

## ***Des nanodiamants fluorescents comme marqueurs pertinents pour l'évaluation de la biodisposition des particules d'adjuvants aluminiques***

Nom de la publication en anglais : ***Fluorescent nanodiamonds as a relevant tag for the assessment of alum adjuvant particle biodisposition***

Nom de la publication en français : ***Des nanodiamants fluorescents comme marqueurs pertinents pour l'évaluation de la biodisposition des particules d'adjuvants aluminiques***

Publié dans la revue : *BMC Medicine* (2015) 13:144, DOI 10.1186/s12916-015-0388-2

Accepté le 3 juin 2015 - Publié en ligne le 17 juin 2015

Par les auteurs suivants : Housam Eidi<sup>1,3\*</sup>, Marie-Odile David<sup>1</sup>, Guillemette Crépeaux<sup>3</sup>, Laetitia Henry<sup>1</sup>, Vandana Joshi<sup>1</sup>, Marie-Hélène Berger<sup>2</sup>, Mohamed Sennour<sup>2</sup>, Josette Cadusseau<sup>3,4</sup>, Romain K. Gherardi<sup>3†</sup> et Patrick A. Curmi<sup>1†</sup>

<sup>1</sup> Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (INSERM) - UMR 1204, Université Evry-Val d'Essonne, Laboratoire Structure-Activité des Biomolécules Normales et Pathologiques, Evry, France

<sup>3</sup> Inserm - U955, Université Paris Est, Faculté de Médecine, Créteil, France

La liste complète des informations sur les auteurs est disponible à la fin de l'article.

Traduction effectuée par Héloïse Marguier et relue par Isabelle Meyer, traductrices diplômées en Traductions Scientifiques et Techniques. Choix des extraits traduits : Association E3M

### **Résumé :**

Sujet : L'oxyhydroxyde d'aluminium (alun) est un composé nanocristallin largement utilisé dans les vaccins comme adjuvant immunologique. Des inquiétudes concernant les particules d'alun ont émergé suite à la découverte de leur implication dans la survenue de lésions focales appelées myofasciite à macrophages (MFM) chez des patients souffrant d'encéphalomyélite myalgique. Ceci révéla une biopersistance durable et inattendue de l'alun dans les cellules immunitaires, ainsi qu'une mécompréhension de son élimination dans le corps. Le fait que les particules d'aluminium phagocytées dans les muscles suite à une injection et dans les ganglions lymphatiques qui y sont associés puissent se disséminer via les phagocytes dans l'ensemble de l'organisme et s'accumuler peu à peu dans le cerveau incite à ce que l'innocuité de l'alun sur le long terme soit évaluée. Toutefois, en l'absence d'un marqueur spécifique, il est difficile d'évaluer de petites quantités de particules d'adjuvants aluminiques authentiques présents dans les tissus.

Méthodes : Nous avons étudié la faisabilité de l'utilisation de nanodiamants fluorescents (mfNDs) comme marqueurs permanents de l'alun (Alhydrogel®). Les mfNDs sont dotés d'une fluorescence spécifique et parfaitement photostable basée sur la présence à l'intérieur de la structure du diamant de centres azote-lacune (*nitrogen-vacancy centers – NV Centers*). Un centre azote-lacune ne perdant

---

<sup>1</sup> Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (INSERM) - UMR 1204, Université Evry-Val d'Essonne, Laboratoire Structure-Activité des Biomolécules Normales et Pathologiques, Evry, France

<sup>3</sup> Inserm - U955, Université Paris Est, Faculté de Médecine, Créteil, France La liste complète des informations sur les auteurs est disponible à la fin de l'article.

pas sa coloration, cela permet une détection microspectrométrique des mfNDs à des niveaux faibles et sur le long terme. Pour cette raison, nous avons développé des nanodiamants fluorescents fonctionnalisés par du polyglycérol hyper-ramifié (mfNDs) qui permet un bon couplage ainsi qu'une bonne stabilité des complexes alun : mfNDs (AluDia). Les spécificités des complexes AluDia étaient comparables à celles du vaccin de référence (vaccin contre l'hépatite B) en termes de taille des particules et de potentiel zêta.

Résultats : In vivo, l'injection d'AluDia a été suivie d'une phagocytose immédiate et grâce au signal spécifique des particules de fND, les particules d'AluDia sont restées facilement détectables dans le muscle ayant subi l'injection, les ganglions lymphatiques, la rate, le foie et le cerveau. In vitro, les mfNDs se sont révélés peu toxiques pour les cellules THP-1 et l'AluDia a présenté une toxicité cellulaire similaire à celle de l'alun seul. Comme prévu, l'AluDia a provoqué l'autophagie et a permis de détecter de façon hautement spécifique de faibles quantités d'alun dans les autophagosomes.

