granulome composé de cellules PAS est formé dans l'enveloppe du muscle injecté ; b) Modélisation PIXE montrant des dépôts d'Al dans le muscle en pseudocouleurs avec un spectre d'émission d'Al confirmatoire (J21) ; c) Section de tissu de la rate (image de gauche) affichant les champs de protons larges de 500 x 500 µm et limités de 100 x 100 µm correspondant aux modèles PIXE (respectivement image du milieu et de droite) entourant les points d'Al éligibles (J21) ; d) Section de tissu cérébral (image de gauche) affichant le champ de protons de 100 x 100 µm limité correspondant au modèle PIXE (image du milieu) entourant les points d'Al éligibles (J21) ; le nombre de champs contenant un ou plusieurs points d'Al augmentait à chaque temps T, par comparaison avec les souris non vaccinées (image de droite). (Échelle : 100 µm).

J (d), jour (day); PIXE, émission de photons X induite par particules (particle induced X-ray emission), TA tibial antérieur.

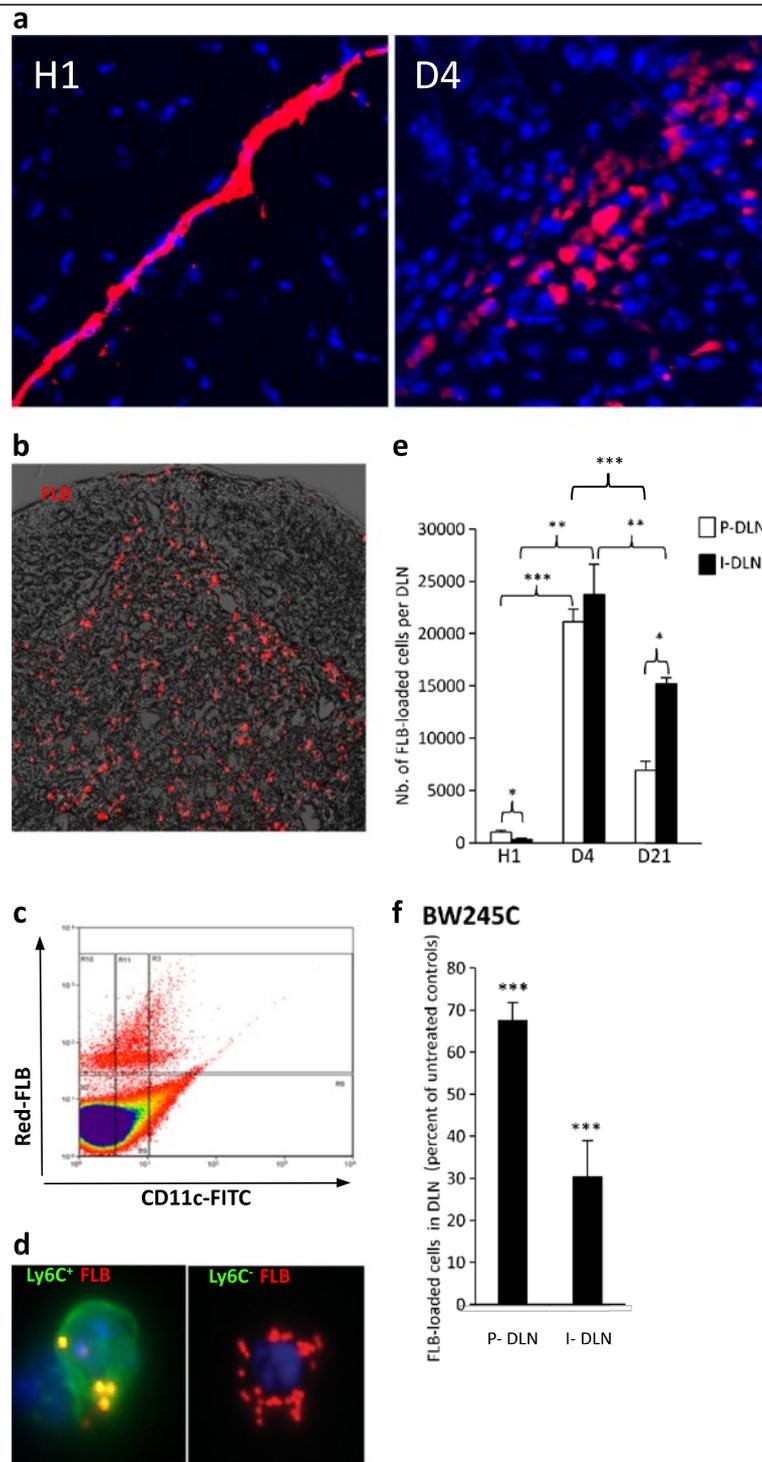
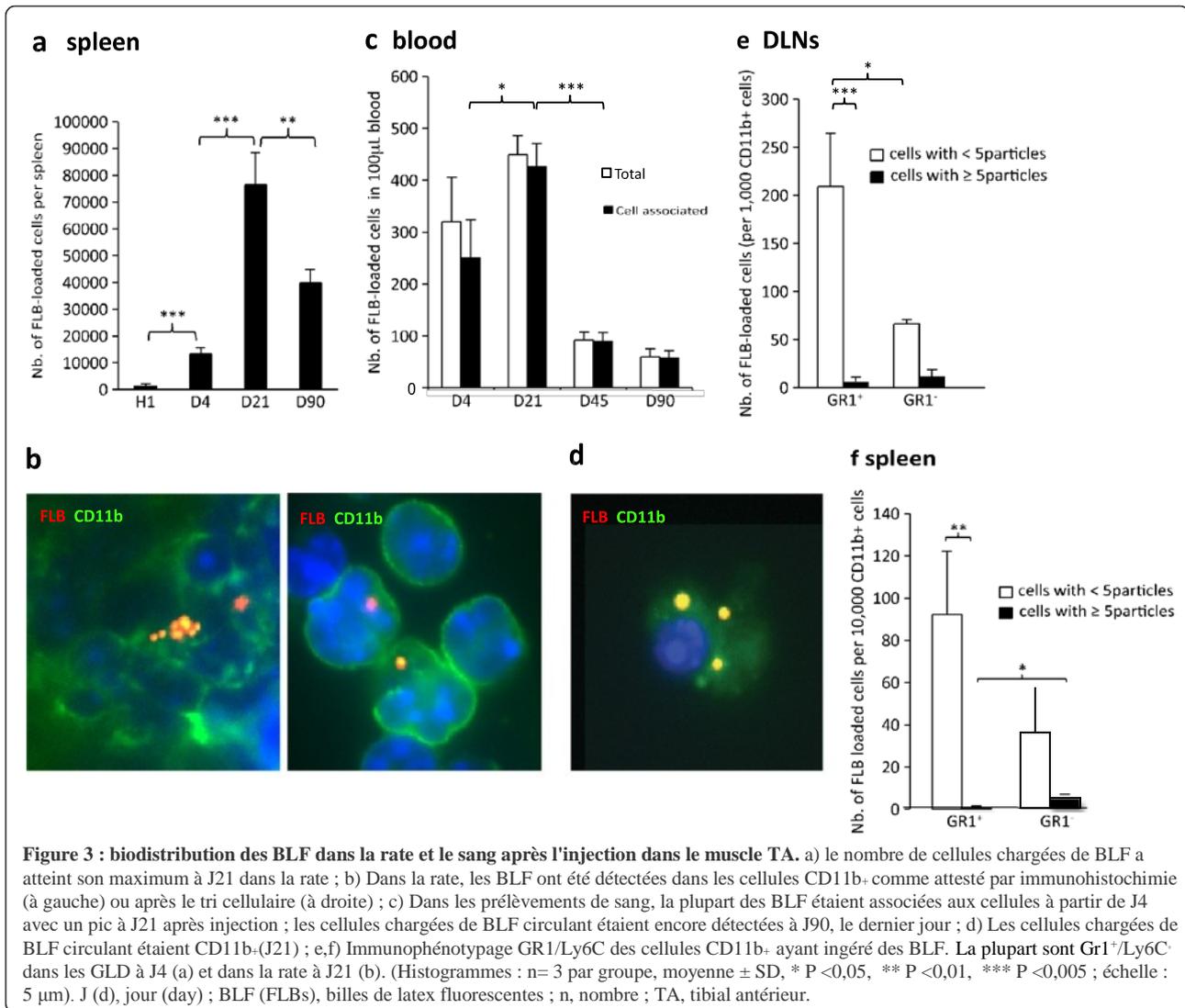


