



HAL
open science

Autophagie, inflammation et toxicité des particules aluminiques dans un paradigme d'encéphalomyélite myalgique / syndrome de fatigue chronique

Jean-Daniel Masson

► **To cite this version:**

Jean-Daniel Masson. Autophagie, inflammation et toxicité des particules aluminiques dans un paradigme d'encéphalomyélite myalgique / syndrome de fatigue chronique. Sciences agricoles. Université Paris-Est Créteil Val-de-Marne - Paris 12, 2021. Français. NNT : 2021PA120030 . tel-04064488

HAL Id: tel-04064488

<https://theses.hal.science/tel-04064488>

Submitted on 11 Apr 2023

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

Thèse de doctorat

Présentée pour l'obtention du titre de
Docteur de l'Université Paris Est mention Sciences de la vie et de la santé

par Jean-Daniel MASSON

*Autophagie, inflammation et toxicité des particules aluminiques dans un
paradigme d'Encéphalomyélite Myalgique/Syndrome de Fatigue Chronique*

Soutenue publiquement le 13 décembre 2021

Travail réalisé au sein de l'IMRB (INSERM U955), Equipe Relaix BNMS

Sous la direction de :

Romain K GHERARDI, Professeur émérite (Directeur de thèse)
Guillemette CRÉPEAUX, MCU (Co-encadrante de thèse)

Membres du jury :

Rapporteurs

Marie-Chantal CANIVENC-LAVIER

CR, Institut national de la recherche agronomique, GSGA, Dijon

Guillaume GARCON

PU, Université de Lille, ULR4483-IMPECS, Lille

Examineurs

Julie PEIFFER

IR, Institut national de l'environnement industriel et des risques, Verneuil-en-Halatte

André PICOT

Professeur émérite, Directeur honoraire CNRS (Président du jury)

Cécile VINDIS

DR, Université Paul Sabatier, Inserm I2MC- UMR1048, Toulouse

Invité

Marie-Odile DAVID

MCU, Université d'Evry-Val-d'Essonne, INSERM U 1204, Evry

Encadrement

Guillemette CRÉPEAUX

MCU, École Nationale Vétérinaire d'Alfort, Maisons Alfort

Romain K GHERARDI

Professeur émérite, Université Paris Est Créteil, Créteil

Résumé

Autophagie, inflammation et toxicité des particules aluminiques dans un paradigme d'Encéphalomyélite Myalgique/Syndrome de Fatigue Chronique

La vaccination est une avancée majeure de la médecine moderne ayant permis d'éradiquer certaines maladies et d'endiguer la propagation de nombreuses autres. Malgré une bonne tolérance par la population générale, certains individus présentent des difficultés d'élimination des particules aluminiques utilisées comme adjuvant vaccinaux. Ces patients présentent une lésion histopathologique musculaire caractéristique, biopersistante sur le long terme et composée de cellules immunitaires présentant des inclusions intracellulaires de cristaux aluminiques. Cette lésion, associée à un ensemble d'arthromyalgie, de fatigue chronique et de troubles cognitifs, est appelée myofasciite à macrophages (MFM).

Les vaccins à base d'aluminium sont des particules pseudo-infectieuses gérées comme des agents pathogènes par des cellules présentatrices d'antigènes via endocytose et élimination ultérieure par l'intermédiaire de la machinerie xéno/autophagique. Par ailleurs, la littérature scientifique a montré que l'oxy-hydroxyde d'aluminium, l'un des principaux adjuvants, peut perturber la réponse autophagique. Cela conforte l'idée que l'intolérance aux adjuvants aluminiques pourrait être la conséquence d'une interaction de type « gènes x environnement » reposant sur une déficience de l'autophagie dans les cellules de l'immunité comme facteur de susceptibilité individuelle aux particules d'aluminium d'origine vaccinale.

Les réponses autophagiques et inflammatoires des cellules immunitaires isolées en réponse aux particules aluminiques n'étant pas totalement caractérisées parmi la population globale. Le travail de thèse présenté dans ce manuscrit a donc eu pour premier objectif d'étudier ces réponses chez des individus sains avant de comparer les résultats avec ceux obtenus chez des individus atteints de MFM. Les données ont démontré que de nombreuses interactions entre les mécanismes d'endocytose, d'autophagie et d'inflammation sont mises en œuvre par les cellules de l'immunité en réponse à la présence de particules d'aluminium. Des expérimentations complémentaires seront nécessaires afin de caractériser finement les différentes intrications entre ces mécanismes. Cependant, certaines observations ont laissé entrevoir de subtiles variations de réponse au sein des cellules immunitaires des patients MFM exposés à des particules aluminiques. Ces cellules ont ainsi présenté un équilibre entre autophagie et endocytose penchant en faveur de l'endocytose et associé à une réponse inflammatoire réduite par rapport aux individus sains. Ces observations sont en accord avec la littérature scientifique actuelle et pourraient être principalement la conséquence plus que la cause de l'état de santé des patients MFM.

Suite aux observations *in vitro*, des analyses exploratoires *in vivo* ont été menées afin de développer un modèle murin avec des perturbations de l'autophagie pour étudier l'importance de ce mécanisme dans la prise en charge et le devenir des particules aluminiques. Une étude longue a été réalisée pour tester l'efficacité d'un traitement pharmacologique (hydroxychloroquine) à perturber l'autophagie sans induire de toxicité. Nos résultats montrent

que, bien qu'apparemment non toxique pour les animaux, le traitement utilisé n'a pas été en mesure de perturber l'autophagie sur le long terme. Par conséquent, l'étude de l'importance du mécanisme autophagique dans la translocation des particules d'aluminium a été réalisée en privilégiant un modèle de KO génétique. Les données ont confirmé les précédentes observations faites sans mettre en avant de rôle majeur de l'autophagie dans le déplacement des particules d'aluminium depuis le site d'injection initial, au regard du faible effectif d'animaux disponibles pour cette étude.

En conclusion, ce travail a permis de mettre en évidence une prise en charge des particules aluminiques d'origine vaccinale d'une grande complexité, nécessitant une approche pluridisciplinaire pour être finement décrite.

Mots clés : Adjuvant aluminique, autophagie, inflammation, toxicité, souris, Encéphalomyélite myalgique/ Syndrome de Fatigue Chronique

Abstract

Autophagy, inflammation and toxicity of aluminum particles in a paradigm of Myalgic Encephalomyelitis/Chronic Fatigue Syndrome

Vaccination is a major advance in modern medicine that has eradicated some diseases and stemmed the spread of many others. Despite good tolerance by the general population, some individuals have difficulties clearing aluminum particles used as vaccine adjuvants. These patients have a characteristic muscle histopathological lesion, biopersisting over the long term and composed of immune cells with intracellular inclusions of aluminum crystals. This lesion, associated with a set of arthromyalgia, chronic fatigue and cognitive impairment, is called macrophagic myofasciitis (MMF).

Aluminum-based vaccines are pseudo-infectious particles managed as pathogens by antigen-presenting cells via endocytosis and subsequent elimination via xeno/autophagic machinery. In addition, the scientific literature has shown that aluminum oxy-hydroxide, one of the main adjuvants, can disrupt the autophagic response. This supports the idea that intolerance to aluminum adjuvants could be the consequence of a "gene x environment" interaction based on a deficiency of autophagy in immunity cells as a factor of individual susceptibility to aluminum particles of vaccine origin.

The autophagic and inflammatory responses of isolated immune cells in response to aluminum particles are not fully characterized among the overall population. The first objective of the thesis work presented in this manuscript was therefore to study these responses in healthy individuals before comparing the results with those obtained in individuals with MMF. The data demonstrated that many interactions between the mechanisms of endocytosis, autophagy and inflammation are implemented by immunity cells in response to the presence of aluminum particles. Additional experiments will be necessary in order to finely characterize the different entanglements between these mechanisms. However, some observations have suggested subtle variations in response within the immune cells of MMF patients exposed to aluminum particles. These cells thus presented a balance between autophagy and endocytosis leaning in favor of endocytosis and associated with a reduced inflammatory response compared to healthy individuals. These observations are in agreement with the current scientific literature and could be primarily the consequence more than the cause of the health condition of MMF patients.

Following *in vitro* observations, *in vivo* exploratory analyses were conducted to develop a mouse model with autophagy disturbances to study the importance of this mechanism in the management and fate of aluminum particles. A long study was conducted to test the effectiveness of a pharmacological treatment (hydroxychloroquine) in disrupting autophagy without inducing toxicity. Our results show that, although apparently non-toxic to animals, the treatment used was not able to disrupt autophagy in the long term. Therefore, the study of the importance of the autophagic mechanism in the translocation of aluminum particles was carried out by favoring a genetic KO model. The data confirmed previous observations made

without highlighting a major role for autophagy in the movement of aluminum particles from the initial injection site, given the small number of animals available for this study.

In conclusion, this work has made it possible to highlight a management of aluminum particles of vaccine origin of great complexity, requiring a multidisciplinary approach to be finely described.

Key words: Aluminum adjuvant, autophagy, inflammation, toxicity, mice, Myalgic Encephalomyelitis/Chronic Fatigue Syndrome

REMERCIEMENTS

En premier lieu je tiens évidemment à adresser un immense merci à Guillemette Crépeaux. Merci d'avoir cru en moi dès le départ de cette aventure, au-delà de la thèse en soit. Merci pour ton soutien, tes encouragements et ta bienveillance durant ces années, toujours avec humour, même corrosif et c'est d'autant plus appréciable. Tu as modifié, j'espère durablement, mon paysage épi-génétique et je suis fier, au regard d'autres doctorants, de travailler avec une personne que j'apprécie, respecte et que j'ai la chance de pouvoir appeler, une amie... Merci !

Romain Gherardi, comment résumer ces années... : J'ai découvert le médecin en même temps que la Myofasciite à macrophages et si le charisme et la prestance du scientifique impressionne, l'Homme sait mettre à l'aise par sa gentillesse et sa bonhomie. Merci infiniment pour votre pédagogie lors de nos réunions où mes questions, parfois farfelues, ont toujours été considérées avec indulgence. Merci pour votre confiance et votre disponibilité, pour vos nombreux conseils et enseignements. Peu à peu l'Homme est devenu Mentor et j'aspire à atteindre cette force de conviction et cet état de connaissances qui vous caractérisent.

J'adresse également tous mes remerciements aux membres du jury, Marie-Chantal Canivenc-Lavier, Guillaume Garçon, Marie-Odile David, Cécile Vindis, Julie Peiffer et André Picot, pour avoir accepté de faire partie du groupe expert en charge d'évaluer ce travail. Dans le même temps, je remercie particulièrement les membres de mon comité de pilotage, Cécile Vindis et Julie Peiffer pour vos précieux conseils lors des réunions annuelles et pour vos encouragements à améliorer les expérimentations et les techniques pour un travail de qualité.

Je voudrais également remercier chaleureusement tous les instituts, associations, fonds et agences qui ont permis le financement de ce travail et sans qui rien n'aurait été possible. Merci à l'institut américain *The Children's Medical Safety Research Institute* (CMSRI), à l'association Entraide aux Malades de Myofasciite à Macrophages (E3M), au fond de dotation *International Fund for Research on LYME disease* (iFL) et à l'Agence Nationale pour la Recherche (ANR) pour leur soutien financier et leur confiance lors de la réalisation de ce projet.

A la faculté de santé de Créteil, je remercie François-Jérôme Authier de m'avoir accueilli au sein de l'équipe 10 et de m'avoir laissé libre choix dans l'orientation de ce projet. Merci pour votre aide, notamment au moment de la sélection des patients dans la base de données, *anonymisation oblige*, pour les prélèvements sanguins et lors des échanges d'idées avec Max « *le tatillon* » entre autre.

A l'École Nationale Vétérinaire d'Alfort je voudrais remercier Laurent Tiret et Fanny Storck pour m'avoir permis de me sentir à l'aise sur le site de l'EnvA, pour leur gentillesse et leurs précieux conseils de biologie murine. Merci également à Nicolas Blanchard-Gutton, Carole Drougard et Isabel Punzon pour la bonne humeur qu'ils ont permis d'instaurer dans l'équipe,

pour leurs conseils techniques et pour les analyses mécano-techniques. Nicolas, il va dans quel sens déjà le miroir dichroïque ?

A l'université d'Evry un grand merci à Marie-Odile David pour le temps qu'elle a pris à m'expliquer la microscopie et toutes ces heures passées à regarder ces petits points rouges, pardon, ces petits points pourpres. Merci pour ta bienveillance lors de nos séances d'observation plutôt chronophages, de là à dire qu'entre vosgiens on est bien, il n'y a qu'un pas. Merci également à Ghidaa Badran pour ta sympathie et les échanges toujours constructif que nous avons eu. Je suis content d'avoir été présent pour tes premiers pas, même timides, avec les animaux. Bon courage à toi pour la suite.

A l'université de Nice, un remerciement spécial « dans la joie » à Baharia Mograbi pour m'avoir accueilli deux mois dans son équipe et m'avoir conseillé comme son propre doctorant. J'ai énormément appris durant ces deux mois, caniculaires, tant sur le plan professionnel que sur le plan humain, merci de m'avoir permis de vivre cette expérience. Un immense merci à Marie-Angéla Domdom pour ton infinie gentillesse et la somme colossale de conseils que tu m'as donnée sur tous ces domaines qui ne m'étaient pas familiers. Merci vraiment et n'oublies pas « On part tôt aujourd'hui ! ». Enfin, bien sûr un grand merci à toute l'équipe, Mika (dit Mika la loose), Ludo, Olivia (Obey, Obey, Obey !), Iris, Greg (calm down, prends un bonbon), Serena, John #Déviation-de-protocole, Titou et Barnabé pour l'ambiance chaleureuse et amicale qu'ils apportent, au laboratoire comme en dehors.

Je voudrais remercier tout particulièrement Didier Lambert, Président de l'association E3M, qui par sa confiance a permis de mettre en marche la machine conduisant à ce travail. Merci d'avoir accepté de me confier la rédaction du premier papier qui m'a familiarisé avec le domaine de la vaccination et des adjuvants. Merci également pour votre soutien lors du démarrage de ce travail de thèse ainsi que pour les données scientifiques et les informations toujours très instructives qui ressortent de nos échanges. Je vous souhaite de tout cœur que la Myofasciite à macrophages soit très prochainement reconnue pour ce qu'elle est et que les membres de l'association soient reconnus et traités en conséquence par les autorités compétentes.

A tous mes collègues thésards, ingénieurs, techniciens, un immense merci pour vos conseils, votre bonne humeur, les discussions professionnelles ou moins professionnelles. Merci, Aymeline de nous avoir prouvé qu'un kilo de glace par jour n'est pas dangereux pour la santé et pour les discussions improbables que l'on a pu avoir, mais aussi Nahed, Alexandre, Lucie, Ambre, Guillaume, Alice, Marine, Lucy et Melody. Merci pour cette ambiance inimitable de l'école vétérinaire que ce soit dans le bâtiment Bressou ou Chauveau par la suite, autant le lieu que l'équipe rendent le travail plus doux, merci à vous. Évidemment, un très grand merci à Lolo. J'ai tellement appris de techniques et de petites astuces avec toi que ce serait trop long d'en faire la liste. Merci pour toutes les petites anecdotes croustillantes sur la vie dans l'école avant notre naissance, hihi. Et tout ça dans une super ambiance et toujours en sifflotant même si de l'affaire, je suis sûr qu'ils le font eksseuprès de t'embêter tous ces petits jeunes ! Un immense merci aux filles, Diana « Ça ça dégage ! », Camille (We are Prodigy) et Cathy, toi

qui a pris soin des « petites crottes » avec attention et bienveillance sans te départir de ta bonne humeur si exubérante. Je pense que sans vous, l'aventure n'aurait sans doute pas été la même, dommage que vous ne soyez pas restées plus longtemps. Merci pour tous les enseignements sur les rongeurs (préhension, gavages, injections...), et aussi, merci pour tout le reste, découverte des carrières à la frontale, promenade sur les toits, chasse des capsules de bière dans le petit bois et Giuseppe, surtout Giuseppe !!

Dans le même ordre d'esprit, merci Baptiste, surtout pour les discussions moins professionnelles, mais aussi pour ton aide immense sur toutes ces coupes et colorations, sur les conseils de congélation et pour avoir égayé la vie du labo grâce aux diverses saisons du feuilleton de ta vie amoureuse. Merci Cyrielle pour nos échanges sur la culture cellulaire et les westerns, Farida, Max, Kaouthar, Christelle, Tess, Reem, Perla, pour la bonne humeur générale et les échanges constructifs à la faculté de santé de Créteil. Merci particulièrement à toi, Yasmine pour l'aide inestimable que tu m'as apportée sur les coupes, les prélèvements et toutes les techniques et conseils qui m'ont permis de faire ces expérimentations.

Un immense merci à tous les étudiants qui m'ont aidé lors de ces longues expérimentations. Merci pour toutes ces heures passées à des tâches parfois répétitives, parfois les week-ends, dans le noir ou en silence... merci pour cette bonne ambiance lors de vos stages plus ou moins longs et votre implication dans les différentes tâches accomplies, c'est aussi vous qui avez permis ce travail. Merci à Marie, Manon, Oriane, Arnaud et Loïc. Pour toi Loïc, une place à part avec ton passage comme membre de l'équipe. Trop de question dans ta tête mais c'est toujours un réel plaisir de discuter avec toi pour faire avancer nos projets communs ou respectifs. Bonne continuation dans ton projet de thèse et bonne chance pour la suite. A tous les autres, je vous souhaite de vous épanouir dans ce que vous faites et de profiter pleinement de ce que votre situation professionnelle peut vous offrir.

Et enfin, en dernière position mais pas par ordre d'importance, je voudrais adresser le plus grand de mes remerciements à mes parents qui me soutiennent depuis toujours. C'est sans le moindre doute grâce à vous si je me suis lancé dans cette aventure. Merci du fond du cœur d'avoir toujours cru en moi même quand je n'y croyais guère moi-même. Merci de ces innombrables heures passées sur skype à discuter de tout et de rien, d'avoir écouté toutes les présentations scientifiques, si ennuyeuses soient-elles, que j'ai pu présenter et de vous être autant investis pour moi. Merci pour tout ce temps passé sur la route pour venir me voir, parfois même pour venir m'aider durant les week-ends. Merci pour votre soutien inconditionnel et vos encouragements à aller le plus loin possible. Vous êtes incontestablement mon étoile polaire, celle qui guide mes pas dans la bonne direction, merci d'être vous...

« La science présente beaucoup de danger, mais il faut lutter contre ces dangers non pas par moins de science mais par davantage de science, une science qui puisse aussi créer sa propre éthique. »

Jean d'Ormesson
(1925-2017)

SOMMAIRE

ABRÉVIATIONS	1
LISTES DES TABLEAUX, FIGURES ET PHOTOS	7
PRÉAMBULE	17
CONTEXTE ET PROBLÉMATIQUE	21
I. La vaccination	23
I.1. Historique	23
I.1.1. La découverte du principe de vaccination.....	23
I.1.2. Des vaccins atténués aux vaccins inactivés	24
I.1.3. Purification des antigènes, la découverte des toxines.....	26
I.2 Les adjuvants vaccinaux, une nécessité	27
I.2.1. Découverte	27
I.2.2. Mode d'action	28
I.3. L'aluminium vaccinal, analyse des études toxico-cinétiques de référence (Masson et al., 2018)	32
I.3.1. Généralités	32
I.3.2. Propriétés	34
I.3.3. Une innocuité non vérifiée.....	34
I.3.3.1. Étude de l'absorption et de l'élimination de l'aluminium vaccinal (Flarend <i>et al.</i> , 1997)	35
a) Une hypothèse de départ erronée.....	36
b) Un protocole d'étude au design limité et imparfait	37
c) Des tissus cibles oubliés ou détruits	37
d) Des mesures de plasma d'emblée contraires à l'hypothèse de travail.....	39
e) Des conclusions contraires à celles suggérées par les résultats.....	39
I.3.3.2. Calculs théoriques suggérant l'innocuité des doses d'Al vaccinal administrées au nourrisson	40
I.3.3.3. L'étude de Keith <i>et al.</i> (2002).....	41
a) Description de l'étude.....	41
b) Critique de l'étude	42
I.3.3.4. L'étude de Mitkus <i>et al.</i> (2011)	44
a) Description de l'étude.....	44
b) Critique de l'étude	46
I.3.4. Conclusion	48
I.4. Toxicité de l'aluminium	50

I.4.1. Neurotoxicité.....	50
I.4.1.1. Études chez l'Homme	50
a) Aluminium d'origine non vaccinale	50
b) Aluminium d'origine vaccinale	52
c) Le syndrome Auto-immun/inflammatoire induit par les adjuvants (ASIA)...	53
I.4.1.2. Études chez l'animal	53
a) Aluminium d'origine non vaccinale	53
b) Aluminium d'origine vaccinale	55
I.5. Le phosphate de calcium, un substitut aux adjuvants aluminiques ? (Masson <i>et al.</i>, 2016).....	69
I.5.1. Contexte	69
I.5.2. Capacité d'adsorption et pouvoir antigénique	70
I.5.2.1. Capacité d'adsorption	70
I.5.2.2. Pouvoir antigénique	71
I.5.3. Innocuité	73
I.5.3.1. Réaction inflammatoire.....	73
I.5.3.2. Forme nano-particulaire.....	74
I.5.3.3. Études anciennes, données in situ	74
I.5.4. Conclusion	75
II. Encéphalomyélite myalgique et Myofasciite à macrophages	77
II.1. Encéphalomyélite myalgique/syndrome de fatigue chronique	77
II.1.1. Dénomination	77
II.1.2. Diagnostic	77
II.1.3. Une symptomatologie ambiguë en lien avec l'immunité et l'inflammation	78
II.2. La myofasciite à macrophages	80
II.2.1. Découverte de la myofasciite à macrophages.....	80
II.2.1.1. Historique	80
II.2.1.2. Une coïncidence malheureuse, un heureux hasard.....	82
II.2.2. Caractéristiques cliniques	83
II.2.2.1. Lésion histologique et durée de persistance de l'aluminium.....	84
II.2.2.2. Douleurs musculo-squelettiques	89
II.2.2.3. Fatigue Chronique dans la MFM.....	89
II.2.2.4. Troubles cognitifs	90
II.2.3. Anomalies immunologiques et MFM.....	93

II.2.3.1. Observations	93
II.2.3.2. Des facteurs de susceptibilité individuelle ?.....	93
III. L'autophagie	97
III.1. Généralités.....	97
III.2. Le processus autophagique	98
III.2.1. Initiation	99
III.2.2. Élongation des autophagosomes	100
III.2.3. Fusion autophagosome-lysosomes et dégradation	100
III.2.4. Flux autophagique	101
III.3. Aluminium, autophagie et inflammation.....	102
OBJECTIFS.....	107
METHODOLOGIE	111
I. Capacité autophagique et réponse inflammatoire <i>in vitro</i> des cellules immunitaires	113
I.1. Culture cellulaire	113
I.1.1. Obtention des cellules	113
I.1.2. Conditions de culture, adhérence et différenciation	114
I.1.3. Exposition des cellules aux particules métalliques.....	115
I.2. Observation de la phagocytose des particules métalliques	116
I.2.1. Équipement et prise de vue	116
I.2.2. Quantification de fluorescence.....	116
I.3. Mesure du flux autophagique	117
I.3.1. Extraction protéique.....	117
I.3.2. Quantification des protéines majeures de l'autophagie	117
I.4. Évaluation de la réponse inflammatoire.....	119
I.4.1. Principe	119
I.4.2. Quantification des cytokines.....	119
II. Études <i>in vivo</i>	120
II.1. Évaluation d'un traitement pharmacologique perturbant l'autophagie (Masson et al., 2020)	120
II.1.1. Animaux	120
II.1.1.1. Conditions d'hébergement.....	120
II.1.1.2. Élevage des animaux reproducteurs	121
II.1.1.3. Effectifs	121
II.1.2. Exposition à l'hydroxychloroquine	124

II.1.2.1. Choix du composé pharmacologique	124
II.1.2.2. Protocole d'exposition et doses choisies	125
II.1.3. Dosage de l'accumulation sérique de l'hydroxychloroquine	128
II.1.3.1. Introduction	128
II.1.3.2. Dosages.....	128
II.1.4. Analyses histochimiques : évaluation de l'impact du traitement sur le flux autophagique	129
II.1.4.1. Introduction	129
II.1.4.2. Protocole.....	129
a) Préparation des tissus.....	129
b) Extraction protéique	130
c) Quantification des protéines majeures de l'autophagie.....	130
II.1.5. Évaluation du développement sensori-moteur.....	131
II.1.5.1. Introduction	131
II.1.5.2. Considérations méthodologiques.....	132
II.1.5.3. Procédures des tests	133
II.1.5.4. Évaluation du développement locomoteur	133
a) Test de retournement (righting reflex).....	133
b) Test d'agrippement (grasping reflex)	135
c) Cliff avoidance	136
d) Test de réaction antigravitaire (negative geotaxis).....	138
e) Test de suspension	140
f) Test de coordination locomotrice	141
g) Open-field.....	143
II.1.5.5. Évaluation du développement sensoriel	144
a) Test de sursaut au bruit (auditory startle)	144
b) Ouverture des yeux	144
II.1.6. Évaluation du comportement maternel.....	146
II.1.6.1. Introduction	146
II.1.6.2. Procédures des tests	146
a) Construction du nid (nest building).....	146
b) Test de ramassage des jeunes (retrieving)	148
II.1.7. Évaluation du comportement individuel à l'âge adulte	151
II.1.7.1. Introduction	151

II.1.7.2. Considérations méthodologiques.....	151
II.1.7.3. Procédures des tests	152
a) Grip strength	153
b) Wire mesh hang	154
c) Accelerating rotarod	155
d) Open field	156
II.2. Suivi des particules aluminiques chez des souris déficientes en autophagie.....	158
II.2.1. Animaux	158
II.2.1.1. Caractérisation phénotypique	158
II.2.1.2. Conditions d'hébergement.....	159
II.2.1.3. Génotypage des animaux.....	160
II.2.2. Traitement.....	160
II.2.2.1. Choix de la méthode de marquage	160
II.2.2.2. Préparation du complexe Alu-Dia	161
II.2.2.3. Protocole d'exposition et dose choisie	163
II.2.3. Suivi des particules d'Alu-Dia	164
II.2.3.1. Préparation des tissus.....	164
II.2.3.2. Mise en évidence de la présence de granulomes musculaires	164
II.2.3.3. Quantification de la présence/translocation d'Alu-Dia	165
a) Co-marquage Alu-Dia/Morin	165
b) Le transfert d'énergie entre molécules fluorescentes.....	166
c) Quantification de la translocation des particules d'Alu-Dia	169
III. Analyses statistiques	170
DONNÉES EXPÉRIMENTALES	173
I. Capacité autophagique et réponse inflammatoire <i>in vitro</i> des cellules immunitaires	175
I.1. Rappel du protocole expérimental	175
I.2. Distribution des effectifs et des âges.....	177
I.3. Phagocytose des particules métalliques	178
I.4. Effet de la présence de particules aluminiques sur le flux autophagique des PBMC	179
I.5. Effet de la présence de particules aluminiques sur la réponse inflammatoire des PBMC	189
I.6. Récapitulatif des résultats et premières interprétations	197
II. Études <i>in vivo</i>	198

II.1. Évaluation du traitement pharmacologique perturbant l'autophagie (Masson <i>et al.</i>, 2020)	198
II.1.1. Rappel du protocole expérimental	198
II.1.2. Effet du traitement sur le poids corporel des animaux	202
II.1.2.1. Cohorte adulte	202
II.1.2.2. Cohorte juvénile	202
II.1.3. Accumulation sérique de l'hydroxychloroquine	206
II.1.4. Analyses histochimiques : évaluation de l'impact du traitement sur le flux autophagique	207
II.1.4.1. Cohorte adulte	207
II.1.4.2. Cohorte juvénile	210
II.1.5. Effet du traitement sur le développement locomoteur	215
II.1.5.1. Test de retournement (<i>righting reflex</i>)	215
II.1.5.2. Test d'agrippement (<i>grasping reflex</i>)	216
II.1.5.3. <i>Cliff avoidance</i>	217
II.1.5.4. Test de réaction antigravitaire (<i>negative geotaxis</i>)	218
II.1.5.5. Test de suspension	219
II.1.5.6. Test de coordination locomotrice	219
II.1.5.7. <i>Open-field</i>	222
II.1.6. Effet du traitement sur le développement sensoriel	223
II.1.6.1. Test de sursaut au bruit (<i>auditory startle</i>)	223
II.1.6.2. Ouverture des yeux	224
II.1.7. Évolution et homogénéité du comportement maternel	225
II.1.7.1. Construction du nid (<i>nest building</i>)	225
II.1.7.2. Test de ramassage des jeunes (<i>retrieving</i>)	226
II.1.8. Effet du traitement sur le comportement individuel à l'âge adulte	228
II.1.8.1. <i>Grip strength</i>	228
a) Cohorte adulte	228
b) Cohorte juvénile	228
II.1.8.2. <i>Wire mesh hang</i>	231
a) Cohorte adulte	231
b) Cohorte juvénile	231
II.1.8.3. <i>Accelerating rotarod</i>	234
a) Cohorte adulte	234

b) Cohorte juvénile	234
II.1.8.4. <i>Open field</i>	237
a) Cohorte adulte.....	237
b) Cohorte juvénile	237
II.1.9. Récapitulatif des résultats	240
II.1.9.1. Effet d'une exposition à l'hydroxychloroquine à l'âge adulte	240
a) Effet du traitement sur le poids corporel	240
b) Accumulation sérique de l'hydroxychloroquine	240
c) Effet du traitement sur l'autophagie des tissus cibles.....	240
d) Effet du traitement sur le comportement individuel.....	241
II.1.9.2. Effet d'une exposition postnatale à l'hydroxychloroquine.....	242
a) Effet du traitement sur le poids corporel	242
b) Effet du traitement sur l'autophagie des tissus cibles.....	242
c) Effet du traitement sur le développement moteur et sensoriel	242
d) Effet du traitement sur le comportement individuel à l'âge adulte	243
II.2. Suivi des particules aluminiques chez des souris déficientes en autophagie.....	244
II.2.1. Rappel du protocole expérimental	244
II.2.2. Génotypage et distribution des effectifs	246
II.2.3. Présence et persistance de granulomes musculaires	246
II.2.4. Présence/translocation d'Alu-Dia dans les organes cibles	248
II.2.4.1. Muscle tibial antérieur	248
II.2.4.2. Ganglion lymphatique poplité	250
II.2.4.3. Ganglion lymphatique inguinal	251
II.2.4.4. Rate.....	252
II.2.4.5. Cerveau	254
II.2.4.6. Récapitulatif des résultats	255
DISCUSSION GÉNÉRALE	257
I. Rappel des objectifs	259
II. Originalité du modèle	260
III. Capacité autophagique et réponse inflammatoire <i>in vitro</i> des cellules immunitaires	261
III.1. Morphologie cellulaire et capacité d'internalisation.....	261
III.2. Mesure du flux autophagique.....	262
III.2.1. Les modulateurs de l'autophagie : CQ et Rapa.....	262

III.2.2. Réponse autophagique des PBMC contrôles aux particules aluminiques.....	265
III.2.2.1. Effets de l’AH sur les PBMC contrôles	265
III.2.2.2. Effets du vaccin sur les PBMC contrôles.....	268
III.2.3. Réponse autophagique des PBMC MFM aux particules aluminiques.....	270
III.2.3.1. Effets de l’AH sur les PBMC MFM.....	270
III.2.3.2. Effets du vaccin sur les PBMC MFM	272
III.3. Réponse inflammatoire et particules aluminiques	273
III.4. Spécificités des PBMC MFM.....	275
III.5. Hypothèse de prise en charge des particules d’AH par les PBMC	279
III.5.1. Une internalisation par phagocytose associée à LC3	279
III.5.2. Activation de l’inflammasome	280
III.5.3. Rôle de l’autophagie.....	280
IV. Perturbation du flux autophagique par un traitement pharmacologique.....	284
IV.1. Effet de l’injection d’hydroxychloroquine sur le poids des animaux – cohorte adulte & juvénile	284
IV.2. Accumulation sérique d’hydroxychloroquine - cohorte adulte.....	284
IV.3. Effet de l’injection d’hydroxychloroquine sur le flux autophagique – cohorte adulte & juvénile	285
IV.4. Effet de l’injection d’hydroxychloroquine sur le développement moteur et sensoriel (cohorte juvénile) et sur le comportement individuel à l’âge adulte (cohorte adulte & juvénile).....	289
IV.5. Conclusion	291
V. Impact d’une déficience dans le processus autophagique sur la translocation des particules aluminiques injectées par voie intramusculaire.	292
V.1. Méthode de suivi des particules	292
V.2. Translocation des particules aluminiques... ..	293
V.2.1. ... impact de la génétique... ..	293
V.2.2. ... et importance de la taille des composés	295
CONCLUSION ET PERSPECTIVES	297
I. Conclusion générale.....	299
II. Perspectives.....	302
II.1. Un défaut de lutte contre le stress oxydant chez les patients MFM ?	302
II.2. Etudes complémentaires	306
BIBLIOGRAPHIE	309
VALORISATION SCIENTIFIQUE	365

ANNEXES.....	413
A.1. Aspect sociétal et réflexion autour des adjuvants aluminiques.....	415
A.1.1. Le choix de la vaccination.....	415
A.1.2. La garantie de la sécurité.....	418
A.1.3. Vaccination et économie.....	421
A.1.4. Communication médiatique.....	421
A.1.4.1. Les adjuvants « <i>ne sont pas nocifs</i> ».....	421
A.1.4.2. L'Al est commun dans notre environnement.....	422
a) Ingestion et injection : une comparaison incorrecte.....	423
b) Ingestion et injection : une histoire de dose.....	425
A.1.4.3. Un recul de 90 ans.....	426

ABRÉVIATIONS

-
- AFSSA : Agence Française de Sécurité Sanitaire des Aliments (devenue ANSM)
 - AH : Oxy-hydroxyde d'aluminium (adjuvant)
 - Al : Aluminium
 - Al-lumo : solution d'oxy-hydroxyde d'aluminium commerciale préalablement marqué par du lumogallion
 - Alu-Dia : Hydroxyde d'aluminium lié à des nano-diamants fonctionnalisés
 - ANSES : Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail
 - ANSM : Agence Nationale de la Santé et du Médicament
 - AP : Hydroxy-phosphate d'aluminium (adjuvant)
 - AR : *Accelerating rotarod*
 - ASC : *apoptosis-associated speck-like protein containing a C-terminal caspase recruitment domain*
 - ASIA : Syndrome Auto-immun//inflammatoire induit par les adjuvants (*Autoimmune/inflammatory Syndrome Induced by Adjuvants*)
 - ATDSR : Agence américaine des substances toxiques et du registre des maladies (*Agency for Toxic Substances and Disease Registry*)
 - ATG : *Autophagy related*

 - bafA1 : Bafilomycine A1
 - BHE : Barrière hémato-encéphalique
 - BSA : albumine de sérum bovine (*Bovin Serum Albumin*)

 - CaP : Phosphate de calcium
 - CDC : Centres pour le contrôle et la prévention des maladies (*Centers for Disease Control and Prevention*)
 - CMH : Complexe majeur d'histocompatibilité
 - CQ : Chloroquine
 - CXCL : *C-X-motif Chemokine Ligand*

 - D : *Day* (jour d'expérimentation de la cohorte adulte)
 - Deptor : *DEP domain-containing m-TOR interacting*
 - DMEM : Milieu de culture cellulaire *Dulbecco's Modified Eagle Medium*
 - DMSO : Diméthylsulfoxyde
 - Drp1 : *dynamamin-related protein 1* (protéine mitochondriale)

 - E3M : Entraide aux Malades de Myofasciite à Macrophages (association)
 - EFS : Établissement Français du Sang
 - EM/SFC : Encéphalomyélite myalgique ou syndrome de fatigue chronique

 - FDA : Administration américaine des denrées alimentaires et des médicaments (*Food and Drug Administration*)
-

- FIP200 : *Focal adhesion kinase family-interacting protein of 200 kDa*
- Fis1 : *fission protein 1* (protéine mitochondriale)
- fND : Nano-diamants fonctionnalisés
- FRET : Transfert d'énergie entre molécules fluorescentes (*Förster resonance energy transfer*)

- GβL : *Mammalian G protein β-subunit-like*
- GERMMAD : Groupe de recherche sur les maladies musculaires acquises et dysimmunitaires
- GM-CSF : *Granulocyte Macrophage Colony Stimulating Factor*
- GS : *Grip strength*

- HCQ : Hydroxychloroquine
- HE : Coloration Hématéine-Eosine
- HES : Coloration Hématéine-Eosine-Safran
- HPLC : Chromatographie liquide de haute performance
- HPV : Papillomavirus humain (*Human papillomavirus*)
- HRP : Peroxydase de raifort

- Ig : Immunoglobuline, il existe des Ig de type G, A, M, E, et D
- IL : Interleukine
- IM : Intramusculaire
- InVS : Institut de veille sanitaire
- IP : Intra-péritonéale (voie d'injection dans la cavité abdominale)
- IRCAN : L'Institut de Recherche sur le Cancer et le Vieillissement de Nice
- IRGM : *immunity-related GTPase family, M*
- IV : Intraveineuse

- LAP : Phagocytose associée à LC3 (*LC3 associated phagocytosis*)
- LC3-II : *Microtubule associated-protein 1 light chain 3-phosphatidylethanolamine*

- MCP1/CCL2 : *Monocyte chemoattractant protein 1*
- M-CSF : *monocyte colony-stimulating factor*
- MFM : Myofasciite à macrophages
- Mfn1 : *mitofusin 1* (protéine mitochondriale)
- Mfn2 : *mitofusin 2* (protéine mitochondriale)
- MRL : Taux minimal de risque (*minimal risk level*)
- MTOC : Centre d'organisation des microtubules
- mTORC1 : *Mammalian target of rapamycin complex*

- NLR : Récepteurs cytoplasmiques de type NOD (*NOD Like Receptor*)
- NLRP3 : *NACHT, LRR, and PYD domains-containing protein 3*

-
- *Nnt*, NNT : Respectivement gène murin et protéine de la *nicotinamide nucleotide transhydrogenase*
 - NOAEL : Dose sans effet indésirable observé (*no-observed-adverse effect level*)

 - OF : *Open field*
 - OMS : Organisation Mondiale de la Santé (WHO en anglais, *World Health Organization*)
 - *Opa1* : *optic atrophy 1* (protéine mitochondriale)

 - PAMP : Motifs moléculaires associés aux pathogènes (*Pathogen-Associated Molecular Pattern*)
 - PAS+ : Coloration positive à l'acide périodique de Schiff
 - PBMC : Cellules mononuclées de sang périphérique (*Peripheral Blood Mononuclear Cells*)
 - PBS : Tampon phosphate (*Phosphate Buffer Saline*)
 - PE : Phosphatidylethanolamine
 - PFA : Paraformaldehyde
 - PI3K : Complexe phosphatidylinositol-3-kinase de classe III
 - PI3P : Phosphatidylinositol-3-phosphate
 - PND : *Post Natal Day* (jour d'expérimentation de la cohorte juvénile)
 - PRAS40 : *Proline-rich Akt substrate of 40kDa*
 - PRR : Récepteurs de reconnaissance de motifs moléculaires (*Pattern Recognition Receptors*)
 - PSM : Poste de sécurité microbiologique
 - PVDF : Polyfluorure de vinylidène

 - Rapa : Rapamycine
 - Raptor : *Regulatory associated protein of mTOR*
 - ROS : Espèces réactives de l'oxygène (*Reactive Oxygen Species*)
 - RPM : Rotations par minute
 - Rubicon : *RUN domain and cysteine-rich domain containing Beclin 1-interacting protein*

 - SC : Sous-cutanée
 - SDS : Sodium dodécyl sulfate
 - SNP : Polymorphisme nucléotidique simple (*single nucleotide polymorphism*)
 - SQSTM1/p62 : séquestosome 1 (protéine de l'autophagie)
 - SVF : Sérum de veau fœtal

 - TA : Muscle tibial antérieur
 - TEP : Tomographie par émission de positrons
 - TGFβ : *Transforming growth factor beta*

- TLR : Récepteurs membranaires de type Toll (*Toll-Like-Receptor*)
- TNF- α : Facteur de nécrose tumoral (*Tumor Necrosis Factor alpha*)
- TSA : Trouble du spectre autistique

- UE : Union Européenne
- ULK : *UNC-51-like-kinase*
- UVRAG : *UV radiation resistance-associated tumor supression gene protein*

- Vps34 : *Vacuolar protein sorting 34*

- WMH : *Wire mesh hang*
- WT : *Wild Type*, animaux de phénotype sauvage et de génotype *Atg5^{flox/flox} Cre-* utilisés pour le suivi des particules d'Al

- ZC : Zone centrale (*Open-field*)
- ZI : Zone intermédiaire (*Open-field*)
- ZP : Zone périphérique (*Open-field*)

LISTES DES TABLEAUX, FIGURES ET PHOTOS

Tableau 1 : Liste des vaccins commerciaux humains contenant un adjuvant aluminique (données 2018).....	33
Tableau 2 : Calendrier des vaccinations recommandées de 0 à 15 mois par le CDC (2021) .	43
Tableau 3 : Reproduction du tableau 1 de (Eidi et al., 2015).....	57
Tableau 4 : Récapitulatif global des études portant sur les adjuvants vaccinaux, toutes voies d'administration, chez l'animal (1/5).....	63
Tableau 5 : Récapitulatif global des études portant sur les adjuvants vaccinaux, toutes voies d'administration, chez l'animal (2/5).....	64
Tableau 6 : Récapitulatif global des études portant sur les adjuvants vaccinaux, toutes voies d'administration, chez l'animal (3/5).....	65
Tableau 7 : Récapitulatif global des études portant sur les adjuvants vaccinaux, toutes voies d'administration, chez l'animal (4/5).....	66
Tableau 8 : Récapitulatif global des études portant sur les adjuvants vaccinaux, toutes voies d'administration, chez l'animal (5/5).....	67
Tableau 9 : Caractéristiques cliniques des patients atteints de MFM.....	92
Tableau 10 : Distribution des animaux dans les différents groupes de traitement pour les cohortes adultes et juvéniles.....	123
Tableau 11 : Doses de HCQ utilisées et calendrier d'injection en fonction de l'expérimentation.....	128
Tableau 12 : Récapitulatif des tests de développement sensori-moteur et des tests du comportement maternel.....	150
Tableau 13 : Récapitulatif des tests de comportement individuel à l'âge adulte.....	157
Tableau 14 : Répartition des effectifs et distribution d'âge dans les différents groupes.....	177
Tableau 15 : Taille et nombre de cellules analysées au sein de chaque groupe et intensité de fluorescence normalisée de lysotracker et de lumogallion.....	178
Tableau 16 : Quantifications protéiques des PBMC exposées à des particules aluminiques	180
Tableau 17 : Modulations de niveau protéique induit par les traitements appliqués aux PBMC.....	181
Tableau 18 : Quantification de cytokines relarguées par les PBMC exposées à des particules aluminiques.....	190
Tableau 19 : Effet du traitement pharmacologique sur le poids corporel des animaux de la cohorte adulte.....	203
Tableau 20 : Effet du traitement pharmacologique sur le poids corporel des animaux de la cohorte juvénile entre PND3 et PND25.....	204
Tableau 21 : Effet du traitement pharmacologique sur le poids corporel des animaux de la cohorte juvénile entre PND26 et PND136.....	205
Tableau 22 : Effets du traitement sur le taux de protéines de l'autophagie des différents organes de la cohorte adulte.....	208
Tableau 23 : Effets du traitement sur le taux de protéines de l'autophagie des différents organes de la cohorte juvénile.....	211
Tableau 24 : Effets du traitement sur les différentes variables du test de coordination locomotrice réalisé à PND20, PND23 et PND26.....	220
Tableau 25 : Effets du traitement sur l'activité comportementale des souriceaux à PND25	222

Tableau 26 : Comportement de ramassage des jeunes sur les souriceaux des cinq groupes de traitement à PND4, 7 et 10.....	227
Tableau 27 : Effets de l'injection IP d'hydroxychloroquine sur les résultats au <i>grip strength</i> des animaux de la cohorte adulte à D70.....	229
Tableau 28 : Effets de l'injection IP d'hydroxychloroquine sur les résultats au <i>grip strength</i> des animaux de la cohorte adulte à D133.....	229
Tableau 29 : Effets de l'injection IP d'hydroxychloroquine sur les résultats au <i>grip strength</i> des animaux de la cohorte juvénile à PND67	230
Tableau 30 : Effets de l'injection IP d'hydroxychloroquine sur les résultats au <i>grip strength</i> des animaux de la cohorte juvénile à PND130	230
Tableau 31 : Effets de l'injection IP d'hydroxychloroquine sur les résultats au <i>wire mesh hang</i> des animaux de la cohorte adulte à D70.....	232
Tableau 32 : Effets de l'injection IP d'hydroxychloroquine sur les résultats au <i>wire mesh hang</i> des animaux de la cohorte adulte à D133.....	232
Tableau 33 : Effets de l'injection IP d'hydroxychloroquine sur les résultats au <i>wire mesh hang</i> des animaux de la cohorte juvénile à PND67	233
Tableau 34 : Effets de l'injection IP d'hydroxychloroquine sur les résultats au <i>wire mesh hang</i> des animaux de la cohorte juvénile à PND130	233
Tableau 35 : Effets de l'injection IP d'hydroxychloroquine sur les résultats au test <i>accelerating rotarod</i> des animaux de la cohorte adulte à D71	235
Tableau 36 : Effets de l'injection IP d'hydroxychloroquine sur les résultats au test <i>accelerating rotarod</i> des animaux de la cohorte adulte à D134	235
Tableau 37 : Effets de l'injection IP d'hydroxychloroquine sur les résultats au test <i>accelerating rotarod</i> des animaux de la cohorte juvénile à PND68	236
Tableau 38 : Effets de l'injection IP d'hydroxychloroquine sur les résultats au test <i>accelerating rotarod</i> des animaux de la cohorte juvénile à PND131	236
Tableau 39 : Effets de l'injection IP d'hydroxychloroquine sur les résultats à l' <i>open field</i> des animaux de la cohorte adulte à D72	238
Tableau 40 : Effets de l'injection IP d'hydroxychloroquine sur les résultats à l' <i>open field</i> des animaux de la cohorte adulte à D135	238
Tableau 41 : Effets de l'injection IP d'hydroxychloroquine sur les résultats à l' <i>open field</i> des animaux de la cohorte juvénile à PND69.....	239
Tableau 42 : Effets de l'injection IP d'hydroxychloroquine sur les résultats à l' <i>open field</i> des animaux de la cohorte juvénile à PND132.....	239
Tableau 43 : Analyse semi-quantitative de la présence de granulomes dans les muscles des animaux en fonction de leur génome	248
Tableau 44 : Quantification de la présence d'Alu-Dia dans le muscle tibial antérieur.....	249
Tableau 45 : Quantification de la présence d'Alu-Dia dans le ganglion lymphatique poplité	251
Tableau 46 : Quantification de la présence d'Alu-Dia dans le ganglion lymphatique inguinal	252
Tableau 47 : Quantification de la présence d'Alu-Dia dans la rate	254
Tableau 48 : Rappel des principaux effets du traitement HCQ sur le flux autophagique.....	286

Tableau 49 : Vaccinations obligatoires sur la première année pour les nourrissons nés à partir du 1er janvier 2018..... 417

Figure 1 : Représentation schématique des points clé de l'action des adjuvants aluminiques selon les données et hypothèses actuelles	31
Figure 2 : Représentation de la cinétique d'élimination des adjuvants aluminiques chez le lapin.....	38
Figure 3 : Évaluation de la charge corporelle théorique en Al d'origine vaccinale et alimentaire chez le nourrisson.....	42
Figure 4 : Courbes d'accumulation théorique de l'aluminium d'origine vaccinale et limites de sécurité actualisées	45
Figure 5 : Observation d'une biopsie musculaire humaine après coupe en paraffine et coloration Hématéine-Eosine (HE)	85
Figure 6 : Observation d'une biopsie musculaire humaine après coupe et coloration Hématéine-Eosine (HE)	85
Figure 7 : Observation d'une biopsie musculaire humaine après coupe en paraffine et coloration PAS	86
Figure 8 : Observation d'un macrophage contigu aux fibres musculaires en microscopie électronique	86
Figure 9 : Observation à fort grossissement de l'organisation spiculaire des inclusions cytoplasmiques des macrophages.....	87
Figure 10 : Observation des inclusions cytoplasmiques des macrophages en microscopie électronique à balayage	87
Figure 11 : Schéma du processus autophagique, adaptation de Cohignac et al., (2014)	98
Figure 12 : Quantification de l'expression génique de <i>Atg5</i> dans les macrophages des souris <i>Atg5</i> CKO.....	159
Figure 13 : Spectres d'excitation (noir) et d'émission (rouge) des centres fluorescents NV des nano-diamants fluorescents.....	162
Figure 14 : Spectre d'émission caractéristique des nano-diamants fonctionnalisés observés dans le canal FRET.	167
Figure 15 : Représentation graphique du déroulement de l'expérimentation <i>in vitro</i>	176
Figure 16 : Western blot représentatif des analyses menées sur les PBMC (données obtenues pour un individu appartenant au groupe MFM).....	179
Figure 17 : Résultats de quantification de la protéine LC3-I dans les PBMC	182
Figure 18 : Résultats de quantification de la protéine LC3-II dans les PBMC	184
Figure 19 : Résultats de quantification du ratio LC3-II/LC3-I dans les PBMC.....	185
Figure 20 : Résultats de quantification de la protéine SQSTM1/p62 dans les PBMC.....	186
Figure 21 : Résultats de quantification de la protéine IRGM dans les PBMC.....	187
Figure 22 : Résultats de quantification de la protéine Rubicon dans les PBMC.....	188
Figure 23 : Résultats de quantification de la cytokine IL-8 produite par les PBMC	191
Figure 24 : Résultats de quantification de la cytokine IL-18 produite par les PBMC	192
Figure 25 : Résultats de quantification de la cytokine CXCL1 produite par les PBMC.....	193
Figure 26 : Régression linéaire modélisant la corrélation entre l'âge des donneuses du groupe MFM et la production de CXCL1 sous traitement témoin.....	194
Figure 27 : Résultats de quantification de la cytokine CCL2 produite par les PBMC.....	195
Figure 28 : Résultats de quantification de la cytokine TNF- α produite par les PBMC	196

Figure 29 : Représentation graphique du déroulement de l'expérimentation <i>in vivo</i> évaluant le traitement pharmacologique.....	199
Figure 30 : Représentation du déroulement de l'expérimentation <i>in vivo</i> sur la cohorte adulte	200
Figure 31 : Représentation du déroulement de l'expérimentation <i>in vivo</i> sur la cohorte juvénile.....	201
Figure 32 : Dosage de l'hydroxychloroquine sérique des souris de la cohorte adulte traitées par injection intra péritonéale.....	206
Figure 33 : Dosage de l'hydroxychloroquine sérique des souris à D3 exprimée par genre ..	207
Figure 34 : Western blot représentatif des protéines LC3 et SQSTM1/p62 dans le muscle tibial antérieur des animaux adultes sacrifiés à D136.....	210
Figure 35 : Western blot représentatif des protéines LC3 et SQSTM1/p62 dans le muscle tibial antérieur des animaux juvéniles sacrifiés à PND136.....	214
Figure 36 : Pourcentage de réussite au test de retournement (A) et temps mis par les animaux des cinq groupes pour se retourner (médianes et quartiles) (B).....	215
Figure 37 : Pourcentage de réussite au test d'agrippement (A) et angle atteint par les animaux des cinq groupes (médianes et quartiles) (B)	216
Figure 38 : Pourcentage de réussite au test du <i>Cliff avoidance</i> (A) et temps mis par les animaux des cinq groupes pour reculer sur la plateforme (médianes et quartiles) (B).....	217
Figure 39 : Pourcentage de réussite au test de réaction antigravitaire (A) et temps mis par les animaux des cinq groupes pour effectuer une rotation de 180° (médianes et quartiles) (B) .	218
Figure 40 : Temps de suspension des animaux des cinq groupes avant la chute (médianes et quartiles).....	219
Figure 41 : Pourcentage de réussite au test de coordination locomotrice (A) et temps total mis par les animaux des cinq groupes pour atteindre la plateforme (médianes et quartiles) (B) .	221
Figure 42 : Pourcentage d'animaux des cinq groupes présentant une réactivité au bruit entre PND11 et PND14 (A) et jour d'apparition de l'audition en fonction du traitement (moyenne et écart-type) (B)	223
Figure 43 : Pourcentage d'animaux des cinq groupes ayant les yeux ouverts entre PND14 et PND16 (A) et jour d'ouverture complète des deux yeux en fonction du traitement (moyenne et écart-type) (B)	224
Figure 44 : Pourcentage des mères des petits de chaque groupe ayant construit un nid à PND3 (A), PND6 (B) et PND8 (C).....	225
Figure 45 : Représentation graphique du déroulement de l'expérimentation <i>in vivo</i> du suivi des particules aluminiques	245
Figure 46 : Résultats de PCR portant sur la présence des gènes <i>Atg5^{WT}</i> et <i>Atg5^{lox}</i> (A) et sur la présence de la Cre-recombinase (B).....	246
Figure 47 : Observation de la présence de granulomes dans les muscles des animaux	247
Figure 48 : Spectre d'émission observé dans le canal FRET sur une coupe de muscle tibial antérieur.....	249
Figure 49 : Spectre d'émission observé dans le canal FRET sur une coupe de ganglion lymphatique poplité.....	250
Figure 50 : Spectre d'émission observé dans le canal FRET sur une coupe de ganglion lymphatique inguinal.....	251

Figure 51 : Spectre d'émission observé dans le canal FRET sur une coupe de rate	253
Figure 52 : Spectre d'émission observé dans le canal FRET sur une coupe de cerveau de l'individu 97241	254
Figure 53 : Signal de la particule d'Alu-Dia dans le canal FRET sur une coupe de cerveau de l'individu 97241	255
Figure 54 : Adaptation de la figure originale 1 de Galais <i>et al.</i> , (2019) schématisant les mécanismes d'autophagie, de LAP et de phagocytose.....	267
Figure 55 : Proposition d'un modèle de prise en charge des particules d'AH par les PBMC	282
Figure 56 : Devenir de l'Al ingéré	423
Figure 57 : Devenir de l'Al injecté	424

Photo 1 : Statue d'Edward Jenner (Kensington Gardens, Londres)	23
Photo 2 : Louis Pasteur (Photo prise dans l'hôtel privé, 51 rue d'Anjou St Honoré, 1894) ...	25
Photo 3 : Gaston Ramon dans le laboratoire de recherche de l'Institut Pasteur, Garches, Octobre 1932	27
Photo 4 : Test de retournement.....	134
Photo 5 : Test d'agrippement	135
Photo 6 : Cliff avoidance	137
Photo 7 : Réaction antigravitaire	139
Photo 8 : Test de suspension.....	140
Photo 9 : Test de coordination locomotrice.....	142
Photo 10 : Open-field	143
Photo 11 : Observation de l'ouverture des yeux	145
Photo 12 : Construction du nid.....	147
Photo 13 : Test de ramassage des jeunes	149
Photo 14 : Grip strength test (Bioseb.fr).....	153
Photo 15 : Open-field (couleurs artificielles)	156

PRÉAMBULE

Le manuscrit de thèse présenté ici retrace le travail effectué depuis février 2017 au sein de l'**équipe Biologie du Système Neuromusculaire du Pr Relaix**, dans l'unité mixte de recherche 955 de l'INSERM. L'équipe est située d'une part à la faculté de santé de Créteil et d'autre part à l'école nationale vétérinaire de Maisons-Alfort. Ce projet a été soutenu financièrement par l'institut américain *The Children's Medical Safety Research Institute* (CMSRI), l'association **Entraide aux Malades de Myofasciite à Macrophages** (E3M), le fond de dotation *International Fund for Research on LYME disease* (iFL) et l'**Agence Nationale pour la Recherche** (ANR).

Ce travail s'inscrit dans un contexte de défiance croissante de la population vis-à-vis de la **vaccination**, révélée par la concertation citoyenne nationale sur la vaccination de 2016 initiée par Mme la Ministre chargée de la santé, Marisol Touraine, et menée par le comité d'orientation dirigé par le Professeur Alain Fischer. L'utilisation d'**adjuvants** dans les vaccins est en effet souvent citée par le grand public comme point de questionnement, et en particulier l'innocuité des adjuvants à base d'**aluminium** (Al). Nous pensons bien évidemment que la vaccination est l'une des avancées majeures de la médecine moderne. Cependant, il faut garder à l'esprit que, contrairement aux traitements conventionnels, les vaccins sont administrés à des sujets sains et que, par conséquent, l'étude de leur absolue utilité et innocuité est primordiale.

Les adjuvants ont pour but d'améliorer la réponse en anticorps des vaccins afin de les rendre plus efficaces (Ramon, 1925). Les adjuvants à base d'Al, utilisés dans plus de 60 % des vaccins commercialisés en médecine humaine, ont été introduits de manière empirique par Alexander Glenny en 1926. Les deux principaux sels d'Al utilisés sont l'**oxy-hydroxyde d'Al** (AH, Alhydrogel[®]) de formule chimique $AlOOH$ et l'**hydroxyphosphate d'Al** (AP, Adjuvaphos[®]) de formule $AlOHPO_4$. Ces adjuvants sont **soupçonnés depuis plusieurs années d'être impliqués dans l'apparition de maladies auto-immunes ou neurologiques** (Tomljenovic & Shaw, 2011).

Dans ce contexte, la **myofasciite à macrophages** (MFM), une **lésion musculaire inflammatoire** caractéristique décrite en France en 1998 (Gherardi *et al.*, 1998), est un indicateur de la **longue persistance** de l'Al vaccinal au niveau du site d'injection (Gherardi *et al.*, 2001a; Gherardi & Authier, 2003). En effet, des cristaux d'Al phagocytés dans des macrophages peuvent persister de façon très localisée au point d'injection du vaccin (muscle deltoïde) pendant plusieurs années après la vaccination. La MFM est observée chez des patients présentant des symptômes communs avec l'**encéphalomyélite myalgique** ou **syndrome de fatigue chronique (EM/SFC)**, tels que des arthromyalgies, des troubles cognitifs et une fatigue persistante associée à un sommeil non réparateur. L'hypothèse étiologique actuelle de la MFM, proposée par l'organisation mondiale de la Santé (OMS), repose sur un dysfonctionnement – d'origine génétique ou acquis – dans le mécanisme d'élimination de l'Al par les cellules immunitaires (World Health Organization, 1999).

L'objectif de ce travail est de faire avancer la recherche vers une meilleure compréhension des réponses physiologiques et immunologiques induites par les adjuvants aluminiques, en particulier dans le contexte d'une possible sensibilité particulière présentée par les patients atteints de MFM. Pour ce faire, le phénotype spécifique des **patients** atteints de MFM a été observé *in vitro* afin d'attester le défaut supposé dans le processus autophagique et son lien avec le statut inflammatoire des cellules de l'immunité. Par ailleurs, nous avons ensuite cherché à définir la meilleure option de **modèle** de petit **animal** permettant l'étude *in vivo* de la **biopersistance** et de la **translocation** des **particules d'Al** depuis le **muscle** injecté jusqu'aux organes distants comme le **cerveau**, ainsi que la **réponse inflammatoire** produite par la présence d'Al exogène dans l'organisme.

CONTEXTE ET PROBLÉMATIQUE

I. La vaccination

I.1. Historique

I.1.1. La découverte du principe de vaccination

Dès le XVII^{ème} siècle, alors que la variole, hautement contagieuse, fait des milliers de morts par épidémies successives, des essais sont menés afin de protéger les personnes saines de la maladie. L'observation avait déjà été faite que les personnes survivant à une maladie contagieuse ne la contractaient plus par la suite. Des techniques empiriques diverses ont donc été testées aux quatre coins du monde, dépôt de pus ou squames varioliques sur la muqueuse nasale des enfants en Chine, administration sous cutanée d'exsudat émanant de patients peu atteints en Perse ou en Afrique, inoculation de pus variolique desséché en Europe. Le but était de faire développer une infection bénigne au patient afin de lui octroyer une protection permanente contre la variole (Bazin, 2008). La technique de « **variolisation** » utilisée en Chine et importée en Europe au XVIII^{ème} siècle était efficace mais pas sans danger puisque mortelle pour environ 2 % des patients exposés (vaccination-info-service.fr, 2018a). Cependant, en cherchant à faire se développer une infection bénigne à un patient afin de le protéger contre la forme sévère de la maladie, le principe de vaccination était découvert.

La première grande avancée remonte à 1796, quand, dans les campagnes anglaises, le médecin **Edward Jenner** (1749-1823) (**Photo 1**) remarque que les fermiers en contact avec la vaccine, forme bovine de la variole, ne semblent pas contracter sa forme humaine. Il a alors l'idée d'introduire par scarification du pus prélevé chez un patient infecté par la vaccine, à un enfant, James Phipps, qui résistera à la variole grâce au **principe d'atténuation** des germes par le passage d'une espèce animale à l'autre (Mettra, 2015).



Photo 1 : Statue d'Edward Jenner (Kensington Gardens, Londres)

Cette atténuation réside dans l'utilisation d'organismes vivants affaiblis afin qu'ils perdent leur caractère pathogène pour le receveur, permettant ainsi une infection limitée induisant une réponse immunitaire proche de celle obtenue par la présence de l'agent infectieux naturel et protégeant contre les infections ultérieures par cet agent. L'atténuation des germes par changement d'espèce cible n'est pas la seule méthode. Elle peut également être effectuée en traitant des pathogènes issus de l'espèce cible par divers procédés comme pour les vaccins contre la rougeole, la rubéole, les oreillons, la fièvre jaune, la tuberculose ou la forme orale du vaccin anti-poliomyélite (World Health Organization, 2013). **Les vaccins atténués** miment si parfaitement l'infection naturelle qu'une unique injection suffit généralement à produire une très longue immunité protectrice pour le receveur (Malé, 2016).

Alors qu'il était obligatoire pour les enfants au Royaume-Uni depuis 1853, le vaccin contre la variole ne devient obligatoire en France qu'en 1902 après avoir été largement popularisé par le Comité central de Vaccine et son premier président, le docteur **Joseph-Ignace Guillotin** (1738-1814), célèbre notamment pour sa participation lors de la révolution française. Les grandes campagnes de vaccination anti-variole dans les pays endémiques entre 1966 et 1980 d'une part et le perfectionnement et la généralisation de la vaccination d'autre part aboutissent à l'**éradication de la variole** au niveau mondial en 1980 (World Health Organization, 2010). La technique fait également ses preuves sur d'autres maladies avec une baisse de 99 % des cas de poliomyélite entre 1988 et 2003, et une baisse de 40 % des cas de rougeole entre 1999 et 2003 au niveau mondial, ainsi qu'une diminution des cas d'oreillons de 859 à 9 pour 100 000 habitants entre 1986 et 2013 en France (Launay, 2015). Le maintien d'une bonne couverture vaccinale, c'est-à-dire d'un taux élevé de personnes vaccinées au sein de la population, est nécessaire pour éviter la résurgence d'autres maladies infectieuses, comme cela a été noté pour la coqueluche ou la rubéole, avec un double bénéfice, individuel mais également collectif, par la réduction du nombre de personnes susceptibles de transmettre les maladies infectieuses (Masson *et al.*, 2018).

I.1.2. Des vaccins atténués aux vaccins inactivés

Dans les années 1870, **Louis Pasteur** (1822-1895) (**Photo 2**), chimiste et physicien de formation, devient un fervent partisan de la théorie selon laquelle les maladies contagieuses sont dues à des organismes microscopiques, contrairement à l'idée répandue selon laquelle ces maladies seraient spontanées (Perrot, Schwartz & Poissenot, 1999). Il applique cette théorie aux maladies des animaux d'élevage et commence l'étude des maladies contagieuses humaines dès 1876. Cette recherche d'une origine microbienne permet la découverte de l'étiologie de la maladie du charbon, du choléra et de la peste et change ainsi la vision de ces maladies dont la cause devient identifiable (Perrot & Schwartz, 2014).



Photo 2 : Louis Pasteur (Photo prise dans l'hôtel privé, 51 rue d'Anjou St Honoré, 1894)

Le terme vaccin est inventé par Pasteur en 1879 lors d'une étude sur le choléra des poules. Ayant retrouvé d'anciennes cultures de bactéries responsables de la maladie, Pasteur les inocule à des poules et constate que ces dernières développent le choléra sans en mourir, même après inoculation supplémentaire de germes frais. Cette technique de **vaccin atténué artificiel** repose sur le même principe que celui utilisé par Jenner 83 ans plus tôt, Pasteur utilise donc le terme « vaccin » en hommage au travail de Jenner sur la variole et sa forme bovine, la vaccine. Le vaccin est ici qualifié d'atténué artificiel dans la mesure où l'Homme est la cause de l'atténuation des antigènes et non pas un changement d'espèce comme pour le vaccin de Jenner. Cette atténuation des antigènes par l'Homme permet de travailler avec les antigènes issus de l'espèce ciblée par le vaccin sans devoir passer par une souche proche comme la vaccine pour la production du vaccin antivariolique. En 1881, Pasteur définit le principe de vaccination comme « *des virus affaiblis ayant le caractère de ne jamais tuer, de donner une maladie bénigne qui préserve de la maladie mortelle* » qui correspond à la vision actuelle des vaccins atténués (Patel, 2016). C'est le début des recherches sur la vaccination humaine aboutissant à la création du vaccin antirabique administré avec succès en 1885 à Joseph Meister, un enfant de 9 ans mordu par un chien suspecté d'être enragé. L'enfant, tout comme 350 autres personnes ayant reçu le vaccin, ne développeront pas la rage (Debré, 2010).

Pasteur découvrira par la suite que le procédé qu'il utilise pour la fabrication de son vaccin antirabique n'atténue pas l'agent infectieux, mais le détruit. Cette découverte capitale ouvre la voie aux **vaccins inactivés** contenant des antigènes composés de pathogènes tués (vaccination-info-service.fr, 2018a). Les pathogènes tués offrent une meilleure stabilité de la préparation et protègent contre l'induction accidentelle de la maladie. Cependant, ces antigènes ne sont pas toujours aussi performants à produire une réponse immunitaire adéquate et peuvent nécessiter plusieurs doses alors que les antigènes vivants, capables de réplication, assurent une stimulation de longue durée permettant la production de cellules mémoires signe de réponse immunitaire adaptative (World Health Organization, 2013).

I.1.3. Purification des antigènes, la découverte des toxines

La purification des antigènes vise à réduire les risques de transmettre la maladie au patient par l'utilisation de fragments de pathogènes contre lesquels l'immunité est voulue. Cette technique est complexe car il faut analyser les différentes sous-unités des pathogènes afin de produire une combinaison efficace à induire une réponse immunitaire dans un vaccin appelé **sous-unitaire**. Ce type de vaccin déclenche une réponse immunitaire courte qui ne garantit pas la production de cellules mémoire comme pour les vaccins atténués (World Health Organization, 2013).

En 1888, la toxine diphtérique est identifiée comme agent responsable de la diphtérie par Émile Roux (1853-1933) et Alexandre Yersin (1863-1943). La toxine tétanique est découverte deux ans plus tard au Danemark.

En 1923, **Gaston Ramon** (1886-1963) (**Photo 3**), vétérinaire et biologiste français qui a travaillé avec Émile Roux sur la production de sérums antitétanique et antidiphtérique chez le cheval, utilise alors le formol pour la conservation des sérums et toxines afin de les prévenir de toute contamination microbienne. L'utilisation de formol couplé à la chaleur inactive et purifie les toxines diphtérique et tétanique en une forme dérivée inoffensive mais conservant son pouvoir immunisant, rendant ainsi leur utilisation plus sûre (Gilbrin, 1984). Ramon donne au produit de cette transformation le nom d'**anatoxine**. Cette forme inactivée de la toxine permet de ne pas engendrer les symptômes de la maladie au moment de l'inoculation. Cependant, cette grande pureté et la sécurité qui lui est associée ont un coût. Si la conservation des anatoxines est généralement très bonne, l'injection d'une anatoxine provoque des réactions locales plus courantes au point d'injection et ne déclenche pas toujours une réponse immunitaire efficace à assurer la production d'anticorps sans l'aide d'un composé extérieur (World Health Organization, 2013).

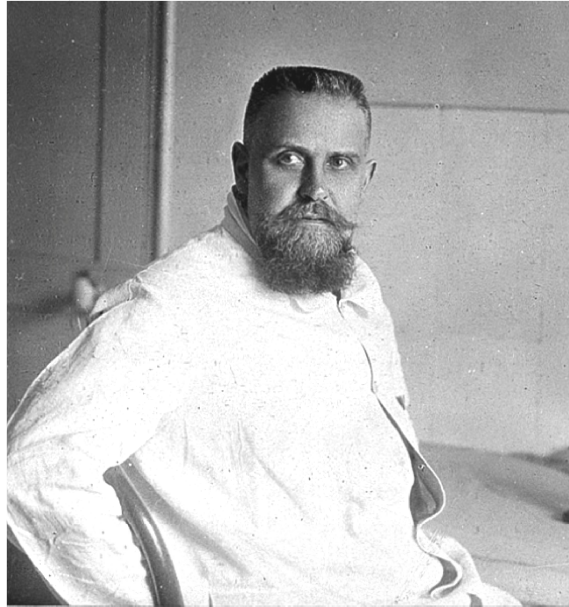


Photo 3 : Gaston Ramon dans le laboratoire de recherche de l'Institut Pasteur, Garches, Octobre 1932

I.2 Les adjuvants vaccinaux, une nécessité

I.2.1. Découverte

L'histoire des adjuvants débute avec la production des anatoxines, lorsque Gaston Ramon constate que la réponse immunitaire après injection de ces composés très purifiés est insuffisante. Il note en 1925 que la production d'antitoxines (que l'on qualifie aujourd'hui d'anticorps) est meilleure en induisant une réaction inflammatoire simultanément à l'injection des anatoxines. Il teste alors diverses substances appelées adjuvants, dont le nom dérivé du latin *adjuvare* signifie « aider », afin d'augmenter la réponse immunitaire en les co-injectant avec l'antigène (Ramon, 1925). L'année suivante, **Alexander Glenny** (1882-1965) immunologiste britannique, découvre les propriétés adjuvantes du sulfate potassique d'Al ($KAl(SO_4)_2$), ou alun, et son action irritante et inflammatoire pour les tissus. En effet, Glenny observe une concentration en antitoxines plus importante dans le sérum lorsque l'alun est co-injecté avec la toxine diphtérique inactivée (Glenny *et al.*, 1926). L'année suivante, l'effet adjuvant de diverses substances, parmi lesquelles la mie de pain ou le tapioca, sera testé, mais c'est finalement l'Al, cette fois sous forme de sels d'hydroxyde ($Al(OH)_3$) ou de phosphate ($Al(OHPO_4)$), qui sera le plus efficace (Chatenoud & Bach, 2012).

Dans les années 1940, deux grandes familles d'adjuvants sont utilisées en vaccination, les sels d'alun et les émulsions d'huile dans l'eau. L'émulsion la plus répandue est l'adjuvant de Freund qui entraîne une excellente réponse immunitaire, malheureusement accompagnée de réactions locales intenses (Freund, Casals & Hosmer, 1937). Des essais seront menés pour améliorer l'adjuvant de Freund mais la découverte dans les années 60 de lésions

granulomateuses accompagnant les inflammations intenses au moment de l'injection, puis la mise en évidence du potentiel carcinogène de métabolites issus des huiles minérales réduiront son intérêt et son utilisation (Singh, 2007).

Paradoxalement, alors que l'adjuvant de Freund se trouve exposé aux critiques et est sujet d'essais d'amélioration, les adjuvants aluminiques eux, restent inchangés jusqu'à aujourd'hui, bien que certaines limites à leur utilisation aient été mises en évidence dès les années 1980 (Tomljenovic & Shaw, 2011). En effet, ces adjuvants n'augmentent pas la réponse immune des toxines tétaniques et diphtériques et induisent une production élevée d'immunoglobuline E (IgE) potentiellement allergéniques (Vassilev, 1978a; Singh, 2007). Les recherches seront néanmoins portées sur la production de nouveaux adjuvants sans réelles tentatives pour comprendre les mécanismes exacts d'action des composés déjà utilisés ou les problèmes de sécurité qu'ils pourraient présenter. En 2002, l'administration américaine des denrées alimentaires et des médicaments (*Food and Drug Administration* (FDA)) écrivait que « le seuil de 15 mg d'alun ou 0,85 mg d'Al par dose vaccinale a été sélectionné empiriquement à partir des données qui ont montré que cette quantité d'Al renforçait l'antigénicité et l'efficacité du vaccin » (Baylor, Egan & Richman, 2002).

I.2.2. Mode d'action

La réponse immunitaire est composée de deux types d'immunité : la réponse innée avec une action cytotoxique non spécifique (phagocytose des pathogènes par des cellules) et la réponse adaptative à la fois humorale (production d'anticorps ou immunoglobulines (Ig) spécifiques) et cellulaire (cytotoxicité spécifique) et dont l'ensemble des diverses intrications ne sont pas encore totalement caractérisées. La fonction première du système immunitaire est d'assurer l'intégrité de l'organisme face aux agressions d'agents pathogènes (Fougereau, 2007). Ainsi, le pathogène introduit dans l'organisme déclenche avant tout une réponse immunitaire innée reposant sur sa détection, par le jeu d'une interaction spécifique entre des récepteurs du soi, les *Pattern Recognition Receptors* (PRR) et les *Pathogen-Associated Molecular Pattern* (PAMP) associés aux pathogènes (Espinosa & Chillet, 2010). Au sein des PRR, la sous-famille la plus importante de ces récepteurs membranaires sont probablement les *Toll-Like-Receptor* (TLR), capables d'identifier les lipides, lipoprotéines, acides nucléiques ou protéines appartenant au non-soi. L'équivalent cytoplasmique est représenté par les *NOD Like Receptor* (NLR) impliqués dans la détection de bactéries intracellulaires. Une fois reconnue, la cellule infectée produit des interférons antiviraux de type I protégeant les cellules voisines (Lapaquette, Nguyen & Faure, 2017).

La réponse inflammatoire permet la prise en charge du pathogène par les macrophages ou les cellules dendritiques qui vont effectuer la phagocytose afin d'internaliser et de décomposer le pathogène et de présenter ses antigènes aux lymphocytes du système immunitaire. Les cellules *Natural killer* (NK) sont également mises à contribution afin de détruire les cellules infectées ou cancéreuses (Espinosa & Chillet, 2010).

L'immunité adaptative qui apparaît après l'immunité innée repose sur la reconnaissance des antigènes spécifiques de l'agent pathogène présenté par les cellules présentatrices d'antigènes aux lymphocytes via le complexe majeur d'histocompatibilité (CMH). Le CMH de classe I donne le signal aux lymphocytes T CD8 qui deviennent cytotoxiques par expression d'un récepteur spécifique à l'antigène à leur surface et sont capables d'action directe sur les antigènes ou d'action indirecte via la sécrétion d'interféron gamma ou d'interleukines (IL) activant d'autres types de cellules de l'immunité. Le CMH de classe II provoque la maturation des lymphocytes T CD4 en lymphocytes auxiliaires ou *helper* : c'est l'immunité cellulaire (Lapaquette, Nguyen & Faure, 2017). Les lymphocytes B répondent à cette présentation d'antigènes par la production d'Ig et anticorps circulants avec une action systémique : c'est l'immunité humorale. Des cellules mémoire capables d'une réponse plus rapide et plus intense en cas de rencontre future avec le même antigène sont également produites si la durée de mise en contact entre l'antigène et le système immunitaire est suffisamment longue. L'ensemble de ces réactions étant étroitement contrôlées par des chimiokines, cytokines et cellules accompagnatrices comme les Th, pour lymphocytes T auxiliaires ou *helper*.

Le rôle des adjuvants est d'aider les antigènes vaccinaux, à faible pouvoir immunogène, à induire la réponse immunitaire innée puis d'augmenter l'amplitude de la réponse adaptative dirigée contre ces antigènes spécifiques afin de mimer l'attaque de l'agent pathogène porteur des antigènes utilisés. Ce rôle d'aide peut devenir primordial avec de nombreux antigènes comme les peptides ou les haptènes car la grande pureté des molécules utilisées les rend très peu immunogènes (Bégué *et al.*, 2012). L'ensemble des adjuvants, dont les adjuvants aluminiques, servent également à orienter la réponse immunologique obtenue vers la voie humorale ou cellulaire en augmentant spécifiquement la production de certains isotopes d'anticorps ou de cellules mémoire de l'immunité (Malé, 2016). Cependant, près d'un siècle après les travaux de Ramon et malgré des études approfondies, le rôle précis des adjuvants, en particulier aluminiques, dans la réponse immunitaire reste toujours relativement peu détaillé (Fougereau, 2007; Exley *et al.*, 2009; Exley, Siesjö & Eriksson, 2010). L'étude de la réponse immunitaire après injection de composés aluminiques suggère une forte réponse immunitaire innée avec attraction de neutrophiles, de monocytes et macrophages, d'éosinophiles et de cellules présentatrices d'antigène CMH de classe II, en particulier des cellules dendritiques (Lu & Hogenesch, 2013). Les macrophages musculaires sont les premiers à intervenir après la détection de l'Al (Brigitte *et al.*, 2010). *In vitro*, la forte liaison de l'antigène avec l'oxy-hydroxyde d'Al (AH) permet d'augmenter l'absorption de l'antigène et sa prise en charge par les cellules présentatrices d'antigènes (Ghimire *et al.*, 2012). Dans le muscle, la production locale de chimiokines par ces cellules permet le recrutement d'autres types cellulaires comme les neutrophiles et les monocytes inflammatoires qui se différencient en cellules dendritiques inflammatoires (Brigitte *et al.*, 2010). Ces cellules immatures ayant phagocyté l'antigène migrent ensuite vers le paracortex des ganglions lymphatiques tout en devenant des cellules matures au contact des lymphocytes T présents au niveau du ganglion (Liao *et al.*, 2012). Les adjuvants aluminiques induisent également une polarisation des lymphocytes T naïfs en cellules effectrices de type Th2 (HogenEsch, 2002; Sokolovska, Hem & HogenEsch, 2007). La voie Th2 préférentielle des adjuvants aluminiques oriente la réponse immunitaire vers la voie humorale et permet une forte production d'anticorps dans la mesure

où la production d'IL-4 par les cellules Th2 favorise la sécrétion d'IgG et d'IgE (Ulanova *et al.*, 2001; Malé, 2016). La voie Th1 favorise quant à elle la production de lymphocytes T cytotoxiques et de macrophages impliqués dans la voie cellulaire. Les recherches dans le domaine suggèrent que l'Al des vaccins pourrait agir par de nombreuses voies, incluant l'inflammasome NALP3 (Exley, Siesjö & Eriksson, 2010) aussi nommé inflammasome NLRP3, bien que sa totale nécessité dans l'effet adjuvant soit contestée en fonction des études menées (Eisenbarth *et al.*, 2008; Li *et al.*, 2008; Franchi & Núñez, 2008; Kool *et al.*, 2008; Spreafico, Ricciardi-Castagnoli & Mortellaro, 2010). Une hypothèse est que les particules d'Al captées par les cellules phagocytaires seraient en mesure d'entraîner des dommages et une rupture lysosomale libérant l'Al ainsi que des enzymes telles que la Cathepsine B dans le cytoplasme (Hornung *et al.*, 2008; Herd, Malugin & Ghandehari, 2011). Les composés libérés représenteraient alors un signal de danger suffisant à activer le NLRP3 et assurer l'initiation de la réponse immunitaire (Eisenbarth *et al.*, 2008; Li *et al.*, 2008; Marrack, McKee & Munks, 2009). Une seconde hypothèse repose sur une action indirecte des adjuvants aluminiques avec production d'un composé intermédiaire. La présence d'espèces réactives de l'oxygène (ROS) ou l'apoptose entraînée par la libération de cytochrome C après perturbation des mitochondries par les particules d'Al (Arab-Nozari *et al.*, 2019) entraînent la production d'urate de sodium (Shi, Evans & Rock, 2003; Lambrecht *et al.*, 2009). L'urate de sodium ainsi que les ROS produits seraient alors les molécules activatrices de l'inflammasome NLRP3 (Martinon *et al.*, 2006; Dostert *et al.*, 2008). Ces deux hypothèses n'étant pas exclusives, rien n'empêche leurs véracités communes et puisque l'absence de NLRP3 n'inhibe pas totalement la réponse immunitaire, il est probable qu'une autre voie de signalisation soit également à l'œuvre dans l'action adjuvante des composés aluminiques (Martinon *et al.*, 2006; Lambrecht *et al.*, 2009). Cette autre voie pourrait passer par la libération d'ADN double brin appartenant à l'hôte après apoptose des cellules immunitaires ayant pris en charge les particules d'Al. Ces molécules d'ADN pourraient en effet agir comme un adjuvant endogène capable d'activer la réponse des lymphocytes B et de stimuler la voie Th2 (Marichal *et al.*, 2011).