Conclusions : La technologie des nanodiamants fluorescents est capable de dépasser les limitations des fluorophores organiques utilisés auparavant et apparaît alors comme une méthodologie de choix pour l'étude de la distribution, de la persistance et de la neurotoxicité à long-terme des adjuvants aluminiques, voire d'autres types de nanoparticules.

## 1. Sujet

Comprendre comment le corps réagit à de petites particules sur le long terme, plus précisément à celles qui interagissent avec le système immunitaire, est l'un des objectifs principaux des recherches récentes. Par exemple, des préoccupations liées à l'utilisation de particules d'aluminium comme adjuvant vaccinal (l'oxyhydroxyde d'aluminium ou « alun ») ont émergé après qu'elles furent identifiées comme facteur causal de la lésion focale appelée myofasciite à macrophages (MFM). Ceci a révélé une conception fondamentalement erronée du devenir de l'alun dans l'organisme et montré une biopersistance durable inattendue au sein des cellules immunitaires [2]. Ces recherches ont également démontré la capacité de l'alun à migrer vers les organes lymphoïdes, à se disperser dans l'ensemble de l'organisme via les cellules de la lignée monocytaire et à s'accumuler peu à peu dans le cerveau [3].

Il semble très probable qu'un faible nombre d'individus vraisemblablement prédisposés et exposés à des matières particulaires dotées de propriétés adjuvantes, par exemple les adjuvants aluminiques ou le silicone dérivé des implants mammaires, puisse développer progressivement des réactions inflammatoires/auto-immunes systémiques et neurologiques de type « ASIA » [7]. Ces individus présentent généralement une persistance durable des particules à l'intérieur des cellules de la lignée monocytaire, soit au site d'une injection antérieure d'un vaccin contenant de l'aluminium, i.e. MFM, soit à proximité d'un implant mammaire présentant des fuites [8].

La présente étude a pour but d'évaluer la possibilité de mettre au point un complexe fluorescent très pertinent pour les vaccins, en marquant l'adjuvant aluminique lui-même (Alhydrogel®) au moyen de nanodiamants fluorescents modifiés (mfNDs).

Dans la présente étude, l'Alhydrogel® utilisé dans les vaccins a été marqué avec des mfNDs formant le complexe AluDia. Dans un premier temps, nous avons déterminé, dans différentes conditions, les propriétés physicochimiques de l'AluDia, notamment sa morphologie, sa taille, son potentiel zêta et sa stabilité. Ensuite, nous avons étudié le devenir de l'AluDia après injection dans le muscle d'une souris, en termes de formation et persistance des granulomes et de biodistribution vers des organes distants. Enfin, nous avons analysé les effets des AluDia sur des macrophages et des neurones en culture en terme de cytotoxicité, d'internalisation, de stabilité et de comportement intracellulaire.

## **2. Méthodes**

### **Modèle de souris**

Huit souris mâles C57BL ont été utilisées. Seize souris CD1 femelles ont été utilisées pour observer la taille des granulomes dans les muscles ayant reçu l'injection de particules d'AluDia, à 45, 135, 180 et 270 jours après l'injection (quatre souris à chaque fois). Les souris ont été tenues à l'écart de tout matériel contenant de l'aluminium, nourries avec de la nourriture pour animaux manufacturée, disposant d'eau à volonté et exposées à des cycles de lumière et d'obscurité de 12 h.

### **Administration des AluDia**

La dose d'AluDia injectée aux souris a été proportionnellement adaptée pour correspondre au nombre moyen de doses du vaccin ENGERIX B® pour adulte reçues par les patients atteints de MFM. Une dose de 20 µL d'AluDia, correspondant à 400 µg d'Al/kg, a été injectée dans le muscle tibial des souris.

### **Préparation du tissu et comptage des particules**

À 7 et 21 jours post-injection, les souris ont reçu une perfusion transcardiaque de tampon phosphate salin (PBS) sous anesthésie terminale. Les tissus et les organes ont été prélevés et rapidement congelés. Les cerveaux entiers ont été découpés en cryosections coronales de 40 µm, la rate et les muscles de 20 µm et les ganglions lymphatiques (GL) de 12 µm, puis stockés à -20 °C jusqu'au moment du comptage des particules ou du traitement. Les coupes de tissu ont été placées successivement sur 10 lames Superfrost®-Plus différentes pour obtenir 10 séries identiques, de façon à pouvoir déterminer le nombre total de particules présentes en multipliant par 10 le nombre de particules observées dans une seule série.

### **Immunohistochimie et coloration Morin**

Un marquage des cellules CD11b a été utilisé pour observer les cellules de la lignée monocytaire, notamment les macrophages dans les muscles ayant reçu l'injection.