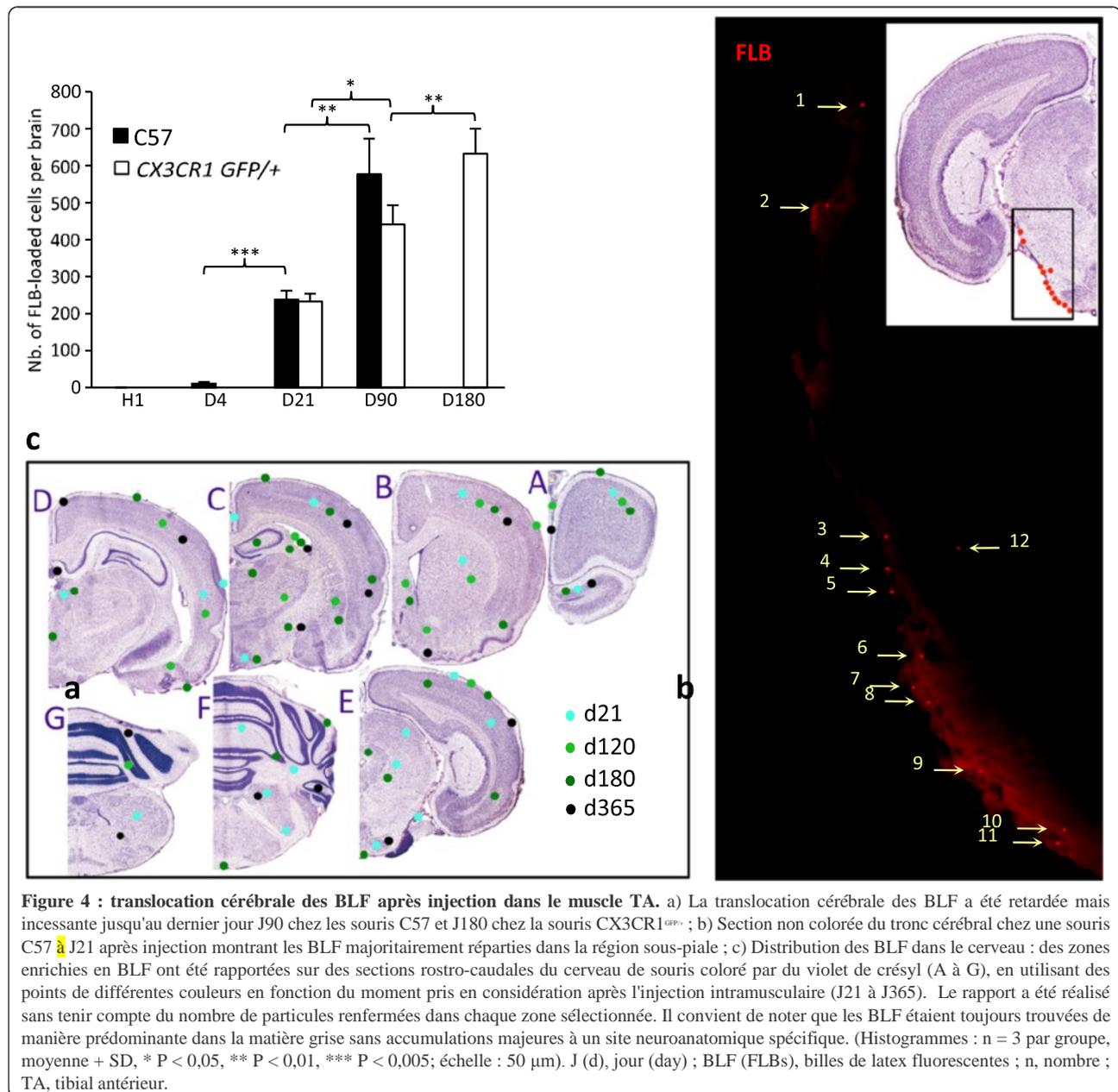
Figure 2 : translocation des FLB dans les ganglions après injection dans le muscle TA. a) Translocation marquée des FLB dans les zones parafolliculaires des ganglions poplités (J4); **b)** Cytométrie en flux montrant que la plupart des cellules chargées de BLF extraites du GLD expriment CD11c à un niveau intermédiaire ou élevé (J4) ; **c)** L'immunocytochimie des cellules CD11b⁺ extraites des GLD étaient généralement Gr1⁺/Ly6C⁺, surtout lorsqu'elles avaient ingéré quelques particules (à gauche), alors que celles lourdement chargées étaient souvent Gr1⁺/Ly6C⁺ (à droite) ; **d)** le nombre de cellules chargées de BLF a atteint son maximum J4 après injection dans les GLD poplités et inguinaux ; **e)** L'inhibiteur de migration BW245C co-injecté avec les BLF dans le muscle a réduit notablement le nombre de cellules chargées de BLF détectées dans les GLD J4 après injection. L'effet était plus prononcé dans le GLD inguinal en aval ; **f)** L'inhibiteur de migration BW245C co-injecté avec les BLF dans le muscle a réduit notablement le nombre de cellules chargées de BLF détectées dans les GLD J4 après injection. L'effet était plus prononcé dans le GLD inguinal en aval ; (histogrammes : n = 3 par groupe, moyenne + SD, * P < 0,05, ** P < 0,01, *** P < 0,005 ; échelle : 100 µm [a] ; 5 µm [c]). J (d), jour (day); GLD (DLNs), ganglions lymphatiques drainants ; BLF (FLB), billes de latex fluorescentes ; TA, tibial antérieur.



Au contraire, lorsqu'elles étaient recouvertes de Al(OH)₃, ces particules étaient fortement positives à la coloration Morin. La microscopie à fluorescence et les analyses spectrales ont été réalisées en utilisant des microscopes optiques confocaux Carl Zeiss.

Isolement de cellules du sang et des tissus et cytométrie en flux

Pour l'immunophénotypage des cellules du sang, un échantillon de sang (100 µl) a été traité avec de l'acide éthylène diamine tétraacétique (EDTA) et coloré avec des anticorps conjugués à l'isothiocyanate de fluorescéine (FITC). Les érythrocytes ont été lysés en utilisant la solution de lyse hypotonique, puis les cellules ont été lavées avec un (D)MEM et triées à l'aide d'un trieur de cellules MoFlo (Beckman Coulter, Villepinte, France). Les cellules ont été extraites des tissus des souris exsanguinées perfusées avec du PBS. Les tissus ont été prélevés et dissociés rapidement dans un (D)MEM. Les GLD et la rate ont été dissociés dans un (D)MEM contenant 0,2 % de collagénase B (Roche Diagnostics, Meylan, France) et 0,2 % de trypsine-EDTA à 37 °C pendant 45 minutes à deux reprises. Le tissu cérébral a été dissocié dans de la trypsine-HBSS à 1 % (Thermo Scientific HyClone, South Logan, Royaume-Uni) contenant 100 U/ml de ADNase (Roche Diagnostics). Les suspensions de cellules ont été filtrées et comptées. Les cellules CD45⁺ or CD11b⁺ ont été isolées en utilisant un système de tri magnétique (MACS, Miltenyi Biotec, Paris, France) et colorées avec l'un des anticorps suivants et leurs isotopes : l'anti-CD11b conjugué au FITC, l'anti-Ly-6C (GR1) conjugué au FITC, l'anti-CD11c conjugué au FITC (BD-Pharmingen Bioscience, San Diego, CA, États-Unis). Les cellules ont été triées en utilisant un trieur de cellules. Les populations présentant une pureté > 90 % ont été utilisées. Les cellules triées ont été cyto-centrifugées et colorées avec Hoechst-33342 pour le noyau. Les cellules chargées de particules ont été comptées avec un microscope à fluorescence.



Expériences de transplantation de la moelle osseuse

Les cellules de la moelle osseuse GFP+ ont été obtenues en rinçant les fémurs de souris CAG-GFP adultes et une injection rétro-orbitaire a été réalisée (1×10^7 cellules par souris) chez des souris C57BL/6 âgées de quatre semaines, comme décrit précédemment [15]. Les souris réceptrices ont été irradiées à 9,0 Gy J1 avant la transplantation et ont été traitées avec 10 mg/kg/jour de ciprofloxacine pendant 10 jours. Le chimérisme du sang > 90 % était contrôlé la troisième ou la quatrième semaine suivant la transplantation.

Analyses statistiques

Toutes les valeurs expérimentales sont présentées comme moyennes et écart type sauf indication autre. Les analyses statistiques ont utilisé le test de Student non apparié ; P < 0,05 était considéré comme significatif.

Résultats

L'injection intramusculaire de vaccin contenant de l'alun dans la souris induit le dépôt d'Al dans des tissus distants

Le vaccin contenant de l'alun (36 µl correspondant à 18 µg d'Al) a été d'abord injecté dans les muscles TA de souris C57BL6, induisant une réaction inflammatoire aiguë qui s'est stabilisée après J4 sous forme de collections de macrophages typiques chargés d'alun avec de grands cytoplasme positifs à l'acide périodique de Schiff et à l'hématoxyline dans les enveloppes des muscles (Figure 1a). En parallèle, la concentration locale dans le tissu d'Al déterminée par la spectrométrie d'absorption atomique a diminué de 50 % de l'injection à J4 et est restée ensuite stable jusqu'à J21 (respectivement 2 342, 1 122, et 1 180 µg/g de tissu musculaire sec).

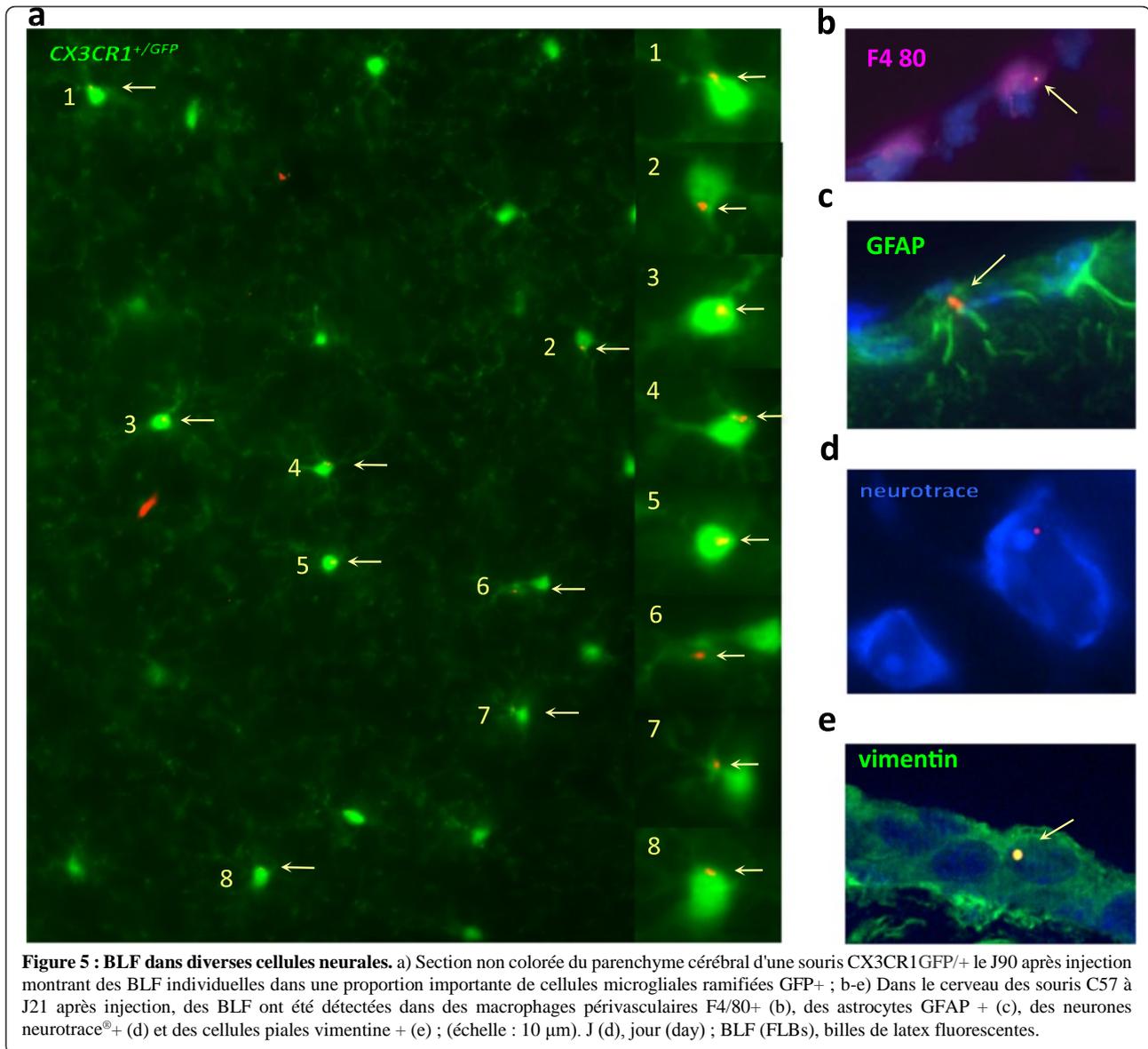


Figure 5 : BLF dans diverses cellules neurales. a) Section non colorée du parenchyme cérébral d'une souris CX3CR1GFP/+ le J90 après injection montrant des BLF individuelles dans une proportion importante de cellules microgliales ramifiées GFP+ ; b-e) Dans le cerveau des souris C57 à J21 après injection, des BLF ont été détectées dans des macrophages périvasculaires F4/80+ (b), des astrocytes GFAP+ (c), des neurones neurotrace⁺ (d) et des cellules piales vimentine+ (e) ; (échelle : 10 µm). J (d), jour (day) ; BLF (FLBs), billes de latex fluorescentes.