L'AH comme d'autres cristaux tels que la silice, l'amiante ou l'urate de sodium, entraînent *in vitro* une forte activation du NLRP3, une libération d'IL-1 β et d'IL-18, en particulier dans les cellules dendritiques, et une forte activité inflammatoire (Sokolovska, Hem & HogenEsch, 2007; Awate, Babiuk & Mutwiri, 2013; Sun *et al.*, 2013a; Muñoz-Wolf & Lavelle, 2018). Cette forte capacité pro-inflammatoire explique la capacité des adjuvants aluminiques à recruter des cellules de l'immunité et déclencher une stimulation et une différenciation des lymphocytes T (Sun *et al.*, 2013b; Sun & Xia, 2016). Les particules d'AH auraient également un effet plus irritant que l'Al soluble de par la spécificité des voies de signalisation activées par ces cristaux (Shi, 2012; Arab-Nozari *et al.*, 2019). Les adjuvants aluminiques se lient systématiquement à la bicouche lipidique de la membrane plasmique et l'attaquent (Hornung *et al.*, 2008), ce qui perturbe l'action des lysosomes chargés de la dégradation de matériaux absorbés par endocytose, phagocytose ou autophagocytose (Hornung *et al.*, 2008; Lima *et al.*, 2013), et joue un rôle important dans l'immunité. Cependant, les protéases lysosomales et des modulations de pH utilisées par les cellules dendritiques produisent des peptides utilisés par le CMH plutôt qu'une lyse totale des protéines (Trombetta *et al.*, 2003). La limitation de la

protéolyse lysosomale des protéines antigéniques augmente donc la présentation des antigènes et l'immunogénicité (Delamarre *et al.*, 2006). La stabilité des complexes CMH II-peptide qui permettent leur accumulation à la surface de la cellule dendritique est augmentée par l'inhibition de l'activité lysosomale (Shin *et al.*, 2006). L'action adjuvante des adjuvants aluminiques pourrait donc passer par une perturbation de l'activité lysosomale en sus d'une rupture physique de la membrane provoquée directement par la structure cristalline de l'adjuvant (Kang & Locksley, 2009). Cependant, ces connaissances n'expliquent pas le rôle exact des particules d'Al et des recherches restent nécessaires afin de caractériser les effets biochimiques de ces adjuvants dans l'organisme.

Dans les années 1980, les adjuvants se feront connaître du grand public par la biais de Charles Janeway (1943-2003), immunologiste de l'Université de Yale, qui révéla ce qu'il appelait « *le sale petit secret des immunologistes* » (Sansonetti, 2017). La **Figure 1** schématise les grandes étapes de l'action des adjuvants Al développées dans le chapitre précédent.

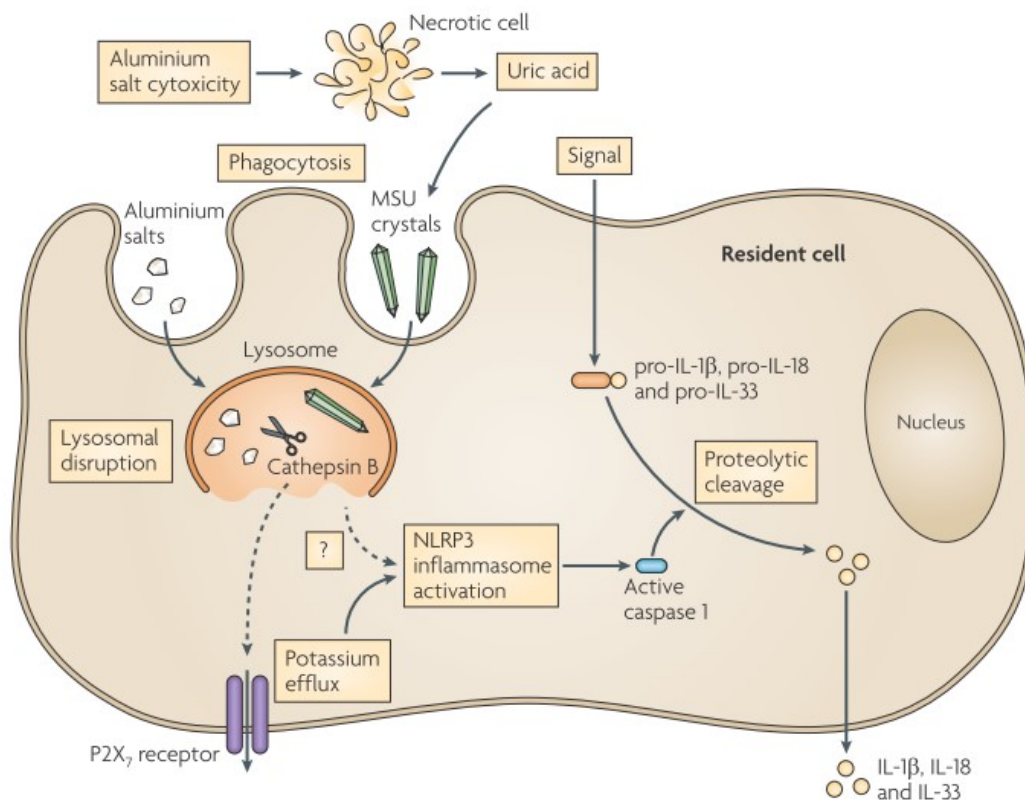


Figure 1 : Représentation schématique des points clé de l'action des adjuvants aluminiques selon les données et hypothèses actuelles
Reproduction de la figure originale 1 de Marrack *et al.* (2009)

I.3. L'aluminium vaccinal, analyse des études toxico-cinétiques de référence (Masson *et al.*, 2018)

Ce chapitre est une reproduction d'une revue publiée en 2018 dans *Journal of Inorganic Biochemistry*, dans laquelle nous avons examiné en détail et à la lumière des études scientifiques récentes, les trois articles de toxicocinétiques de la littérature servant de référence aux agences de régulation sanitaire et aux industriels pour affirmer l'innocuité des adjuvants aluminiques (cf Publication 2, section valorisation scientifique (Masson *et al.*, 2018)).

I.3.1. Généralités

Les deux principaux adjuvants aluminique, l'AH et l'hydroxy-phosphate d'aluminium (AP), sont présents dans environ 60 % des vaccins humains (**Tableau 1**) et vétérinaires (Spickler & Roth, 2003). La forme oxy-hydroxyde est l'adjuvant le plus utilisé dans les vaccins distribués en France (tous les vaccins contre l'hépatite B, l'hépatite A, ou possédant une valence tétanique, de nombreux autres vaccins, ainsi que les produits pour immunothérapie sous-cutanée de désensibilisation). Pour les vaccins contre le papillomavirus humain (HPV) les adjuvants sont l'AH pour le divalent 16/18 Cervarix[®] (associé à un second adjuvant, le monophosphoryl lipid A, dérivé détoxifié du lipopolysaccharide (Thompson *et al.*, 2005)) et le sulfate d'hydroxy-phosphate d'Al amorphe pour le quadrivalent 6/11/16/18/ Gardasil[®] (un adjuvant plus immunostimulant que les adjuvants aluminiques classiques mais dont l'étude n'est pas possible car il est propriété exclusive de la société Merck) (Caulfield *et al.*, 2007).

Tableau 1 : Liste des vaccins commerciaux humains contenant un adjuvant aluminique (données 2018)

Nom commercial	Laboratoire	Adjuvant aluminique
Mélange de bactéries et de virus		
Diphtérie, tétanos, coqueluche acellulaire, poliomyélite, Haemophilus influenzae B et hépatite B		
• InfanrixHexa	GSK	Al-Phosphate : 0.32 mg/dose Al-Hydroxyde : 0.50 mg/dose (0.5 ml)
Diphtérie, tétanos, coqueluche acellulaire, Poliomyélite et Haemophilus influenzae B		
• InfanrixQuinta	GSK	Al-Hydroxyde : 0.50 mg/dose (0.5 ml)
• Pentavac	Sanofi Pasteur MSD	Al-Hydroxyde : 0.30 mg/dose (0.5 ml)
Diphtérie, tétanos, coqueluche acellulaire et Poliomyélite		
DTCaPolio		
• InfanrixTetra	GSK	Al-Hydroxyde : 0.50 mg/dose (0.5 ml)
• Tetravac acellulaire	Sanofi Pasteur MSD	Al-Hydroxyde : 0.30 mg/dose (0.5 ml)
dTcaPolio		
• Boostrixtetra	GSK	Al-Hydroxyde : 0.30 mg/dose + Al-Phosphate : 0.20 mg/dose (0.5 ml)
• Repavax	Sanofi Pasteur MSD	Al-Phosphate : 0.33 mg/dose (5 ml)
Diphtérie, tétanos et Poliomyélite		
• Revaxis	Sanofi Pasteur MSD	Al-Hydroxyde : 0.35 mg/dose (0.5 ml)
Bactéries		
Méningocoque		
Méningocoque C		
• Meningitec	Pfizer Holding	Al-Phosphate : 0.125 mg/dose (5 ml)
• Menjugatekit	Novartis Vaccines and diagnostics	Al-Hydroxyde : 0.35 mg/dose (0.5 ml)
• Neisvac	Pfizer Holding	Al-Hydroxyde : 0.50 mg/dose (0.5 ml)
Méningocoque B		
• Bexsero	Novartis Vaccines and diagnostics	Al-Hydroxyde : 0.50 mg/dose (0.5 ml)
Pneumocoque		
• Prevenar 13	Pfizer Holding	Al-Phosphate : 0.125 mg/dose (5 ml)
• Pasteur tetanic vaccin	Sanofi Pasteur MSD	Al-Hydroxyde : 0.60 mg/dose (0.5 ml)
Virus		
Hépatite B		
• Engerix 10 µg/0.5 ml	GSK	Al-Hydroxyde : 0.25 mg/dose (0.5 ml)
• Engerix 20 µg/1 ml	GSK	Al-Hydroxyde : 0.50 mg/dose (1 ml)
• HBVAXPRO 5µg/0.5 ml	Sanofi Pasteur MSD	Al-hydroxyphosphate sulfate 0.25 mg/dose (0.5 ml)
• HBVAXPRO 10µg/1 ml	Sanofi Pasteur MSD	Al-hydroxyphosphate sulfate 0.25 mg/dose (1 ml)
• GenHevac B Pasteur	Sanofi Pasteur	Al-Hydroxyde ≤ 1.25 mg/dose (1 ml)
Hépatite A		
• Avaxim adulte	Sanofi Pasteur	Al-Hydroxyde : 0.30 mg/dose (0.5 ml)
• Havrix 1440 U/1 ml adulte	GSK	Al-Hydroxyde : 0.50 mg/dose (1 ml)
• Havrix 720 U/0.5 ml enfant et femme enceinte	GSK	Al-Hydroxyde : 0.25 mg/dose (0.5 ml)
Encéphalite à tiques		
• Ticovac 0.5 ml adulte	Baxter	Al-Hydroxyde : 0.35 mg/dose (0.5 ml)
• Ticovac 0.25 ml enfant	Baxter	Al-Hydroxyde : 0.17 mg/dose (0.25 ml)
• Encepur	Novartis Vaccines and diagnostics	0.35 mg/dose (0.5 ml)
Encéphalite japonaise		
• Ixiaro		Al-Hydroxyde : 0.25 mg/dose (0.5 ml)
Papillomavirus Humain (HPV)		
• Cervarix	GSK	Al-Hydroxyde : 0.50 mg/dose (0.5 ml) + 3-O-desacyl-4'-monophosphoryl lipide A (50 µg)
• Gardasil	Sanofi Pasteur MSD	Al-hydroxyphosphate sulfate 225 µg/dose (0.5 ml)
Hépatite A et B		
• Twinrix adulte	GSK	Al-Hydroxyde : 0.05 mg/dose + Al-Phosphate : 0.40 mg/dose (1 ml)
• Twinrix enfant	GSK	Al-Hydroxyde : 0.025 mg/dose + Al-Phosphate : 0.20 mg/dose (0.5 ml)

Les deux grands types d'adjuvants aluminiques potentialisent fortement la production d'anticorps (réponse humorale par activation des lymphocytes CD4⁺ Th2 et priming des lymphocytes B) et pas, ou très peu, la production de lymphocytes T cytotoxiques. Les mécanismes mis en jeu sont encore incomplètement compris (Marrack, McKee & Munks, 2009; Exley, Siesjö & Eriksson, 2010). La FDA a fixé empiriquement le niveau autorisé d'adjuvant à 0,85 mg d'Al par dose de vaccin, sur la base de résultats montrant un bon effet adjuvant à cette concentration (selon Joan May, FDA/CBER (Center for Biologics Evaluation and Research), citée dans (Baylor, Egan & Richman, 2002)). Cette concentration, qui reste sujette à caution, est de plus très imprécise au regard des données du fabricant et fluctuante entre vaccins d'un même lot (Shardlow *et al.*, 2021).

I.3.2. Propriétés

Les deux adjuvants aluminiques possèdent des propriétés physico-chimiques différentes à l'état natif. L'AH possède une morphologie cristalline, connue sous le nom de Boehmite, alors que l'AP est amorphe. L'AH est composé de nanoparticules d'environ 2,2 nm x 4,5 nm x 10 nm qui forment spontanément des agrégats microniques ayant un aspect nano-fibreux en microscopie électronique à transmission (Eidi *et al.*, 2015; Mold, Shardlow & Exley, 2016). Cet adjuvant est fortement hydraté, formant un gel stable dont les capacités d'adsorption antigénique sont uniformément élevées. Les interactions hydrostatiques et les échanges des groupes hydroxyles par du phosphate sont les principales forces expliquant l'adsorption à la surface de l'adjuvant. L'AP possède moins de groupes hydroxyles, et ses capacités d'adsorption antigénique sont donc moindres que celles de l'AH. L'AH possède une charge de surface positive, le phosphate une charge négative. Les cinétiques de biodisposition des deux adjuvants sont également significativement différentes : l'AH est beaucoup plus lentement solubilisé, plus avidement internalisé par les macrophages et moins toxique pour les cellules phagocytaires (Mold, Shardlow & Exley, 2016; Shardlow, Mold & Exley, 2018) que l'AP, suggérant des différences notables de réactions des deux adjuvants lors des interactions avec l'AP, les acides organiques, les environnements protéiniques et les cellules immunitaires rencontrés *in vivo*.

I.3.3. Une innocuité non vérifiée

Les plus hautes autorités mondiales en matière de santé tels que l'OMS, le *Centers for Disease Control and Prevention* (CDC) américain ou le *vaccine knowledge project* de l'université d'Oxford (World Health Organization, 2012; Oxford vaccine group, 2019; Centers for Disease Control, 2019) déclarent les adjuvants aluminiques comme sûrs. Cependant, un nombre croissant d'études démontre une bio-persistance des adjuvants Al beaucoup plus importante qu'escomptée, associée à une translocation lente des particules vers des organes distants du site d'injection et une neurotoxicité des composés mise en avant par la présence de troubles comportementaux chez l'animal (cf le chapitre I.4.1.2. pour plus de détails) Ces données sont à même d'interpeller le grand public de posant de plus en plus de

questions au sujet de la réelle sécurité des adjuvants Al. Il n'existe en effet qu'une seule étude expérimentale citée comme référence pour garantir la sécurité des adjuvants Al qui analyse réellement le devenir des adjuvants dans l'organisme jusqu'à 28 jours après injection intramusculaire (IM) chez des lapins (Flarend *et al.*, 1997) et deux analyses théoriques comparant l'accumulation d'Al issu de l'alimentation et de la vaccination chez les enfants à un seuil de sécurité extrapolé d'observations faites sur modèle animal (Keith, Jones & Chou, 2002; Mitkus *et al.*, 2011). Notons toutefois que l'analyse de la cinétique *in vivo* des composés Al (adjuvants et vaccins entiers) a récemment été complétée par une étude menée chez le rat démontrant la longue persistance des adjuvants Al dans l'organisme et la translocation vers d'autres organes, ces deux paramètres étant étudiés jusqu'à 80 jours après injection (Weisser *et al.*, 2019).

I.3.3.1. Étude de l'absorption et de l'élimination de l'aluminium vaccinal (Flarend *et al.*, 1997)

Pendant longtemps les instances internationales spécialisées ont tenu pour un fait acquis que l'Al injecté par voie vaccinale était pour l'essentiel rapidement éliminé de l'organisme par voie urinaire (Eickhoff & Myers, 2002) et, encore actuellement, ce message est relayé par des sites officiels d'information à destination du grand public (Oxford Vaccine Group, 2015; vaccination-info-service.fr, 2021). Cette affirmation prend sa source dans des études des années 90 utilisant une nouvelle technique d'étude de la toxico-cinétique de l'Al. En effet, jusqu'en 1990, il était difficile de connaître le devenir précis de l'Al *in vivo*, car on ne pouvait différencier l'Al administré de celui provenant d'autres formes d'exposition ou de contaminations externes des échantillons. L'utilisation comme traceur de l'isotope faiblement radioactif ^{26}Al , distinct du ^{27}Al naturel, a permis de détecter de très petites quantités d'Al (10^{-17}g) grâce à la spectrométrie de masse par accélérateur (Hem, 2002). Un article publié en 1995 a été la première étude à injecter par voie intraveineuse (IV) du citrate de ^{26}Al , une forme soluble d'Al, à un unique volontaire sain pour étudier la toxico-cinétique de l'ion Al chez l'homme (Priest *et al.*, 1995). Les auteurs ont constaté que plus de la moitié de l'Al injecté avait quitté le secteur sanguin après 15 minutes, et qu'il en restait moins de 1 % après deux jours. Au 13^{ème} jour, 83 % de la dose injectée avait été excrétée par voie urinaire et 1,8 % par voie fécale. Les 15 % restant dans l'organisme après cette date déclinaient ensuite très lentement puisque la rétention du ^{26}Al était encore de 4 % après 3 ans. Des résultats analogues ont été reproduits suite à des injections IV chez 6 autres volontaires sains, avec néanmoins des variations interindividuelles notables dans le degré de rétention de l'Al (Talbot *et al.*, 1995). Ces travaux ont ainsi montré une élimination multiphasique de l'Al circulant, comportant une phase d'élimination rapide initiale, suivie de phases d'élimination beaucoup plus lentes. Les expositions environnementales multiples vont ainsi favoriser l'accumulation progressive de l'Al dans l'organisme au cours de la vie d'un individu (Priest *et al.*, 1995). Il est indispensable de bien prendre en compte que, dans ces études toxico-cinétiques préliminaires, ni la forme de l'Al (soluble) ni la voie d'administration IV ne correspondait à la situation vaccinale, où l'Al est injecté sous forme nano/micro-particulaire et par voie sous-cutanée (SC) ou IM.

A l'aide du même traceur ^{26}Al , Flarend *et al.*, (1997) ont ensuite réalisé la seule étude pharmaco-cinétique des adjuvants aluminiques de la littérature. Il faut noter que cette étude était initialement considérée comme une étude préliminaire (Eickhoff & Myers, 2002), mais qu'elle n'a été suivie d'aucune étude définitive. L'Académie Nationale de Médecine souligne que « *ce travail expérimental, unique à ce jour, sert pour la modélisation de la pharmacocinétique des adjuvants* » (Bégué *et al.*, 2012). Cette unique étude de référence pâtit cependant de nombreuses faiblesses dans ses hypothèses de travail, son design, et l'interprétation de ses résultats.

a) *Une hypothèse de départ erronée*

A l'époque où a été réalisée l'étude, l'hypothèse en vigueur était celle de Glenny (1926) selon laquelle l'adjuvant aluminique (initialement du sulfate potassique d'Al $\text{KAl}(\text{SO}_4)_2$) formait un dépôt local à partir duquel une désorption progressive de l'antigène vaccinal avait lieu, à l'origine de l'effet adjuvant observé. Cette théorie du dépôt a récemment été mise en doute (Marrack, McKee & Munks, 2009), puis abandonnée (Hutchison *et al.*, 2011). En s'appuyant sur ce dogme initial, Stanley Hem, un chimiste de formation, avait étudié *in vitro* les cinétiques de dissolution d'une dose d'adjuvant aluminique (correspondant à 0,85 mg d'Al) dans 25 ml d'un milieu dont la concentration en acide faible chélateur de l'Al (citrate) était identique à celle du liquide interstitiel (Seeber, White & Hem, 1991). A pH 7,35 et température ambiante, il avait observé une dissolution de 55 % de l'AP à 12 h contre 0 % pour deux adjuvants à base d'AH du commerce. En augmentant la concentration du citrate par un facteur x100 et en portant la température à 37 °C, une dissolution de 100 % de la forme phosphate était observée à 12 h contre moins de 6 % pour les formes hydroxyde. A 132 heures (temps final de l'étude), la dissolution des formes hydroxyde était seulement de 7 à 10 %. Tout en mentionnant l'existence d'une cinétique différente de dissolution des formes phosphate et hydroxyde d'Al *in vitro*, Flarend *et al.* ont posé comme hypothèse de départ de leur étude *in vivo* que les deux adjuvants injectés chez le lapin seraient solubilisés au contact des acides organiques chélateurs possédant un groupe acide alpha-hydroxy carboxylique (acides citrique, lactique et malique) présents dans le liquide interstitiel. Cette hypothèse de départ est largement fautive à deux titres : la solubilisation de l'AH antérieurement constatée *in vitro* était nulle en présence d'une concentration physiologique en citrate (Seeber, White & Hem, 1991) et, surtout, les auteurs n'ont pas considéré le fait, ultérieurement avéré, qu'une fois injectés dans un tissu, les agglomérats d'adjuvant sont rapidement capturés par les cellules du système immunitaire inné (Gherardi *et al.*, 2001a; Verdier *et al.*, 2005; Authier *et al.*, 2006; Mold *et al.*, 2014; Eidi *et al.*, 2015) et sont donc rapidement soustraits à l'effet dissolvant des chélateurs du liquide interstitiel. Stanley Hem, qui semblait ignorer la capture cellulaire des adjuvants aluminiques, occasionnellement observée antérieurement à son étude pour l'AH (Erdohazi & Newman, 1971; Slater *et al.*, 1982; Mrak, 1982), la reconnaîtra implicitement quelques années plus tard en montrant l'importance de la phagocytose dans l'effet immunologique (Morefield *et al.*, 2005).

b) Un protocole d'étude au design limité et imparfait

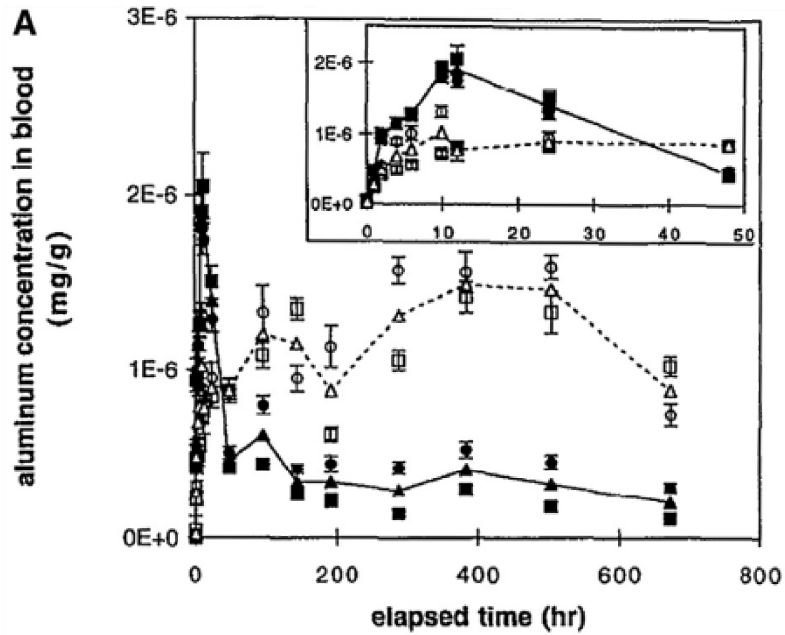
Flarend *et al.*, (1997) ont injecté 0,85 mg de ^{26}Al sous forme AH ou AP par voie IM à des lapins :

- Seulement 2 lapins ont été injectés pour chaque sel d'Al étudié : ce nombre semble très insuffisant pour permettre une interprétation fiable des données sur une expérimentation biologique. En effet, les expériences montreront une forte variation interindividuelle de l'élimination urinaire d'Al après l'injection d'AP (**Figure 2**). De telles variations interindividuelles ont déjà été observées après une injection IV d'Al chez l'homme (Talbot *et al.*, 1995) ;
- L'étude a porté sur une durée très limitée de 28 jours: les résultats *in vitro* antérieurs de l'équipe rendaient improbable l'élimination de l'AH après un délai aussi court (Seeber, White & Hem, 1991) ;
- L'hydroxyde d'Al utilisé, fabriqué par précipitation, diffère de l'oxy-hydroxyde d'Al (Alhydrogel[®]) utilisé dans les vaccins commerciaux et de l'hydroxyde d'Al (Imject[®]) utilisé comme adjuvant vaccinal expérimental (Cain *et al.*, 2013). Une option possible aurait été d'incuber longuement du ^{26}Al avec de l'Alhydrogel[®] et d'attendre l'échange entre ^{27}Al et ^{26}Al afin de marquer l'adjuvant officiel.

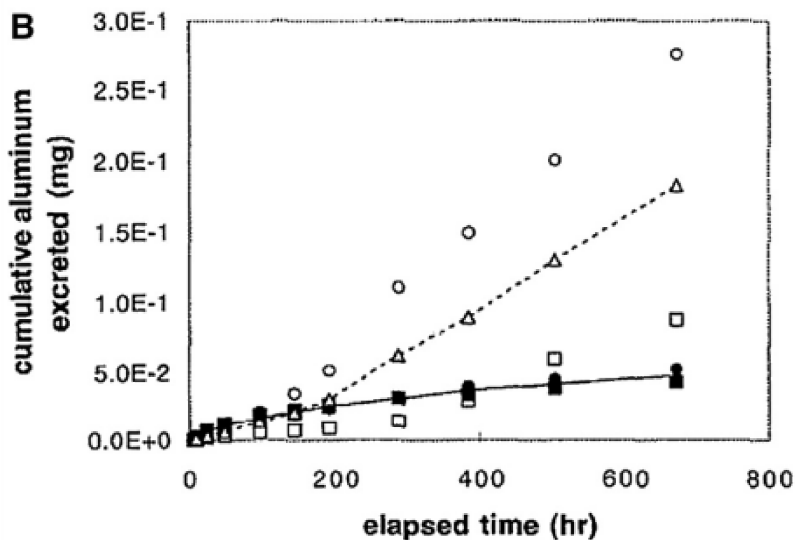
c) Des tissus cibles oubliés ou détruits

Le manque de pertinence des organes prélevés à l'issue de l'étude afin d'étudier la biodistribution du ^{26}Al est frappant :

- Les muscles injectés n'ont pas été prélevés rendant impossible la détermination de la quantité d'adjuvant restée au site d'injection alors même que l'étude se fondait sur la « théorie du dépôt » ;
- Les ganglions prélevés étaient des ganglions intestinaux et pas les ganglions de drainage de la zone injectée, alors que le drainage de l'adjuvant vers les ganglions lymphatiques régionaux est une voie essentielle de la dissémination systémique de l'adjuvant (Khan *et al.*, 2013; Crépeaux *et al.*, 2015; Eidi *et al.*, 2015) ;
- Les os prélevés (fémurs) ont été perdus, alors que l'os est le lieu de fixation préférentiel de l'Al soluble circulant, loin devant le rein et les autres organes (Walker *et al.*, 1994; AFSSAPS, 2011) ;
- Les cerveaux ont bien été prélevés, mais l'un d'eux a été détruit, appartenant à l'animal présentant la plus forte absorption sanguine de ^{26}Al (animal injecté avec AP).



Blood concentration profile after i.m. administration of ^{26}Al -labelled aluminium hydroxide adjuvant: ■, rabbit 1; ●, rabbit 2; ▲, mean; or aluminium phosphate adjuvant: □, rabbit 3; ○, rabbit 4; △, mean



Cumulative urinary excretion of aluminium after i.m. administration of ^{26}Al -labelled aluminium hydroxide adjuvant: ■, rabbit 1; ●, rabbit 2; ▲, mean; or aluminium phosphate adjuvant: □, rabbit 3; ○, rabbit 4; △, mean. Error bars of <5% are not shown

Figure 2 : Représentation de la cinétique d'élimination des adjuvants aluminiques chez le lapin

Reproduction des figures originales 1 et 2 de Flarend *et al.*, (1997). Concentration plasmatique (A) et excretion urinaire cumulee (B) du ^{26}Al après injection IM d'hydroxyde de ^{26}Al et de phosphate de ^{26}Al chez le lapin.

d) *Des mesures de plasma d'emblée contraires à l'hypothèse de travail*

Dans leur étude, Flarend *et al.* ont mesuré l'isotope ^{26}Al dans le sang et les urines pendant les 28 jours de l'étude, puis dans les organes prélevés *post-mortem*.

La première constatation est la survenue d'un pic sanguin initial de ^{26}Al . De façon inexplicable, c'est la forme hydroxyde qui induit le pic le plus net, l'augmentation étant notée dès le premier point (1 h), culminant à 10 h et s'achevant à 48 h (**Figure 2A**). Les auteurs interprètent ce pic initial comme résultant d'une dissolution précoce de l'hydroxyde, ce qui semble douteux au regard de l'absence totale de solubilisation de la forme hydroxyde observée à 12 h *in vitro* (Seeber, White & Hem, 1991). En revanche, la forme phosphate sensée se solubiliser plus rapidement que la forme hydroxyde ne provoque qu'une modeste élévation plasmatique de ^{26}Al initiale, comme en témoigne une aire sous la courbe plus élevée d'un facteur x1,4 en faveur de l'hydroxyde dans les 48 premières heures. L'hypothèse d'une possible fuite sanguine initiale d'AH sous forme nano/microparticulaire n'est pas envisagée.

A partir de la 48^{ème} heure, la concentration plasmatique de ^{26}Al devient et restera nettement supérieure pour l'AP comparé à l'AH (**Figure 2A**). Les auteurs ne commentent pas l'existence d'ondulations des concentrations plasmatiques avec des pics à 100 h et 400 h, constatée pour les deux adjuvants mais plus nettes pour l'AP, qui pourraient suggérer des phénomènes cycliques d'absorption, peut-être liés à des phénomènes de capture/relargage cellulaires ou tissulaires. A 28 jours, l'absorption du ^{26}Al à partir de l'adjuvant phosphate est 3 fois supérieure à celle observée pour l'AH.

A l'issue de l'étude, les auteurs insistent sur l'absence de phase terminale au niveau de la courbe des concentrations plasmatiques, c'est-à-dire de phase terminale d'absorption sanguine du ^{26}Al . L'examen ultérieur des courbes par le groupe de Mitkus *et al.* indique qu'en fait l'absorption du ^{26}Al a amorcé la phase terminale pour l'AP et est déjà très proche de zéro pour l'AH au 28^{ème} jour de l'étude (**Figure 2A**). Pour l'AH, les niveaux plasmatiques de ^{26}Al sont très bas dès la 100^{ème} heure et l'absorption décroît de façon continue de la 400^{ème} à la 700^{ème} heure, indiquant un passage plasmatique d'Al extrêmement faible après le pic initial.

e) *Des conclusions contraires à celles suggérées par les résultats*

Il existe une forte différence d'excrétion urinaire de ^{26}Al entre les deux adjuvants. A 28 jours, 22 % du ^{26}Al de l'adjuvant phosphate a été éliminé dans les urines, avec des écarts importants entre les deux lapins étudiés (10-33 %). A la même date, seulement 5,6 % (5,0-6,2 %) du ^{26}Al de la forme hydroxyde est éliminé. Le niveau de rétention de plus de 94 % à 28 jours observé pour l'AH semble clairement lié à sa très faible solubilisation. En tenant compte du pic sanguin initial, dont la signification en terme de solubilisation est pourtant très incertaine (cf I.3.4.1.a), les auteurs calculent d'ailleurs que seulement 17 % du ^{26}Al est absorbé à partir de l'hydroxyde à 28 jours (contre 51 % pour le phosphate). En conséquence, la distribution dans les différents tissus du ^{26}Al montre des concentrations tissulaires constamment plus élevées pour la forme phosphate (avec un facteur d'environ x2,9) (Flarend *et al.*, 1997). La

distribution est harmonieuse pour les deux adjuvants (rein > rate > foie > cœur > ganglion > cerveau), réserves faites sur l'absence d'étude des muscles injectés, des ganglions de drainage et de l'os. Cette distribution ne vaut que pour le temps court de l'étude. Ce point est particulièrement important si on considère la possibilité d'une translocation lente de l'AH dans les organes lymphoïdes (Crépeaux *et al.*, 2015) et le cerveau (Khan *et al.*, 2013).

Les auteurs soulignent que l'élimination du ^{26}Al persiste dans les urines à l'état d'équilibre pour les deux adjuvants à 28 jours. Cependant, si l'étude de la dose cumulée excrétée montre une augmentation franche avec le temps chez un des lapins pour la condition phosphate, la pente est nettement plus faible pour le second lapin et quasi-plate pour l'hydroxyde (**Figure 2B**). Ces résultats indiquent que l'élimination peut être lente pour l'adjuvant phosphate, et est très faible pour l'hydroxyde.

Les auteurs indiquent pourtant que « la dissolution, l'absorption, la distribution et l'élimination des adjuvants aluminiques a été démontrée » par leur étude. Le caractère rassurant de ces résultats a été communiqué dans la communauté scientifique comme l'indique le rapport de conférence du *National Vaccine Program Office* de 2002 à San Juan, Puerto Rico (Eickhoff & Myers, 2002). Cependant, une conclusion inverse aurait dû être faite par les auteurs dans une perspective de sécurité vaccinale, soulignant la faible dissolution et la faible élimination des adjuvants aluminiques, notamment de forme hydroxyde, et la nécessité de conduire des études complémentaires de long terme menées sur un plus grand nombre d'animaux. Les agences de régulation elles-mêmes auraient été bien inspirées de commander des études toxico-cinétiques complémentaires afin d'éviter la propagation d'informations hasardeuses sur l'élimination rapide des adjuvants aluminiques (Oxford Vaccine Group, 2015), surtout après avoir pris connaissance des études ultérieures montrant la phagocytose, la persistance intracellulaire, la migration à distance et la neurotoxicité des adjuvants aluminiques (Gherardi *et al.*, 2001a; Khan *et al.*, 2013; Crépeaux *et al.*, 2015; Eidi *et al.*, 2015).

I.3.3.2. Calculs théoriques suggérant l'innocuité des doses d'Al vaccinal administrées au nourrisson

Deux études ont estimé les quantités théoriques d'Al auxquelles le nourrisson est exposé, par voie alimentaire et vaccinale (Keith, Jones & Chou, 2002; Mitkus *et al.*, 2011). Le principe des deux études est similaire : il s'agit de calculs théoriques fondés sur l'apport et l'excrétion d'Al de la naissance à 12 mois. L'accumulation calculée d'Al est comparée au niveau de sécurité déterminé, pour la voie orale, par l'Agence des substances toxiques du CDC américain d'Atlanta (ATDSR). L'ASDTR définit un taux minimal de risque ou minimal risk level (MRL) qui tient compte du risque de neurotoxicité de l'Al administré par voie orale. Ce MRL oral est fixé à partir de valeurs déterminées par des études réalisées chez l'animal (McCormack *et al.*, 1979; Domingo *et al.*, 1989), extrapolées ensuite à l'homme à l'aide de facteurs de correction. Les résultats « rassurants » de ces deux études théoriques ont constitué un argument de poids en faveur de l'innocuité des adjuvants aluminiques (Bégué *et al.*, 2012;

Oxford Vaccine Group, 2015). Une seule étude directe a été menée, concluant sur le caractère rassurant de l'absence d'élévation de l'Al dans le sérum et les urines 24 heures après l'administration de vaccins contenant une dose totale de 1200 µg d'Al à des prématurés âgés de 2 mois (Movsas *et al.*, 2013).

I.3.3.3. L'étude de Keith *et al.* (2002)

a) Description de l'étude

Dans la première étude, Keith, Jones & Chou, (2002) ont estimé l'accumulation corporelle d'Al en fonction de l'âge et du poids des enfants de 0 à 12 mois. L'accumulation d'origine alimentaire (allaitement et/ou alimentation artificielle) a été calculée en prenant en compte un facteur d'absorption intestinale de 0,78 %. L'apport vaccinal, soit 7 injections administrées à 0, 2, 4, 6 et 12 mois (3 anti-hépatite B et 4 DTaP (Diphtérie-Tétanos-Coqueluche acellulaire), pour une quantité totale d'Al de 4,15 mg par enfant), a été calculé en postulant que la dose d'Al injectée est immédiatement absorbée à 100 % et que le profil toxico-cinétique est celui décrit et modélisé par Priest pour le ²⁶Al soluble injecté par voie IV chez l'homme (Priest *et al.*, 1995). Ces apports respectifs ont été comparés à un profil de « sécurité » prenant en compte l'accroissement du poids de 0 à 12 mois et un MRL de 2 mg Al/kg/j (Agency for Toxic Substances and Disease Registry, 1999). Ce MRL a été défini à partir d'une étude ancienne (Golub *et al.*, 1989) qui avait étudié l'activité motrice de souris soumises à une alimentation contenant du lactate d'Al. Chez ces souris la *no-observed-adverse-effect-level* (NOAEL) ou dose sans effets indésirables observés était de 62 mg Al/kg/j, ce qui corrigé par un facteur 30 (facteur 3 d'extrapolation de la souris à l'homme et facteur 10 de variabilité interindividuelle) produit un MRL par voie orale de 2 mg Al/kg/j (Agency for Toxic Substances and Disease Registry, 1999). L'étude de Keith, Jones & Chou, (2002) montre que l'accumulation d'Al vaccinal est environ deux fois supérieure à celui de l'apport alimentaire mais reste pour l'essentiel en deçà de la courbe de MRL. Les auteurs soulignent, néanmoins, que dans leur modèle les vaccins du calendrier vaccinal produisent des pics à chaque injection, que celui du 2^{ème} mois dépasse brièvement la courbe de MRL et que ceux du 4^{ème} et 6^{ème} mois se situent juste à la limite de cette courbe (**Figure 3**).

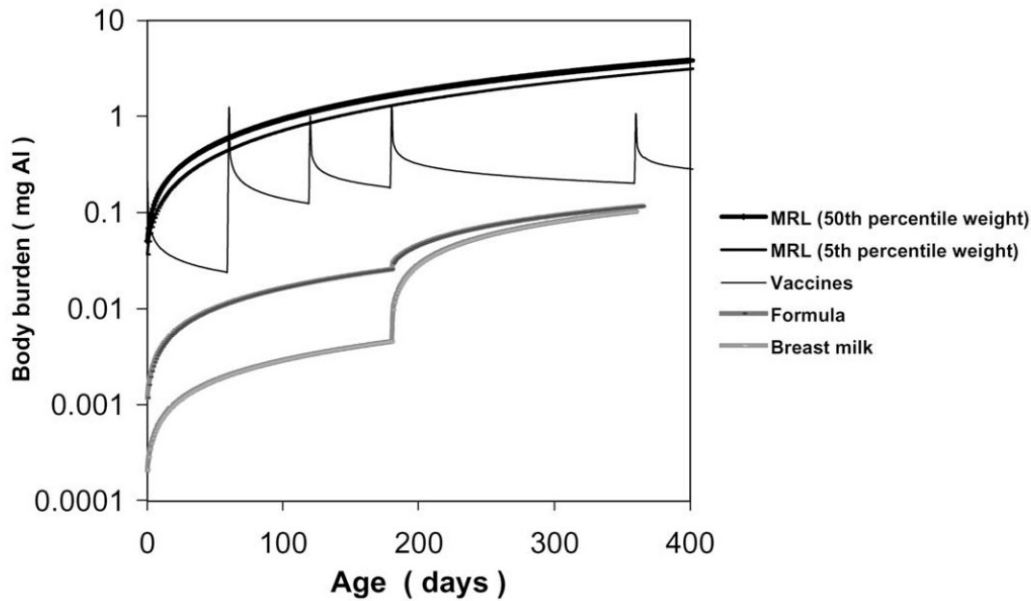


Figure 3 : Évaluation de la charge corporelle théorique en Al d'origine vaccinale et alimentaire chez le nourrisson

Reproduction de la figure originale 1 de Keith, Jones & Chou, (2002). La courbe limite de sécurité intègre le MRL oral basé sur une NOAEL de 62 mg Al/kg/j et le poids de 50 % ou de 5 % des enfants américains selon les abaques de l'époque. Dans l'hypothèse d'une absorption immédiate de 100 % de l'Al vaccinal, il existe un franchissement transitoire de la limite de sécurité par l'Al vaccinal à 2 mois, et des pics limite à 4 et 6 mois.

b) Critique de l'étude

Les limites et imperfections méthodologiques du modèle de Keith, Jones & Chou, (2002) ont justifié l'étude ultérieure de Mitkus *et al.*, (2011) :

- Amplification ultérieure du calendrier vaccinal pédiatrique recommandé aux USA entre l'âge de 0 à 12 mois, par adjonction, en sus du vaccin contre l'hépatite B et du DTaP, de 3 vaccins aluminiques (7 injections), contre Haemophilus influenza (Hib), Pneumocoque et hépatite A. En 2021, 16 injections aluminiques sont recommandées par les CDC entre l'âge de 0 et 15 mois (**Tableau 2**) (Centers for Disease Control and Prevention, 2021). Ce chiffre est un maximum du fait de l'utilisation possible de divers vaccins multivalents ;
- Abaissement ultérieur du niveau de sécurité, le MRL par voie orale passant à 1 mg Al/kg/j en 2008 (Agency for Toxic Substances and Disease Registry, 2008) ;
- Non prise en compte de l'immaturation de la fonction de filtration glomérulaire chez le nourrisson pouvant influencer sur l'élimination de l'Al absorbé (Keith, Jones & Chou, 2002) ; il faut noter que la question de l'immaturation de la barrière hémato-encéphalique (BHE) n'a pas non plus été prise en compte alors que le système nerveux en développement est notoirement sensible aux expositions toxiques (Miodovnik,

2011). La question de l'immaturation de la BHE est une question importante en matière de toxicologie des adjuvants aluminiques. Dans son rapport, l'Académie Nationale de Pharmacie considère que « *la BHE, incomplètement formée aux stades pré-natal et post-natal, est plus perméable aux toxiques. De plus, le cerveau est davantage perfusé entre 6 et 13 ans en raison de ses besoins accrus pour réaliser sa maturation. [...] Des études expérimentales de toxicologie chez l'animal juvénile [...] sont d'autant plus indispensables que des études épidémiologiques chez l'enfant [...] sont difficilement réalisables* » (Académie nationale de Pharmacie, 2016).

- Actualisation nécessaire de la courbe de poids des enfants américains ;
- Amélioration en 2004 de la modélisation mathématique de la rétention du ^{26}Al injecté par voie IV chez l'Homme, comportant désormais 3 phases d'absorption avec des demi-vies respectives de l'Al de 1,4, 40 et 1727 jours (Priest, 2004) ;
- Et surtout, prise en compte des résultats de Flarend *et al.*, (1997) montrant que l'absorption de l'Al des adjuvants ne peut en aucun cas être considérée comme étant de 100 % immédiatement après l'injection.

Tableau 2 : Calendrier des vaccinations recommandées de 0 à 15 mois par le CDC (2021)

Âge (mois)	0	2	4	6	12	15
Hépatite B *	X	X		X		
Rotavirus		X	X	X		
Diphtérie, Tétanos, Coqueluche acellulaire *		X	X	X		X
Haemophilus influenzae B *		X	X	X	X	
Pneumocoque *		X	X	X	X	
Poliovirus inactivé (PVI)		X	X	X		
Influenza				X		
Rougeole-Oreillons-Rubéole					X	
Varicelle					X	
Hépatite A *					X	

* vaccins contenant un adjuvant aluminique (oxy-hydroxyde d'Al et/ou phosphate d'Al)

I.3.3.4.L'étude de Mitkus *et al.* (2011)*a) Description de l'étude*

Dans cette deuxième étude, Mitkus reprend d'abord la méthodologie de Keith en tenant compte de tous les paramètres énoncés ci-dessus à l'exception des résultats de Flarend, et confirme que si l'absorption plasmatique de l'Al vaccinal était immédiatement de 100 % il y aurait un transitoire franchissement du niveau de sécurité à 2 mois et un pic à la limite de la sécurité à 4 mois. En revanche, quand il tient compte de la lente absorption de l'Al à partir des adjuvants aluminiques montrée par Flarend, la marge de sécurité semble importante. Pour construire son modèle, il postule que comme l'absorption sanguine de l'Al est de 51 % pour l'adjuvant phosphate à 28 jours dans l'étude de Flarend, il faudra encore 28 jours pour tout absorber (total 56 jours). Un calcul similaire le conduit à penser que comme l'absorption sanguine de l'Al est de 17 % pour l'oxy-hydroxyde à 28 jours, il faudra encore 137 jours pour tout absorber (total 165 jours). La quantité cumulée d'Al absorbé à partir des vaccins (total de 4,23 mg d'Al par enfant) est nettement supérieure à l'absorption d'Al d'origine alimentaire (facteur x2) mais demeure nettement en deçà du niveau de sécurité pour le phosphate et très nettement pour l'oxy-hydroxyde (**Figure 4**). Les auteurs en concluent qu'il est peu probable que l'Al apporté par les vaccins ait une influence significative sur la charge en Al de l'organisme des nourrissons, impliquant une bonne sécurité des adjuvants aluminiques de 0 à 12 mois.

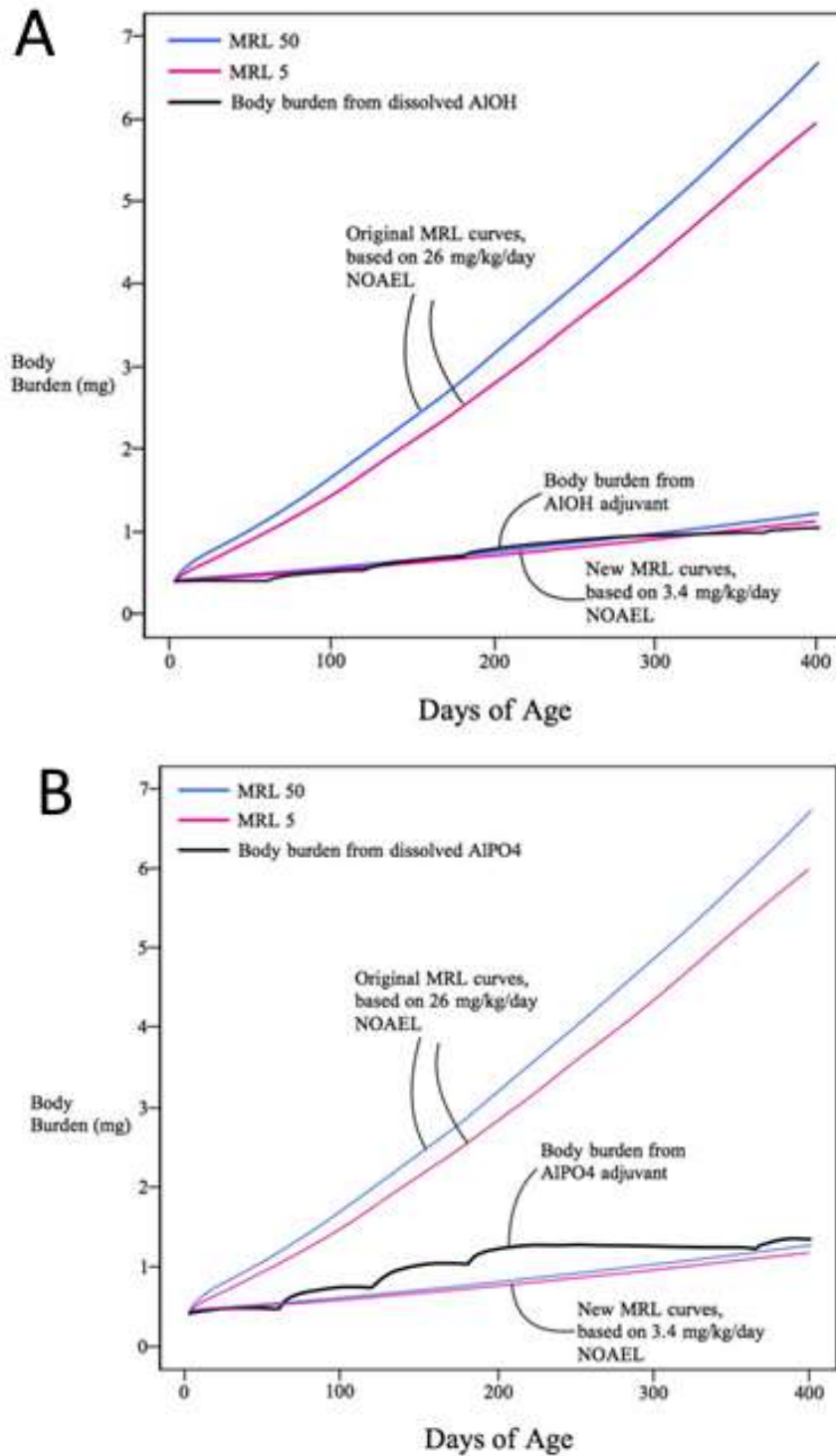


Figure 4 : Courbes d'accumulation théorique de l'aluminium d'origine vaccinale et limites de sécurité actualisées

Modification des figures originales 3 et 4 de Mitkus et al., (2011). Sur les deux panneaux sont indiqués les courbes de MRL de l'article original basés sur une NOAEL de 26 mg Al/kg/j (courbes intégrant le poids de 50 % ou de 5 % des enfants américains) ; de nouvelles courbes de MRL basées sur une NOAEL réactualisée de 3,4 mg Al/kg/j (Alawdi *et al.*, 2016) montre un franchissement de la limite de sécurité de l'Al absorbé à partir de l'oxy-hydroxyde d'Al (A) et du phosphate d'Al (B). Figures réalisées par Daniel Steinberg.

b) Critique de l'étude

C'est un MRL par voie orale qui a été utilisé pour définir la courbe de sécurité. L'Al ingéré parvient à traverser la barrière intestinale sous sa seule forme ionique (Keith, Jones & Chou, 2002) (cf A.1.4.2. **Figure 56**). En revanche, les adjuvants sont des nanoparticules agrégées en microparticules administrées directement au-delà de la barrière cutanée. Or la toxicologie particulaire fait intervenir de nombreux autres paramètres que la dose. En particulier la surface particulaire qui augmente de façon exponentielle à mesure que la taille des particules diminue (et que le nombre de particules augmente) pour une masse de matière donnée (Sharifi *et al.*, 2012). Sous sa forme particulaire, l'Al est rapidement capturé et ensuite transporté à distance par les cellules immunitaires (Gherardi *et al.*, 2001a; Khan *et al.*, 2013; Crépeaux *et al.*, 2015; Eidi *et al.*, 2015) (cf A.1.4.2. **Figure 57**). La comparaison de la toxicité chimique des ions Al, tels que ceux absorbés au niveau intestinal, et de la toxicité particulaire des sels d'Al injectés par voie IM est donc un contresens (Willhite *et al.*, 2014). En témoigne la courbe dose-réponse atypique des effets neurotoxiques de l'AH, avec un transfert cérébral de l'Al et un effet clinique sélectivement observés pour les faibles doses, qui se rapproche de celles décrites en toxicologie particulaire (Crépeaux *et al.*, 2017). En toute rigueur, le MRL utilisé pour la modélisation du risque vaccinal devrait être défini sur la base d'expérimentations animales menées avec des adjuvants aluminiques, contrôlés pour leurs paramètres particuliers pour être conformes à ceux des vaccins, et injectés par voie IM plutôt qu'avec des formes solubles d'Al (chlorure ou lactate) ajoutées aux aliments ou à l'eau de boisson.

Le MRL par voie orale fixe la courbe de sécurité à un niveau trop élevé. Le MRL de 1 mg/kg/j (*Agency for Toxic Substances and Disease Registry*, 2008) a été déterminé sur la base d'une NOAEL observée de 26 mg/kg/j chez la souris en 2001 (Golub & Germann, 2001). Cependant, de nombreuses publications font état d'effets neurotoxiques objectivés par des tests fins de mémoire et de comportement chez la souris et chez le rat, effets confirmés par des altérations neurobiologiques cohérentes, pour des doses orales d'Al très inférieures à 26 mg/kg/j : 6 mg/kg/j rapporté en 1993 (Bilkei-Gorzó, 1993), 5,6 mg/kg/j rapporté en 2008 et 2009 (Sethi *et al.*, 2008; 2009), 10 mg/kg/j rapporté en 2016 (Cao *et al.*, 2016), 3,4 mg/kg/j rapporté en 2016 (Alawdi *et al.*, 2016), et même 1,5 mg/kg/j rapporté en 2017 (Martinez *et al.*, 2017). En utilisant le MRL par voie orale « officiel », Mitkus a donc fixé la courbe de sécurité à un niveau bien trop élevé. Ce niveau a été surestimé d'un facteur pouvant atteindre un facteur x17,3 (soit 26/1,5) si on tient compte de l'étude la plus récente, et encore le niveau 1,5 mg/kg/j rapporté n'est même pas un NOAEL puisque des effets ont été documentés à cette dose (Martinez *et al.*, 2017). Dans ces conditions, la bonne sécurité des adjuvants aluminiques chez le nourrisson ne peut être assurée sans réserve sur la base de l'étude de Mitkus. De plus, par facilité de calcul, les deux adjuvants ont été traités de manière séparée alors que les vaccins administrés régulièrement durant la première année de vie contiennent les deux adjuvants, parfois simultanément (**Tableau 1**). Il aurait été judicieux de produire une figure indiquant l'accumulation globale d'Al d'origine vaccinale en additionnant les courbes respectives

des deux adjuvants. Le dépassement du MRL basé sur une NOAEL de 3,4 mg Al/kg/j aurait alors été presque constant sur les 400 jours de calculs.

La toxicité potentielle de l'Al particulaire n'a pas été envisagée. Comme Flarend avant lui (Flarend *et al.*, 1997), Mitkus considère que seul l'Al soluble absorbé à partir du site d'injection est susceptible d'être toxique. Son estimation de la durée d'absorption sanguine complète des adjuvants injectés (moins de 2 mois pour le phosphate ; 5,5 mois pour l'oxy-hydroxyde) repose d'ailleurs sur un calcul simpliste ne tenant pas compte du caractère imminent (phosphate) ou en cours d'achèvement (oxy-hydroxyde) de l'absorption plasmatique au 28^{ème} jour, alors qu'il en fait lui-même le constat sur les courbes de Flarend (cf I.3.3.4.a). Le corollaire de ce calcul simpliste est une sous-estimation de la bio-persistance de l'Al sous forme particulaire après injection. Les études histologiques effectuées après injection IM d'AH ont montré une persistance de l'Al particulaire, et du granulome qu'il induit, encore décelable au niveau du muscle 12 mois après injection chez l'animal (Verdier *et al.*, 2005; Authier *et al.*, 2006) et de plusieurs années (jusqu'à plus de 12 ans) chez les patients humains adultes souffrant d'un syndrome de fatigue chronique post-vaccinal (Gherardi *et al.*, 2015). Même dans l'hypothèse ou des facteurs de susceptibilité génétique pourraient expliquer la faible solubilisation intracellulaire de l'AH chez ces patients (Gherardi *et al.*, 2015), la sous-estimation par Mitkus de la durée d'absorption de l'adjuvant est certaine et importante.

Une autre erreur de cette étude consiste à ne pas suspecter que l'adjuvant puisse migrer hors du muscle sous forme particulaire. Les études expérimentales ont montré que la longue bio-persistance intracellulaire de l'AH concerne aussi bien les particules observées au site d'injection que celles transportées à distance (Crépeaux *et al.*, 2015). Chez la souris, les particules d'AH sont en effet transportées par des cellules de la lignée monocytaire, d'abord vers les ganglions lymphatiques de drainage puis, probablement via le canal thoracique, vers la circulation sanguine, pour atteindre des organes distants comme la rate voire le cerveau où une accumulation lente et retardée peut être observée dans les cellules microgliales et les neurones (Khan *et al.*, 2013; Eidi *et al.*, 2015). Après une injection IM unique, la pénétration cérébrale des particules est faible mais elle augmente considérablement sous l'influence de la signalisation du *monocyte chemoattractant protein 1* (MCP-1/CCL2), et s'accompagne d'une expression cellulaire d'IL-1 β , témoin attendu de l'activation de l'inflammasome par l'adjuvant (Khan *et al.*, 2013). Signalons enfin que des effets neurotoxiques ont été observés avec des doses d'AH reproduisant le schéma vaccinal américain de l'âge de 0 à 18 mois transposé à la souris (Shaw, Li & Tomljenovic, 2013). Attentif au seul Al absorbé, et pas à l'Al particulaire, Mitkus pensait que « le fait que le tissu osseux soit probablement le siège principal de résidence à long-terme (de l'Al absorbé à partir du site injecté), et pas des organes mous plus sensibles, est rassurant ». Une étude récente menée chez des prématurés vaccinés à l'âge de 2 mois (Movsas *et al.*, 2013), également concentrée sur le seul Al absorbé, a trouvé curieusement « rassurant » de ne constater aucune élévation de l'Al dans le sérum et les urines 24 heures après l'administration de vaccins contenant une dose totale de 1200 μ g d'Al (environ 200 μ g/kg) (Movsas *et al.*, 2013). L'absence d'absorption et d'élimination

rapide de l'Al des adjuvants nous semblerait plutôt un motif légitime de préoccupation pour la sécurité des adjuvants aluminiques, puisqu'elle implique une persistance systémique des particules d'Al immunostimulantes et potentiellement migrantes vers les organes du système nerveux central (Crépeaux *et al.*, 2015; 2017).

I.3.4. Conclusion

La glorieuse histoire des vaccins s'est construite sur des bases souvent empiriques au cours du XX^{ème} siècle. C'est le cas, en particulier, des adjuvants de première génération à base d'Al qui ont rendus d'énormes services depuis 1926. Ces adjuvants sont encore appelés à être administrés à des milliards d'individus au cours des prochaines années dans le cadre de l'expansion massive des stratégies de prévention vaccinale annoncée au niveau mondial (Kaddar, 2012). Dans ce contexte, compte tenu de leurs sérieuses faiblesses conceptuelles et méthodologiques, les 3 études toxico-cinétiques disponibles constituent des bases objectivement très insuffisantes pour garantir l'absolue innocuité des adjuvants aluminiques administrés à très grande échelle, notamment sur le long terme. La vaccinologie du XXI^{ème} siècle est une science moderne et forte. A ce titre, elle ne peut simplement se reposer sur ses succès passés et faire l'impasse sur une compréhension fine du devenir *in vivo* de ses adjuvants aluminiques, au risque de perdre sa crédibilité auprès de populations de plus en plus sensibles à toutes les dimensions de la santé globale. Il nous semble hautement nécessaire que soient réalisées, sous le contrôle des autorités sanitaires, de nouvelles études toxico-cinétiques expérimentales, incluant des études de longue durée, afin de confirmer ou d'infirmer l'absolue innocuité des sels d'Al du point de vue de la toxicologie fondamentale. De telles études n'étant pas encore disponibles, nous avons recensé les connaissances actuelles sur la toxicité de diverses formes de l'Al dans le chapitre suivant.

Résumé d'étape :

Dans la première partie de ce manuscrit, nous avons défini les points suivants :

- Il existe trois grands types de vaccins : les **vaccins vivants atténués** dont l'antigène est un agent infectieux affaibli par changement d'espèce cible ou traitement physico-chimique, les **vaccins inactivés** dont l'antigène est un agent infectieux détruit et les **vaccins sous-unitaires** dont l'antigène est une molécule purifiée issue d'un pathogène.
- Les **adjuvants** sont primordiaux pour déclencher la réponse immunitaire avec des antigènes très purifiés dont l'immunogénicité est réduite par comparaison avec un agent infectieux entier (qu'il soit atténué ou inactivé).
- Les deux principaux adjuvants utilisés en médecine humaine sont **l'oxy-hydroxyde d'aluminium** et le **phosphate d'aluminium** et leur mode d'action, bien que de mieux en mieux caractérisé, reste toujours incomplètement élucidé malgré près d'un siècle d'utilisation.
- **L'efficacité** adjuvante des composés aluminiques n'est plus à prouver mais leur niveau de **sécurité** réel reste flou dans la mesure où les **études de référence**, garantissant leur innocuité, comportent un certain nombre de lacunes conceptuelles et de conclusions hasardeuses au vu des données expérimentales obtenues.

I.4. Toxicité de l'aluminium

I.4.1. Neurotoxicité

Ce chapitre traitera de la neurotoxicité de l'Al, d'abord chez l'Homme puis chez l'animal. Dans les deux cas, une première partie relativement rapide sera consacrée à l'Al sous diverses formes avant de se focaliser sur les adjuvants aluminiques afin de faire l'état des lieux des connaissances scientifiques en matière de sécurité des adjuvants vaccinaux à base d'Al.

I.4.1.1. Études chez l'Homme

a) *Aluminium d'origine non vaccinale*

La première observation de la neurotoxicité de l'Al remonte à 1976 chez des patients dialysés (Alfrey, LeGendre & Kaehny, 1976). L'Al ne pouvant être éliminé du fait de la capacité rénale perturbée chez ces patients, il s'accumule dans l'os où il provoque une ostéomalacie (décalcification) ou dans le cerveau, ce qui aboutit à des troubles du langage, des troubles moteurs et des encéphalopathies. Depuis le 16 juin 1986, une résolution du Conseil et des représentants des gouvernements des États membres parue au journal officiel, vise à protéger les patients sous dialyse en réduisant au maximum l'exposition à l'Al (Conseil des Communautés Européennes, 1986).

Une source d'exposition importante à l'Al est celle des travailleurs de fonderie, ouvriers, mineurs ou soudeurs en contact avec des fumées et poussières d'Al. Ces expositions professionnelles sont associées de longue date à des déficits de performances psychiques (réduction des réactions psychomotrices, dissociation de la coordination oculomotrice, réduction des capacités mémorielles, déséquilibre mental et émotionnel) (Hosovski *et al.*, 1990). L'exposition professionnelle à des poussières d'Al est associée à des dysfonctionnements cognitifs proportionnels à la dose reçue (Rifat *et al.*, 1990; Polizzi *et al.*, 2002) ainsi qu'à des symptômes neuropsychiatriques (Sjögren, Gustavsson & Hogstedt, 1990; Kilburn, 1998; Meng *et al.*, 2019), bien que certaines études ne permettent pas de faire le lien entre troubles cognitifs et exposition à l'Al (Letzel *et al.*, 2000). Le personnel en contact avec des vapeurs d'oxyde d'Al (Al_2O_3) présentent des maux de tête, des insomnies et des difficultés de concentration ainsi que de l'irritabilité et des troubles de l'humeur (Sińczuk-Walczak *et al.*, 2003), suggérant une neurotoxicité consécutive à une exposition chronique à l'Al.

L'alimentation peut également être une source d'exposition chronique à l'Al. Citons pour exemple cette étude portant sur 227 enfants prématurés, d'un poids inférieur à 1,850 kg, nés avant la 34^{ème} semaine de grossesse et alimentés par une solution standard contenant de l'Al ou une solution appauvrie en Al. L'utilisation de l'échelle de développement de Bailey montre, chez les 182 enfants ayant survécus jusqu'à l'âge de 18 mois, un score de développement cérébral moindre chez les enfants ayant reçus une alimentation intraveineuse

longue avec une solution contenant de l'Al (Bishop *et al.*, 1997). Cette contamination alimentaire pourrait d'ailleurs ne pas être limitée aux nourrissons prématurés dans la mesure où de l'Al a été retrouvé en quantité dans 24 différentes préparations infantiles liquides ou en poudre (Redgrove *et al.*, 2019) et que ce composé est utilisé de manière courante par l'industrie agro-alimentaire exposant également la population adulte (Exley, 2013). L'afflux d'Al dans le système digestif conduit à une accumulation de l'Al au niveau de la muqueuse intestinale, probablement délétère pour l'homéostasie de l'intestin. Cela affecte la régulation de la perméabilité, de la microflore et de la fonction immunitaire de l'intestin et conduit à l'apparition de maladies inflammatoires chroniques telles que la maladie de Crohn (Vignal, Desreumaux & Body-Malapel, 2016).

La présence d'Al dans le cerveau est un fait décrit dans plusieurs études de maladies neurologiques. Les cerveaux de 10 patients présentant un Alzheimer ont révélé un taux d'Al plus important par rapport aux contrôles dans des zones cérébrales impliquées dans la maladie (l'hippocampe, les gyrus pariétaux inférieur et supérieur ainsi que dans le gyrus temporal moyen) (Xu *et al.*, 1992). Plus récemment, des concentrations d'Al parmi les plus importantes jamais mesurées dans le cerveau humain ont été enregistrées dans les tissus cérébraux de ces patients (Mirza *et al.*, 2017). Cet Al semble de plus être associé avec les agrégats de β -amyloïde caractéristiques de la maladie d'Alzheimer indiquant qu'il pourrait en être un élément sinon déclencheur, au moins aggravant (Exley & Mold, 2020). L'étude de cerveaux de 5 individus décédés avec une confirmation de diagnostic de troubles du spectre autistique (TSA) a permis de définir que le taux d'Al cérébral chez les patients TSA est élevé dans les lobes frontaux, occipitaux, temporaux et pariétaux en comparaison avec les mesures précédentes de l'équipe, effectuée sur 60 cerveaux (House *et al.*, 2012; Mold *et al.*, 2017). De plus, une coloration au lumogallion a permis de mettre en avant l'emplacement exact des particules dans les différentes zones cérébrales avec des différences notables entre genre. En effet, le dépôt d'Al est plus important chez les hommes avec une localisation intracellulaire des particules par opposition aux femmes dont le dépôt d'Al est plutôt extracellulaire. Le marquage indique également que l'Al cérébral est principalement retrouvé dans le cytoplasme des cellules microgliales et d'autres cellules inflammatoires non neuronales (astrocytes et lymphocytes) de la matière grise, du système vasculaire, des méninges et de la matière blanche (Mold *et al.*, 2017). Cette localisation pourrait expliquer en partie comment l'Al arrive à franchir la BHE et permettre de considérer l'Al comme étant impliqué dans l'étiologie des TSA. Ces études ne retracent cependant pas le parcours de l'Al pour en connaître l'origine, vaccinale ou non.

Les propriétés neurotoxiques de l'Al en contact avec les neurones sont avérées depuis 1994 et l'Al est classifié comme neurotoxique reconnu pour l'Homme depuis cette date (Simonsen *et al.*, 1994). L'institut de veille sanitaire (InVS) a admis que « *de nombreuses études montrent à présent que l'aluminium peut être toxique pour les plantes, les animaux et l'homme* » (InVS-AFSSA-AFSSAPS, 2003). Le mécanisme d'action de la neurotoxicité de l'Al cérébral pourrait reposer sur un stress oxydant au niveau cellulaire en mesure d'augmenter le taux des substances réagissant avec l'acide thio-barbiturique, le disulfure de glutathion, la glutathion peroxydase ou la catalase dans le cortex tout en diminuant le taux de glutathion-S-transférase

(Flendrig, Kruis & Das, 1976). Cette hypothèse est soutenue par l'étude de l'exposition de jeunes rats au chlorure d'Al qui produit un stress oxydatif nocif au bon fonctionnement des neurones dans la plupart des régions cérébrales étudiées (Kinawy, 2019). Le spectre global de toxicité de l'Al inclut des troubles cognitifs, des dommages de la BHE, des altérations de la neurotransmission et de l'activité synaptique, l'activation microgliale, la baisse de métabolisation du glucose et des fonctions mitochondriales, l'interférence avec la transcription génomique et l'accentuation de l'agrégation de la β -amyloïde et des neurofilaments (Tomljenovic, 2011).

b) Aluminium d'origine vaccinale

La vaccination n'est pas une source d'exposition négligeable au regard de l'Al alimentaire (Exley, 2020). Une étude récente calculant la dose théorique d'Al reçue au cours de la vie en se basant sur le calendrier vaccinal actuel et les vaccins les plus administrés en France démontre l'importance de la quantité d'Al reçue par la vaccination (Angrand *et al.*, 2020).

Chez les patients atteints de MFM, des techniques de microanalyse aux rayons X et de spectrométrie d'absorption atomique ont permis de détecter la signature spécifique de l'AH au niveau du muscle deltoïde, rendant cette présence d'Al musculaire compatible avec une origine vaccinale. Chez ces patients, la persistance d'adjuvant Al est accompagnée de troubles cognitifs, de l'attention et de la concentration (Couette *et al.*, 2009; Passeri *et al.*, 2011), détaillés dans le chapitre II.2.2. de la myofasciite à macrophage. Plusieurs de ces dysfonctionnements peuvent être présents simultanément en fonction des patients, répartis en 4 grands groupes. Certains d'entre eux présentent une faiblesse de l'attention sélective visuelle, un défaut dans les fonctions exécutives, des troubles de la mémoire ou des troubles de l'audition (Aoun Sebaiti *et al.*, 2017) (ces 4 groupes sont détaillés dans le chapitre II.2.2.4.).

Par ailleurs, une étude américaine a démontré que l'injection, du vaccin anti-HBV adjuvé sur AH à la naissance, (telle que réalisée aux États-Unis, alors que cette injection est pratiquée à l'âge de deux mois en France) augmente de trois fois le risque de développer des troubles du spectre autistique comparé à une injection retardée d'un mois (Gallagher & Goodman, 2010). De plus, l'Al vaccinal présent dans les vaccins est mis en cause dans l'apparition de nodules sous-cutanés généralement associés à une allergie de contact à l'Al chez de très jeunes individus (Goiset *et al.*, 2018).

Citons enfin le syndrome de la guerre du Golfe suspecté d'être d'origine multifactorielle impliquant la vaccination. En effet, des vétérans déployés dans le golfe persique durant ce conflit présentent un syndrome incluant un état de fatigue chronique, des problèmes cognitifs avec un état dépressif, des troubles de la mémoire et des difficultés de concentration ainsi que des douleurs musculo-squelettiques (Gherardi, Crépeaux & Authier, 2019). L'origine exacte de ce syndrome reste inexpliquée et pourrait reposer sur des expositions multiples à des contaminants rencontrés durant les conflits étant donné que la durée de présence sur une zone

de conflit et la proximité des combats font augmenter la proportion de vétérans atteints par le syndrome de la guerre du Golfe (Steele, 2000). Cependant le grand nombre de vaccinations reçues par les soldats reste une explication plausible sur l'origine de ce trouble. En effet, une étude démographique sur plus de 2000 soldats démontre que la prévalence de vétérans atteints du syndrome de la guerre du Golfe est plus importante chez les soldats vaccinés comparés aux soldats n'ayant pas reçu de vaccins, qu'ils aient été déployés dans le Golfe persique ou sur un autre champ de bataille (Steele, 2000). Ces données laissent donc supposer que le syndrome de la guerre du Golfe est associé aux conditions environnementales rencontrées sur les zones de conflit et que les vaccins ou leurs adjuvants administrés pendant la guerre peuvent être un facteur aggravant (Steele, 2000).

c) Le syndrome Auto-immun/inflammatoire induit par les adjuvants (ASIA)

Introduit en 2011 par (Shoenfeld & Agmon-Levin, 2011), le concept d'ASIA regroupe toutes les manifestations auto-immunes suivant une exposition à un stimulus xénobiotique ayant des propriétés adjuvantes, tel que la silicone, les éléments infectieux ou l'Al, englobant ainsi les différents syndromes de la Guerre du Golfe, dont l'origine pourrait être la forte vaccination des soldats (Hotopf *et al.*, 2000; Cherry *et al.*, 2001), de la siliconose (faisant suite à la rupture d'implants en gel de silicone présentant une adjuvantité nocive (Miyoshi, 1964; Shoaib & Patten, 1996)) ou de la MFM. L'ensemble de ces syndromes présentent des symptômes communs et non spécifiques que sont les myalgies, myosites, arthralgies, manifestations neurologiques, fièvre et altérations cognitives. L'encéphalomyélite myalgique ou syndrome de fatigue chronique (EM/SFC) est également fréquemment retrouvé (Sharif *et al.*, 2018), souvent associé à des troubles du sommeil, ainsi que la présence d'auto-anticorps ou d'une maladie auto-immune chez 35 % des patients (Shoenfeld & Agmon-Levin, 2011). L'ASIA, caractérisé par une réponse immunitaire hyperactive après exposition à une substance aux propriétés adjuvantes, pourrait avoir un impact sur une population prédisposée (au vue de la faible prévalence de ces manifestations) ou nécessiter une co-exposition entre plusieurs facteurs déclencheurs (Rosenblum, Shoenfeld & Amital, 2011).

I.4.1.2. Études chez l'animal

a) Aluminium d'origine non vaccinale

Plusieurs centaines d'études portant sur la toxicité de l'Al chez l'animal ont été publiées mais relativement peu s'intéressent au devenir et aux effets de l'Al d'origine vaccinale. Une écrasante majorité des études traitant de la toxicité de l'Al non vaccinal a été réalisée chez le rongeur et une grande proportion relate de la toxicité du lactate d'Al, un sel d'Al de formule $[\text{CH}_3\text{CH}(\text{OH})\text{COO}]_3\text{Al}$ aux propriétés antibactériennes, administré par voie orale. Les résultats les plus communs rapportent une augmentation de la concentration d'Al cérébrale chez : le rat (Cherroret *et al.*, 1992) ; la souris (Golub *et al.*, 1992) ; et le singe (Sarin, Gupta & Gill, 1997; Sarin, Julka & Gill, 1997) adultes. Cette accumulation cérébrale,

majoritairement associée à une baisse d'activité motrice chez les rongeurs juvéniles peut également être accompagnée d'une baisse de la force de préhension ou d'une augmentation de l'agressivité en fonction de la dose d'Al reçue (Golub *et al.*, 1995). Dans certaines études, une augmentation du stress oxydant et des signes d'inflammation ont été relevés, accompagnés de troubles de la mémoire et de l'apprentissage (Becaria *et al.*, 2006; Ribes *et al.*, 2008; 2010; 2012; Garcia *et al.*, 2010).

Un second groupe de recherches s'intéresse communément à l'exposition orale ou intra-péritonéale (IP) au chlorure d'Al (AlCl_3). Ce composé est également retrouvé dans le cerveau après exposition chez le rat adulte (Baydar *et al.*, 2003) comme chez la souris juvénile (Abu-Taweel, Ajarem & Ahmad, 2012). Cette présence cérébrale est alors associée à un retard de développement neuro-moteur (Bernuzzi, Desor & Lehr, 1989a; 1989b), à des dommages génétiques et des altérations de la structure des synapses (Bhalla, Garg & Dhawan, 2010; Bhalla, Singla & Dhawan, 2010). Elle provoque un stress oxydant libérant des cytokines pro-inflammatoires (Prakash, Gopinath & Sudhandiran, 2013) causant des dommages aux protéines (Jyoti & Sharma, 2006; Jyoti, Sethi & Sharma, 2007; Bihaqi *et al.*, 2009), aux mitochondries et aux astrocytes. Une altération de la structure de la BHE a également été observée (Song *et al.*, 2008) ainsi que des troubles neurocomportementaux (Commissaris *et al.*, 1982) incluant des troubles de la mémoire (Jia *et al.*, 2001; Jia, Zhong & Wang, 2001; Gong *et al.*, 2006; Kakkar & Kaur, 2011), des troubles d'apprentissage (Li *et al.*, 2006), une élévation de l'anxiété et une neuro-dégénérescence sévère (Mehpara Farhat, Mahboob & Ahmed, 2019).

Les autres composés et voies d'admission génèrent peu ou prou le même type de réponses. Une accumulation cérébrale, un stress oxydant, une inflammation et/ou une modification neurocomportementale ont ainsi été observés avec le nitrate d'Al ($\text{Al}(\text{NO}_3)_3$) (Gómez *et al.*, 1997, p. 2008; Colomina *et al.*, 2002; 2005; Flora *et al.*, 2003; Gonzalez-Muñoz *et al.*, 2008; Azzaoui, Ahami & Khadmaoui, 2008), le gluconate d'Al ($\text{C}_{18}\text{H}_{33}\text{AlO}_{21}$) (Struys-Ponsar *et al.*, 1997; Miu *et al.*, 2003), le sulfate d'Al ($\text{Al}_2(\text{SO}_4)_3$) (Santucci *et al.*, 1994; Rodella *et al.*, 2008; Pogue *et al.*, 2017b; 2017a), le citrate d'Al ($\text{C}_6\text{H}_5\text{AlO}_7$) (Silva *et al.*, 2013; Esquerre *et al.*, 2019) ou le fluorure d'Al (AlF_3) (Thorne *et al.*, 1986). Une ancienne étude rapporte même des résultats concordants avec les données actuelles obtenues chez l'Homme (Mold *et al.*, 2017) en démontrant que différentes molécules à base d'Al sont capables de modifier la perméabilité de la BHE et d'être retrouvées dans le cytoplasme des neurones (Favarato *et al.*, 1992).

Cependant, ces exemples de toxicité reposent sur une exposition aiguë ou chronique à une forme d'Al différente de celle utilisée dans les vaccins, pénétrant dans l'organisme par une voie différente de l'injection IM ou SC. Or, les toxicologues ont démontré que la comparaison de la toxicité d'Al de formes différentes, administrées par des voies différentes n'est pas pertinente (Willhite *et al.*, 2014). Il est donc impératif que les études de toxicité prennent en compte non seulement une molécule utilisée comme adjuvant (AH, AP ou sulfate d'hydroxy-phosphate d'Al) mais également une voie d'admission réelle du composé (injection IM ou SC) afin de d'étudier les effets neurotoxiques de l'Al d'origine vaccinal.

b) Aluminium d'origine vaccinale

Bien que n'étant pas des voies d'injection usuelles, quelques études récentes ont analysé l'impact d'une ou de plusieurs injections d'Al dans la cavité intra-péritonéale ou par voie orale chez l'animal. Ainsi, lors de tests de sécurité, l'injection IP de vaccins vétérinaires adjuvés sur AH a été décrite comme le déclencheur d'une inflammation intestinale chez le cochon d'inde adulte, pouvant conduire à une obstruction intestinale ou une intussusception menant les animaux à la mort (Aihara *et al.*, 2019). De même, l'utilisation de vaccin anti-HBV en trois injections IP de 50 µl à 0, 7 et 21 jours, chez des souris C57BL/6 a entraîné une baisse d'activité locomotrice accompagnée d'une augmentation de l'anxiété deux mois après les injections. Ces altérations comportementales, transitoires car non retrouvées 3 mois après les injections, ont été observées accompagnées d'un processus pro-inflammatoire systémique et d'un défaut de neurogenèse au niveau de l'hippocampe (Yang *et al.*, 2016). L'AH, injectée en deux fois 100 µl pour 4 mg d'Al à 15 jours d'intervalle en IP chez la daurade royale, a provoqué une altération des cellules immunitaires des glandes surrénales et de la rate, visible 120 à 170 jours post-injection (Galindo-Villegas *et al.*, 2019). De plus, injectés dans la cavité abdominale de souris adultes, AH comme AP ont produit une hypothermie dose-dépendante rapide et transitoire en quelques heures. Une forte infiltration de granulocytes, de neutrophiles et d'éosinophiles, concordante avec une activation de l'inflammasome, a conjointement été observée dans la cavité péritonéale (Freiberger *et al.*, 2018). Enfin, l'AH a également été retrouvé dans le cerveau de façon dose-dépendante après une administration orale de 50 à 200 mg/kg avec la capacité de perturber l'électro-encéphalogramme des souris dès 45 minutes post-ingestion (Cutrufo *et al.*, 1984). Ces études suggèrent que les deux adjuvants Al administrés, chez l'animal, par voie IP ou orale peuvent avoir des effets secondaires locaux et systémiques potentiels avec des conséquences sur la santé.

Le reste des études présentées dans ce chapitre se focalisent sur les adjuvants Al présents dans les vaccins (AH, AP) avec une voie d'administration du composé correspondante à ce qui est pratiqué dans la réalité (injection IM ou SC). Dans les paragraphes suivants, les études seront traitées par sujet de recherche avec tout d'abord celles portant sur la translocation des particules depuis le site d'injection jusqu'aux organes distants puis celles traitant de l'observation d'effets neurotoxiques suite à l'injection de composés aluminiques. Un dernier paragraphe sera spécifiquement consacré au modèle ovin, chez qui un phénomène épidémiologique a pu être reproduit expérimentalement, confirmant les observations déjà faites chez les rongeurs. Une revue de l'ensemble de ces études est en cours de rédaction (Angrand, Masson *et al.*, en préparation).

L'injection IM de vaccins contenant un adjuvant Al conduit à l'apparition d'une lésion musculaire particulière chez plusieurs espèces animales. Chez le rat Sprague-Dawley adulte, une injection IM de vaccin GenHevac[®] adjuvé sur AH induit une lésion persistante sur les 28 jours de l'étude (Gherardi *et al.*, 2001a). Le vaccin Engerix B[®], également adjuvé sur AH a produit une lésion similaire observable durant le mois suivant l'injection IM de 10 µl chez des rates adultes Sprague Dawley ou Lewis (Authier *et al.*, 2006). Enfin, l'injection IM de 0,5 ml

d'un vaccin combiné Tétanos-Diphtérie avec un adjuvant AH ou AP à 0,6 µg/ml Al a conduit à l'observation de la même lésion musculaire jusqu'à 3 mois pour l'AP et sur les 12 mois de l'étude pour l'AH chez le macaque (Verdier *et al.*, 2005). Cette lésion musculaire particulière et caractéristique de la MFM se compose d'une infiltration locale dense de lymphocytes et de macrophages dans le péri et l'endomysium (Gherardi *et al.*, 2001a; Authier *et al.*, 2006) (cf chapitre II.2.2.1.).