La formation d'un complexe Morin fluorescent avec de l'aluminium a été détectée par la présence d'une intense fluorescence verte avec un rayonnement caractéristique de 520 nm sous une excitation de 420 nm.

## **3. Résultats et discussion**

### **Caractérisation des particules**

Dans les conditions physiologiques de notre étude, la taille et le potentiel zêta des particules d'AluDia étaient très similaires à ceux de l'alun seul ou de l'alun associé à l'antigène du virus de l'hépatite B.

Ainsi, les propriétés physicochimiques du complexe AluDia étaient aussi proches que possible de celles du vaccin contre l'hépatite B, rendant les mfNDs pertinents pour une étude plus approfondie de son utilisation comme marqueur des particules d'alun.

### **Observations in vivo**

#### *Formation de granulomes au site de l'injection*

La coupe sériée du muscle à J 45, J 135, J 180 et J 270 après l'inoculation de l'AluDia a montré une rétraction progressive des granulomes dans le muscle (tableau 2), comme indiqué précédemment chez le rat [30]. À 270 jours après l'injection, sur les trois souris testées, l'une ne présentait plus

aucun granulome dans le muscle, tandis que les deux autres ne montraient que de petits granulomes résiduels dans le muscle.

#### *Translocation de l'AluDia depuis le site d'injection vers les organes distants*

L'ALuDia injecté dans le muscle tibial antérieur de la souris a été suivi d'une biodistribution lymphatique et systémique des particules (Tableau 3), comme indiqué précédemment avec d'autres particules fluorescentes [3].

De la même façon que les particules nanohybrides d'alun-rhodamine (AlRho) utilisées par Khan et al. [3], l'AluDia a atteint les Ganglions Lymphatiques (GL) inguinaux, comme observé au jour 7, puis ont quitté les GL qui se sont partiellement vidés au jour 21. Il a été intéressant d'observer une augmentation de la quantité de particules d'AluDia dans la rate au jour 7 (54 500 particules) suivie d'une diminution au jour 21 (7 000 particules). Cet afflux massif d'alun dans la rate au jour 7 n'a pas été mentionné auparavant dans l'étude de Khan et al. [3] qui ne comprenait aucun point d'étude intermédiaire entre les jours 4 et 21. Cette observation correspond au délai d'apparition d'une réponse immunitaire primaire dans les organes lymphoïdes. Des particules ont également été détectées dans le foie, un organe qui n'a pas été étudié par Khan et al. [3], mais qui, comme montré antérieurement, absorbe les adjuvants aluminiques via la circulation sanguine [31]. Outre les connaissances complémentaires apportées par l'analyse de différents points d'étude dans le temps et d'organes supplémentaires, l'utilisation de l'AluDia nous a permis de confirmer notre hypothèse précédente selon laquelle les particules d'alun migrent à partir du site d'injection vers les GL puis vers des organes distants non connectés aux vaisseaux lymphatiques [3].

Quatre cerveaux ont été examinés à J 21 après l'injection intramusculaire d'AluDia. En cohérence avec le faible taux d'incorporation cérébral des particules indiqué auparavant à ce stade proche de l'injection [3], chacun des quatre cerveaux contenait  $15 \pm 4$  particules d'AluDia, formant généralement de petits amas dans le cervelet ou dans le cortex cérébral.

Comme on le voit sur la Fig. 3j-l, la coloration Morin pour l'aluminium a révélé que le mfNDs et l'alun colocalisaient dans la plupart des particules, alors que des particules occasionnelles étaient uniquement positives soit pour la coloration Morin soit pour le fND.

Ces données prouvent définitivement que les adjuvants aluminiques des vaccins peuvent réellement pénétrer dans le cerveau [3]. Ceci se produit sous une forme particulaire et imite la translocation cérébrale de particules infectieuses telles que des bactéries intracellulaires, le HIV et d'autres pathogènes [32–34].

#### **4. Conclusion**

Nous avons développé une méthode de traçage des particules d'adjuvant aluminique dans le but de pouvoir comprendre leur devenir, leur durée de persistance, leur accumulation supposée et leur impact sur les organes et l'organisme grâce à leur marquage avec des nanodiamants fonctionnalisés. La détection des mfNDs par photoluminescence est facile à mettre en place à différentes échelles et permet une estimation détaillée de leur biodistribution dans les organes et dans l'organisme jusqu'au niveau infracellulaire. Le marquage des particules d'adjuvant avec les mfNDs n'affecte ni les propriétés physicochimiques ni les effets biologiques de celles-ci. Ainsi, les nanodiamants fluorescents modifiés par du polyglycérol hyper-ramifié semblent être un outil biocompatible et nouveau pour analyser tous les aspects de la biodisposition de l'alun.