L'Al a été également localisé dans le muscle et les tissus distants par PIXE [19]. La numérisation aléatoire de sections de 20 µm d'épaisseur, échantillonnées et traitées avec une protection méticuleuse contre l'Al environnemental a révélé des signaux Al significatifs dans le muscle, la rate et le cerveau (Figure 1b-c). Dans le cerveau, toutes les taches d'Al constituaient 38, 21 et 37 % des champs de 500 × 500 µm testés respectivement à J21 et aux mois 6 et 12 (mo6 et mo12) après injection (moyenne = 31,5 % ; n = 73 champs, Figure 1d). La baisse au mois 6 est due soit aux variations interindividuelles lors de la manipulation de l'aluminium soit à des problèmes au niveau de l'échantillonnage liés aux proportions variables de matière grise et blanche dans les zones numérisées aléatoirement (voir ci-dessous). La taille des points est de 1 à 14 µm. En comparaison, cinq souris non vaccinées présentaient seulement sept points positifs sur 94 champs testés (moyenne= 7,4 %). Ces résultats ont confirmé que l'Al dérivé de l'alun peut migrer, pénétrer et persister dans le tissu cérébral [21-23]. Les dépôts d'Al détectés dans la rate et le cerveau pourraient résulter de la translocation physique des particules d'alun, de l'agrégation in situ de l'Al soluble, ou des deux.

Les fluorosphères injectées dans le muscle de la souris sont soumises à une biodistribution systémique et lymphatique

Pour examiner si les particules subissent une translocation vers des sites distants, nous avons injecté ensuite des BLF polychromatiques. Une taille de 500 nm a été choisie comme une approximation de la taille moyenne des agglomérats d'alun observés in vivo, permettant la visualisation des BLF comme sphères individuelles à l'aide de microscopes à fluorescence et confocaux (résolution >200 nm). Après injection intramusculaire de suspensions de 20 µl, les BLF ont culminé sous forme libre dans le sang de manière passagère (1 200 + 400 BLF par 100 µl) à l'heure 1.

Tableau 1 Distribution des particules (en pourcentage du total) en fonction du temps après l'injection

Durée après l'injection	J21	J90	J180	J365
Localisation				
Plexus choroïde	0 %	5 %	5 %	3 %
Leptoméninges	9 %	5 %	0 %	3 %
Parenchyme	91 %	90 %	95 %	94 %

Dès 1 heure après l'injection, certaines BLF avaient également atteint des GLD. L'injection intramusculaire de cellules GFP+ CD45+, déjà chargées de BLF ou co-injectées avec les BLF, n'a montré aucune translocation de cellules GFP+ dans les GLD à l'heure 1 (données non présentées ici), indiquant la translocation précoce de particules indépendantes de cellule vers les GLD par drainage lymphatique du liquide interstitiel musculaire [24]. Dans les GLD cependant, la plupart des BLF ont été associées à la cellule, suggérant une capture rapide par les cellules résidentes du GLD. Dans les 24 heures, les BLF ont été phagocytées par les MO/MP CD11b+ du muscle. Les phagocytes retirent progressivement les particules de l'interstitium pour former des colonies (Figure 2a) situées principalement dans les enveloppes des muscles à J4.

Les BLF ont spectaculairement augmenté dans les GLD à J4, formant des agglomérats intracellulaires dans la zone interfolliculaire (Figure 2b-e). Les cellules chargées de particules extraites des GLD à J4 étaient CD45+, CD11b+, et plus souvent GR1+/Ly6C+ (69 % à 81 %) et CD11c+, avec une intensité intermédiaire (46 %) ou élevée (22 %) (Figure 2a, c, d), correspondant ainsi aux CD et MP inflammatoires dérivées des MO [25].

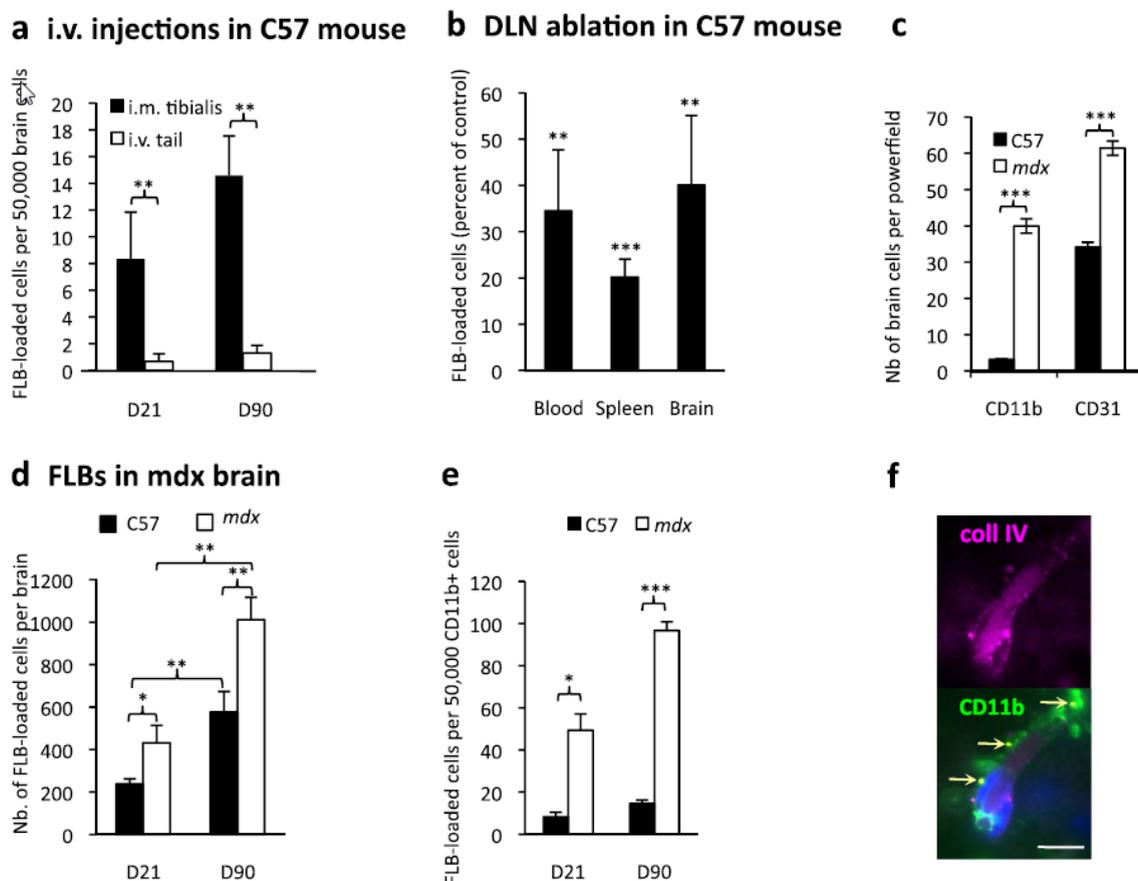


Figure 6 : mécanismes de translocation des BLF. a) En comparaison avec la voie intramusculaire, l'injection directe de BLF dans la veine de la queue des souris C57 n'a été associée avec aucune translocation cérébrale J21 et J90 après injection ; b) L'ablation du GLD inguinal et poplité a été associée à une diminution marquée des cellules chargées de BLF dans le sang, la rate et le cerveau J21 après injection ; c) La souris mdx avec une BHE altérée a présenté une augmentation marquée de la population de cellules CD11b+ périvasculaires ainsi qu'une angiogenèse significative indiquée par une augmentation des cellules endothéliales CD31+, en comparaison avec les souris C57 normales ; d-e) Les souris mdx ont présenté une incorporation augmentée de BLF dans le cerveau, en comparaison avec les souris C57, les souris mdx étaient dotées d'une neurodélivrance des BLF augmentée à J21 et à J90, comme indiqué par l'histologie (d) ou après le tri des cellules CD11b+ (e) ; f) A J21, les BLF ont été principalement détectées en dehors des membranes basales capillaires immunocolorées pour le collagène IV (en haut), associées de manière proche avec les macrophages périvasculaires CD11b. (en bas) ; (histogrammes : n = 3 par groupe, moyenne + SD, * P < 0,05, ** P < 0,01, *** P < 0,005 ; échelle dans d : 10 μm). J (d), jour (day) ; GLD (DLN) ganglion lymphatique drainant ; BLF (FLBs), billes de latex fluorescentes ; n, nombre