Une première étape des recherches portant sur la translocation de l'Al vaccinal, réalisé par notre groupe, repose sur l'injection de billes de latex fluorescentes et de vaccin nanohybride d'AH aggloméré sur un noyau de rhodamine B (Khan *et al.*, 2013). Cette étude démontre qu'une large part de l'Al injecté à des souris C57BL/6 adultes, à raison de 18 µg d'Al pour 36 µl, correspondant à la dose moyenne d'Al reçue par les patients atteints de MFM, a été transportée hors du muscle principalement à l'intérieur de cellules immunitaires pour gagner les ganglions lymphatiques de drainage. Le passage des cellules immunitaires de la circulation lymphatique à la circulation sanguine, probablement via le canal thoracique, permet ensuite à ces cellules d'atteindre des organes distants comme la rate, le foie ou le cerveau mais le passage dans le cerveau n'a été observé qu'avec une injection IM du nanohybride et pas avec une injection IV. Dans le cerveau, les particules ont tout d'abord été détectées dans des cellules CD11b⁺ péri-vasculaires avant d'être retrouvées dans les cellules microgliales et les cellules nerveuses jusqu'à un an post-injection (Khan *et al.*, 2013). Le passage par le système lymphatique semble attesté par le fait que la translocation a été fortement réduite en cas d'ablation du ganglion de drainage le plus proche de la zone d'injection. La distribution systémique des particules d'Al est modulée par la présence de chimiokines telles que MCP1/CCL2 puisque leur injection simultanée a augmenté la pénétration cérébrale de l'Al (Khan *et al.*, 2013). En effet, la protéine CCL2, secrétée par les lymphocytes T, les monocytes, les cellules endothéliales et les fibroblastes lors d'un problème infectieux ou une lésion tissulaire est un agent attractif des monocytes, sensibles au gradient de cette molécule par des récepteurs spécifiques. Les monocytes et macrophages sont donc attirés sur la zone infectieuse par la forte concentration en protéine CCL2 où ils peuvent se charger de particules d'Al. Or, une relative abondance de la protéine MCP1/CCL2 circulante a été identifiée chez les patients MFM (Cadusseau *et al.*, 2014) pouvant indiquer un important recrutement de monocytes et macrophages potentiellement responsables d'une translocation cérébrale plus importante de l'Al chez ces personnes. L'Al comme certaines particules infectieuses, pourrait donc pénétrer dans le cerveau par un mécanisme de cheval de Troie en étant inclus dans les macrophages (Drevets *et al.*, 2004; Eugenin *et al.*, 2006).

Afin de palier aux critiques de la première étude sur la nature du matériau utilisé qui a été qualifié de « *non représentatif de l'aluminium utilisé comme adjuvant vaccinal* » par l'Agence Française de Sécurité Sanitaire des Produits de Santé cité par le Haut Conseil de Santé Publique (Haut Conseil de Santé Publique, 2013), une technique de marquage directe de l'adjuvant commercial a été développée afin de suivre précisément le composé injecté lors de la vaccination (Eidi *et al.*, 2015). Le marquage a été assuré par de la poudre de diamant synthétique, nanométrique appelés nano-diamants fonctionnalisés (fND) dont la synthèse a été décrite en détail (Boudou *et al.*, 2009). La complexation avec l'adjuvant à base d'AH a été

rendue possible par une agitation minutieuse suivie d'une sonication après mise en contact des deux composés (Eidi *et al.*, 2015). Il résulte de cette préparation, un adjuvant rendu fluorescent par l'adjonction de nano-diamant fonctionnalisés (Alu-Dia) avec une fluorescence caractéristique à 700 nm après excitation par un laser de longueur d'onde 532 nm. Afin de s'assurer que l'Alu-Dia était aussi proche que possible de l'adjuvant commercial, les auteurs ont caractérisé les nano-diamants seuls, l'adjuvant commercial, le complexe Alu-Dia ainsi qu'un vaccin complet (Engerix B[®]) afin de comparer la taille des particules ainsi que le potentiel zêta ou charge de surface des différents composés. Cette étude démontre que les nano-diamants seuls ont bien présenté une taille nanométrique avec un diamètre moyen de particule de l'ordre de 80 nm et un potentiel zêta négatif (-29 mV). L'adjuvant commercial, le complexe Alu-Dia ainsi que le vaccin complet Engerix B[®] ont quant à eux formé des agrégats micrométriques d'un diamètre moyen allant de 2900 à 3800 nm avec des charges de surfaces positives comprises entre + 25 et + 30 mV (**Tableau 3**). Cette étude démontre qu'en conditions physiologiques, l'Alu-Dia conserve les propriétés physico-chimiques de l'adjuvant (Alhydrogel[®]) en présentant une taille moyenne de particules et un potentiel zêta similaire à ceux de l'adjuvant commercial et à un vaccin complet contenant cet adjuvant (Eidi *et al.*, 2015). Cela assure ainsi une prise en charge et une toxicité les plus similaires possibles à celles de l'adjuvant. De plus, cette similarité persiste lors de la conservation de l'Alu-Dia en PBS ou en milieu de culture cellulaire additionné de sérum de veau fœtal à 4 °C.

Tableau 3 : Reproduction du tableau 1 de (Eidi *et al.*, 2015)

Diamètre de distribution et potentiel zêta des nano-diamants seuls, de l'alhydrogel[®] du complex Alu-Dia et du vaccin complet Engerix B[®]. Données obtenues en PBS à pH 7,2 et 25 °C (mesures en triplicat).

Composé	Diamètre (nm)	Potentiel zêta (mV)
Nano-diamants	80 ± 30	- 29 ± 3
Alhydrogel [®]	3240 ± 200	+ 25 ± 4
Alu-Dia	2930 ± 230	+28 ± 2
Engerix B [®]	3820 ± 570	+30 ± 5

Après avoir caractérisé les propriétés physiques du complexe Alu-Dia, les auteurs ont caractérisé ses capacités cytotoxiques (basées sur le taux de survie de cellules en culture dans un milieu contenant le composé) afin de ne pas attribuer à l'adjuvant des résultats potentiellement induits par la présence de nano-diamants (Eidi *et al.*, 2015). Différentes concentrations de nano-diamants seuls, d'adjuvant (alhydrogel[®]) et de complexe Alu-Dia allant de 0 à 160 µg/ml ont donc été testés dans le milieu de culture de cellules neuronales. Si les nano-diamants seuls n'ont présenté qu'une très faible cytotoxicité aux concentrations les plus fortes (110,5 µg/ml), l'adjuvant seul a quant à lui présenté une toxicité pouvant être sévère à toutes les doses testées. En comparaison, le complexe Alu-Dia a présenté le même profil de cytotoxicité que l'alhydrogel[®] sans toxicité supplémentaire (Eidi *et al.*, 2015). L'Alu-Dia peut donc être utilisé pour suivre le devenir de l'adjuvant après l'injection IM d'une part mais également pour évaluer les effets de la biodistribution de ce composé dans l'organisme.

L'utilisation du complexe Alu-Dia a permis de suivre la translocation précise de l'adjuvant après une injection IM à une concentration de 400 µg/kg. Chez les souris C57BL/6 adultes, une lésion caractéristique de MFM composée de monocytes et de macrophages infiltrés dans l'endomysium a été identifiée 21 jours après l'injection (Eidi *et al.*, 2015). Cette lésion a également été observée 45 jours après injection IM chez les souris CD1 adultes après injection d'Alu-Dia à 200 ou 400 µg/kg répartie sur trois injections espacées de 4 jours (Crépeaux *et al.*, 2015). Un contrôle avec un marquage au Morin marquant l'Al d'une fluorescence verte a permis de définir que les nano-diamants (rouges) étaient colocalisés avec l'Al et que le complexe Alu-Dia est stable une fois injecté dans l'organisme. Comme cela était le cas chez le rat, le taux d'Al musculaire a peu à peu diminué durant les 9 mois de l'étude et la fluorescence caractéristique du complexe Alu-Dia a été retrouvée dans des organes distants du site d'injection tels que les ganglions lymphatiques de drainage, la rate, le foie et le cerveau 21 jours après injection. Ces observations apportent ainsi la preuve que l'Al cérébral retrouvé dans de nombreuses études de toxicité peut être d'origine vaccinale et venir former des petits amas retrouvés au niveau du cervelet et du cortex cérébral signifiant que l'adjuvant n'est pas intégralement stoppé par la BHE une fois pris en charge par les cellules de l'immunité (Crépeaux *et al.*, 2015; Eidi *et al.*, 2015).

Dans le cadre de l'étude du syndrome de la guerre du Golfe, de l'AH a été injecté par voie SC à des souris CD1 mâles adultes de 3 mois à raison de 100 µg/kg en 2 injections réparties sur 2 semaines (Petrik *et al.*, 2007). Les résultats démontrent que l'Al a subi une translocation depuis le site d'injection. En effet, celui-ci a été retrouvé dans le cytoplasme des neurones moteurs à 6 mois post-injection, provoquant une apoptose et une perte de ces neurones dans la moelle épinière (Petrik *et al.*, 2007). Par ailleurs, une étude récente a suivi l'évolution de la concentration plasmatique en Al ainsi que la teneur en Al dans divers tissus, 80 jours après l'injection IM de 500 µl de solution contenant 1,25 mg Al (AH ou AP) ou un vaccin contenant l'un, l'autre ou les deux adjuvants, répartie dans six muscles chez le rat. Ces mesures ont démontré que l'AP présente une certaine solubilisation alors que la forme AH n'est pas ou très peu dissoute (Weisser *et al.*, 2019). Cette dissolution définit directement le devenir de l'adjuvant puisque l'AP a été retrouvé en plus grande quantité dans les os alors que la rétention musculaire de l'AH a presque toujours été totale dans cette étude (Weisser *et al.*, 2019).

La translocation des particules semble cependant à mettre en regard avec le fond génétique des animaux. En effet, l'Alu-Dia injecté dans le muscle de souris femelles CD-1 adultes à une concentration de 200 ou 400 µg/kg répartie sur trois injections espacées de 4 jours a induit une concentration en Al croissante dans les ganglions lymphatiques et la rate entre 45 et 270 jours post-injection mais pas dans le cerveau (Crépeaux *et al.*, 2015). Cette observation confirme l'importance du fond génétique des animaux puisque les souris C57BL/6 utilisées dans l'étude précédente présentaient des traces d'Al cérébral à des temps plus courts et pour une dose initiale plus faible d'Alu-Dia (Eidi *et al.*, 2015). De plus, une étude antérieure a observé une cinétique d'élimination musculaire de l'AH différente entre deux souches de rats, sur l'année suivant l'injection IM de 10 µl de vaccin (Engerix B[®]) (Authier *et al.*, 2006). Il est possible que cette différence de réponse entre les souris C57BL/6 et les CD1 soit le reflet de

la différence dans le fond génétique des souris influençant l'orientation de la balance Th1/Th2 (Mills *et al.*, 2000) de la même manière que le fond génétique chez le rat a influencé la vitesse de résorption du granulome musculaire avec une taille de granulome plus faible chez le rat Lewis dont la réponse immunitaire est orientée Th1 (Authier *et al.*, 2006). En effet, la souris C57BL/6 présente une immunité également orientée Th1 et pro-inflammatoire (Whitehead *et al.*, 2003; Mills & Ley, 2014) alors que la balance Th1/Th2 de la souris CD1 n'est pas caractérisée. Il est également intéressant de constater que, tout comme les patients MFM, les souris C57BL/6, apparemment plus sensibles à la translocation cérébrale de l'adjuvant aluminique, ont produit plus de chimioattractant MCP1/CCL2. Ce dernier étant impliqué dans l'attraction des monocytes sur le lieu de l'injection, dans l'augmentation de la translocation cérébrale de l'adjuvant et étant un biomarqueur du EM/SFC et de la MFM (Khan *et al.*, 2013; Cadusseau *et al.*, 2014; Mills & Ley, 2014).

Néanmoins, il semble que le fond génétique des animaux ne soit pas le seul facteur à prendre en compte dans la neurotoxicité des adjuvants aluminiques. En effet, la dose d'adjuvant semble également être un facteur important puisque le dogme « la dose fait le poison » ne semble pas s'appliquer aussi simplement aux adjuvants aluminiques. Des trois doses d'adjuvant Alhydrogel[®], 200, 400 et 800 µg/kg administrées par voie IM à des souris CD1 femelles adultes, seule la dose 200 µg/kg a provoqué une augmentation de la concentration en Al cérébrale, accompagnée d'une augmentation de l'activité microgliale (Crépeaux *et al.*, 2017). Dans cette étude, la dose d'adjuvant la plus faible s'est révélée être celle produisant un effet neurologique notable mesuré par une baisse de l'activité locomotrice et une modulation de l'anxiété des animaux (Crépeaux *et al.*, 2017) comme précédemment noté après injection SC de l'adjuvant (Petrik *et al.*, 2007; Shaw & Petrik, 2009). Le changement de comportement des animaux à la dose 200 µg d'Al/kg était également associé à une augmentation de la densité en cellules microgliales au niveau du cortex frontal attestant d'une activation immunitaire dans cette zone, d'une élévation significative du taux d'Al cérébral total et d'une réduction plus importante du granulome musculaire qui était presque résorbé contrairement aux deux doses supérieures utilisées, dont le granulome est resté observable durant toute la durée de l'étude (Crépeaux *et al.*, 2017). Une modification comportementale a également été observée après injection de deux doses IM d'AH de 200 µg ou de vaccin Engerix B[®] (GSK) à des souris NZBWF1 femelles de 8 et 12 semaines. Elle avait alors la forme d'un déficit mémoriel, d'une augmentation de l'anxiété et d'une activation des cellules microgliales, 5 mois après la vaccination (Agmon-Levin *et al.*, 2014a).

Des réponses non linéaires ont déjà été rapportées en toxicologie de l'Al en particulier des courbes biphasiques, aussi bien dans des études neurotoxicologiques *in vitro* (Exley & Birchall, 1992; Platt *et al.*, 1995; Forest *et al.*, 2014; Eidi *et al.*, 2015) que dans des recherches *in vivo* (Kumar, 1998; Tsunoda & Sharma, 1999; Kim, 2003; Roig *et al.*, 2006) avec des expositions orales à l'Al. L'hypothèse la plus probable de cette neurotoxicité sélective des faibles doses d'adjuvant repose sur la nature nanométrique du composé. En effet, l'adjuvant est composé de spicules nanométriques (Mao, Zhou & Gao, 2013) qui forment spontanément des agglomérats microniques (Johnston, Wang & Hem, 2002) sujets à de subtiles variations de taille après adsorption d'un antigène (Eidi *et al.*, 2015) et en interaction avec le phosphate,

les acides organiques et l'environnement protéique *in vivo*. Les cellules du système immunitaire et en particulier les macrophages viennent alors phagocyter ce composé très peu biodégradable. Or la taille idéale de capture de particules pour les macrophages est de l'ordre de 1 à 4 μm (soit la taille moyenne d'une bactérie) (Kowalski, Bahnfleth & Whittam, 1999) correspondant à la taille moyenne de 1,20 μm des agglomérats incorporés par les cellules en 24 h *in vitro* (Mold *et al.*, 2014; Mold, Shardlow & Exley, 2016). Les particules plus fines (20-200 nm) sont capables de diffuser librement vers le ganglion lymphatique le plus proche quand les particules de taille intermédiaire (0,5-2 μm) nécessitent un transport cellulaire (Manolova *et al.*, 2008). Les particules encore plus importantes prennent certainement plus de temps pour être incorporées au sein des macrophages rendant ainsi leur translocation retardée (Morefield *et al.*, 2005). L'étude de la taille des particules au sein des trois solutions d'adjuvant de 200, 400 et 800 μg d'Al/kg a révélé que la concentration 200 μg d'Al/kg est la seule à être composée d'agglomérats d'une moyenne de 1,7 μm , donc facilement capturés par les macrophages. Les deux autres solutions étaient très majoritairement composées de très larges agglomérats d'environ 35 μm et d'une petite fraction de composés fins de l'ordre de 1,5 μm expliquant donc la translocation plus aisée des particules aluminiques issues de la faible dose d'adjuvant (Crépeaux *et al.*, 2017). La réponse non linéaire observée suggère que l'adjuvant Alhydrogel[®] répond aux lois spécifiques de la toxicologie des particules sans suivre la logique de dose-réponse chimique.

Les neurones de souris CD1 mâles adultes de 3 mois ayant reçu 100 $\mu\text{g}/\text{kg}$ d'AH en 2 injections réparties sur 2 semaines par voie SC, ont présenté des traces d'Al cytoplasmique et une activation de la Caspase 3 concordante avec l'apoptose (Petrik *et al.*, 2007; Shaw & Petrik, 2009). Une augmentation de l'activation des astrocytes et du nombre de cellules microgliales est restée visible 6 mois après injection de l'adjuvant (Shaw & Petrik, 2009). Les animaux ayant reçu de l'Al ont présenté une diminution progressive de la force musculaire, accompagnée d'une augmentation de l'anxiété (Petrik *et al.*, 2007), d'une diminution de la mémoire spatiale et d'une altération des fonctions motrices (Shaw & Petrik, 2009).

Chez des souriceaux CD1 nouveau-nés exposés à l'adjuvant AH par injections répétées par voie SC à une dose dite élevée (550 $\mu\text{g}/\text{kg}$ reproduisant le calendrier vaccinal américain de 0 à 18 mois) ou dite faible (240 $\mu\text{g}/\text{kg}$ mimant le calendrier vaccinal scandinave), il a été montré, dans le cadre d'une étude sur les TSA, une atteinte du système nerveux central par une augmentation de l'anxiété en rapport avec la dose d'Al reçue ainsi qu'une diminution de l'activité des animaux ayant reçu la plus forte dose, 20 à 22 semaines après le début du traitement (Shaw, Li & Tomljenovic, 2013). Ce même calendrier d'injection à forte dose (550 $\mu\text{g}/\text{kg}$) a ensuite fait ressortir des anomalies dans les interactions sociales, comparables à celles présentes dans les TSA, avec une baisse de l'intérêt social et une perturbation de la réaction pour la nouveauté sociale chez de jeunes souris CD1 exposées à l'AH de manière précoce (Sheth, Li & Shaw, 2018).

Au niveau cérébral, les particules d'Al ont principalement été retrouvées dans les cellules microgliales avec une pénétration plus importante en cas de lésion de la BHE (Khan *et al.*, 2013). Cependant, en 2015, une équipe américaine a mis en avant l'existence d'un système de

drainage lymphatique cérébral que l'on pensait jusque-là inexistant. En cherchant des passerelles pour les lymphocytes T dans les méninges, cette équipe a découvert des vaisseaux lymphatiques fonctionnels, tapissant les sinus dorsaux, capables de transporter des fluides et des cellules immunitaires depuis le liquide céphalorachidien et connectés aux ganglions lymphatiques cervicaux profonds (Louveau *et al.*, 2015). Cette découverte pourrait changer la vision des maladies neuro-inflammatoires et neurodégénératives associées au dysfonctionnement du système immunitaire en expliquant comment des cellules immunitaires activées en périphérie sont capables de franchir la BHE pour agir au niveau du parenchyme cérébral (Medawar, 1948; Louveau, 2015). Il apparaît en effet que ces vaisseaux soient une importante voie de recirculation pour les cellules et qu'ils pourraient être la voie d'entrée des macrophages chargés en Al dans le cerveau. Puisque l'administration d'Al peut conduire au dysfonctionnement du SNC (Petrik *et al.*, 2007; Shaw & Petrik, 2009; Shaw, Li & Tomljenovic, 2013), le doute subsiste quant au taux auquel ce composé peut être utilisé en toute sécurité (Tomljenovic & Shaw, 2011).

Les résultats obtenus chez le modèle murin se retrouvent également chez le modèle ovin, un gros mammifère dont la physiologie est plus proche de celle de l'Homme. Après une campagne de vaccination importante contre la fièvre catarrhale ovine en Espagne en 2008, un syndrome post-vaccinal a été observé dans la population ovine du nord du pays. Ce syndrome se compose d'une réaction neurologique aigüe observable 2 à 6 jours après une injection de vaccin contenant de l'Al et se caractérise par un manque de réponse aux stimuli externes accompagné d'une méningo-encéphalite (Luján *et al.*, 2013). Cette phase aigüe peut être suivie d'une phase chronique déclenchée par un stimulus externe comme une faible température hivernale. Lors de cette phase chronique, les animaux présentent des périodes d'excitation et de fatigue, de tétraplégie évoluant vers la mort (Luján *et al.*, 2013). Ces réactions post-vaccinales ont été reproduites expérimentalement en utilisant un calendrier vaccinal accéléré comportant 14 injections de vaccins contenant un adjuvant Al, réparties sur 198 jours, pour un total de 56 mg d'Al injecté par animal. Les animaux exposés ont présenté les signes cliniques du syndrome ovin précédemment décrit et une translocation de l'Al a été observée dans la moelle épinière (Luján *et al.*, 2013). Par la suite, l'administration SC des 9 vaccins les plus courants ou un d'adjuvant Al seul (AH) à une dose équivalente chez des agneaux de 3 mois, sous la forme de 19 injections réparties sur 475 jours pour un total de 81,29 mg d'Al par animal, a provoqué des nodules sous-cutanés au sein desquels l'Al est identifiable (Asín *et al.*, 2018). Cet Al est également retrouvé à distance du site d'injection, au niveau des nœuds lymphatiques de drainage 458 jours après la première injection (Asín *et al.*, 2018) ainsi que dans les cellules gliales de la matière grise de la moelle épinière lombaire et du lobe pariétal (de Miguel *et al.*, 2020). Or les adjuvants tels que l'AH ne sont pas de simples vecteurs d'antigènes mais sont capables d'induire des signaux de danger endogènes qui peuvent stimuler le système immunitaire (Varela-Martínez *et al.*, 2018). En effet, un protocole similaire à l'expérience précédente a démontré que l'AH seul peut augmenter l'expression génique de la voie *NF-κB* tout comme les vaccins complets. L'adjuvant seul a en revanche diminué l'expression des cytokines et de leurs récepteurs modulant ainsi à la fois l'immunité et l'inflammation (Varela-Martínez *et al.*, 2018).

Par ailleurs, l'application d'un calendrier vaccinal accéléré comportant 16 injections de vaccins contenant un adjuvant Al ou l'équivalence avec un adjuvant Al seul, réparties sur 349 jours pour un total de 71 mg d'Al a provoqué des changements comportementaux (Asín *et al.*, 2020). Cette étude impute à la présence d'Al vaccinal une baisse des interactions entre les animaux, l'augmentation de l'agressivité et des comportements stéréotypés, une hausse de l'excitation ainsi que de la compulsion alimentaire. Les troubles observés chez les ovins suite à la vaccination sont maintenant reconnus comme la version ovine du syndrome auto-immunitaire / inflammatoire induit par les adjuvants (syndrome ASIA, cf I.4.1.1.c) (Asín *et al.*, 2019).

Notons également un fait intéressant émanant de la société Merial (filiale vétérinaire de la société Sanofi) : face à l'association entre le sarcome félin (sorte de tumeur cancéreuse musculo-cutanée) et l'Al d'origine vaccinal (Madewell *et al.*, 2001), la filiale vétérinaire de Sanofi a en effet développé la gamme Purevax[®] ne contenant pas d'Al et dont l'argument de vente est l'absence d'adjuvants chimiques ayant un risque potentiel de provoquer des réactions locales ou allergiques.

En conclusion, les études menées chez l'animal montrent qu'une translocation cérébrale est possible pour plusieurs molécules contenant de l'Al pénétrant dans l'organisme par diverses voies d'exposition. Ces molécules sont alors en mesure d'induire une inflammation ou un stress oxydant provoquant la perte de neurones et l'apparition de troubles locomoteurs ou mémoriels. De nombreuses études *in vitro* ont par ailleurs démontré le caractère toxique de l'Al, en particulier pour les cellules du SNC où il est capable d'altérer les fonctions cellulaires, le métabolisme énergétique et les mécanismes épigénétiques modulant l'expression génique. Il est également capable de réduire le relargage de neurotransmetteurs, d'altérer les propriétés des membranes et de favoriser l'accumulation anormale de certaines protéines (Kawahara & Kato-Negishi, 2011). L'Al est malheureusement, en raison de ses propriétés physico-chimiques, très utilisé dans l'industrie et retrouvé dans une large gamme de produits allant de l'eau potable aux viennoiseries. De nombreux composés tels que certains métaux peuvent affecter l'absorption de l'Al dans le corps après une exposition par le système respiratoire ou digestif et par la peau et permettre à l'Al de perturber le SNC en provoquant des altérations cognitives ou des troubles neurodégénératifs (Niu, 2018). L'Al est donc identifié de longue date comme un neurotoxique affectant la mémoire, la cognition et le contrôle psychomoteur, altérant la neurotransmission et l'activité synaptique, endommageant la BHE, exerçant des effets pro-oxydants, activant les cellules microgliales et la neuroinflammation, réduisant le métabolisme du glucose dans le cerveau et les fonctions mitochondriales, interférant dans l'activité transcriptionnelle et favorisant l'agrégation de β -amyloïdes et de neurofilaments (Tomljenovic, 2011). Le manque de questionnement sur la réelle innocuité des sels d'Al utilisés comme adjuvants vaccinaux repose surtout sur leur longue période d'utilisation remontant à une époque où la science et la médecine étaient moins exigeantes en matière de sécurité et d'innocuité. Cependant, il est fort probable que si les adjuvants à base d'Al étaient développés aujourd'hui, ils ne seraient pas acceptés pour une utilisation humaine (propos du Dr N Garçon, responsable du centre mondial des adjuvants du laboratoire GSK, Workshop on aluminum in vaccines, Porto Rico 11 mai 2000, cités dans Belle, 2010).

Tableau 4 : Récapitulatif global des études portant sur les adjuvants vaccinaux, toutes voies d'administration, chez l'animal (1/5)

Référence	Modèle (âge au début de l'étude)	Molécule	Exposition	Principaux résultats
(Agmon-Levin <i>et al.</i> , 2014a)	Souris femelles NZBWF1, 8 à 12 semaines	AH et vaccin HBV	injection IM 0,4 ml vaccin HBV (Engerix B [®]) ou 0,4 ml à 200 µg à 8 et 12 semaines puis analyses comportementales à 21, 26 et 30 semaines.	Problèmes rénaux (anticorps anti dsDNA, dommages histologiques) des souris vaccinées HBV. Perte en globule rouge, déficit de la mémoire et activation des cellules microgliales chez les souris vaccinées HBV et Al. Augmentation de l'anxiété par l'Al.
(Aihara <i>et al.</i> , 2019)	Cochon d'inde et souris	Vaccins vétérinaire contenant un adjuvant aluminique (AH, AP, AH-saponine)	5 ml IP pour les cochons d'inde et 0,5 ml pour les souris puis évaluation sur 7 jours	Développement d'intussusception et d'obstruction intestinale par adhésion due à un foyer inflammatoire.
(Asín <i>et al.</i> , 2018)	Agneaux Rasa aragonesa castrés, 3 mois	AH (Alhydrogel [®]) et vaccins vétérinaires ovin avec adjuvant Al	19 injections SC sur 453 jours (équivalence de 6 à 7 ans de vaccination) soit un total de 81,29 mg Al pour histologie des tissus injectés et des ganglions lymphatiques.	Présence de granulomes SC contenant de l'Al et dont la sévérité est plus importante dans le groupe vaccin que dans le groupe adjuvant seul. Translocation des adjuvants vers les ganglions lymphatiques de manière plus importante dans le cas de vaccins.
(Asín <i>et al.</i> , 2020)	Agneaux Rasa aragonesa castrés, 3 mois	AH (Alhydrogel [®]) et vaccins vétérinaires ovin avec adjuvant Al	16 injections SC sur 349 jours (équivalence de 6 à 7 ans de vaccination) soit un total de 70,861 mg Al pour évaluation socio-comportementale après 7 et 16 injections.	Changement du comportement individuel et social dès la 7eme injection. Défaut d'interactions sociales, agressivité, stéréotypie. Augmentation des marqueurs de stress.
(Authier <i>et al.</i> , 2006)	Rates femelles Sprague Dawley & Lewis, 5 semaines	Vaccin Engerix B 20 [®] avec adjuvant AH	injection IM de 10 µl vaccin pour étude de l'élimination musculaire sur une année	Observation d'une lésion musculaire caractéristique de la MFM 1 mois post-injection diminuant en taille avec le temps. L'élimination musculaire des particules d'Al est différente entre les deux souches de rats.

Tableau 5 : Récapitulatif global des études portant sur les adjuvants vaccinaux, toutes voies d'administration, chez l'animal (2/5)

Référence	Modèle (âge au début de l'étude)	Molécule	Exposition	Principaux résultats
(Crépeaux <i>et al.</i> , 2015)	Souris femelles CD-1, 8 semaines	Alu-Dia (traceur à base d'AH), AH (Alhydrogel [®]) et vaccin HBV (Engerix B [®] GSK)	1) 3 injections Alu-Dia IM dans le muscle tibial ou SC de 20 µl espacées de 4 jours, soit un total de 200 ou 400 µg/kg. Suivi de la translocation 45, 135, 180 ou 270 post-injection. 2) 3 injections Al et vaccin HBV IM de 20 µl espacées de 4 jours, soit un total de 400 µg Al/kg. Analyses comportementales 45, 135, 180 ou 270 post-injection.	1) Translocation retardée des adjuvants Al vers les ganglions lymphatiques puis la rate. Particules non retrouvées au niveau cérébral. 2) Persistance longue du granulome musculaire au site d'injection. Absence d'altération cognitive.
(Crépeaux <i>et al.</i> , 2017)	Souris femelles CD-1, 8 semaines	AH (Alhydrogel [®])	3 injections IM dans le muscle tibial de 20 µl espacées de 4 jours, soit un total de 200, 400, 800 µg/kg. Évaluation comportementale, dosage cérébral et analyse de la persistance 180 jours après la dernière injection.	Pattern neurologique limité à la plus faible dose : baisse du niveau d'activité, altération de l'anxiété. Augmentation de l'activité microgliale et accumulation d'Al dans le cerveau à la plus faible dose, 6 mois post-injection au moment où le granulome musculaire se résorbe.
(Cutrufo <i>et al.</i> , 1984)	Souris mâles DBA/2, adultes	AH en poudre	50 100 200 mg/kg par voie orale puis enregistrement EEG pendant 90 min	Accumulation dose dépendante d'Al dans le cerveau et perturbation de l'électro-encéphalogramme (EEG) dès 45 minutes post-ingestion
(de Miguel <i>et al.</i> , 2020)	Agneaux Rasa aragonesa castrés, 3 mois	AH (Alhydrogel [®]) et vaccins vétérinaires ovin avec adjuvant Al	19 injections SC sur 453 jours (équivalence de 6 à 7 ans de vaccination) soit un total de 81,29 mg Al pour suivi de la translocation de l'adjuvant	Identification de la présence d'Al dans la moelle épinière lombaire et le lobe pariétal, en particulier les cellules gliales de la matière grise.

Tableau 6 : Récapitulatif global des études portant sur les adjuvants vaccinaux, toutes voies d'administration, chez l'animal (3/5)

Référence	Modèle (âge au début de l'étude)	Molécule	Exposition	Principaux résultats
(Eidi <i>et al.</i> , 2015)	1) Cellules THP1 et NSC-34 2) souris mâles C57BL/6, 8-10 semaines. Souris femelles CD-1, 7 semaines	Alu-Dia (traceur à base d'Al)	1) traitement <i>in vitro</i> avec AH, fND et Alu-Dia (gamme de concentrations) pour étude de cytotoxicité à 72h. 2) 1 injection <i>in vivo</i> IM de 20 µl pour un total de 400 µg/kg pour étude de la translocation à 7 et 21 jours.	1) Faible toxicité du traceur fND seul et toxicité comparable de l'Alu-Dia avec AH seul. Particules prises en charges par l'autophagie et permettant la détection des particules d'Al dans les autophagosomes. 2) Phagocytose rapide de l'Al et translocation vers les ganglions, la rate, le foie et le cerveau en 3 semaines.
(Freiberger <i>et al.</i> , 2018)	Souris femelles CD57BL/6 et BALB/c, 6-12 semaines	AH (Alhydrogel®) et AP (Adju-Phos®)	100 µl unique IP ou SC contenant de 0,04 à 2 mg Al puis suivi jusqu'à 150 min	Hypothermie dose-dépendante 10 min après injection. Signes cliniques d'apathie, posture voûtée et piloérection. Recrutement massif de cellules immunitaires dans la cavité abdominale associé à une activation de l'inflammasome.
(Galindo-Villegas <i>et al.</i> , 2019)	Daurade royale	AH (Imject™)	2 injections IP à 2 semaines d'intervalle, 100 µl contenant 4 mg/poisson IP. Analyses 120, 170 et 300 jours post-injection	Adhérence tissulaire, hépatomégalie et augmentation non délétère des tissus adipeux. Toxicité sur les cellules immunitaires des glandes surrénales et de la rate au jour 120, confirmé au jour 170 mais résorbé au jour 300 avec une bonne réponse immunitaire.
(Gherardi <i>et al.</i> , 2001a)	Rats Sprague-Dawley adultes	Vaccin GenHevac® 250 µl avec adjuvant AH	Injection intra musculaire de vaccin pour observation histologique du muscle 7, 14, 21 et 28 jours post-injection	Induction d'une zone de lésion musculaire nécrotique contenant une forte densité de lymphocytes et de macrophages caractéristique de la MFM.
(Khan <i>et al.</i> , 2013)	Souris mâles C57BL/6, mdx, CX3CR1 ^{GFP/-} et CCL2 ^{-/-} , 8-10 semaines	Al-Rho (traceur à base d'Al)	1 injection IM de 36µl pour 18 µg Al	Translocation systémique aux organes lymphoïdes, rate et cerveau, détectable 1 an post-injection. Particules d'Al détectées dans les cellules péri-vasculaires CD11b ⁺ puis la microglie et les autres cellules nerveuses. La translocation est fortement réduite par ablation du ganglion. L'altération de la BHE augmente la translocation cérébrale. CCL2 est impliquée dans la translocation systémique des particules.

Tableau 7 : Récapitulatif global des études portant sur les adjuvants vaccinaux, toutes voies d'administration, chez l'animal (4/5)

Référence	Modèle (âge au début de l'étude)	Molécule	Exposition	Principaux résultats
(Luján <i>et al.</i> , 2013)	Agneaux castrés, 3 mois	vaccins vétérinaires ovin avec adjuvant Al	1) étude de cas avant/après vaccination contre la maladie de la langue bleue sur 64 animaux 2) reproduction expérimentale du syndrome : 14 injections SC sur 198 jours soit un total de 56 mg Al pour analyses sanguines et histologiques après 177, 254 et 261 jours	1) Épisode neurologique intense 2-6 jours après injection, caractérisé par des signes cliniques incluant la léthargie, un aveuglement transitoire et une faible réponse aux stimuli externes associés à une méningo-encéphalite pour une faible proportion d'animaux. La phase chronique, plus fréquente et déclenchée par un stimulus extérieur comme le froid, comporte une phase d'excitation suivie d'une période de faiblesse, d'une ataxie et d'une tétraplégie menant à la mort. 2) Signes retrouvés dans le modèle expérimental. Translocation de l'Al vers les tissus nerveux de la moelle épinière.
(Petrik <i>et al.</i> , 2007)	Souris mâles CD-1, 3 mois	AH (Alhydrogel®)	2 injections SC de 50 µg/kg chacune à 2 semaines d'intervalle, soit un total de 100 µg/kg. Suivi comportemental sur 6 mois et analyses à 6 mois post-injection	Augmentation de l'anxiété, diminution de la force motrice. Perte de poils au niveau de l'injection. Apoptose de neurones moteurs dans la moelle épinière et du cortex moteur primaire. Augmentation des astrocytes dans la moelle épinière. Al présent dans le cytoplasme des neurones moteurs.
(Shaw & Petrik, 2009)	1) souris mâles CD-1, 3 mois 2) souris mâles CD-1, 9 mois	AH (Alhydrogel®)	2 injections SC de 50 µg/kg dans 200 µl chacune à 2 semaines d'intervalle, soit un total de 100 µg/kg pour histologie et tests comportementaux	Apoptose de neurones moteurs, augmentation des astrocytes, Al présent dans le cytoplasme des neurones moteurs. Activation de la microglie et des astrocytes persistant jusqu'à 6 mois après l'injection. Altérations des fonctions motrices et diminution de la mémoire spatiale.
(Shaw, Li & Tomljenovic, 2013)	Souris mâles et femelles CD-1, nouveau nés	AH (Alhydrogel®)	4 à 6 injections SC de 15 µl de PND2 à PND17, soit un total de 240 µg/kg & 550 µg/kg puis analyses comportementales de 16 à 22 semaines.	Augmentation du poids mâles & femelles à forte dose. Augmentation de l'anxiété des mâles & femelles à forte dose (effet léger chez les femelles à faible dose). Diminution de l'activité des mâles à la forte dose.

Tableau 8 : Récapitulatif global des études portant sur les adjuvants vaccinaux, toutes voies d'administration, chez l'animal (5/5)

Référence	Modèle (âge au début de l'étude)	Molécule	Exposition	Principaux résultats
(Sheth, Li & Shaw, 2018)	Souris mâles et femelles CD-1, nouveau nés	AH (Alhydrogel [®])	Reproduction du calendrier vaccinal pédiatrique US de 2010 en 6 injections SC de 15 µl de PND2 à PND16, soit un total de 550 µg/kg pour étude du comportement social à 8, 17 et 29 semaines.	Diminution de l'intérêt social à 8 et 17 semaines. Perturbation des réactions face à une nouveauté sociale.
(Varela-Martínez <i>et al.</i> , 2018)	Agneaux Rasa aragonesa, 5 mois	AH (Alhydrogel [®]) et vaccins vétérinaires ovin avec adjuvant Al	19 injections SC sur 475 jours (équivalence de 6 à 7 ans de vaccination) soit un total de 81,29 mg Al pour analyse des modifications d'expression génique	Augmentation de l'expression des gènes de la voie de signalisation NF-κB par les vaccins comme par l'adjuvant seul. Observation d'une diminution d'expression des cytokines et de leurs récepteurs suite à l'injection d'adjuvant par rapport aux vaccins. Modulation de l'inflammation et de l'immunité par les adjuvants.
(Verdier <i>et al.</i> , 2005)	Macaque (<i>Macaca fasciculata</i>) mâles de 2,3–3,9 kg	Vaccin combiné Tétanos-Diphtérie avec adjuvant AH ou AP à 0,6 µg/ml Al	Injection intramusculaire unique de 0,5 ml de vaccin. Observation histologique de la zone d'injection 3, 6 et 12 mois post-injection.	Observation de lésions musculaires caractéristique de la MFM jusqu'à 3 mois après injection pour AP et sur les 12 mois de l'étude pour AH.
(Weisser <i>et al.</i> , 2019)	Rats mâles Wistar, 2 mois	AH (Alhydrogel [®]), AP (Adju-Phos [®]) et vaccins sur AH, AP ou les deux	injections IM sur 6 sites pour un volume de 500 µl et 1,25 mg Al pour les adjuvants seuls ou 500 µl du vaccin puis mesure de la concentration plasmatique et tissulaire jusqu'à 80 jours post-injection	Augmentation de la concentration plasmatique en Al pour AP. La rétention musculaire en Al est presque totale avec l'AH qui ne présente aucun relarguage plasmatique et le stockage osseux est plus important avec AP à 80 jours post-injection.
(Yang <i>et al.</i> , 2016)	Souris mâles et femelles C57BL/6 nouveau nés	Vaccin HBV (Alhydrogel [®])	Injections IP à 0, 7 et 21 jours avec 50 µl de vaccin pour analyse comportementale à 4, 8 et 12 semaines et analyses moléculaires	Altération comportementale transitoire à 8 semaines non retrouvée à 12 semaines (défaut de neurogenèse au niveau de l'hippocampe avec processus inflammatoire systémique)

Résumé d'étape :

Dans la partie précédente consacrée à la toxicité de l'Al, nous avons abordé les points suivants :

- **Chez l'Homme, les expositions environnementales à l'Al, majoritairement liées au milieu professionnel ainsi qu'à l'alimentation, sont généralement associées à des troubles cognitifs.**
- La présence d'Al au niveau cérébral est un fait avéré dans les cas de maladie d'Alzheimer et des troubles du spectre autistique.
- Les propriétés neurotoxiques de l'Al sont connues de longue date bien que le mécanisme sous-jacent ne soit pas clairement caractérisé.
- La vaccination représente un apport en Al non négligeable, particulièrement lors des stades précoces de développement. Par son action immunostimulante, l'Al d'origine vaccinale, comme d'autres composés aux propriétés adjuvantes, pourrait conduire, seul ou en synergie avec d'autres facteurs, à une hyper-activation du système immunitaire, néfaste pour la santé.
- Chez l'animal, diverses formes d'Al non vaccinal administrées par voie orale conduisent à l'augmentation de la teneur cérébrale en Al accompagnée de dommages histologiques ainsi que de troubles comportementaux et cognitifs.
- Les molécules d'Al utilisées comme adjuvants, injectées en IP, produisent des effets indésirables au niveau intestinal, et des altérations comportementales et inflammatoires.
- Différentes techniques de suivi des particules d'Al administrées par voie IM ont été testées et témoignent du déplacement des particules depuis le muscle injecté vers des organes distants tels que les ganglions lymphatiques, la rate, le foie ou le cerveau.
- La présence d'Al au niveau cérébral, dont la voie d'entrée reste à déterminer, est associée à des troubles comportementaux et inflammatoires.
- Le fond génétique des animaux conditionne la bio-distribution et le devenir des particules laissant supposer que de subtiles différences génétiques ou physiologiques entre animaux de la même espèce peuvent moduler la prise en charge de l'Al par l'organisme.
- La taille des particules semble être un facteur primordial, conditionnant leur translocation ainsi que leur niveau de neurotoxicité.

I.5. Le phosphate de calcium, un substitut aux adjuvants aluminiques ? (Masson *et al.*, 2016)

La section suivante est la traduction d'une revue publiée en 2016 dans *Expert Review of Vaccines*. Dans cette revue, nous avons souhaité regrouper les données disponibles sur le phosphate de calcium utilisé comme adjuvant vaccinal. Ce composé, développé par l'Institut Pasteur, pourrait en effet être vu comme un substitut possible aux adjuvants aluminiques actuels dont la toxicité vient d'être discutée (cf Publication 3, section valorisation scientifique (Masson *et al.*, 2016)).

I.5.1. Contexte

L'absolue innocuité de l'Al dans les vaccins humains ne fait pas l'unanimité au sein de la communauté scientifique (Aprile & Wardlaw, 1966) et bien que de plus en plus de travaux démontrent le lien entre l'Al vaccinal et les différentes maladies dont ceux-ci seraient responsables, l'Académie Nationale de Médecine ne reconnaît pas cette relation de cause à effet (Bégué *et al.*, 2012; Exley, 2014a; Goullé & Grangeot-Keros, 2019). Il convient cependant de rappeler les controverses sur ces adjuvants, accusés d'être impliqués dans l'apparition de maladies auto-immunes ou neurologiques, notamment en ce qui concerne les vaccins contre l'hépatite B et le papillomavirus humain (HPV) (Tomljenovic & Shaw, 2011). La MFM, décrite en 1998 (cf chapitre II), fait partie des maladies imputées à l'Al vaccinal (Gherardi & Authier, 2003). Elle se caractérise par une lésion inflammatoire causée par des cristaux d'Al phagocytés dans des macrophages, persistant de façon très localisée au point d'injection du vaccin (muscle deltoïde) pendant plusieurs années après la vaccination (World Health Organization, 1999; Exley *et al.*, 2009). Ces pathologies ont en commun la présence de troubles neurologiques. Or la neurotoxicité de l'Al est aujourd'hui reconnue et la relation possible entre l'Al et des maladies neurologiques chroniques telles que la maladie d'Alzheimer fait l'objet d'études depuis plusieurs années (Bégué *et al.*, 2012; Exley, 2013; 2014b; Crépeaux *et al.*, 2020).

La question de la sécurité vaccinale est une préoccupation majeure, et certaines associations de patients demandent l'application du principe de précaution en substituant à l'Al vaccinal un autre adjuvant ayant déjà été utilisé en vaccination humaine, le phosphate de calcium (CaP) (E3M, 2015a). Le CaP a été initialement développé par l'Institut Pasteur sous forme d'hydroxyapatite ($\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$) bien que le produit décrit dans le brevet initial soit du CaP tribasique ($\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$) (Relyveld, 1977). Il a été utilisé dans les vaccins contre la diphtérie, le tétanos, la coqueluche et la poliomyélite (Relyveld, Henocq & Raynaud, 1964; Coursaget *et al.*, 1986; Gupta *et al.*, 1995). Malgré son remplacement par les sels d'alun à partir de 1985 après le rachat de la branche production de l'Institut Pasteur par l'Institut Mérieux, il reste un adjuvant approuvé par l'OMS pour la vaccination humaine et fait partie des substances susceptibles de pouvoir remplacer les sels d'alun dans les vaccins (Moulin, 1996; Sesardic, Rijpkema & Patel, 2007). L'emploi du CaP comme adjuvant non spécifique, donc généralisable à l'ensemble des antigènes, avait déjà été proposé sans faire l'objet de

recherches systématiques du fait du succès des adjuvants aluminiques (Relyveld & Raynaud, 1967).

A partir de 1984 pourtant, l'Institut Pasteur a décidé de commercialiser des allergènes retard adsorbés sur CaP afin de mettre en exergue l'effet retard du CaP et son effet immunogène. L'utilisation des allergènes en désensibilisation spécifique nécessitant une multiplication des injections et les seuls allergènes retard étant des allergènes sur oxy-hydroxyde d'Al (sur alun-pyridine ou sur oxy-hydroxyde d'Al *in situ*), l'Institut Pasteur a préféré alors s'orienter vers la seule alternative à l'AH : le CaP (Lecadet, Ickovic & Thibaudon, 1988).

Les récentes demandes des associations de patients pour la réutilisation du CaP à la place de l'Al vaccinal relancent les travaux sur cette molécule par ailleurs peu présente dans la littérature scientifique. Les avis divergent sur l'efficacité de la réponse immunitaire induite par le CaP ainsi que sur son innocuité en tant qu'adjuvant. C'est pourquoi cette revue de la littérature a été réalisée pour recueillir les données existantes sur cette molécule en tant qu'adjuvant afin d'en faire ressortir les forces et les faiblesses pour son utilisation à grande échelle (Masson *et al.*, 2016).

I.5.2. Capacité d'adsorption et pouvoir antigénique

A la lumière des publications scientifiques actuellement disponibles, il convient de définir clairement les notions de capacité d'adsorption et de pouvoir antigénique, qui parfois semblent confondues. Nous entendrons donc par capacité d'adsorption, la capacité d'un adjuvant à adsorber une certaine dose d'antigène par unité de surface. Et par pouvoir antigénique, la capacité d'un adjuvant à induire une réponse immunitaire adéquate à la vaccination en terme de concentration sanguine, ou titre d'anticorps. Autrement dit, sa capacité à présenter un antigène de manière efficace afin de rendre la production d'anticorps par l'organisme optimale en fonction de la dose initiale d'antigènes injectée. Ce point a d'ailleurs été fondamental dans le choix du phosphate de calcium comme adjuvant-adsorbant d'allergènes pour la désensibilisation spécifique (Lecadet, Ickovic & Thibaudon, 1988).

I.5.2.1. Capacité d'adsorption

La capacité d'adsorption du CaP est dépendante de nombreux facteurs et fait intervenir plusieurs phénomènes tels que les liaisons hydrogènes ou les forces électrostatiques (Seeber, White & Hem, 1991; Jiang *et al.*, 2004). Il faut donc noter que le pH joue un rôle primordial dans la détermination de cette capacité bien que celui-ci doive être gardé le plus physiologique possible pour la vaccination humaine (Gupta *et al.*, 1995). Le point de charge nulle ou point isoélectrique (pH auquel la charge de surface d'une molécule est nulle) est de 5,5 pour le CaP, 5 pour l'AP et 11.1 pour l'AH. La charge de surface ou potentiel zêta est positive si le pH est inférieur au point isoélectrique. Par conséquent, à pH physiologique, le CaP commercial et l'AP présentent un potentiel zêta négatif alors que l'AH présente un

potentiel zêta positif (Al-Shakhshir *et al.*, 1994; Jiang *et al.*, 2004; Singh *et al.*, 2006). Les antigènes sont également caractérisés par un point isoélectrique et cela explique pourquoi l'AH est plus efficace pour adsorber les toxines diphtériques et tétaniques dont les points isoélectrique sont respectivement de 4,1 et 5 (Aggerbeck & Heron, 1995; Sivananda & Sundaran, 2010).

Toutefois, en plus des forces électrostatiques, une autre forme de liaison avec l'antigène est possible avec le CaP. Les groupements hydroxyles présents dans la forme commerciale du CaP permettent une adsorption d'antigènes phosphorylés par liaison hydrogène (Bleam *et al.*, 1991). Des études ont démontré que ce type de liaison était également présent pour les adjuvants aluminiques tel que l'AH (Iyer, HogenEsch & Hem, 2003; Iyer *et al.*, 2004) permettant une adsorption des antigènes forte et non affectée par la variation du pH (Jiang *et al.*, 2004).

Enfin, la surface spécifique influence également la capacité d'adsorption en prenant en compte la forme et la taille des particules de l'adjuvant afin d'en déterminer la surface d'échange réelle avec l'antigène, par opposition avec la surface apparente. En effet, lorsque la taille des particules diminue, la surface spécifique augmente. Par exemple, deux poudres de CaP, la première avec une granulométrie médiane de 10,88 μm possède une surface spécifique de 0,54 m^2/g alors que la seconde avec une granulométrie médiane de 2,22 μm possède une surface spécifique de 2,76 m^2/g (Ginebra, Driessens & Planell, 2004). Puisque la capacité d'adsorption augmente avec la surface spécifique, la forme nanoparticulaire du CaP est celle qui présente la plus grande capacité d'adsorption (Rivera Gil *et al.*, 2010).

I.5.2.2. Pouvoir antigénique

Il semble que la capacité d'adsorption d'un adjuvant ne détermine pas nécessairement son pouvoir antigénique. En effet, pour un taux d'adsorption comparable en antigène de venin de serpent, le CaP sous forme gel (cf (Masson *et al.*, 2016)) présente un pouvoir antigénique plus important que l'AH, chez la souris (Olmedo *et al.*, 2014). Généralement, les particules d'une taille comparable aux agents pathogènes tels que les virus sont facilement reconnues et absorbées par les cellules dendritiques ou les macrophages (Zhao *et al.*, 2014). Les petites particules (20 à 200 nm) sont préférentiellement adsorbées par les cellules dendritiques alors que les grosses particules ($< 5 \mu\text{m}$) sont phagocytées par les macrophages. Cette phagocytose conduit alors à la présentation des antigènes administrés de manière efficace et une réponse immunitaire adaptative (Shah *et al.*, 2014). Le test de 6 tailles de particules d'hydroxyapatite de 40 nm à 5 μm chez la souris a permis de mettre en évidence que les particules de 100 à 400 nm sont celles qui présentent le plus fort pouvoir antigénique. Cependant, il convient d'être prudent avec ces résultats car il semble que chaque adjuvant présente sa propre gamme de taille optimale (Hayashi *et al.*, 2016)

Le pouvoir antigénique est également impacté par le calendrier de vaccination et l'injection de rappel. En effet, chez l'Homme, si le taux d'anticorps mesuré après la première injection vaccinale est supérieur avec l'AH, le taux d'anticorps final mesuré après l'injection de rappel est supérieur chez les personnes ayant reçu un vaccin à base de CaP (Relyveld *et al.*, 1991; Aggerbeck, Fenger & Heron, 1995). L'utilisation d'anatoxine tétanique adsorbée sur CaP et AH chez le cobaye démontre que le CaP est moins performant. La production d'IgG 1a et 1b est plus faible avec cet adjuvant qu'avec l'AH (Vassilev, 1978b). Cependant, cette même anatoxine tétanique ainsi que l'anatoxine diphtérique adsorbées sur CaP, à une concentration supérieure, induisent chez les animaux comme chez l'Homme, une production en IgG similaire voire supérieure à celle induite par les adjuvants aluminiques, surtout après le rappel (Relyveld *et al.*, 1991; Gupta & Siber, 1994; Aggerbeck, Fenger & Heron, 1995).

Les adjuvants vaccinaux provoquent généralement la synthèse préférentielle d'une ou plusieurs classes d'antigènes (World Health Organization, 1976). Le CaP sous forme gel présente l'avantage majeur de ne pas augmenter le taux d'IgE lors de son utilisation en rappel, chez l'Homme comme chez l'animal, contrairement à l'AH (Relyveld, Lavergne & de Rudder, 1974; Vassilev, 1978b; Ickovic *et al.*, 1983). Or, la production prolongée d'IgE pourrait être à l'origine d'allergies en cas d'injections régulières (Vassilev, 1978b). La faible production d'IgE lors du rappel à base de CaP est attribuée au fait qu'il est un constituant naturel du corps humain (Relyveld, Henocq & Raynaud, 1964). La présence d'anticorps IgE spécifiques dans le sérum humain doit être considérée comme un danger potentiel qui peut se manifester après la vaccination de rappel, surtout chez des personnes hyperimmunisées ou allergiques (Vassilev, 1978b). La production d'IgE humaine est conditionnée par un facteur héréditaire, toutefois certains auteurs associent la fréquence croissante des allergies à des programmes de vaccination de masse (Relyveld, 1969; Hubscher, 1977).

Globalement, bien que les résultats obtenus avec les modèles animaux soient divergents en fonction de l'antigène et de la concentration en adjuvant, les données présentes pour l'Homme laissent à penser que le CaP est un adjuvant efficace et potentiellement plus efficace que les sels d'aluns si ce n'est à la première injection, tout au moins après le rappel. Il a une bonne capacité d'adsorption et induit un fort taux d'IgG sans augmenter le taux d'IgE bien que des analyses complémentaires soient souhaitables (Relyveld, Henocq & Raynaud, 1964; Gupta *et al.*, 1995; Petrovsky & Aguilar, 2004).

I.5.3. Innocuité

Le CaP provoque, comme la plupart des adjuvants, l'apparition de petits nodules SC qui peuvent être palpables pendant une trentaine de jours après injection. Ces nodules ont ensuite tendance à se résorber en laissant une lésion cicatricielle définitive avec des amas de dépôt de calcium entourés d'une mince couche fibreuse, presque acellulaire (Balouet, Levaditi & Relyveld, 1975; Levaditi & Relyveld, 1975; Balouet *et al.*, 1977). Cependant, les nodules SC peuvent être évités par l'injection IM, plus profonde (Relyveld *et al.*, 1969). Signalons que le CaP fait partie des composés classés comme sûrs et biocompatibles par la FDA (Dorozhkin & Epple, 2002; Rivera Gil *et al.*, 2010), grâce à sa présence naturelle au sein de l'organisme. Le CaP a l'avantage de ne pas être bio-persistant et d'être donc moins toxique (Ahmed, Geary & Salem, 2014). La remarquable biocompatibilité du CaP en fait un biomatériau utilisé en orthopédie et dans les prothèses dentaires (Dorozhkin & Epple, 2002).

I.5.3.1. Réaction inflammatoire

Le CaP induit au niveau du site d'injection SC une réaction inflammatoire active faisant intervenir des neutrophiles et des macrophages (Goto *et al.*, 1997). La réaction inflammatoire produite par le CaP sous forme gel ne dure pas plus de 4 semaines, contrairement à celle induite par les adjuvants aluminiques qui peut durer deux fois plus longtemps (Goto *et al.*, 1997). Bien que non directement nuisibles à la santé, les réactions locales douloureuses doivent être évitées en raison de l'impact négatif qu'elles génèrent sur la perception publique des risques et avantages liés à la vaccination (Petrovsky, 2015a). Contrairement aux adjuvants aluminiques, le CaP n'est pas toxique *in vitro* pour les macrophages dans la gamme de concentration utilisée en vaccination (Goto *et al.*, 1993; 1997). Cette capacité du CaP de ne pas être néfaste aux macrophages est importante dans le choix de son utilisation en tant qu'adjuvant pour la vaccination humaine et pour l'immunité spécifique car le rôle des macrophages est reconnu comme important, sinon primordial dans l'induction de la réponse immunitaire (World Health Organization, 1976). De plus, la réaction inflammatoire reste de courte durée même à forte concentration en CaP (Goto *et al.*, 1997). Cela rend possible l'utilisation du CaP vaccinal même en cas de surconcentration de l'adjuvant, ce qui pourrait s'imposer en fonction de l'antigène utilisé.

Il semble que dans une certaine mesure, le CaP soit doté d'une certaine activité hémolytique. Cependant, il est important de préciser que ces résultats sont le fruit d'expérimentations *in vitro* et qu'ils ne sont pas unanimement acceptés. En effet, le CaP, bien que présentant une activité hémolytique avérée, n'est pas conçu, en tant qu'adjuvant, pour être injecté par voie vasculaire mais par voie IM ou éventuellement SC. Cette distinction et l'absence d'autres rapports semblables dans la littérature tend à démontrer que ces résultats n'ont pas de sens clinique (Léry, 1994).

I.5.3.2. Forme nano-particulaire

Parmi les évolutions dans le domaine des adjuvants, de nombreuses recherches se portent désormais sur les composés nano-particulaires. En effet, leur petite taille offre une plus grande surface d'adsorption pour un même volume (Rivera Gil *et al.*, 2010). Indépendamment de son excellente stabilité de stockage, de sa préparation à froid et de son développement relativement peu coûteux, le CaP nano-particulaire présente des caractéristiques positives dans tous les domaines étudiés (He *et al.*, 2000; Koppad *et al.*, 2011). Chez la souris, avec les virus de l'herpès et d'Epstein Barr, il induit une production durable d'IgG totaux, d'IgG2a et d'IgA sans produire d'IgE, sans trace d'inflammation sur les sites d'injection et sans qu'aucune toxicité n'ait été mise en avant durant l'étude (He *et al.*, 2000; 2002; Koppad *et al.*, 2011). En étude chez les poissons, oiseaux et en contact avec des cellules humaines en culture, cet adjuvant nano-particulaire est facilement absorbé et dissout dans les lysosomes avant d'être évacué hors des cellules. (Neumann *et al.*, 2009; Behera & Swain, 2011; Koppad *et al.*, 2011; Viswanathan, Gopinath & Raj, 2014). Il a été proposé de développer des vaccins unidoses à base de CaP nano-particulaire en raison des nombreux avantages que présente cette nouvelle forme et de son potentiel à avoir une libération prolongée d'antigène (He *et al.*, 2000). Cette forme est efficace pour la vaccination par voie muqueuse (intra nasale et intra vaginale) et permet la vaccination systémique par cette voie (He *et al.*, 2000; 2002).

Les sels d'alun, également nano-particulaires, stimulent préférentiellement la réponse humorale et spécialement la voie Th2 caractérisée par la production d'IL-4 et IL-5 ainsi que la production d'IgE et d'IgG1 (Gupta, 1998; Marrack, McKee & Munks, 2009; Aimaniananda *et al.*, 2009). Le CaP nano-particulaire peut présenter deux formes de cristaux, la forme de bâtonnet et la forme sphérique. Les cristaux en bâtonnets peuvent induire les deux types de réponse immunitaire, la réponse cellulaire de l'immunité (le développement de lymphocytes T) par activation de la voie Th1 et la réponse humorale par la voie Th2 (Hayashi *et al.*, 2016; Wang *et al.*, 2016a; 2016b). Les adjuvants micro-particulaires ne sont pas capables d'induire une réponse similaire en raison de leur trop grande taille (He *et al.*, 2002; Sokolova *et al.*, 2011; Knuschke, Epple & Westendorf, 2014; Zhou *et al.*, 2014; Jones *et al.*, 2014). Toutefois, chez le modèle murin, la comparaison de deux vaccins antitétaniques sur base de CaP nano-particulaire ou d'AP nano-particulaire a permis de mettre en avant la présence de lésions histologiques au niveau du cerveau, des reins, du foie et du muscle au point d'injection. Ces lésions de type congestion, vacuolisation ou dégénérescence tissulaire sont généralement moins aiguës avec le CaP sauf pour les lésions musculaires présentant des signes d'hémorragies (Issa *et al.*, 2014).

I.5.3.3. Études anciennes, données in situ

L'intérêt pour le CaP ayant grandement chuté après l'arrêt de son utilisation dans les années 80, les recherches sur cette molécule se sont tariées progressivement. En effet, il n'y a que peu d'études portant sur l'innocuité du CaP micro-particulaire utilisé comme adjuvant, et la plus récente date de la fin des années 90. Le CaP ne semble pas présenter de signe d'une

quelconque activité susceptible de provoquer des problèmes allergiques ou des réactions le rendant incompatible avec son utilisation pour la vaccination humaine ou animale dans les publications relevées. Au contraire, il semble très bien toléré (Relyveld *et al.*, 1970a; 1970b; Sureau *et al.*, 1977; Vassilev, 1978b; Relyveld, 1986; Gupta *et al.*, 1995; Goto *et al.*, 1997).

Signalons également que le CaP a été utilisé en France jusqu'au milieu des années 80, principalement pour le groupe de vaccins diphtérie-coqueluche-tétanos, sans que les praticiens ne fassent remarquer d'effet secondaire non souhaité. Celui-ci a été utilisé avec succès dans la vaccination pentavalente humaine (antivaricelleuse, anti-rougeoleux, BCG et antitétanique), sans réaction indésirable (Gateff *et al.*, 1973).

Selon plusieurs auteurs, le CaP est un constituant naturel du corps humain, offrant une plus grande garantie de l'absence d'effets indésirables et plus sûr que l'AH (McLachlan, Lukiw & Kruck, 1989). D'autres auteurs reconnaissent que son profil d'innocuité établie le rend intéressant pour l'évaluation d'une nouvelle génération de vaccins en gardant à l'esprit que tout comme pour le pouvoir adjuvant, les études effectuées sur les animaux pour tester l'innocuité des vaccins et de leurs adjuvants ne garantissent pas d'être le parfait reflet de la situation humaine, et nécessiterait ainsi de nouvelles études (Singh *et al.*, 2006; Petrovsky, 2015a).

I.5.4. Conclusion

Avant d'envisager l'utilisation d'un adjuvant chez l'Homme, il faut étudier expérimentalement plusieurs facteurs pour déterminer si la préparation est appropriée et sans danger, tels que : l'innocuité par des épreuves de toxicité aiguë et chronique, la tolérance locale et générale, la tératogénicité, la biodégradabilité, la cancérogénicité ou cocancérogénicité, le degré d'immunopotentialisation, les effets adverses inacceptables ou pharmacologiques divers, la définition de l'action etc. (World Health Organization, 1976). Le CaP a passé avec succès ces différents tests offrant notamment une grande efficacité en terme de titre en anticorps circulants, ce qui a permis son utilisation dans plusieurs vaccins humains pendant une vingtaine d'années (Relyveld, Levaditi & Ravisce, 1978; Bégué *et al.*, 2012). Le manque de données sur cette molécule ne permet pas une conclusion stricte quant à son innocuité. Cependant, les données disponibles chez l'Homme laissent percevoir une bonne capacité du CaP à produire une réponse immunitaire efficace (parfois plus qu'avec les sels d'alun après le rappel) avec les antigènes de la diphtérie, du tétanos, de la poliomyélite et de la coqueluche dans les conditions de préparation définies par le professeur E.H. Relyveld (Relyveld, 1986). Cet adjuvant est un composé naturellement présent dans l'organisme, caractérisé comme sûr par la FDA. Aucune étude à notre connaissance ne rapportant d'effets indésirables lors de son utilisation dans les conditions prévues, aucune raison ne semble justifier la mise à l'écart de cet adjuvant dans la vaccination humaine pour les antigènes cités. Ce que confirme son utilisation en désensibilisation spécifique depuis plus de 30 ans.

Pour conclure, au-delà de la connaissance des différences entre le CaP et les sels d'alun ou la comparaison pour savoir si le CaP est plus ou moins efficace que ces concurrents, ce composé est un bon candidat, spécialement sous sa forme hydroxyapatite, pour remplacer ou compléter les sels d'alun en tant qu'adjuvant. L'emploi du CaP comme adjuvant non spécifique pour d'autres antigènes devrait faire l'objet de recherches plus poussées, en se concentrant notamment sur la réponse de la forme gel de ce composé qui a déjà été utilisée chez l'Homme. Ce composé est présent dans la pharmacopée internationale et fait partie des adjuvants approuvés par l'OMS. Il est également mentionné comme adjuvant vaccinal dans la pharmacopée européenne. De plus, le Pr Daniel Floret, président du Comité Technique des Vaccinations 2016, a reconnu durant le salon Pharmagora 2016 que le CaP est une vraie alternative à l'Al dans les vaccins (E3M, 2016). Enfin, le brevet du CaP est aujourd'hui dans le domaine public, le rendant accessible à tous pour une utilisation dans de futurs vaccins.

Cette revue sur le CaP a été initiée afin d'évaluer la pertinence de la demande de l'association Entraide aux Malades de Myofasciite à Macrophages (E3M) de remettre sur le marché des vaccins adjuvés sur ce composé et d'effectuer des recherches pour produire d'autres vaccins avec cet adjuvant (E3M, 2015a). L'association E3M regroupe des personnes atteintes de myofasciite à macrophages et se mobilise pour l'utilisation de vaccins sans aluminium. Cette position provient de l'implication des adjuvants aluminiques dans la myofasciite à macrophages décrite dans le chapitre suivant.

II. Encéphalomyélite myalgique et Myofasciite à macrophages

Afin de clarifier le chapitre traitant de la myofasciite à macrophages (MFM), il convient de définir ici quelques notions majeures.

II.1. Encéphalomyélite myalgique/syndrome de fatigue chronique

II.1.1. Dénomination

L'encéphalomyélite myalgique ou syndrome de fatigue chronique (EM/SFC) est un syndrome invalidant dont l'origine reste incertaine (Wyller, 2007; Institute of Medicine Committee on the Diagnostic Criteria for ME/CFS, 2015). Le nom de cette condition, signifiant littéralement inflammation de la moelle épinière et du cerveau avec douleurs musculaires, a beaucoup évolué. Le terme encéphalomyélite myalgique a été utilisé pour la première fois par l'OMS et a été classé parmi les maladies neurologiques dans l'*International Classification of Diseases* de 1969. Le large éventail de symptômes présenté par les patients EM/SFC et décrit en 1969 par Fukuda sous l'appellation « syndrome de fatigue chronique », a servi de base de diagnostic pour le CDC (Fukuda *et al.*, 1994). Cependant, afin de ne pas stigmatiser les patients avec le terme de « fatigue » qui semble très bénin mais désigne en réalité une pathologie bien plus complexe et handicapante, il a été proposé de rassembler encéphalomyélite myalgique et syndrome de fatigue chronique sous le terme d'EM/SFC (Carruthers *et al.*, 2003). En 2011, une nouvelle classification dérivée de la précédente abandonne le terme SFC et reconnaît l'EM comme un problème de santé majeur chez les enfants (Crawley, Emond & Sterne, 2011). En 2015, l'*Institute of Medicine* suggère de remplacer « syndrome de fatigue chronique » par l'appellation plus précise « d'intolérance systémique à l'effort » (Institute of Medicine Committee on the Diagnostic Criteria for ME/CFS, 2015). Afin de limiter les confusions, nous utiliserons l'abréviation EM/SFC dans l'ensemble de ce manuscrit pour faire référence à ce syndrome.

II.1.2. Diagnostic

Les symptômes présentés par les patients EM/SFC comprennent un état d'épuisement chronique de cause inconnue, des douleurs musculo-squelettiques, des troubles du sommeil, des difficultés de concentration, des maux de tête et des troubles cognitifs pouvant conduire à une incapacité physique limitant l'autonomie (Fukuda *et al.*, 1994; Reid *et al.*, 2000; Cleare *et al.*, 2015). Selon la classification de 2003, le diagnostic d'EM/SFC s'effectuait sur la présence concomitante de fatigue, malaise à l'effort, troubles du sommeil, myalgies et arthralgies depuis au moins 6 mois en association avec au moins deux manifestations neurologiques ou cognitives et un symptôme parmi les catégories suivantes : i) dysfonction autonome, ii) altération neuro-endocrine et iii) trouble de l'immunité (Carruthers *et al.*, 2003). La dernière classification en date inclut les quatre symptômes suivants ; i) intolérance à l'effort réduisant les possibilités d'activité, ii) malaise post-exercice, iii) sommeil non réparateur, iv) troubles

cognitifs et/ou intolérance orthostatique (Institute of Medicine Committee on the Diagnostic Criteria for ME/CFS, 2015). La multiplication des définitions plus ou moins convergentes indique clairement le manque de consensus sur la caractérisation et la classification de ce syndrome complexe.

II.1.3. Une symptomatologie ambiguë en lien avec l'immunité et l'inflammation

La caractérisation de l'EM/SFC est d'autant plus compliquée que de nombreux symptômes présentés par les patients sont communs à plusieurs conditions d'origine indéfinie telles que la fibromyalgie, le syndrome associé à la MFM, le syndrome du côlon irritable ou le syndrome de tachycardie postural orthostatique, entre autres (Aaron & Buchwald, 2001), pour revue, voir (Gherardi, Crépeaux & Authier, 2019). Les personnes atteintes de fibromyalgie présentent en effet les symptômes communs de myalgie, fatigue, maux de tête ainsi que des troubles de la mémoire, du sommeil et de la concentration. La concordance entre les deux conditions est telle qu'elles pourraient être une continuité pathologique avec une symptomatologie composée, à une extrémité du spectre, de plus de fatigue et à l'autre extrémité, de plus de myalgie, bien que cette hypothèse reste discutée (Aaron & Buchwald, 2001). Le syndrome associé à la MFM se compose de symptômes très semblables (détaillés dans le chapitre II.2.2.) et plus de 70 % des patients MFM présentent l'ensemble des critères d'inclusion à l'EM/SFC (Aoun Sebaiti *et al.*, 2018). Dans un autre registre, le syndrome du côlon irritable, le trouble intestinal le plus commun, est caractérisé par une gêne abdominale et des troubles du transit. Parmi les patients atteints par ce syndrome, 14 % présentent également une EM/SFC et réciproquement 35 à 90 % des patients EM/SFC présentent un syndrome du côlon irritable (Kim & Chang, 2012; Hausteiner-Wiehle & Henningsen, 2014). Le syndrome de tachycardie postural orthostatique est quant à lui caractérisé par une élévation anormale du rythme cardiaque lors du passage en position debout en lien avec un trouble du système nerveux autonome. Les patients présentant ce syndrome remplissent les critères de diagnostic de l'EM/SFC pour 64 % d'entre eux (Okamoto *et al.*, 2012) et environ 40 % des patients EM/SFC souffrent de tachycardie posturale orthostatique (Schondorf *et al.*, 1999). En conclusion, il semblerait que l'EM/SFC, dont la patho-physiologie reste inconnue et qui est diagnostiquée sur la base de sa seule symptomatologie, ne corresponde pas à une unique pathologie mais représente un spectre de maladies issues de différents processus patho-physiologiques convergeant vers un phénotype très similaire (Kennedy *et al.*, 2006; Hickie *et al.*, 2006; Bansal *et al.*, 2012; Natelson, 2013).

L'EM/SFC partage également des similitudes avec le syndrome de fatigue post-infection (Morris *et al.*, 2016). Cependant l'absence de pathogène chez une partie des patients examinés (Navaneetharaja *et al.*, 2016) suggère que les symptômes observés pourraient être causés par un panel assez large de déclencheurs à action adjuvante allant des pathogènes aux composés toxiques (Treib *et al.*, 2000; Vermeulen & Scholte, 2003; Rosenblum, Shoenfeld & Amital, 2011; Stejskal, 2014; Navaneetharaja *et al.*, 2016). En effet, bien que peu comprise, l'hypothèse étiologique actuelle de l'EM/SFC repose sur un défaut individuel dans

l'élimination des pathogènes et composés toxiques à action immunostimulante (Rosenblum, Shoenfeld & Amital, 2011). Cette incapacité de régulation des stimulations pourrait conduire à l'épuisement du système immunitaire à long terme (Landay *et al.*, 1991), ce que semble confirmer l'observation d'un niveau de cytokines élevé chez les patients EM/SFC durant plusieurs années avant un effondrement soudain (Hornig *et al.*, 2015).

Parmi les composés suspectés d'être à l'origine des symptômes observés, les particules d'Al utilisées comme adjuvants dans les vaccins sont des candidats sérieux pour des investigations supplémentaires (Shepherd, 2001). En effet, la persistance anormalement longue des particules d'Al dans le muscle, en association avec une importante quantité de cellules de l'immunité, forme une lésion musculaire caractéristique appelée myofasciite à macrophages, visible chez certaines personnes présentant les symptômes de l'EM/SFC (Gherardi *et al.*, 2001a; Authier *et al.*, 2003; Rigolet *et al.*, 2014; Santiago *et al.*, 2015; Chkheidze *et al.*, 2017). Comme nous l'avons vu dans le paragraphe consacré à la neurotoxicité de l'Al étudiée chez l'animal (cf I.4.1.2.), l'Al administré sous diverses formes et par diverses voies peut être retrouvé au niveau cérébral, attestant le fait que le composé ne reste pas au niveau de la zone de pénétration dans l'organisme. Les particules d'Al prises en charge par les cellules de l'immunité peuvent en effet être déplacées vers des organes distants en conservant leur propriété immunostimulante (Khan *et al.*, 2013). L'Al vaccinal agit donc sur le système immunitaire par son effet adjuvant et l'antigène adsorbé à sa surface lui confère les caractéristiques d'un pseudo-pathogène immunogène persistant (Rosenblum, Shoenfeld & Amital, 2011). Les particules d'Al peuvent, de plus, se lier à des produits indésirables lors de la préparation vaccinale, tels que l'ADN du papillomavirus (Lee, 2012) ou des protéines de levures (Offit & Jew, 2003), potentiellement dangereux (Rinaldi *et al.*, 2013).

La principale problématique de la longue persistance des particules d'Al dans l'organisme, outre leur action immuno-stimulante prolongée, réside dans leur capacité à atteindre des organes distants et à y exercer une activité toxique suggérée par plusieurs études (Wen & Wisniewski, 1985; Redhead *et al.*, 1992; Sahin *et al.*, 1994; Wang *et al.*, 2013). En effet, la présence d'Al dans l'organisme produit une inflammation par l'activation de l'inflammasome NALP3 (Hornung *et al.*, 2008). Cependant, de manière concordante avec l'EM/SFC, les patients MFM présentent un épuisement immunitaire caractérisé par un faible taux de cytokines circulantes IL-1 β , IL-4, IL-10, IL-12, IL-17 et TGF- β mais une concentration élevée en cytokines CCL2 sur le long terme (Gherardi, Cadusseau & Authier, 2014). Cette modulation de l'inflammation pourrait jouer un rôle dans la survenue de troubles de la mémoire et de l'apprentissage étant donné l'importance, chez le rat, du système immunitaire dans la mise en place de ces processus par action sur la plasticité synaptique au niveau de l'hippocampe, particulièrement sensible à la neuro-inflammation (Min *et al.*, 2009). Il est par ailleurs établi que l'injection d'adjuvants Al à des rats nouveau-nés induit une réponse immunitaire orientée Th2 caractérisée par la production de IL-1 β , IL-6 et du Facteur de nécrose tumoral (*Tumor Necrosis Factor* ; TNF- α) dans l'hippocampe modulant la plasticité synaptique (Li *et al.*, 2015). Ce type d'activation immunitaire orientée Th2 a également été documentée dans le fluide cérébrospinal de patients EM/SFC (Hornig *et al.*, 2016) laissant entrevoir le rôle clé de la réponse inflammatoire dans l'étiologie de ce syndrome.

II.2. La myofasciite à macrophages

Dans ce chapitre, nous allons exposer plus en détail la MFM, nom donné à une lésion musculaire caractéristique (détaillée dans le paragraphe II.2.2.1.), témoignant d'une longue persistance de l'adjuvant aluminique dans les cellules immunitaires au niveau du site d'injection vaccinale. Cette lésion s'accompagne d'un syndrome associé présentant des symptômes correspondant au EM/SFC (Authier *et al.*, 2003; Gherardi, 2016). Ces symptômes caractéristiques sont présentés par les patients MFM dans diverses proportions, 93 % de fatigue chronique, 88 % de douleur musculaire ou 57 % de douleur articulaire (**Tableau 9 p. 92**), pour un total de 71 % des patients présentant l'ensemble des critères d'inclusion du EM/SFC (Aoun Sebaiti *et al.*, 2018). Par conséquent, la MFM pourrait être envisagée comme un biomarqueur possible d'EM/SFC post-vaccinal, d'autant que la sur-activation immunitaire semble être un facteur fréquemment associé à l'EM/SFC (Glaser & Kiecolt-Glaser, 1998; Carruthers *et al.*, 2003) et que la lésion musculaire de la MFM est immunologiquement active. L'hypothèse actuelle liant MFM et EM/SFC résulte de la combinaison d'une rétention longue de l'Al vaccinal dans le muscle injecté avec une action immunostimulante et inflammatoire, associée à une translocation lente des particules d'Al dans les cellules de l'immunité vers des organes distants comme le cerveau, à l'origine d'un EM/SFC post-vaccinal, manifestation principale du syndrome ASIA (décrit dans le paragraphe I.4.1.1.c) (Exley *et al.*, 2009; Gherardi, Crépeaux & Authier, 2019).

II.2.1. Découverte de la myofasciite à macrophages

II.2.1.1. Historique

La MFM, semblable à une myopathie inflammatoire acquise, a été observée pour la première fois à l'automne 1993 lorsque Michelle Coquet, experte en imagerie cellulaire, remarque la présence d'une grande quantité de macrophages dans une biopsie musculaire réalisée chez une infirmière souffrant de douleurs musculaires et articulaires invalidantes et d'une grande fatigue (Gherardi, 2016). La microscopie réalisée sur la biopsie musculaire a été montrée, comme une curiosité, à la Société Scientifique Française de Neuropathologie lors de la grande réunion annuelle de décembre 1993. Les amas de macrophages disposés en grande quantité entre les fibres musculaires et contenant des inclusions n'évoquent aucun cas connus aux sommités présentes mais suggèrent une infection, probablement d'origine bactérienne. En janvier 1994, une seconde observation de cette même lésion musculaire est faite sur un patient suivi pour des douleurs musculaires inexplicables à l'hôpital Henri Mondor de Créteil, faisant passer cette observation du statut de curieux à celui de suspect.

Faisant le lien avec la présentation de Michelle Coquet, les professeurs Romain Gherardi et François-Jérôme Authier, du service de neuropathologie de l'hôpital Henri Mondor, vont alors se plonger dans l'immense collection des cas répertoriés afin de ne pas qualifier d'inédite, une observation déjà décrite. La seule maladie dont les lésions correspondent à celles observées sur les coupes est la maladie de Whipple, liée à une infection généralement intestinale, causée

par une bactérie qui peut cependant diffuser à d'autres organes rendant l'observation musculaire curieuse mais plausible (Gherardi, 2016). Il faudra encore une année avant que le troisième cas ne soit observé, début 1995, rapidement suivi par un quatrième cas à Paris, un cinquième à Marseille, eux même suivis par d'autres dans toute la France (Gherardi, 2016). Dès lors différentes agences sanitaires telles que le CDC ou l'InVS seront prévenues de l'émergence d'une pathologie inconnue dont la cause reste incertaine, le germe suspecté refusant de se laisser observer.

Il faudra attendre le 23 octobre 1998, après que Michelle Coquet ait demandé une analyse des biopsies par le centre d'étude nucléaire de Bordeaux-Gradignan pour que le coupable soit démasqué. Le rapport rédigé par le physicien Philippe Moretto explique que le spectre de diffraction des inclusions présentes dans le cytoplasme des macrophages n'est nullement d'origine bactérienne mais représentatif de l'AH dont la structure est cristalline, par opposition à la structure amorphe de l'AP (Gherardi, 2016).

Surgit alors la question majeure de cette découverte, d'où provient cet Al ? Il est clairement entendu que l'Al observé est exogène car dans l'ensemble de la biosphère, aucun métabolisme n'intègre l'Al à ses fonctions biologiques (Exley, 2003). Afin de se protéger contre ce métal indésirable, notre organisme est doté de barrières protectrices limitant l'accès de l'Al (cf A.1.4.2.). Mais les patients dont les muscles contiennent de l'Al ne présentent aucune anomalie dans les dosages en Al sanguin ou urinaire réalisés suggérant des barrières saines. La présence d'Al dans leurs organismes ne serait donc pas due à une exposition environnementale par l'alimentation, l'eau ou par une exposition professionnelle (Gherardi, 2016). Il faudra qu'à la lumière de ces nouvelles connaissances, le Pr Gherardi, ayant remarqué qu'une part non négligeable des patients présentent également des atteintes auto-immunes, ne fasse des recherches dans l'*encyclopedia of immunology* (Delves & Roitt, 1998), pour découvrir que l'Al sous forme d'oxy-hydroxyde est utilisé comme adjuvant dans les vaccins...