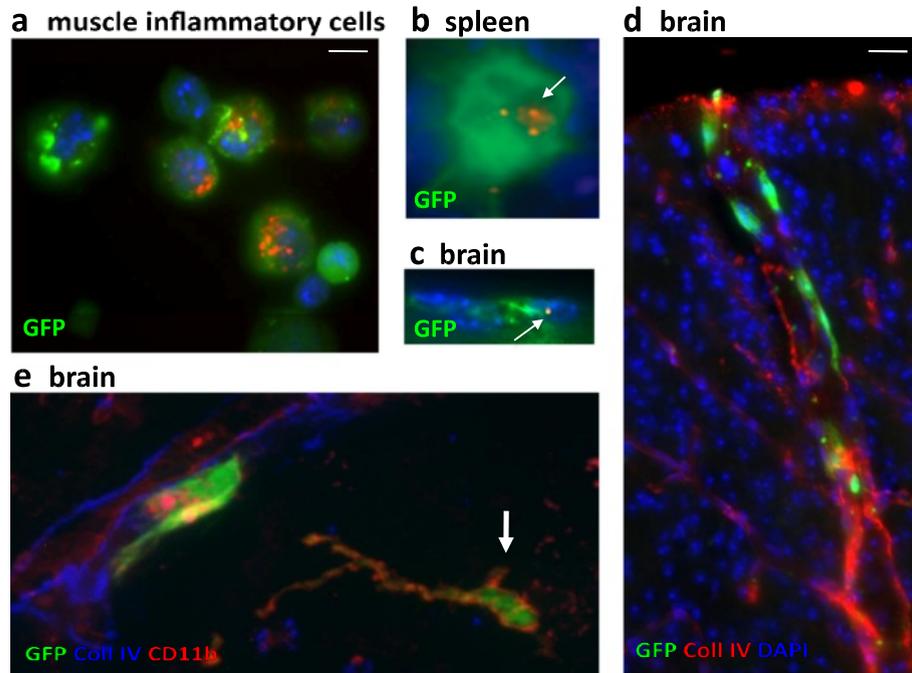


Figure 7 : souris avec moelle osseuse chimérique GFP⁺. a-c) Les souris chimériques ayant subi une injection intramusculaire de BLF ont présenté des cellules dérivées de la moelle osseuse GFP⁺ renfermant des BLF parmi les cellules inflammatoires extraites du muscle injecté (a) à J4 après injection des BLF, dans la rate (b) et le cerveau (c) à J33 après injection des BLF.

d-e) Les souris chimériques ont montré l'incorporation de cellules GFP⁺ dans le cerveau, principalement sous la forme de cellules périvasculaires dans le cortex (d) et, occasionnellement, dans des cellules CD11b⁺ ramifiées situées plus profondément (e, flèche) à J180 après transplantation de la moelle osseuse. (échelle : 10 µm). BM, moelle osseuse ; J (d), jour (day) ; BLF (FLBs), billes de latex fluorescentes.

La co-injection de BLF avec l'analogue synthétique de la prostaglandine BW245C, un composé connu pour empêcher la migration des CD [20], a inhibé la translocation des BLF vers les GLD à J4 respectivement à hauteur de 32 % dans les GLD poplités et à 69 % dans les GLD inguinaux (Figure 2f). Ceci indiquait un transport de particule important à l'intérieur des cellules phagocytaires, du moins en aval des GLD poplités. Au niveau des repères de temps plus tardifs, le nombre de cellules chargées de particules et la charge des cellules individuelles ont diminué toutes les deux dans les GLD de manière prononcée (Figure 2e). Alors qu'elles diminuaient dans les GLD, les BLF ont augmenté radicalement dans la rate du J4 au J21 (Figure 3a, b). Étant donné que la rate n'est pas connectée aux vaisseaux lymphatiques, le transfert de particules des GLD vers la rate impliquait une sortie du système lymphatique par le canal thoracique et une circulation dans le flux sanguin. Systématiquement, les points ont présenté à J21 un pic similaire de cellules CD11b⁺ chargées de BLF dans la circulation (Figure 3c, d). À partir de J4, les BLF étaient associées aux cellules (Figure 3d). La plupart des cellules chargées de BLF dans le sang, les GLD et la rate ont exposé quelques particules et étaient GR1⁺/Ly6C⁺ (Figure 3e, f). En revanche 22 % à 33 % de celles-ci étaient GR1⁻/Ly6C⁻ dans la rate et ont incorporé fréquemment >5 BLF, suggérant une maturation associée à la phagocytose des cellules dérivées des MO inflammatoires [20,25,26]. Les cellules chargées de BLF ont diminué de manière marquée dans la rate à J90. Bien que de manière dégressive après le J21, les cellules chargées de BLF ont encore été détectées dans le sang à J45 et J90.

L'incorporation de fluorosphères dans le cerveau est retardée et dépend de la charge des cellules au préalable dans les tissus lymphoïdes et périphériques

Des particules ont été détectées dans le cerveau principalement à partir de J21 après l'injection. Après J21 suivant l'injection intramusculaire, les BLF ont augmenté de manière graduelle dans le cerveau jusqu'au dernier jour J90 chez la souris C57Bl6 (Figure 4a, b) et jusqu'au dernier jour J180 chez la souris CX3CR1^{GFP/+} utilisée conventionnellement pour étudier la microglie résidente (Figures 4a et 5a). Les BLF ont été trouvées de façon prédominante dans la matière grise (82 % à 95 %), indépendamment de la quantité de BLF injectées (4, 10, 20 µl), de la co-injection de vaccin (36 µl) ou du temps suivant l'injection de J21 à J365. Certaines BLF ont été détectées dans les leptoméniges (9 %) et dans la substance blanche (9 %) à J21, mais ces localisations sont devenues rares avec le temps. Les BLF se trouvaient à < 5 % dans le plexus choroïde (Tableau 1). La distribution comparative des BLF au mois 3, mois 6 et mois 12 n'a montré aucune accumulation préminente de particules à un emplacement neuroanatomique (Figure 4c). Les BLF ont généralement été détectées dans le cerveau comme particules simples situées à l'intérieur ou à la surface des cellules, 37 % à 62 % des particules pourraient être assignées de manière fiable à un sous-ensemble de cellules par caractérisation immunohistochimique.

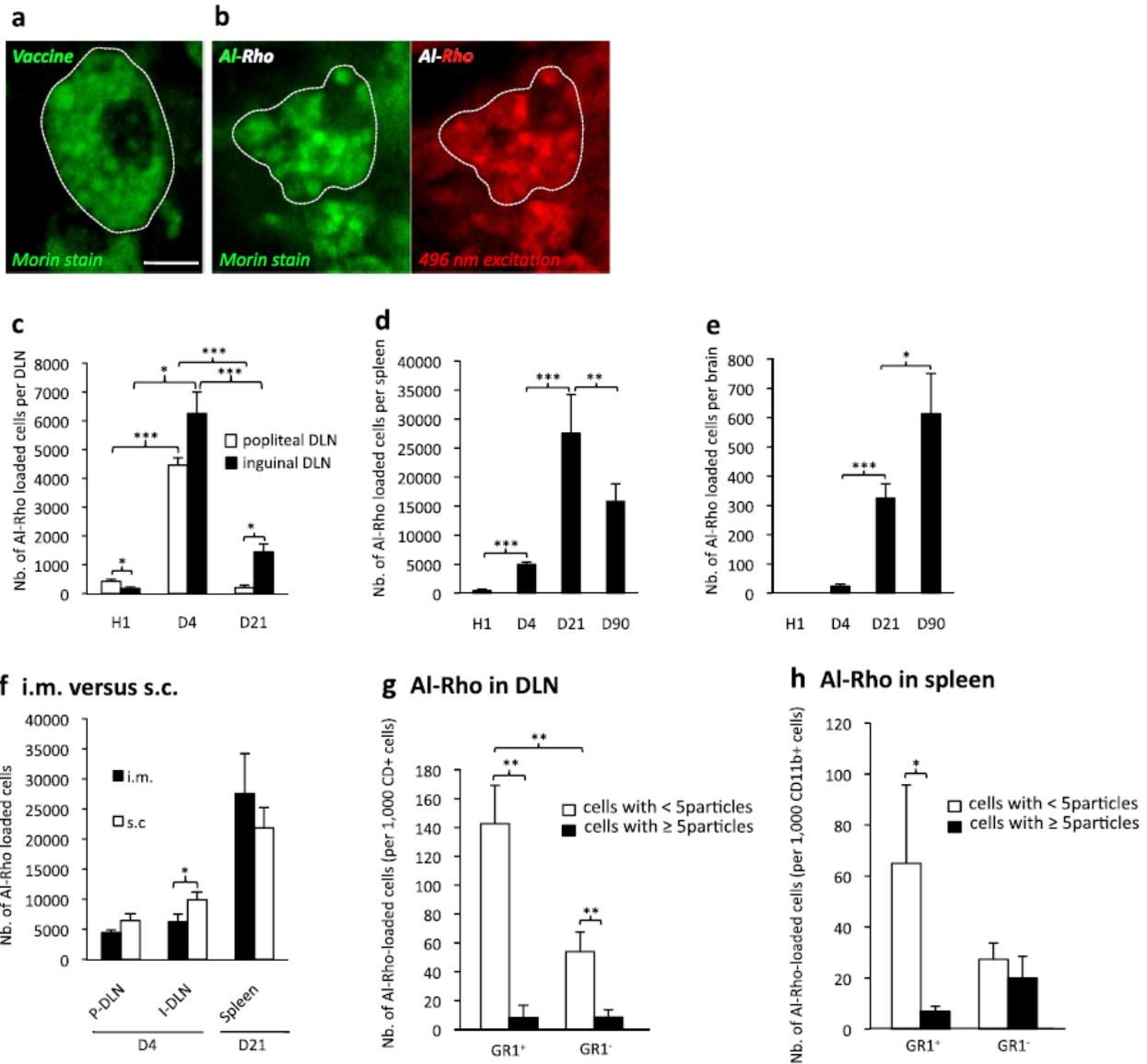


Figure 8 Biodistribution des particules d'Al. **a)** La coloration Morin pour l'aluminium a montré des agglomérats cytoplasmiques d'alun à l'intérieur des macrophages du muscle après administration du vaccin par voie intramusculaire chez une souris C57 ; **b)** La coloration Morin confirme que les nano-hybrides Al-Rho phagocytés sont associés avec l'Al et forment des particules similaires par leur taille aux agglomérats d'alun ; **c-e)** Les nano-hybrides Al-Rho présentent une distribution dépendante du temps dans les GLD, la rate et le cerveau, remarquablement similaire à celle des BLF ; **f)** L'Al-Rho injecté en sous-cutané subit une translocation vers les GLD et la rate, comme observé avec la voie intramusculaire ; **g, h)** Immunophénotypage Ly6C des cellules CD11b⁺ qui ont ingéré de l'Al-Rho : la plupart sont Gr1⁺/Ly6C⁺ dans les GLD à J4 (**g**) et dans la rate à J21 (**h**). (Histogrammes : n = 3 par groupe, moyenne ± SD, * P < 0,05, ** P < 0,01, *** P < 0,005; échelle dans a : 10 µm). J (d), jour (day) ; GLD (DLNs), ganglions lymphatiques drainants ; BLF (FLBs), billes de latex fluorescentes ; n, nombre.