Bien sûr la présence d'AH dans les vaccins à elle seule ne prouve pas que cet Al soit responsable de la MFM. Cependant, après vérification des carnets de santé de l'ensemble des patients, il s'avère que 100 % des personnes atteintes de MFM ont été vaccinées dans les années précédant leur diagnostic (Gherardi, 2016). Un long travail de recherche a ensuite été nécessaire pour apprendre l'existence de 4 formes d'adjuvants à base d'Al (l'hydroxyde, l'oxy-hydroxyde, le phosphate et le sulfate d'hydroxy-phosphate d'Al parfois combinés entre eux) et dont seuls les deux premiers correspondent aux cristaux retrouvés dans les biopsies musculaires des patients MFM. La comparaison des vaccins reçus par les patients démontre que 100 % de patients atteints de MFM ont reçu dans le deltoïde (site des biopsies musculaires), un adjuvant aluminique dans les 10 années précédant leurs premiers symptômes cliniques (Gherardi, 2016). Le lien formel entre les adjuvants aluminiques et la MFM sera permis par les sciences fondamentales en testant l'hypothèse chez le rat. En effet, l'injection d'un quart de dose de vaccin Engerix B[®] contre l'hépatite B dans les pattes postérieures de rats induit une MFM dont les inclusions caractéristiques sont visibles en microscopie électronique (Gherardi *et al.*, 2001b).

II.2.1.2. Une coïncidence malheureuse, un heureux hasard

La découverte du lien entre adjuvants aluminique et MFM soulève bien des questions dans la mesure où ces composés sont utilisés depuis 1926 (cf I.2.1.) alors que la MFM n'a été décrite qu'en 1993. Cependant, un changement majeur dans la vaccination s'est produit au début des années 1990 avec le passage du mode de vaccination SC à la voie IM afin d'obtenir une meilleure réponse immunologique et de limiter les réactions indésirables telles que les nodules sous-cutanés. De plus, ce changement à l'échelle mondiale concorde avec la recommandation de vacciner contre l'hépatite B, un vaccin contenant de l'AH (**Tableau 1 p. 33**). Cette coïncidence malheureuse apporte une explication sur le moment d'émergence tardif de la MFM au regard de la longue période d'utilisation des adjuvants aluminiques (Gherardi, 2016).

Mais la description de la MFM comporte également sa part de chance car les probabilités d'observer l'infiltration caractéristique de macrophages dans le muscle sont relativement limitées. Qualifiée de maladie franco-française par les plus sceptiques, la MFM est en effet beaucoup plus susceptible d'être observée en France où un heureux hasard veut que la zone de vaccination, le muscle deltoïde, recommandé par l'OMS pour l'administration IM des vaccins au début des années 1990, soit également le site des biopsies musculaires, augmentant ainsi grandement les chances de visualiser la signature musculaire de la MFM. En effet, dans d'autres pays, les biopsies musculaires sont habituellement réalisées au niveau de la cuisse ou du biceps (Ragunathan-Thangarajah *et al.*, 2013). De plus, la France est le pays avec la plus forte distribution de vaccins contre l'hépatite B avec une vaccination globale de la population adulte sans risque particulier entre 1994 et 1997 alors que d'autres pays de l'Union Européenne (UE) se sont focalisés sur les préadolescents et les populations à risque (Gherardi, 2016). Il est donc grandement probable que la MFM soit présente dans tous les pays du monde mais que sa détection ne puisse se faire que dans les pays où les biopsies musculaires sont réalisées dans le deltoïde comme la France ou quelques rares pays dont les pathologistes ont été formés en France (OPECST, 2014a). Cependant, lorsque pour une raison ou une autre, la biopsie musculaire d'un patient est réalisée au niveau du site préalable d'injection vaccinale, la MFM peut être détectée hors de France comme le montrent les données disponibles aux États-Unis (Simpson, 2002; Theeler, Simper & Ney, 2008), en Corée du sud (Park *et al.*, 2005), en Allemagne (Fischer, Reimann & Schröder, 2003; Bornemann *et al.*, 2004), en Australie (Shingde *et al.*, 2005), en Irlande (Ryan *et al.*, 2006), au Portugal (Polido Pereira *et al.*, 2011) ou au Royaume-Uni (Shivane *et al.*, 2012). Le Haut Conseil de Santé Publique reconnaît d'ailleurs dans son rapport de 2013 que la MFM est rarement rapportée dans les autres pays car ces derniers ne réalisent pas les biopsies dans le deltoïde mais que « *des biopsies du deltoïde seraient pratiquées dans les autres pays si la MFM était considérée comme une entité reconnue* » (Haut Conseil de Santé Publique, 2013). Cette phrase reconnaît implicitement qu'il n'est pas possible de trouver une lésion que l'on ne cherche pas.

II.2.2. Caractéristiques cliniques

La MFM est définie comme étant la lésion musculaire spécifique attestant d'une persistance anormalement longue d'AH dans les macrophages présents sur le site d'injection suite à une vaccination. Cette lésion est composée d'un infiltrat inflammatoire de grands macrophages basophiles contenant des agrégats d'Al persistants et de cellules T, sans lésion des myofibrilles (Gherardi *et al.*, 1998). Le syndrome associé à la MFM, dont le lien de causalité avec la lésion histologique n'est pas reconnu à ce jour par l'OMS (World Health Organization, 1999), est l'ensemble des symptômes présentés par les patients atteints de MFM. Il se compose de plusieurs troubles physiques et cognitifs correspondant au EM/SFC, dont la cause précise reste actuellement inconnue mais pourrait être une réaction immunitaire anormale à un agent infectieux ou toxique à l'origine d'une activation chronique de l'immunité (Landay *et al.*, 1991). Le pattern de symptômes exprimés par les patients MFM se compose en effet de fatigue chronique, myalgie, arthralgie, de troubles de la fonction motrice (**Tableau 9 p. 92**) et de troubles cognitifs (cf chapitre II.2.2.4.) indiquant une lésion du système nerveux (Rigolet *et al.*, 2014; Aoun Sebaiti *et al.*, 2017). L'examen initial de 53 patients par l'InVS en collaboration avec le Groupe de recherche sur les maladies musculaires acquises et dysimmunitaires (GERMMAD) décrit les symptômes de la MFM comme étant manifestés de manière équivalente pour les deux sexes avec des patients plutôt adultes de 45 ans et plus (Institut de veille sanitaire, 2001). L'accumulation des patients permet une analyse plus complète avec un âge médian des patients de 48 ans et un sex-ratio penchant du côté féminin (**Tableau 9 p. 92**) (Gherardi & Authier, 2003; Gherardi, 2016).

L'association entre la MFM et le syndrome associé reste compliqué sur la base de données humaines dans la mesure où il n'est pas éthiquement envisageable de procéder à des biopsies musculaires de patients asymptomatiques afin d'y rechercher la présence d'Al musculaire. Cependant une analyse statistique démontre une forte association entre la MFM et les myalgies (90 % contre 44 % chez des patients atteints de myalgie sans MFM) (Gherardi *et al.*, 2001a) corroborant une précédente étude identifiant les myalgies et arthralgies comme effets indésirables de la vaccination contre l'hépatite B (McMahon *et al.*, 1992). La comparaison de patients myalgiques vaccinés présentant ou non une MFM montre des différences importantes entre les deux groupes. Les patients MFM souffrent rarement de fibromyalgie et présentent des signes (altérations des potentiels évoqués) évoquant une démyélinisation du SNC (Ragunathan-Thangarajah *et al.*, 2013) suggérant une association réelle des myalgies avec la lésion musculaire. L'association de fatigue chronique à la lésion musculaire est également avérée par l'étude cas-témoin menée par l'Agence Française de Sécurité Sanitaire des Produits de Santé révélant un symptôme plus fréquent et plus sévère chez les patients avec MFM par rapport aux patients sans (AFSSAPS, 2003). Les altérations cognitives démontrées par des tests suggèrent une détérioration cortico-souscorticale stables dans le temps (Passeri *et al.*, 2011) influant sur la mémoire visuelle, la mémoire de travail et l'écoute dichotique (Couette *et al.*, 2009). Comparé à des patients atteints de maladies douloureuses, les patients MFM présentent des déficits cognitifs plus graves avec des troubles neuropsychologiques comparables aux pathologies inflammatoires ou toxiques comme la sclérose en plaque, les

infections au virus de l'immunodéficience humaine et au virus de l'hépatite B ou l'exposition chronique à l'Al (Couette *et al.*, 2009).

II.2.2.1. Lésion histologique et durée de persistance de l'aluminium

La lésion musculaire de la MFM est observable après une unique injection IM d'un vaccin aluminique chez le rat (Authier *et al.*, 2006), le singe (Verdier *et al.*, 2005) et la souris (Khan *et al.*, 2013). Chez l'Homme, cette lésion pathognomonique, observée en microscopie optique, se distingue par la présence de macrophages envahissant l'épimysium entourant le muscle, le périmysium entourant chaque faisceau de fibres et de manière dominante dans l'endomysium entourant chaque myocyte ou fibre musculaire (**Figure 5**). Les macrophages cohésifs, entourant des fibres musculaires intactes et sans trace de nécrose, ont un large cytoplasme basophile contenant des inclusions cytoplasmiques de taille micronique ou sub-micronique (**Figure 6**) positives à la coloration à l'acide périodique de Schiff (PAS+) (**Figure 7**). Des lymphocytes CD8⁺ sont toujours présents dans le voisinage des macrophages. L'observation de l'ultrastructure des inclusions cytoplasmiques osmiophiles (avec une fixation de l'osmium du tétr oxyde d'osmium) des macrophages en microscopie électronique présente une organisation en pelotes de spicules de 1 à 2 nm de large sur 60 à 120 nm de long typique de l'AH (**Figure 8-11**) dont certaines, entourées d'une membrane (**Figure 10**), pourraient provenir d'une vacuole de phagocytose ou du lysosome (Shivane *et al.*, 2012; Kim *et al.*, 2020). L'observation de cette lésion est exclusive aux muscles deltoïde et n'a jamais été observée à distance du site d'injection vaccinal (Coquet, 2008; Kim *et al.*, 2020).

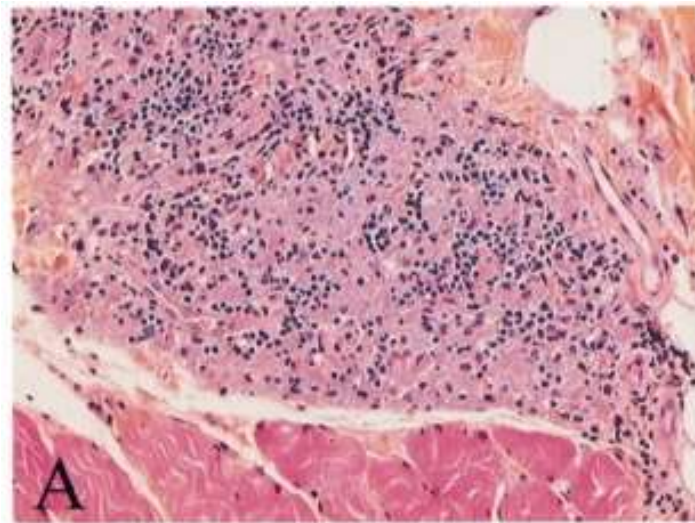


Figure 5 : Observation d'une biopsie musculaire humaine après coupe en paraffine et coloration Hématéine-Eosine (HE)
Reproduction de la figure originale 1A de Gherardi *et al.*, (2001a). Le fascia contigu aux fibres musculaires est infiltré par des amas de macrophages basophiles. X 100.

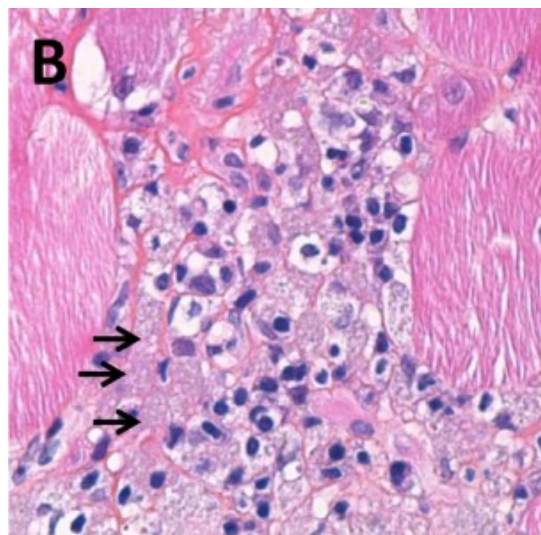


Figure 6 : Observation d'une biopsie musculaire humaine après coupe et coloration Hématéine-Eosine (HE)
Reproduction de la figure originale 1B de Gherardi *et al.*, (2016). Le cytoplasme des macrophages contient des inclusions granuleuses (flèches).

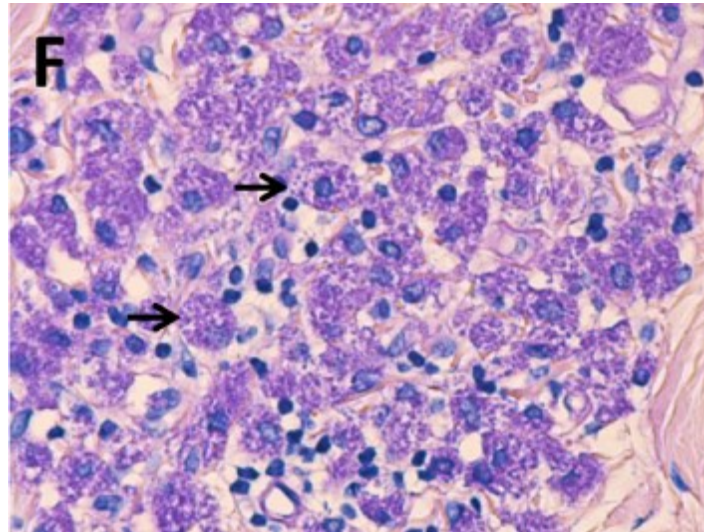


Figure 7 : Observation d'une biopsie musculaire humaine après coupe en paraffine et coloration PAS

Reproduction de la figure originale 1F de Gherardi *et al.*, (2016). Les macrophages sont remplis d'inclusions granuleuses PAS+.

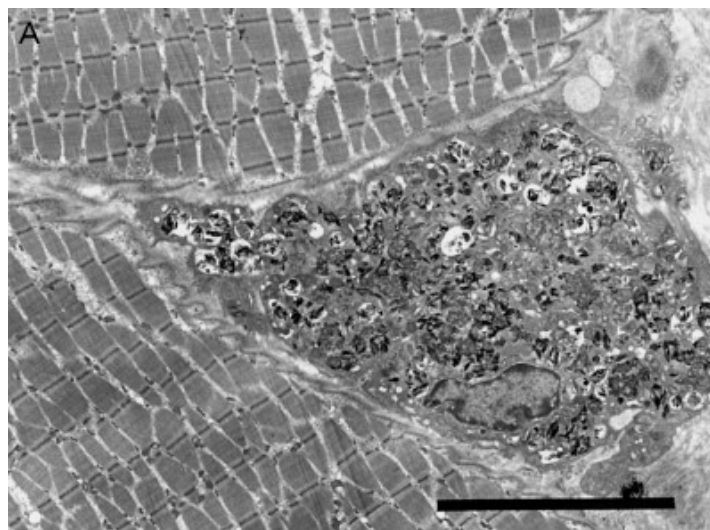


Figure 8 : Observation d'un macrophage contigu aux fibres musculaires en microscopie électronique

Reproduction de la figure originale 2A de Gherardi *et al.*, (2001a). Le cytoplasme est rempli d'inclusions osmiophiles. Barre d'échelle : 10 μ m.

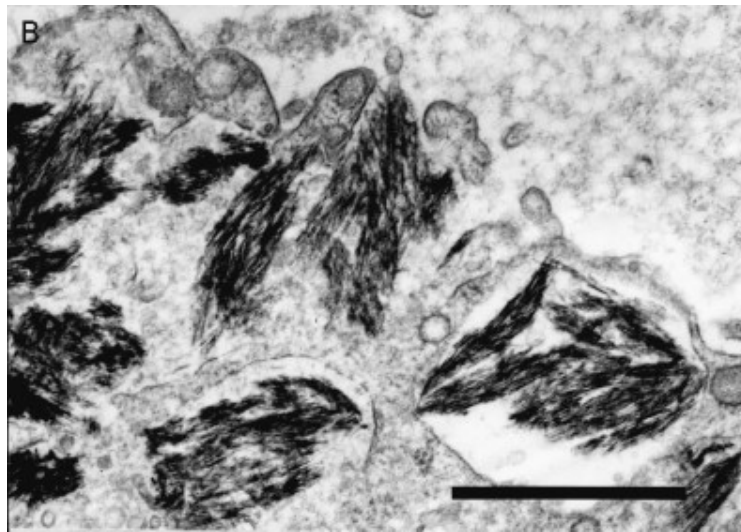


Figure 9 : Observation à fort grossissement de l'organisation spiculaire des inclusions cytoplasmiques des macrophages
Reproduction de la figure originale 2B de Gherardi *et al.*, (2001a). Barre d'échelle : 0,5 μ m.

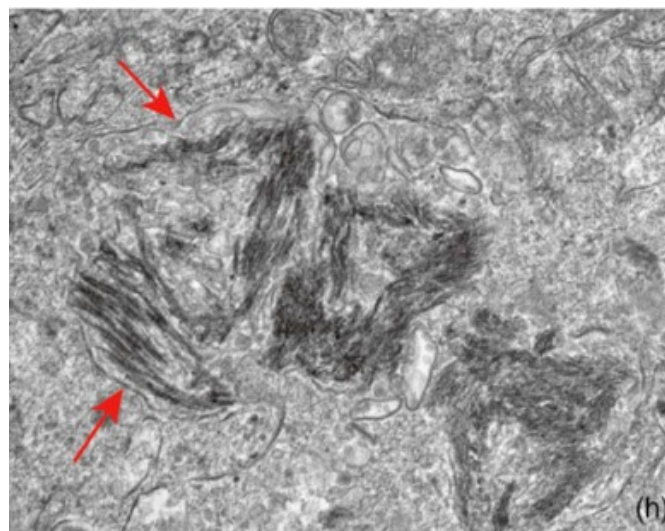


Figure 10 : Observation des inclusions cytoplasmiques des macrophages en microscopie électronique à balayage
Reproduction de la figure originale 1, h de Shivane *et al.*, (2012). Une membrane entoure en partie l'inclusion observée (flèches rouges).

Chez le rat, l'injection de vaccin dirigé contre l'hépatite B (genHevac[®]), correspondant au type de vaccin administré à 84 % des patients MFM, conduit à la formation d'une lésion musculaire spécifique de la MFM en 21 jours (Gherardi *et al.*, 2001a). Cette lésion reste visible 12 mois après l'injection, avec cependant une taille de lésion variable en fonction du fond génétique des individus puisque les rats Lewis présentent des lésions musculaires moins importantes que les rats Sprague-Dawley au bout d'une année (Authier *et al.*, 2006). La différence chez le rat pourrait être expliquée par une réponse immunitaire naturellement orientée Th1 chez le rat Lewis avec la production plus importante de lymphocytes T cytotoxiques. Cette observation laisse supposer que des variations d'ordre génétique dans la balance immunitaire Th1/2 pourraient interférer dans le mécanisme d'élimination des adjuvants aluminiques et sur leur durée de persistance dans le muscle injecté. Chez le singe cynomolgus (*Macaca fasciculata*) ayant reçu un vaccin diphtérie-tétanos adjuvé sur AH ou sur AP, la lésion musculaire est retrouvée pour les deux adjuvants trois mois après injection, mais avec une durée de persistance plus importante pouvant atteindre un an dans le cas de l'AH (Verdier *et al.*, 2005) prouvant ainsi l'origine vaccinale de la MFM et sa persistance musculaire plus longue que celle initialement attendue.

Il a longtemps été admis que les adjuvants assuraient une réponse immunitaire durable en formant un dépôt libérant lentement les antigènes par dissolution dans les acides faibles du milieu interstitiel (Flarend *et al.*, 1997; Shi, HogenEsch & Hem, 2001). Ces anciennes études présentent pourtant de nombreux biais méthodologiques (Masson *et al.*, 2018) et nous savons désormais que ce dépôt n'est pas nécessaire pour obtenir une bonne production d'anticorps puisque l'ablation du site d'injection ne change pas la réponse immunitaire obtenue (Hutchison *et al.*, 2011) et que les antigènes sont pris en charge et éliminés du site d'injection en quelques heures (Gupta *et al.*, 1996). De plus, les adjuvants sont avidement absorbés par les cellules phagocytaires (Gherardi *et al.*, 2001a; Morefield *et al.*, 2005) et persistent plus ou moins longtemps au niveau du site d'injection. Internalisé dans les cellules immunitaires, l'Al persiste sous forme particulière dans les tissus expliquant *de facto* pourquoi les taux sériques d'Al des patients MFM restent compris dans les valeurs seuil (Gherardi *et al.*, 2001a) bien que la mesure d'excrétion urinaire démontre la surcharge d'Al chez les patients MFM vaccinés atteints de EM/SFC (Exley *et al.*, 2009). Chez le tiers des patients MFM, un taux plasmatique élevé de créatine kinase peut être détecté, parfois avec un retour à la normale et généralement lié au processus de myonécrose suggérant une autre atteinte musculaire comme la myopathie inflammatoire/dysimmunitaire (Rigolet *et al.*, 2014).

La durée médiane de persistance des adjuvants aluminiques chez les patients MFM est de 65 mois (Cadusseau *et al.*, 2014). Cette durée est considérée comme anormalement longue quand elle dépasse 18 mois après la dernière vaccination (Gherardi *et al.*, 2015). Cependant, la durée réelle de persistance des adjuvants chez l'Homme reste inconnue en dehors des personnes biopsiées, et impossible à collecter en l'absence d'imagerie fiable et non invasive pour repérer les lésions de MFM (Rigolet *et al.*, 2014). Sachant que l'Al persiste dans l'organisme sur une durée potentiellement longue, certains auteurs ont qualifié de « tatouage vaccinal », une présence inerte d'Al normale à la suite d'une vaccination (Papo, 2003; Siegrist, 2005). Néanmoins, cette idée semble erronée dans la mesure où : i) la lésion de MFM

n'est pas retrouvée chez l'ensemble des personnes biopsiées (Ragunathan-Thangarajah *et al.*, 2013), ii) les analyses histologiques démontrent que ces lésions sont immunologiquement actives (Gherardi *et al.*, 2001a) et iii) l'injection IM de vaccin ou d'adjuvant Al s'accompagne chez l'animal, d'une diffusion de l'Al dans l'organisme jusqu'à la moelle épinière et le cerveau (Flarend *et al.*, 1997; Khan *et al.*, 2013; Luján *et al.*, 2013; Eidi *et al.*, 2015; Crépeaux *et al.*, 2017; Weisser *et al.*, 2019).

II.2.2.2. Douleurs musculo-squelettiques

Les symptômes associés à la MFM se développent lentement mais dès la première description du syndrome, la myalgie a été rapportée comme l'un des symptômes majeurs de la MFM. Ces myalgies touchent 88 % des patients (**Tableau 9**) et apparaissent généralement suite à un effort physique, loin du site de vaccination, dans les membres inférieurs, avant de gagner progressivement le haut du corps, les muscles paravertébraux et devenir diffuses (Gherardi & Authier, 2003). Les myalgies représentent le seul trouble fonctionnel chez une minorité de patients alors qu'une autre, plus limitée, présente comme seul trouble fonctionnel une arthralgie (Rigolet *et al.*, 2014). Les douleurs de la colonne vertébrale, du dos et de l'ensemble des articulations sont très communes et généralement retrouvées associées avec d'autres troubles. L'arthromyalgie combinant les douleurs musculaires et articulaires est très commune chez les patients MFM et la douleur, présente dès le réveil, est accentuée par les efforts physiques et l'activité quotidienne, entraînant un handicap non négligeable (78 % des patients ne travaillent plus, 18 % ont un travail à temps partiel et la plupart renoncent à tout forme de vie sociale tant ces douleurs sont invalidantes).

L'examen musculaire par électromyogramme se révèle de type myopathique chez moins de la moitié des patients (Gherardi *et al.*, 2015). D'importantes différences existent avec les contrôles souffrant de myalgies sans MFM : les patients MFM souffrent rarement de fibromyalgies (points sensibles définis, présents chez 55,5 % des contrôles contre 16,5 % des patients MFM) mais présentent des potentiels évoquant une démyélinisation du SNC (Ragunathan-Thangarajah *et al.*, 2013).

II.2.2.3. Fatigue Chronique dans la MFM

La fatigue chronique est le symptôme le plus présent dans le syndrome lié à la MFM avec 93 % des patients touchés (**Tableau 9 p. 92**). Bien que le terme fatigue soit extrêmement commun dans la langue française, il convient ici de lui attribuer sa juste définition car la fatigue chronique associée à la MFM ne correspond en rien à l'état d'épuisement passager ressenti après une longue période d'activité ou un léger manque de sommeil mais à une réelle condition neurologique d'épuisement retrouvé dans le EM/SFC (Gherardi, 2016). En ce sens, le terme très anodin de « fatigue » nuit aux patients car elle laisse supposer un état passager de manque d'énergie alors qu'elle se manifeste en réalité par un état d'épuisement chronique, persistant et non amélioré par le repos, associé à des inflammations au niveau du cerveau et de

la moelle épinière et à des douleurs musculaires. La fatigue chronique est également un symptôme débilitant capable d'affecter les activités quotidiennes des patients ainsi que leur humeur, leur mémoire ou leur fonctionnement cognitif. Ainsi, la fatigue chronique est considérée présente plus de 50 % du temps chez 63 % des patients MFM, affectant les activités de 80 % d'entre eux et affectant les capacités physiques et mentales de 53 % des patients sans être améliorée par le sommeil pour 47 % des cas (**Tableau 9 p. 92**). La fatigue chronique peut quelquefois être l'unique symptôme et apparaître plusieurs mois avant les douleurs musculo-squelettiques.

II.2.2.4. Troubles cognitifs

Les patients MFM se plaignent fréquemment de perte de mémoire, de cerveaux « brumeux » et de sautes d'humeur. Si les douleurs, l'état de fatigue chronique ou les syndromes dépressifs, généralement retrouvés chez les patients en errance de diagnostic, sont connus pour entraîner un déficit des performances cognitives et intellectuelles, les troubles cognitifs associés à la MFM sont un élément spécifique de cette dernière (Couette *et al.*, 2009; Passeri *et al.*, 2011) en particulier les troubles de l'attention et de la concentration. Ces troubles généralement sévères, touchant plus de la moitié des patients, sont des atteintes neuropsychologiques quantifiables non corrélés à la douleur, la fatigue, la dépression ou la durée de la maladie (Couette *et al.*, 2009; Passeri *et al.*, 2011; Rigolet *et al.*, 2014). Les troubles cognitifs associés à la MFM sont relativement similaires à ceux décrits dans d'autres pathologies impliquant une atteinte neurologique d'origine inflammatoire tels que les scléroses en plaques ou les infections chroniques notamment par le virus de l'hépatite C (Aoun Sebaiti *et al.*, 2017). Le profil cognitif des patients MFM, dressé par comparaison avec des patients atteints d'autres formes de douleurs chroniques telles que l'arthrite, combine un syndrome dysexécutif, une perte de mémoire et des signes de déconnection inter hémisphérique suggérant des détériorations cortico-souscorticales influant sur la mémoire visuelle, la mémoire de travail et l'écoute dichotique (Couette *et al.*, 2009). Ces troubles très handicapants et non corrélés aux autres symptômes semblent stables dans le temps malgré une certaine hétérogénéité dans la réplication des résultats (Passeri *et al.*, 2011).

Une batterie de tests évaluant la mémoire à court et long terme, les fonctions exécutives, l'attention ou l'écoute dichotique a permis de classer les patients MFM en 4 groupes distincts (Aoun Sebaiti *et al.*, 2017) :

- le premier groupe comprend les patients sub-symptomatiques présentant des performances non pathologiques à l'ensemble des tests excepté une faiblesse de l'attention sélective visuelle ;
- le groupe fronto-sous-cortical désigne les patients présentant des scores inférieurs pour les tests des fonctions exécutives et de l'attention ;
- le groupe papézien comprend les patients présentant des troubles du stockage, de la reconnaissance et de la fonction de consolidation de la mémoire verbale épisodique en supplément des troubles présentés par le groupe fronto-sous-cortical ;

- le quatrième groupe présente en plus des troubles du groupe papézien, une extinction de l'audition de l'oreille gauche à l'écoute dichotique.

Chaque groupe présente des caractéristiques propres comme une atteinte plus sévère de la mémoire associée à un âge plus avancé et un état dépressif plus important dans le groupe papézien (Aoun Sebaiti *et al.*, 2017). D'autre part, certaines des atteintes cognitives retrouvées chez les patients MFM telles que les altérations de la mémoire visuelle, la mémoire de travail ou les troubles de l'attention/concentration, ont déjà été caractérisées chez des patients hémodialysés fortement exposés à l'Al (Bolla *et al.*, 1992), des personnes ayant accidentellement consommé une eau contaminée au sulfate d'Al (Laskus *et al.*, 2005) ou des travailleurs des fonderies (Polizzi *et al.*, 2002) et ne sont pas améliorées par les traitements médicamenteux (Passeri *et al.*, 2011).

L'utilisation de la tomographie par émission de positrons (TEP), une technique d'imagerie médicale nucléaire, a permis de visualiser des défauts dans le métabolisme du glucose au niveau des lobes occipital et temporal ainsi que dans le système limbique, le cervelet (impliqué dans les processus cognitifs et les fonctions exécutrices) et le cortex pariétal chez des patients MFM (Van Der Gucht *et al.*, 2015; 2016; 2017; Sahbai *et al.*, 2019). Cette technique serait plus discriminante qu'une simple imagerie par résonance magnétique (IRM) généralement normale chez les patients MFM et non corrélée aux troubles cognitifs présentés par ces patients (Aoun Sebaiti *et al.*, 2017). L'hypométabolisme du glucose dans les zones cérébrales précitées pourrait agir sur le système limbique (amygdale, hippocampe et gyrus cingulaire) qui joue un rôle important dans le stockage et la consolidation de la mémoire à long terme via le circuit de Papez (Papez, 1937; Milner, Corkin & Teuber, 1968; Zola-Morgan, Squire & Amaral, 1986; Eichenbaum, 2000).

Tableau 9 : Caractéristiques cliniques des patients atteints de MFM
Données (Gherardi, 2016) adaptées de (Gherardi & Authier, 2003) et actualisées selon (Aoun Sebaiti *et al.*, 2018) pour la présence de Syndrome de Fatigue Chronique

Âge moyen (écart)	48 ans (19-77)
Sex-ratio (M/F)	0,72
Antécédent de vaccination aluminique (%)	100
<ul style="list-style-type: none"> • Hépatite B • Hépatite A • Tétanos • Nombre de doses • Délai médian entre vaccination et biopsie (écart) • Délai moyen entre vaccination et premiers symptômes (écart) 	<ul style="list-style-type: none"> • 84 • 19 • 58 • 1-9 • 53 mois (3-98) • 7 mois (0,5-84)
Fatigue chronique (%)	93
<ul style="list-style-type: none"> • Entraînant une limitation des activités antérieures • Présente > 50 % du temps • Affectant le fonctionnement physique et mental • Non améliorée par le repos • Associée à des troubles du sommeil • Sommeil non réparateur • Troubles de l'humeur • Troubles de mémoire subjectifs • Céphalées • Syndrome de fatigue chronique (critères Oxford 1991 ou CDC 1994) 	<ul style="list-style-type: none"> • 80 • 63 • 53 • 43 • 53 • 47 • 53 • 50 • 47 • 71
Myalgies (%)	88
<ul style="list-style-type: none"> • Délai médian entre vaccination et myalgies (écart) <ul style="list-style-type: none"> • 3 mois • 1 an • 2 ans Localisation initiale <ul style="list-style-type: none"> • Membres inférieurs • Membres supérieurs • Diffuse Localisation au moment de la biopsie <ul style="list-style-type: none"> • Membres inférieurs • Membres supérieurs • Diffuse • Elévation des Créatines Phosphokinase • Présence de points-galettes douloureux • Fibromyalgie (selon l'American College of Rheumatology 1990) 	<ul style="list-style-type: none"> • 11 mois (0-72) <ul style="list-style-type: none"> • 30 • 61 • 80 • 62 • 27 • 10 • 30 • 5 • 65 • 29 • 8 • 0
Autres manifestations (%)	
<ul style="list-style-type: none"> • Arthralgies • Dyspnée (essoufflement) • Troubles digestifs • Troubles urinaires • Fièvre • Perte de poids • Vitesse de sédimentation > 40 mm/h 	<ul style="list-style-type: none"> • 57 • 51 • 30 • 21 • 20 • 17 • 14
Maladies auto-immunes associées (%)	19
<ul style="list-style-type: none"> • Sclérose en plaques • Thyroïdite d'Hashimoto • Myosite, polyarthrite rhumatoïde, syndrome de Sjögren 	<ul style="list-style-type: none"> • 9 • 3 • 7

II.2.3. Anomalies immunologiques et MFM

II.2.3.1. Observations

Les analyses biologiques des patients MFM montrent la présence inconstante d'anomalies immunologiques avec une augmentation particulière du nombre de lymphocytes B circulants et la présence d'auto-anticorps anti-nucléaires et anti-phospholipides (Gherardi *et al.*, 2001b; Chérin *et al.*, 2008). Dix-neuf pourcent des patients souffrent d'une maladie auto-immune définie au moment du diagnostic incluant la sclérose en plaque, la thyroïdite auto-immune, la myosite à inclusion, la dermatomyosite, l'arthrite rhumatoïde ou le syndrome de Sjögren (Authier *et al.*, 2001; Chérin *et al.*, 2001; Gherardi & Authier, 2003; Lazaro *et al.*, 2005; Israeli *et al.*, 2011). En tant que puissant activateur du système immunitaire, retenu sur le site d'injection des vaccins, l'Al pourrait produire une activation immunitaire prolongée, potentiellement à l'origine des arthralgies et du EM/SFC (Landay *et al.*, 1991; Agmon-Levin & Shoenfeld, 2008). Sans être un réel indicateur du EM/SFC, les stimulations immunitaires prolongées sont généralement associés à une importante production de cytokines pro-inflammatoires incluant les IL-1 β , IL-6, TNF- α et le facteur de stimulation des macrophages (Aggarwal & Puri, 1995; Dinarello, 1996; Komaroff & Buchwald, 1998; Wessely, Hotopf & Sharpe, 1999). Par comparaison avec des sujets témoins, les patients MFM présentent un important taux sérique de MCP1/CCL2 sans élévation particulière (et plutôt une diminution) d'autres cytokines. Cette observation contraste avec les patients inflammatoires présentant un taux stable de MCP1/CCL2 mais des productions importantes en cytokines pro-inflammatoires (Cadusseau *et al.*, 2014) et a initié la recherche de troubles génétiques sur le gène CCL2 chez les patients MFM, pouvant permettre d'expliquer pourquoi ces patients seraient plus sensibles à la présence d'Al.

II.2.3.2. Des facteurs de susceptibilité individuelle ?

En 1999, l'OMS écrivait que l'hypothèse plausible de l'origine de la lésion de MFM « *serait l'existence d'un groupe de sujets chez lesquels l'élimination de l'aluminium présent dans le deltoïde se ferait difficilement [bien que l'on ne sache] pas encore si ce phénomène correspond à une dysfonction des macrophages qui serait génétique ou acquise, ou s'il s'agit de la queue de la distribution normale qui décrit la cinétique d'élimination de l'aluminium et la réponse tissulaire locale à cet élément dans la population générale* » (World Health Organization, 1999).

D'un point de vue mathématique et statistique, si la lésion de MFM était « *la queue de la distribution normale* », la probabilité de détecter cette lésion devrait être d'autant plus élevée que la durée entre la dernière vaccination et la biopsie est courte. Or, le pic de mise en évidence de MFM se situe 4 à 5 ans après la dernière vaccination, contredisant de fait cette hypothèse (Rigolet *et al.*, 2014). Reste donc la seconde piste évoquée par l'OMS, l'existence d'une prédisposition génétique ou acquise, chez les patients MFM, perturbant l'élimination de l'Al via un défaut dans le mécanisme de prise en charge naturel de l'Al par les cellules

immunitaires. Or, la faible prévalence de la maladie, associée à des cas de MFM familiaux, fait penser, comme le suggère l'OMS, que des facteurs génétiques de prédisposition individuels pourraient exister (Amoura *et al.*, 2000; Guis *et al.*, 2002a; 2002b; Nevo *et al.*, 2004). D'autant plus que les données expérimentales obtenues chez l'animal montrent que le fond génétique des animaux semble être un facteur clé de la durée de persistance du granulome post vaccinal (Authier *et al.*, 2003) ou de la réponse du SNC à un défi immunitaire périphérique au cours du développement (Bruce *et al.*, 2019) et que certains des patients appartiennent au groupe HLA-DRB1*01 associé à un risque accru de développer des maladies auto-immunes (Guis *et al.*, 2002b). Une analyse génétique focalisée sur 4 polymorphismes nucléotidiques simples ou *single nucleotide polymorphism* (SNP) dans la séquence du gène CCL2 de 252 patients MFM et 516 témoins a révélé que l'haplotype AG du palindrome de substitution nucléotidique rs3760396C était associée à un risque accru de développer la MFM (Khan *et al.*, 2013). Bien que 94 patients présentant cet haplotype ne présentaient pas d'anomalie dans le gène CCL2, il est intéressant de constater que pour les autres patients, l'allèle rs3760396C est associé à un fort niveau d'expression de MCP1/CCL2 *in vitro* (Nyquist, Zhang & De Graba, 2010) rappelant ainsi les observations faites *in vivo* (Cadusseau *et al.*, 2014). De plus, des défauts génétiques mineurs dans les mécanismes cellulaires d'élimination des particules tels que l'autophagie (Sridhar *et al.*, 2012) pourraient contribuer à la biopersistance des particules d'Al et expliquer la présence intracellulaire des adjuvants au même titre que les pathogènes dans le cas de la maladie de Crohn (Brest *et al.*, 2011).

Cependant, l'hypothèse d'une difficulté d'élimination acquise n'est pas à exclure. En effet, l'autophagie, décrite plus en détail dans la partie III., en particulier sa forme spécifique la xéno-autophagie, est l'un des principaux mécanismes de défense permettant d'envelopper et de dégrader les pathogènes intracellulaires mais également les particules inertes exogènes pouvant être sujettes à la phagocytose/endocytose (Stern, Adiseshaiyah & Crist, 2012). Or, il convient de rappeler ici que les cristaux d'Al ont majoritairement été observés au niveau intracellulaire avec la présence ponctuelle de membranes entourant ces amas et pouvant faire penser aux membranes des vacuoles de phagocytose ou du lysosome. L'autophagie au sens large, incluant la phagocytose associée à LC3 ou *LC3 associated phagocytosis* (LAP) est le principal instrument de solubilisation et d'élimination de l'Al internalisé dans les cellules de l'immunité (Sabella *et al.*, 2014; Chatterjee, Sarkar & Bhattacharya, 2014). Cependant, en tant que particules cristallines probablement toxiques pour les membranes, les adjuvants aluminiques pourraient déclencher une inflammation susceptible de perturber leur propre voie d'élimination par liaison systématique à la bicouche lipidique des membranes et perturbation de l'action des lysosomes impliqués dans la dégradation des matériaux absorbés par endocytose, phagocytose ou autophagocytose (Hornung *et al.*, 2008; Kang & Locksley, 2009; Flach *et al.*, 2011; Shi, 2012; Lima *et al.*, 2013). Une perturbation de ce mécanisme par l'Al lui-même conduirait ainsi à l'accumulation de particules aluminiques, protégées de l'acidité des lysosomes et les hydrolases acides qu'ils contiennent, seuls facteurs susceptibles de solubiliser l'Al. La présence continue de particules d'Al dans le cytoplasme des macrophages conduirait alors à la génération d'un important stress oxydant menant à une inflammation prolongée (Danielsson, Sandberg & Eriksson, 2017). Cette dernière finissant par produire un

épuisement ou *burn-out* du système immunitaire passant alors en résilience, expliquant la présence d'un important taux de MCP1/CCL2 sans présence de cytokines pro-inflammatoires chez les patients MFM.

Enfin, si les hypothèses d'une susceptibilité d'origine génétique et d'origine environnementale semblent également plausibles, il est également envisageable que l'origine de la MFM soit la résultante de l'interaction entre génétique et environnement. Il est en effet vraisemblable que des défauts génétiques mineurs soient présents chez les patients MFM sans causer de dysfonction dans la prise en charge des pathogènes et xénobiotiques naturels mais que le challenge induit par la présence d'Al d'origine vaccinale soit trop important et agisse comme déclencheur, révélant ainsi l'intolérance sous-jacente des patients MFM à l'Al.

Résumé d'étape :

Dans la partie précédente consacrée à l'encéphalomyélite myalgique ou syndrome de fatigue chronique et à la myofasciite à macrophages, nous avons exposé les points suivants :

- L'**EM/SFC** est un **syndrome invalidant** d'origine **inconnue** dont la définition reste encore établie sur des critères purement cliniques.
- Les **symptômes** présentés par les patients sont **multiples** et chevauchant avec d'autres conditions.
- La **réponse immunitaire et inflammatoire** semble être un facteur clé dans l'étiologie de l'EM/SFC.
- La **MF** se caractérise par la **persistance d'Al** d'origine vaccinale au niveau d'une **lésion musculaire**, accompagnée de symptômes concordants avec l'EM/SFC :
 - douleurs musculaires et articulaires réduisant les possibilités d'activité,
 - fatigue intense non améliorée par le repos,
 - troubles cognitifs affectant l'attention, la mémoire, les fonctions exécutives, ou l'écoute,
 - 71 % des patients atteints de MF ont un diagnostic établi d'EM/SFC.
- L'**Al d'origine vaccinale** peut être déplacé au sein de l'organisme et **moduler l'immunité et l'inflammation** via un possible **défaut d'élimination, inné ou acquis**, commun à l'ensemble des composés exogènes à action adjuvante.
- Une possible **sur-inflammation** conduisant finalement à **l'épuisement du système immunitaire** est envisagée pour expliquer les symptômes observés.

III. L'autophagie

III.1. Généralités

Le terme autophagie, initialement décrit par Christian de Duve (De Duve, 1963) et dérivé du grec ancien signifiant « *se manger soi-même* », est un terme générique pour désigner un processus cellulaire catabolique dans lequel des composants intracellulaires tels que des organelles ou des protéines défectueuses sont dégradées par action des hydrolases acides contenues dans le lysosome. Il existe trois grands types d'autophagie décrits dans la littérature : la microautophagie, l'autophagie conduite par des protéines chaperonnes et la macroautophagie.

- La microautophagie est caractérisée par l'invagination de la membrane lysosomale qui vient alors séquestrer une partie du cytoplasme dans l'enceinte du lysosome afin d'assurer sa dégradation (Marzella, Ahlberg & Glaumann, 1981; Mijaljica, Prescott & Devenish, 2011; Li, Li & Bao, 2012).
- L'autophagie conduite par des protéines chaperonnes correspond à l'internalisation directe de protéines altérées au travers de la membrane lysosomale. Cette internalisation est aidée par les protéines chaperonnes liant des séquence pentapéptidiques KFERQ localisées sur les protéines altérées pour les conduire vers des protéines canal de la membrane lysosomale (Dice, 1988; Kaushik & Cuervo, 2012).
- La macroautophagie est quant à elle caractérisée par la formation d'une vésicule à double membrane intracytoplasmique appelée autophagosome qui vient se développer autour des composés cytoplasmiques indésirables (Mizushima *et al.*, 2001). L'autophagosome fusionne ensuite avec un lysosome pour former un autophagolysosome ou autolysosome dans lequel les enzymes lysosomales, les hydrolases acides, vont détruire les composés séquestrés (Levine & Kroemer, 2019). On peut noter que l'autophagosome peut également fusionner avec un endosome pour former un amphisome et lier ainsi l'endocytose et l'autophagie (Berg *et al.*, 1998).

Ces trois formes d'autophagie sont complémentaires et permettent un recyclage permanent des composés cellulaires dans le but de maintenir l'homéostasie cellulaire en régulant la composition du cytoplasme par destruction des pathogènes, protéines ou organites obsolètes et composés néfastes, toxiques ou autre potentiellement internalisés par les cellules (Stern, Adisshaiah & Crist, 2012). Dans le reste du document, nous nous sommes focalisés sur le mécanisme de macroautophagie que nous appellerons autophagie, en tant que régulateur lors de la présence de pathogènes ou de composés toxiques.

Indispensable au bon fonctionnement cellulaire par son action de maintien de l'homéostasie, l'autophagie peut également être activée ou surexprimée dans certaines conditions de stress, un stress métabolique en cas de déficit en acides aminés ou en facteurs de croissance, un stress hypoxique en cas d'apport d'oxygène insuffisant ou un stress visant le réticulum endoplasmique (Klionsky *et al.*, 2016; Yin *et al.*, 2017). L'autophagie est également un acteur impliqué dans la dégradation des pathogènes et la présentation des antigènes aux cellules

dendritiques, ainsi qu'un régulateur de la réponse inflammatoire et oxydante. Dans ce contexte, une perturbation de l'autophagie est reconnue comme étant impliquée dans de nombreuses pathologies telles que les cancers, les maladies neuro-dégénératives et les maladies inflammatoires (Levine & Kroemer, 2019). De plus, l'expérimentation nous apprend que les macrophages, cellules en charge d'éliminer les pathogènes et autres composés toxiques de notre organisme, sont capables d'internaliser les particules aluminiques dans des vésicules retrouvées co-localisées avec les lysosomes (Mold *et al.*, 2014; Mold, Shardlow & Exley, 2016) suggérant par conséquent qu'une déficience dans l'une des étapes de ce mécanisme pourrait être à l'origine de la rétention prolongée d'aluminium chez les patients atteint de MFM (cf chapitre II.).

III.2. Le processus autophagique

Le processus autophagique se compose de plusieurs étapes clés que sont l'initiation ou la formation des autophagosomes, l'élongation des autophagosomes et la fusion de l'autophagosome avec un lysosome pour la dégradation et le recyclage du cargo (**Figure 11**). L'autophagie est régulée par plus de 30 gènes appelés gènes *ATG* conservés au cours de l'évolution des eucaryotes.

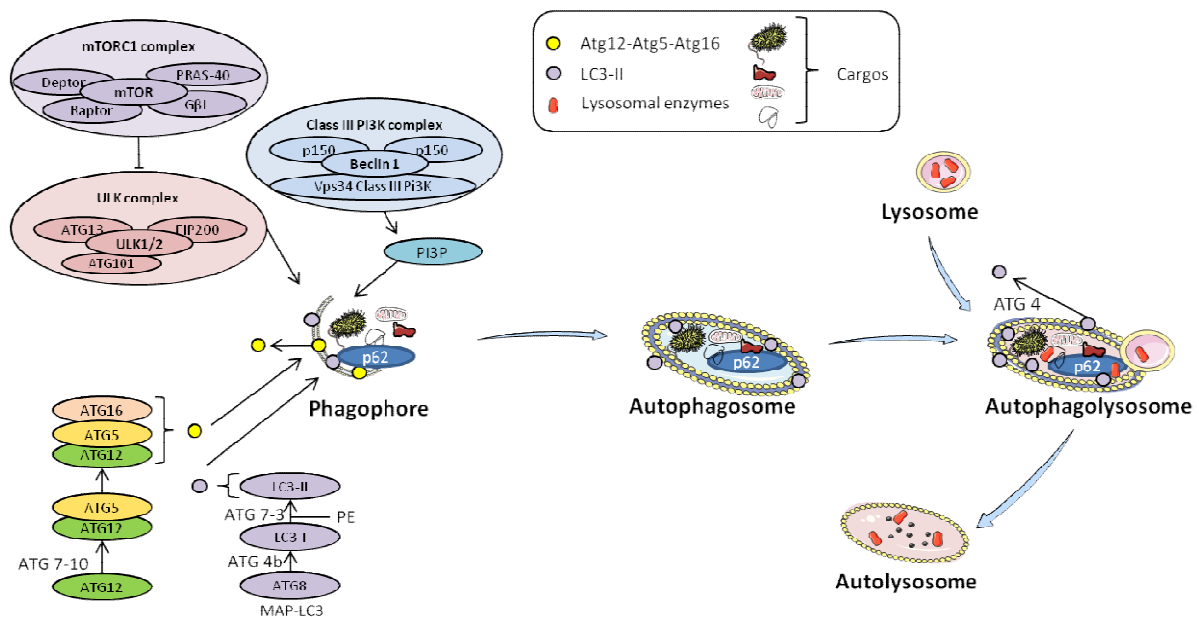


Figure 11 : Schéma du processus autophagique, adaptation de Cohignac et al., (2014)

p62 : SQSTM1/p62 ; PE : phosphatidylethanolamine

III.2.1. Initiation

L'initiation correspond à la phase d'apparition d'une double membrane, le phagophore, au sein du cytoplasme. L'origine exacte de cette double membrane n'est pas encore précisément définie et plusieurs hypothèses non exclusives coexistent pour tenter de l'identifier. Le phagophore pourrait, de fait, être généré *de novo* depuis des protéines préexistantes au niveau cytoplasmique ou être un dérivé de structures cellulaires établies, comme le réticulum endoplasmique (Ylä-Anttila *et al.*, 2009; Hayashi-Nishino *et al.*, 2009), l'appareil de Golgi (Geng *et al.*, 2010; Geng & Klionsky, 2010), la membrane mitochondriale externe (Hailey *et al.*, 2010), ou directement issu de la membrane plasmique (Ravikumar *et al.*, 2010; Ravikumar, Moreau & Rubinsztein, 2010).

Lors de cette étape, deux complexes macromoléculaires majeurs sont mis en jeu, le *mammalian target of rapamycin complex* (mTORC1) et le complexe phosphatidylinositol-3-kinase de classe III (PI3K). mTORC1 est composé de la protéine kinase mTOR, de la protéine *regulatory associated protein of mTOR* (Raptor), de la protéine *mammalian G protein β -subunit-like* (G β L), de la protéine *DEP domain-containing m-TOR interacting* (Deptor) et de la protéine *proline-rich Akt substrate of 40kDa* (PRAS40). mTORC1 peut interagir avec un second complexe protéique, *UNC-51-like-kinase* (ULK) composé des protéines ULK1/2, *autophagy related (ATG) gene 13*, *focal adhesion kinase family-interacting protein of 200 kDa* (FIP200) et ATG101. En condition physiologique, mTORC1 est active et peut phosphoryler les protéines ATG13 et ULK1 inhibant l'activité kinase ULK et l'autophagie. Au contraire, dans des conditions de stress physiologiques évoqués précédemment, mTORC1 est inactivée et ULK induit l'autophagie via une régulation par phosphorylation. Le complexe mTOR pourrait également moduler l'activité du facteur de transcription FoxO3 régulant l'expression de plusieurs gènes majeurs de l'autophagie comme ATG4b, ATG12 ou Beclin-1 (Mehrpour *et al.*, 2010).

Le complexe PI3K est quant à lui composé des protéines PI3K, *vacuolar protein sorting 34* (Vps34), p150, Beclin-1 et ATG14. Ce complexe protéique permet l'activation de la protéine Vps34 à son tour capable de produire le phosphatidylinositol-3-phosphate (PI3P) essentiel à la formation des autophagosomes par recrutement protéique pour l'élongation du phagophore (Burman & Ktistakis, 2010; Mizushima, Yoshimori & Ohsumi, 2011). Une augmentation d'expression du complexe PI3K peut donc être interprétée comme un signe d'activation de la machinerie autophagique. Cependant, nombre de protéines régulatrices telles qu'Ambra1, *UV radiation resistance-associated tumor suppression gene protein* (UVRAG), Rubicon, Bif1 et les protéines anti-apoptotiques Bcl-2 ou Bcl-x1 sont en mesure d'interagir avec le complexe PI3K afin de moduler son activité (Patingre *et al.*, 2005; Liang *et al.*, 2006; Fimia *et al.*, 2007; Takahashi *et al.*, 2007).

III.2.2. Élongation des autophagosomes

Le phagophore se développe dès sa mise en place dans le cytoplasme afin de former la vésicule à double membrane en charge de séquestrer le cargo de composés indésirables. Deux systèmes de conjugaison *ubiquitin-like* participent à l'élongation de la structure pré-autophagosomale. Le premier système est composé des protéines ATG5 et ATG12, conjuguées par l'action des protéines ATG7 et ATG10. ATG16L est ensuite liée au complexe ATG12-ATG5 via son domaine super-enroulé pour former le complexe ATG12-ATG5-ATG16 de 800 kDa. Ce complexe, essentiel à l'élongation de la structure pré-autophagosomale (Kuma *et al.*, 2002; Mizushima *et al.*, 2003) se dissocie de l'autophagosome quand celui-ci est mature.

Le second système est issu du clivage en C-terminal de la pro-LC3, aussi appelée MAP-LC3 ou ATG8 chez l'Homme, par ATG4b produisant la LC3-I. Cette protéine est alors conjuguée par ATG7 et ATG13 à la phosphatidylethanolamine (PE) pour devenir la protéine ATG8-PE aussi appelée LC3-PE ou *microtubule associated-protein 1 light chain 3-phosphatidylethanolamine* (LC3-II) (Tanida *et al.*, 2004; Tanida, Ueno & Kominami, 2004). LC3-II, contrairement au premier système, reste sur l'autophagosome jusqu'à la complète maturation de ce dernier et sa fusion avec le lysosome. C'est à ce moment que les molécules de LC3-II positionnées sur la face cytosolique de l'autophagolysosome sont recyclées vers le cytosol par ATG4 (Tanida, Ueno & Kominami, 2004). Durant la phase de maturation, les molécules de LC3-II de la face interne de l'autophagolysosome servent de point d'encrage au cargo cytosolique, lui-même marqué par la protéine séquestosome 1 (SQSTM1/p62). Cette protéine fait le lien entre les composés poly-ubiquitinés à détruire et la membrane interne de l'autophagosome (Pankiv *et al.*, 2007). Après fusion avec le lysosome, les protéines SQSTM1/p62 et LC3-II sont détruites en même temps que le cargo cellulaire par l'activité protéolytique apportée par le lysosome.

Ces deux systèmes sont, de plus, en interaction puisque le conjugué ATG5-ATG12 pourrait avoir une activité ligase ubiquitine facilitant la conjugaison de LC3-I avec la PE (Hanada *et al.*, 2007). De même, le complexe ATG12-ATG5-ATG16 et l'interaction entre ATG12 et ATG3 pourrait jouer un rôle dans la lipidation de LC3 (Fujita *et al.*, 2008).

III.2.3. Fusion autophagosome-lysosomes et dégradation

En fin de processus, les autophagolysosomes sont formés par fusion entre les autophagosomes et les lysosomes. Pour que cette fusion ait lieu, il faut que les autophagosomes, formés de façon aléatoire dans le cytoplasme des cellules de mammifères, atteignent les lysosomes majoritairement localisés au niveau périnucléaire près du centre d'organisation des microtubules (MTOC) (Jahreiss, Menzies & Rubinsztein, 2008). Ce déplacement nécessitant l'implication des microtubules est conduit par les protéines motrices dynéines (Ravikumar *et al.*, 2005; Kimura, Noda & Yoshimori, 2008). L'inhibition de ce transport par dépolymérisation des microtubules ou l'inhibition des protéines motrices peut entraîner un

blocage de l'autophagie (Webb, Ravikumar & Rubinsztein, 2004). Le mécanisme de fusion entre les deux vésicules fait intervenir de nombreuses protéines incluant des GTPases comme Rab7, la syntaxine 5, plusieurs *soluble N-ethylmaleimide sensitive factor attachment protein receptor* (SNARES), LAMP1, LAMP2, et des protéines Vps de classe C (Tanaka *et al.*, 2000; Jäger *et al.*, 2004; Gutierrez *et al.*, 2005; Liang *et al.*, 2008; Renna *et al.*, 2011; Mariño *et al.*, 2014). Après la fusion, le cargo cellulaire ainsi que la membrane interne de l'autophagolysosome sont dégradés par les hydrolases acides lysosomales comprenant les protéinases A et B et les cathepsines B, D et L (Tanida *et al.*, 2005). Les acides aminés résultants de cette dégradation sont recyclés vers le cytoplasme pour y être réutilisés.

III.2.4. Flux autophagique

L'autophagie, comme indiqué ci-dessus, est une suite d'étapes continues allant de la formation des autophagosomes au relargage des produits de dégradation, en passant par la production de vacuoles séquestrant les produits à dégrader et leur fusion avec les lysosomes pour que la dégradation par les hydrolases acides ait lieu. Puisque ce processus est dynamique, l'évaluation du flux autophagique ne peut se faire par une unique mesure et plusieurs conditions doivent être remplies pour obtenir des résultats interprétables. L'évaluation du nombre d'autophagosomes à un instant donné par microscopie électronique à transmission ou la quantification de la protéine LC3-II – qui est un bon marqueur autophagosomale puisqu'elle est associée à la membrane interne des autophagosomes – ne donnent qu'une idée de la présence d'une activité autophagique dans la cellule sans en indiquer la direction. En effet, le taux de LC3-II dans une cellule résulte de la balance constante entre sa formation et donc la formation de nouveaux autophagosomes et sa destruction en fin de processus. Ainsi un fort taux de LC3-II ne peut distinguer une augmentation de la formation d'autophagosomes et donc de LC3-II par l'activation de l'autophagie d'un blocage de l'autophagie dans ces étapes tardives empêchant la destruction de LC3-II (Mizushima, 2004; Barth, Glick & Macleod, 2010; Klionsky *et al.*, 2016). Pour distinguer ces deux cas de figure, il est essentiel de combiner l'analyse de la quantification des autophagosomes avec une mesure d'efficacité du flux autophagique.

L'évaluation de l'efficacité du flux autophagique peut être réalisée en utilisant des agents pharmacologiques activateurs ou inhibiteurs du flux. La bafilomycine A1 (bafA1) ou la chloroquine (CQ) et l'hydroxychloroquine (HCQ) sont de ces molécules potentiellement capables d'inhiber l'acidification des lysosomes mais surtout la fusion entre les lysosomes et les autophagosomes (Mauthe *et al.*, 2018). L'utilisation de ces molécules empêche la dégradation de LC3-II, entraînant son accumulation et permettant la distinction entre les deux scénarii précédents par comparaison de l'expression de LC3-II en présence ou non d'agent pharmacologique. L'accumulation de LC3-II en présence d'agent pharmacologique est alors un signe d'activation du flux autophagique quand un taux comparable entre les deux conditions signale un manque de dégradation de LC3-II et un flux autophagique non fonctionnel. L'utilisation d'inhibiteur de protéases lysosomales comme le E64d ou la pepstatine peuvent également être utilisés pour cette mesure (Mizushima, Yoshimori &

Levine, 2010). Cette première méthode d'évaluation peut également être couplée à la quantification du substrat de l'autophagie SQSTM1/p62 dont l'accumulation est un marqueur fiable de dysfonctionnement autophagique alors que l'activation du flux autophagique est caractérisée par une importante baisse de la quantité de cette protéine. Il est également possible de mesurer des changements dans le flux autophagique en calculant le ratio LC3-II / LC3-I depuis une quantification protéique par western blot mais cette technique est soumise à controverse en raison de la différence d'affinité des protéines avec l'anticorps et du taux variable d'expression de LC3-I et LC3-II en fonction de la lignée cellulaire étudiée (Barth, Glick & Macleod, 2010). A ce jour, la plus complète revue de la littérature sur le sujet est celle de Klionsky *et al.* (Klionsky *et al.*, 2021).

III.3. Aluminium, autophagie et inflammation

En tant que substance ayant des capacités immunostimulantes, l'Al est pris en charge par les cellules de l'immunité telles que les macrophages dans lesquels il peut être retrouvé internalisé (Shardlow, Mold & Exley, 2020). Après avoir été phagocyté par les macrophages ou les cellules dendritiques, l'Al se retrouve dans des vésicules d'endocytose et met en branle la machinerie autophagique qui permet la présentation des antigènes aux lymphocytes T (Li *et al.*, 2011).

Les adjuvants aluminiques sont des mélanges de particules nano et micrométriques dans des proportions variables. En effet, la concentration en Al dans les préparations semble jouer sur la taille des agglomérats formés (Crépeaux *et al.*, 2017) et donc potentiellement aussi sur le pourcentage de nanoparticules libres restantes en solution. Cette caractéristique leur confère à la fois les caractéristiques des particules, capables d'activer les cellules dendritiques *in vitro*, ce que les formes solubles du composé ne font pas (Shi, Evans & Rock, 2003), mais également celles des composés nanométriques.

Les particules microniques d'Al peuvent se lier avec une certaine force aux lipides de la membrane plasmique des cellules dendritiques et ce lien pourrait être le mécanisme d'activation de la phagocytose (Flach *et al.*, 2011). Ces particules sont alors généralement retrouvées dans des phagosomes puis des lysosomes où elles sont attaquées. Les nanoparticules inférieures à 20 nm, en revanche, ont la particularité de pouvoir être internalisées dans les cellules sans intervention de la machinerie d'endocytose (Edetsberger *et al.*, 2005). En effet, les nanoparticules peuvent franchir les membranes biologiques et entrer dans le cytoplasme cellulaire, ce que les particules plus imposantes ne peuvent pas faire (Holsapple *et al.*, 2005). La présence de nanoparticules au sein du cytoplasme force alors les cellules à activer l'autophagie pour tenter de séquestrer ces corps étrangers afin de les dégrader (Yokoyama *et al.*, 2011). Il a ainsi été montré que les nanoparticules induisent la présence d'un taux élevé de vacuoles autophagiques aussi bien en condition *in vitro* pour les cellules humaines ou animales qu'en condition *in vivo* (Stern & Johnson, 2008; Andón & Fadeel, 2013). Aussi la réponse autophagique cellulaire pourrait être dépendante de la taille des particules en présence (Seleverstov *et al.*, 2006; Chatterjee, Sarkar & Bhattacharya, 2014).

De plus, les objets de taille nanométrique acquièrent de nouvelles propriétés en raison de l'augmentation de leur rapport surface sur masse. Ces propriétés de surface uniques des nanoparticules pourraient également être la raison de leur potentielle toxicité (Arora, Rajwade & Paknikar, 2012). En effet, les nanoparticules peuvent être associées avec des molécules biologiques comme les phospholipides des membranes (De Jong & Borm, 2008). Cela pourrait expliquer la raison de la déstabilisation des lysosomes provoquée par la présence d'Al pouvant conduire à la rupture du lysosome dans le cytosol (Hornung *et al.*, 2008; Herd, Malugin & Ghandehari, 2011), à l'avortement du processus autophagique ainsi qu'à l'apparition d'une réaction inflammatoire via l'activation de l'inflammasome NALP3 ou NLRP3 (Hornung *et al.*, 2008; Lima *et al.*, 2013) même en l'absence de réel stimuli de danger (Kang & Locksley, 2009). En cas de libération des particules dans le milieu extracellulaire suite à la digestion de ces dernières ou suite à la mort cellulaire, ces particules pourraient être prises en charge par le système de drainage lymphatique, gagner le flux sanguin et de là, être transportées dans l'ensemble du corps et stockées dans divers organes et tissus tels que le cœur, le foie, les reins, la rate et le système nerveux central (Oberdörster *et al.*, 2005).

De plus, autophagie et inflammation sont deux mécanismes étroitement liés. En effet, si la présence d'Al induit la production de vacuoles autophagiques, comme exposé dans le paragraphe précédent, l'inflammasome est reconnu pour être un élément crucial de l'action adjuvante de l'Al (Martinon, Mayor & Tschopp, 2009). En effet, les composés exogènes tels que les PAMP ou les particules d'Al sont reconnus par les TLR et NLR comme étant indésirables. Cette détection active l'oligomérisation des protéines *NACHT*, *LRR*, and *PYD domains-containing protein 3* (NLRP3) entre elles, puis avec des protéines *apoptosis-associated speck-like protein containing a C-terminal caspase recruitment domain* (ASC), pour former l'inflammasome NLRP3 (Jo *et al.*, 2016; Schroder *et al.*, 2018; Mehto *et al.*, 2019). Une fois assemblé, l'inflammasome active la caspase-1 permettant la maturation et la libération de cytokines pro-inflammatoires, en particulier IL-1 β mais aussi IL-18, indispensables au bon déroulement de la réponse immunitaire (Martinon, Mayor & Tschopp, 2009; Mehto *et al.*, 2019). Or, la caspase-1 active également la Gasdemine-D, connue pour former des pores dans la membrane plasmique provoquant une forme de mort cellulaire appelée pyroptose (Fernandes-Alnemri *et al.*, 2007; Shi, Gao & Shao, 2017).

Une étude récente démontre que l'autophagie est impliquée comme moyen de régulation de l'inflammation via l'action de la protéine *immunity-related GTPase family, M* (IRGM) afin de limiter la mort cellulaire (Mehto *et al.*, 2019). En effet, en plus de réguler la réponse inflammatoire en limitant l'oligomérisation des protéines NLRP3 et ASC, IRGM permet également un adressage spécifique des composants de l'inflammasome vers les autophagosomes. En assurant la cohésion protéique, IRGM favorise la dégradation des composés inflammatoires par autophagie, réduit la réponse inflammatoire et améliore la survie cellulaire (Mehto *et al.*, 2019). Cependant, l'Al étant biopersistant, il semble peu probable que l'autophagie soit en mesure de réduire l'inflammation produite, plus encore si l'Al réduit les performances autophagiques par rupture de la membrane lysosomale (Hornung *et al.*, 2008).

En résumé, la taille des particules d'Al semble être un facteur décisif modifiant la prise en charge de ces dernières par les cellules de l'immunité, phagocytose pour les particules micrométriques et autophagie pour les particules nanométriques. De plus, les propriétés de liaison des particules d'Al avec les phospholipides des membranes biologiques semblent avoir des conséquences également dépendantes de la taille de ces particules, tantôt bénéfiques pour l'adjuvantité, tantôt néfaste pour l'accomplissement du mécanisme d'autophagie. Les particules d'Al semblent, qui plus est, former une boucle d'amplification de la réponse inflammatoire par activation de l'inflammasome NLRP3 et limitation du mécanisme de rétrocontrôle de cette inflammation pouvant conduire à la mort cellulaire par pyroptose.

Résumé d'étape :

Dans la partie précédente consacrée à l'autophagie, nous avons abordé les points suivants :

- L'**autophagie** est un mécanisme de **régulation de l'homéostasie** cellulaire primordial notamment pour le recyclage de composés obsolètes et le maintien de la **survie cellulaire**.
- Des **perturbations d'autophagie** ont été démontrées comme étant **impliquées** dans la survenue de nombreuses pathologies telles que des **cancers**, des **maladies neuro-dégénératives** et des **maladies inflammatoires**.
- Ce processus complexe fait intervenir de **nombreuses protéines** en interaction pour **séquestrer** des composés indésirables dans une **vacuole autophagosomale** afin de les détruire par fusion avec le **lysosome**.
- En tant que **processus dynamique**, le suivi de l'autophagie n'est pas aisé et nécessite de prendre des précautions quant à l'**interprétation** des résultats obtenus.
- **Aluminium, autophagie et inflammation** forment un ménage à trois délétère dans la mesure où :
 - l'**Al active** le processus **inflammatoire** et la production d'IL-1 β et d'IL-18,
 - le **processus inflammatoire** est **régulé** par l'**autophagie** afin de limiter la mort cellulaire par **pyroptose**,
 - les particules **d'Al** peuvent **impacter** le **processus autophagique** en se liant aux membranes lipidiques.

En complément de l'aspect scientifique développé dans cette section, une ouverture sur les l'aspect sociétal de l'utilisation des adjuvants aluminiques a été ajoutée en annexe de ce manuscrit. Les éléments qui y sont développés ne visent pas à alimenter la polémique sur la vaccination mais à replacer les connaissances scientifiques actuelles dans leur contexte pour faciliter la compréhension de ce sujet complexe.

OBJECTIFS

Le travail de thèse présenté ici a été développé à partir des données bibliographiques exposées précédemment selon le raisonnement suivant :

- La vaccination est une avancée majeure de la médecine moderne ayant permis d'éradiquer certaines maladies et d'endiguer la propagation de nombreuses autres.
- Les doses d'adjuvants aluminiques utilisées pour augmenter la réponse vaccinale garantissent leur efficacité sans que leur sécurité n'ait été évaluée.
- L'Al vaccinal peut être retrouvé chez les patients souffrant de MFM plusieurs années après la dernière vaccination contredisant les anciens dogmes vaccinaux stipulant que le dépôt d'Al était rapidement résorbé et éliminé.
- Les données animales suggèrent que l'Al injecté dans le muscle peut être déplacé via les macrophages au sein de l'organisme jusqu'à des organes distants comme le cerveau.
- L'autophagie est une voie naturelle d'élimination des pathogènes et des particules exogènes telles que l'Al au sein des cellules de l'immunité.
- L'OMS envisage un dysfonctionnement, génétique ou acquis, des macrophages comme cause possible de la MFM.
- Plusieurs patients ont reçus, lors de voyages à l'étranger, des traitements prophylactiques contre la malaria composés de molécules connues pour réduire l'activité autophagique.
- L'Al nano-particulaire utilisé dans les préparations vaccinales est lui-même capable de perturber l'autophagie.

Ce travail repose ainsi sur l'hypothèse majeure d'une diminution de la performance du processus autophagique chez les patients atteints de MFM, d'origine génétique et/ou environnementale, les prédisposant à une intolérance aux composés aluminiques utilisés dans les préparations vaccinales. Si l'Al ou une autophagie réduite ne semblent pas pathologiques de manière isolée, il est possible que la réunion de ces deux conditions, selon une combinaison « gène x environnement », conduise à une surcharge en Al au sein des macrophages. Ces cellules pourraient alors disséminer l'Al en se déplaçant dans l'organisme jusqu'à des organes éloignés de l'injection, comme le cerveau, où l'Al pourrait exercer ses propriétés neurotoxiques reconnues. Puisque l'autophagie semble être un point central dans le développement de la MFM, plusieurs questions se sont imposées et ont conduit aux expérimentations présentées dans la suite de ce manuscrit :

- La capacité autophagique des cellules immunitaires des patients MFM est-elle réellement réduite ?
- Un défaut d'autophagie conduit-il à une moins bonne élimination et une accumulation des particules aluminiques par les cellules immunitaires ?
- Est-il possible de modéliser chez l'animal un défaut d'autophagie proche de la situation présentée par les patients MFM ?
- Observe-t-on une différence de translocation des particules aluminiques entre des animaux présentant une perturbation du processus autophagique par rapport à des animaux présentant un phénotype sauvage ?

Ainsi les principaux objectifs de ce travail ont été i) d'évaluer les capacités autophagiques et la réponse inflammatoire à l'Al des cellules immunitaires de patients MFM et ii) de tester un traitement pharmacologique afin d'évaluer sur un modèle animal le devenir de particules d'Al injectées par voie IM.

Plusieurs approches et expérimentations ont été menées pour répondre au mieux aux différentes questions posées :

1) Une approche *in vitro* visant à évaluer l'autophagie basale et la réponse autophagique à l'Al des cellules immunitaires de patients MFM ainsi qu'une appréciation de la réponse inflammatoire de ces cellules à l'Al a été réalisée.

2) Une approche pharmacologique a ensuite été menée afin de simuler une perturbation de l'autophagie *in vivo* chez le modèle murin. Pour ce faire, un traitement pharmacologique a été appliqué à des animaux juvéniles ou adultes. Le développement moteur et sensoriel des animaux juvéniles a été étudié au cours des trois premières semaines de vie post-natale afin de s'assurer que le traitement ne perturbe pas la bonne mise en place du système nerveux chez les souriceaux. Le comportement individuel des animaux adultes a été évalué en termes de résistance à l'effort physique, d'activité locomotrice et d'anxiété afin de garantir l'absence d'effet négatif du traitement sur le comportement ou les performances physiques des animaux. L'analyse de l'efficacité du traitement a été réalisée par le dosage des protéines majeures de l'autophagie.

3) Finalement, une approche génétique a été étudiée pour évaluer la translocation des particules aluminiques au sein de l'organisme après une injection IM. Des souris présentant un *Knock Out* conditionnel sur l'un des gènes de l'autophagie ont été utilisées afin de suivre le devenir des particules aluminiques injectées dans le muscle et de comparer cette translocation à celle observée chez les animaux contrôles.

METHODOLOGIE

Cette section expose de manière détaillée la méthodologie utilisée lors des expérimentations réalisées dans ce travail de thèse. Le premier chapitre sera consacré à l'expérimentation *in vitro* visant à déterminer l'efficacité autophagique et la réponse inflammatoire à l'Al des cellules immunitaires de patients MFM afin d'évaluer l'implication de ce mécanisme dans l'intolérance à l'Al présentée par les patients MFM. Le second chapitre traitera des expérimentations *in vivo* avec une première partie sur l'utilisation d'un traitement pharmacologique, utilisé pour perturber l'autophagie chez un modèle murin, et une seconde partie sur un modèle génétique utilisé pour le suivi systémique des particules aluminiques d'origine vaccinale. Tous les produits utilisés dont la provenance n'est pas spécifiée ont été achetés chez Sigma Aldrich (Saint Quentin Fallavier, France).

I. Capacité autophagique et réponse inflammatoire *in vitro* des cellules immunitaires

Cette expérimentation a été réalisée afin de rendre compte du niveau autophagique basal ainsi que des réponses autophagique et inflammatoire au sein des cellules immunitaires de patients atteints de MFM. Dans un souci de limitation du nombre de variables pour maintenir une puissance statistique adéquate, cette analyse a été menée sur des prélèvements issus de femmes atteintes de MFM dans la mesure où le *sex-ratio* n'est pas équilibré et qu'une majorité de patients MFM sont des femmes. Des cellules primaires mononuclées de sang périphérique ou *peripheral blood mononuclear cells* (PBMC) issues de patientes MFM ou de donneuses saines ont été placées en culture et mises en présence d'adjuvant Al ou de vaccin total. Après traitement, l'internalisation des particules d'Al a été regardée en microscopie à fluorescence, le flux autophagique des cellules a été observé par western blot et le statut inflammatoire des cellules a été évalué par une analyse semi-quantitative d'un panel de cytokines dans le milieu de culture. Le résumé graphique de cette expérimentation est disponible **Figure 15 p. 176**.

I.1. Culture cellulaire

I.1.1. Obtention des cellules

Cette étude a été menée dans le respect des principes de la déclaration d'Helsinki et avec le consentement éclairé des participants. Huit patientes atteintes de MFM ont été recrutées par l'hôpital Henri Mondor en respectant les critères suivants : i) délais minimal entre la dernière vaccination et la biopsie musculaire attestant la présence de MFM supérieur à 18 mois, ii) présence d'arthro-myalgie depuis plus de 6 mois, iii) présence du EM/SFC depuis plus de 6 mois, iv) présence manifeste de troubles cognitifs. Les individus contrôles, de sexe féminin et d'âge équivalent aux patientes ont été prélevés par l'Établissement Français du Sang (EFS).

Les cellules primaires utilisées pour cette expérimentation ont été obtenues par centrifugation à gradient de densité sur coussin de sucrose afin de séparer les PBMC du sang périphérique.

Concrètement, les prélèvements sanguins ont été délicatement déposés sur un volume approprié de 15 ml de Ficoll Paque Plus (GE Healthcare, 17-1440-02, Pasching, Autriche) pour 30 ml de sang. La séparation mécanique des cellules en fonction de leurs densités a été obtenue par centrifugation durant 20 minutes à 500 g suivie d'une décélération lente. Après centrifugation, les PBMC forment un anneau blanchâtre à la surface de la solution de Ficoll. Cet anneau de PBMC a été récupéré et rincé en tampon phosphate ou *Phosphate Buffer Saline* (PBS) (Fisher Scientific, 14190-144, Illkirch, France) avant d'être remis en suspension à une concentration de vingt millions de cellules par millilitre dans une solution de congélation composée à 95 % de sérum de veau fœtal (SVF) (GE Healthcare, A15-151, lot A15112-0729, Pasching, Autriche) et 5 % de diméthylsulfoxyde (DMSO) (Santa Cruz, sc-358801, Heidelberg, Allemagne). La suspension cellulaire a ensuite été distribuée en cryotubes de 1 ml qui ont été congelés en CoolCell (Dutcher, CoolCell FX, Brumath, France) à -80 °C pour une durée minimale de 24 h avant d'être transférés en azote liquide jusqu'au jour de l'expérimentation.

I.1.2. Conditions de culture, adhérence et différenciation

Au début de l'expérimentation, les cellules ont été rapidement décongelées en *Dulbecco's Modified Eagle Medium* (DMEM) (Fisher Scientific, 11966-025, Illkirch, France) à 37 °C afin de diluer le DMSO toxique pour les cellules à cette température. Un lavage en PBS à 37 °C a été réalisé avant de remettre les cellules en suspension dans un milieu dit « d'adhérence » composé de milieu RPMI 1640 + Glutamax (Fisher Scientific, 61870-010, Illkirch, France) additionné de 1 % de pénicilline/streptomycine (Fisher Scientific, 15140-122, Illkirch, France) et 1 % de L-glutamine 200 mM (Fisher Scientific, 25030-024, Illkirch, France). Les cellules ont été mises en culture à une densité constante de quatre cent mille cellules par centimètre carré dans un millilitre de milieu de culture. Cette densité cellulaire optimale a été déterminée par des expérimentations préliminaires non présentées évaluant la survie cellulaire, le changement morphologique et la quantité protéique récupérable après culture dans diverses conditions de densité/volume/traitement. Les cellules utilisées pour l'observation de la phagocytose des particules aluminiques ont étéensemencées sur lame Ibidi à 4 puits (Ibidi, 80446, Gräfelfing, Allemagne) et celles destinées à la mesure du flux autophagique et de la réponse inflammatoire ont étéensemencées sur des plaques de cultures à 24 puits (Costar, 3524, Corning, NY, USA). Les cultures cellulaires ont été placées en étuve à 37 °C sous 5 % de CO₂ durant 3 h afin de faire adhérer les cellules.

Après 3 h d'adhérence, le milieu d'adhérence a été délicatement retiré et remplacé par du milieu dit « de différenciation » à 37 °C, composé de milieu RPMI 1640 (ATCC modification) (Fisher Scientific, A10491-01, Illkirch, France) additionné de 1 % de pénicilline/streptomycine, 10 % de SVF et 0,1 % de M-CSF (*monocyte colony-stimulating factor*) et GM-CSF (*Granulocyte Macrophage Colony Stimulating Factor*) humaines à 10 ng/ml (Peprotech, respectivement 300-25 et 300-03, Neuilly-sur-Seine, France). Le prétraitement de M-CSF/GM-CSF à 10 ng/ml a été maintenu durant 6 jours en étuve à 37 °C sous 5 % de CO₂. Au sixième jour, 50 % du milieu de culture a été remplacé par du milieu de

différenciation à 37 °C, fraîchement préparé. Les cultures ont ensuite été replacées à l'étuve pour une utilisation le septième jour.

I.1.3. Exposition des cellules aux particules métalliques

Après une semaine de prétraitement, les cellules ont été exposées à l'Al sous différentes formes. Les cellules utilisées pour l'observation de la phagocytose des particules aluminiques ont été mises en contact avec une solution d'AH commerciale, l'alhydrogel[®] (Invivogen, vac-alu-250, Toulouse, France), préalablement marqué par du lumogallion ou [acide 4-chloro-3-(2,4-dihydroxyphenylazo)-2-hydroxybenzene-1-sulphonique] (SantaCruz, sc-295368, Heidelberg, Allemagne), un fluorochrome réagissant à la présence d'aluminium en formant un complexe fluorescent à 590 nm après excitation à 500 nm. Cette solution, appelée Al-lumo, a été obtenue d'après une méthodologie publiée (Mile *et al.*, 2015) en incubant une dilution d'AH à 5 mg/ml d'Al avec du lumogallion à 50 µM durant une nuit sous agitation douce. L'Al-lumo a été récupéré après centrifugation 10 min à 14 000 g puis remis en suspension dans du RPMI 1640 (ATCC modification) et stérilisé sous poste de sécurité microbiologique (PSM) par filtration à 0,2 µm. La solution d'Al-lumo a été gardée à + 4 °C et à l'abri de lumière jusqu'à utilisation. Les cellules utilisées pour la mesure du flux autophagique et l'évaluation de la réponse inflammatoire ont été traitées avec l'AH commercial ou un vaccin complet (Engerix B[®], GSK).

Après une semaine en milieu de différenciation, les cellules mises en culture sur lame Ibidi[®], ont été mises en contact avec de l'Al-lumo à une concentration finale de 50 µg/ml d'Al pour une durée de 4 h en étuve à 37 °C sous 5 % de CO₂. Une heure avant la fin du traitement, les cellules ont été mises en présence de Hoechst 33342 et de LysoTracker[™] Green DND-26 (Life Technology SAS, respectivement H3570 et L7526, Courtaboeuf, France). Ces sondes permettent l'observation du noyau des cellules vivantes et la présence de lysosomes dans le cytoplasme attestant de la dynamique autophagique dans les cellules.

A la fin des sept jours de prétraitement, les cellules utilisées pour la mesure du flux autophagique et l'évaluation de la réponse inflammatoire ont été traitées avec l'AH commercial ou le vaccin complet à une concentration finale de 50 µg/ml d'Al pour une durée de 4 h en étuve à 37 °C sous 5 % de CO₂ avec ou sans modulateurs de l'autophagie. Les cellules traitées avec les modulateurs de l'autophagie ont été mises en contact avec de la CQ (C66628 – 100 µM) afin d'inhiber l'autophagie dans sa dernière phase ou de la rapamycine (Rapa, R8781 – 100 nM) afin d'activer le processus. Les modulateurs de l'autophagie ont été déposés 1 h avant le traitement à l'Al et durant toute la durée de ce dernier afin d'améliorer l'interprétation des résultats en western blot en terme de flux autophagique (Klionsky *et al.*, 2021).