À J21, les particules étaient principalement associées avec les macrophages CD11b⁺ périvasculaires, mais à J90 elles ont également été trouvées dans la microglie CX3CR1⁺ profonde (Figure 5a). Les particules ont également été détectées dans les astrocytes GFAP⁺, les neurones colorés au Neurotrace ou MAP2⁺ et les cellules leptoméningées vimentine⁺ (Figure 5b-e) ainsi que dans les péricytes/progénéiteurs oligodendrogliaux NG2⁺ (non montré). L'incorporation des BLF dans la microglie résidente ramifiée GFP⁺ des souris CX3CR1^{GFP/+} a fait augmenter jusqu'à 26 fois la valeur de J21 à J180.

Il est important de remarquer qu'en comparaison avec l'injection intramusculaire, la même quantité de BLF injectée dans la veine de la queue n'a entraîné presque aucun accès au cerveau à J21 et à J90 chez les souris C57B16 (Figure 6a). De plus, l'ablation des GLD inguinaux et poplités avant l'injection des BLF dans le muscle TA a entraîné une réduction de 60 % à 80 % de l'incorporation des BLF dans le sang, la rate et les compartiments du cerveau à J21 (Figure 6b). Ainsi, l'absorption de cellules dans le muscle et les GLD, ainsi que le trafic ultérieur des cellules dans le sang contribuent de manière décisive à la translocation retardée des particules vers la rate et le cerveau (Figure 6a-f).

Tableau 2 Moment d'observation d'un pic, et valeur du pic de cellules chargées de particules dans les organes étudiés (nombre total \pm SD)

Particule	GLD Poplité		GLD inguinal		Rate		Sang		Cerveau	
	Pic	Nombre de cellules chargées	Pic	Nombre de cellules chargées	Pic	Nombre de cellules chargées	Pic	Nombre de cellules chargées	Dernier point	Nombre de cellules chargées
BLF	J4	21 117 \pm 1 235	J4	23 746 \pm 2 880	J21	76,503 \pm 11 850	J21	9 878 \pm 792	J90	577 \pm 96
Al-Rho	J4	4 462 \pm 257	J4	6 253 \pm 745	J21	27 570 \pm 6 670	J21	7 546 \pm 1 034	J90	613 \pm 137

Dans la même logique, en injectant les BLF dans le muscle des souris avec moelle osseuse chimérique GFP+ obtenues par transplantation des cellules dérivées de la moelle osseuse GFP+ vers les souris C56Bl6 syngéniques [15], nous avons détecté des cellules GFP+ chargées de BLF dans ces organes (Figure 7a, b, c) et observé une incorporation retardée des cellules dérivées du donneur dans le cerveau (Figure 7d, e).

Ce modèle de transplantation de la moelle osseuse est connu pour être associé à une altération de la BHE induite par l'irradiation. Les souris mdx déficientes en dystrophine ont également chroniquement une BHE altérée [27]. En conséquence, en comparaison des témoins du même âge, elles présentaient beaucoup plus de capillaires cérébraux CD31+ ainsi qu'une augmentation radicale des macrophages CD11b+ périvasculaires (Figure 6c) au dépens de la microglie ramifiée profonde. L'injection de BLF dans le muscle de la souris mdx a entraîné une augmentation de l'incorporation de cellules dans le cerveau à J21 et J90, comme indiqué par l'histologie et les cyto-centrifugations des cellules CD45+/CD11b+ extraites du cerveau (Figure 6d, e, f). Ainsi, l'altération de la BHE et/ou la réponse angiogénique/inflammatoire associée favorise probablement l'incorporation cérébrale des cellules chargées de particules en circulation.

Les nanohybrides fluorescents enrobés d'Al(OH)₃ sont soumises à la dispersion systémique CCL2-dépendante et la pénétration dans le cerveau

Pour les expériences de confirmation nous avons fabriqué des particules fluorescentes imitant l'alun. Les nanohybrides de rhodamine [28] ont été enrobés de manière covalente avec une couche d'Al(OH)₃. Comme indiqué par la coloration Morin pour l'aluminium, ces particules d'Al-Rho ont été avidement phagocytées après injection intramusculaire et ont formé des agglomérats intracellulaires similaires par leur taille à l'adjuvant vaccinal (Figure 8a, b). La biodistribution du substitut fluorescent d'alun injecté dans le muscle TA était remarquablement similaire à celle des BLF (Tableau 2), dont le pic à J4 dans les GLD, le pic à J21 dans la rate, l'accès au cerveau retardé et l'association principale avec les MO GR1+/Ly6C+ dans les tissus (Figure 8c-h). En comparaison avec l'injection intramusculaire, l'injection en sous-cutané de particules d'Al-Rho était associée à un taux supérieur régulier de diffusion vers les GLD (Figure 8f), un résultat cohérent avec la présence de CD migratoires abondantes dans la peau.

En se basant sur l'étude PNS humaine, nous avons réalisé des expériences sur la perte et le gain de fonction du gène CCL2 pour étudier le rôle des cellules réceptives CCL2 dans la diffusion et la neurodélivrance des particules. L'injection de particules d'Al-Rho dans le muscle TA de souris déficientes en CCL2 a diminué l'incorporation des particules de 35 % dans le GLD poplité et de 76 % dans le GLD inguinal à J4, mais aussi de 71 %, 85 % et 82 % respectivement dans la rate, le sang et le cerveau à J21 (Figure 9a). Inversement, la biodistribution des particules d'Al-Rho a augmenté dans différentes expériences sur le gain de fonction du gène CCL2 (Figure 9b-d). La co-injection intramusculaire de l'Al-Rho avec CCL2 recombinante pour murin (rCCL2 : 1 μ g) a augmenté l'incorporation des particules de 47 % dans le GLD poplité et de 163 % dans le GLD inguinal (J4), mais aussi de 180 % dans la rate, 274 % dans le sang et de 341 % dans le cerveau (J21).

En outre, la perfusion cérébrale lente (i.c.) de CCL2 par une pompe osmotique (180 pg/jour pendant 15 jours à partir de J7 après l'injection intramusculaire d'Al-Rho) a augmenté l'incorporation des particules dans le cerveau de 74 % à J21 en comparaison avec le groupe témoin PBS. La combinaison de l'injection intramusculaire et de la perfusion i.c. de rCCL2 a augmenté l'incorporation des particules dans le cerveau de 539 %. Malgré d'importantes variations interindividuelles, une tendance constante d'augmentation (CCL2-dépendante) des niveaux d'Al dans le cerveau a été détectée 21 jours après l'injection intramusculaire de 40 μ l de vaccin contenant de l'alun (Figure 9e). Ensemble, ces résultats indiquent qu'après une injection intramusculaire, les particules associées à des MO inflammatoires peuvent accéder au cerveau en utilisant un mécanisme CCL2-dépendant, éventuellement par un mécanisme de cheval de Troie. Il est important de remarquer que les particules d'Al-Rho accédant au cerveau après injection intramusculaire sont restées intactes dans la mesure où elles étaient encore enrobées d'Al(OH)₃ comme attesté par coloration Morin (Figure 10a) et par PIXE (Figure 10b). Leur incorporation dans les cellules neurales a été constamment associée à l'expression de l'IL-1 β (Figure 10c), un marqueur fiable de l'activation de l'inflammasome NALP3 induit par les particules [29].

Les nanohybrides fluorescents enrobés d'Al(OH)₃ sont retenus dans le cerveau

Une accumulation apparemment irréversible des nanomatériaux après injection intramusculaire était propre aux tissus cérébraux qui manquent de voies lymphatiques conventionnelles, et peuvent retenir les cellules immunitaires [30]. Nous avons injecté stéréotaxiquement 0,5 μ l d'Al-Rho dans le striatum de souris C57Bl6 et compté les particules dans les GL cervicaux, le sang et la rate à J4 et J21. En comparaison avec la même quantité d'Al-Rho injectée dans le muscle TA, l'injection intracérébrale n'a été associée à presque aucune translocation de particules vers les GLD régionaux (Figure 10d) et à l'apparition de huit fois moins de particules dans la rate (Figure 10e). Étant donné que 25 particules libres d'Al-Rho par 100 μ l ont été détectées dans le sang à

l'heure 1, il est probable que les rares particules détectées ultérieurement dans la rate reflétaient le passage direct des particules dans le sang durant l'injection intracérébrale.

Il semble, par conséquent, que l'absence de recirculation contribue probablement à l'accumulation progressive des particules dans le cerveau.