I.2. Observation de la phagocytose des particules métalliques

I.2.1. Équipement et prise de vue

En fin de traitement, les lames Ibidi ont été observées en microscopie à contraste de phase et en fluorescence sur un microscope Zeiss Axio Observer Z1 équipé d'une enceinte thermostatée avec un objectif X63. La détection du signal Hoechst a été effectuée avec le set de filtres 49 (Carl Zeiss S.A.S, 488049-9901-000, Marly le Roi, France) comprenant un filtre d'excitation G 365 nm, un miroir dichroïque FT 395 nm et un filtre d'émission BP 445/50 nm. La fluorescence du LysoTracker a été imagée avec le set de filtres 38HE (Carl Zeiss S.A.S, 489038-9901-000, Marly le Roi, France) comprenant un filtre d'excitation BP 470/40 (HE), un miroir dichroïque FT 495 (HE) et un filtre d'émission BP 525/50 (HE). Enfin le signal issu du complexe Al-lumo a été observé avec le set de filtres 43HE (Carl Zeiss S.A.S, 489043-9901-000, Marly le Roi, France) comprenant un filtre d'excitation BP 550/25 (HE), un miroir dichroïque FT 570 (HE) et un filtre d'émission BP 605/70 (HE).

Un minimum de 10 prises de vue a été réalisé pour chaque condition et chaque individu afin de garantir l'analyse finale d'une cinquantaine de cellules. Les clichés ont été pris par une caméra Zeiss AxioCam MRm présentant une définition de 1388x1040 pixels, une résolution de 96 ppi et un codage sur 16 bits. Le temps de pose utilisé avec chaque set a été arrêté de manière à obtenir un signal visible mais peu intense afin de réduire au maximum la détection du bruit de fond diffus. Ce temps de pose a été maintenu constant pour l'ensemble des prises de vues de l'expérimentation afin de permettre la comparaison des images entre individus. Les images des différents canaux ont été enregistrées indépendamment sous format TIFF afin de pouvoir être analysées de manière individuelle. L'échelle des images a été enregistrée automatiquement dans les métadonnées afin de pouvoir effectuer des mesures lors de l'analyse.

I.2.2. Quantification de fluorescence

Les prises de vues ont été analysées sur le logiciel Icy (V 2.1.4.0 BioImage Analysis unit, Institut Pasteur, France) (de Chaumont *et al.*, 2012). De façon détaillée, la prise de vue en contraste de phase a été utilisée afin de définir précisément l'emplacement des cellules grâce au *plug in* Active Cells 2.7 (Delgado-Gonzalo *et al.*, 2015) intégré au logiciel. Ce *plug in* permet la manipulation de formes ellipsoïdales afin d'épouser au mieux au contour des cellules. Ces zones d'intérêts ont ensuite été reportées sur les trois images réalisées en fluorescence. Le signal Hoechst a été utilisé afin de vérifier la viabilité des cellules analysées. La fluorescence des cellules dans les canaux LysoTracker et Lumogallion a été calculée par addition de l'intensité de chaque pixel composant la zone d'intérêt. En parallèle, la surface de la zone en μm^2 a également été relevée afin de normaliser la somme de l'intensité de fluorescence par la taille de la cellule. Cela permet l'obtention d'une intensité moyenne par μm^2 et de s'affranchir des différences de fluorescence dus aux différences de taille des cellules.

Pour chaque prise de vue, le nombre de cellules analysées, la surface de chacune des cellules et la somme de fluorescence de LysoTracker et de Lumogallion ont été enregistrés. Pour chaque individu, le nombre de cellules, la surface minimale, moyenne et maximale de chaque cellule a été notée et la fluorescence normalisée par μm^2 de LysoTracker et de Lumogallion a été calculée.

I.3. Mesure du flux autophagique

I.3.1 Extraction protéique

Après traitement, le milieu de culture a été récupéré pour l'évaluation de la réponse inflammatoire, détaillée dans le paragraphe suivant. Après récupération du milieu de culture, les cellules ont été rincées deux fois en PBS froid avant d'être lysées dans 100 μl de tampon de lyse TR3 préalablement chauffé à 95 °C. Ce tampon est une solution aqueuse de sodium dodécyl sulfate (SDS) (L-5750 - 170 mM), disodium phosphate (1065761000 - 10 mM), sodium orthovanadate (S6508 - 1 mM), β -glycérophosphate (G9422 - 10 mM), sodium pyrophosphate tetrabasique (P8010 - 2,5 mM) et sodium fluoride (201154 - 50 mM) + 10 % glycerol (G6279) additionnée de cOmplete™ Mini Protease Inhibitor Cocktail (11836153001). Les lisats cellulaires ont été obtenus par homogénéisation à la P200 puis récupérés en tube afin d'opérer une sonication de 10 sec permettant de détruire l'ADN présent et d'augmenter la fluidité des échantillons. La concentration protéique a été mesurée en utilisant le kit BCA Pierce™ BCA Protein Assay Kit (Fisher Scientific, 23225, Illkirch, France) puis les échantillons ont été normalisés à une concentration de 1 mg de protéine par millilitre en solution de Leammi. Cette solution est composée d'un tampon TrisHCl (T-5941 - 200 mM), d'un colorant (bleu de bromophénol - 0,02 %) permettant de voir la progression de l'échantillon dans le gel, de glycérol (G6279 - 9 %) pour alourdir l'échantillon et faciliter son dépôt et d'un mélange de SDS (L-5750 - 2 %) et de DTT (1,4-dithiothreitol, *threo*-1,4-Dimercapto-2,3-butanediol, D0632 - 100 mM) permettant la dénaturation des protéines par réduction des ponts dissulfures et le chargement négatif des protéines par l'application d'une température de 95 °C durant 5 min.

I.3.2. Quantification des protéines majeures de l'autophagie

La quantité des protéines LC3-I, LC3-II, SQSTM1/p62, Rubicon et IRGM a été évaluée par western blot. La migration a été réalisée dans une cuve Mini Gel Tank (Life Technology SAS, A25977, Courtaboeuf, France) avec un tampon de migration Bolt™ MES SDS Running Buffer (20X) (Invitrogen™, B0002, Illkirch, France) et des gels précoulés Bolt™ 4-12 % Bis-Tris Mini Protein Gel à 15 puits (Invitrogen™, NW04125BOX, Illkirch, France). Les échantillons ont été déposés à quantité constante de 14 μg de protéine et soumis à une tension de 180 V jusqu'à migration complète du marqueur bleu hors du gel.

Les protéines ont été transférées sur membrane de polyfluorure de vinylidène (PVDF) par utilisation d'un système de transfert semi-sec iBlot2 Dry Blotting System (Fisher Scientific, IB21001, Illkirch, France) et de kits de transfert iBlot™ 2 Transfer Stacks (Invitrogen™, IB24002, Illkirch, France). Après transfert, un marquage des membranes au rouge Ponceau a permis le contrôle de la présence de protéines sur la membrane avant marquage par des anticorps.

Une saturation des membranes en solution de gélatine de poisson (Sigma, G7765, Merck, Darmstadt, Allemagne) à 2,5 % a été réalisée afin de limiter le marquage aspécifique des anticorps. Après saturation, des anticorps primaires anti-LC3B (1:1,000; Life Technology, PA1-46286, Courtaboeuf, France), anti-SQSTM1/p62 (1:3,000; Life Technology, PA5-20839, Courtaboeuf, France), anti-Rubicon (1:1,000; Ozyme, 8465S, Saint-Cyr l'école, France) ou anti-IRGM (1:1,000; Abcam, ab69495, Amsterdam, Pays-Bas), tous produit chez le lapin, ont été déposés *overnight* à 4 °C. Après le marquage primaire, les membranes ont été lavées puis mises à incuber avec un anticorps secondaire anti-rabbit produit chez la chèvre et couplé à la peroxydase de raifort (HRP) (1:5,000; Santa Cruz, SC-2054, Heidelberg, Allemagne). Une protéine de ménage a été marquée par un anticorps primaire de souris anti-béta-actine pré-couplé à la HRP (1:10,000; Santa Cruz, SC-47 778 HRP, Heidelberg, Allemagne) afin de normaliser les résultats obtenus.

Les résultats de marquage ont été révélés par chimioluminescence avec une solution de révélation (SuperSignal™ West Femto; Fisher scientific 34096, Illkirch, France). Les prises de vues des membranes ont été réalisées dans une Azure C600 (Azure Biosystems, Inc., Dublin, Ohio, USA). Les images produites ont été analysées par le logiciel ImageJ (V1.53i Wayne Rasband and contributors, National Institute of Health, USA) (Schneider, Rasband & Eliceiri, 2012) intégré au logiciel Icy (V 2.1.4.0 BioImage Analysis unit, Institut Pasteur, France) (de Chaumont *et al.*, 2012). La quantification de chaque protéine par l'option Gel Analyzer a été normalisée par la quantification de béta-actine afin de pouvoir comparer les différents échantillons entre eux.

I.4. Évaluation de la réponse inflammatoire

I.4.1. Principe

Un panel de 11 cytokines pro et anti-inflammatoires communes ou déjà analysées dans des études antérieures (IL-1 β , IL-6, IL-8, IL-10, IL-12p40, IL-18, CXCL1, CCL2, CCL4, TGF β et TNF- α) a été dosé par la méthode semi-quantitative de dot-blot. Cette méthode repose sur le même principe que le test ELISA en sandwich avec des anticorps de capture des protéines d'intérêts pré-couplés à une membrane sous forme de spots circulaires et des anticorps de marquage déposés sur les protéines capturées. Les membranes utilisées ont donc été créées et commandées sous forme de kit pour cette expérimentation (CliniSciences, RayBio Custom C-Series Human Cytokine Antibody, Nanterre, France). Cette méthode permet le dosage de plusieurs protéines en suspension dans le milieu de culture cellulaire de façon simultanée sans recourir à une séparation physique des protéines avant marquage.

I.4.2. Quantification des cytokines

Après traitement, le milieu de culture des cellules traitées avec de l'AH ou du vaccin complet sans modulateur de l'autophagie, a rapidement été récupéré et traité avec des anti-protéases cOmpleteTM Mini Protease Inhibitor Cocktail (11836153001) afin de limiter la dégradation potentielles des cytokines présentes. Les membranes de dot-blot ont été saturées en suivant le protocole fournisseur puis les échantillons ont été incubés *overnight* à 4 °C sous agitation douce. L'incubation de la solution protéique sur les membranes a permis de fixer chaque protéine au niveau de ses anticorps de capture spécifiques. Une solution d'anticorps de marquage fourni dans le kit a ensuite été déposée afin de produire un marquage HRP commun à toutes les protéines. Des témoins positifs disposés sur les membranes ont été utilisés comme normalisateurs.

Les signaux ont été révélés par chimioluminescence avec la solution de détection présente dans le kit. Les membranes ont été imagées sur Chemidoc MP Imager (BioRad, Nanterre, France). Les images produites ont été analysées par le logiciel Icy (V 2.1.4.0 BioImage Analysis unit, Institut Pasteur, France) (de Chaumont *et al.*, 2012). Une matrice a été réalisée par positionnement de zones d'intérêt circulaires sur les zones de marquage potentiel de l'ensemble de chaque membrane. Le *plug in* Active Contours (Dufour *et al.*, 2011) intégré au logiciel a ensuite été utilisé dans sa configuration native afin d'automatiser et de standardiser la détection des spots de chimioluminescence. La moyenne des signaux obtenus pour chaque cytokine a été normalisée par la moyenne des contrôles positifs incorporés aux membranes.

II. Études *in vivo*

II.1. Évaluation d'un traitement pharmacologique perturbant l'autophagie (Masson et al., 2020)

Cette expérimentation a été menée afin de tester la faisabilité technique d'une inhibition autophagique à long terme par un traitement pharmacologique chez des souris de type sauvage, adultes ou juvéniles. Pour cela, des injections adaptées d'un calendrier prophylactique humain ont été réalisées par voie IP. À différents temps après le début de l'expérimentation, des analyses ont été menées afin d'attester de l'accumulation du composé pharmacologique dans le sérum des animaux, de l'efficacité du traitement ainsi que de l'absence d'effets néfastes tant sur le développement sensori-moteur de souris juvéniles que sur le comportement individuel de souris adultes. Le résumé graphique de cette expérimentation est disponible **Figure 29 p. 199**. Cette étude a fait l'objet d'un article publié en 2020, dont s'inspire la section suivante (cf Publication 1, section valorisation scientifique (Masson *et al.*, 2020)).

II.1.1. Animaux

L'évaluation du traitement pharmacologique a été réalisé chez des souris femelles et mâles de souche C57BL/6JRj en provenance de chez Janvier Labs (Saint Berthevin, France). Une étude sur une cohorte d'animaux adultes a été conduite avec des animaux en provenance directe du fournisseur et une seconde étude sur une cohorte d'animaux juvéniles a été menée sur des animaux nés à l'animalerie de parents achetés auprès du même fournisseur. Les procédures utilisées quant à la manipulation des animaux ont respecté les recommandations de la directive européenne du 22 septembre 2010 concernant l'expérimentation animale (2010/63/UE) et ont été approuvées par le comité d'éthique de l'École Nationale Vétérinaire de Maisons-Alfort (Autorisations n° APAFIS#9767-2017042116187889 du 21 novembre 2017 et APAFIS#11633-2017100309523784 du 6 avril 2018).

II.1.1.1. Conditions d'hébergement

A leur arrivée dans les locaux, les animaux faisant partie de la cohorte adulte, reçus âgés de 7 semaines, ont été répartis dans des cages d'habitation à raison de 5 animaux du même sexe par cage. Les animaux ont été marqués individuellement afin de permettre leur identification. Avant toute expérimentation, une période de stabulation de 7 jours a été respectée afin de permettre aux animaux de s'acclimater aux conditions de température (22 ± 2 °C) et d'humidité (55 ± 10 %) de l'animalerie. Un cycle lumineux standard a été mis en place (lumière allumée de 7 h à 19 h). La nourriture (Granovit AG, Kaiseraugst, Suisse) et l'eau étaient disponibles *ad libitum* sur toute la durée de l'étude. Après la période de stabulation, les animaux ont été répartis aléatoirement dans les différents groupes de traitement. Le jour de la première injection du composé pharmacologique par voie IP a été noté *Day 1* (D1). Les

groupes expérimentaux étaient formés de 5 animaux par genre et par traitement pour chaque point de prélèvement (D3, 73 et 136). Les effectifs et la composition des groupes sont récapitulés dans le **Erreur ! Source du renvoi introuvable.** Les animaux ont été pesés de manière hebdomadaire durant toute la durée de l'expérimentation.

II.1.1.2. Élevage des animaux reproducteurs

Les animaux reproducteurs à l'origine des souriceaux utilisés dans la cohorte juvénile ont été commandés auprès du même fournisseur. A leur arrivée au laboratoire, les femelles de 7 semaines ont été réparties dans des cages d'habituation à raison de 5 animaux par cage alors que les mâles, anciens reproducteurs, âgés de 8 mois ont été maintenus dans des cages individuelles durant toute la durée de la stabulation. Un marquage individuel a permis l'identification de chaque animal. Comme pour les animaux adultes, une période de 7 jours a été respectée avant toute expérimentation afin de permettre aux animaux de s'acclimater aux conditions de température (22 ± 2 °C) et d'humidité (55 ± 10 %) de l'animalerie. Un cycle lumineux standard a été mis en place (lumière allumée de 7 h à 19 h). La nourriture (Granovit AG, Kaiseraugst, Suisse) et l'eau étaient disponibles *ad libitum* sur toute la durée de l'étude. A l'issue de la période de stabulation, les femelles ont été mises en accouplement à raison de 2 femelles par mâle, dans la cage du mâle. Les femelles sont restées en contact avec le mâle jusqu'à observation manifeste de signes de gestation puis ont été isolées en cage individuelle. Le jour de naissance des souriceaux a été noté *Post Natal Day 0* (PND0). Ce jour-là, les portées ont été réduites à 6 souriceaux. L'identification individuelle, le sexage et le suivi des jeunes ont commencé à PND3. Les souriceaux ont alors été répartis aléatoirement dans un des 5 groupes de traitement afin d'obtenir l'effectif le plus harmonieux par genre et par traitement pour chaque point de prélèvement (PND11, 26, 73 et 136). L'organisation de ces effectifs est récapitulée dans le **Erreur ! Source du renvoi introuvable.** Les animaux ont été pesés quotidiennement entre PND3 et PND25, puis deux fois par semaine jusqu'à l'âge de 2 mois et enfin de manière hebdomadaire jusqu'à la fin de l'expérimentation. Les jeunes ont été maintenus avec leur mère jusqu'au sevrage à PND28, mâles et femelles d'une même portée ont alors été séparés dans des cages d'élevage pouvant contenir jusqu'à 5 animaux. Les procédures utilisées quant à la manipulation des animaux ont été approuvées par le comité d'éthique de l'École Nationale Vétérinaire de Maisons-Alfort (Autorisations n° APAFIS#13038-2018011509088600 du 23 août 2018).

II.1.1.3. Effectifs

Pour ces expérimentations, la cohorte adulte était constituée de 60 mâles et 60 femelles âgés de 8 semaines en début d'expérimentation, soit 15 animaux de chaque genre pour chaque traitement (**Erreur ! Source du renvoi introuvable.**). Ces 15 animaux correspondent à un effectif de 5 individus à chacun des trois points de prélèvement D3, 73 et 136.

Les dosages et analyses histochimiques ont été réalisées sur l'ensemble des animaux de la cohorte soit un effectif de 5 animaux par genre, par traitement et par point de prélèvement.

Les tests de comportement individuel ont été réalisés sur 40 animaux soit 5 animaux par genre et par traitement pour chacun des temps D73 et D136.

La cohorte juvénile a été constituée à partir de 14 souris mâles et 28 femelles adultes ayant donné naissance à 280 souriceaux. Le groupe témoin a été composé de 28 femelles et 28 mâles afin de respecter un effectif final de 7 souriceaux par genre, par traitement et par point de prélèvement.

Comme pour la cohorte adulte, les analyses histochimiques ont été réalisées sur un effectif de 5 animaux par genre, par traitement et par point de prélèvement.

Les tests sensorimoteurs ont été appliqués à l'ensemble des souriceaux jusqu'à PND11. 210 animaux ont été testés sur l'ensemble du panel de test sensori-moteur jusqu'à PND26.

Le comportement maternel a été évalué sur l'ensemble des 28 femelles pour chacune de leurs portées, les femelles ayant eu jusqu'à 3 portées pour constituer l'ensemble de la cohorte.

Le comportement individuel adulte a été évalué sur un effectif global de 7 animaux par genre et par traitement pour les points de prélèvement PND73 et PND136 (voir **Erreur ! Source du renvoi introuvable.**).

Tableau 10 : Distribution des animaux dans les différents groupes de traitement pour les cohortes adultes et juvéniles

	Cohorte juvénile										Cohorte adulte							
	Groupe (mg HCQ/kg)										Groupe (mg HCQ/kg)							
	0		15		30		50		70		0		30		50		70	
	mâles	femelles	mâles	femelles	mâles	femelles	mâles	femelles	mâles	femelles	mâles	femelles	mâles	femelles	mâles	femelles	mâles	femelles
Nombre d'animaux	28	28	30	26	28	28	28	28	27	29	15	15	15	15	15	15	15	15
Nombre de portées	27	28	29	26	28	28	28	28	26	28								
Nombre de souriceaux par portée	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6								
Nombre d'animaux testés jusqu'à PND25	21	21	23	19	21	21	21	21	20	22								
Nombre de portées testées jusqu'à PND25	21	21	22	19	21	21	21	21	19	21								
Nombre d'animaux testés à PND73	7	7	9	6	7	7	7	7	6	8	5	5	5	5	5	5	5	5
Nombre de portées testées à PND73	7	7	9	6	7	7	7	7	6	7								
Nombre d'animaux testés à PND136	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7								
Nombre de portées testées PND136	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7	5	5	5	5	5	5	5	5
Période d'évaluation du développement sensori-moteur	PND3 à PND26																	
période d'évaluation du comportement individuel à l'âge adulte	La semaine précédant PND73 et PND136										La semaine précédant D73 et D136							
Points de prélèvement	PND11 ; PND26 ; PND73 ; PND136										D3 ; D73 ; D136							

D : Day (jour d'expérimentation de la cohorte adulte)

PND : Post Natal Day (jour d'expérimentation de la cohorte juvénile)

II.1.2. Exposition à l'hydroxychloroquine

Dans ce travail, nous avons choisi, pour plusieurs raisons évoquées ci-après d'évaluer la faisabilité technique d'un traitement pharmacologique pour perturber l'autophagie des souris sur une période prolongée. Il nous est apparu, lors de la conception du protocole de ces études, que les modèles génétiques existant n'étaient pas nécessairement les plus adaptés pour répondre aux questions posées. En effet, les modèles génétiques les plus communs d'inactivation de gènes *Atg* présentent des désavantages flagrants incompatibles avec les expérimentations envisagées. Sur l'ensemble des gènes contrôlant l'autophagie, 14 ont été invalidés chez la souris. Cependant, étant donné l'importance du processus au sein de l'organisme, beaucoup de ces modèles ne sont pas viables, les animaux produits mourant *in utero* ou après quelques jours de vie et interdisant de fait des études sur une durée prolongée. Les animaux viables, quant à eux, peuvent présenter des phénotypes anormaux pouvant interférer avec les expérimentations envisagées (Kuma, Komatsu & Mizushima, 2017). Par exemple, les souris déficientes pour les gènes *Atg5* et *Atg7* ne sont pas viables au-delà de quelques jours. Lorsque cette déficience est cantonnée aux seules cellules de la lignée myéloïde, les souris *Atg7* CKO présentent une déficience de l'élagage synaptique se traduisant par des troubles du comportement social des jeunes animaux (Kim *et al.*, 2017) alors que les souris *Atg5* CKO présentent une accumulation protéique anormale au niveau des neurones, accompagnée d'une neuro-dégénération progressive et d'un déficit de la fonction motrice (Hara *et al.*, 2006).

II.1.2.1. Choix du composé pharmacologique

L'hydroxychloroquine (HCQ), utilisée pour l'ensemble de cette étude a été sélectionnée pour plusieurs raisons. La plus importante étant que cette molécule est couramment citée comme inhibiteur de l'autophagie à utiliser comme contrôle positif lors de l'évaluation du flux autophagique (Klionsky *et al.*, 2021). En effet, la HCQ est une base faible diprotique, totalement soluble et attirée par les compartiments acides, la molécule est dite « lysosomotrope », c'est-à-dire qu'elle a une affinité pour les lysosomes dont elle va perturber l'action. Sous sa forme non protonée, elle a la capacité de franchir les membranes cellulaires. Une fois dans le lysosome, son caractère diprotique lui permet de désacidifier le compartiment lysosomal par captation de deux protons (Al-Bari, 2015). La désacidification peut avoir deux conséquences : soit la fusion avec un autophagosome n'aura pas lieu (Kaufmann & Krise, 2007; Mauthe *et al.*, 2018), soit la fusion aura lieu, mais l'autophagolysosome qui en résulte ne verra pas son pH diminuer de manière suffisante à assurer l'action des hydrolases acides. Dans les deux cas, le mécanisme autophagique ne sera pas en mesure d'assurer sa fonction normale de détoxification.

La HCQ, comme la CQ, sont deux composés utilisés comme traitement curatif ou préventif contre la malaria sous forme de comprimés vendus sous les noms commerciaux Plaquenil, Axemal, Dolquine et Quensyl. La HCQ possède des propriétés anti-inflammatoires utilisées pour le traitement de la polyarthrite rhumatoïde et du lupus érythémateux. Cette molécule est

largement utilisée en médecine moderne et très étudiée, notamment en cancérologie ou dans le cadre du traitement du Covid-19. Or un certain nombre de patients atteints de MFM ont reçu ce type de traitement pour prévenir de la malaria lors de voyages à l'étranger. L'intérêt de ce composé est la réversibilité de son action dès l'arrêt du traitement par simple action de la pompe à protons des lysosomes où la HCQ s'est accumulée. Cependant, la dose à administrer aux animaux doit être sélectionnée avec soin car la CQ comme la HCQ sont des composés toxiques dont la surdose est impliquée dans l'apparition de troubles tels que des myopathies vacuolaires (Jiang *et al.*, 2014; Nalbandian *et al.*, 2015), rétinopathies (Rabin & Ramirez, 2019), cardiomyopathies et neuromyopathies (Al-Bari, 2015). La HCQ diffère de la CQ par un unique groupe hydroxyle mais cette subtile différence permet au composé d'être trois fois moins toxique que son homologue (McChesney, 1983; Wolf, Wolf & Ruocco, 2000).

II.1.2.2. Protocole d'exposition et doses choisies

Le protocole d'exposition à la HCQ a dû être adapté de la bibliographie existante car aucune étude de cette durée n'a pu être trouvée avec un protocole opérationnel dans la littérature. En effet, de nombreuses études ont utilisé une injection unique afin d'observer les effets produits quelques heures après cette injection (Iwai-Kanai *et al.*, 2008; Haspel *et al.*, 2011; Vodicka *et al.*, 2014). Les études plus longues se sont étendues sur plusieurs jours ou semaines et n'ont pas dépassé 8 semaines, au maximum (Jiang *et al.*, 2014; Nalbandian *et al.*, 2015). Les injections ont alors été réalisées de manière quotidienne ou 5 jours par semaine. Cependant, la HCQ peut avoir une durée de demi-vie plasmatique très variable en fonction de la dose reçue, pouvant aller jusqu'à 50 jours (Ochsendorf, 2010). Il nous est alors paru possible de mettre en place un calendrier d'injection plus léger afin de ne pas nuire aux animaux tout en maintenant la dose globale injectée. Notons que la HCQ peut être administrée par voie IP ou par gavage des animaux. Le gavage n'a pas été envisagé afin de réduire au maximum le stress des animaux, qui pourrait nuire à leurs performances lors des tests comportementaux réalisés et parce que les animaux juvéniles sont trop petits pour envisager cette méthode sans risque.

Chez la souris, CQ et HCQ ont été utilisées à des doses variables, comprises entre 10 et 80 mg/kg. Un traitement à 10 mg/kg de CQ en 5 injections IP par semaine sur 8 semaines (soit un total de 50 mg hebdomadaire) permet de bloquer l'autophagie mais endommage les muscles des souris (Jiang *et al.*, 2014). En effet, les composés peuvent induire des crises chez les individus prédisposés et causer une myotoxicité due à l'accumulation de la drogue dans les vacuoles des myofibrilles des muscles striés. Cette myopathie, qui affecte les muscles proximaux et peut être accompagnée d'une neuropathie périphérique est habituellement résolue avec l'abandon du traitement (Rodriguez-Caruncho & Bielsa Marsol, 2014). D'un autre côté, un traitement moins intensif pourrait ne pas bloquer l'autophagie car l'activité musculaire a la capacité de restaurer l'activité autophagique inhibée par la chloroquine (Jiang *et al.*, 2014). Une dose de 60 mg/kg de CQ est nécessaire pour perturber l'autophagie hépatique en une seule injection chez l'animal adulte (Haspel *et al.*, 2011) et le seuil maximal permettant de ne pas induire de rétinopathie semble être de 7,8 mg/kg de HCQ chez l'homme

soit une équivalence de 96 mg/kg chez la souris (Mackenzie, 1983). De plus l'inhibition de l'autophagie chez les très jeunes animaux est délétère sur le plan énergétique notamment au niveau du foie et du cœur, ce qui conduit généralement à une mort précoce (Kuma *et al.*, 2004). Le choix de la dose de composé à utiliser n'est donc pas un choix évident découlant de données bibliographiques étant donné les différences de cinétique interindividuelle et organe dépendant de la HCQ (Vodicka *et al.*, 2014) et le manque de données sur la cinétique de ce composé à long terme.

Afin de pallier à ce manque d'information, nous avons choisi de reproduire chez la souris, le calendrier prophylactique humain contre la malaria. Ce calendrier produit par le CDC recommande la prise hebdomadaire de deux comprimés de 200 mg de Plaquenil® (Sanofi-Aventis, Gentilly, France), contenant 155 mg de HCQ pour un adulte. Ce traitement est habituellement maintenu sur la durée d'exposition potentielle à la maladie et peut-être prolongé en cas de besoin avec cependant une recommandation d'examen oculaire en cas de traitement supérieur à 5 ans.

Considérons le poids moyen d'un homme à 75 kg. Cet homme reçoit un total hebdomadaire de HCQ de 310 mg soit une dose d'environ 4,1 mg/kg de poids corporel. A ce chiffre s'applique une correction allométrique permettant d'extrapoler la dose équivalente chez la souris ($\times 12,3$). Ce facteur de correction, issu des pratiques vétérinaires, reflète les différences de métabolisme entre différentes espèces par la comparaison de leurs surfaces corporelles (Sharma & McNeill, 2009). La dose équivalente à la dose humaine applicable aux souris pour prendre en compte leur différence de métabolisme est donc d'environ 50 mg/kg de poids corporel. Cette dose étant tout à fait cohérente avec les études faites chez les rongeurs sur des temps plus courts, celle-ci a été conservée comme dose de référence. Une dose supérieure de 70 mg/kg a été déclinée de la dose de référence afin de pallier à une éventuelle résistance des souris au traitement. Deux doses inférieures, 30 et 15 mg/kg ont également été produites afin de prévenir d'éventuels dommages si les animaux devaient se montrer particulièrement sensibles au traitement, en particulier la dose 15 mg/kg développée pour l'étude des souriceaux, potentiellement plus sensibles que les animaux adultes puisque pas encore totalement développés. Les solutions injectées aux animaux ont été préparées le jour même de l'injection, à partir de poudre de Paquenil® diluée dans du sérum physiologique, après avoir pesé les animaux afin d'adapter la concentration en HCQ pour injecter un volume constant de 25 μ l, entre PND6 et PND21, 100 μ l entre PND22 et PND35 puis 200 μ l pour les souris adultes.

Un calendrier d'injection à fréquence dégressive a été mis en place afin de limiter le nombre d'injections totale reçues par les animaux, pour des raisons éthiques, tout en maintenant les conditions les plus favorables possible pour l'efficacité du traitement. Les expérimentations ont duré 4 mois chacune et les injections rapprochées en début d'expérimentation, afin de permettre une action rapide de la HCQ, ont rapidement été espacées pour ne garder qu'une injection hebdomadaire basée sur le calendrier prophylactique humain afin de garder un niveau stable de HCQ dans l'organisme. Les animaux adultes ont ainsi été injectés à D1, 2, 6, 10 puis une fois par semaine alors que les animaux juvéniles ont été injectés à PND6, 10, 14,

21 puis une fois par semaine. Les doses et calendrier d'injection sont résumés ci-dessous (**Tableau 11**).

Tableau 11 : Doses de HCQ utilisées et calendrier d'injection en fonction de l'expérimentation

Cohorte	Doses HCQ	Calendrier d'injection IP
Juvenile	15, 30, 50, 70 mg HCQ/kg	PND6, 10, 14, 21 puis 1/semaine
Adulte	30, 50, 70 mg HCQ/kg	D1, 2, 6, 10 puis 1/semaine

II.1.3. Dosage de l'accumulation sérique de l'hydroxychloroquine

II.1.3.1. Introduction

Afin de s'assurer de la présence de la HCQ dans le sérum des animaux et de surveiller son accumulation au cours du temps, un dosage sérique a été réalisé chez les animaux adultes (les jeunes animaux n'ayant pas un volume sanguin permettant l'analyse). Ces dosages ont été effectués après deux injections (D3), pour contrôler la présence rapide du traitement au niveau sanguin puis deux et quatre mois après le début de l'expérimentation (D73 et D136) afin d'évaluer l'accumulation du composé. Ces dosages ont été réalisés à l'hôpital Cochin (AP-HP, 75014 Paris, France).

II.1.3.2. Dosages

Les analyses ont été faites par chromatographie liquide de haute performance (HPLC), selon une adaptation de la méthode décrite par (Qu *et al.*, 2015). Le sang a été laissé à température ambiante 30 min après échantillonnage pour permettre la coagulation. Il a ensuite été centrifugé 10 min à 1000g afin de séparer le sérum des autres constituants. Les échantillons ainsi produits ont été conservés à -80 °C avant dosage.

En résumé, après précipitation des protéines, la HCQ et ces métabolites, la desethylhydroxychloroquine et la desethylchloroquine ont été séparés sur colonne XTerra phenyl[®] utilisant les propriétés de rétention de la silice. L'analyse a été réalisée par chromatographie liquide en fluorescence à 380 nm après excitation à 320 nm et la quantification par utilisation d'une courbe d'étalons internes préparés pour l'occasion. Les précisions intra-day et inter-day fluctuent de 4,3 à 10,3 % et la limite de quantification inférieure de cette méthode est de 25 ng/ml.

II.1.4. Analyses histochimiques : évaluation de l'impact du traitement sur le flux autophagique

II.1.4.1. Introduction

Le flux autophagique est un processus complexe à étudier *in vivo* en raison de sa dynamique. La plus importante revue sur le sujet définit les différentes méthodes disponibles pour y parvenir en précisant les points forts et les limites de chaque méthodes (Klionsky *et al.*, 2021). Parmi les méthodes principales, la microscopie électronique peut être utilisée afin d'observer directement les autophagosomes présents dans le cytoplasme. L'analyse peut également se faire par western blot, immuno-histochimie et chromatographie en flux par suivi des protéines majeures de l'autophagie telles que LC3 et SQSTM1/p62.

L'une des méthodes les plus utilisées dans la littérature est l'analyse par western blot. Cette méthode a l'avantage d'être simple à réaliser mais nécessite différents contrôles afin d'interpréter les résultats sans ambiguïté (Mizushima & Yoshimori, 2007; Barth, Glick & Macleod, 2010; Klionsky *et al.*, 2021). Premièrement, un anticorps dirigé contre une seule des isoformes de la protéine LC3 doit être sélectionné afin de ne pas perturber la lecture des données par un marquage aspécifique. Deuxièmement, le marquage de LC3 permettant d'évaluer la présence d'autophagosomes dans les cellules ne doit pas être réalisé seul. Afin de pouvoir distinguer une activation de l'autophagie d'une inhibition de la dégradation des composés séquestrés (voir III.2.4. de la section contexte et problématique), la quantification de LC3 doit être couplée à une quantification de SQSTM1/p62, permettant ainsi d'appréhender l'efficacité du flux autophagique. L'utilisation d'inhibiteur spécifique de l'autophagie par baisse de l'acidité du lysosome peut également être appliquée afin de produire un témoin positif de la situation de blocage tardif de l'autophagie. Ces précautions permettent, en principe, de faire la différence entre une activation (augmentation de LC3-II et du ratio LC3-II/LC3-I mais chute de la quantité de SQSTM1/p62) et une inhibition de la dégradation du cargo (augmentation de la quantité de LC3-II, du ratio LC3-II/LC3-I et de SQSTM1/p62).

II.1.4.2. Protocole

a) Préparation des tissus

L'évaluation du flux autophagique par western blot a été réalisée dans le muscle tibial antérieur (TA), les ganglions lymphatiques, la rate, le foie et le cerveau afin de contrôler l'action globale du traitement. Les organes ont été prélevés aux jours PND11, 26, 73 et 136 pour la cohorte juvénile et aux jours D3, 73 et 136 pour la cohorte adulte. Les animaux ont été sacrifiés par décapitation à PND11 et par dislocation cervicale aux autres points d'échantillonnage. Les organes ont été prélevés aussi rapidement que possible et congelés en azote liquide puis stockés à -80 °C.

b) Extraction protéique

Au moment de l'analyse, les organes ont été décongelés par homogénéisation dans un tampon de lyse RIPA (solution aqueuse de NaCl (S3014 - 150 mM) et Trisbase (T1503 - 50 mM) + 1 % Triton (T8787), 0,1 % SDS (L-5750) et 0,5 % deoxycholate (D6750)) additionné d'un cocktail d'antiprotéase-antiphosphatase (Fisher Scientific, A32959, Illkirch, France) afin de conserver intactes les protéines extraites. La lyse chimique produite par le tampon RIPA a été complétée par une lyse mécanique des tissus dans un agitateur Precellys (Bertin Instruments, Montigny-le-Bretonneux, France) par utilisation de billes en céramique. Après l'étape de lyse, l'extrait protéique a été débarrassé des potentielles impuretés restantes par centrifugation 30 min à 14 000 rpm. Le surnageant a été conservé et une sonication de 10 sec lui a été appliquée afin de détruire l'ADN présent et augmenter la fluidité de l'extrait. Les protéines présentes ont été quantifiées grâce au kit BCA Pierce™ BCA Protein Assay Kit (Fisher Scientific, 23225, Illkirch, France). Les protéines ont ensuite été standardisées à une concentration de 1 mg de protéine par ml en solution de Leammli. Cette solution permettant tout à la fois de dénaturer les protéines en les chargeant négativement après 5 min à 95 °C, de faciliter le dépôt de l'échantillon lors de la migration et de voir sa progression dans le gel.

c) Quantification des protéines majeures de l'autophagie

L'expression des protéines LC3-I, LC3-II et SQSTM1/p62 a été évaluée par western blot. Le matériel utilisé était une cuve de migration Xcell4 Surelock tank (Life Technology SAS, WR0100, Courtaboeuf, France) utilisant un tampon de migration NuPAGE™ MES SDS Running Buffer (20X) (Invitrogen™, NP000202, Illkirch, France) et des gels précolés de grand format NuPAGE™ 10 % Bis-Tris Midi Protein Gels (Invitrogen™, WG1203BOX, Illkirch, France) permettant d'accueillir 25 échantillons ainsi qu'un marqueur de poids moléculaire. Cette taille de gel était indispensable afin de pouvoir analyser l'ensemble des groupes expérimentaux sur un unique gel et permettre ainsi une analyse plus fiable des résultats. Un volume constant d'échantillons de 10 µl à 1 mg de protéines par ml a été déposé et soumis à une tension de 180 V jusqu'à sortie du front de migration hors du gel.

Après migration, les protéines ont été transférées sur membrane de PVDF par utilisation d'un système de transfert semi-sec iBlot2 Dry Blotting System (Fisher Scientific, IB21001, Illkirch, France) et de kits de transfert iBlot™ 2 Transfer Stacks (Invitrogen™, IB24001, Illkirch, France). Le bon déroulement du transfert a été attesté par utilisation de rouge Ponceau afin de s'assurer de la présence de protéines sur les membranes avant l'utilisation d'anticorps.

Les membranes ont été saturées une heure dans une solution de gélatine de poisson (Sigma, G7765, Merck, Darmstadt, Allemagne) à 2,5 % afin de limiter le marquage aspécifique des anticorps sur la membrane. Après saturation, les marquages primaires ont été réalisés *overnight* à 4 °C avec des anticorps de lapin anti-LC3B (1:1,000; Life Technology, PA1-

46286, Courtaboeuf, France) ou des anticorps de lapin anti-SQSTM1/p62 (1:3,000; Life Technology, PA5-20839, Courtaboeuf, France).

Un lavage a été effectué avant le marquage secondaire de 60 min à température ambiante avec un anticorps anti-rabbit de chèvre couplé à la HRP (1:5,000; Santa Cruz, SC-2054, Heidelberg, Allemagne). Un anticorps primaire de souris anti-béta-actine pré-couplé à la HRP (1:10,000; Santa Cruz, SC-47 778 HRP, Heidelberg, Allemagne) a été utilisé pour marquer la protéine de normalisation.

Les protéines ont été visualisées par utilisation d'une solution de révélation par chimioluminescence (SuperSignal™ West Femto ; Fisher Scientific 34096, Illkirch, France) dans une machine de révélation Azure C600 (Azure Biosystems, Inc., Dublin, Ohio, USA). Les clichés des membranes ont été enregistrés et analysés par le logiciel ImageJ (V1.53i Wayne Rasband and contributors, National Institute of Health, USA) (Schneider, Rasband & Eliceiri, 2012) intégré au logiciel Icy (V 2.1.4.0 BioImage Analysis unit, Institut Pasteur, France) (de Chaumont *et al.*, 2012). Afin de pouvoir comparer les niveaux d'expression protéique, la quantification de chaque protéine par l'option Gel Analyzer a été divisée par la quantité de béta-actine présente dans l'échantillon afin de standardiser les données.

II.1.5. Évaluation du développement sensori-moteur

II.1.5.1. Introduction

Le développement du comportement moteur résulte d'interactions complexes entre des mécanismes génétiques et les effets de stimuli externes précoces (Jamon & Clarac, 1998). Contrairement à certains animaux comme le cobaye, qui est une espèce dite « précoce », en raison de la mise en place des fonctions motrices de base dès la naissance, la souris fait partie des mammifères dits « non précoces », car à la naissance son organisme général et son système nerveux en particulier sont immatures (Fox, 1966). À la naissance, la souris possède des aptitudes sensorielles et motrices très limitées et n'est pas capable d'assurer elle-même le maintien de sa température corporelle. Elle est de ce fait complètement dépendante de sa mère au début de la vie. Le souriceau nouveau né n'est capable que de quelques activités spécifiques telles vocaliser, téter, et rouler sur le côté. Ses mouvements ne sont pas coordonnés, sa sensibilité tactile n'est pas complètement développée et ses canaux auditifs comme ses yeux sont encore fermés.

En tant que mammifère « non précoce », ayant un développement sensori-moteur post-natal au même titre que l'Homme, le chien, le chat ou le rat, la souris est un bon modèle pour l'étude de la maturation des fonctions cérébrales. En effet, la mise en place des fonctions essentielles du cerveau durant la période périnatale afin d'aboutir aux fonctions neuronales essentielles à la survie de l'organisme est, comme chez l'Homme (McCain, Mustard & Shanker, 2007), très sensible à la présence de substances chimiques pouvant affecter la plasticité des réseaux neuronaux (Johnston *et al.*, 2009). Des défauts dans le processus de

maturation à un stade précoce pourrait impacter la santé physique et mentale à long terme ainsi que le comportement et l'apprentissage (Andersen, 2003). L'observation du jeune animal par des tests standardisés et non invasifs permet d'évaluer facilement la maturation de son système nerveux et de mettre en évidence des facteurs de perturbation de son développement. Le but de ces tests est d'établir des relations simples entre l'évolution des réactions motrices ou sensorielles des animaux et l'ontogenèse de leur système nerveux. Les animaux utilisés dans la cohorte juvéniles ont donc été soumis à un ensemble de tests classiques proposés par Fox (Fox, 1965) et couvrant la période allant de la naissance au sevrage.

II.1.5.2. Considérations méthodologiques

Le nombre de souriceaux n'est pas constant à la naissance. Ces variations peuvent influencer sur la croissance et le développement des animaux et rendre difficile la comparaison de la performance de chaque individu. Pour limiter ce facteur de variation et permettre une croissance homogène de chaque individu d'une même portée, nous avons choisi de réduire à 6 le nombre de souriceaux par portée le jour même de la naissance. Cependant, cette pratique peut avoir des conséquences sur le comportement maternel et influencer alors le bon développement des jeunes restants. Ainsi, parallèlement à l'expertise des jeunes, nous avons évalué le comportement maternel par la mise en place de deux tests permettant d'observer la qualité des soins apportés par la mère et les interactions mère-jeunes. Le poids des souriceaux a quant à lui été suivi quotidiennement dès le 3^{ème} jour de vie post-natale.

L'observation d'une réaction motrice nécessite de définir des paramètres précis de déclenchement de la réaction, d'attestation que la réaction a eut lieu et d'exploitation des résultats. En effet, le matériel utilisé, l'heure du test dans le cycle d'activité de l'animal, l'ambiance lumineuse et la température de la salle d'expérimentation ou la durée de séparation entre la mère et les jeunes sont autant d'éléments qui peuvent influencer les résultats obtenus. D'autre part, les animaux peuvent être, en fonction du test considéré, testés une seule fois ou de manière répétée, ce qui peut modifier le comportement de l'animal, à cause de la fatigue ou d'un effet d'apprentissage, même sur de très jeunes animaux. Enfin, la réussite ou l'échec à une épreuve doit être défini à partir d'un paramètre précis, mais objectif, facile à relever et représentatif de la réaction motrice testée. Les notes qualitatives définies par un indice sont donc moins pertinentes et plus dépendantes de l'expérimentateur que d'autres types de relevés. D'une manière générale, la durée réelle d'exécution du test semble être la variable la plus représentative de la performance de l'animal et la mieux adaptée à la mise en évidence de différences interindividuelles.

Enfin, en termes de suivi des animaux, certains auteurs recommandent de suivre un lot d'animaux durant plusieurs jours alors que d'autres préconisent l'utilisation d'animaux différents chaque jour pour limiter d'éventuels biais induits par la manipulation répétée des animaux et l'effet d'apprentissage. Compte tenu des différences interindividuelles pouvant

exister au sein d'une même portée, il nous semblait plus approprié, pour les expériences menées, de tester quotidiennement l'ensemble des souriceaux de chaque portée.

II.1.5.3. Procédures des tests

L'ensemble des tests utilisés dans ce travail ont été décrits par Fox (Fox, 1965) et permettent l'évaluation du degré de maturation sensori-motrice du souriceau sur les trois premières semaines de vie. Le jour de la naissance est appelé PND0. Les tests ont été réalisés, pour la plupart, sur trois jours consécutifs. Ils ont été menés dans une pièce attenante à l'animalerie, suivant les mêmes conditions de température et d'humidité que la salle d'élevage. Ils ont été appliqués à l'ensemble des souriceaux de l'expérimentation. Une observation quotidienne des animaux a permis le suivi de leur évolution pondérale. Durant la réalisation des tests, les mères ont été isolées dans la salle d'élevage. Les tests ont été réalisés de manière à ce que la durée de séparation mère-jeunes ne dépasse pas 30 minutes. Un tableau récapitulatif des procédures relatives aux tests évaluant le développement sensorimoteur des jeunes et le comportement maternel est présenté à la fin de cette partie (**Tableau 12 p. 150**).

II.1.5.4. Évaluation du développement locomoteur

a) *Test de retournement (righting reflex)*

Principe : Ce premier test effectué sur les souriceaux, permet d'évaluer le réflexe de retournement, fortement contrôlé par la maturation des structures labyrinthiques et permettant à l'animal de retrouver une position stable sur ses 4 pattes après une chute ou un déséquilibre.

Procédure : Ce test, réalisé à PND3, 4 et 5 débute par le dépôt de l'animal sur une planche en bois (40 x 40 cm) couverte de feutrine, en position dorsale (**Photo 4**). Le souriceau est ensuite lâché, en prenant soin de ne lui donner aucune impulsion, et laissé libre de ses mouvements pendant une durée maximale de 3 minutes. Après avoir été lâchés, les animaux décrivent généralement des séries de balancements latéraux initiés par la tête. Ces mouvements latéraux peuvent conduire au rétablissement du souriceau sur ses pattes mais dans certains cas, le retournement peut ne pas être complet lorsque l'une des pattes postérieures reste sous l'animal. Cette manœuvre, appelée « pseudo-retournement », ne permet généralement pas au souriceau d'atteindre une position stable et favorise le déséquilibre ramenant l'animal en position initiale.

Variables mesurées : Le temps mis par l'animal pour se retourner sur ses 4 pattes est enregistré. Le test est considéré comme étant réussi si le souriceau évalué arrive à se rétablir sur ses pattes en moins de 3 minutes.



Photo 4 : Test de retournement
(Photographies personnelles réalisées à PND3 chez la souris)

b) Test d'agrippement (grasping reflex)

Principe : Ce test permet de mesurer la présence d'un réflexe bien connu car également présent chez le nourrisson humain. La stimulation de la paume de la main entraîne la fermeture de celle-ci (Koupernik & Dailly, 1972). Ce réflexe présent dès la naissance disparaît avec l'âge. Chez la souris, la motricité et la mobilité des membres antérieurs est importante pour accéder au lait maternel en s'agrippant au pelage de la mère.

Procédure : Le dispositif utilisé consiste en un plateau grillagé de (10 x 16 cm, maillage 5 mm) fixé à l'axe d'un moteur (**Photo 5**). Le plateau effectue une rotation de 360° en 45 secondes et un rapporteur fixé à la structure permet de lire l'angle du plateau par rapport à l'horizontale. Un amas de coton disposé sous la structure permet d'amortir la chute du souriceau. Ce test est réalisé à PND4, 5 et 6. Au début du test, le plateau du dispositif est placé à l'horizontale et le souriceau est déposé au centre du plateau. Le moteur est alors mis en marche, entraînant la rotation du plateau. Le glissement de l'animal engendré par le mouvement de rotation induit le réflexe d'agrippement afin d'éviter la chute. Le test s'arrête au moment où l'animal tombe du plateau.

Variables mesurées : L'angle de chute est relevé. Le test est considéré comme étant réussi si l'angle de chute du souriceau évalué est supérieur ou égal à 90°.

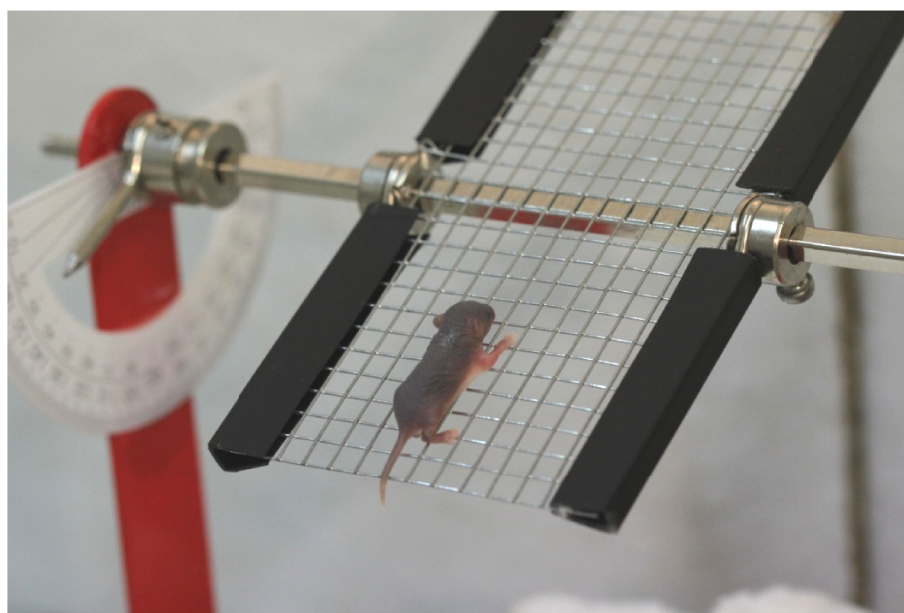


Photo 5 : Test d'agrippement
(Photographie personnelle réalisée à PND4 chez la souris)

c) Cliff avoidance

Principe : Le but de ce test est d'évaluer la capacité de l'animal à éviter le vide. Il fait intervenir la force musculaire ainsi que la coordination des membres de l'animal.

Procédure : Le dispositif est composé d'une plateforme en bois (L : 20 cm, l : 10 cm, h : 10 cm) couverte de feutrine, surplombant un tapis de coton pour amortir la chute du souriceau (**Photo 6**). Ce test est réalisé à PND6, 7 et 8. L'animal est initialement positionné face au vide avec la tête et les deux pattes antérieures dans le vide. Deux essais d'une durée maximale de 3 minutes sont menés successivement. Par peur du vide, le souriceau va tenter de se soustraire à la chute en faisant demi-tour ou en reculant pour se rétablir sur la plateforme.

Variables mesurées : Le temps mis par l'animal pour se rétablir complètement sur la plateforme est enregistré. Seule la meilleure des deux performances est prise en compte. Le test est considéré comme étant réussi si le souriceau évalué arrive à se rétablir en moins de 3 minutes.

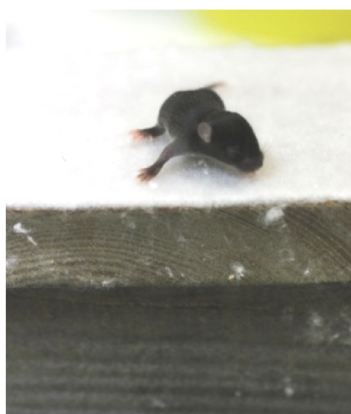
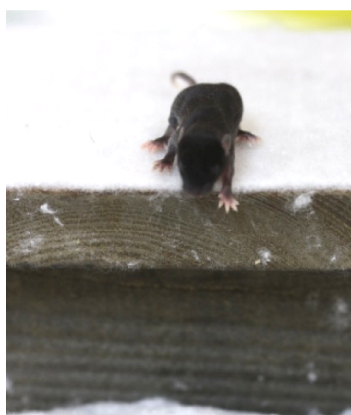
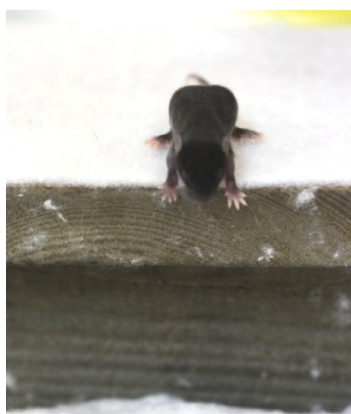


Photo 6 : Cliff avoidance
(Photographies personnelles réalisées à PND8 chez la souris)

d) Test de réaction antigravitaire (negative geotaxis)

Principe : Ce test, comme le test de retournement, a pour but d'évaluer la réaction motrice mise en œuvre en réponse à une position inhabituelle dans l'espace. Pour se rétablir en position stable, un bon niveau de coordination des membres antérieurs est requis, nécessitant de fait une certaine maturité du système moteur. La maturation du système vestibulaire est ainsi mise en avant car ces structures, mises en place précocement, sont responsables de la détection du positionnement corporel dans l'espace (Norton & Kimler, 1987).

Procédure : Le dispositif est composé d'une planche en bois (40 x 40 cm) couverte de feutrine et inclinée à 20° par rapport à l'horizontale (**Photo 7**). Cet angle est maintenu fixe car il conditionne directement la difficulté du test et pourrait transformer celui-ci en test d'agrippement. Le test de réaction antigravitaire est réalisé à PND8, 9 et 10. L'animal est placé sur la planche, tête vers le bas, et laissé libre de ses mouvements pour une durée maximale de 3 minutes. Le test s'arrête quand le souriceau a effectué une rotation de 180° lui permettant d'avoir la tête dirigée vers le haut. Comme pour le test de retournement, les mouvements du corps sont initiés par les mouvements de la tête. Des oscillations latérales accompagnées de poussées des membres antérieurs permettent à l'animal d'accomplir les premiers 90° de la rotation. L'instabilité de cette configuration nécessite un ajustement par rapport à la verticale qui sera plus rapide et plus précis au fur et à mesure des jours.

Variables mesurées : Le temps mis par l'animal pour se rétablir à la verticale, tête vers le haut, est enregistré. Le test est considéré comme étant réussi si le souriceau évalué arrive à se rétablir en moins de 3 minutes.

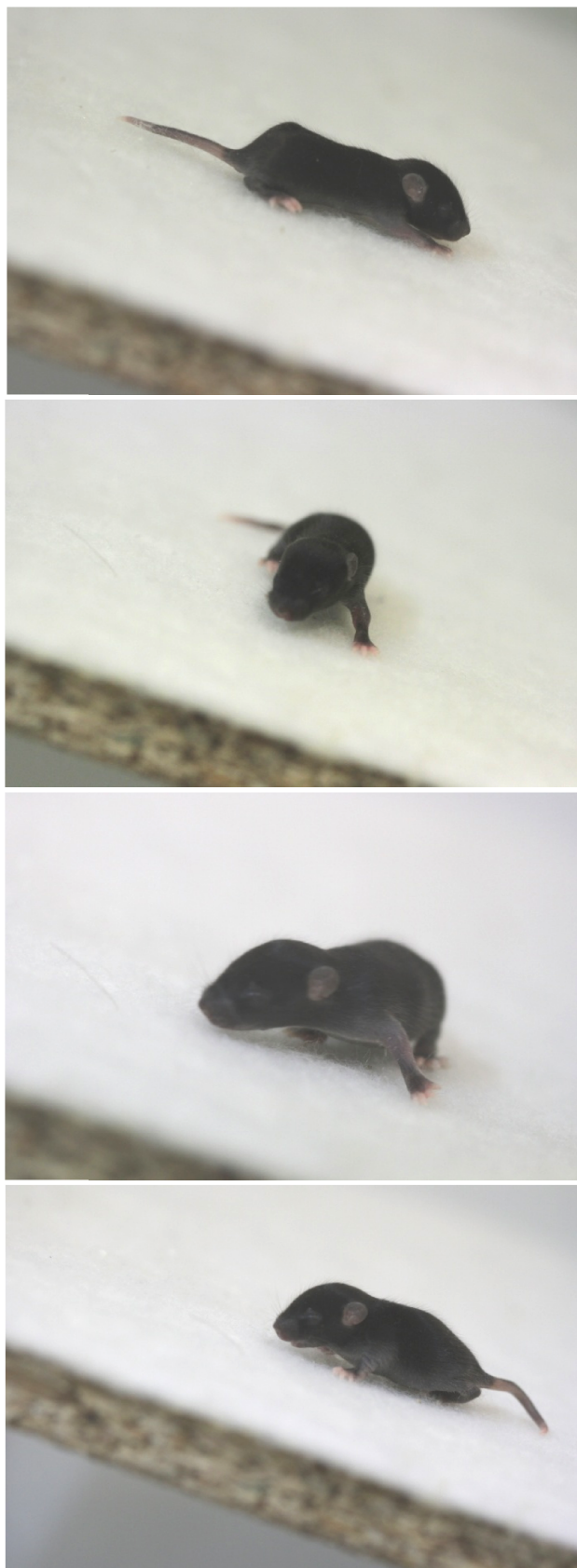


Photo 7 : Réaction antigravitaire
(Photographies personnelles réalisées à PND8 chez la souris)

e) Test de suspension

Principe : Ce test, réalisé avant l'ouverture des yeux des souriceaux, permet l'évaluation de la force musculaire et de la résistance physique des animaux (Nevins, Nash & Beardsley, 1993).

Procédure : Le dispositif est composé d'un fil métallique de 0,5 mm de diamètre tendu entre deux montants à 20 cm du sol. Un matelas de coton est positionné sous le fil pour réceptionner l'animal lors de sa chute. Ce test est réalisé à PND10. L'animal, initialement placé face au fil, est lâché lorsque ses pattes antérieures agrippent fermement le fil (**Photo 8**). Le test se termine avec la chute du souriceau. Les animaux, n'ayant pas encore les yeux ouverts restent pour la plupart suspendus au fil jusqu'à la chute bien que certains tentent d'agripper le fil avec les pattes postérieures ou la queue. Ce test, s'il est réalisé avec des animaux dont les yeux sont ouverts permet une analyse combinée de la force musculaire et de l'émotivité de l'animal. En effet, dans ce cas, les animaux peuvent « juger » que la chute n'est pas dangereuse et se laisser tomber avant d'être fatigués. La durée avant la chute devient alors fortement dépendante de la hauteur du fil. Des observations sur les rats montrent une augmentation des performances des animaux à ce test jusqu'à PND20. Par la suite, le poids corporel tend à être un facteur limitant les performances des animaux les plus lourds (Gelly, 1979).

Variables mesurées : Le temps écoulé entre le début du test et la chute du souriceau est enregistré.

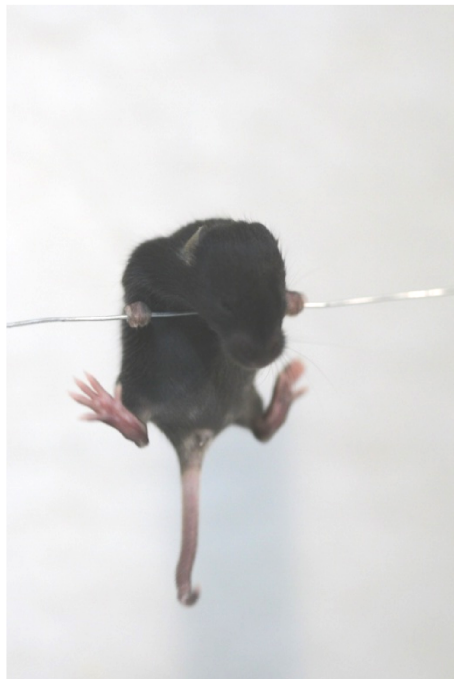


Photo 8 : Test de suspension
(Photographie personnelle réalisée à PND10 chez la souris)

f) Test de coordination locomotrice

Principe : Dès qu'ils ont les yeux ouverts, les souriceaux explorent leur environnement avec une autonomie croissante. La motricité et la résistance physique des animaux augmentent rapidement durant cette phase et il est alors possible de mettre en place des tests de motricité plus complexes. Ce test de coordination permet ainsi de mettre en avant le sens de l'équilibre, la coordination des quatre membres et la résistance physique des animaux. Il est composé de plusieurs étapes associées à une activité physique particulière. La dépense énergétique totale peut être importante, aussi la fatigue des animaux peut influencer sur les performances au test.

Procédure : Le dispositif est composé d'un récipient cylindrique (h : 22 cm, diamètre : 30 cm) rempli au deux tiers d'eau tempérée (**Photo 9**). Une tige filetée (h : 32 cm, diamètre : 8 mm) au bout de laquelle se trouve un obstacle obstruant la montée, émerge au centre de l'eau. Autour de cette tige, à une hauteur de 20 cm au dessus du niveau de l'eau, se trouve une plateforme avec une ouverture circulaire de 80 mm. Ce test est réalisé à PND20, 23 et 26. En début de test, le souriceau est placé dans l'eau, face à la paroi du cylindre. L'animal commence alors à nager puis fini par trouver la tige filetée au centre du bassin et l'escalade, l'eau représentant pour lui un milieu aversif. L'escalade de la tige filetée dans un premier temps, puis le passage de la tige à la plateforme et le rétablissement sur la plateforme sont des étapes critiques dans la réussite à ce test puisque l'animal se retrouve dans une position instable. Le rétablissement sans chute à une position quadrupède normale sur la plateforme est une tâche nécessitant une parfaite coordination entre les 4 membres de l'animal (Essman & Jarvik, 1961). De manière générale, une chute est toujours suivie d'une nouvelle tentative pour atteindre la plateforme, seul endroit où l'animal peut se reposer. Le test se termine lorsque l'animal retrouve une position quadrupède sur la plateforme. La durée maximale du test est de 4 minutes. Chaque session a été filmée afin d'être analysée ultérieurement à l'aide d'un logiciel mis au point au sein du laboratoire et codé sur Python.

Variables mesurées : Le temps mis par l'animal dans chacune des trois activités (temps de nage, temps d'escalade de la tige filetée, temps mis pour se rétablir sur la plateforme), ainsi que le temps total sont enregistrés. Le nombre de chutes est également relevé. Le test est considéré comme étant réussi si le souriceau évalué arrive à se rétablir sur la plateforme en moins de 4 minutes.

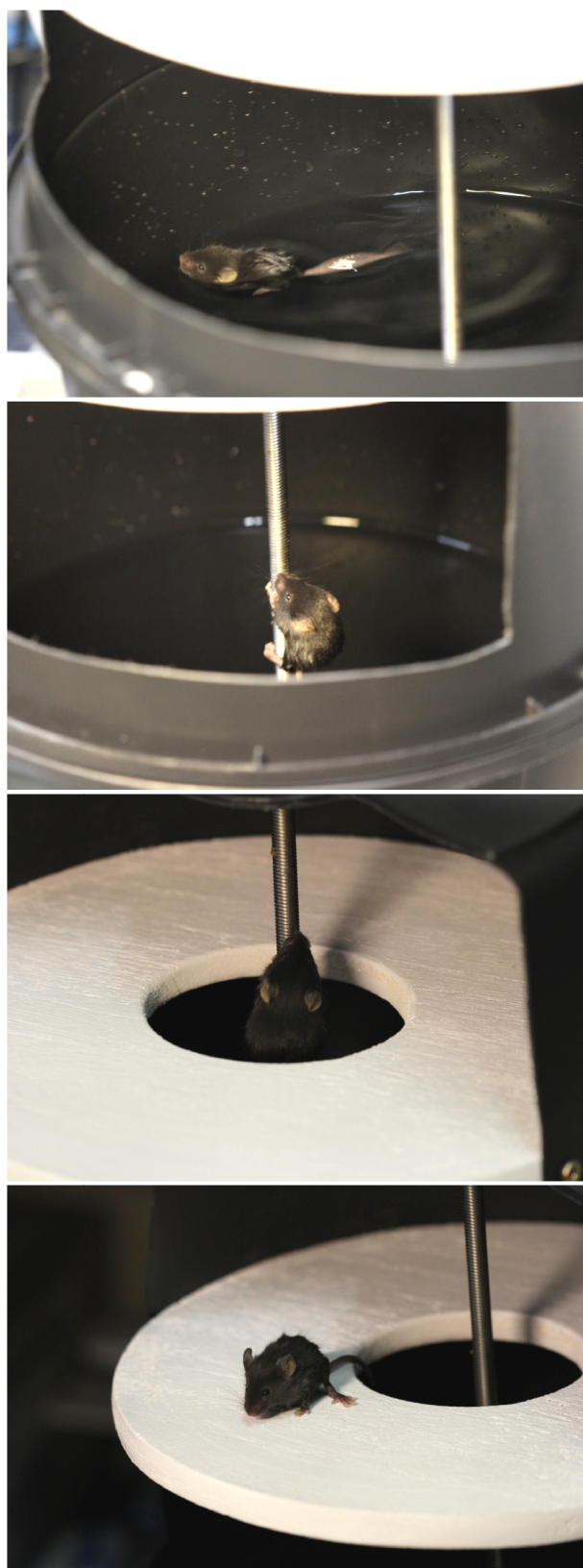


Photo 9 : Test de coordination locomotrice
(Photographies personnelles réalisées à PND23 chez la souris)

g) Open-field

Principe : L'*open-field* ou test « en champ ouvert » a été mis au point en 1932 (Hall & Ballachey, 1932) afin d'évaluer le niveau d'activité motrice et exploratoire d'un animal placé dans une situation nouvelle. Chez le jeune animal, ce test n'est pas effectué pour obtenir d'information sur les réponses émotionnelles de l'animal.

Procédure : Le dispositif est composé d'une enceinte cubique de 21 cm de côté, ouverte en son sommet. Le plancher est divisé en 9 cases de 7 cm de côté (**Photo 10**). Ce test est effectué à PND25, en lumière rouge. Le souriceau est initialement placé dans la case centrale et laissé libre d'explorer son environnement durant 5 minutes. La session est filmée et enregistrée pour un dépouillage ultérieur des vidéos à l'aide d'un logiciel mis au point au sein du laboratoire et codé sur Python.

Variables mesurées : Le nombre total de cases traversées et le nombre de redressements (animal en position verticale en équilibre sur les pattes postérieures) sont enregistrés.



Photo 10 : Open-field
(Photographie personnelle réalisée à PND25 chez la souris)

II.1.5.5. Évaluation du développement sensoriel

Le système sensoriel a été évalué pour son rôle primordial dans la capacité d'un organisme à interagir avec son environnement (Cory-Slechta *et al.*, 2001).

a) *Test de sursaut au bruit (auditory startle)*

Principe : La maturation du système nerveux auditif peut être mise en avant par une réaction motrice de sursaut à une brusque stimulation sonore. Le souriceau présente les composantes motrices mises en jeu avant l'apparition de la réaction au bruit, attestant de fait l'implication de l'ouverture du canal auditif et de la maturation des structures auditives dans la réaction de sursaut à la stimulation sonore. Cette réaction, à évolution très rapide, antérieure à l'ouverture des yeux, est un bon marqueur temporel du développement sensori-moteur des souriceaux.

Procédure : Un stimulus sonore bref et intense est produit, grâce à un clicker d'entraînement, à proximité de l'animal à partir de PND11. S'il perçoit le son, l'animal testé réagit par un sursaut accompagné d'une extension de la tête et des pattes. Le test est reconduit jusqu'à ce que l'ensemble des animaux répondent de manière positive, généralement autour de PND14.

Variables mesurées : Une note de 0 ou de 1 est attribuée en accord avec la réponse de l'animal évalué. Quand un animal obtient la note de 1, il n'est plus testé les jours suivants.

b) *Ouverture des yeux*

Principe : L'ouverture des yeux est un indice de maturation cérébrale facile à évaluer par simple observation de l'animal.

Procédure : Les souriceaux sont observés quotidiennement avec une attention particulière pour les yeux autour de PND14 à PND16 (**Photo 11**).

Variables mesurées : Un indice est attribué pour l'ouverture de chaque œil dont l'ouverture peut être décalée de 24 heures. Un indice de 0 est attribué à un œil fermé, 1 signifie que l'œil est en cours d'ouverture mais que la paupière n'est pas encore totalement ouverte (**Photo 11** – milieu) et 2 est la note donnée à un œil totalement ouvert et bien rond (**Photo 11** – bas).

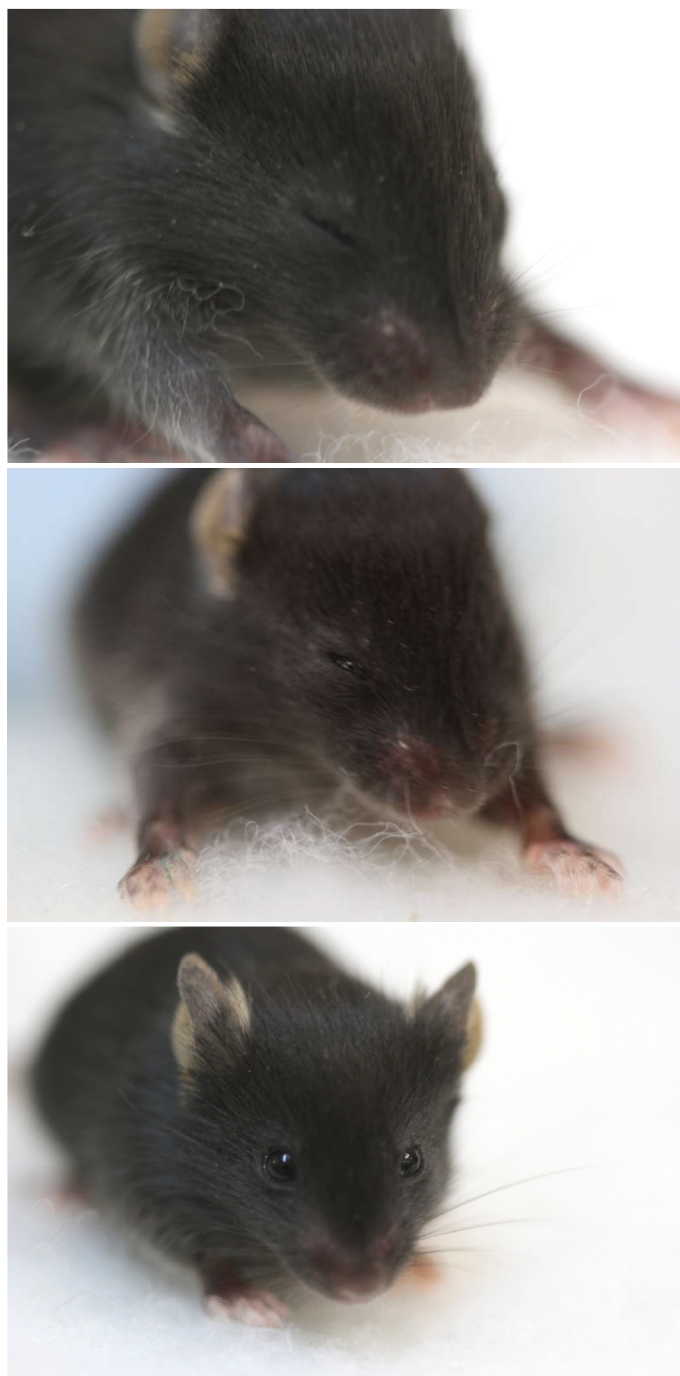


Photo 11 : Observation de l'ouverture des yeux
(Photographies personnelles réalisées entre PND14 et PND16 chez la souris)

II.1.6. Évaluation du comportement maternel

II.1.6.1. Introduction

Le comportement de la mère vis-à-vis de sa progéniture est une composante importante pour le bon développement des souriceaux. Il est donc admis que les variations interindividuelles d'expression du comportement maternel modifient les réponses comportementales des jeunes durant leur développement ou à l'âge adulte. En tant qu'animaux « non précoces », les premiers jours de vie post-natale des souris sont une étape critique où la survie des souriceaux est totalement dépendante des soins prodigués par leur mère. Celle-ci doit les nourrir, leur apporter les soins nécessaires au maintien de leur température corporelle et les protéger de l'environnement. Après la naissance, l'activité la plus importante de la mère est de construire un nid et d'y regrouper les jeunes. Le comportement maternel général peut donc être appréhendé par ces deux composantes principales. Étant donné l'importance de l'impact d'un stress maternel sur la qualité des soins reçus par les jeunes et aux conséquences sur le développement (Burenkova, Aleksandrova & Zarayskaya, 2019; Reshetnikov, Ryabushkina & Bondar, 2020), nous avons évalué le comportement maternel via la qualité du nid construit pour les jeunes et la rapidité de ramassage des souriceaux.

II.1.6.2. Procédures des tests

a) Construction du nid (*nest building*)

Principe : La construction de nid est un comportement exprimé par la mère dès la veille de la parturition et perdurant jusqu'à la prise d'autonomie des souriceaux. Ce test permet d'évaluer la qualité du nid construit par la mère pour abriter les petits.

Procédure : Le test est appliqué à chaque mère à PND3, 6 et 8. Selon une technique établie (Kalueff *et al.*, 2006), un matériau nécessaire à la construction du nid (carré de coton compressé) a été déposé dans la cage d'habitation et le nid déjà présent a été retiré. La mère va généralement déchiqueter le coton et le mélanger à la sciure de la cage pour façonner un nid de qualité autour des jeunes (**Photo 12**).

Variables mesurées : La qualité du nid produit a été évaluée 1h, 2h et 24h après le début du test. Un indice a été attribué au nid sur une échelle à 3 points selon la méthode de Kalueff (2006). Un indice de 0 correspond à une absence de nid ou si l'animal n'a pas utilisé le matériau. Un indice de 1 signifie que le matériau a été utilisé mais que le nid produit n'est pas complet (**Photo 12** – milieu). Un indice de 2 correspond à un nid circulaire entourant intégralement les souriceaux (**Photo 12** – bas).



Photo 12 : Construction du nid
(Photographies personnelles réalisées à PND3 (haut et bas) et PND 8 (milieu) chez la souris)

b) Test de ramassage des jeunes (retrieving)

Principe : Le ramassage est un comportement naturel de la femelle allaitante. Lorsque l'un ou plusieurs des petits est éloigné du nid, la mère va le chercher afin de le ramener au nid, où les soins maternels sont généralement apportés (**Photo 13**).

Procédure : Ce test est réalisé à PND4, 7 et 10. Avant le début du test, la mère est retirée de la cage, les jeunes y sont dispersés et le nid initialement présent est retiré. Un matériau permettant la construction du nid (carré de coton compressé) est déposé dans la cage puis la mère est réintroduite. Le comportement maternel est filmé durant 20 minutes pour une analyse ultérieure à l'aide d'un logiciel mis au point au sein du laboratoire et codé sur Python.

Variables mesurées : Le temps de latence (durée écoulée avant que la mère ne saisisse le premier petit), le temps total de regroupement (durée mis par la mère pour regrouper tous les petits), le temps consacré aux jeunes (toiletage, regroupement, allaitement) et la présence ou non d'un nid au bout des 20 minutes (attribution d'un indice 0, 1 ou 2 similaire au test de construction de nid) sont enregistrés.

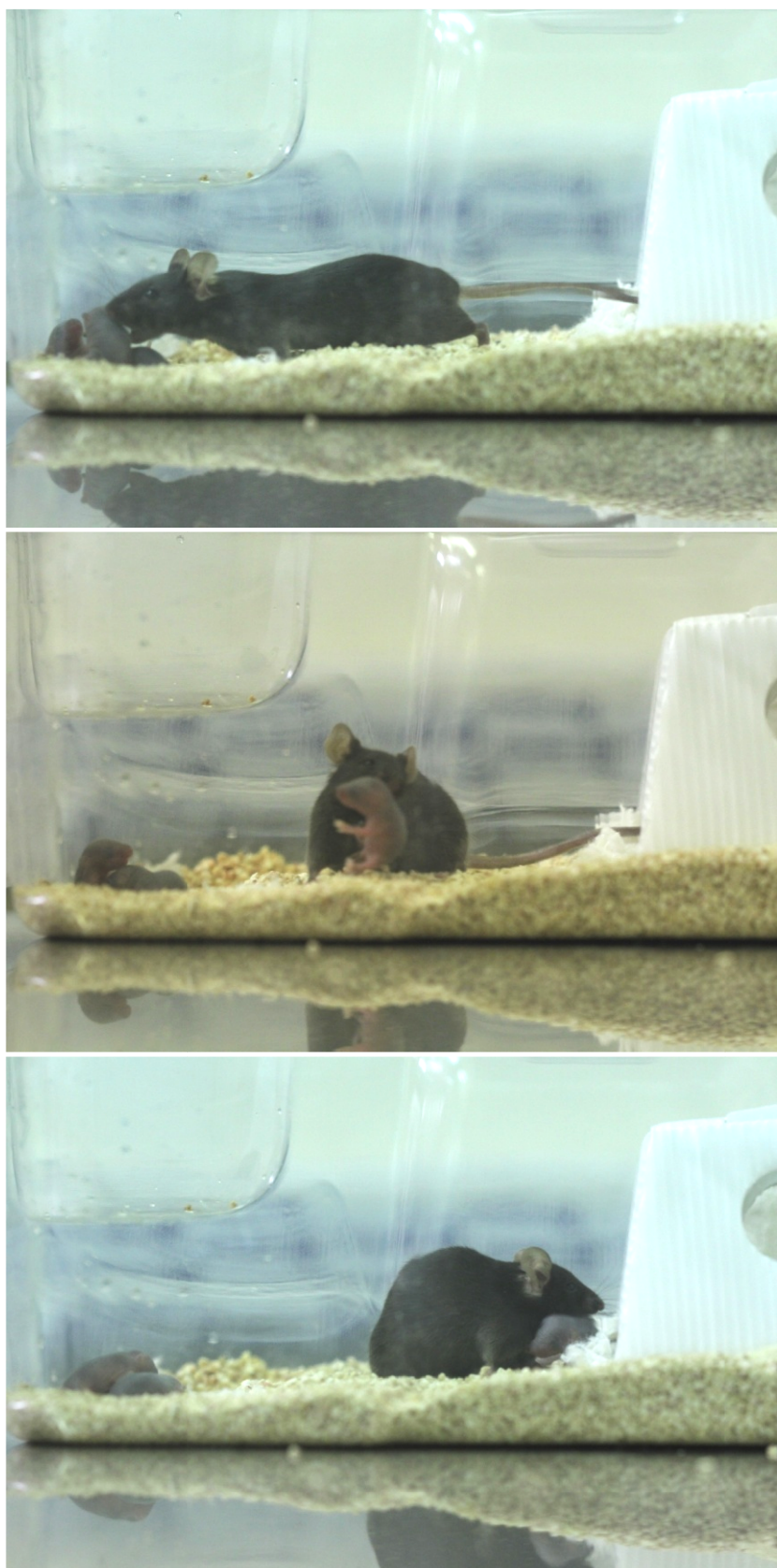


Photo 13 : Test de ramassage des jeunes
(Photographies personnelles réalisées à PND4 chez la souris)

Tableau 12 : Récapitulatif des tests de développement sensori-moteur et des tests du comportement maternel

	Tests	Age	Réflexe ou comportement évalué	Procédure			Nombre d'essais	Variables relevées	Limites expérimentales
				Début du test	Fin du test	Temps			
Développement moteur	Retournement	PND3 4 5	Réflexe impliquant les mécanorécepteurs du cou	Souriceau placé sur le dos	Souriceau en position quadrupède normale	≤ 3 min	1	- Temps de retournement	Placement initial de l'animal
	Agrippement	PND4 5 6	Agrippement des pattes antérieures	Souriceau placé sur la plaque grillagée	Chute		1	- Angle de chute	
	<i>Cliff avoidance</i>	PND6 7 8	Perception du vide	Souriceau placé les deux pattes antérieures dans le vide	Rétablissement sur la plateforme ou chute	≤ 3 min	2	- Temps pour se rétablir sur la plateforme	Placement initial de l'animal
	Réaction antigravitaire	PND8 9 10	Perception de la gravité	Souriceau placé la tête vers le bas sur un plan incliné à 20°	Rétablissement la tête vers le haut, corps à la verticale	≤ 3 min	1	- Temps pour se rétablir la tête en haut	
	Suspension	PND10	Force musculaire	Souriceau accroché au fil de fer par les pattes antérieures	Chute		1	- Temps avant la chute	Positionnement initial des pattes
	Coordination locomotrice	PND20 23 26	Coordination des 4 pattes Force musculaire, résistance physique	Souriceau déposé dans l'eau face au cylindre	Rétablissement sur la plateforme	≤ 4 min	1	- Temps de nage, d'escalade, de rétablissement, temps total - Nombre de chutes	
	<i>Open field</i>	PND25	Activité motrice	Souriceau placé au centre du dispositif	Fin des 5 minutes	5 min	1	- Nombre de cases totales parcourues - Redressements	
Développement sensoriel	Sursaut au bruit	PND11 12 13 14	Maturation du système auditif	Émission d'un bruit sec et fort à proximité de l'animal			1	- Sursaut ou absence de réaction	Variabilité sur 24 h
	Ouverture des yeux	PND14 15 16	Maturation du système visuel	Observation				- Indice pour l'ouverture de chaque œil	Variabilité sur 24 h
Comportement maternel	Construction du nid	PND3 6 8	Soin apporté aux jeunes	Apport d'une feuille de coton				- Évaluation de la qualité du nid à trois temps	
	Ramassage des jeunes	PND4 7 10		Souriceaux éparpillés dans la cage, retrait du nid et réintroduction de la mère	Fin des 20 min	20 min		- Temps mis pour rassembler les petits, temps de soin - Reconstruction d'un nid	

PND: *Post Natal Day*

II.1.7. Évaluation du comportement individuel à l'âge adulte

II.1.7.1. Introduction

Le comportement animal est un indicateur solide de l'état global des animaux. Il peut généralement être observé de manière non invasive et permet d'évaluer les effets de substances (drogues, médicaments, polluants) notamment sur le système nerveux central. L'observation d'effets sur le comportement est un pré-requis fondamental pour l'étude ultérieure des mécanismes biologiques, cellulaires et moléculaires qui sous-tendent ces altérations. L'observation comportementale est aujourd'hui appliquée de manière plus régulière et l'existence d'altérations comportementales résultantes de l'exposition à des substances chimiques est un concept important pour la compréhension des mécanismes de neurotoxicité (Lucchini *et al.*, 2000).

Le comportement d'un individu peut être défini comme « le mouvement d'un organisme dans un contexte spatio-temporel précis en réponse à des variables appelées stimuli » (Tilson, 1987). Le comportement est donc la réponse physiologique d'un individu à l'intégration de divers signaux sensoriels, moteurs ou cognitifs par le système nerveux central. Une altération comportementale est donc un indicateur de perturbations induites au niveau de ce système. La principale difficulté repose sur le caractère éminemment complexe du comportement. Il existe en effet différents domaines comportementaux parmi lesquels les fonctions motrices et sensorielles, les fonctions cognitives complexes, les émotions ou les comportements sociaux (Slikker & Bowyer, 2005) qui apparaissent, de plus, pouvoir être interdépendants. Les fonctions cognitives peuvent, par exemple, impliquer des mécanismes d'apprentissage, de mémoire ou d'attention, compliquant leur évaluation qui peut, par ailleurs, être pratiquée avec un large panel de méthodes spécifiques à chaque tâche. Néanmoins, l'étude comportementale présente certains avantages non négligeables : sa mise en place est relativement simple et peu coûteuse et le caractère non invasif des techniques, permet de tester les animaux sur l'ensemble du panel souhaité.

II.1.7.2. Considérations méthodologiques

Les tests classiquement utilisés pour l'étude du comportement animal, et des rongeurs en particulier, reposent sur un principe simple : laisser l'animal libre d'explorer son environnement avec ou sans contrainte spécifique puis de relever des variables précises renseignant sur le registre comportemental souhaité. Cette situation génère, chez les rongeurs, un conflit entre un comportement exploratoire inné et la peur d'aller vers un environnement inconnu et potentiellement dangereux.

Les dispositifs utilisés sont couramment appelés labyrinthes et ont beaucoup évolué depuis leur mise au point initiale. Les procédures utilisées sont grandement standardisées car un grand nombre de facteurs sont capables de faire varier les résultats. Parmi ces facteurs, des différences dans la construction même du labyrinthe (forme, matériaux, taille, couleur) ou les

procédures mises en œuvre (manipulation des animaux, moment de la journée, éclairage de la pièce, répétition des essais) peuvent être retrouvés. La validité de ces tests est importante pour l'extrapolation des résultats à l'Homme.

Classiquement, chaque test est utilisé pour évaluer une composante comportementale (le niveau d'anxiété, l'activité motrice, etc.). Il faut cependant garder à l'esprit qu'une composante peut être évaluée par plusieurs tests, que l'activité locomotrice peut, par exemple, être évaluée dans la plupart des tests et que les différentes composantes sont toutes interdépendantes. En effet, le niveau d'anxiété influence grandement le niveau d'activité tant chez l'Homme que chez l'animal. Un animal stressé passera plus de temps immobile et inactif sans que ses capacités motrices réelles ne soient impactées.

Dans les études réalisées ici, le comportement individuel a été évalué à l'âge adulte. Les deux cohortes d'animaux ont passé les mêmes tests, soit à partir de PND66 et PND129 pour la cohorte juvénile, soit à partir de D66 et D129 pour la cohorte adulte, ce qui correspond à une latence de 2 et 4 mois entre le début de l'expérimentation et les tests comportementaux. L'anxiété, l'activité locomotrice, la force musculaire et la résistance physique des animaux ont ainsi été testés. Pour cela, quatre tests successifs ont été mis en place, le *grip strength* (GS), le *wire mesh hang* (WMH), l'*accelerating rotarod* (AR) et l'*open field* (OF).

II.1.7.3. Procédures des tests

Toutes les expérimentations décrites ci-dessous ont été réalisées dans une pièce attenante à l'animalerie. Les tests ont tous été réalisés en matinée après avoir laissé les animaux s'acclimater à la température et à l'ambiance lumineuse de la pièce pendant 30 minutes. Entre chaque animal, les tests ont été soigneusement nettoyés avec une solution hydro-alcoolique à 30 % d'éthanol. Pour éviter d'éventuels effets liés au passage de femelles sur le comportement des mâles (OF, AR), les expérimentations de la cohorte adulte ont été décalées afin que les mâles passent en test avant les femelles. Les mâles de la cohorte juvénile ont également été testés avant les femelles issues de la même portée. L'ordre de passage des animaux a été totalement randomisé entre les différents groupes afin de ne pas observer l'effet du cycle circadien sur l'activité des animaux. Un tableau récapitulatif des procédures relatives aux tests évaluant le comportement individuel est présenté à la fin de cette partie (**Tableau 13 p. 157**).

a) Grip strength

Principe : Le GS a été développé pour mesurer la force musculaire maximale des animaux testés (Maurissen *et al.*, 2003). Ce test informe sur la force déployée lors d'un effort intense et de courte durée produit par les pattes avant ou par les quatre pattes simultanément.

Procédure : Le dispositif utilisé était un appareil commercial modèle Bio-GS3 (Bioseb, France) couplé à un dispositif d'agrippement (barre en T pour les pattes avant ou grille pour les quatre pattes) (**Photo 14**). L'appareil se comporte comme un peson horizontal enregistrant la force maximale perçue lors de la traction. Ce test est réalisé à PND67 ou PND130 pour la cohorte juvénile et D70 ou D133 pour la cohorte adulte. Le test débute par le positionnement de l'animal les deux pattes avant sur la barre du T ou les quatre pattes sur la grille. L'animal est ensuite tiré progressivement vers l'arrière en le maintenant par la base de la queue. En réponse à cette traction, la souris testée exerce une brusque contraction de ses membres pour tenter de se soustraire à la préhension subie. Le test s'achève lorsque l'animal lâche le dispositif. Cinq essais successifs sont menés pour les deux mesures (pattes avant et quatre pattes).

Variables mesurées : La force maximale déployée lors de chaque tentative est notée et seule la meilleure performance pour chacune des deux mesures (pattes avant et quatre pattes) est enregistrée.



Photo 14 : Grip strength test (Bioseb.fr)

b) Wire mesh hang

Principe : Le WMH est un test d'endurance musculaire statique par agrippement d'un grillage retourné (Kondziella, 1964). L'effort déployé doit être constant et perdurer sur toute la durée du test qui permet de mettre en avant la résistance musculaire des animaux à un effort prolongé.

Procédure : Le dispositif utilisé était une grille de cage d'élevage composée de tiges d'acier de 1 mm de diamètre. Un support permet de déposer la grille à 40 cm au dessus d'une litière similaire à celle utilisée dans les cages d'élevage afin d'amortir la chute de l'animal. L'emplacement de la grille à une hauteur standardisée relativement élevée par rapport à la taille des animaux est important dans la mesure où à cet âge, les souris peuvent appréhender la hauteur de la chute et se laisser tomber avant d'être fatiguées si elles « jugent » que la chute n'est pas dangereuse. Ce test est réalisé à PND67 ou PND130 pour la cohorte juvénile et D70 ou D133 pour la cohorte adulte. Avant le début du test, les animaux sont pesés afin de prendre en compte l'impact du poids corporel sur les performances réalisées. Le test débute par le dépôt de la souris sur la grille. Cette dernière est ensuite retournée pour que la souris se retrouve suspendue sous la grille qui est déposée sur son support. Un chronomètre est lancé pour une durée maximale de cinq minutes. Le test se termine à la chute de l'animal ou au bout des cinq minutes. Les animaux passent le test trois fois avec une période de repos entre chaque essai.

Variables mesurées : Le poids des animaux est relevé. Le temps durant lequel les animaux sont capables de rester suspendus par les pattes avant de tomber dans le lit de sciure est noté pour chacun des trois essais. Seul le meilleur des trois essais est enregistré.

c) Accelerating rotarod

Principe : Le test AR est un test d'endurance musculaire dynamique mesurant la résistance physique des animaux lors d'une activité soutenue (marche ou course) (Pratte *et al.*, 2011). Le test consiste à imposer aux animaux une activité locomotrice de plus en plus soutenue afin de mettre en avant leur résistance à un effort soutenu.

Procédure : Le dispositif utilisé était un appareil commercial modèle RR-02 (Orchid Scientific, Inde). Cet appareil est composé d'un tube en rotation de 3 cm de diamètre dont la vitesse est contrôlée de façon électronique pour tester les animaux en marche, en course ou dans une activité hybride allant de la marche à la course en accélération constante (4 à 40 rotations par minute ou RPM sur 5 min). Des lames en PVC séparent des couloirs sur le cylindre permettant de tester jusqu'à 5 animaux simultanément. Le tube rotatif est situé à 15 cm au-dessus d'un système d'interrupteur à bascule permettant l'arrêt automatique du chronomètre pour chaque couloir. Ce test est réalisé à PND68 ou PND131 pour la cohorte juvénile et D71 ou D134 pour la cohorte adulte. Les souris sont placées sur le tube face au sens de rotation du tube de manière à les forcer à une marche en avant pour éviter la chute. Les animaux sont habitués au dispositif durant les deux jours précédents le test. La première habitude se fait sur 5 min de marche à 4 RPM. Le second entraînement consiste en une accélération de 2 à 20 RPM sur 5 min. Le jour du test, les animaux sont placés sur le tube pour 3 séances successives de 4 à 40 RPM sur 5 min, bénéficient d'un temps de repos puis repassent deux séances successives. Le test commence au départ de la rotation du tube. Afin de ne pas tomber, les animaux doivent assurer une activité locomotrice corrélée à la vitesse de rotation. Le poids des animaux est pris en compte car, comme dans le cas du WMH, celui-ci peut influencer sur les performances au test. Le test s'arrête quand l'animal tombe du tube sur l'interrupteur.

Variables mesurées : Le poids de l'animal est relevé. La durée avant la chute, la vitesse de rotation au moment de la chute et la distance totale parcourue sont notées pour chaque essai. Seul le meilleur des cinq essais est enregistré.

d) Open field

Principe : Ce test est similaire à celui déjà effectué pour mesurer l'activité locomotrice chez les souris à PND25 avec cependant une dimension adaptée à la taille des animaux adultes. Chez les adultes ce test permet une évaluation de l'activité locomotrice ainsi que du niveau d'anxiété des animaux évalués. L'OF est l'un des labyrinthes les plus couramment employés depuis sa mise au point dans les années 30. Ce succès repose sans doute sur la simplicité de ce test facile à mettre en place et à analyser (Walsh & Cummins, 1976). L'OF est réalisé à PND69 ou PND132 pour la cohorte juvénile et D72 ou D135 pour la cohorte adulte. A l'âge adulte, le dispositif utilisé est composé d'une enceinte cubique de 42 cm de côté, ouverte en son sommet et dont le plancher est divisé en 36 cases de 7 cm de côté (**Photo 15**). Ces cases définissent trois zones distinctes que sont la zone centrale (ZC) composée des 4 cases les plus au centre du dispositif (**Photo 15** – zone rouge), la zone intermédiaire (ZI) composée des 12 cases entourant la ZC (**Photo 15** – zone orange) et de la zone périphérique (ZP) composée des 20 cases les plus externes du dispositif (**Photo 15** – zone verte). Pour évaluer le niveau d'anxiété des animaux adultes, on considère des zones protégées et des zones aversives, anxiogènes. La ZP du dispositif représente une zone protégée puisque contre la paroi alors que la ZP et la ZC à découvert sont des zones anxiogènes pour les souris.

Procédure : La pièce d'expérimentation était éclairée en lumière rouge peu perceptible par les rongeurs (Jacobs, Williams & Fenwick, 2004). Le dispositif utilisé permettait de tester jusqu'à 4 animaux de manière simultanée. Les animaux de même sexe et issus d'une même portée dans le cas de la cohorte juvénile ont ainsi pu être testés de manière synchrone. Chaque session a été filmée afin d'être analysée ultérieurement à l'aide d'un logiciel mis au point au sein du laboratoire et codé sur Python. Lors du dépouillement, un animal était considéré dans une zone donnée lorsque ses quatre pattes s'y trouvaient. Comme pour les jeunes animaux, l'animal testé a été déposé au centre du dispositif et laissé libre d'explorer son environnement pendant une durée de 5 minutes.

Variables mesurées : sur l'analyse vidéo sont enregistrés : le temps passé et la distance parcourue dans chacune des trois zones ainsi que le nombre total de redressements.

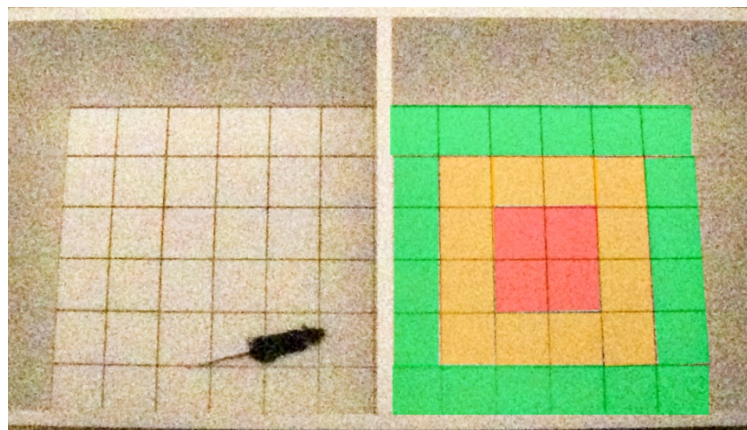


Photo 15 : Open-field (couleurs artificielles)

Tableau 13 : Récapitulatif des tests de comportement individuel à l'âge adulte

Tests	Age	Comportement évalué	Procédure				Variables relevées	Limites expérimentales
			Début du test	Fin du test	Temps	Nombre d'essais		
<i>Grip strength</i>	PND67 ou 130 et D70 ou 133	Force musculaire	Placement de l'animal sur le dispositif	Relâchement de l'agrippement		5	- Force développée par les pattes avant seules ou par les quatre pattes	
<i>Wire mesh hang</i>	PND67 ou 130 et D70 ou 133	Endurance musculaire statique	Retournement de la grille	Chute	≤ 5 min	3	- Poids de l'animal - Durée avant la chute	Hauteur de la grille
<i>Accelerating rotarod</i>	PND68 ou 131 et D71 ou 134	Endurance musculaire dynamique	Placement de l'animal sur le tube en rotation	Chute	≤ 5 min	5	- Poids de l'animal - Durée avant la chute, vitesse de rotation et distance totale parcourue	
<i>Open field</i>	PND69 ou 132 et D72 ou 135	Activité et anxiété	Animal placé au centre du dispositif	Fin des 5 min	5 min	1	- Distance parcourue et temps passé dans chaque zone - Nombre de redressements	

PND: *Post Natal Day*

II.2. Suivi des particules aluminiques chez des souris déficientes en autophagie

Cette autre expérimentation a été menée afin d'observer l'impact d'une déficience en autophagie sur la translocation systémique des particules aluminiques d'origine vaccinale. Pour cela, un adjuvant aluminique marqué de manière permanente afin de pouvoir être spécifiquement identifié a été injecté dans le TA de souris génétiquement modifiées présentant un défaut dans le mécanisme autophagique. Des analyses ont été réalisées trois semaines après injection afin de comparer la translocation de l'adjuvant injecté chez les souris mutantes et contrôles. Le résumé graphique de cette expérimentation est disponible **Figure 45 p. 245**.

II.2.1. Animaux

L'étude de la translocation des particules aluminiques a été réalisée chez des souris *Atg5* CKO mâles, génétiquement modifiées pour présenter une déficience en protéine ATG5 dans les cellules de la lignée myéloïde. Cette protéine étant indispensable à l'élongation des autophagosomes via le recrutement de la protéine LC3 (voir chapitre III.2. de la section contexte et problématique) les animaux *Atg5* CKO présentent un mécanisme autophagique déficient (Lodder *et al.*, 2015). Les souris *Atg5* CKO ont été générées par croisement de souris *Atg5^{flox/flox}* développées au Japon par le Pr Noboru Mizushima (Hara *et al.*, 2006) et de souris transgéniques exprimant la Cre-recombinase sous contrôle du promoteur M lysozyme (LysM-Cre) en provenance du laboratoire Charles River (France). Une lignée stable produisant des animaux *Atg5* CKO (*Atg5^{flox/flox} Cre+*) et des animaux contrôles (*Atg5^{flox/flox}*) a été générée après plusieurs rétrocroisements. Un total de 6 individus mâles issus de cette lignée et âgé de 3 mois nous a gracieusement été fourni par le Dr Fatima Teixeira-Clerc de l'unité de recherche 955 de l'INSERM (Lodder *et al.*, 2015). Les procédures utilisées lors de la manipulation des animaux ont respecté les recommandations de la directive européenne du 22 septembre 2010 concernant l'expérimentation animale (2010/63/UE) et ont été approuvées par le comité d'éthique de l'École Nationale Vétérinaire de Maisons-Alfort (Autorisations n° APAFIS #18036-2018121110303021 du 27 mars 2019).

II.2.1.1. Caractérisation phénotypique

La caractérisation du phénotype des souris *Atg5* CKO a été réalisée par diverses équipes ayant travaillé avec les mêmes animaux. Différents traitements appliqués à des cultures de macrophages péritonéaux ont attesté de l'impact de la mutation génétique sur les capacités autophagiques des monocytes de ces souris. Le traitement de cellules issues d'animaux *Atg5* CKO par la Rapa, un agent inducteur de l'autophagie, n'a pas produit d'augmentation de la présence de LC3-II ou de diminution de SQSTM1/p62 par comparaison avec les cellules compétentes des animaux contrôles (Lodder *et al.*, 2015; Santeford *et al.*, 2016). L'analyse de l'expression génique a confirmé une diminution de la production d'ARN messager *Atg5* chez les animaux *Atg5* CKO (**Figure 12**) en supplément d'un défaut de présence de vacuole

autophagique intra-cytoplasmique (Santeford *et al.*, 2016). Cette réponse atteste des capacités autophagiques réduites dans les cellules de la lignée myéloïde des souris *Atg5* CKO.

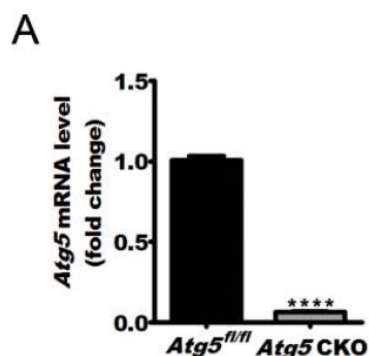


Figure 12 : Quantification de l'expression génique de *Atg5* dans les macrophages des souris *Atg5* CKO

Reproduction de la figure originale 1A de Santeford *et al.*, (2016).

De plus, les cellules de Kupffer (macrophages hépatiques) issues des souris *Atg5* CKO se sont révélées être plus sensibles à la présence de LPS. En effet, des taux plus importants d'IL-1 α et IL-1 β ont été retrouvés dans ces cellules après exposition à la Rapa par comparaison avec les cellules des animaux contrôles (Lodder *et al.*, 2015). Cette réponse inflammatoire exacerbée en cas d'inhibition de l'autophagie a été retrouvée dans plusieurs autres études utilisant le même modèle génétique (Liu *et al.*, 2015; Santeford *et al.*, 2016). D'après les auteurs, l'augmentation de la réponse inflammatoire en cas d'inhibition de l'autophagie serait en partie due à la production de ROS plus importante dans les cellules déficientes pour *Atg5* (Lodder *et al.*, 2015). En effet, il a été proposé que le taux des ROS agisse sur la polarisation des macrophages, et donc leur statut inflammatoire, de manière hormétique (Tan *et al.*, 2016). Ainsi, à partir d'un certain seuil, la présence de ROS dans les macrophages orienterait ces derniers vers la voie pro-inflammatoire M1 (Calabrese *et al.*, 2018).

II.2.1.2. Conditions d'hébergement

Les animaux ont été élevés en animalerie libre de pathogènes (EP3) et maintenus par fratrie en séparant les mâles des femelles après sevrage. L'identification individuelle des animaux a été assurée par l'utilisation de puces électroniques. Des conditions de température (22 ± 2 °C) et d'humidité (55 ± 10 %) habituelles ont été respectées dans l'animalerie et la nourriture et l'eau étaient disponibles *ad libitum* sur toute la durée de l'étude. Un cycle lumineux standard a été mis en place (lumière allumée de 7 h à 19 h).

II.2.1.3. Génotypage des animaux

L'identification du génotype des animaux a été effectuée dès leur arrivée. Pour cela, un échantillon de queue a été prélevé sur les animaux afin d'être analysé par une technique de PCR conventionnelle. L'extraction d'ADN a été réalisée dans 400 µl d'un tampon de NaOH à 0,05 N chauffé à 99 °C sous agitation à 1000 RPM durant 30 min. L'action de la soude a été neutralisée par ajout de 120 µl de Tris HCl 1 N et la solution de 520 µl obtenue a été centrifugée 7 min à 4 °C et 14000 RPM afin de culoter les éventuels débris non dissout.

L'ADN obtenu a été utilisé pour amplifier spécifiquement les séquences correspondantes aux gènes Atg5, Atg5^{flox} et LysM-Cre par l'utilisation des sondes suivantes :

Atg5 WT For (forward 5'-GAATATGAAGGCACACCCCTGAAATG-3')

Atg5flox For (forward 5'-ACAACGTCGAGCACAGCTGCGCAAGG-3')

Atg5 Rev commune (forward 5'-GTACTGCATAATGGTTTAACTCTTGC-3')

Cre For (forward 5'-GGACATGTTTCAGGGATCGCCAGGCG-3')

Cre Rev (forward 5'-GCATAACCAGTGAAACAGCATTGCTG-3')

Les gènes Atg5 ont été amplifiés à une température d'hybridation de 58 °C et la Cre-recombinase à 62,5 °C avec une séquence de 35 cycles grâce à une machine de PCR Mastercycle Nexus GX2 (Eppendorf). La séparation des produits de PCR a été réalisée par migration dans un gel à 2 % d'agarose contenant du GelRed[®] (Biotium), un intercalant de l'ADN fluorescent aux UV. La révélation a été photographiée grâce à une machine d'imagerie E-Box (Vilber).

II.2.2. Traitement

Le suivi de particules d'aluminium vaccinal n'est pas aisé. En effet, la mesure de la présence d'Al dans les analyses par des méthodes conventionnelles ne peut garantir que cet élément provient bien du traitement et pas d'une contamination extérieure via l'eau de boisson ou l'alimentation par exemple. La garantie de la provenance de l'Al ne peut être obtenue que si le produit injecté est identifiable par lui-même. De plus, cette identification ne doit pas se faire au détriment des propriétés physico-chimiques du composé initial au risque d'observer une réponse physiologique différente de celle obtenue avec le composé non marqué.

II.2.2.1. Choix de la méthode de marquage

Plusieurs méthodes de marquage de l'Al sont possibles. La plus simple, en termes de modifications apportées au composé initial, est le marquage par utilisation d'un traceur faiblement radioactif, l'isotope ²⁶Al, distinct de l'isotope naturel stable ²⁷Al par la perte d'un proton. Le principe repose sur un libre échange entre les atomes ²⁶Al et ²⁷Al par incubation longue du ²⁶Al avec de l'Alhydrogel[®] afin de marquer l'adjuvant officiel. La détection de l'isotope faiblement radioactif se fait ensuite par utilisation de la spectrométrie de masse par

accélérateur (Hem, 2002) permettant de détecter de très petites quantités d'Al (10^{-17} g). Cependant, au vu de la potentielle dangerosité des composés radioactifs et du coût de la technique de détection, cette méthode ne nous est pas apparue être optimale.

Une autre technique pour étudier la bio-distribution et le devenir des particules aluminiques d'origine vaccinale serait d'utiliser un traceur support à la surface duquel le composé à étudier serait fixé. Cette technique a été utilisée avec succès en 2013 afin de suivre la translocation de particules d'Al dans le corps suite à une injection IM. Dans cette étude, le traceur était constitué d'un cœur de rhodamine B sur lequel de l'AH a été déposé (Khan *et al.*, 2013). L'observation de la fluorescence du noyau de rhodamine à 560 nm après excitation à 496 nm a permis le suivi des particules injectées. Bien qu'ayant fait ses preuves, cette technique présente néanmoins l'inconvénient majeur d'utiliser une particule dont les propriétés de charge, de taille et de toxicité ne sont pas connues et sont donc potentiellement différentes de celles de l'adjuvant commercial.

Le choix a été fait d'utiliser une technique de marquage par adjonction d'un traceur fluorescent sur l'adjuvant natif afin de suivre son devenir sans en altérer les propriétés. Cette technique utilise des fND liés par le biais d'interactions électrostatiques et/ou interactions hydrogène à l'AH sous la forme d'un complexe, préparé par le Dr Marie-Odile David de l'unité de recherche 1204 de l'INSERM à l'université d'Évry, et dont la préparation est détaillée dans le paragraphe suivant.

II.2.2.2. Préparation du complexe Alu-Dia

Dans cette expérimentation, les injections ont été réalisées avec un complexe appelé Alu-Dia, composé d'AH marqué par l'adjonction de fND. Les nano-diamants ont été obtenus à partir de microdiamants irradiés sous bombardement électronique puis recuit à haute température sous atmosphère inerte avant d'être broyés pour obtenir des particules de taille nanométrique. (Boudou *et al.*, 2009). La fluorescence caractéristique de ces particules provient des centres NV qui ont été créés dans le cristal par irradiation électronique suivi d'un recuit sous vide à 850 °C. Les fND produits ont été décontaminés par traitement aux acides durs (HF / HNO₃) puis nettoyés à l'eau. La surface des particules a été traitée à l'acide perchlorique pour la saturer de groupements hydroxyles servant de liens avec l'adjuvant commercial (Boudou, 2013).

Un adjuvant commercial d'AH (Alhydrogel[®], InvivoGen, San Diego, USA) a été utilisé pour produire le complexe Alu-Dia final selon une méthode décrite en 2015 (Eidi *et al.*, 2015). Des suspensions de fND fonctionnalisés (Boudou, 2013) à 1,3 g/ml et d'Alhydrogel à 10 mg Alum/ml ont été mélangées par sonication dans des proportions de 1:17 v/v afin de permettre la formation d'un complexe entre les deux composés. La suspension d'Alu-Dia a été diluée en PBS jusqu'à la concentration désirée.

Une analyse détaillée de l'Alu-Dia a démontré que les particules d'adjuvant marquées par fND conservent des propriétés de taille et de potentiel zêta très proches de celles de l'alhydrogel initial ou de celles des particules présentes dans le vaccin commercial Engerix B[®] (Eidi *et al.*, 2015) (**Tableau 3 p. 57**). Ce marquage permanent de l'AH permet donc de suivre le composé injecté par détection de la fluorescence caractéristique des fND émettant dans le rouge lointain supérieur à 600 nm (max à 680 nm) après une excitation à 532 nm (max à 550 nm) (**Figure 13**). Un co-marquage au Morin, marqueur de l'Al émettant à 520 nm après excitation à 420 nm a démontré la bonne stabilité du composé et le possible marquage de l'Al sans modification des propriétés fluorescentes des fND (Eidi *et al.*, 2015). De plus, l'Alu-Dia a été très bien toléré et ne modifie pas la réponse cellulaire des cellules neurales exposées. En effet, si les fND seuls ne présentaient qu'une faible toxicité à forte concentration, l'Al présentait des signes de toxicité dès les plus faibles doses. La présence du traceur aux fND ne change pas fondamentalement la toxicité de l'adjuvant (Eidi *et al.*, 2015) permettant ainsi le suivi d'un composé qui a de grandes chances d'être traité par les cellules de la même manière que l'adjuvant commercial.

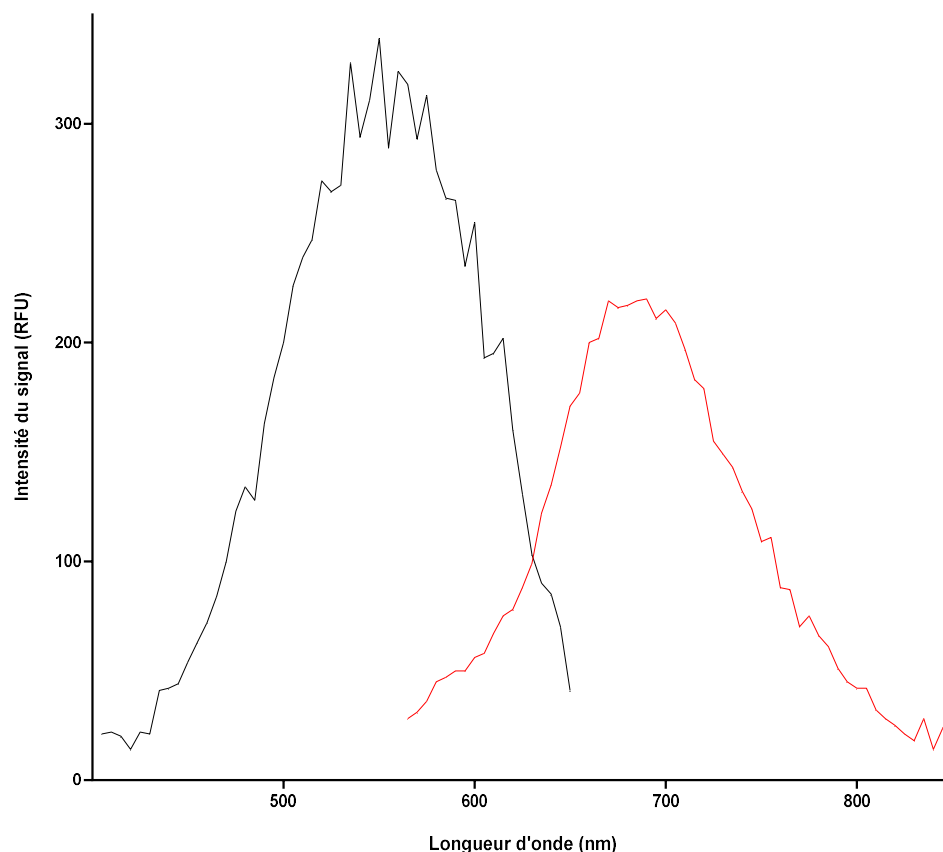


Figure 13 : Spectres d'excitation (noir) et d'émission (rouge) des centres fluorescents NV des nano-diamants fluorescents.

Les mesures ont été réalisées sur un lecteur Infinite[®] M 200 PRO (Tecan).

II.2.2.3. Protocole d'exposition et dose choisie

Dès la conception de cette expérimentation, il a été décidé que les conditions expérimentales utilisées devraient être les plus proches possible de celles utilisées dans les études antérieures de l'équipe afin de se placer dans la continuité de ces dernières. Ainsi la dose d'Alu-Dia de 200 µg/kg a été sélectionnée. Les données précédentes de l'équipe ont démontré pour cette dose la translocation des particules d'Alu-Dia depuis le site d'injection jusqu'à des organes distants tels que le cerveau après injection sc, ainsi que l'apparition de troubles du comportement et augmentation de la concentration cérébrale d'Al après injection IM (Crépeaux *et al.*, 2015; 2017; Eidi *et al.*, 2015).

La quantité de 200 µg/kg d'Alu-Dia correspond à la moitié de la dose extrapolée de la dose médiane d'Al reçue par les patients MFM. Ces patients étant majoritairement des femmes dont le poids normalisé a été défini à 60 kg et ayant reçu un nombre médian de 4 injections d'Engerix B[®] contenant 500 µg d'Al, la dose d'Al reçue correspond donc à 8,3 µg/kg pour une injection Engerix B[®] soit 33 µg/kg pour les quatre injections reçues. La dose de 400 µg/kg d'Alu-Dia a été obtenue en appliquant la correction allométrique permettant d'extrapoler la dose équivalente chez la souris (x 12,3). Cette dose de 400 µg/kg a précédemment été utilisée chez la souris C57BL/6 où une translocation cérébrale a été observée 21 jours après injection du composé dans le TA (Eidi *et al.*, 2015). Cependant, afin de prendre en compte le potentiel impact de la taille des agglomérats particuliers d'Al sur la translocation et les effets neurologiques associés (Crépeaux *et al.*, 2015; 2017); la dose de 200 µg/kg a été sélectionnée afin d'être administrée aux animaux dans un volume d'injection de 20 µl. Chez la souris CD1, cette dose de 200 µg/kg a, en effet, été la seule à provoquer des troubles du comportement par comparaison avec des doses plus importantes et dont la taille moyenne des agglomérats est également plus importante (Crépeaux *et al.*, 2017).

Le jour de l'injection, les animaux ont été anesthésiés par inhalation d'isoflurane. Leur patte postérieure droite a été rasée et un volume de 20 µl d'adjuvant marqué aux nano-diamants a été injecté dans le TA à l'aide d'une seringue Hamilton de 25 µl et d'une aiguille de précision de 30 gauges afin de minimiser la taille de la lésion et le traumatisme musculaire en découlant. Les animaux ont ensuite été laissés au repos et différentes analyses ont été réalisées 21 jours après l'injection.

II.2.3. Suivi des particules d'Alu-Dia

II.2.3.1. Préparation des tissus

Les animaux ont été euthanasiés par dislocation cervicale 21 jours après l'injection IM d'Alu-Dia. Les différents organes analysés (TA, ganglions lymphatiques poplitée et inguinal, rate et cerveau) ont été prélevés rapidement et fixés 2 heures en solution de paraformaldehyde (PFA) à 4 %. Les TA ont ensuite été traités en solution de sucrose à 40 % et les autres organes en solution de sucrose à 20 % afin de les protéger de l'éclatement cellulaire lors de la congélation. Les différents organes ont été montés en OCT (Tissue-Tek[®]) sur bouchon de liège et congelés par immersion en isopentane (env. -70 °C) refroidi en bain d'azote liquide afin d'obtenir une congélation rapide sans endommager les tissus. Les organes montés ont été conservés à -80 °C jusqu'aux analyses en prenant des précautions pour limiter les possibles contaminations externes en Al.

Des coupes sériées ont été réalisées au cryostat à -15 °C afin d'obtenir plusieurs jeux de lames présentant des coupes adjacentes. Les séries étaient constituées de dix lames SuperFrost[®]-plus sauf pour les ganglions, plus petits, où les séries ont été réalisées sur cinq lames. Les coupes adjacentes ont été déposées lame par lame jusqu'à la dernière avant de reprendre au début de la série. Cette technique a permis d'obtenir des lames présentant l'intégralité de l'épaisseur des organes en analysant 1/10^{ème} (ou 1/5^{ème} pour les ganglions) des coupes réalisées. Les organes ont été coupés selon un plan longitudinal sur une épaisseur de coupe de 12 µm pour les ganglions, 20 µm pour le TA et la rate et 40 µm pour le cerveau. L'ensemble des lames a été mis à sécher durant deux heures sous hotte avant d'être stocké à une température de -80 °C.

II.2.3.2. Mise en évidence de la présence de granulomes musculaires

Une coloration de type hématoxyline-éosine (HE) a été réalisée afin de révéler la présence d'une infiltration de cellules immunitaires dans le muscle. Cette coloration bichromatique se compose d'un colorant nucléaire, l'hématoxyline, et d'un colorant cytoplasmique, l'éosine. L'hématoxyline est un colorant cationique, dit également basique, qui a une affinité pour les éléments cellulaires dits basophiles. Il colore notamment les noyaux en bleu/violet, en se fixant sur les acides nucléiques. A contrario, l'éosine est un colorant anionique qui a une affinité pour les éléments cellulaires dits éosinophiles. Il colore le cytoplasme en rose et les autres éléments cellulaires basiques en rose/rouge plus ou moins vifs. Ce marquage permet de mettre en avant la présence des cellules immunitaires formant un granulome dans les muscles injectés. En effet, les grands amas de monocytes et macrophages présents dans le muscle lors d'une réaction immunitaire sont colorés d'une teinte rose/violacée distincte des fibres musculaires environnantes majoritairement rose pâle.

Huit séries de lames par TA ont été utilisées afin de réaliser la coloration HE selon le protocole suivant :

- Séchage des lames à température ambiante sous hotte
- Préparation de la solution d'hématéine (produit oxydé de l'hématoxyline) ou hemalun acide de Mayer : solution aqueuse à 50 g/l d'alun de potassium ($\text{AlK}(\text{SO}_4)_2 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$) (Sigma-Aldrich), 0,2 g/l d'iodate de sodium (NaIO_3) (Sigma-Aldrich), 1 g/l d'hématoxyline cristallisée (Fluka)
- Préparation de la solution d'éosine : solution à 10 g/l d'éosine aqueuse à 1 % stabilisée (Ral)
- Coloration en bain d'hématéine pendant 10 minutes
- Rinçage à l'eau contenant quelques gouttes d'acide acétique
- Coloration en bain d'éosine pendant 5 minutes
- Rinçage à l'eau distillée
- Déshydratation par bains successifs d'éthanol à 70°, 95°, 100° (I) puis 100° (II) durant quelques secondes
- Sous hotte, passage des lames en bain de xylène durant 1 minute
- Montage des lamelles au baume du Canada (Sigma-Aldrich)
- Séchage minimum de 24 heures à température ambiante sous hotte
- Conservation des lames à température ambiante

L'ensemble des lames a été observé en microscopie optique à lumière transmise avec un microscope Leica DMLB équipé d'un objectif 10X et d'une caméra couleur Olympus UC90 présentant une définition de 1688x1352 pixels, une résolution de 96 ppi. Une analyse semi-quantitative des granulomes observés a été effectuée. Les granulomes présents dans les muscles ont été répartis en trois catégories en fonction de leur taille : petits (+), moyens (++) et grands (+++) granulomes. Le pourcentage de chaque taille de granulome a ensuite été calculé pour chaque groupe. Le nombre de coupes sans granulome a été relevé et le pourcentage de coupes sans granulome a été calculé pour chaque groupe.

II.2.3.3. Quantification de la présence/translocation d'Alu-Dia

a) Co-marquage Alu-Dia/Morin

Bien que la stabilité du complexe Alu-Dia lors de sa translocation ait déjà été démontrée (Eidi *et al.*, 2015), un marquage ciblant l'Al a été réalisé afin d'observer un double signal provenant de la particule d'Al et du fND accompagnateur afin d'assurer la provenance des particules détectées et quantifiées lors de cette analyse. La présence d'Al sur les coupes a été mise en évidence par une coloration au Morin selon un protocole corrigé par Mold *et al.* afin d'améliorer la qualité des observations (Mold *et al.*, 2019). Le Morin ou 2',3,4',5,7-Pentahydroxyflavone (Sigma-Aldrich) est un colorant flavonoïde issu des feuilles de goyavier (*Psidium guajava*), ayant la particularité de s'agréger avec l'aluminium en formant des complexes fluorescents vert-bleutés (Malinin & Malinin, 1991) détectables après excitation à 420 nm sous la forme d'une fluorescence à 520 nm. Cette molécule est également capable de

se lier à d'autres éléments comme le bore, le béryllium, le zinc, le gallium, l'indium et le scandium (Chkheidze *et al.*, 2017). Dans le protocole ci-dessous, la coloration au Morin a été couplée au noir du soudan (Sigma-Aldrich), utilisé comme agent de contraste pour limiter la perturbation du signal due à l'auto-fluorescence émise par les tissus.

Une série de lames par organe a été utilisée pour réaliser le marquage au Morin selon le protocole suivant :

- Séchage des lames à température ambiante sous hotte
- Coloration en solution de Morin : 0,2 % w/v en éthanol à 85° pendant 30 minutes
- Lavage en éthanol à 85° pendant 30 secondes
- Lavage en eau ultrapure pendant 35 secondes
- Coloration en solution de noir du soudan : 0,3 % w/v en éthanol à 70° pendant 10 minutes
- Lavage en éthanol à 70° pendant 30 secondes
- Lavage en eau ultrapure pendant 30 secondes
- Montage des lamelles en *Dako fluorescent mounting medium* (Agilent)
- Séchage minimum de 2 heures à température ambiante sous hotte
- Conservation des lames à -20 °C

b) *Le transfert d'énergie entre molécules fluorescentes*

La détection du marquage au Morin a été effectuée avec un set de filtres appelé « canal Morin » et comprenant un filtre d'excitation laissant passer les longueurs d'onde de 391 à 437 nm, un miroir dichroïque de 470 nm et un filtre d'émission récupérant les longueurs d'onde allant de 508 à 554 nm. La fluorescence des fND a été observée grâce à un set de filtres appelé « canal fND » et composé d'un filtre d'excitation laissant passer les longueurs d'onde comprises entre 535 et 585 nm, un miroir dichroïque de 605 nm et un filtre d'émission récupérant les longueurs d'onde supérieures à 647 nm. L'analyse de la co-localisation du marquage au Morin et de la fluorescence des fND a été attestée par une méthode dite de transfert d'énergie entre molécules fluorescentes (FRET). Cette technique utilise une particularité des deux fluorochromes utilisés : la longueur d'onde d'émission du Morin est suffisamment proche de la longueur d'onde d'excitation des fND pour permettre leur excitation si le complexe Alu-Dia reste intègre durant sa translocation. Ainsi si l'excitation du Morin permet la détection de la fluorescence spécifique des fND, cela signifie que les deux marquages sont physiquement proches et que la particule observée est bien un complexe Alu-Dia provenant de l'expérimentation. Pour observer ce FRET, un set de filtres spécifique appelé « canal FRET » a été utilisé combinant le filtre d'excitation du Morin entre 391 et 437 nm, le miroir dichroïque de 470 nm et le filtre d'émission supérieur à 647 nm. Le spectre de fluorescence du signal observé a été analysé sur un microscope Zeiss Axioplan 2 équipé d'un objectif 1.4 NA à immersion et équipé d'un spectromètre Acton SP2150i (Princeton Instruments, Buckinghamshire, UK) afin de garantir la présence de fND par leur spectre d'émission caractéristique (**Figure 14**). L'ensemble des sets de filtres utilisés dans cette étude a été composé et commandé spécifiquement auprès du fabricant du microscope utilisé (Carl Zeiss S.A.S, Marly le Roi, France).

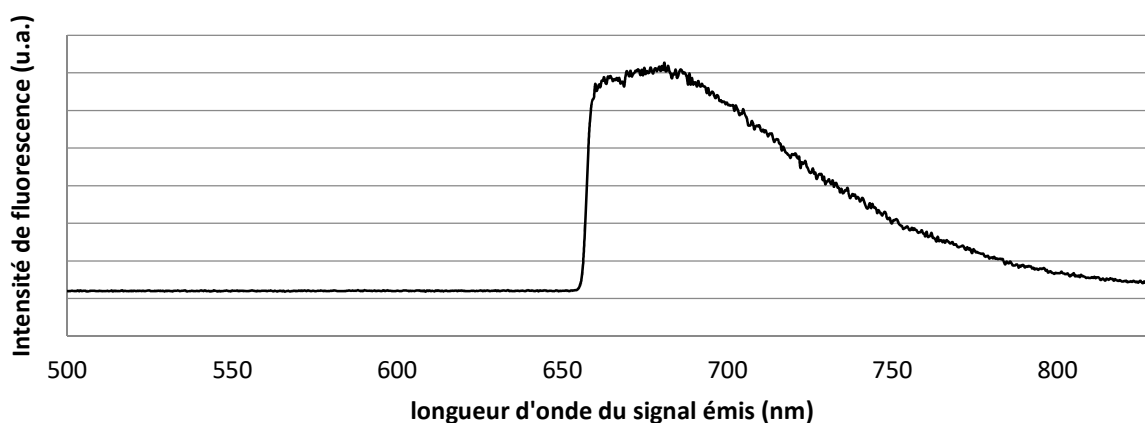


Figure 14 : Spectre d'émission caractéristique des nano-diamants fonctionnalisés observés dans le canal FRET.

u.a. : Unité arbitraire obtenue lors de la lecture du signal par le spectromètre.

Des tests préalables à la quantification de la translocation des particules d'Alu-Dia ont été réalisés afin d'apprécier la spécificité et la qualité du signal obtenu dans le canal FRET. Pour cela, des lames blanches de fND seuls ou de coupes d'organes sans coloration au Morin ont été imagées dans les canaux FRET et fND en utilisant plusieurs temps de pose similaires entre les deux canaux afin de comparer les signaux obtenus dans les deux cas. Les images réalisées ont été analysées avec le plug-in natif Spot Detector (Olivo-Marin, 2002) inclus au logiciel Icy (V 2.1.4.0 BioImage Analysis unit, Institut Pasteur, France) (de Chaumont *et al.*, 2012) en utilisant une échelle de 2 et un seuil de sensibilité de 20, calibré sur les images prises dans le canal fND pour garantir l'objectivité et la reproductibilité des tests.

L'observation de fND seuls a permis de constater que certains gros fND sont détectés dans le canal FRET. Cette réponse reste cependant de faible intensité et peut être grandement réduite en diminuant la durée d'exposition. La détection indésirable des grosses particules de fND est due à la présence dans leur structure cristalline de centres NVN capables de fluorescer en rouge en réponse à une excitation par une lumière bleue. La fluorescence observée correspond alors à la queue de distribution du spectre d'émission et explique la faible intensité des spots détectés. Les plus petites particules ne sont en revanche pas détectées même en utilisant une durée d'exposition longue saturant le signal obtenu dans le canal fND. Pour exemple, une prise de vue permettant la détection de 13 spots dans le canal fND ne permet la détection que d'un spot dans le canal FRET. L'augmentation de la durée d'exposition permet la détection maximale de 196 spots dans le canal fND quand la détection dans le canal FRET reste de un spot.

L'observation de coupes de ganglions inguinaux et poplités sans coloration au Morin a permis de constater que la forte auto-fluorescence des tissus dans le vert pouvait causer un biais dans l'observation des fND dans le canal FRET. En effet, l'auto-fluorescence des tissus dans le vert semble être en mesure d'exciter partiellement les fND, y compris pour les petites particules, qui produisent alors une fluorescence faible mais détectable (de l'ordre du dixième

de l'intensité obtenue dans le canal fND à durée d'exposition équivalente). La durée d'exposition devient alors un facteur clé pour limiter l'acquisition de signal en provenance de ces fND pouvant ne pas être inclus dans les particules d'Alu-Dia.

Gardant à l'esprit que la comparaison de coupes avec et sans Morin est complexe dans la mesure où il est illusoire de vouloir trouver des champs d'observations présentant un nombre commun de fND visibles, de même taille/intensité avec une auto-fluorescence du tissu similaire pour une durée d'exposition donnée, des observations ont été faites sur des coupes de ganglions et de muscles pour observer l'efficacité globale de la technique. Les images réalisées confirment la possible détection des petits fND même sans Morin si la durée d'exposition est assez longue et l'auto-fluorescence du tissu suffisamment forte. L'intensité du signal de ces fND est en revanche restée faible, quelquefois confondue avec l'auto-fluorescence des tissus dans le rouge ne permettant plus sa détection par le logiciel et permettant une élimination numérique de ce signal par comparaison avec celui obtenu en présence de Morin. La durée d'exposition lors de l'acquisition des images et le seuillage du signal lors de l'analyse des prises de vues sont donc les facteurs clé à prendre en compte pour limiter les biais expérimentaux permettant la détection de particules de fND sans garantie de leur inclusion dans les complexes Alu-Dia.

c) Quantification de la translocation des particules d'Alu-Dia

L'ensemble des lames a été observé en microscopie optique à fluorescence sur un microscope Zeiss Axio Observer Z1 avec un objectif X20 pour le TA, le ganglion lymphatique poplité et inguinal et X63 à immersion pour la rate et le cerveau. Sur la base des observations faites durant les tests préalables, décrits ci-dessus, une prise de vue a été opérée sur chaque zone de présence de fND au sein de chaque coupe analysée. Les clichés ont été centrés pour imager un maximum de fND. Chacun des trois canaux Morin, fND et FRET a été imagé en limitant la durée d'exposition pour obtenir un signal visible mais peu intense afin de réduire au maximum la détection de fND ne répondant pas aux conditions de FRET. Les temps de pose ont été fixés pour chaque organe et maintenus constants pour l'ensemble des individus. Les images ont été enregistrées indépendamment sous format TIFF avec une caméra Zeiss AxioCam MRm présentant une définition de 1388x1040 pixels, une résolution de 96 ppi et un codage sur 16 bits. L'échelle a automatiquement été enregistrée dans les métadonnées des images afin de pouvoir effectuer des mesures lors de l'analyse.

La quantification et la mesure des particules détectées sur les clichés de microscopie ont été réalisées à l'aide d'une macro d'analyse conçue pour obtenir des mesures standardisées et reproductibles à l'aide du logiciel ImageJ (V1.53i Wayne Rasband and contributors, National Institute of Health, USA) (Schneider, Rasband & Eliceiri, 2012) intégré au logiciel Icy (V 2.1.4.0 BioImage Analysis unit, Institut Pasteur, France) (de Chaumont *et al.*, 2012). La macro développée pour cette analyse utilise les images des canaux Morin et FRET afin de ne conserver que les objets dont la fluorescence est visible dans les deux canaux et permet ainsi de s'affranchir d'une grande partie de l'auto-fluorescence des tissus. Les objets sélectionnés sont ensuite automatiquement comptés et mesurés.

Pour chaque prise de vue, le nombre de particules identifiées et la surface de chacune des particules ont été enregistrés. Pour chaque individu, le nombre de coupes par organe et le nombre de prises de vue effectuées ont été notés. Le nombre moyen de particules par coupe, la surface minimale, moyenne et maximale des particules de chaque organe ont ainsi été calculés.

III. Analyses statistiques

L'ensemble des données obtenues dans les différentes parties expérimentales décrites précédemment a été analysé avec le logiciel SPSS 25.0 pour Windows (SPSInc., Chicago, Il., USA) et par le logiciel GraphPad Prism (V7.00, San Diego, California USA) pour la réalisation de certains graphiques. Le seuil de significativité est fixé à $p = 0,05$.

Les données obtenues pour des effectifs suffisamment importants ont été analysées par un test de **Shapiro-Wilk** afin de s'assurer de la normalité de leur distribution. Les données suivant une loi de distribution normale ont été analysées par des tests paramétriques et des tests non paramétriques ont été appliqués dans le cas contraire.

Les données issues de l'**expérimentation *in vitro*** ont été analysées par des **tests non paramétriques** en raison du faible effectif de chaque groupe. La distribution **d'âge** des individus a été comparée par un test de **Mann-Whitney**.

Les **comparaisons intergroupes** des données relatives à l'internalisation des particules ont été réalisées par un test de **Mann-Whitney**. Un test de **corrélation de Spearman** visant à explorer le lien entre l'âge des donneuses et chaque variable relevée a été effectué de façon globale et au sein de chaque groupe.

Les données obtenues par western-blot pour la **mesure du flux autophagique** ont fait l'objet d'une **comparaison intergroupe** par le test de **Mann-Whitney**. Un test de **corrélation de Spearman** a été effectué, de façon globale et au sein de chaque groupe, afin d'explorer le lien entre l'âge des donneurs et chaque variable relevée. Les **comparaisons intragroupes** des variables appariées ont été réalisées par un test de **Friedman** suivi d'un test de **Wilcoxon** pour les comparaisons deux à deux lorsque cela était approprié.

Les quantifications de **cytokines** relevées dans les différents groupes ont été comparées par le test de **Mann-Whitney**. La relation entre l'âge des donneurs et les différentes cytokines ont fait l'objet d'un test de **corrélation de Spearman** global et au sein de chaque groupe. Des comparaisons intragroupes ont été menées avec le test de **Friedman** pour échantillons appariés, suivi d'un test de **Wilcoxon** pour les comparaisons deux à deux le cas échéant.

Les données issues des tests de **développement sensori-moteur** ont été analysées par le test non paramétrique de **Kruskal-Wallis** suivi d'un test de **Mann-Whitney** pour la comparaison intergroupe quand cela était approprié. Le test de **chi-deux de Pearson** a été appliqué à l'analyse du taux de réussite des animaux aux tests de développement. Les analyses ont été réalisées sur l'ensemble des animaux, mâles et femelles confondus avant une séparation des genres à PND25.

L'évolution du **poids** des animaux a été analysée par une **ANOVA à deux facteurs** (« traitement » et « sexe ») suivie d'un test Post-hoc de **Dunnett's** le cas échéant.

Concernant les tests de **comportement maternel**, le test de construction du nid a été analysé avec un test du **chi-deux de Pearson** et le test de ramassage des jeunes a été analysé à l'aide d'une **ANOVA à deux facteurs** dont un répété (« traitement » et « jour de test ») et du chi-deux de Pearson.

Les **données comportementales** relevées à **l'âge adulte** ont été analysées par des tests paramétriques. **L'ANOVA à deux facteurs** a été utilisée pour mettre en évidence les effets de l'exposition à l'hydroxychloroquine et du sexe dans l'expression du comportement de l'animal. En cas d'effet significatif du traitement, une analyse à postériori de **Dunnnett's** a été réalisée.

En raison des effectifs limités de chaque groupe, les résultats issus des westerns blot et des dosages sériques en HCQ ont été analysés par le test non paramétrique de **Kruskal-Wallis** suivi du test de **Mann-Whitney** pour les comparaisons intergroupes. En raison des procédures de génération des données, mâles et femelles ont été analysés séparément sans comparaison de ces données entre elles. Les comparaisons à posteriori ont été réalisées pour comparer l'effet de chaque traitement par rapport au contrôle.

Les données obtenues pour les **analyses histologiques** des souris génétiquement modifiées étant de nature qualitative ordinale ou quantitative de faible effectif, elles ont été étudiées à l'aide du test non paramétrique de **Mann-Whitney**.

DONNÉES EXPÉRIMENTALES

« Quand la science a prononcé, il n'y a plus qu'à se taire »

Jules Verne (1828-1905)

Voyage au centre de la Terre

Cette section est dédiée à la description des résultats obtenus. Les résultats seront présentés dans le même ordre que celui utilisé dans la partie méthodologie.

Un premier chapitre sera consacré aux résultats de l'expérimentation *in vitro* : évaluation du flux autophagique et dosage des cytokines produites en réponse à la présence d'Al sur les cellules immunitaires des patients atteints de MFM et leur capacité d'internalisation de l'adjuvant.

Le second chapitre développera les résultats des expérimentations *in vivo* : tout d'abord l'effet du traitement pharmacologique décomposé comme suit : analyse des dosages sériques de la cohorte adulte, quantification protéique de la cohorte adulte puis juvénile, résultats aux tests de développement moteur et sensoriel, évaluation du comportement maternel puis évaluation du comportement individuel de la cohorte adulte puis juvénile. Enfin, une seconde partie sera consacrée aux résultats de suivi systémique des particules aluminiques chez le modèle génétique déficient en autophagie.

I. Capacité autophagique et réponse inflammatoire *in vitro* des cellules immunitaires

I.1. Rappel du protocole expérimental

Les données relatives aux prélèvements sanguins, à l'extraction et la conservation ainsi qu'aux conditions de culture et de traitement des cellules ont été décrites dans la section précédente. L'ensemble des analyses effectuées à la suite des cultures cellulaires y sont également détaillées (Chapitre I. de la section méthodologie).

Pour rappel, lors de cette expérimentation, des cellules immunitaires de type PBMC extraites de prises de sang réalisées chez des patientes MFM ou des sujets contrôles ont été mises en cultures et différenciées durant une semaine avant d'être mises en présence de particules d'Al afin d'observer l'internalisation des particules par les cellules, le flux autophagique basal ainsi que les réponses autophagique et inflammatoire déclenchées par les particules aluminiques seules ou combinées à des antigènes. Dans la suite de cette section décrivant les résultats obtenus lors de cette expérimentation, le terme PBMC utilisé désignera donc toujours ces cellules préalablement différenciées.

La **Figure 15** illustre l'expérimentation réalisée sous forme de résumé graphique.

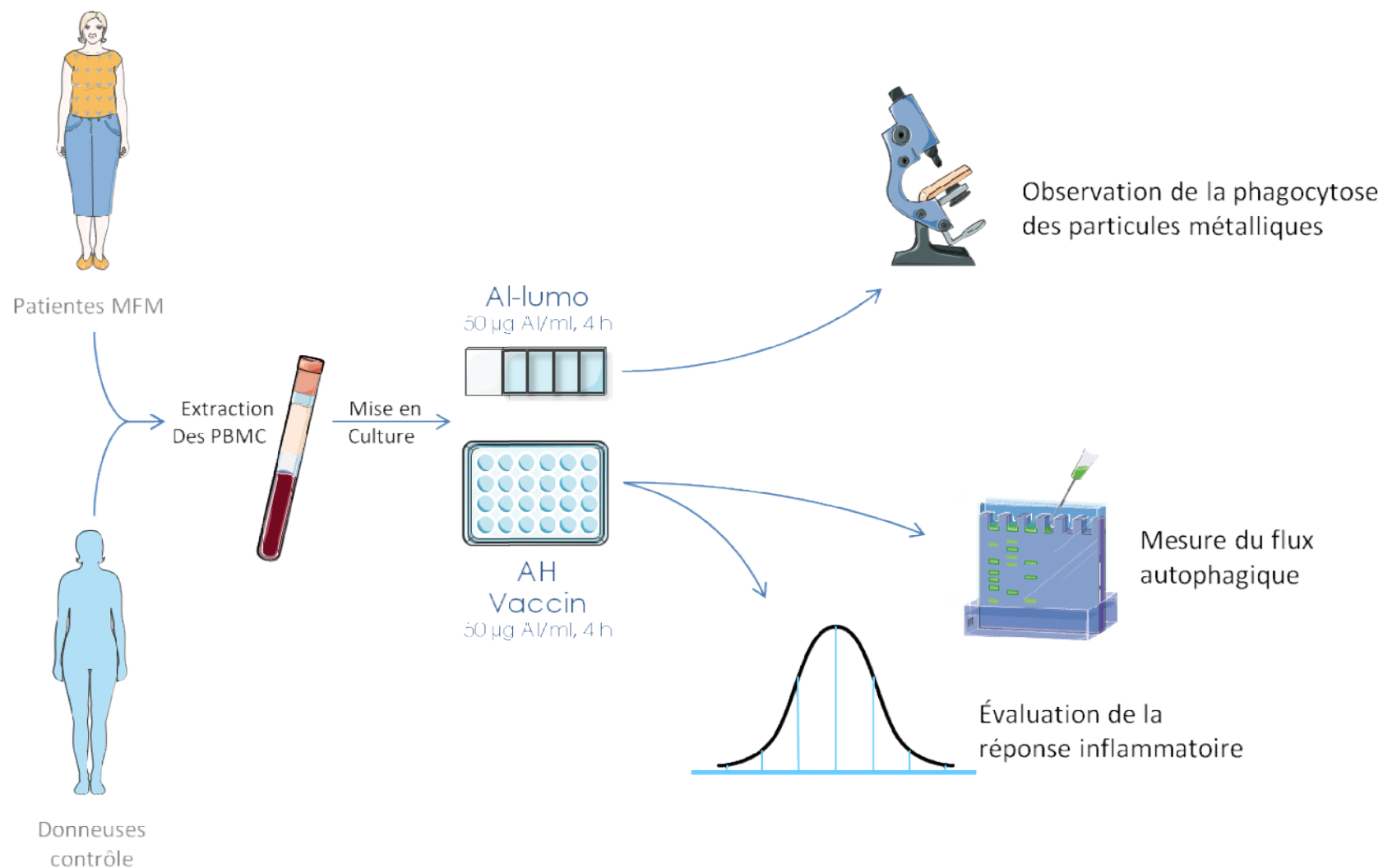


Figure 15 : Représentation graphique du déroulement de l'expérimentation *in vitro*

MFM : Myofasciite à macrophages ; PBMC : Cellules mononuclées de sang périphérique ; Al-lumo : AH marqué par lumogallion ; AH : Oxy-hydroxyde d'aluminium

I.2. Distribution des effectifs et des âges

Pour cette étude, les PBMC ont été extraites de prélèvements sanguins réalisés chez 11 donneuses contrôles et 8 patientes MFM. Les donneuses contrôles ont présenté une distribution d'âge allant de 42 à 65 ans avec une médiane de 48 ans quand les patientes MFM ont présenté des âges allant de 37 à 77 ans avec médiane de 56 ans (**Tableau 14**). L'analyse statistique a permis de conclure à une homogénéité de distribution d'âge entre les deux groupes.

Tableau 14 : Répartition des effectifs et distribution d'âge dans les différents groupes

Groupe	n	Âge min	Âge médian médiane (quartiles)	Âge max	Test U de Mann-Whitney	
					U	<i>p.</i>
Contrôle	11	42	48 (48 – 54)	65	89	<i>ns</i>
MFM	8	37	56 (51,25 – 68,5)	77		

ns : non significatif

L'internalisation des particules métalliques d'Al-lumo par les PBMC a été observée chez 10 contrôles et 8 MFM.

La mesure du flux autophagique a été réalisée sur l'ensemble des effectifs pour les protéines LC3-I, LC3-II, SQSTM1/p62 et IRGM soit 11 contrôles et 8 MFM et avec un effectif de 8 contrôles et 8 MFM pour la protéine Rubicon.

L'évaluation de la réponse inflammatoire des PBMC a été effectuée pour l'ensemble des 11 contrôles et des 8 MFM.

I.3. Phagocytose des particules métalliques

Les différentes variables relevées lors de l'observation des cellules ayant été mises en contact avec de l'Al-lumo et une sonde fluorescente, marquant la présence des lysosomes dans le cytoplasme, attestent de l'homogénéité des analyses menées. Le nombre de cellules analysées ne s'est pas révélé être différent d'un groupe à l'autre. De même, les tailles minimales, moyennes et maximales des cellules observées ont été semblables entre les deux groupes, attestant d'une morphologie cellulaire similaire chez le groupe MFM et chez les individus contrôles (**Tableau 15**).

Les variables associées à la capacité de phagocytose des cellules ont été observées en quantité similaire au sein des groupes MFM et contrôle. L'intensité normalisée de lysotracker a attesté d'une présence lysosomale semblable entre groupe contrôle et MFM. L'intensité de fluorescence normalisée de lumogallion a quant à elle témoigné d'une capacité de phagocytose analogue entre les PBMC du groupe MFM et celles du groupe contrôle (**Tableau 15**).

Tableau 15 : Taille et nombre de cellules analysées au sein de chaque groupe et intensité de fluorescence normalisée de lysotracker et de lumogallion

Groupe	Contrôle	MFM	Mann-Whitney	
			U	<i>p</i>
Nombre de cellules	56,5 (55 - 58,5)	54,5 (53,25 - 57,75)	23	<i>ns</i>
taille minimale (μm^2)	189,1 (175,31 - 241,22)	195,76 (175,64 - 211,92)	39	<i>ns</i>
taille moyenne (μm^2)	373,14 (321,82 - 416,79)	360,93 (281,45 - 422,73)	35	<i>ns</i>
taille maximale (μm^2)	669,06 (525,26 - 723,09)	622,66 (506,96 - 903,49)	38	<i>ns</i>
Intensité de lysotracker/ μm^2 (u.a.)	121111,31 (67363,63 - 145954,02)	125442,03 (85496,11 - 138620,72)	37	<i>ns</i>
Intensité de lumogallion/ μm^2 (u.a.)	67536,94 (35399,89 - 76350,22)	64720,7 (45363,6 - 73423,63)	39	<i>ns</i>

Les résultats sont exprimés sous forme de médiane et quartiles (entre parenthèses). Le test de Mann-Whitney a été utilisé pour les comparaisons intergroupes.

u.a. : Unité arbitraire, obtenue lors de l'analyse des images, correspondant à la somme des valeurs de chaque pixel composant la région d'intérêt rapportée à sa taille en μm^2 .

ns : non significatif.

I.4. Effet de la présence de particules aluminiques sur le flux autophagique des PBMC

Un western blot représentatif des analyses est présenté **Figure 16**. Les résultats de quantifications protéiques effectuées sur l'ensemble des western blot ont été regroupés dans le **Tableau 16**. Dans l'optique de simplifier la lecture des résultats, les différentes modulations protéiques significatives imputables aux traitements appliqués au sein de chaque groupe ont été résumées dans le **Tableau 17**.

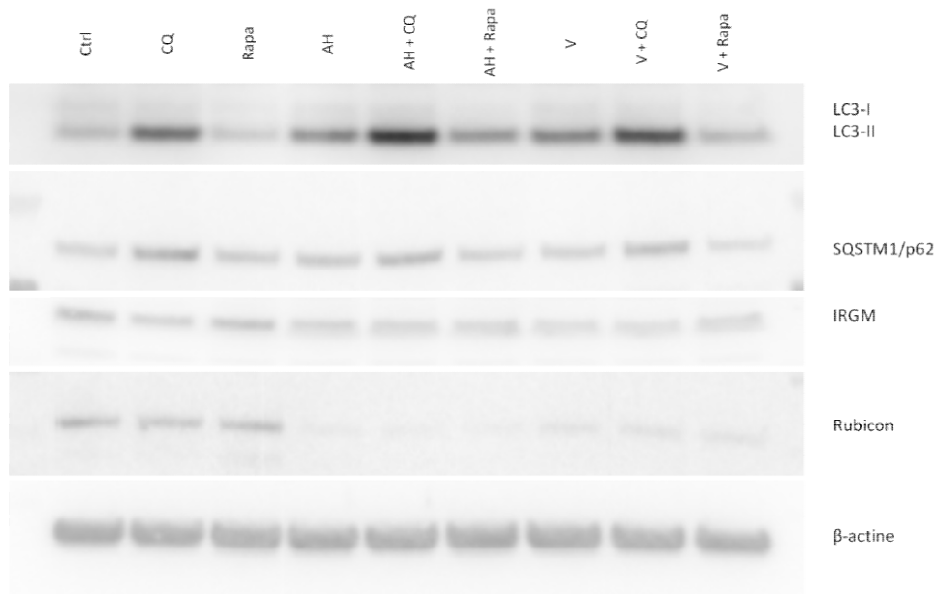


Figure 16 : Western blot représentatif des analyses menées sur les PBMC (données obtenues pour un individu appartenant au groupe MFM)

CQ : Chloroquine ; Rapa : Rapamycine ; AH : Oxy-hydroxyde d'aluminium (adjuvant seul) ; V : Vaccin (Engerix B[®])

Les comparaisons intergroupes effectuées ont permis d'identifier deux différences de quantification protéique entre les individus contrôles et les patientes MFM (pour la protéine LC3-II sous traitement Rapa et pour la protéine Rubicon sous traitement témoin, * dans le **Tableau 16**). Toutes les protéines étudiées ont présenté des modulations de quantité induites par un ou plusieurs des traitements utilisés, excepté la protéine IRGM pour le groupe MFM. Les différentes modulations observées sont développées protéine par protéine après les tableaux récapitulatifs.

Le test de corrélation de Spearman n'a mis en avant aucune modification de la quantité basale des protéines étudiées en rapport avec l'âge des individus donateurs que ce soit dans le groupe MFM ou dans le groupe contrôle. Afin de parfaire l'interprétation des résultats obtenus, une analyse du ratio LC3-II/LC3-I a été effectuée. Cette analyse s'est montrée pertinente pour les traitements CQ et Rapa seuls mais n'apporte pas d'information complémentaire pour les autres traitements. Les résultats relatifs à cette analyse sont présentés après les résultats des protéines LC3.

Tableau 16 : Quantifications protéiques des PBMC exposées à des particules aluminiques

Traitement Groupe	Témoïn	CQ	Rapa	AH	AH + CQ	AH + Rapa	V	V + CQ	V + Rapa	Friedman		
										X ²	p	
LC3-I	Ctrl	0,44 (0,23 - 0,70)	0,91 (0,38 - 1,06)	0,31 (0,19 - 0,65)	0,72 (0,61 - 1,19)	0,96 (0,89 - 1,34)	0,52 (0,28 - 0,79)	0,49 (0,40 - 0,70)	0,82 (0,67 - 0,95)	0,51 (0,23 - 0,54)	56,551	< 0,001
	MFM	0,91 (0,55 - 0,99)	0,97 (0,74 - 1,15)	0,41 (0,34 - 0,57)	0,65 (0,51 - 1,04)	0,88 (0,61 - 1,01)	0,38 (0,25 - 0,43)	0,48 (0,46 - 0,62)	0,69 (0,58 - 1,01)	0,44 (0,31 - 0,52)	23,476	0,015
LC3-II	Ctrl	0,29 (0,20 - 0,64)	0,78 (0,60 - 1,12)	0,22 (0,04 - 0,36)	0,65 (0,52 - 1,20)	1,20 (0,85 - 1,45)	0,48 (0,35 - 0,68)	0,36 (0,28 - 0,48)	0,94 (0,62 - 1,06)	0,45 (0,27 - 0,59)	71,574	< 0,001
	MFM	0,38 (0,20 - 0,69)	0,94 (0,56 - 1,34)	0,45 (0,31 - 0,64)	0,61 (0,38 - 1,10)	1,09 (0,78 - 1,27)	0,51 (0,36 - 0,70)	0,50 (0,38 - 0,89)	1,00 (0,93 - 1,20)	0,36 (0,29 - 0,80)	22,067	0,024
SQSTM1/ p62	Ctrl	1,18 (0,59 - 2,10)	1,25 (0,96 - 1,56)	0,71 (0,56 - 0,96)	0,71 (0,44 - 0,89)	0,78 (0,60 - 1,04)	0,39 (0,21 - 0,49)	0,69 (0,48 - 0,96)	0,74 (0,55 - 1,06)	0,25 (0,22 - 0,45)	57,760	< 0,001
	MFM	1,57 (0,87 - 2,26)	1,50 (1,36 - 1,66)	0,98 (0,72 - 1,29)	0,76 (0,51 - 1,04)	1,02 (0,56 - 1,30)	0,44 (0,34 - 0,72)	0,84 (0,60 - 0,98)	1,01 (0,86 - 1,09)	0,57 (0,44 - 0,60)	26,077	0,006
IRGM	Ctrl	1,17 (0,87 - 1,76)	0,96 (0,92 - 1,06)	1,00 (0,81 - 1,10)	0,78 (0,70 - 1,48)	0,92 (0,64 - 1,29)	1,01 (0,52 - 1,22)	0,74 (0,46 - 0,87)	0,54 (0,40 - 0,79)	0,74 (0,42 - 1,10)	44,668	< 0,001
	MFM	1,20 (0,75 - 1,74)	1,00 (0,68 - 1,36)	0,80 (0,59 - 1,19)	0,84 (0,52 - 1,07)	0,86 (0,44 - 1,20)	0,67 (0,40 - 1,13)	0,59 (0,45 - 0,97)	0,79 (0,46 - 1,08)	0,96 (0,58 - 1,48)	11,791	ns
Rubicon	Ctrl	0,51 (0,21 - 1,03)	0,60 (0,35 - 1,18)	1,00 (0,42 - 1,25)	0 (0 - 0,12)	0 (0 - 0,15)	0 (0 - 0,11)	0 (0 - 0,18)	0 (0 - 0,12)	0 (0 - 0,11)	72,078	< 0,001
	MFM	1,13 (1,01 - 1,15)	1,07 (0,97 - 1,29)	1,13 (1,09 - 1,36)	0,07 (0 - 0,16)	0,08 (0 - 0,18)	0,05 (0 - 0,14)	0,12 (0 - 0,16)	0,13 (0 - 0,23)	0,12 (0 - 0,16)	34,731	< 0,001

Les données sont exprimées sous forme de médiane et quartiles (entre parenthèses).

Les unités sont arbitraires et correspondent à la somme des valeurs de chaque pixel composant la région d'intérêt rapportée à sa taille en μm^2 .

* p < 0,05 obtenue au test de Mann-Whitney entre le groupe Ctrl et le groupe MFM au sein du traitement indiqué en colonne

▲ p < 0,05 par comparaison avec le traitement témoin au sein du groupe indiqué en ligne

△ p < 0,05 par comparaison avec le traitement CQ au sein du groupe indiqué en ligne

† p < 0,05 par comparaison avec le traitement AH au sein du groupe indiqué en ligne

■ p < 0,05 par comparaison avec le traitement Rapa au sein du groupe indiqué en ligne

□ p < 0,05 par comparaison avec le traitement AH + CQ au sein du groupe indiqué en ligne

◆ p < 0,05 par comparaison avec le traitement V au sein du groupe indiqué en ligne

CQ : Chloroquine

Rapa : Ramamycine

AH : Oxy-hydroxyde d'aluminium (adjuvant seul)

V : vaccin (Engerix B)

ns : non significatif

Significativité obtenue au test de rang de Wilcoxon pour les comparaisons intragroupe

Tableau 17 : Modulations de niveau protéique induit par les traitements appliqués aux PBMC

Traitement	Groupe	Témoïn	CQ	Rapa	AH	AH + CQ	AH + Rapa	V	V + CQ	V + Rapa
LC3-I	Ctrl	-	-	-	↑	▲	▼	▼	↓ ↑	↓
	MFM	-	-	↓	-	-	▼	↓	-	-
LC3-II	Ctrl	-	↑	-	↑	▲	△ ▼	▼	↓ ↑	△
	MFM	-	↑	-	↑	-	-	↑	↑	-
SQSTM1/ p62	Ctrl	-	-	↓	↓	▼	▽ ▼	-	▼	▽ ↓
	MFM	-	-	-	↓	▼	▽ ▼	-	▼	▽ ↓
IRGM	Ctrl	-	-	-	-	-	-	↓ ▼	▼ ↓	-
	MFM	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Rubicon	Ctrl	-	-	-	↓	▼	▽	↓	▼	▽
	MFM	-	-	-	↓	▼	▽	↓	▼	▽

- ↑ : augmentation significative du taux de protéines par rapport au traitement témoin ($p < 0,05$)
 ↓ : diminution significative du taux de protéines par rapport au traitement témoin ($p < 0,05$)
 ▲ : augmentation significative du taux de protéines par rapport au traitement CQ ($p < 0,05$)
 ▼ : diminution significative du taux de protéines par rapport au traitement CQ ($p < 0,05$)
 ▲ : augmentation significative du taux de protéines par rapport au traitement AH ($p < 0,05$)
 ▼ : diminution significative du taux de protéines par rapport au traitement AH ($p < 0,05$)
 △ : augmentation significative du taux de protéines par rapport au traitement Rapa ($p < 0,05$)
 ▽ : diminution significative du taux de protéines par rapport au traitement Rapa ($p < 0,05$)
 ↑ : augmentation significative du taux de protéines par rapport au traitement AH + CQ ($p < 0,05$)
 ↓ : diminution significative du taux de protéines par rapport au traitement AH + CQ ($p < 0,05$)
 ↑ : augmentation significative du taux de protéines par rapport au traitement V ($p < 0,05$)
 ↓ : diminution significative du taux de protéines par rapport au traitement V ($p < 0,05$)

Significativité obtenue au test de rang de Wilcoxon pour les comparaisons intragroupe

CQ : Chloroquine
 Rapa : Ramamycine
 AH : Oxy-hydroxyde d'aluminium (adjuvant seul)
 V : vaccin (Engerix B)
 - : absence de différence statistique

LC3-I : Les comparaisons intragroupes rapportent une diminution de la quantité de protéine LC3-I, chez le groupe MFM, suite aux traitements Rapa et V par comparaison avec le traitement témoin. Chez le groupe contrôle, le traitement AH a fait augmenter la quantité de protéine LC3-I par comparaison avec le traitement témoin (**Tableau 17, Figure 17**).

Les autres comparaisons ont rapporté une augmentation de LC3-I chez le groupe contrôle après traitement AH + CQ par comparaison avec le traitement CQ et une baisse de LC3-I après traitement AH + Rapa chez les deux groupes par comparaison avec le traitement AH. LC3-I a été retrouvée en plus faible quantité chez le groupe contrôle après traitement V par rapport au traitement AH et après traitement V + CQ par rapport au traitement AH + CQ. En comparaison avec le traitement V, le taux de LC3-I a été augmenté par le traitement V + CQ et diminué par le traitement V + Rapa chez le groupe contrôle (**Tableau 17, Figure 17**).

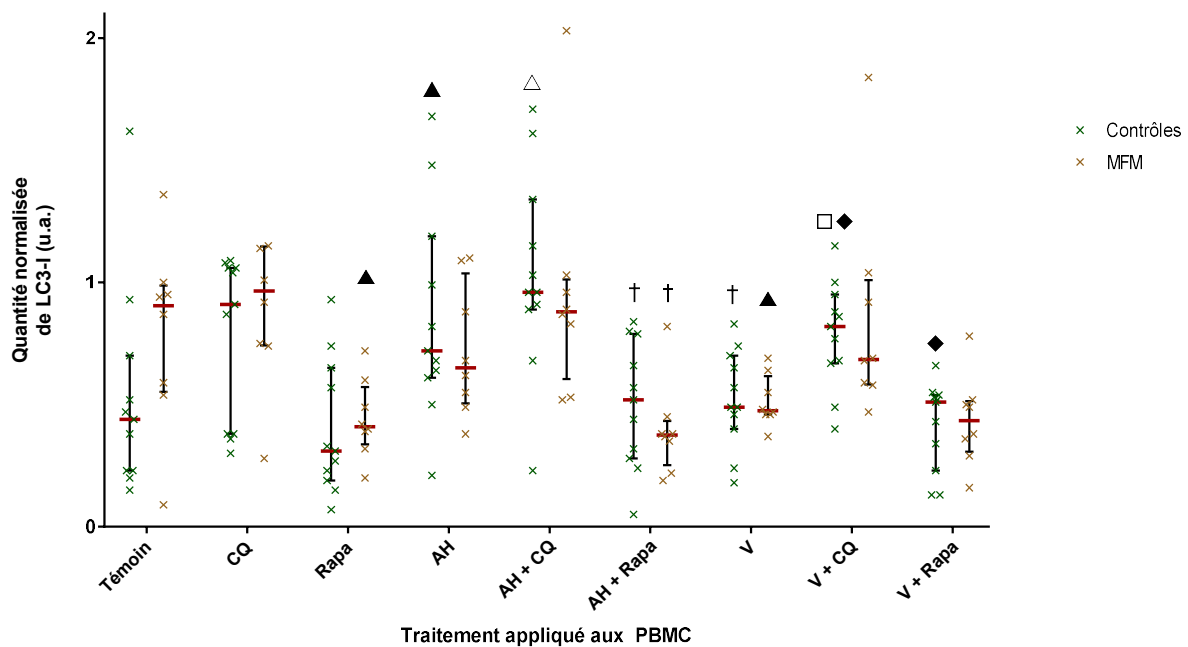


Figure 17 : Résultats de quantification de la protéine LC3-I dans les PBMC

Les résultats sont représentés sous forme de médiane (barre rouge) et quartiles (moustaches).

CQ : Chloroquine

Rapa : Ramamycine

AH : Oxy-hydroxyde d'aluminium (adjuvant seul)

V : Vaccin (Engerix B[®])

u.a. : Unité arbitraire, obtenue lors de l'analyse des images, correspondant à la somme des valeurs de chaque pixel composant la région d'intérêt rapportée à sa taille en μm^2 .

▲ : $p < 0,05$ par comparaison avec le traitement témoin au sein du groupe indiqué

△ : $p < 0,05$ par comparaison avec le traitement CQ au sein du groupe indiqué

† : $p < 0,05$ par comparaison avec le traitement AH au sein du groupe indiqué

□ : $p < 0,05$ par comparaison avec le traitement AH + CQ au sein du groupe indiqué

◆ : $p < 0,05$ par comparaison avec le traitement V au sein du groupe indiqué

Significativité obtenue au test de Wilcoxon en comparaison intragroupe

LC3-II : Une quantité supérieure de protéine LC3-II a été retrouvée dans les PBMC du groupe MFM en présence de Rapa par comparaison avec les PBMC du groupe contrôle (* dans le **Tableau 16** et **Figure 18**). LC3-II a été significativement accumulée dans les PBMC des deux groupes suite aux traitements CQ et AH par comparaison avec le traitement témoin respectif de chaque groupe. Cette accumulation par rapport au traitement témoin a également été retrouvée dans le groupe MFM suite au traitement V (**Tableau 17, Figure 18**).