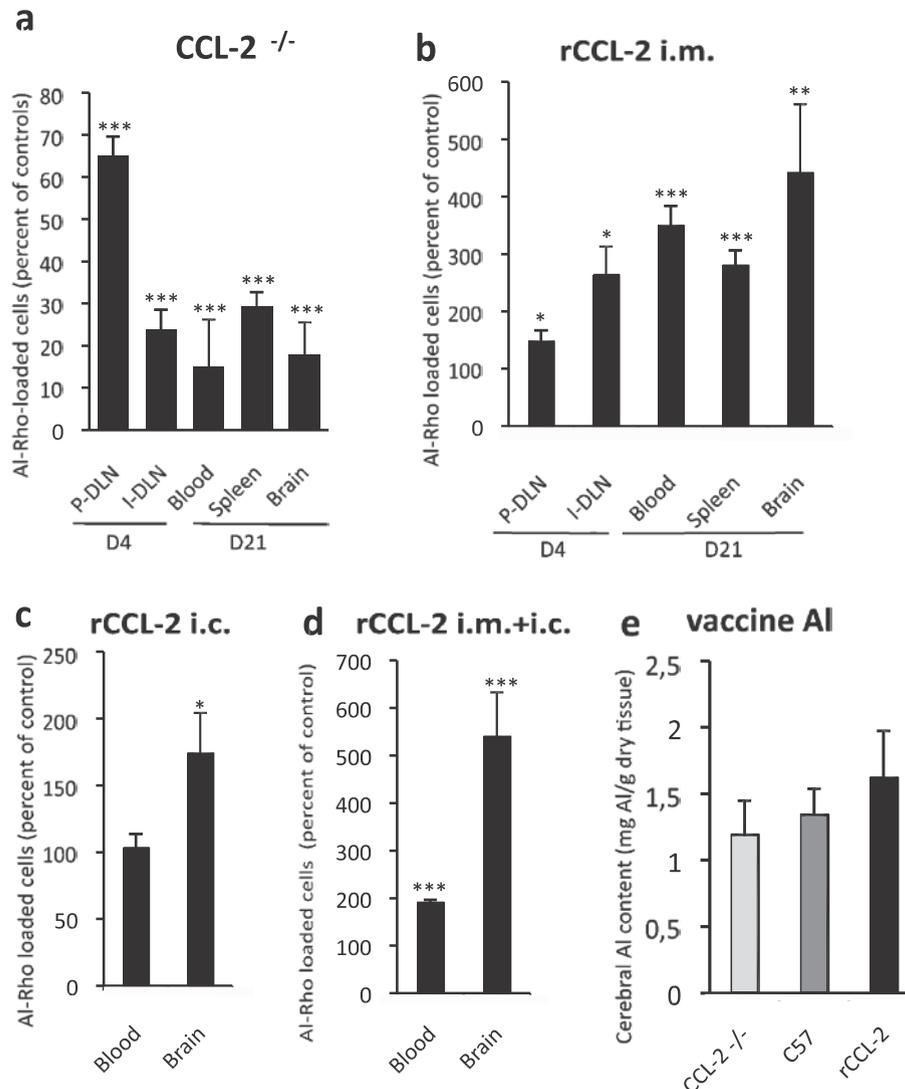
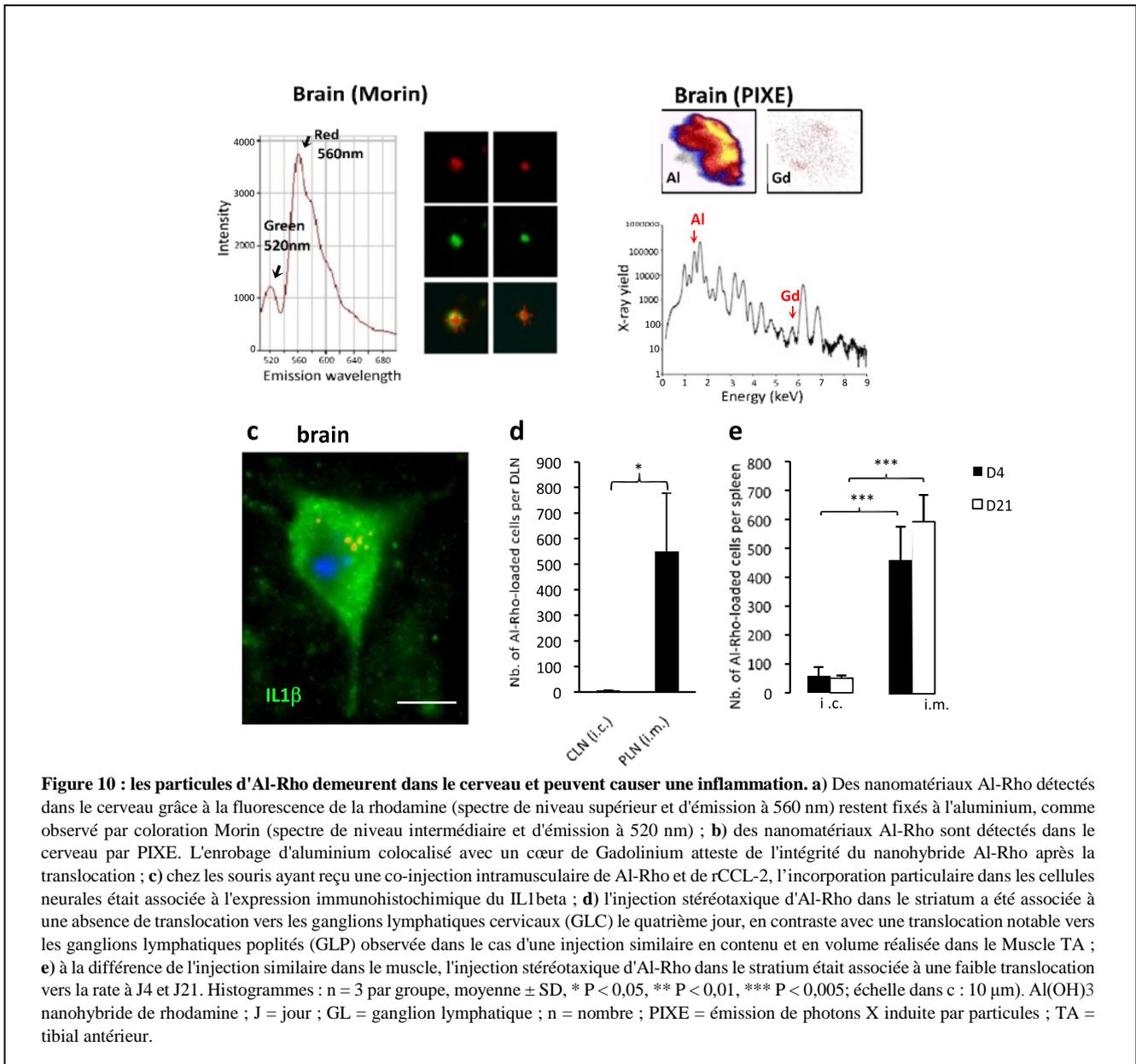


Figure 9 : translocation systémique CCL2-dépendante des particules d'Al. a) Les souris déficientes en CCL2 montrent une baisse radicale de la translocation de l'Al-Rho depuis le muscle injecté vers le GLD inguinal, le sang, la rate et le cerveau, en comparaison avec les témoins respectifs (100 %). Il convient de remarquer que la différence est significative mais moins prononcée pour le GLD poplité ; b) La co-injection de rCCL-2 avec l'Al-Rho est associée à augmentation radicale de la translocation de l'Al-Rho depuis le muscle injecté vers le GLD inguinal, le sang, la rate et le cerveau, en comparaison avec les témoins respectifs (100 %). Il convient de remarquer que la différence est significative mais moins prononcée pour le GLD poplité ; c) La rCCL-2 perfusée par une micropompe osmotique dans le striatum pendant 15 jours est associée à une augmentation significative de la translocation de l'Al-Rho depuis le muscle injecté vers le cerveau ; d) La combinaison de l'injection intramusculaire et intracérébrale de la rCCL2 est associée à une augmentation radicale de la translocation des BLF depuis le muscle vers le sang et le cerveau ; e) Le vaccin contenant de l'alun injecté dans le muscle de souris déficientes en CCL-2, normales et rCCL-2 a été associé à une tendance à l'augmentation CCL-2-dépendante des niveaux de concentration d'Al dans le cerveau ; (Histogrammes : n = 3 par groupe, moyenne ± SD, * P < 0,05, ** P < 0,01, *** P < 0,005, sauf [e] : n 10 par groupe, moyenne ± SEM). Al-Rho, nanohybride rhodamine Al(OH)₃ ; GLD, ganglions lymphatiques drainants; BLF (FLBs), billes de latex fluorescentes ; n, nombre ; SEM, erreur type de la moyenne.

Discussion

Les particules injectées par voie intramusculaire ou sous-cutanée peuvent accéder à des tissus distants. Les particules de latex et d'Al-Rho ont montré des biodistributions très semblables, supposant un mécanisme basique de dispersion commun. Leur assimilation initiale par les cellules à la périphérie et dans les tissus des GLD ainsi que leur transport ultérieur à l'intérieur des cellules inflammatoires dérivées des MO influent de manière essentielle, comme indiqué par l'immunophénotypage, le blocage de la migration cellulaire et l'ablation du GLD. Les cellules étaient fortement chargées en particules peu après l'injection intramusculaire, mais n'en contenaient généralement qu'une ou deux après J4 et en aval dans le GLD poplité, indiquant soit une dilution *via* la division cellulaire [31], soit une dissémination vers les autres cellules [32] au sein des GLD. Des études précédentes

ont rapporté un transport cellulaire des particules depuis la peau jusqu'aux GLD [25], toutefois le devenir des particules en aval reste extrêmement peu étudié. Des preuves solides démontrent que, dans des conditions inflammatoires, toutes les CD atteignant les GLD n'y meurent pas localement mais peuvent au contraire rejoindre le flux sanguin au moyen des circuits lymphatiques efférents et du canal thoracique, et présentent les antigènes dans la rate et dans la moelle osseuse [33]. Des particules adjuvantes ingérées stimulent ce phénomène qui, à tour de rôle, peuvent favoriser leur translocation depuis le point d'injection jusqu'à des sites plus distants, considérant que : (i) l'alun induit une différenciation rapide des cellules de la lignée monocytaire en CPA [34] et stimule leur migration vers les GLD [35], (ii) l'hydroxyde de béryllium, un adjuvant particulaire très similaire, stimule fortement leur évacuation par les canaux lymphatiques efférents [36] ; et, comme montré dans le présent document, (iii) des dépôts d'aluminium peuvent être détectés par PIXE dans la rate et le cerveau après une injection intramusculaire d'alun.



Une accumulation différée et progressive des particules se produit dans le cerveau intact. Des expériences utilisant le modèle de parabiose [37] ou évitant toute irradiation du cerveau avant une transplantation de moelle osseuse [38] ont montré que la microglie endogène n'est pas régénérée par la périphérie dans les conditions d'un SNC normal. Bien que le faible chimérisme inhérent à ces approches expérimentales puisse mener à une sous-estimation de la lente régénération de la microglie par la périphérie [39], une explication plus probable de nos résultats réside en l'action stimulante qu'exercent les particules sur le déplacement des cellules myéloïdes [36]. Les particules de latex comme les agglomérats d'hydroxyde d'aluminium alimentent l'inflammation [40,41] et la stimulation immunitaire non-spécifique peut augmenter la migration transendothéliale des monocytes jusqu'à 20 fois dans des modèles *in vitro* de la BHE [42]. Dans la même logique, l'injection intramusculaire de rCCL2 augmente fortement l'incorporation particulaire dans le cerveau intact alors que les souris déficientes en CCL2 présentaient une neurodélivrance réduite. Il est probable que la rCCL2 induise une libération par la moelle osseuse de MO inflammatoires et de cellules souches hématopoïétiques et

progénitrices [43], suivie de leur transmigration vers le muscle injecté et les GLD [44], puis de la fixation des particules et leur dissémination. La perfusion cérébrale de faibles doses de rCCL2, imitant des états pathologiques attirant les monocytes inflammatoires, augmente également la neurodélivrance des particules. Les particules intracérébrales ont subi avec un certain délai une translocation depuis les macrophages périvasculaires vers le réseau sentinelle de la microglie du parenchyme et vers d'autres cellules neurales résidentes, et ne parviennent probablement pas à rejoindre à nouveau la circulation, expliquant leur accumulation progressive dans le cerveau.