D'autres comparaisons ont mis en avant une augmentation de la quantité de LC3-II après les traitements AH + Rapa et V + Rapa chez le groupe contrôle par comparaison avec le traitement Rapa. Comme pour LC3-I, LC3-II a été retrouvée en plus faible quantité chez le groupe contrôle après traitement V par rapport au traitement AH et après traitement V + CQ par rapport au traitement AH + CQ. Dans le groupe contrôle, le taux de LC3-II a été augmenté par le traitement AH + CQ et réduit par le traitement AH + Rapa par rapport au traitement AH. Le traitement V + CQ a quant à lui augmenté la quantité de LC3-II par rapport au traitement V dans les deux groupes (**Tableau 17, Figure 18**).

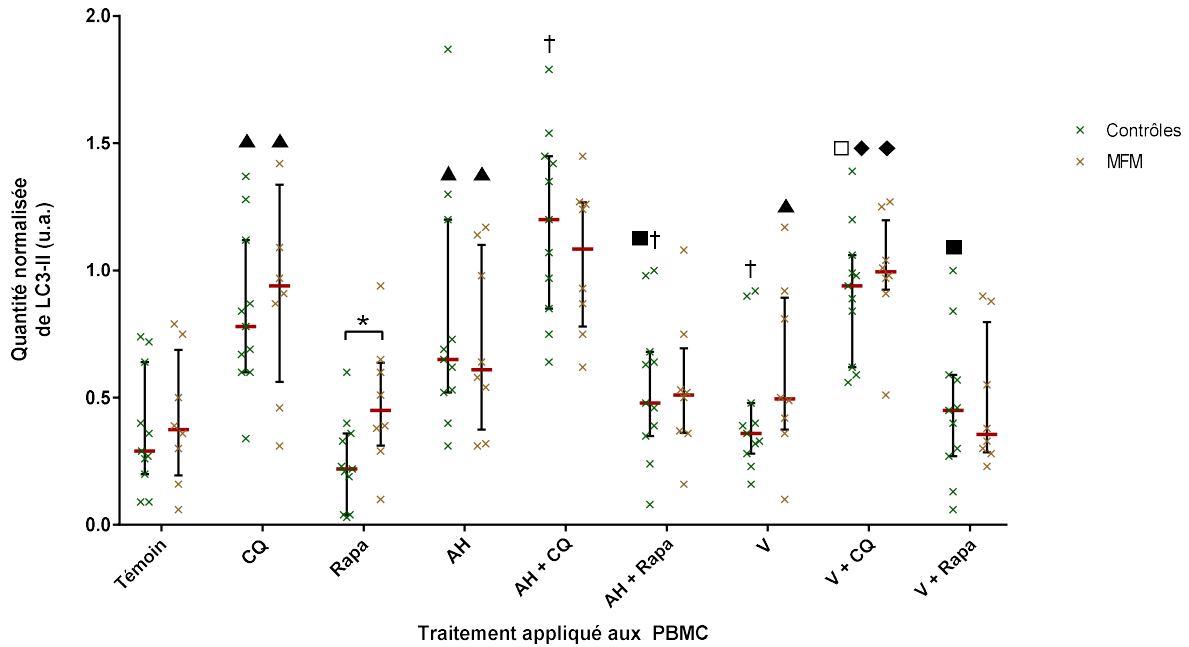


Figure 18 : Résultats de quantification de la protéine LC3-II dans les PBMC

Les résultats sont représentés sous forme de médiane (barre rouge) et quartiles (moustaches).

CQ : Chloroquine

Rapa : Ramamycine

AH : Oxy-hydroxyde d'aluminium (adjuvant seul)

V : Vaccin (Engerix B[®])

u.a. : Unité arbitraire, obtenue lors de l'analyse des images, correspondant à la somme des valeurs de chaque pixel composant la région d'intérêt rapportée à sa taille en μm^2 .

* $p < 0,05$ au test de Mann-Whitney entre les groupes Ctrl et MFM au sein du traitement indiqué en colonne

▲ : $p < 0,05$ par comparaison avec le traitement témoin au sein du groupe indiqué

† : $p < 0,05$ par comparaison avec le traitement AH au sein du groupe indiqué

■ : $p < 0,05$ par comparaison avec le traitement Rapa au sein du groupe indiqué

□ : $p < 0,05$ par comparaison avec le traitement AH + CQ au sein du groupe indiqué

◆ : $p < 0,05$ par comparaison avec le traitement V au sein du groupe indiqué

Significativité obtenue au test de Wilcoxon en comparaison intragroupe

Ratio LC3-II/LC3-I : Afin de compléter les quantifications de LC3-I et LC3-II, de rendre compte de l'écart de présence intracytoplasmique des deux formes de la protéine et d'améliorer l'interprétation des effets des traitements CQ et Rapa, une analyse du ratio LC3-II/LC3-I a été réalisée. L'augmentation de présence de la forme II de la protéine LC3 observée dans les PBMC des deux groupes par comparaison avec le traitement témoin (**Figure 18**) a significativement fait augmenter le ratio LC3-II/LC3-I dans ces deux groupes par rapport au traitement témoin (**Figure 19**). Les PBMC du groupe MFM ayant un taux de LC3-I réduit en présence du traitement Rapa par comparaison avec le traitement témoin (**Figure 17**), le ratio LC3-II/LC3-I résultant s'en trouve augmenté (**Figure 19**). Les PBMC du groupe contrôle présentent quant à eux un ratio LC3-II/LC3-I réduit en présence du traitement Rapa par rapport au traitement CQ (**Figure 19**).

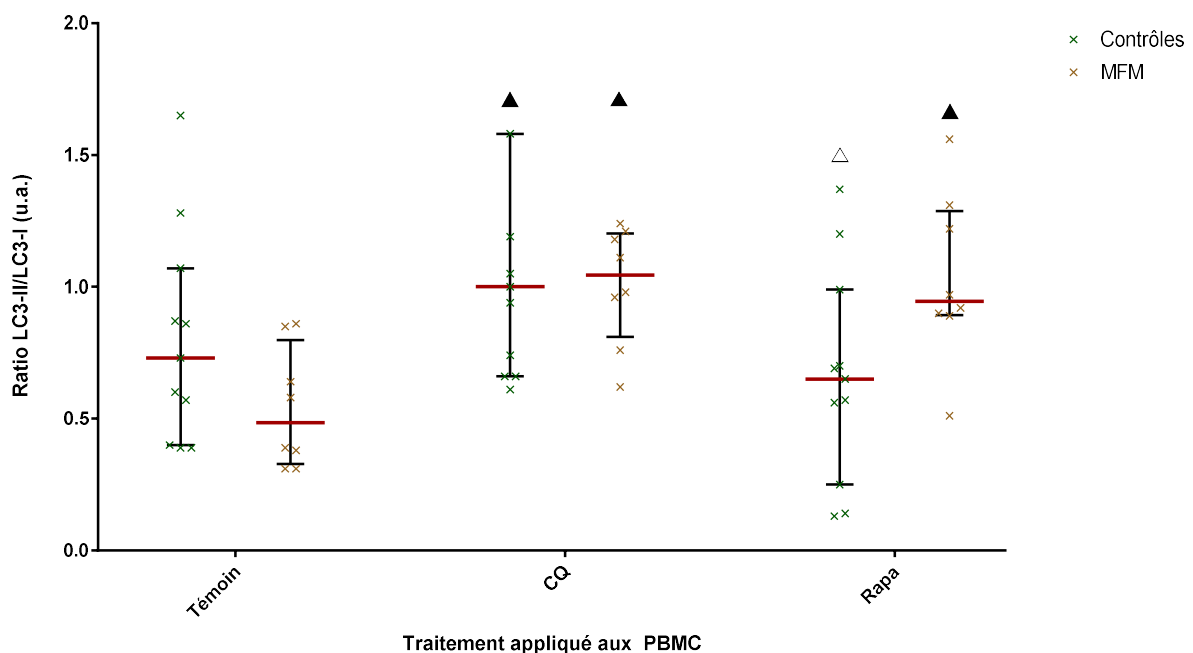


Figure 19 : Résultats de quantification du ratio LC3-II/LC3-I dans les PBMC

Les résultats sont représentés sous forme de médiane (barre rouge) et quartiles (moustaches).

CQ : Chloroquine

Rapa : Ramamycine

u.a. : Unité arbitraire, obtenue lors de l'analyse des images, correspondant à la somme des valeurs de chaque pixel composant la région d'intérêt rapportée à sa taille en μm^2 .

▲ : $p < 0,05$ par comparaison avec le traitement témoin au sein du groupe indiqué

△ : $p < 0,05$ par comparaison avec le traitement CQ au sein du groupe indiqué

Significativité obtenue au test de Wilcoxon en comparaison intragroupe

SQSTM1/p62 : La protéine SQSTM1/p62 a été observée en quantité réduite chez le groupe contrôle suite au traitement Rapa par rapport au traitement témoin. Une réduction de la présence de cette protéine a également été relevée au sein des deux groupes après traitement AH par comparaison avec le traitement témoin respectif de chaque groupe (**Tableau 17, Figure 20**).

Les autres comparaisons ont mis en avant une baisse significative de la quantité de SQSTM1/p62 après les traitements AH + CQ et V + CQ chez les deux groupes par comparaison avec le traitement CQ respectif de chaque groupe. Le traitement AH + Rapa a diminué la quantité de SQSTM1/p62 des deux groupes par rapport aux traitements Rapa et AH respectifs de chaque groupe. Le même effet a été observé pour le traitement V + Rapa par comparaison avec les traitements Rapa et V respectifs de chaque groupe (**Tableau 17, Figure 20**).

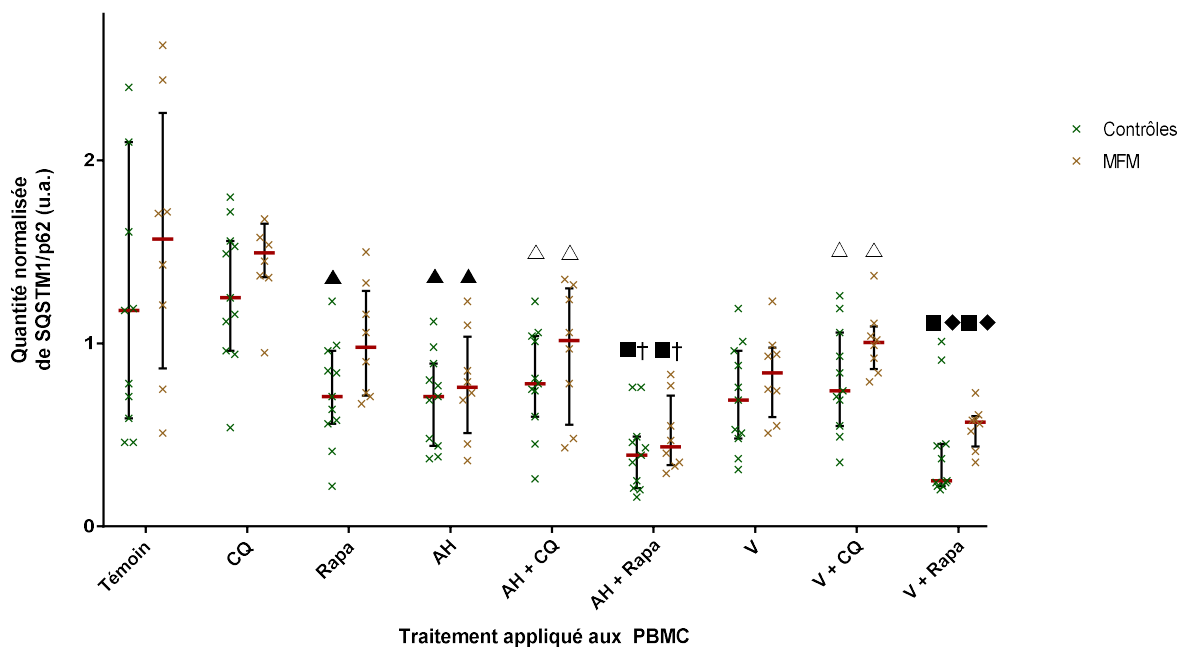


Figure 20 : Résultats de quantification de la protéine SQSTM1/p62 dans les PBMC

Les résultats sont représentés sous forme de médiane (barre rouge) et quartiles (moustaches).

CQ : Chloroquine

Rapa : Ramamycine

AH : Oxy-hydroxyde d'aluminium (adjuvant seul)

V : Vaccin (Engerix B[®])

u.a. : Unité arbitraire, obtenue lors de l'analyse des images, correspondant à la somme des valeurs de chaque pixel composant la région d'intérêt rapportée à sa taille en μm^2 .

▲ : $p < 0,05$ par comparaison avec le traitement témoin au sein du groupe indiqué

△ : $p < 0,05$ par comparaison avec le traitement CQ au sein du groupe indiqué

■ : $p < 0,05$ par comparaison avec le traitement Rapa au sein du groupe indiqué

† : $p < 0,05$ par comparaison avec le traitement AH au sein du groupe indiqué

◆ : $p < 0,05$ par comparaison avec le traitement V au sein du groupe indiqué

Significativité obtenue au test de Wilcoxon en comparaison intragroupe

IRGM : Les comparaisons intragroupes effectuées ont mis en avant une réduction significative de la présence de la protéine IRGM suite au traitement V chez le groupe contrôle par rapport au traitement témoin (**Tableau 17, Figure 21**).

Cette baisse de présence de la protéine IRGM suite au traitement V est également significative pour le groupe contrôle par comparaison avec le traitement AH. De la même manière, le traitement V + CQ réduit la quantité de la protéine IRGM chez le groupe contrôle par comparaison avec le groupe CQ mais également par comparaison avec le groupe AH + CQ (**Tableau 17, Figure 21**).

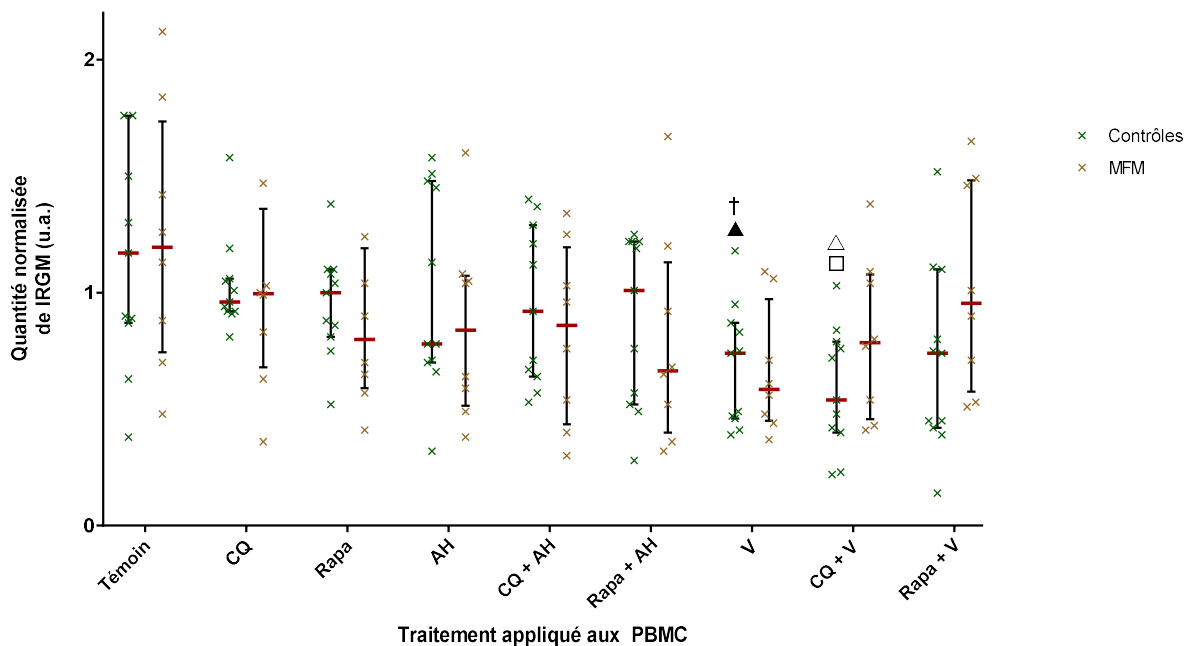


Figure 21 : Résultats de quantification de la protéine IRGM dans les PBMC

Les résultats sont représentés sous forme de médiane (barre rouge) et quartiles (moustaches).

CQ : Chloroquine

Rapa : Ramamycine

AH : Oxy-hydroxyde d'aluminium (adjuvant seul)

V : Vaccin (Engerix B®)

u.a. : Unité arbitraire, obtenue lors de l'analyse des images, correspondant à la somme des valeurs de chaque pixel composant la région d'intérêt rapportée à sa taille en μm^2 .

▲ : $p < 0,05$ par comparaison avec le traitement témoin au sein du groupe indiqué

△ : $p < 0,05$ par comparaison avec le traitement CQ au sein du groupe indiqué

† : $p < 0,05$ par comparaison avec le traitement AH au sein du groupe indiqué

□ : $p < 0,05$ par comparaison avec le traitement AH + CQ au sein du groupe indiqué

Significativité obtenue au test de Wilcoxon en comparaison intragroupe

Rubicon : Les PBMC du groupe MFM ont présenté un niveau basal de Rubicon supérieur aux contrôles, sans mise en contact avec des particules aluminiques ou des modulateurs de l'autophagie (* dans le **Tableau 16** et **Figure 22**)

Par comparaison avec le traitement témoin respectif de chaque groupe, la protéine Rubicon a été retrouvée en quantité réduite après les traitements AH et V au sein des deux groupes. Cette baisse de quantité a été retrouvée après les traitements AH + CQ et V + CQ en comparaison avec le traitement CQ respectif de chaque groupe ainsi qu'après les traitements AH + Rapa et V + Rapa par comparaison avec le traitement Rapa respectif de chaque groupe. (**Tableau 17**, **Figure 22**).

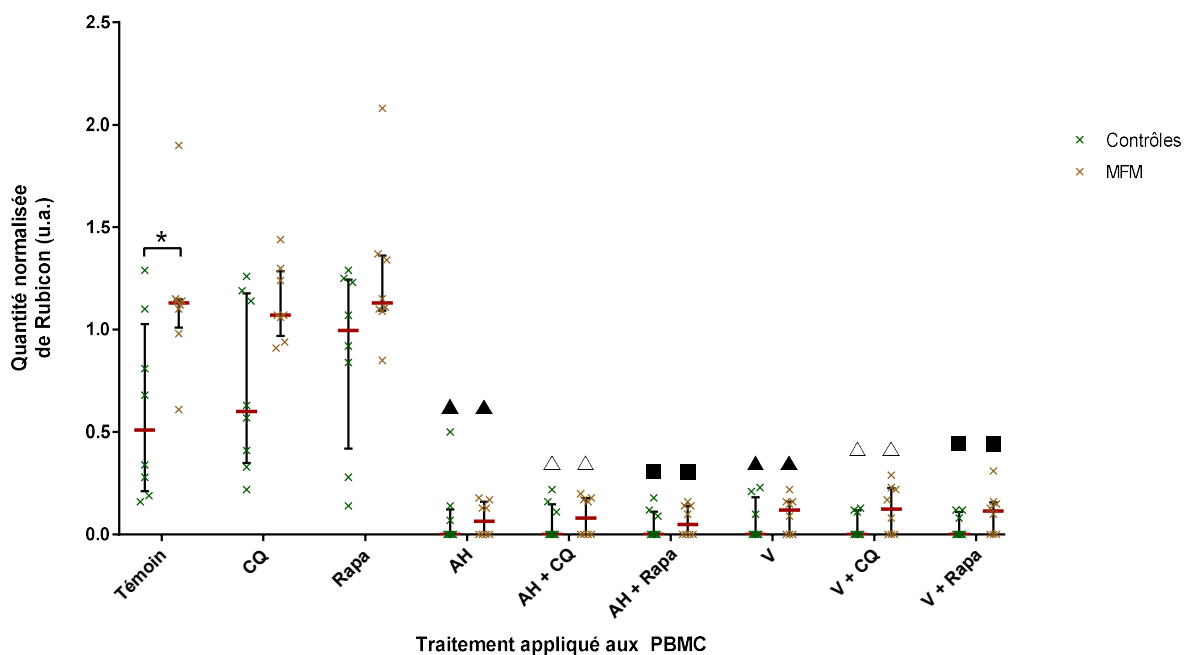


Figure 22 : Résultats de quantification de la protéine Rubicon dans les PBMC

Les résultats sont représentés sous forme de médiane (barre rouge) et quartiles (moustaches).

CQ : Chloroquine

Rapa : Ramamycine

AH : Oxy-hydroxyde d'aluminium (adjuvant seul)

V : Vaccin (Engerix B®)

u.a. : Unité arbitraire, obtenue lors de l'analyse des images, correspondant à la somme des valeurs de chaque pixel composant la région d'intérêt rapportée à sa taille en μm^2 .

* $p < 0,05$ au test de Mann-Whitney entre les groupes Ctrl et MFM au sein du traitement indiqué en colonne

▲ : $p < 0,05$ par comparaison avec le traitement témoin au sein du groupe indiqué

△ : $p < 0,05$ par comparaison avec le traitement CQ au sein du groupe indiqué

■ : $p < 0,05$ par comparaison avec le traitement Rapa au sein du groupe indiqué

Significativité obtenue au test de de Wilcoxon en comparaison intragroupe

I.5. Effet de la présence de particules aluminiques sur la réponse inflammatoire des PBMC

Les résultats de quantification des cytokines produites par les PBMC lors de la mise en contact avec différents traitements ont été rassemblés dans le **Tableau 18**.

Parmi les onze cytokines étudiées, trois n'ont pas fait l'objet d'analyses statistiques (IL-1 β , IL-12p40 et TGF- β) en raison de leur présence à des quantités inférieures au seuil de détection de la méthode utilisée ou en raison de détections anecdotiques non compatibles avec l'analyse des données. Cinq des huit cytokines dont les données ont été analysées (IL-8, IL-18, CXCL1, CCL2 et TNF- α) ont présenté des différences statistiques de quantité entre le groupe contrôle et le groupe MFM, des modulations significatives de production imputables aux traitements appliqués et/ou une corrélation statistique avec l'âge des individus donneurs. Les différentes modulations de ces cinq cytokines sont développées une à une.

Tableau 18 : Quantification de cytokines relarguées par les PBMC exposées à des particules aluminiques

Traitement	Groupe	Témoin	AH	V	Friedman	
					X ²	<i>p</i>
IL-1β	Ctrl	Protéine très rarement retrouvée au-dessus du seuil de détection (n = 2 pour le groupe Ctrl et n = 1 pour le groupe MFM).				
	MFM	Analyses statistiques non applicables.				
IL-6	Ctrl	125,87 (59,28 - 288,53)	207,7 (83,19 - 258,96)	248,56 (128,79 - 364,78)	5,091	<i>ns</i>
	MFM	236,23 (60,34 - 342,38)	270,22 (80,23 - 356)	329,94 (95,44 - 393,92)	1,750	<i>ns</i>
IL-8	Ctrl	464,52 (345,27 - 515,48)	432,31 (384,97 - 478,48)	504,24 (455,44 - 550,89)	5,636	<i>ns</i>
	MFM	498,09 (444,44 - 518,52)	503,59 (469,98 - 558,54)	528,82 (476,85 - 615,26)	4,000	<i>ns</i>
IL-10	Ctrl	13,86 (0 - 19,02)	8,61 (0 - 36,08)	34,26 (0 - 46,37)	3,350	<i>ns</i>
	MFM	23,16 (3,81 - 31,51)	10,46 (0 - 31,25)	13,89 (0 - 29,4)	0,667	<i>ns</i>
IL-12p40	Ctrl	Protéine constamment sous le seuil de détection.				
	MFM	Analyses statistiques non applicables.				
IL-18	Ctrl	0 (0 - 0)	0 (0 - 7,03)	0 (0 - 39,81)	6,333	0,042
	MFM	0 (0 - 0)	0 (0 - 0)	20,06 (0 - 56,79) ▲ △	9,500	0,009
CXCL1	Ctrl	154,39 (118,37 - 196,34)	152,16 (116,89 - 175,11)	149,66 (135,68 - 198,87)	4,545	<i>ns</i>
	MFM	275,45 (220,84 - 293,62)	254,02 (233,1 - 291,67)	249,98 (206,22 - 333,26)	1,750	<i>ns</i>
CCL2	Ctrl	322,02 (300,25 - 366,74)	338,28 (312,72 - 380,25)	367,86 (345,85 - 395,08) △	7,091	0,029
	MFM	344,44 (299,08 - 381,77)	367,82 (351,2 - 390,78)	360,63 (335,6 - 432,57)	5,250	<i>ns</i>
CCL4	Ctrl	123,22 (84,62 - 150,41)	129,66 (92,29 - 146,45)	137,39 (98,43 - 165,52)	1,273	<i>ns</i>
	MFM	105,23 (100,94 - 118,08)	103,5 (94,26 - 121,01)	105,52 (96,55 - 113,17)	1,000	<i>ns</i>
TGF-β	Ctrl	Protéine constamment sous le seuil de détection.				
	MFM	Analyses statistiques non applicables.				
TNF-α	Ctrl	0 (0 - 37,15)	67,07 (46,1 - 117,7) ▲	164,62 (94,38 - 235,08) ▲ △	20,182	< 0,001
	MFM	0 (0 - 21,64)	25,53 (17,32 - 49,92) ▲	75,54 (35 - 144,92) ▲ △	14,000	0,001

Données exprimées sous forme de médiane et quartiles (entre parenthèses) en unité arbitraire définie ci-avant
 * $p < 0,05$ au test de Mann-Whitney entre les groupes Ctrl et MFM au sein du traitement indiqué en colonne
 ▲ $p < 0,05$ au test de Wilcoxon par comparaison avec le traitement témoin au sein du groupe indiqué en ligne
 △ $p < 0,05$ au test de Wilcoxon par comparaison avec le traitement AH au sein du groupe indiqué en ligne
 AH : Oxy-hydroxyde d'aluminium (adjuvant seul) ; V : vaccin (Engerix B[®]) ; *ns* : non significatif

IL-8 : Les PBMC du groupe MFM ont produit significativement plus d'IL-8 que les PBMC du groupe contrôle en présence d'AH. Cette différence n'est cependant pas statistiquement induite par la présence de l'adjuvant car la concentration en IL-8 a été similaire entre les différents traitements après 4 h de mise en contact (**Tableau 18, Figure 23**).

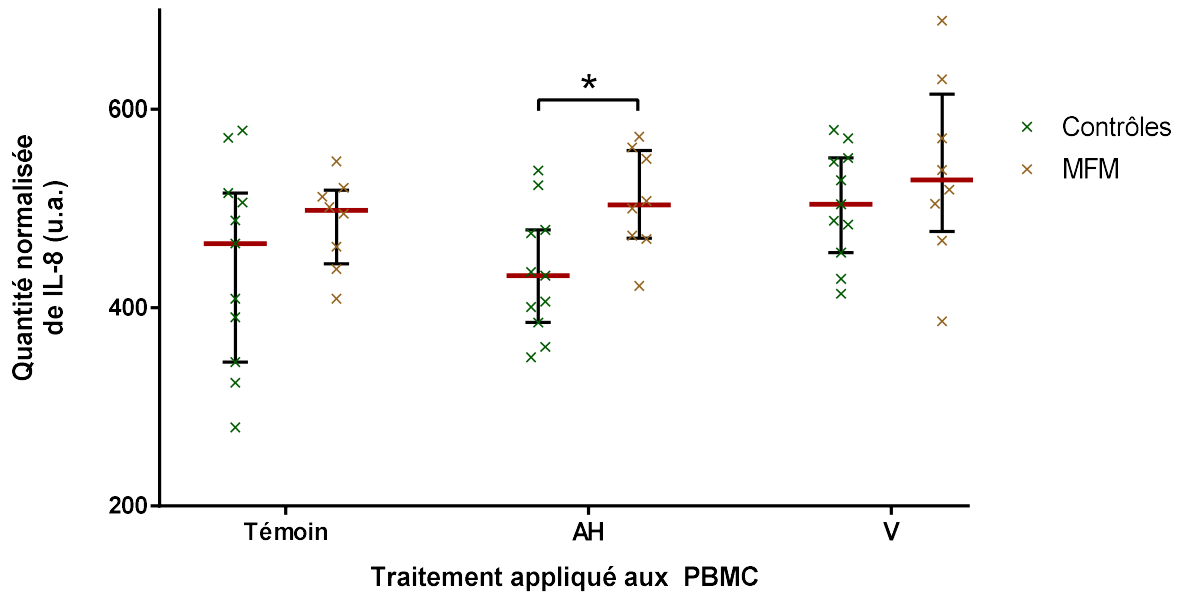


Figure 23 : Résultats de quantification de la cytokine IL-8 produite par les PBMC

Les résultats sont représentés sous forme de médiane (barre rouge) et quartiles (moustaches).

AH : Oxy-hydroxyde d'aluminium (adjuvant seul)

V : Vaccin (Engerix B[®])

u.a. : Unité arbitraire, obtenue lors de l'analyse, correspondant à l'intensité de chimiluminescence du signal normalisé par l'intensité du contrôle positif

* $p < 0,05$ au test de Mann-Whitney entre les groupes contrôle et MFM au sein du traitement indiqué en colonne

IL-18 : La production d'IL-18 par les PBMC du groupe MFM a été significativement accrue par la présence de vaccin dans le milieu de culture. La quantité d'IL-18 retrouvée dans le milieu de culture des cellules du groupe MFM après 4 h de mise en contact avec le vaccin Engerix B[®] a été plus importante qu'avec les traitements témoin et AH (**Tableau 18, Figure 24**). Notons toutefois que ce résultat doit être observé avec une certaine prudence en raison de la faiblesse des effectifs (n = 4 dosages supérieurs au seuil de détection pour le traitement V).

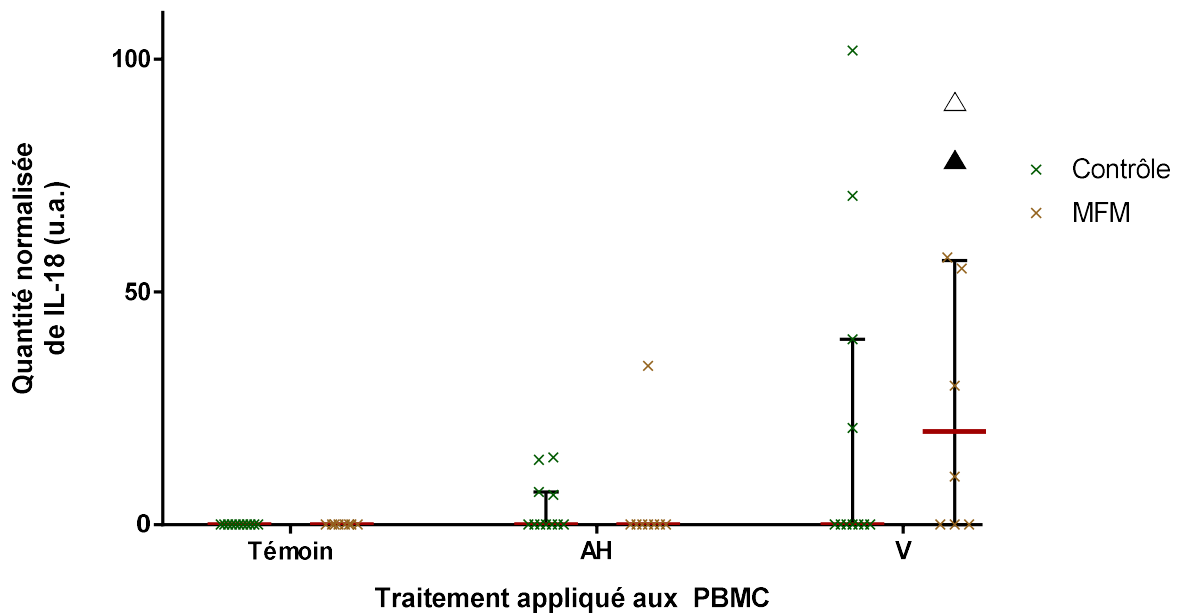


Figure 24 : Résultats de quantification de la cytokine IL-18 produite par les PBMC

Les résultats sont représentés sous forme de médiane (barre rouge) et quartiles (moustaches).

AH : Oxy-hydroxyde d'aluminium (adjuvant seul)

V : Vaccin (Engerix B[®])

u.a. : Unité arbitraire, obtenue lors de l'analyse, correspondant à l'intensité de chimiluminescence du signal normalisé par l'intensité du contrôle positif

▲ $p < 0,05$ au test de Wilcoxon par comparaison avec le traitement témoin au sein du groupe indiqué

△ $p < 0,05$ au test de Wilcoxon par comparaison avec le traitement AH au sein du groupe indiqué

CXCL1 : Les comparaisons intergroupes ont mis en avant une production de CXCL1 plus importante par les PBMC du groupe MFM par rapport au groupe contrôle quel que soit le traitement appliqué. Les analyses démontrent que les différents traitements n'ont pas modulé l'excrétion de cette cytokine dans le groupe contrôle comme dans le groupe MFM (**Tableau 18, Figure 25**).

L'analyse par corrélation de Spearman a mis en avant une corrélation négative significative ($p < 0,05$) entre l'âge des donneuses du groupe MFM et le niveau de CXCL1 excrété par leurs PBMC en condition témoin (en l'absence de particules aluminiques). Le taux de CXCL1 produit par les PBMC des patientes MFM serait donc de moins en moins important au cours du vieillissement avec un R^2 de régression linéaire de 0,678 (**Figure 26**).

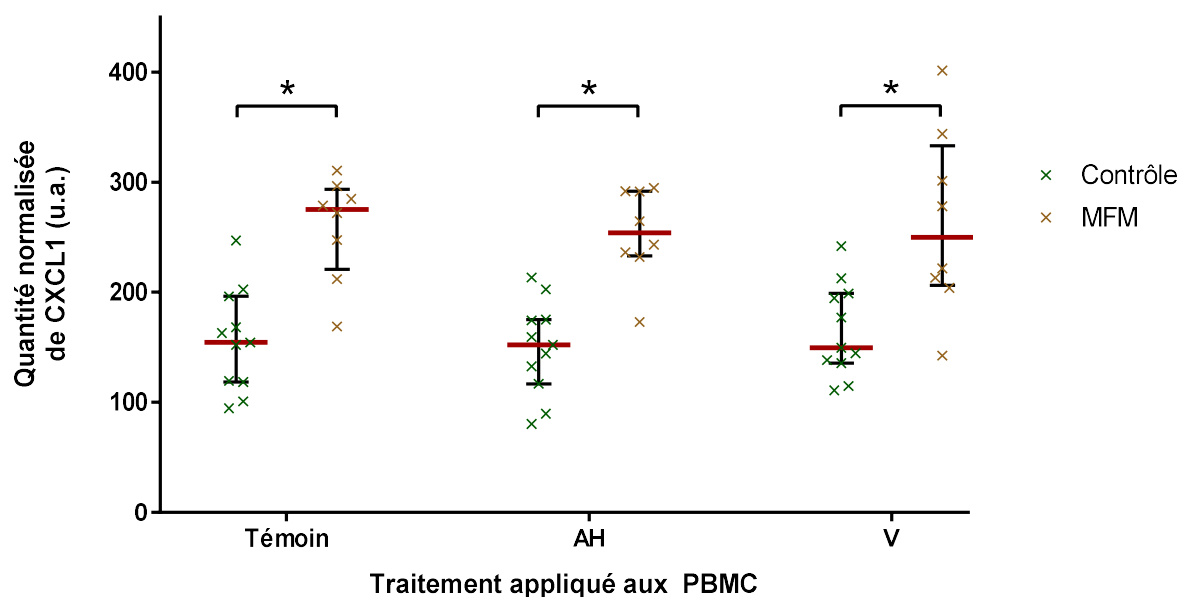


Figure 25 : Résultats de quantification de la cytokine CXCL1 produite par les PBMC

Les résultats sont représentés sous forme de médiane (barre rouge) et quartiles (moustaches).

AH : Oxy-hydroxyde d'aluminium (adjuvant seul)

V : Vaccin (Engerix B®)

u.a. : Unité arbitraire, obtenue lors de l'analyse, correspondant à l'intensité de chimiluminescence du signal normalisé par l'intensité du contrôle positif

* $p < 0,05$ au test de Mann-Whitney entre les groupes contrôle et MFM au sein du traitement indiqué en colonne

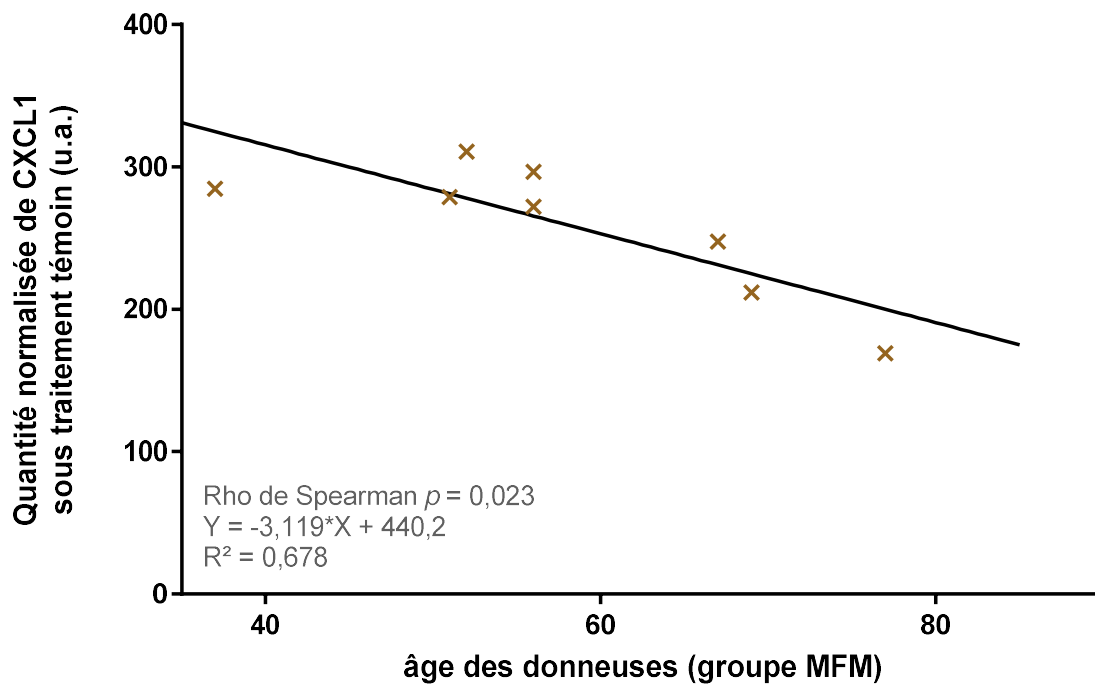


Figure 26 : Régression linéaire modélisant la corrélation entre l'âge des donneuses du groupe MFM et la production de CXCL1 sous traitement témoin

Les résultats sont représentés sous forme de données individuelle pour les 8 donneuses du groupe MFM.

u.a. : Unité arbitraire, obtenue lors de l'analyse, correspondant à l'intensité de chimiluminescence du signal normalisé par l'intensité du contrôle positif

CCL2 : La production de la protéine CCL2 a été similaire entre le groupe contrôle et le groupe MFM quel que soit le traitement appliqué aux cellules. La production de CCL2 par les PBMC du groupe contrôle a été significativement amplifiée par le traitement V. La quantité de CCL2 retrouvée dans le milieu extracellulaire après 4 h de mise en contact avec le vaccin Engerix B[®] a été plus importante qu'avec le traitement AH (**Tableau 18, Figure 27**).

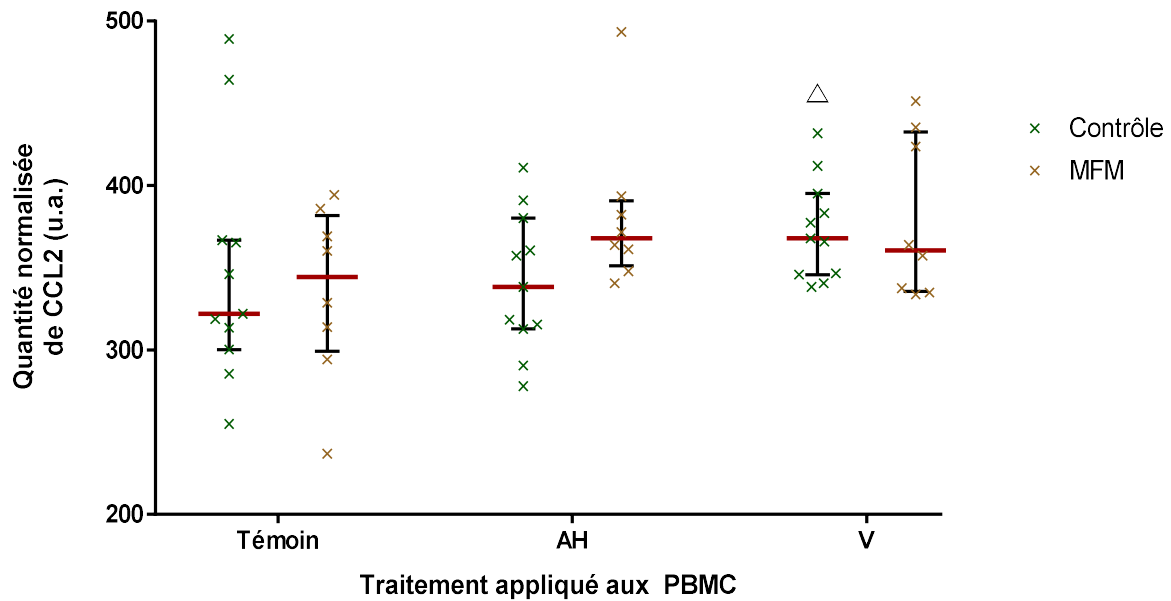


Figure 27 : Résultats de quantification de la cytokine CCL2 produite par les PBMC

Les résultats sont représentés sous forme de médiane (barre rouge) et quartiles (moustaches).

AH : Oxy-hydroxyde d'aluminium (adjuvant seul)

V : Vaccin (Engerix B[®])

u.a. : Unité arbitraire, obtenue lors de l'analyse, correspondant à l'intensité de chimiluminescence du signal normalisé par l'intensité du contrôle positif

Δ $p < 0,05$ au test de Wilcoxon par comparaison avec le traitement AH au sein du groupe indiqué

TNF- α : La production de TNF- α par les PBMC a été significativement modulée par les traitements appliqués aux cellules. Les PBMC des deux groupes, exposées aux traitements AH et V, ont produit significativement plus de TNF- α respectivement au traitement témoin de chaque groupe. De plus, les PBMC exposées au traitement V ont excrété un niveau de TNF- α supérieur à celles sous traitement AH au sein du même groupe. Enfin les PBMC du groupe MFM ont produit significativement moins de TNF- α que les cellules du groupe contrôle dans les conditions de traitement AH et V, cette différence n'étant pas visible en condition témoin (Tableau 18, Figure 28).

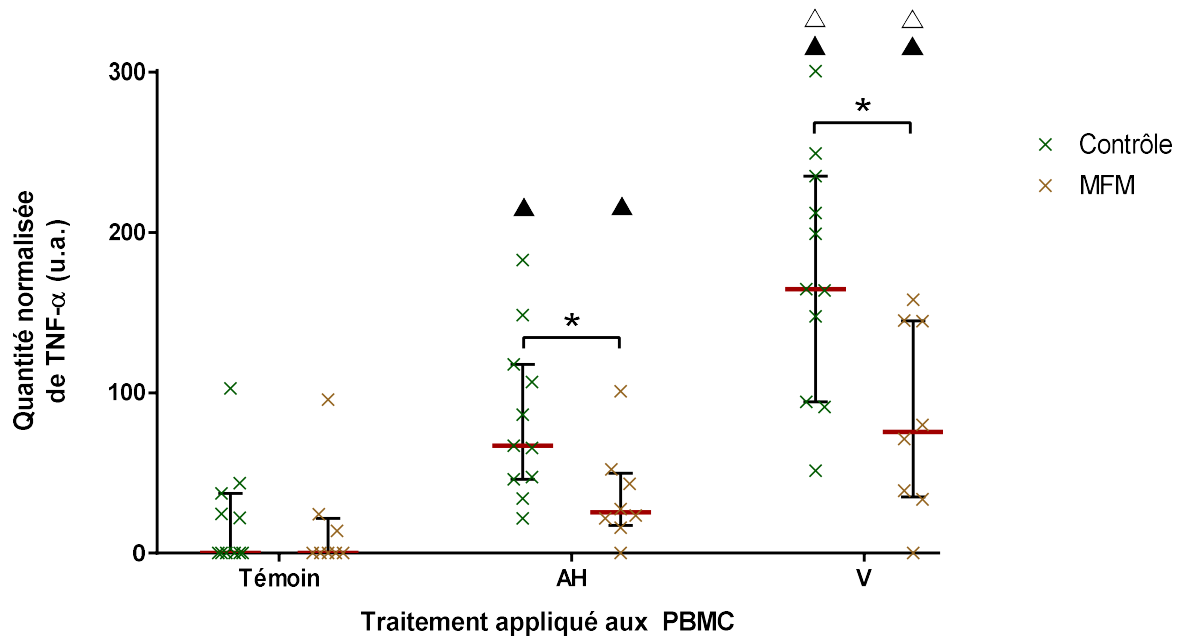


Figure 28 : Résultats de quantification de la cytokine TNF- α produite par les PBMC

Les résultats sont représentés sous forme de médiane (barre rouge) et quartiles (moustaches).

AH : Oxy-hydroxyde d'aluminium (adjuvant seul)

V : Vaccin (Engerix B[®])

u.a. : Unité arbitraire, obtenue lors de l'analyse, correspondant à l'intensité de chimiluminescence du signal normalisé par l'intensité du contrôle positif

* $p < 0,05$ au test de Mann-Whitney entre les groupes contrôle et MFM au sein du traitement indiqué en colonne

▲ $p < 0,05$ au test de Wilcoxon par comparaison avec le traitement témoin au sein du groupe indiqué

△ $p < 0,05$ au test de Wilcoxon par comparaison avec le traitement AH au sein du groupe indiqué

I.6. Récapitulatif des résultats et premières interprétations

Les observations cellulaires réalisées suggèrent que les PBMC de patientes atteintes de MFM sont de taille comparable aux cellules contrôles. De plus, l'analyse microscopique démontre une capacité d'internalisation des particules aluminiques ainsi qu'une présence lysosomale au sein de ces cellules similaires à celles des contrôles.

La mesure du flux autophagique basal ne permet pas de différencier les cellules de patientes MFM de celles des individus contrôles dans les conditions de l'étude. La différence statistique majeure distinguant PBMC MFM et contrôles est la présence de la protéine Rubicon en quantité supérieure chez les patientes MFM, en condition témoin (sans traitement des cellules). La présence de cette protéine est, de plus, fortement régulée par les traitements utilisés avec une réduction importante du taux de Rubicon en présence de particules aluminiques, qu'elles proviennent de l'adjuvant seul ou du vaccin.

Dans l'ensemble, les résultats de l'expérimentation *in vitro* sur les PBMC mettent en avant la réponse de la protéine LC3 à la présence de particules aluminiques. Les taux des deux formes de la protéine LC3 sont en effet modulés par les traitements prouvant la mise en place rapide d'un mécanisme LC3 dépendant en présence de particules aluminiques (avec l'adjuvant seul ou un vaccin entier). Les variations de concentration de ces protéines suivent celles attendues en cas d'activation du processus autophagique. La réponse de la protéine SQSTM1/p62, observée en présence de modulateurs de l'autophagie, suit en revanche une évolution inattendue laissant supposer que le mécanisme observé pourrait être de nature différente à celui, envisagé initialement, de l'autophagie canonique.

Les mesures de cytokines effectuées dans le milieu de culture décrivent quant à elles le rôle pro-inflammatoire des adjuvants Al, encore accentué en présence d'antigènes. En effet, l'excrétion de trois des onzes cytokines analysées a été modulée par la présence de particules aluminique, IL-18 et CCL2 en présence de vaccin et TNF- α en présence d'adjuvant et de vaccin. La production de TNF- α a été significativement augmentée en présence d'adjuvant seul et augmenté de façon plus importante encore en présence de vaccin.

De manière intéressante, la production de TNF- α par les PBMC de patientes MFM, bien que suivant la même augmentation significative, a été systématiquement et significativement inférieure à celle des PBMC contrôles en présence de particules aluminiques, ce qui atteste d'une réponse inflammatoire perturbée chez les patientes MFM.

De plus, les PBMC MFM ont également présenté un taux natif caractéristique de CXCL1 supérieur à celui des individus contrôles, négativement corrélé à l'âge des patientes et sans modulation par les traitements utilisés dans cette étude.

II. Études *in vivo*

II.1. Évaluation du traitement pharmacologique perturbant l'autophagie (Masson *et al.*, 2020)

II.1.1. Rappel du protocole expérimental

Les données relatives à l'élevage, aux accouplements et à l'exposition des animaux ont été décrites dans la section précédente de même que l'ensemble des protocoles de tests et d'analyses histologiques (Chapitre II.1. de la section méthodologie).

Pour rappel, lors de cette expérimentation, des animaux adultes ou juvéniles en début d'expérimentation ont été soumis à des injections IP de HCQ sur une durée de quatre mois. L'accumulation du composé dans le sérum des animaux a été suivie et une évaluation de l'impact du traitement sur le flux autophagique a été réalisée dans différents organes. Enfin le développement sensori-moteur des souriceaux et le comportement individuel des animaux adultes ont été étudiés afin de contrôler l'absence d'effets indésirables.

La **Figure 29** illustre l'expérimentation réalisée sous forme de résumé graphique.

Les **Figure 30** et **Figure 31** illustrent respectivement sur une échelle de temps les expérimentations *in vivo* de la cohorte adulte et de la cohorte juvénile.

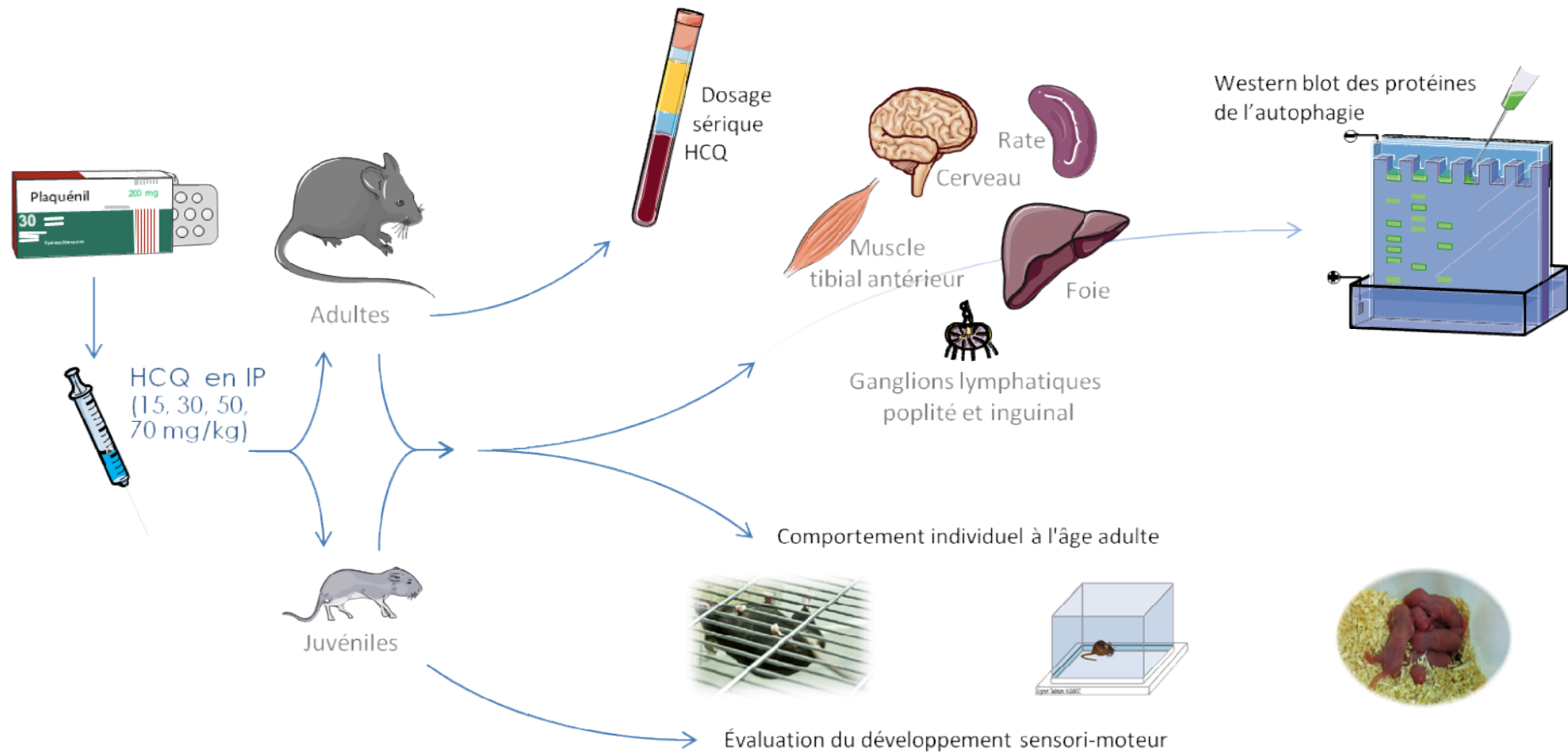


Figure 29 : Représentation graphique du déroulement de l'expérimentation *in vivo* évaluant le traitement pharmacologique

HCQ : Hydroxychloroquine
 IM : Injection intramusculaire

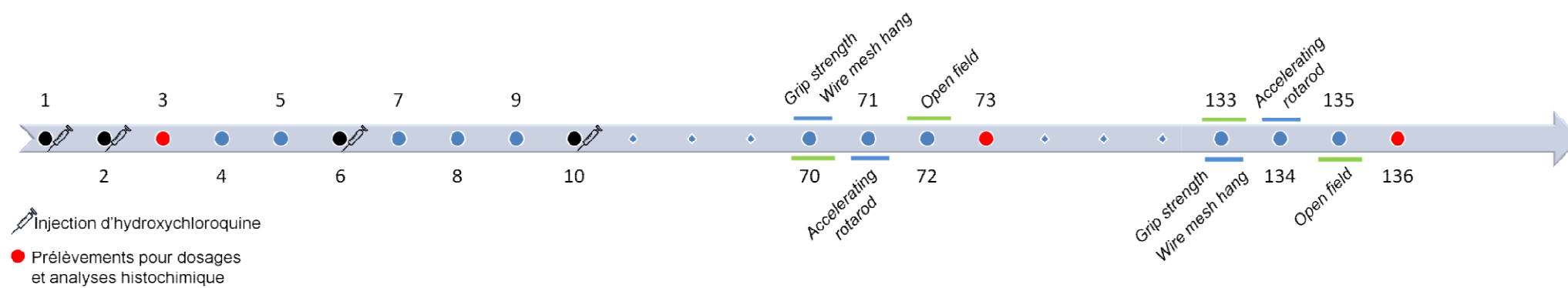


Figure 30 : Représentation du déroulement de l'expérimentation *in vivo* sur la cohorte adulte

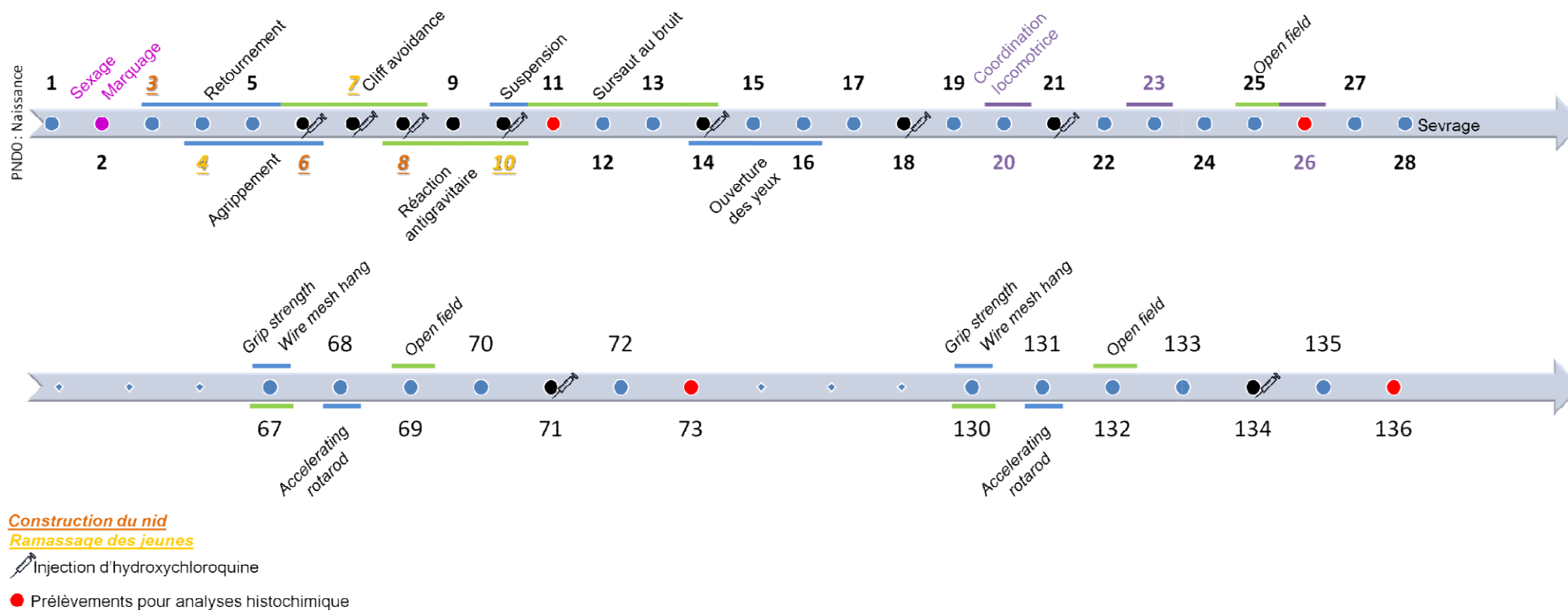


Figure 31 : Représentation du déroulement de l'expérimentation *in vivo* sur la cohorte juvénile

II.1.2. Effet du traitement sur le poids corporel des animaux

II.1.2.1. Cohorte adulte

L'ANOVA à 2 facteurs réalisée pour déterminer l'effet du traitement pharmacologique sur le poids corporel des animaux de la cohorte adulte entre D1 et D136 n'a mis en évidence aucune différence significative entre les quatre groupes (**Tableau 19**).

L'effet du facteur « sexe » a été significatif durant toute la durée de l'expérimentation. Les femelles présentant un poids corporel plus faible que les mâles (**Tableau 19**).

L'interaction entre les deux facteurs n'a jamais été observée significative.

II.1.2.2. Cohorte juvénile

L'ANOVA à 2 facteurs réalisée a permis de mettre en avant l'effet significatif du traitement sur le poids corporel des animaux de la cohorte juvénile à PND95 (**Tableau 20** et **Tableau 21**). Cependant, cette différence n'est pas retrouvée par l'analyse a posteriori des données par le test de Dunnett's comparant le groupe témoin aux animaux traités.

L'analyse démontre une action significative du facteur « sexe » entre PND3 et 10, à PND15 puis de PND17 à 136 (**Tableau 20** et **Tableau 21**). Les femelles ont toujours un poids corporel plus faible que les mâles excepté durant la phase de sevrage maternel, lorsque la courbe de poids des petits stagne au moment où ils commencent à adopter la nourriture solide.

Enfin, l'interaction entre les deux facteurs n'a jamais eu d'action significative sur le poids corporel des animaux ni durant leur développement, ni après leur sevrage.

Tableau 19 : Effet du traitement pharmacologique sur le poids corporel des animaux de la cohorte adulte

Poids (g)	Témoïn		30 mg/kg		50 mg/kg		70 mg/kg		ANOVA					
	mâles	femelles	mâles	femelles	mâles	femelles	mâles	femelles	Traitement		Sexe		Traitement*sexe	
									F	p	F	p	F	p
D1	24,06 ± 1,30	18,97 ± 0,94	24,64 ± 1,30	18,88 ± 0,57	24,51 ± 1,35	18,71 ± 1,09	24,08 ± 1,14	18,72 ± 0,94	F (3, 124) 0,601	ns	F (1, 124) 790,558	< 0,001	F (3, 124) 0,739	ns
D6	24,05 ± 1,28	19,09 ± 1,38	24,38 ± 1,10	19,37 ± 0,49	24,86 ± 1,35	19,55 ± 1,10	24,22 ± 1,21	19,02 ± 0,85	F (3, 82) 1,459	ns	F (1, 82) 436,921	< 0,001	F (3, 82) 0,115	ns
D10	25,10 ± 1,57	19,10 ± 1,36	25,29 ± 1,23	19,39 ± 0,54	25,83 ± 1,26	19,38 ± 1,20	25,29 ± 1,49	19,14 ± 0,82	0,683	ns	533,477	< 0,001	0,203	ns
D17	25,80 ± 1,68	19,67 ± 1,13	25,92 ± 1,22	20,02 ± 0,64	26,50 ± 1,41	20,29 ± 1,10	26,06 ± 1,29	19,72 ± 1,02	1,166	ns	539,959	< 0,001	0,121	ns
D24	26,74 ± 1,82	19,90 ± 1,24	26,10 ± 1,83	19,99 ± 0,61	27,26 ± 1,62	20,19 ± 0,98	26,99 ± 1,14	19,95 ± 0,90	0,969	ns	543,920	< 0,001	0,587	ns
D31	27,75 ± 1,87	20,46 ± 1,09	27,69 ± 1,36	20,33 ± 0,61	28,04 ± 1,40	20,24 ± 0,94	27,92 ± 0,89	20,00 ± 0,91	0,099	ns	857,059	< 0,001	0,372	ns
D38	27,96 ± 1,76	20,70 ± 0,91	27,71 ± 1,37	20,81 ± 0,57	28,35 ± 1,35	20,85 ± 0,87	28,00 ± 0,81	20,27 ± 1,01	0,645	ns	881,070	< 0,001	0,501	ns
D45	28,30 ± 1,64	20,97 ± 1,03	28,57 ± 1,03	21,09 ± 0,90	29,05 ± 1,46	20,84 ± 1,13	28,60 ± 1,12	20,52 ± 1,01	F (3, 81) 0,469	ns	F (1, 81) 897,703	< 0,001	F (3, 81) 0,726	ns
D52	28,15 ± 1,56	21,26 ± 1,39	28,99 ± 1,26	21,29 ± 0,95	29,11 ± 1,29	21,27 ± 1,14	28,69 ± 0,73	20,96 ± 1,23	0,794	ns	802,956	< 0,001	0,691	ns
D59	28,49 ± 1,78	21,88 ± 1,19	29,40 ± 1,11	21,56 ± 0,83	29,75 ± 1,21	21,86 ± 1,30	29,15 ± 0,92	21,35 ± 1,41	1,079	ns	758,295	< 0,001	1,306	ns
D66	29,01 ± 1,77	21,78 ± 1,13	29,89 ± 1,27	21,56 ± 0,69	30,31 ± 1,11	21,51 ± 1,09	30,02 ± 0,98	21,42 ± 1,25	0,693	ns	996,459	< 0,001	1,867	ns
D73	29,97 ± 1,23	21,38 ± 1,42	29,28 ± 0,95	21,32 ± 1,05	29,80 ± 1,21	21,98 ± 0,93	30,44 ± 0,67	21,72 ± 1,28	F (3, 41) 0,914	ns	F (1, 41) 596,994	< 0,001	F (3, 41) 0,446	ns
D80	30,55 ± 1,07	22,83 ± 1,76	29,68 ± 0,62	22,54 ± 1,23	30,27 ± 0,99	22,38 ± 1,15	31,02 ± 0,81	22,08 ± 1,49	0,448	ns	478,724	< 0,001	1,018	ns
D87	31,18 ± 1,02	22,48 ± 1,45	30,40 ± 0,71	22,58 ± 1,00	30,95 ± 0,82	23,02 ± 1,36	31,28 ± 0,78	22,72 ± 1,71	0,418	ns	545,934	< 0,001	0,391	ns
D94	31,27 ± 1,15	22,68 ± 1,32	30,44 ± 1,03	22,90 ± 1,51	31,45 ± 1,10	23,82 ± 1,54	31,54 ± 0,78	22,57 ± 1,48	1,127	ns	461,794	< 0,001	0,849	ns
D101	30,85 ± 1,27	23,12 ± 1,28	30,22 ± 1,29	22,96 ± 1,48	31,10 ± 0,92	23,28 ± 1,62	31,42 ± 0,98	22,75 ± 1,54	0,415	ns	395,417	< 0,001	0,522	ns
D108	30,80 ± 0,85	23,02 ± 1,35	30,34 ± 1,11	23,40 ± 1,40	30,87 ± 1,17	23,40 ± 1,49	30,88 ± 1,19	22,70 ± 1,60	0,150	ns	384,877	< 0,001	0,431	ns
D115	31,47 ± 1,35	23,27 ± 1,46	31,28 ± 0,81	23,24 ± 1,17	31,82 ± 1,43	24,25 ± 1,49	31,22 ± 1,08	23,18 ± 1,78	0,912	ns	375,293	< 0,001	0,118	ns
D122	31,63 ± 1,89	24,03 ± 1,75	31,62 ± 1,03	23,76 ± 1,15	31,50 ± 1,37	24,65 ± 1,57	31,46 ± 1,20	23,63 ± 1,68	0,254	ns	277,758	< 0,001	0,279	ns
D129	31,03 ± 1,49	23,53 ± 1,35	31,90 ± 0,97	24,16 ± 1,16	31,58 ± 1,12	24,75 ± 1,50	31,54 ± 1,05	23,62 ± 1,70	1,088	ns	353,417	< 0,001	0,368	ns
D136	31,42 ± 1,37	23,48 ± 1,27	31,44 ± 0,73	23,84 ± 1,25	31,28 ± 1,15	24,15 ± 1,59	31,24 ± 0,63	22,72 ± 1,74	0,725	ns	405,531	< 0,001	0,580	ns

Les résultats sont présentés sous forme de moyenne ± écart-type. Les effets principaux et l'interaction étudiés par l'ANOVA à 2 facteurs sont présentés avec les valeurs de F obtenue et la probabilité correspondante.

ns : non significatif ; D : Day (jour d'expérimentation de la cohorte adulte)

Tableau 20 : Effet du traitement pharmacologique sur le poids corporel des animaux de la cohorte juvénile entre PND3 et PND25

Poids (g)	Témoïn		15 mg/kg		30 mg/kg		50 mg/kg		70 mg/kg		ANOVA					
	mâles	femelles	mâles	femelles	mâles	femelles	mâles	femelles	mâles	femelles	Traitement		Sexe		Traitement*Sexe	
											F	p	F	p	F	p
PND3	2,07 ± 0,32	2,12 ± 0,35	2,07 ± 0,33	2,07 ± 0,46	2,15 ± 0,40	1,97 ± 0,38	2,15 ± 0,40	1,96 ± 0,37	2,15 ± 0,37	2,04 ± 0,34	F _(4,275) 0,137	ns	F _(4,275) 3,910	<0,05	F _(4,275) 1,097	ns
PND4	2,56 ± 0,38	2,58 ± 0,34	2,59 ± 0,42	2,58 ± 0,51	2,66 ± 0,44	2,45 ± 0,44	2,68 ± 0,43	2,45 ± 0,49	2,66 ± 0,40	2,55 ± 0,42	0,105	ns	4,527	<0,05	0,932	ns
PND5	3,04 ± 0,46	3,08 ± 0,38	3,10 ± 0,49	3,07 ± 0,54	3,14 ± 0,48	2,95 ± 0,52	3,21 ± 0,48	2,92 ± 0,53	3,21 ± 0,44	3,01 ± 0,49	0,166	ns	5,160	<0,05	1,100	ns
PND6	3,57 ± 0,48	3,61 ± 0,38	3,58 ± 0,52	3,58 ± 0,58	3,67 ± 0,48	3,46 ± 0,57	3,75 ± 0,48	3,42 ± 0,55	3,75 ± 0,47	3,54 ± 0,50	0,209	ns	5,445	<0,05	1,374	ns
PND7	4,05 ± 0,52	4,12 ± 0,40	4,08 ± 0,53	4,04 ± 0,59	4,15 ± 0,49	3,91 ± 0,57	4,23 ± 0,51	3,85 ± 0,55	4,20 ± 0,51	4,00 ± 0,53	0,174	ns	6,292	<0,05	1,573	ns
PND8	4,53 ± 0,53	4,58 ± 0,44	4,55 ± 0,56	4,55 ± 0,60	4,64 ± 0,51	4,41 ± 0,62	4,72 ± 0,51	4,31 ± 0,59	4,67 ± 0,46	4,51 ± 0,54	F _(4,273) 0,172	ns	F _(4,273) 5,578	<0,05	F _(4,273) 1,689	ns
PND9	5,03 ± 0,57	5,05 ± 0,46	5,02 ± 0,57	5,04 ± 0,68	5,10 ± 0,55	4,86 ± 0,64	5,16 ± 0,51	4,81 ± 0,58	5,13 ± 0,52	4,95 ± 0,57	F _(4,272) 0,156	ns	F _(4,272) 4,518	<0,05	F _(4,272) 1,144	ns
PND10	5,50 ± 0,61	5,53 ± 0,48	5,50 ± 0,57	5,46 ± 0,69	5,51 ± 0,51	5,35 ± 0,64	5,62 ± 0,51	5,23 ± 0,61	5,56 ± 0,57	5,42 ± 0,61	0,266	ns	4,001	<0,05	1,045	ns
PND11	5,92 ± 0,63	5,98 ± 0,57	5,94 ± 0,61	5,95 ± 0,76	5,95 ± 0,55	5,77 ± 0,71	6,09 ± 0,53	5,66 ± 0,66	6,01 ± 0,60	5,88 ± 0,59	0,289	ns	3,291	ns	1,339	ns
PND12	6,35 ± 0,80	6,38 ± 0,66	6,35 ± 0,75	6,39 ± 0,86	6,33 ± 0,68	6,08 ± 0,76	6,52 ± 0,64	6,00 ± 0,76	6,44 ± 0,80	6,30 ± 0,73	F _(4,204) 0,437	ns	F _(4,204) 2,668	ns	F _(4,204) 1,004	ns
PND13	6,80 ± 0,80	6,83 ± 0,69	6,77 ± 0,80	6,79 ± 0,86	6,71 ± 0,67	6,53 ± 0,77	6,99 ± 0,66	6,38 ± 0,80	6,84 ± 0,84	6,67 ± 0,79	0,442	ns	2,941	ns	1,181	ns
PND14	7,12 ± 0,87	7,07 ± 0,80	7,11 ± 0,85	7,06 ± 0,88	6,98 ± 0,70	6,79 ± 0,84	7,29 ± 0,74	6,69 ± 0,78	7,16 ± 0,98	7,04 ± 0,84	0,54	ns	3,138	ns	0,813	ns
PND15	7,45 ± 0,86	7,25 ± 0,83	7,42 ± 0,83	7,37 ± 0,94	7,21 ± 0,73	7,02 ± 0,78	7,50 ± 0,73	6,92 ± 0,76	7,36 ± 0,99	7,22 ± 0,81	0,733	ns	4,119	<0,05	0,613	ns
PND16	7,62 ± 0,85	7,45 ± 0,94	7,64 ± 0,85	7,54 ± 0,97	7,38 ± 0,75	7,25 ± 0,86	7,72 ± 0,76	7,08 ± 0,80	7,53 ± 1,02	7,49 ± 0,87	0,691	ns	3,199	ns	0,842	ns
PND17	7,77 ± 0,86	7,60 ± 0,93	7,74 ± 0,84	7,62 ± 0,94	7,51 ± 0,73	7,39 ± 0,80	7,91 ± 0,78	7,18 ± 0,73	7,74 ± 1,03	7,65 ± 0,92	0,661	ns	4,380	<0,05	1,074	ns
PND18	7,95 ± 0,85	7,68 ± 0,98	7,88 ± 0,85	7,78 ± 0,89	7,69 ± 0,66	7,54 ± 0,71	8,05 ± 0,75	7,29 ± 0,71	7,96 ± 0,95	7,68 ± 0,76	0,643	ns	7,561	<0,01	1,114	ns
PND19	8,29 ± 0,92	8,06 ± 0,89	8,18 ± 0,86	8,13 ± 0,99	8,18 ± 0,80	7,77 ± 0,75	8,42 ± 0,75	7,57 ± 0,67	8,15 ± 0,95	7,84 ± 0,75	0,549	ns	10,212	<0,01	1,336	ns
PND20	8,80 ± 0,92	8,62 ± 0,83	8,77 ± 0,91	8,61 ± 1,06	8,72 ± 0,84	8,22 ± 0,88	9,09 ± 0,81	8,20 ± 0,82	8,86 ± 1,00	8,45 ± 0,81	0,469	ns	11,957	<0,01	1,173	ns
PND21	9,46 ± 1,09	9,16 ± 0,95	9,33 ± 0,98	9,14 ± 1,30	9,38 ± 0,89	8,67 ± 1,01	9,78 ± 0,89	8,80 ± 1,00	9,48 ± 1,11	9,01 ± 0,96	0,528	ns	14,182	<0,001	1,033	ns
PND22	10,17 ± 1,13	9,88 ± 0,88	10,01 ± 0,99	9,68 ± 1,39	9,96 ± 1,02	9,27 ± 1,02	10,36 ± 1,03	9,26 ± 1,04	10,00 ± 1,28	9,45 ± 1,05	0,842	ns	15,463	<0,001	0,941	ns
PND23	11,12 ± 1,20	10,61 ± 0,91	10,95 ± 1,12	10,46 ± 1,36	10,81 ± 1,17	10,12 ± 1,11	11,41 ± 1,07	10,10 ± 1,06	10,98 ± 1,33	10,29 ± 1,07	0,72	ns	21,648	<0,001	0,889	ns
PND24	11,92 ± 1,40	11,36 ± 0,94	11,82 ± 1,28	11,06 ± 1,32	11,69 ± 1,18	10,72 ± 1,16	12,30 ± 1,21	10,78 ± 1,11	11,93 ± 1,39	11,01 ± 1,14	0,742	ns	31,439	<0,001	0,901	ns
PND25	12,85 ± 1,40	12,18 ± 0,96	12,80 ± 1,39	11,84 ± 1,44	12,68 ± 1,20	11,51 ± 1,13	13,21 ± 1,37	11,52 ± 1,10	12,89 ± 1,54	11,80 ± 1,09	F _(4,203) 0,594	ns	F _(4,203) 39,706	<0,001	F _(4,203) 0,892	ns

Les résultats sont présentés sous forme de moyenne ± écart-type. Les effets principaux et l'interaction étudiés par l'ANOVA à 2 facteurs sont présentés avec les valeurs de F obtenue et la probabilité correspondante.

ns : non significatif

PND : Post Natal Day (jour d'expérimentation de la cohorte juvénile)

Tableau 21 : Effet du traitement pharmacologique sur le poids corporel des animaux de la cohorte juvénile entre PND26 et PND136

Poids (g)	Témoïn		15 mg/kg		30 mg/kg		50 mg/kg		70 mg/kg		ANOVA					
	mâles	femelles	mâles	femelles	mâles	femelles	mâles	femelles	mâles	femelles	Traitement		Sexe		Traitement*Sexe	
											F	p	F	p	F	p
PND26	13,84 ± 1,41	12,87 ± 1,17	13,71 ± 1,30	12,63 ± 1,39	13,40 ± 1,22	12,38 ± 1,01	14,14 ± 1,60	12,34 ± 1,07	13,61 ± 1,66	12,45 ± 1,13	F (4, 175)		F (4, 175)		F (4, 175)	
											0,694	ns	37,548	<0,001	0,603	ns
PND28	15,81 ± 1,70	14,32 ± 1,02	15,60 ± 1,63	14,07 ± 1,28	15,29 ± 1,38	13,71 ± 1,15	16,35 ± 1,70	13,55 ± 0,99	15,40 ± 2,27	13,97 ± 1,29	F (4, 135)		F (4, 135)		F (4, 135)	
PND30	17,80 ± 1,66	15,74 ± 1,18	17,33 ± 1,69	15,22 ± 1,46	17,08 ± 1,31	15,05 ± 1,15	18,16 ± 1,84	15,06 ± 1,22	16,75 ± 2,66	15,05 ± 1,22	0,616	ns	49,454	<0,001	1,07	ns
PND35	21,16 ± 1,48	18,07 ± 1,09	20,99 ± 1,67	17,86 ± 0,86	20,56 ± 1,20	17,84 ± 0,87	21,39 ± 1,66	17,95 ± 1,03	20,12 ± 2,94	18,18 ± 0,65	1,463	ns	66,716	<0,001	0,771	ns
PND40	22,80 ± 1,42	18,62 ± 1,17	22,49 ± 1,80	18,52 ± 0,90	22,04 ± 0,90	18,43 ± 0,68	23,01 ± 1,21	18,54 ± 0,85	21,85 ± 2,82	18,91 ± 0,82	0,705	ns	132,259	<0,001	1,066	ns
PND42	23,27 ± 1,44	18,76 ± 1,15	23,01 ± 1,92	18,92 ± 1,06	22,37 ± 1,08	18,73 ± 0,73	23,69 ± 1,33	18,49 ± 0,95	22,39 ± 2,68	18,93 ± 1,01	0,721	ns	265,471	<0,001	1,264	ns
											0,74	ns	293,903	<0,001	1,639	ns
PND45	24,29 ± 1,43	18,97 ± 1,18	23,71 ± 1,94	19,19 ± 0,71	23,09 ± 1,25	18,84 ± 0,90	24,46 ± 1,29	18,81 ± 0,76	23,82 ± 2,02	19,25 ± 0,96	F (4, 134)		F (4, 134)		F (4, 134)	
PND49	25,23 ± 1,45	19,50 ± 1,21	24,70 ± 2,06	19,55 ± 0,73	24,25 ± 1,12	19,26 ± 1,12	25,51 ± 1,34	19,36 ± 0,91	24,90 ± 1,90	19,79 ± 1,08	1,209	ns	471,272	<0,001	1,407	ns
PND50	25,27 ± 1,35	19,51 ± 1,14	24,73 ± 2,24	19,52 ± 1,01	24,37 ± 1,03	19,39 ± 1,00	25,65 ± 1,41	19,39 ± 0,87	25,03 ± 2,01	19,57 ± 1,21	1,119	ns	551,902	<0,001	0,914	ns
PND55	26,13 ± 1,35	20,27 ± 1,30	25,55 ± 2,28	20,22 ± 0,85	25,17 ± 1,01	19,91 ± 1,18	26,69 ± 1,36	19,95 ± 0,76	25,72 ± 1,76	20,64 ± 2,44	0,867	ns	536,5	<0,001	0,872	ns
PND60	26,84 ± 1,47	20,48 ± 1,33	26,31 ± 2,14	20,58 ± 0,81	25,79 ± 1,22	20,35 ± 1,11	27,20 ± 1,35	20,10 ± 0,98	26,30 ± 1,77	21,35 ± 3,05	1,116	ns	456,644	<0,001	1,308	ns
											0,81	ns	431,211	<0,001	1,709	ns
PND67	27,15 ± 1,21	20,94 ± 1,17	26,52 ± 2,15	20,96 ± 1,01	26,10 ± 0,94	20,70 ± 1,30	27,54 ± 1,37	20,68 ± 1,05	26,73 ± 1,75	20,92 ± 1,10	F (4, 133)		F (4, 133)		F (4, 133)	
PND74	27,68 ± 1,21	21,19 ± 1,17	27,39 ± 2,34	21,67 ± 1,57	26,83 ± 1,17	21,26 ± 1,54	28,01 ± 1,57	21,06 ± 0,99	27,27 ± 1,84	21,19 ± 1,23	1,161	ns	653,746	<0,001	1,267	ns
											0,537	ns	561,725	<0,001	0,947	ns
PND81	28,77 ± 0,98	22,39 ± 1,74	29,45 ± 0,89	22,03 ± 1,38	27,55 ± 1,05	21,53 ± 1,59	29,29 ± 1,37	22,01 ± 1,24	28,69 ± 2,05	21,97 ± 1,09	F (4, 70)		F (4, 70)		F (4, 70)	
PND88	29,16 ± 0,91	22,80 ± 1,81	30,14 ± 1,12	22,60 ± 1,55	28,04 ± 1,11	21,76 ± 1,62	29,56 ± 1,42	22,09 ± 2,04	29,23 ± 2,03	22,94 ± 1,61	1,885	ns	449,533	<0,001	0,7	ns
PND95	29,93 ± 1,05	22,86 ± 2,05	30,71 ± 1,00	23,49 ± 1,72	27,90 ± 1,93	22,00 ± 1,47	30,36 ± 1,58	22,80 ± 1,64	29,99 ± 2,11	22,93 ± 1,29	1,951	ns	355,474	<0,001	0,677	ns
PND102	30,57 ± 0,97	24,10 ± 2,09	31,24 ± 1,16	23,66 ± 1,48	29,15 ± 1,20	22,83 ± 1,69	31,00 ± 1,34	23,19 ± 1,81	30,33 ± 1,98	23,14 ± 1,18	3,668	<0,05	339,381	<0,001	0,554	ns
PND109	31,36 ± 0,76	24,43 ± 2,25	31,78 ± 1,17	24,64 ± 2,10	29,75 ± 1,12	23,89 ± 1,66	31,56 ± 1,24	23,77 ± 1,08	30,94 ± 1,92	23,74 ± 1,53	2,233	ns	398,708	<0,001	0,7	ns
PND116	31,89 ± 0,82	25,30 ± 2,22	32,58 ± 1,40	24,99 ± 2,19	29,95 ± 1,23	24,40 ± 1,62	31,83 ± 1,74	24,13 ± 1,70	31,43 ± 2,18	24,03 ± 1,61	1,769	ns	373,16	<0,001	0,756	ns
PND123	32,03 ± 1,20	25,80 ± 2,42	32,86 ± 1,44	24,86 ± 2,46	30,64 ± 1,19	23,90 ± 1,67	32,31 ± 1,71	24,90 ± 1,92	31,84 ± 2,23	24,31 ± 1,30	2,158	ns	301,77	<0,001	1,019	ns
PND130	32,43 ± 1,42	26,23 ± 2,64	33,28 ± 1,61	25,28 ± 2,41	31,16 ± 1,38	24,60 ± 2,10	32,83 ± 1,48	25,20 ± 2,24	32,07 ± 2,10	24,50 ± 1,45	2,144	ns	290,446	<0,001	0,56	ns
											1,641	ns	256,986	<0,001	0,595	ns
PND136	31,93 ± 1,31	25,63 ± 2,54	32,65 ± 1,18	25,01 ± 2,20	30,43 ± 1,03	24,24 ± 1,99	32,51 ± 1,59	24,81 ± 2,00	31,87 ± 2,06	24,34 ± 1,69	F (4, 69)		F (4, 69)		F (4, 69)	
											1,801	ns	275,87	<0,001	0,634	ns

Les résultats sont présentés sous forme de moyenne ± écart-type. Les effets principaux et l'interaction étudiés par l'ANOVA à 2 facteurs sont présentés avec les valeurs de F obtenue et la probabilité correspondante.

ns : non significatif ; PND : *Post Natal Day* (jour d'expérimentation de la cohorte juvénile)

II.1.3. Accumulation sérique de l'hydroxychloroquine

Le taux de HCQ dans le sérum des animaux n'a jamais dépassé le seuil de détection chez les animaux du groupe témoin. Le reste des animaux présentait un taux de HCQ sérique variable entre 0 et 415 ng/ml.