Conclusions

Dans l'ensemble, nos résultats indiquent que, à l'image des bactéries intra-cellulaires [45], les nanomatériaux peuvent être transportés par les cellules de la lignée monocyttaire vers les GLD, le sang et la rate, et, de même que le VIH [46] et d'autres pathogènes, peuvent utiliser la transmigration des monocytes au travers de la BHE médiée par les CCL2 pour pénétrer dans le cerveau. Ceci se produit à un taux extrêmement faible chez des souris normales et le pourcentage de particules injectées retrouvé dans les tissus est estimé à $1:10^5$ dans la rate à J21 et à $1:10^7$ dans le cerveau à J90, ce qui corrobore la théorie de l'excellente tolérance de la vaste majorité des individus à des doses limitées d'alun et à d'autres particules injectées. La neurodélivrance de nanomatériaux a montré une augmentation significative chez des souris dotées soit d'une BHE peu résistante soit de taux de CCL2 élevés dans les tissus, suspectés précédemment comme étant pathogènes chez l'homme [48]. D'un côté, une telle incorporation cérébrale de nanomatériaux injectés dans les tissus devrait être considérée comme une caractéristique intéressante dans le développement de stratégies thérapeutiques ayant pour cible le SNC. De l'autre, l'alun est doté d'un potentiel neurotoxique élevé [49], et la prévision d'une administration à la population de doses toujours plus nombreuses de cet adjuvant peu biodégradable devrait être étudiée plus sérieusement par les organismes de réglementation, au vu du danger insidieux qu'il pourrait représenter. Il est probable que la bonne tolérance de l'alun soit influencée par de nombreux facteurs, notamment la sur-vaccination, l'immaturation de la BHE, les facteurs de prédisposition individuelle et l'âge qui peut être associé à des altérations subtiles de la BHE et à une augmentation progressive de la production de CCL2 [50].

Documents supplémentaires

Document supplémentaire 1 : Annexe. Ressources supplémentaires

Abréviations

Al-Rho : Al(OH)₃ nanohybride de rhodamine ; CPA : cellule présentatrice d'antigène ; ASIA : syndrome auto-immun/inflammatoire induit par les adjuvants (autoimmune/inflammatory syndrome induced adjuvants) ; BHE : barrière hémato-encéphalique ; CCL2 : chimiokine ligand 2 (motif C-C) ; SNC : système nerveux central ; J : jour ; CD : cellule dendritique ; DEG : diéthylène glycol ; GLD : ganglions lymphatiques drainants ; DMEM : milieu modifié de Eagle (de Dulbecco) ; DMSO : diméthylsulfoxyde ; EDTA : acide éthylène diamine tétraacétique ; FITC : isothiocyanate de fluorescéine ; BLF : billes de latex fluorescentes ; SAAFG : spectrométrie d'absorption atomique à four graphite ; IL : interleukine ; mdx : souris déficiente en dystrophine ; MCP1 : monocyte chemoattractant protein 1 ; MFM : myofasciite à macrophages ; PBS : tampon phosphate salin ; PFA : paraformaldéhyde ; PIXE : émission de photons X induite par particules ; PNS : polymorphismes nucléotidiques simples ; MTA : muscle tibial antérieur ; FGCT : four graphite à chauffe transversale.

Conflits d'intérêt

Les auteurs déclarent l'absence de tout conflit d'intérêt.

Contributions des auteurs

ZK a réalisé des expériences sur des animaux et des traitements de tissus et participé à l'analyse des données ; CC a réalisé des études sur la génétique moléculaire ; FJA a fourni des données cliniques ; VI a effectué des traitements de tissus pour une analyse par PIXE et a participé à leur analyse ; FL a participé à la production de particules de substitution ; CE a effectué une détermination de l'Al dans les tissus ; MMY et PM ont participé à l'analyse par PIXE, XD a réalisé une analyse confocale ; OT a développé et fourni des particules de substitution ; RKG a développé et coordonné l'étude, l'analyse des données et rédigé le manuscrit ; JC a conçu l'étude, mené des expériences sur les animaux, analysé des données et préparé les figures, et participé à la rédaction du manuscrit.

Tous les auteurs ont lu et approuvé le manuscrit final.

Remerciements

Ce travail a bénéficié pour la recherche de financements de deux associations de patients : E3M (Entraide aux Malades de Myofasciite à Macrophages) « Neurodélivrance 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 de la Dwsoskin Foundation (Nano in brain) ; de la région Ile-de-France avec le programme PICRI (Partenariat Institutions-Citoyens pour la Recherche et l'Innovation) « Recherche de polymorphismes dans les gènes codant pour des facteurs inflammatoires (chimiokines) dans la myofasciite à macrophages » et de l'ANSM, procédure hors appel d'offre « Biopersistence and neuromigration of aluminic adjuvants of vaccines: genetic risk factors and experimental neurotoxicity. » Nous souhaitons remercier les personnes suivantes pour leurs précieuses

contributions : Dr Sophie Hue, Dr Fabrice Chrétien, Dr Madly Brigitte, Dr Anne Hulin, Lucie Poupel, Emilie House, Yasmine Baba-Amer, et Mathieu Surenaud.

Coordonnées des auteurs

¹ Inserm, U955, Créteil, 94000, France

² Université Paris Est, Faculté de Médecine, 8 rue du Général Sarrail, Créteil 94010, France.

³ Inserm, UMR-S 945, 91 Boulevard de l'Hôpital, Paris 75013, France.

⁴ Université Pierre et Marie Curie, Faculté de Médecine, 11 Boulevard de l'Hôpital, Paris 75013, France.

⁵ AP-HP, Groupe Hospitalier Pitié-Salpêtrière, Service d'Immunologie, 11 Boulevard de l'Hôpital, Paris 75013, France.

⁶ AP-HP, Hôpital H. Mondor - A. Chenevier, Service d'Histologie, Centre de Référence Neuromusculaire GNMH, 51 Avenue du Maréchal de Lattre de Tassigny, Créteil 94000, France.

⁷ CNRS UMR 5620, Laboratoire de Physico-Chimie des Matériaux Luminescents, 2 rue Victor Grignard, Villeurbanne 69622, France.

⁸ Université Claude Bernard Lyon 1, 2 rue Victor Grignard, Villeurbanne 69622, France.

⁹ The Birchall Centre, Lennard-Jones Laboratories,

Keele University, Staffordshire ST5 5BG, UK.

¹⁰ CNRS UMR 5797, Centre d'Etudes Nucléaires de Bordeaux Gradignan, Allée du haut Vignaud, Gradignan 33175, France.

¹¹ Faculté des Sciences et Technologie, UPEC, 61 Avenue du Général de Gaulle, Créteil, France.

¹² IMRB équipe 10, Faculté de Médecine, 8 rue du Général Sarrail, Créteil F-94010, France.

Date de réception : le 12 novembre 2012 Date de validation : le 7 mars 2013

Date de publication : le 4 avril 2013

Références

1. Committees on toxicity, mutagenicity and carcinogenicity of chemicals in food, consumer products and the environment (COT, COM, COC). Joint statement on nanomaterial toxicology. 2005. Available at <http://cot.food.gov.uk/pdfs/cotstatements2005nanomats.pdf>.
2. Dobrovolskaia MA, Aggarwal P, Hall JB, McNeil SE: Preclinical studies to understand nanoparticle interaction with the immune system and its potential effects on nanoparticle biodistribution. *Mol Pharm* 2008, 5:487–495.
3. Exley C, Siesjö P, Eriksson H: The immunobiology of aluminium adjuvants: how do they really work? *Trends Immunol* 2010, 31:103–109.
4. Gherardi RK, Coquet M, Cherin P, Belc L, Moretto P, Dreyfus PA, Pelissier JF, Chariot P, Authier FJ: Macrophagic myofasciitis lesions assess long-term persistence of vaccine-derived aluminium hydroxide in muscle. *Brain* 2001, 124:1821–1831.
5. Authier FJ, Cherin P, Creange A, Bonnotte B, Ferrer X, Abdelmoumni A, Ranoux D, Pelletier J, Figarella-Branger D, Granel B, Maisonneuve T, Coquet M, Degos JD, Gherardi RK: Central nervous system disease in patients with macrophagic myofasciitis. *Brain* 2001, 124:974–983.
6. Gherardi RK, Authier FJ: Aluminum inclusion macrophagic myofasciitis: a recently identified condition. *Immunol Allergy Clin North Am* 2003, 23:699–712.
7. Shoenfeld Y, Agmon-Levin N: 'ASIA' - autoimmune/inflammatory syndrome induced by adjuvants. *J Autoimmun* 2010, 36:4–8.
8. Authier FJ, Sauvat S, Champey J, Drogou I, Coquet M, Gherardi RK: Chronic fatigue syndrome in patients with macrophagic myofasciitis. *Arthritis Rheum* 2003, 48:569–570.
9. Couette M, Boisse MF, Maisonneuve P, Brugieres P, Cesaro P, Chevalier X, Gherardi RK, Bachoud-Levi AC, Authier FJ: Long-term persistence of vaccine-derived aluminium hydroxide is associated with chronic cognitive dysfunction. *J Inorg Biochem* 2009, 103:1571–1578.
10. Flarend RE, Hem SL, White JL, Elmore D, Suckow MA, Rudy AC, Dandashli EA: In vivo absorption of aluminium-containing vaccine adjuvants using 26Al. *Vaccine* 1997, 15:1314–1318.
11. Morefield GL, Sokolovska A, Jiang D, HogenEsch H, Robinson JP, Hem SL: Role of aluminum-containing adjuvants in antigen internalization by dendritic cells in vitro. *Vaccine* 2005, 23:1588–1595.
12. Hamilton JA, Byrne R, Whitty G: Particulate adjuvants can induce macrophage survival, DNA synthesis, and a synergistic, proliferative response to GM-CSF and CSF-1. *J Leukoc Biol* 2000, 67:226–232.
13. Verdier F, Burnett R, Michelet-Habchi C, Moretto P, Fievet-Groyne F, Sauzeat E: Aluminium assay and evaluation of the local reaction at several time points after intramuscular administration of aluminium containing vaccines in the Cynomolgus monkey. *Vaccine* 2005, 23:1359–1367.
14. Authier FJ, Sauvat S, Christov C, Chariot P, Raisbeck G, Poron MF, Yiou F, Gherardi R: Al(OH)₃-adjuvanted vaccine-induced macrophagic myofasciitis in rats is influenced by the genetic background. *Neuromuscul Disord* 2006, 16:347–352.
15. Brigitte M, Schilte C, Plonquet A, Baba-Amer Y, Henri A, Charlier C, Tajbakhsh S, Albert M, Gherardi RK, Chrétien F: Muscle resident macrophages control the immune cell reaction in a mouse model of notexin-induced myoinjury. *Arthritis Rheum* 2010, 62:268–279.
16. Carbone FR, Belz GT, Heath WR: Transfer of antigen between migrating and lymph node-resident DCs in peripheral T-cell tolerance and immunity. *Trend Immunol* 2004, 25:655–658.
17. Wang XY, Yao X, Wan YM, Wang B, Xu JQ, Wen YM: Responses to multiple injections with alum alone compared to injections with alum adsorbed to proteins in mice. *Immunol Lett* 2012, 149:88–92.
18. Cain DW, Sanders SE, Cunningham MM, Kelson G: Disparate adjuvant properties among three formulations of "alum". *Vaccine* 2013, 31:653–660.
19. Moretto P: Nuclear microprobe: a microanalytical technique in biology. *Cell Mol Biol* 1996, 42:1–16.
20. Wen GY, Wisniewski HM: Histochemical localization of aluminum in the rabbit CNS. *Acta Neuropathol* 1985, 68:175–184.
21. Redhead K, Quinlan GJ, Das RG, Gutteridge JM: Aluminium-adjuvanted vaccines transiently increase aluminium levels in murine brain tissue. *Pharmacol Toxicol* 1992, 70:278–280.
22. Sahin G, Varol I, Temizer A, Benli K, Demirdamar R, Duru S: Determination of aluminum levels in the kidney, liver, and brain of mice treated with aluminium hydroxide. *Biol Trace Elem Res* 1994, 41:129–135.
23. Kivellä R, Silvennoinen M, Lehti M, Kainulainen H, Vihko V: Effects of acute exercise, exercise training, and diabetes on the expression of lymphangiogenic growth factors and lymphatic vessels in skeletal muscle. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2007, 293:H2573–H2590.
24. Randolph GJ, Inaba K, Robbiani DF, Steinman RM, Muller WA: Differentiation of phagocytic monocytes into lymph node dendritic cells in vivo. *Immunity* 1999, 11:753–761.

25. Allan RS, Waithman J, Bedoui S, Jones CM, Villadangos JA, Zhan Y, Lew AM, Shortman K, Heath WR, Carbone FR: Migratory dendritic cells transfer antigen to a lymph node-resident dendritic cell population for efficient CTL priming. *Immunity* 2006, 25:153–162.
26. Arnold L, Henry A, Poron F, Baba-Amer Y, van Rooijen N, Plonquet A, Gherardi RK, Chazaud B: Inflammatory monocytes recruited after skeletal muscle injury switch into anti-inflammatory macrophages to support myogenesis. *J Exp Med* 2007, 204:1057–1069.
27. Nico B, Frigeri A, Nicchia GP, Corsi P, Ribatti D, Quondamatteo F, Herken R, Girolamo F, Marzullo A, Svelto M, Roncali L: Severe alterations of endothelial and glial cells in the blood–brain barrier of dystrophic mdx mice. *Glia* 2003, 42:235–251.
28. Fizez J, Rivière C, Bridot L, Charvet N, Louis C, Billotey C, Raccourt M, Morel G, Roux S, Perriat P, Tillement O: Multi-luminescent hybrid gadolinium oxide nanoparticles as potential cell labeling. *J Nanosci Nanotechnol* 2009, 9:5717–5725.
29. Hornung V, Bauernfeind F, Halle A, Samstad EO, Kono H, Rock KL, Fitzgerald KA, Latz E: Silica crystals and aluminum salts activate the NALP3 inflammasome through phagosomal destabilization. *Nat Immunol* 2008, 9:847–856.
30. Weller RO, Djuanda E, Yow HY, Carare RO: Lymphatic drainage of the brain and the pathophysiology of neurological disease. *Acta Neuropathol* 2009, 117:1–14.
31. Kabashima K, Banks TA, Ansel KM, Lu TT, Ware CF, Cyster JG: Intrinsic lymphotoxin-beta receptor requirement for homeostasis of lymphoid tissue dendritic cells. *Immunity* 2005, 22:439–450.
32. Angeli V, Ginhoux F, Llodrà J, Quemeneur L, Frenette PS, Skobe M, Jessberger R, Merad M, Randolph GJ: B cell-driven lymphangiogenesis in inflamed lymph nodes enhances dendritic cell mobilization. *Immunity* 2006, 24:203–215.
33. Cavanagh LL, Bonasio R, Mazo JB, Halin C, Cheng G, van der Velden AW, Cariappa A, Chase C, Russell P, Starnbach MN, Koni PA, Pillai S, Weninger W, von Andrian UH: Activation of bone marrow-resident memory T cells by circulating antigen-bearing dendritic cells. *Nat Immunol* 2005, 6:1029–1037.
34. Rimaniol AC, Gras G, Verdier F, Capel F, Grigoriev VB, Porcheray F, Sauzeat E, Fournier JG, Clayette P, Siegrist CA, Dormont D: Aluminum hydroxide adjuvant induces macrophage differentiation towards a specialized antigen-presenting cell type. *Vaccine* 2004, 22:3127–3135.
35. Kool M, Soullié T, van Nimwegen M, Willart MA, Muskens F, Jung S, Hoogsteden HC, Hammad H, Lambrecht BN: Alum adjuvant boosts adaptive immunity by inducing uric acid and activating inflammatory dendritic cells. *J Exp Med* 2008, 205:869–882.
36. Hall JG: Studies on the adjuvant action of beryllium, I. Effects on individual lymph nodes. *Immunology* 1998, 53:105–113.
37. Ajami B, Bennett JL, Krieger C, Tetzlaff W, Rossi FM: Local self-renewal can sustain CNS microglia maintenance and function throughout adult life. *Nat Neurosci* 2007, 10:1538–1543.
38. Mildner A, Schmidt H, Nitsche M, Merkler D, Hanisch UK, Mack M, Heikenwalder M, Brück W, Priller J, Prinz M: Microglia in the adult brain arise from Ly-6C^{hi}CCR2⁺ monocytes only under defined conditions. *Nat Neurosci* 2007, 10:1544–1553.
39. Prinz M, Mildner A: Microglia in the CNS: immigrants from another world. *Glia* 2011, 59:177–187.
40. Inoue K, Takano H, Yanagisawa R, Koike E, Shimada A: Size effects of latex nanomaterials on lung inflammation in mice. *Toxicol Appl Pharmacol* 2009, 234:68–76.
41. Pauluhn J: Pulmonary toxicity and fate of agglomerated 10 and 40 nm aluminium oxyhydroxides following 4-week inhalation exposure of rats: toxic effects are determined by agglomerated, not primary particle size. *Toxicol Sci* 2009, 109:152–167.
42. Persidsky Y, Stins M, Way D, Witte MH, Weinand M, Kim KS, Bock P, Gendelman HE, Fiala M: A model for monocyte migration through the blood–brain barrier during HIV-1 encephalitis. *J Immunol* 1997, 158:3499–3510.
43. Si Y, Tsou CL, Croft K, Charo IF: CCR2 mediates hematopoietic stem and progenitor cell trafficking to sites of inflammation in mice. *J Clin Invest* 2010, 120:1192–1203.
44. Palframan RT, Jung S, Cheng G, Weninger W, Luo Y, Dorf M, Littman DR, Rollins BJ, Zweierink H, Rot A, von Andrian UH: Inflammatory chemokine transport and presentation in HEV: a remote control mechanism for monocyte recruitment to lymph nodes in inflamed tissues. *J Exp Med* 2001, 193:1361–1373.
45. Chackerian AA, Alt JM, Perera TV, Dascher CC, Behar SM: Dissemination of Mycobacterium tuberculosis is influenced by host factors and precedes the initiation of T-cell immunity. *Infect Immun* 2002, 70:4501–4509.
46. Drevets DA, Dillon MJ, Schawang JS, Van Rooijen N, Ehrchen J, Sunderkötter C, Leenen PJ: The Ly-6C^{high} monocyte subpopulation transports Listeria monocytogenes into the brain during systemic infection of mice. *J Immunol* 2004, 172:4418–4424.
47. Eugenin EA, Osiecki K, Lopez L, Goldstein H, Calderon TM, Berman JW: CCL2/monocyte chemoattractant protein-1 mediates enhanced transmigration of human immunodeficiency virus (HIV)-infected leukocytes across the blood–brain barrier: a potential mechanism of HIV-CNS invasion and NeuroAIDS. *J Neurosci* 2006, 26:1098–1106.
48. Gonzalez E, Rovin BH, Sen L, Cooke G, Dhandra R, Mummidu S, Kulkarni H, Bamshad MJ, Telles V, Anderson SA, Walter EA, Stephan KT, Deucher M, Mangano A, Bologna R, Ahuja SS, Dolan MJ, Ahuja SK: HIV-1 infection and AIDS dementia are influenced by a mutant MCP-1 allele linked to increased monocyte infiltration of tissues and MCP-1 levels. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002, 99:13795–13800.
49. Shaw CA, Petrik MSJ: Aluminum hydroxide injections lead to motor deficits and motor neuron degeneration. *J Inorg Biochem* 2009, 103:1555–1562.
50. Galimberti D, Fenoglio C, Lovati C, Venturelli E, Guidi I, Corrà B, Scalabrini D, Clerici F, Mariani C, Bresolin N, Scarpini E: Serum MCP-1 levels are increased in mild cognitive impairment and mild Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging* 2006, 27:1763–1768.

doi:10.1186/1741-7015-11-99

Citer cet article ainsi : Khan et al: Slow CCL2-dependent translocation of biopersistent particles from muscle to brain. *BMC Medicine* 2013 11:99.