A D3, la HCQ a été détectée chez 7 animaux sur 11 (63 %) appartenant au groupe 30 mg/kg, 9 animaux sur 10 (90 %) appartenant au groupe 50 mg/kg et 10 animaux sur 10 (100 %) appartenant au groupe 70 mg/kg. La concentration médiane en HCQ sérique était respectivement de 39, 90 et 96 ng/ml pour les groupes 30, 50 et 70 mg/kg (**Figure 32**). La comparaison multiple des groupes par le test de Mann-Whitney confirme que les groupes traités présentaient une concentration en HCQ sérique supérieure aux témoins ($p < 0.01$ pour le groupe 30 mg/ml et $p < 0.001$ pour les groupes 50 et 70 mg/ml) (**Figure 32**). A D73 et D136, l'ensemble des mesures de concentration sérique en HCQ ont été inférieures à la limite de quantification de 25 ng/ml à l'exception d'un animal à D73 présentant un taux de 37 ng/ml (qui n'a pas été pris en compte pour les analyses statistiques).

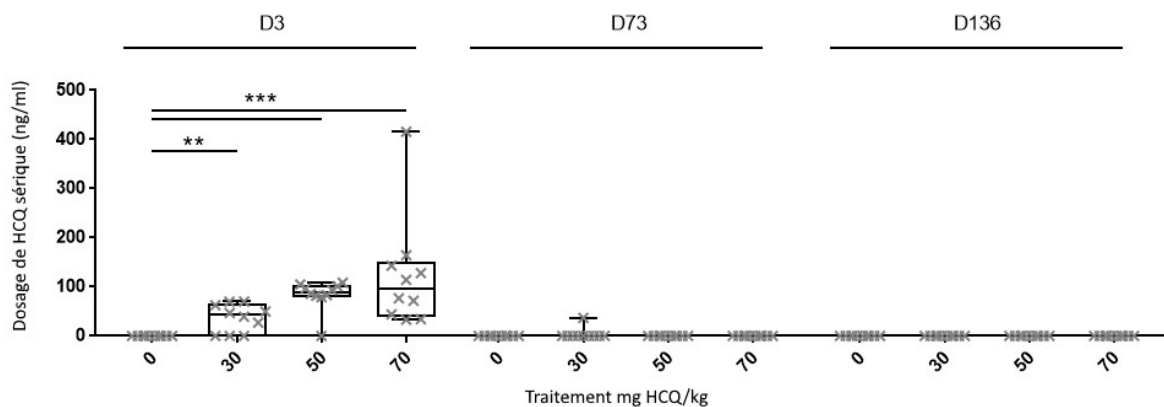


Figure 32 : Dosage de l'hydroxychloroquine sérique des souris de la cohorte adulte traitées par injection intra péritonéale

Chaque croix représente la valeur de HCQ dosée chez un animal. Les boîtes à moustaches indiquent la médiane et les quartiles. Le test de Kruskal-Wallis a été utilisé pour comparer les doses des animaux des quatre groupes et le test de Mann-Whitney a été utilisé pour les comparaisons multiples. ** : $p < 0.01$; *** : $p < 0.001$ différence statistiquement significative par rapport aux témoins ; D : Day (jour d'expérimentation de la cohorte adulte).

En séparant les genres, la concentration médiane en HCQ sérique des mâles était respectivement de 50, 94 et 143 ng/ml pour les groupes 30, 50 et 70 mg/kg et la concentration médiane en HCQ sérique des femelles était respectivement de 14, 83 et 77 ng/ml pour les groupes 30, 50 et 70 mg/kg (**Figure 33**). Selon la comparaison multiple des groupes par le test de Mann-Whitney, la concentration en HCQ sérique était plus importante dans les groupe

30 mg/kg ($p < 0.05$), 50 et 70 mg/kg ($p < 0.01$) chez les mâles et dans les groupes 50 mg/kg ($p < 0.05$) et 70 mg/kg ($p < 0.01$) chez les femelles par rapport aux témoins (**Figure 33**). Aucune différence de concentration n'a été observée entre les mâles et les femelles quelle que soit la dose de composé.

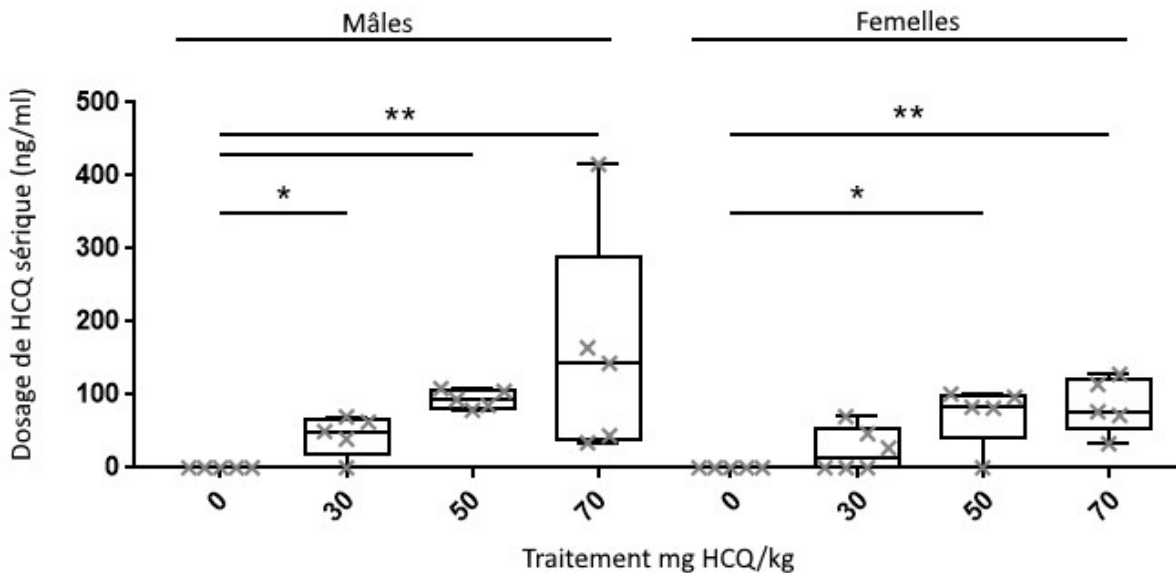


Figure 33 : Dosage de l'hydroxychloroquine sérique des souris à D3 exprimée par genre

Chaque croix représente la valeur de HCQ dosée chez un animal. Les boîtes à moustaches indiquent la médiane et les quartiles. Le test de Kruskal-Wallis a été utilisé pour comparer les doses des animaux des quatre groupes et le test de Mann-Whitney a été utilisé pour les comparaisons multiples. * : $p < 0.05$; ** : $p < 0.01$ différence statistiquement significative par rapport aux témoins.

II.1.4. Analyses histochimiques : évaluation de l'impact du traitement sur le flux autophagique

II.1.4.1. Cohorte adulte

Les résultats de comparaison des quantifications protéiques sont résumés dans le **Tableau 22**.

Tableau 22 : Effets du traitement sur le taux de protéines de l'autophagie des différents organes de la cohorte adulte

Organe			Muscle tibial antérieur			Ganglions lymphatiques			Rate			Foie			Cerveau		
Endpoint	Sexe	Protéine	Groupe (mg HCQ/kg)			Groupe (mg HCQ/kg)			Groupe (mg HCQ/kg)			Groupe (mg HCQ/kg)			Groupe (mg HCQ/kg)		
			30	50	70	30	50	70	30	50	70	30	50	70	30	50	70
D3	♂	LC3-I	-	-	-	-	↑	↑	-	-	-	-	↓	↓	-	-	-
		LC3-II	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	↓	-	-	-
		SQSTM1/p62	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	↓	↓	-	-	-
	♀	LC3-I	-	-	-	-	-	↑	-	-	-	-	-	-	-	-	-
		LC3-II	-	-	-	-	↑	↑	-	-	-	-	-	-	-	-	-
		SQSTM1/p62	-	-	-	-	-	-	↑	-	-	-	-	-	↓	-	-
D73	♂	LC3-I	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
		LC3-II	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
		SQSTM1/p62	-	-	↓	-	-	-	-	↓	-	-	↓	↓	-	-	-
	♀	LC3-I	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	↓	-	-
		LC3-II	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	↓	-
		SQSTM1/p62	-	-	-	-	-	-	-	-	↓	-	-	-	-	-	-
D136	♂	LC3-I	-	-	-	-	↑	↑	-	-	-	-	-	↓	↓	-	↓
		LC3-II	-	-	-	↑	↑	-	-	↓	-	-	-	↓	↓	-	↓
		SQSTM1/p62	-	↓	-	↓	-	-	↓	↓	↓	-	-	↓	-	-	-
	♀	LC3-I	-	-	-	-	↑	-	-	-	-	-	↑	↑	-	-	-
		LC3-II	-	-	-	-	-	-	-	-	-	↑	↑	↑	-	-	-
		SQSTM1/p62	-	-	-	-	-	-	-	-	↓	↑	↑	↑	-	-	-

Les résultats sont présentés sous forme de différence par rapport au groupe contrôle après analyse par un test de Kruskal-Wallis.

Les comparaisons multiples ont été réalisées par un test de Mann-Whitney sur des effectifs de $n = 5$ animaux par groupe, sexe.

- : absence de différence statistique

↑ : augmentation significative du taux de protéines par rapport au groupe contrôle ($p < 0,05$)

↓ : diminution significative du taux de protéines par rapport au groupe contrôle ($p < 0,05$)

D : Day (jour d'expérimentation de la cohorte adulte)

Par comparaison avec le groupe contrôle, plusieurs protéines ont été significativement accumulées ou ont vu leur taux réduit sans organisation apparente et sans relation avec l'organe concerné (**Tableau 22**).

À D3, seuls les ganglions lymphatiques et le foie ont présenté des modulations d'expression protéique induites par le traitement pharmacologique pour les mâles. Ainsi le taux de LC3-II du foie a été diminué dans le groupe d'exposition 70 mg/kg et le taux de SQSTM1/p62 des ganglions lymphatiques a été réduit pour les groupes 50 et 70 mg/kg.

Chez les femelles, le taux protéique a été modulé par le traitement dans les ganglions lymphatiques et le cerveau. La protéine LC3-II a été significativement accumulée dans les ganglions lymphatiques des groupes d'exposition 50 et 70 mg/kg. Le taux de SQSTM1/p62 a été statistiquement plus important dans les ganglions lymphatiques du groupe 70 mg/kg mais moins important dans le cerveau du groupe 30 mg/kg.

À D73, les taux protéiques ont été modifiés par le traitement dans le TA, la rate et le foie des mâles. Le taux de SQSTM1/p62 a été réduit dans le TA pour le groupe 70 mg/kg, dans la rate pour le groupe 50 mg/kg et dans le foie pour les groupes 50 et 70 mg/kg.

Chez les femelles, le traitement pharmacologique a eu un impact sur la rate et le cerveau. La protéine LC3-II a été retrouvée en plus faible quantité dans le cerveau du groupe 50 mg/kg et le taux de SQSTM1/p62 a été diminué dans la rate du groupe 70 mg/kg.

À D136, l'ensemble des organes des mâles ont présentés une modulation protéique. LC3-II a été accumulée dans les ganglions lymphatiques des groupes 30 et 50 mg/kg mais réduit dans la rate pour le groupe 50 mg/kg, dans le foie pour le groupe 70 mg/kg et dans le cerveau pour les groupes 30 et 70 mg/kg. Le traitement a significativement diminué le taux de SQSTM1/p62 dans le TA pour le groupe 50 mg/kg, dans les ganglions lymphatiques pour le groupe 30 mg/kg et dans la rate pour le groupe 70 mg/kg.

Chez les femelles, une modulation du taux de protéine a été observée dans les ganglions lymphatiques, la rate et le foie. LC3-II a été retrouvée en plus grande quantité dans le foie pour tous les groupes d'exposition. Le taux de SQSTM1/p62 a également été augmenté dans le foie pour l'ensemble des groupes mais a été retrouvé diminué dans la rate du groupe 70 mg/kg.

L'accumulation des protéines LC3-II et SQSTM1/p62 attendue en cas d'inhibition de l'autophagie n'a été observée que dans le foie des animaux femelles à D136 pour l'ensemble des groupes et dans les ganglions lymphatiques des animaux femelles à D3 pour le groupe 70 mg/kg (**Tableau 22**). Cette observation a été complétée par l'utilisation d'une seconde méthode de calcul reposant sur le ratio LC3-II/LC3-I. Ce ratio n'a été augmenté dans aucun organe de manière synchrone avec une accumulation de SQSTM1/p62, ce qui aurait été un signe de perturbation du processus autophagique dans ses derniers stades par une perturbation de l'acidification lysosomale. En tant qu'organe distant du site d'injection, le TA n'a pas présenté de signe d'accumulation des protéines LC3-II ou SQSTM1/p62 chez les mâles comme chez les femelles (**Figure 34**).

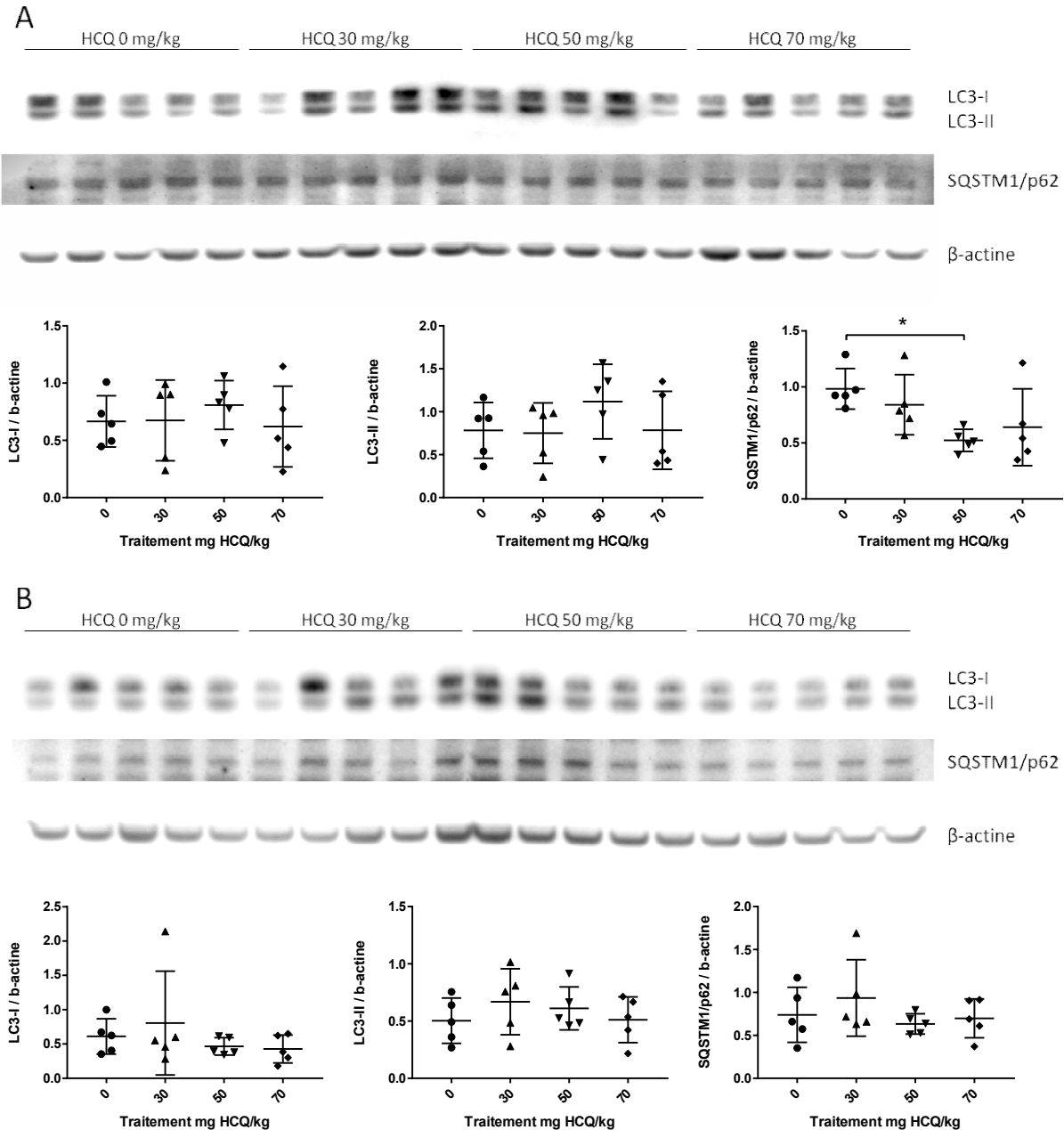


Figure 34 : Western blot représentatif des protéines LC3 et SQSTM1/p62 dans le muscle tibial antérieur des animaux adultes sacrifiés à D136

Représentation des variations interindividuelles et intergroupes des variations d'expression protéique. (A) Données mâles $n = 5$ /groupe ; (B) Données femelles $n = 5$ /groupe. Taux protéique normalisé analysé par un test de Kruskal-Wallis. Comparaisons multiples réalisées par le test de Mann-Whitney ; * $p < 0,05$.

II.1.4.2. Cohorte juvénile

Les résultats de comparaison des quantifications protéiques sont résumés dans le **Tableau 23**.

Tableau 23 : Effets du traitement sur le taux de protéines de l'autophagie des différents organes de la cohorte juvénile

Endpoint	Organe	Sexe	Protéine	Muscle tibial antérieur				Ganglions lymphatiques				Rate				Foie				Cerveau			
				Groupe (mg HCQ/kg)				Groupe (mg HCQ/kg)				Groupe (mg HCQ/kg)				Groupe (mg HCQ/kg)				Groupe (mg HCQ/kg)			
				15	30	50	70	15	30	50	70	15	30	50	70	15	30	50	70	15	30	50	70
PND11	♂	LC3-I	-	-	-	↓	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	↓	↓	
		LC3-II	-	↓	↓	↓	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	↓	↓	↓	↓	
		SQSTM1/p62	-	-	↓	-	-	-	-	-	-	↑	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	♀	LC3-I	-	-	-	-	↑	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
		LC3-II	-	-	-	-	-	↑	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
		SQSTM1/p62	-	-	-	-	↑	↑	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
PND26	♂	LC3-I	-	-	-	-	-	-	-	↑	-	-	-	-	-	-	-	-	↑	-	↑	-	
		LC3-II	-	↑	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	↑	↑	↑	-	
		SQSTM1/p62	-	-	-	-	-	-	-	-	↑	-	-	↓	-	-	-	-	↑	-	↑	↑	
	♀	LC3-I	-	-	-	-	↑	-	-	↓	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	↑	-	
		LC3-II	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	↑	-	
		SQSTM1/p62	↑	↑	-	-	-	-	-	-	-	↓	↓	↓	-	-	-	-	-	-	-	-	
PND73	♂	LC3-I	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		
		LC3-II	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		
		SQSTM1/p62	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		
	♀	LC3-I	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	↓	-	-	↓	-	-	-		
		LC3-II	-	-	-	-	-	↑	-	-	↓	↓	-	-	-	-	-	-	-	-	-		
		SQSTM1/p62	-	-	-	-	-	↑	-	↓	↓	↓	-	-	-	-	-	-	-	-	-		
PND136	♂	LC3-I	-	-	-	-	↑	↑	↑	↑	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		
		LC3-II	-	-	-	-	-	↑	-	↑	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		
		SQSTM1/p62	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		
	♀	LC3-I	-	↓	↓	-	-	-	-	-	-	-	-	-	↑	↑	-	↑	↑	-	-	↓	
		LC3-II	-	-	↓	-	-	-	-	-	-	-	-	-	↑	↑	↑	↑	-	-	↓	↓	
		SQSTM1/p62	-	-	↓	-	-	-	-	-	-	↑	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	

Les résultats sont présentés sous forme de différence par rapport au groupe contrôle après analyse par un test de Kruskal-Wallis.

Les comparaisons multiples ont été réalisées par un test de Mann-Whitney sur des effectifs de $n = 5$ animaux par groupe, sexe.

- : absence de différence statistique

↑ : augmentation significative du taux de protéines par rapport au groupe contrôle ($p < 0,05$)

↓ : diminution significative du taux de protéines par rapport au groupe contrôle ($p < 0,05$)

PND : Post Natal Day (jour d'expérimentation de la cohorte juvénile)

Comme pour l'expérimentation adulte, le taux de plusieurs protéines a été régulé positivement ou négativement selon les groupes et les organes sans organisation apparente (**Tableau 23**).

A PND11, le traitement a modifié les taux protéiques dans le TA, la rate et le cerveau pour les animaux mâles. Le taux de LC3-II a été significativement diminué dans le TA pour les groupes 30, 50 et 70 mg/kg. SQSTM1/p62 a été accumulée dans le TA pour le groupe 50 mg/kg mais réduit dans le cerveau pour le groupe 30 mg/kg par rapport aux contrôles.

Chez les femelles, des différences de concentration en protéine ont été observées dans les ganglions lymphatiques avec une accumulation de LC3-II pour le groupe 30 mg/kg et une augmentation de SQSTM1/p62 pour les groupes 15 et 30 mg/kg.

A PND26, le traitement pharmacologique a eu un impact sur la présence des protéines autophagiques dans le TA, la rate et le cerveau des mâles. La protéine LC3-II a été retrouvée en plus grande quantité dans le TA pour le groupe 30 mg/kg ainsi que dans le cerveau pour les groupes 15, 30 et 50 mg/kg. SQSTM1/p62 a été accumulée dans la rate pour le groupe 15 mg/kg et dans le cerveau pour les groupes 15, 50 et 70 mg/kg. Elle a en revanche été retrouvée en quantité réduite dans la rate pour le groupe 70 mg/kg.

Chez les femelles, les taux protéiques ont été modulés dans le TA, les ganglions lymphatiques, la rate et le cerveau. Le traitement a significativement accru le taux de LC3-II dans le cerveau pour le groupe 50 mg/kg. SQSTM1/p62 a été retrouvée augmentée dans le TA pour les groupes 15 et 30 mg/kg mais diminuée dans la rate pour les groupes 30, 50 et 70 mg/kg.

A PND73, les organes mâles n'ont présentés aucune modification dans la présence des protéines étudiées.

Chez les femelles en revanche, les ganglions lymphatiques, la rate et le foie ont été impactés par le traitement pharmacologique. La protéine LC3-II a été accumulée dans les ganglions lymphatiques pour les groupes 30 mg/kg mais réduite dans la rate pour les groupes 15 et 30 mg/kg. SQSTM1/p62 a été retrouvée en plus grande quantité dans les ganglions lymphatiques pour le groupe 30 mg/kg mais en quantité réduite pour le groupe 70 mg/kg ainsi que dans la rate pour les groupes 15 et 30 mg/kg.

A PND136, les ganglions lymphatiques des mâles ont présenté une quantité de LC3-II augmentée pour les groupes 30 et 70 par rapport au groupe contrôle.

Le TA, la rate et le foie des femelles ont présentés des quantités de protéines modulées par le traitement. LC3-II a été significativement réduite dans le TA pour le groupe d'exposition 50 mg/kg et dans le cerveau pour les groupes 50 et 70 mg/kg mais a été retrouvée en proportion plus importante dans le foie pour tous les groupes. SQSTM1/p62 a été retrouvée en plus faible quantité dans le TA pour le groupe 50 mg/kg mais en quantité plus importante dans la rate pour le groupe 30 mg/kg.

Finalement, aucun organe ne semble avoir été réellement impacté par le traitement au niveau autophagique à aucun des points temporels étudiés. Il n'y a en effet pas d'accumulation conjointe de LC3-II et SQSTM1/p62 à l'exception du cerveau des mâles, traités avec 15 ou

50 mg/kg à PND26, et des ganglions lymphatiques des femelles traitées avec 30 mg/kg de HCQ aux temps PND11 et PND73 bien que ces effets ne soient pas stables dans le temps comme le confirme les résultats des temps PND26 et PND136 (**Tableau 23**). De plus, un contrôle des données par calcul du ratio LC3-II/LC3-I confirme qu'aucune augmentation de ce ratio synchrones avec une augmentation de SQSTM1/p62 n'a été observée sauf dans le cerveau des mâles à PND26 pour le groupe 15 mg/kg. En tant qu'organe distant du site d'injection, le TA n'a pas présenté de signe d'accumulation des protéines LC3-II ou SQSTM1/p62 chez les mâles comme chez les femelles (**Figure 35**).

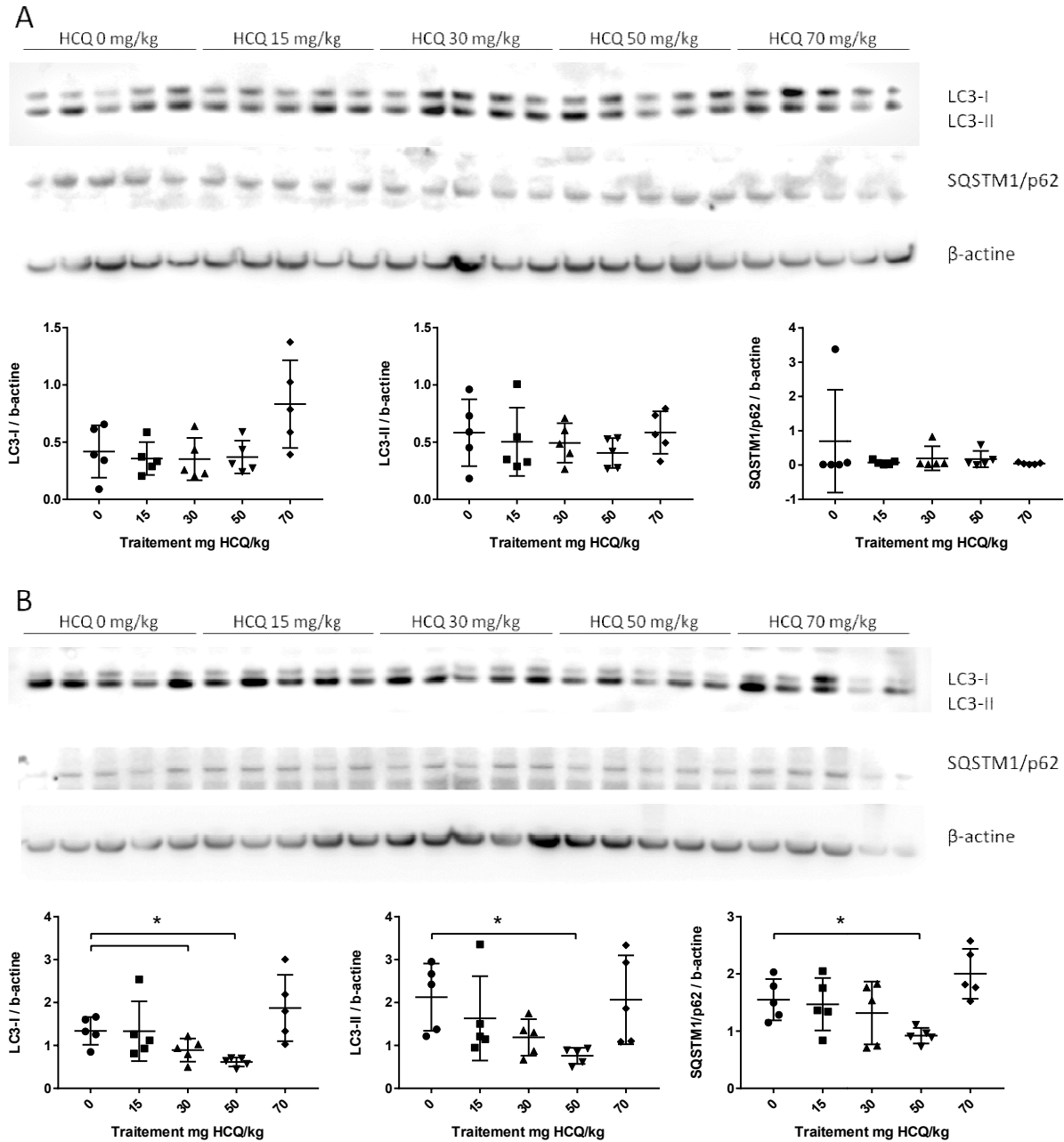


Figure 35 : Western blot représentatif des protéines LC3 et SQSTM1/p62 dans le muscle tibial antérieur des animaux juvéniles sacrifiés à PND136

Représentation des variations interindividuelles et intergroupes des variations d'expression protéique. (A) Données mâles $n = 5$ /groupe ; (B) Données femelles $n = 5$ /groupe. Taux protéique normalisé analysé par un test de Kruskal-Wallis. Comparaisons multiples réalisées par le test de Mann-Whitney ; * $p < 0,05$.

II.1.5. Effet du traitement sur le développement locomoteur

II.1.5.1. Test de retournement (*righting reflex*)

L'analyse statistique n'a révélé aucune différence, concernant le pourcentage de réussite, entre les groupes à PND3, PND4 ou PND5 (**Figure 36A**). De plus, le temps mis par les animaux pour réussir le test n'a été modifié par aucune dose de traitement quel que soit le jour de test considéré (**Figure 36B**). En revanche, à PND5, les animaux témoins comme ceux exposés aux doses 30 mg/kg et 70 mg/kg ont amélioré leurs temps par rapport au premier jour de test (**Figure 36B**).

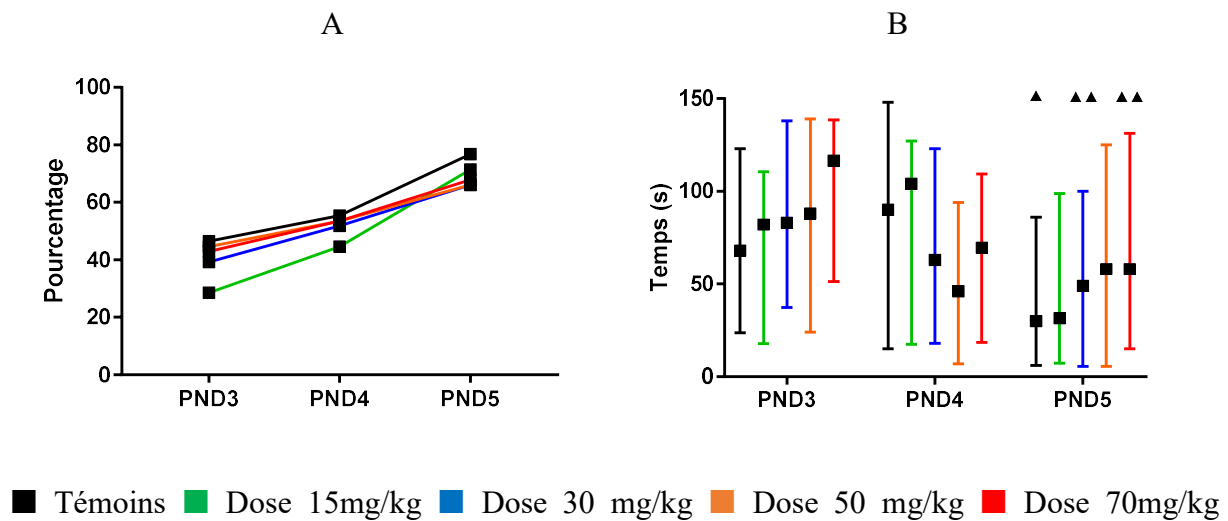


Figure 36 : Pourcentage de réussite au test de retournement (A) et temps mis par les animaux des cinq groupes pour se retourner (médianes et quartiles) (B)

Le chi-deux de Pearson, le test de Kruskal-Wallis et le test de Friedman ont été réalisés pour comparer les animaux des cinq groupes. Les tests de Mann-Whitney et Wilcoxon ont été utilisés pour les comparaisons multiples.

▲ : $p < 0,05$; ▲▲ : $p < 0,01$ différence statistiquement significative par rapport au premier jour de test ; PND : *Post Natal Day* (*jour d'expérimentation de la cohorte juvénile*).

II.1.5.2. Test d'agrippement (*grasping reflex*)

L'analyse des données relevées dans ce test n'a montré aucune différence de pourcentage de réussite entre les groupes à PND4, PND5 ou PND6 (**Figure 37A**). Quelque soit le jour de test, l'angle de chute a été similaire entre les animaux traités et les contrôles (**Figure 37B**). De plus, l'ensemble des animaux améliorent leurs performances à ce test au cours des trois jours de test (**Figure 37B**).

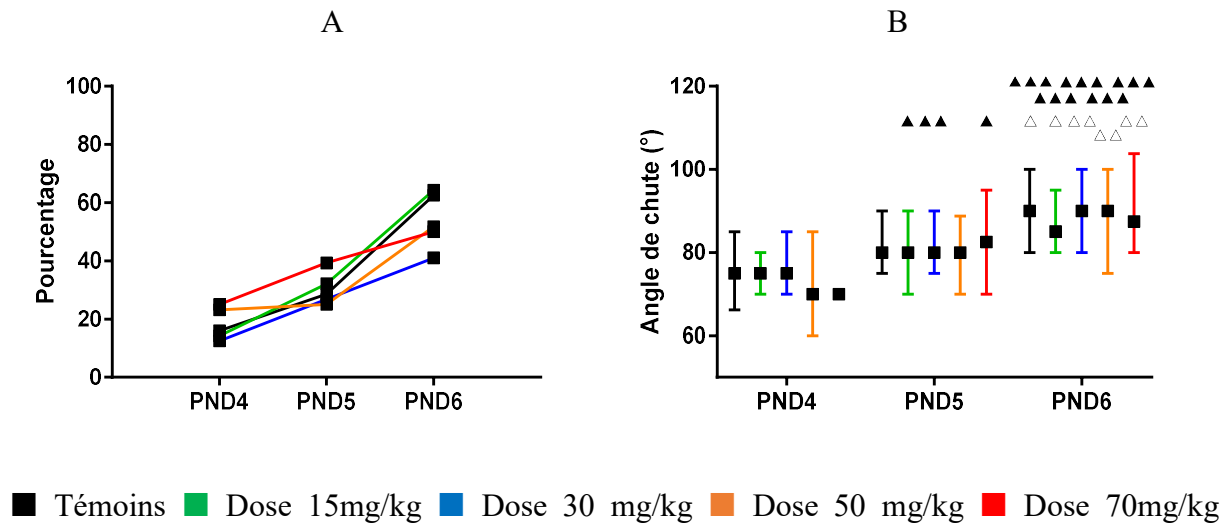


Figure 37 : Pourcentage de réussite au test d'agrippement (A) et angle atteint par les animaux des cinq groupes (médianes et quartiles) (B)

Le chi-deux de Pearson, le test de Kruskal-Wallis et le test de Friedman ont été réalisés pour comparer les animaux des cinq groupes. Les tests de Mann-Whitney et Wilcoxon ont été utilisés pour les comparaisons multiples.

▲ : $p < 0,05$; ▲▲ : $p < 0,01$; ▲▲▲ : $p < 0,001$ différence statistiquement significative par rapport au premier jour de test.

△ : $p < 0,05$; △△ : $p < 0,01$ différence statistiquement significative par rapport au second jour de test.

PND : *Post Natal Day* (jour d'expérimentation de la cohorte juvénile).

II.1.5.3. *Cliff avoidance*

Le chi-deux de Pearson n'a révélé aucune variation significative du pourcentage de réussite entre les cinq groupes (**Figure 38A**). Le temps mis par les animaux pour reculer sur la plateforme n'a pas été affecté par le traitement quelque soit le jour de test envisagé (**Figure 38B**). Enfin, les animaux traités ont amélioré leurs performances lors du second jour de test et seuls les animaux des groupes 15 et 70 mg/kg ont amélioré leurs performances au cours des trois jours de test (**Figure 38B**).

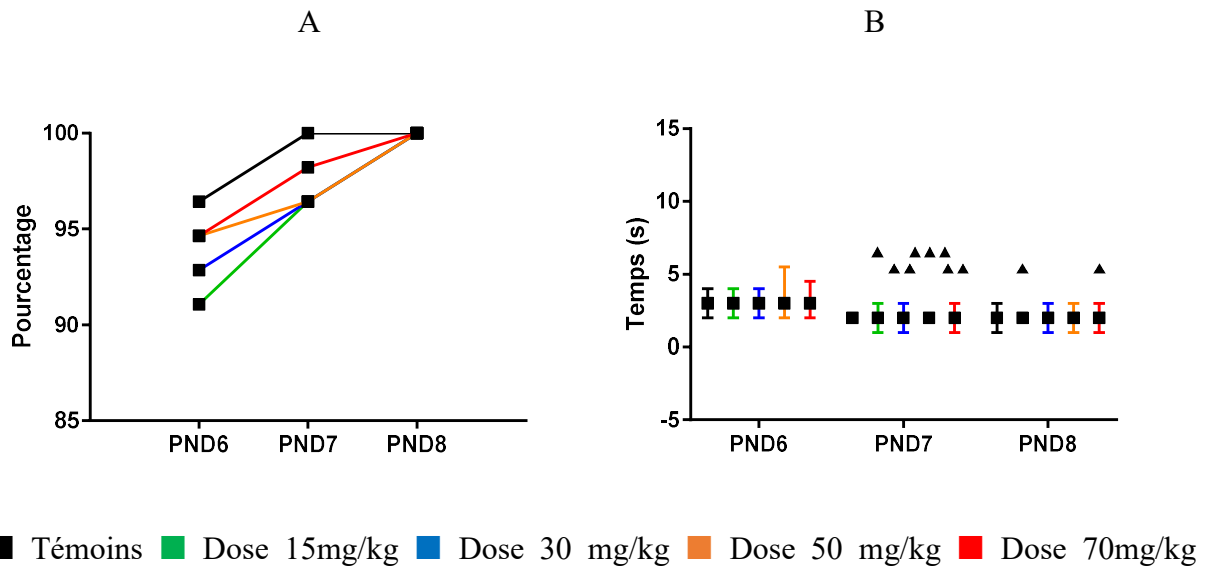


Figure 38 : Pourcentage de réussite au test du *Cliff avoidance* (A) et temps mis par les animaux des cinq groupes pour reculer sur la plateforme (médianes et quartiles) (B)

Le chi-deux de Pearson, le test de Kruskal-Wallis et le test de Friedman ont été réalisés pour comparer les animaux des cinq groupes. Les tests de Mann-Whitney et Wilcoxon ont été utilisés pour les comparaisons multiples.

▲ : $p < 0,05$; ▲▲ : $p < 0,01$; ▲▲▲ : $p < 0,001$ différence statistiquement significative par rapport au premier jour de test ; PND : *Post Natal Day* (jour d'expérimentation de la cohorte juvénile).

II.1.5.4. Test de réaction antigravitaire (*negative geotaxis*)

L'analyse n'a révélé aucune incidence du traitement sur le pourcentage de réussite des cinq groupes (**Figure 39A**). Aucune différence significative concernant le temps mis pour effectuer une rotation de 180° n'a été observée (**Figure 39B**). L'ensemble des animaux ont amélioré leurs performances sur les trois jours de test et seuls les témoins ont amélioré leurs performances d'un jour à l'autre (**Figure 39B**).

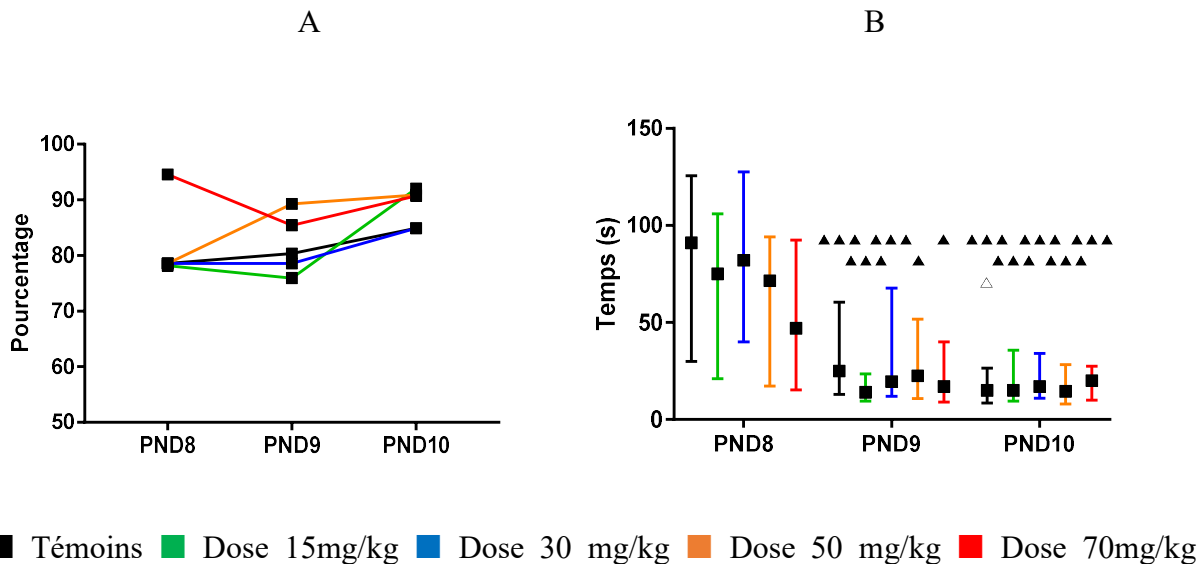


Figure 39 : Pourcentage de réussite au test de réaction antigravitaire (A) et temps mis par les animaux des cinq groupes pour effectuer une rotation de 180° (médianes et quartiles) (B)

Le chi-deux de Pearson, le test de Kruskal-Wallis et le test de Friedman ont été réalisés pour comparer les animaux des cinq groupes. Les tests de Mann-Whitney et Wilcoxon ont été utilisés pour les comparaisons multiples.

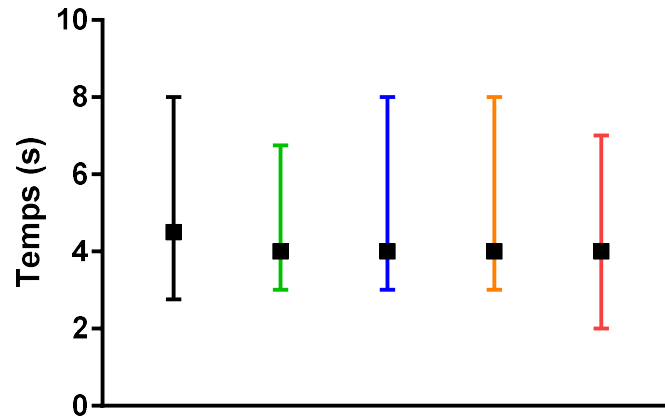
▲ : $p < 0,05$; ▲▲ : $p < 0,01$; ▲▲▲ : $p < 0,001$ différence statistiquement significative par rapport au premier jour de test.

△ : $p < 0,05$ différence statistiquement significative par rapport au second jour de test.

PND : *Post Natal Day* (jour d'expérimentation de la cohorte juvénile).

II.1.5.5. Test de suspension

Aucune différence significative n'a été révélée par l'analyse des temps obtenus à ce test (**Figure 40**).



■ Témoins ■ Dose 15mg/kg ■ Dose 30 mg/kg ■ Dose 50 mg/kg ■ Dose 70mg/kg

Figure 40 : Temps de suspension des animaux des cinq groupes avant la chute (médianes et quartiles)

Le test de Kruskal-Wallis a été réalisé pour comparer les animaux des cinq groupes.

II.1.5.6. Test de coordination locomotrice

L'ensemble des résultats obtenus à ce test est présenté dans le **Tableau 24**.

Tableau 24 : Effets du traitement sur les différentes variables du test de coordination locomotrice réalisé à PND20, PND23 et PND26

	Témoins			15 mg/kg			30 mg/kg			50 mg/kg			70 mg/kg		
	PND20	PND23	PND26	PND20	PND23	PND26	PND20	PND23	PND26	PND20	PND23	PND26	PND20	PND23	PND26
Temps de nage (s)	59,52 (26,63 - 139,88)	7,65 ▲▲▲ (3,04 - 15,03)	5,86 ▲▲▲ (3,72 - 12,32)	62,45 (33,07 - 111,49)	11,66 ▲▲▲ (5,65 - 18,21)	4,72 ▲▲▲△△△ (3,24 - 7,35)	51,11 (31,76 - 115,53)	10,58 ▲▲▲ (4,55 - 17,97)	5,44 ▲▲▲△ (3,81 - 11,62)	59,56 (25,17 - 95,47)	9,53 ▲▲▲ (5,62 - 12,19)	4,55 ▲▲▲△△△ (2,51 - 9,66)	81,52 (35,15 - 166,05)	9,59 ▲▲▲ (5,05 - 22,22)	4,67 ▲▲▲△△ (2,97 - 9,55)
Temps d'escalade (s)	81,14 (28,09 - 162,34)	43,49 (13,43 - 161,62)	23,64 (11,06 - 129,07)	106,75 (34,03 - 168,02)	35,88 (16,49 - 133,36)	13,68 ▲▲▲△△△ (8,31 - 53,88)	74,32 (33,32 - 153,90)	67,63 (20,79 - 164,27)	16,63 ▲▲▲△△△ (9,44 - 49,32)	81,15 (37,32 - 141,98)	65,20 (20,05 - 150,05)	9,53 **▲▲▲△△△ (6,85 - 21,62)	79,69 (41,99 - 125,12)	92,80 (20,86 - 177,46)	12,58 ▲▲▲△△△ (9,34 - 47,58)
Temps de rétablissement (s)	5,03 (0 - 76,40)	42,40 (11,69 - 98,26)	16,59 △△ (4,62 - 59,06)	19,56 (0 - 97,72)	26,25 (6,36 - 103,02)	8,14 (2,90 - 51,73)	12,34 (0,96 - 124,70)	38,87 (7,16 - 84,24)	11,74 △△ (3,73 - 41,22)	31,25 (2,68 - 100,18)	39,20 (11,25 - 81,34)	10,88 ▲△△ (5,06 - 46,89)	9,73 (0 - 109,27)	27,93 (6,52 - 59,24)	19,00 (4,65 - 44,43)
Temps total (s)	70,50 (38,19 - 131,22)	56,54 (30,27 - 93,65)	29,55 △ (19,44 - 68,48)	41,06 (35,03 - /)	67,51 (28,92 - 110,00)	33,19 △△ (17,09 - 78,50)	38,78 (32,16 - /)	55,40 (30,81 - 102,18)	32,34 △△ (18,94 - 66,61)	69,03 (38,01 - 110,56)	62,16 (33,66 - 119,92)	27,97 △△△ (17,31 - 63,55)	84,77 (84,77 - 84,77)	66,74 (30,43 - 92,74)	40,22 △△ (20,59 - 68,41)
Réussite (%)	9,50	47,60	69,00 •	4,90	51,20	87,80	4,80	42,90	73,20	11,90	50,00	88,10	2,40	47,60	88,10

Les résultats sont exprimés sous forme de médiane et quartiles (entre parenthèses). Le chi-deux de Pearson, le test de Kruskal-Wallis et le test de Friedman ont été réalisés pour comparer les animaux des cinq groupes. Les tests de Mann-Whitney et Wilcoxon ont été utilisés pour les comparaisons multiples.

** : $p < 0,01$ différence statistiquement significative par rapport aux témoins.

▲ : $p < 0,05$; ▲▲▲ : $p < 0,001$ différence statistiquement significative par rapport au premier jour de test.

△ : $p < 0,05$; △△ : $p < 0,01$; △△△ : $p < 0,001$ différence statistiquement significative par rapport au second jour de test.

• : $p < 0,05$ différence statistiquement significative entre les cinq groupes.

PND : *Post Natal Day* (jour d'expérimentation de la cohorte juvénile)

Les résultats ont montré une différence significative entre les groupes concernant le pourcentage de réussite uniquement à PND26 (**Figure 41A**). Concernant les performances, les animaux exposés à la dose 50 mg/kg ont passé moins de temps à escalader la tige filetée à PND26 (**Tableau 24**), alors que l'ensemble des animaux a mis significativement moins de temps pour réussir ce test au bout du troisième jour (**Figure 41B**).

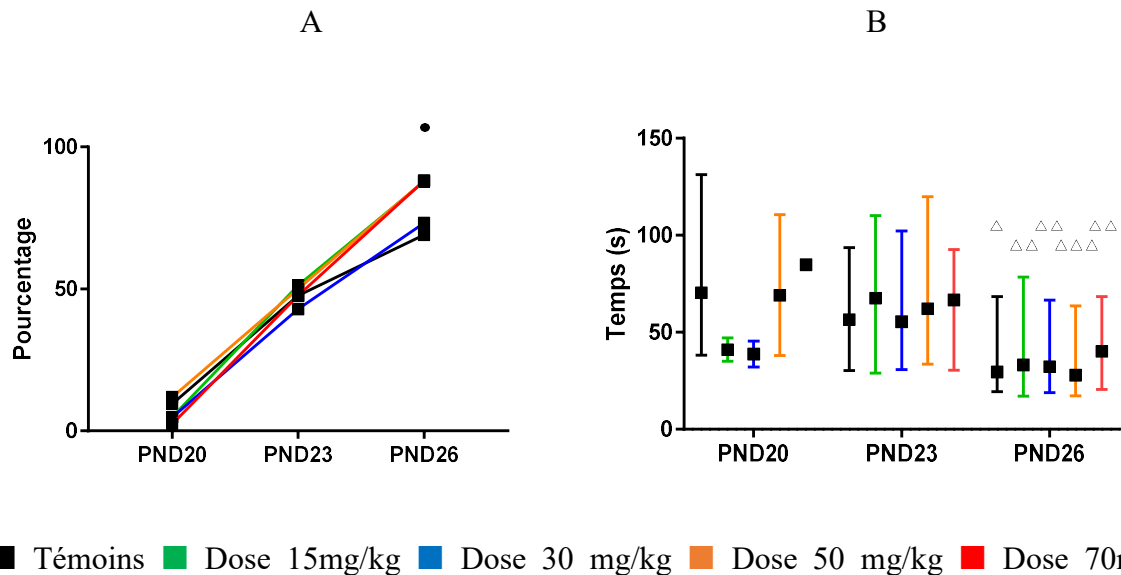


Figure 41 : Pourcentage de réussite au test de coordination locomotrice (A) et temps total mis par les animaux des cinq groupes pour atteindre la plateforme (médianes et quartiles) (B)

Le chi-deux de Pearson, le test de Kruskal-Wallis et le test de Friedman ont été réalisés pour comparer les animaux des cinq groupes. Les tests de Mann-Whitney et Wilcoxon ont été utilisés pour les comparaisons multiples.

Δ : $p < 0,05$; $\Delta\Delta$: $p < 0,01$; $\Delta\Delta\Delta$: $p < 0,001$ différence statistiquement significative par rapport au second jour de test.

• : $p < 0,05$ différence statistiquement significative entre les cinq groupes.

PND : *Post Natal Day* (jour d'expérimentation de la cohorte juvénile)

II.1.5.7. *Open-field*

L'ANOVA à 1 facteur réalisée sur les données obtenues dans ce test, n'a mis en évidence aucune différence entre les groupes témoins et traités tant au niveau du nombre total de cases traversées que du nombre total de redressements (**Tableau 25**).

Tableau 25 : Effets du traitement sur l'activité comportementale des souriceaux à PND25

	Control	15 mg/kg	30 mg/kg	50 mg/kg	70 mg/kg	ANOVA	
						F _(4, 197)	p
Nombre total de cases traversées	64 ± 3	64 ± 3	54 ± 3	62 ± 4	63 ± 3	1,763	ns
Nombre total de redressements	19 ± 2	19 ± 2	17 ± 1	18 ± 2	20 ± 2	0,873	ns

Les résultats sont exprimés sous forme de moyenne ± écart-type. Les effets étudiés par l'ANOVA à 1 facteur sont présentés avec les valeurs de F obtenues et la probabilité correspondante.

ns : non significatif.

II.1.6. Effet du traitement sur le développement sensoriel

II.1.6.1. Test de sursaut au bruit (*auditory startle*)

L'analyse statistique des résultats n'a montré aucune différence entre les cinq groupes ni sur le pourcentage d'animaux présentant une réactivité au bruit à chacun des quatre jours de test (**Figure 42A**), ni sur le jour moyen d'apparition de l'audition de chaque groupe de traitement (**Figure 42B**).

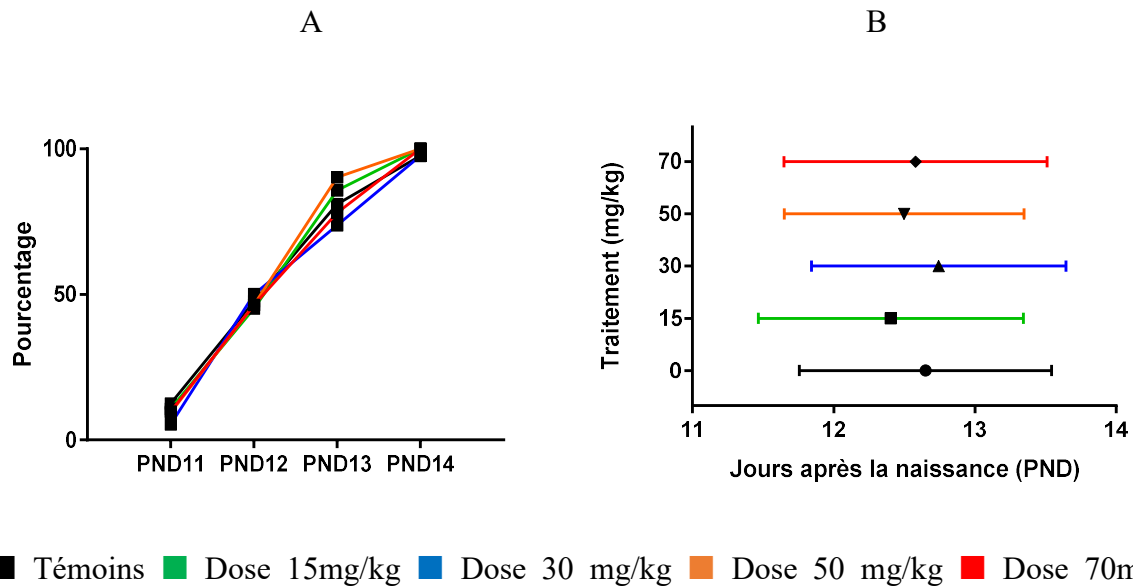


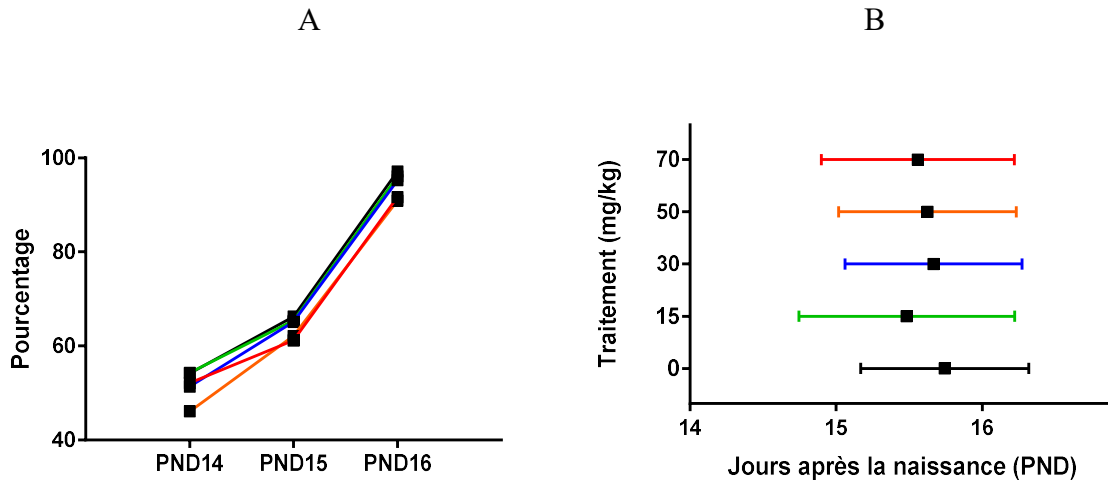
Figure 42 : Pourcentage d'animaux des cinq groupes présentant une réactivité au bruit entre PND11 et PND14 (A) et jour d'apparition de l'audition en fonction du traitement (moyenne et écart-type) (B)

Le chi-deux de Pearson et l'ANOVA à un facteur ont été réalisés pour comparer les animaux des cinq groupes.

PND : *Post Natal Day* (jour d'expérimentation de la cohorte juvénile)

II.1.6.2. Ouverture des yeux

Aucune différence significative entre les cinq groupes n'a été montrée ni sur le pourcentage d'animaux ayant les yeux ouverts entre PND14 et PND16 (**Figure 43A**), ni sur le jour moyen d'ouverture des deux yeux de chaque groupe de traitement (**Figure 43B**).



■ Témoins ■ Dose 15mg/kg ■ Dose 30 mg/kg ■ Dose 50 mg/kg ■ Dose 70mg/kg

Figure 43 : Pourcentage d'animaux des cinq groupes ayant les yeux ouverts entre PND14 et PND16 (A) et jour d'ouverture complète des deux yeux en fonction du traitement (moyenne et écart-type) (B)

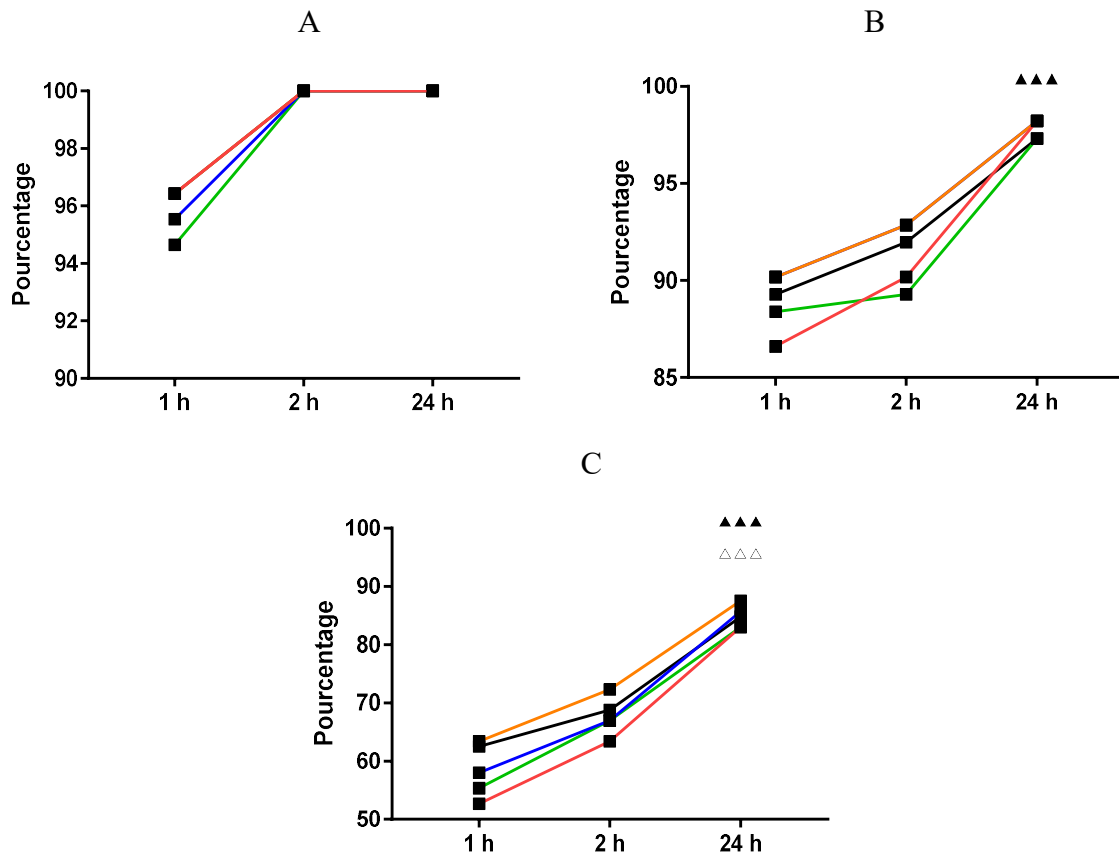
Le chi-deux de Pearson et l'ANOVA à un facteur ont été réalisés pour comparer les animaux des cinq groupes.

PND : *Post Natal Day* (jour d'expérimentation de la cohorte juvénile)

II.1.7. Évolution et homogénéité du comportement maternel

II.1.7.1. Construction du nid (*nest building*)

Les mères des petits de chaque groupe de traitement ont montré la même habileté à construire un nid aux trois jours étudiés (PND3, PND6 et PND8). Cependant, une baisse significative du pourcentage de construction de nid à 24 heures a été observée au cours du temps pour l'ensemble des cinq groupes (**Figure 44**).



■ Témoins ■ Dose 15mg/kg ■ Dose 30 mg/kg ■ Dose 50 mg/kg ■ Dose 70mg/kg

Figure 44 : Pourcentage des mères des petits de chaque groupe ayant construit un nid à PND3 (A), PND6 (B) et PND8 (C)

Le chi-deux de Pearson et le test de Friedman ont été réalisés pour comparer les animaux des cinq groupes. Le test de Wilcoxon a été utilisé pour les comparaisons multiples.

▲▲▲ : $p < 0,001$ différence statistiquement significative par rapport au premier jour de test.

△△△ : $p < 0,001$ différence statistiquement significative par rapport au second jour de test.

PND : *Post Natal Day* (jour d'expérimentation de la cohorte juvénile)

II.1.7.2. Test de ramassage des jeunes (*retrieving*)

L'ANOVA à deux facteurs, dont un répété et le chi-deux de Pearson n'ont révélé aucune différence significative entre les groupes de traitement quelle que soit la variable étudiée dans le test de ramassage des jeunes. La qualité des soins apportés aux jeunes a cependant été fluctuante avec un temps total consacré aux jeunes significativement décroissant au fil du temps mais de manière homogène pour tous les groupes de traitement (**Tableau 26**).

Tableau 26 : Comportement de ramassage des jeunes sur les souriceaux des cinq groupes de traitement à PND4, 7 et 10

	1 ^{er} jour	2 ^{em} jour	3 ^{em} jour	groupe		jour de test		groupe*jour	
				F _(4, 275)	p	F _(4, 275)	p	F _(4, 275)	p
Temps de latence (s)									
Témoins	32,39 ± 45,03	36,24 ± 73,42	56,32 ± 157,76	0,007	ns	12.040	< 0.01	0.072	ns
15 mg/kg	27,50 ± 34,44	36,24 ± 73,06	63,48 ± 158,93						
30 mg/kg	27,94 ± 34,62	36,70 ± 73,16	61,32 ± 159,11						
50 mg/kg	27,58 ± 34,12	38,65 ± 73,02	64,76 ± 160,56						
70 mg/kg	24,89 ± 33,48	36,42 ± 73,22	63,44 ± 160,50						
Temps total de regroupement (s)									
Témoins	212,01 ± 176,24	166,01 ± 106,22	250,20 ± 245,00	0,248	ns	5.863	< 0.05	0.298	ns
15 mg/kg	210,89 ± 180,66	160,74 ± 98,35	279,82 ± 262,11						
30 mg/kg	211,45 ± 178,46	163,62 ± 98,78	266,71 ± 244,32						
50 mg/kg	239,91 ± 226,89	166,39 ± 100,88	251,65 ± 218,55						
70 mg/kg	203,50 ± 176,45	155,49 ± 100,53	242,15 ± 195,73						
Temps total consacré aux jeunes (s)									
Témoins	649,12 ± 208,75	588,11 ± 228,54	506,64 ± 250,15	0,087	ns	54.827	< 0.001	0.058	ns
15 mg/kg	625,76 ± 202,34	586,88 ± 249,00	498,02 ± 244,97						
30 mg/kg	640,12 ± 212,07	563,87 ± 233,50	497,61 ± 247,81						
50 mg/kg	651,62 ± 207,09	553,72 ± 227,00	506,34 ± 246,21						
70 mg/kg	670,96 ± 200,27	536,81 ± 231,34	514,17 ± 237,20						
Reconstruction d'un nid (%)									
Témoins	43	26	20	ns					
15 mg/kg	42	27	16						
30 mg/kg	44	24	16						
50 mg/kg	47	24	21						
70 mg/kg	45	21	18						

Les résultats sont exprimés sous forme de moyenne ± écart-type. Les variables de temps ont été étudiées par l'ANOVA à 2 facteurs, dont 1 répété. Le pourcentage d'animaux ayant construit un nid a été analysé par le chi-deux de Pearson.

PND : *Post Natal Day* (jour d'expérimentation de la cohorte juvénile)

II.1.8. Effet du traitement sur le comportement individuel à l'âge adulte

II.1.8.1. *Grip strength*a) *Cohorte adulte*

Aucune variation significative concernant la force musculaire des pattes avant ou des quatre pattes n'a été observée à D70 (**Tableau 27**).

La seule différence significative à D133 concerne le genre des animaux, les femelles étant statistiquement moins fortes que les mâles pour les pattes avant comme pour l'ensemble des quatre pattes (**Tableau 28**).

b) *Cohorte juvénile*

L'ANOVA à deux facteurs n'a permis de mettre en évidence aucun effet du traitement sur la force musculaire mesurée par le test GS à PND67 (**Tableau 29**) comme à PND130 (**Tableau 30**).

Un effet du sexe a cependant été observé. En effet, les femelles ont présenté une force musculaire significativement moindre par rapport aux mâles à PND67 (**Tableau 29**) et PND130 (**Tableau 30**).

Tableau 27 : Effets de l'injection IP d'hydroxychloroquine sur les résultats au *grip strength* des animaux de la cohorte adulte à D70

Variable	Groupe (mg HCQ/kg)								Anova					
	Témoins		30		50		70		traitement		sexe		traitement*sexe	
	mâles	femelles	mâles	femelles	mâles	femelles	mâles	femelles	F _(4,36)	p	F _(4,36)	p	F _(4,36)	p
Pattes avant (g)	120,04 ± 28,91	130,92 ± 13,1	123,46 ± 25,63	141,8 ± 21,43	122,48 ± 37,63	124,42 ± 9,13	102,74 ± 19,58	130,48 ± 14,21	0,826	ns	4,122	ns	0,571	ns
4 pattes (g)	223,82 ± 56,87	209,26 ± 15,7	199,9 ± 29,99	245,96 ± 34,97	194,86 ± 16,58	198,18 ± 21,65	189,48 ± 38,28	201,84 ± 21,42	1,87	ns	1,346	ns	1,565	ns

Tableau 28 : Effets de l'injection IP d'hydroxychloroquine sur les résultats au *grip strength* des animaux de la cohorte adulte à D133

Variable	Groupe (mg HCQ/kg)								Anova					
	Témoins		30		50		70		traitement		sexe		traitement*sexe	
	mâles	femelles	mâles	femelles	mâles	femelles	mâles	femelles	F _(4,36)	p	F _(4,36)	p	F _(4,36)	p
Pattes avant (g)	148,08 ± 15,78	132,44 ± 20,98	149,56 ± 31,6	117,94 ± 9,88	157,14 ± 30,15	134,78 ± 23,62	143,88 ± 26,49	135,52 ± 11,68	0,487	ns	7,433	< 0,05	0,479	ns
4 pattes (g)	255,7 ± 40,55	188,86 ± 28,71	260,62 ± 28,97	214,82 ± 31,81	266,06 ± 24,16	223,5 ± 39,01	286,84 ± 50,41	224,08 ± 13,85	1,692	ns	25,937	< 0,001	0,319	ns

Les résultats des deux tableaux sont exprimés sous forme de moyenne ± écart-type. Les effets étudiés par l'ANOVA à 2 facteurs sont présentés avec les valeurs de F obtenues et la probabilité correspondante.

ns : non significatif.

D : Day (jour d'expérimentation de la cohorte adulte).

Tableau 29 : Effets de l'injection IP d'hydroxychloroquine sur les résultats au *grip strength* des animaux de la cohorte juvénile à PND67

Variable	Groupe (mg HCO/kg)										Anova		
	Témoins		15		30		50		70		traitement	sexe	traitement*sexe
	mâles	femelles	mâles	femelles	mâles	femelles	mâles	femelles	mâles	femelles	F (4,58) p	F (4,58) p	F (4,58) p
Pattes avant (g)	152,81 ± 22,11	144,05 ± 16,88	139,58 ± 14,4	132,4 ± 23,75	147,1 ± 18,92	121,27 ± 24,49	140,12 ± 20,09	129,43 ± 15,38	149,58 ± 27,04	125,83 ± 18,43	1,082 ns	8,786 < 0,01	0,579 ns
4 pattes (g)	277,01 ± 52,51	211,4 ± 20,67	245,4 ± 27,25	226,94 ± 27,13	241,72 ± 16,44	219,36 ± 26,57	280,93 ± 57,31	226,26 ± 33,07	277,36 ± 24,64	210,29 ± 38,08	0,758 ns	25,556 < 0,001	1,349 ns

Tableau 30 : Effets de l'injection IP d'hydroxychloroquine sur les résultats au *grip strength* des animaux de la cohorte juvénile à PND130

Variable	Groupe (mg HCO/kg)										Anova		
	Témoins		15		30		50		70		traitement	sexe	traitement*sexe
	mâles	femelles	mâles	femelles	mâles	femelles	mâles	femelles	mâles	femelles	F (4,29) p	F (4,29) p	F (4,29) p
Pattes avant (g)	148,47 ± 17,26	133,7 ± 7,73	153,13 ± 14,48	133,65 ± 10,4	152,1 ± 22,45	132,9 ± 11,77	149,07 ± 13,04	120,48 ± 20,32	154,83 ± 10,74	119,8 ± 20,76	0,365 ns	18,327 < 0,001	0,447 ns
4 pattes (g)	259,13 ± 14,33	227,07 ± 18,03	261,9 ± 14,4	237,4 ± 27,73	244,17 ± 14,48	227,75 ± 34,4	263,63 ± 14,84	228,83 ± 24,04	299,9 ± 35,49	232,2 ± 41,45	1,162 ns	14,001 < 0,01	0,896 ns

Les résultats des deux tableaux sont exprimés sous forme de moyenne ± écart-type. Les effets étudiés par l'ANOVA à 2 facteurs sont présentés avec les valeurs de F obtenues et la probabilité correspondante.

ns : non significatif.

PND : *Post Natal Day* (jour d'expérimentation de la cohorte juvénile).

II.1.8.2. *Wire mesh hang*

a) *Cohorte adulte*

Un effet du sexe des animaux sur l'endurance a été observé à D70. Les femelles ont été significativement plus endurantes que les mâles (**Tableau 31**).

L'ANOVA à deux facteurs n'a permis de mettre en avant aucun effet ni du traitement, ni du sexe des animaux sur les performances au test WMH à D133 (**Tableau 32**).

b) *Cohorte juvénile*

L'ANOVA à deux facteurs n'a permis de mettre en évidence aucun effet du traitement sur l'endurance à PND67 (**Tableau 33**) ou à PND130 (**Tableau 34**).

Cependant, un effet du sexe a été observé. En effet, les femelles ont présenté une endurance à l'effort significativement plus importante que les mâles à PND67 (**Tableau 33**) comme à PND130 (**Tableau 34**).

Tableau 31 : Effets de l'injection IP d'hydroxychloroquine sur les résultats au *wire mesh hang* des animaux de la cohorte adulte à D70

Variable	Groupe (mg HCQ/kg)								Anova					
	Témoins		30		50		70		traitement		sexe		traitement*sexe	
	mâles	femelles	mâles	femelles	mâles	femelles	mâles	femelles	F _(4,36)	p	F _(4,36)	p	F _(4,36)	p
Durée avant la chute (s)	48,8 ± 40,97	88,8 ± 3,31	21 ± 24,51	138,4 ± 35,74	34,8 ± 27,2	72,2 ± 41,22	56,6 ± 2	102 ± 58,71	0,861	ns	20,523	< 0,001	2,096	ns
Ratio temps / poids (s/g)	1,79 ± 1,47	45,84 ± 2,42	0,72 ± 0,84	6,69 ± 1,73	1,18 ± 0,9	3,41 ± 1,86	50,12 ± 1,81	4,98 ± 2,78	1,147	ns	34,822	< 0,001	2,204	ns

Tableau 32 : Effets de l'injection IP d'hydroxychloroquine sur les résultats au *wire mesh hang* des animaux de la cohorte adulte à D133

Variable	Groupe (mg HCQ/kg)								Anova					
	Témoins		30		50		70		traitement		sexe		traitement*sexe	
	mâles	femelles	mâles	femelles	mâles	femelles	mâles	femelles	F _(4,36)	p	F _(4,36)	p	F _(4,36)	p
Durée avant la chute (s)	33 ± 20,29	24,4 ± 29,19	22,4 ± 7,92	50,2 ± 14,41	40 ± 22,03	33,6 ± 23,67	58,4 ± 20,02	38,2 ± 28,51	1,378	ns	0,072	ns	2,253	ns
Ratio temps / poids (s/g)	1,03 ± 0,6	1,07 ± 1,32	0,71 ± 0,25	2,12 ± 0,63	1,27 ± 0,71	1,37 ± 0,93	1,87 ± 0,63	1,63 ± 1,1	1,2	ns	1,531	ns	1,949	ns

Les résultats des deux tableaux sont exprimés sous forme de moyenne ± écart-type. Les effets étudiés par l'ANOVA à 2 facteurs sont présentés avec les valeurs de F obtenues et la probabilité correspondante.

ns : non significatif.

D : Day (jour d'expérimentation de la cohorte adulte)

Tableau 33 : Effets de l'injection IP d'hydroxychloroquine sur les résultats au *wire mesh hang* des animaux de la cohorte juvénile à PND67

Variable	Groupe (mg HCQ/kg)										Anova					
	Témoins		15		30		50		70		traitement		sexe		traitement*sexe	
	mâles	féelles	mâles	féelles	mâles	féelles	mâles	féelles	mâles	féelles	F (4, 64)	p	F (4, 64)	p	F (4, 64)	p
Durée avant la chute (s)	62,43 ± 42,1	136,57 ± 62,38	96,67 ± 69,95	155,67 ± 7,09	120,5 ± 37,77	151,57 ± 58,85	68,43 ± 67,42	140,71 ± 48,97	116 ± 64,74	168,29 ± 29,69	1,607	ns	18,882	< 0,001	0,339	ns
Ratio temps / poids (s/g)	2,34 ± 1,64	6,43 ± 3,03	3,87 ± 2,94	41,32 ± 1,98	4,57 ± 1,58	7,32 ± 2,88	2,47 ± 2,6	6,91 ± 2,47	4,39 ± 2,45	8,06 ± 1,48	1,451	ns	38,609	< 0,001	0,263	ns

Tableau 34 : Effets de l'injection IP d'hydroxychloroquine sur les résultats au *wire mesh hang* des animaux de la cohorte juvénile à PND130

Variable	Groupe (mg HCQ/kg)										Anova					
	Témoins		15		30		50		70		traitement		sexe		traitement*sexe	
	mâles	féelles	mâles	féelles	mâles	féelles	mâles	féelles	mâles	féelles	F (4, 64)	p	F (4, 64)	p	F (4, 64)	p
Durée avant la chute (s)	82,71 ± 45,86	154,14 ± 31,26	64,14 ± 46,46	175,43 ± 9,38	77,29 ± 61,56	157,57 ± 40,72	68,71 ± 55,22	172,43 ± 20,03	53,67 ± 39,5	164,86 ± 33,91	0,161	ns	92,736	< 0,001	0,699	ns
Ratio temps / poids (s/g)	2,62 ± 1,51	5,82 ± 1,42	1,96 ± 1,46	7,09 ± 0,77	2,47 ± 2	6,57 ± 1,91	2,17 ± 1,81	6,9 ± 0,99	1,69 ± 1,26	6,79 ± 1,56	0,159	ns	147,65	< 0,001	0,99	ns

Les résultats des deux tableaux sont exprimés sous forme de moyenne ± écart-type. Les effets étudiés par l'ANOVA à 2 facteurs sont présentés avec les valeurs de F obtenues et la probabilité correspondante.

ns : non significatif

PND : *Post Natal Day* (jour d'expérimentation de la cohorte juvénile)

II.1.8.3. *Accelerating rotarod*

a) *Cohorte adulte*

À D71, une variation significative de la distance totale parcourue a été observée entre les quatre groupes (**Tableau 35**). Les animaux traités avec la dose de 70 mg/kg ont parcouru une distance significativement plus faible que les animaux témoins. Un effet du sexe a également été mis en avant par l'analyse. Les femelles ont présenté une endurance à l'effort plus importante que les mâles, en rapport avec leur poids moindre (**Tableau 35**). Ce résultat se confirme par l'analyse des résultats à D134 (**Tableau 36**).

b) *Cohorte juvénile*

L'analyse statistique a mis en évidence un effet du sexe sur les résultats obtenus au test à PND68 (**Tableau 37**) ainsi qu'à PND131 (**Tableau 38**). Dans les deux cas, comme pour la cohorte adulte, les femelles ont montré une plus importante endurance que les mâles. Cette différence d'endurance est imputable à la différence de masse entre mâles et femelles puisqu'elle n'a pas été observée sur les scores bruts des animaux. L'ANOVA à deux facteurs utilisée n'a pas révélé d'effet du traitement sur les résultats ni d'interaction entre le traitement et le sexe des animaux.

Tableau 35 : Effets de l'injection IP d'hydroxychloroquine sur les résultats au test *accelerating rotarod* des animaux de la cohorte adulte à D71

Variable	Groupe (mg HCQ/kg)								Anova					
	Témoins		30		50		70		traitement		sexe		traitement*sexe	
	mâles	femelles	mâles	femelles	mâles	femelles	mâles	femelles	F (4, 36)	p	F (4, 36)	p	F (4, 36)	p
Durée avant la chute (s)	201,86 ± 62,54	171,68 ± 64,28	149,08 ± 26,08	187,82 ± 38,41	149,6 ± 44,86	143,32 ± 26,77	147,08 ± 21,54	141,26 ± 22,18	2,331	ns	0,005	ns	1,192	ns
Vitesse de rotation (rpm)	27,96 ± 7,44	24,38 ± 7,66	21,7 ± 3,04	26,38 ± 4,55	21,82 ± 5,33	21,02 ±	21,5 ± 2,56	20,7 ± 2,68	2,32	ns	0,006	ns	1,219	ns
Distance totale (cm)	449,18 ± 223,6	347,08 ± 196,18	256,3 ± 75,78	384,16 ± 137,26	267,28 ± 124,53	240,92 ± 74,64	249,38 ± 59,93 *	233,36 ± 62,74 *	2,924	<0,05	0,01	ns	1,301	ns
Ratio temps / poids (s/g)	7,3 ± 2,47	7,82 ± 3,11	4,93 ± 1,02	8,66 ± 1,94	5,12 ± 1,69	6,73 ± 1,24	5 ± 0,83	6,71 ± 1,11	1,935	ns	10,675	<0,01	1,329	ns

Tableau 36 : Effets de l'injection IP d'hydroxychloroquine sur les résultats au test *accelerating rotarod* des animaux de la cohorte adulte à D134

Variable	Groupe (mg HCQ/kg)								Anova					
	Témoins		30		50		70		traitement		sexe		traitement*sexe	
	mâles	femelles	mâles	femelles	mâles	femelles	mâles	femelles	F (4, 36)	p	F (4, 36)	p	F (4, 36)	p
Durée avant la chute (s)	175,5 ± 25,02	162,06 ± 30,05	159,4 ± 10	184,3 ± 48,45	215,62 ± 57,41	195,5 ± 21,92	155 ± 16,21	194,1 ± 40,07	2,426	ns	0,482	ns	1,734	ns
Vitesse de rotation (rpm)	24,76 ± 2,96	23,16 ± 3,57	22,82 ± 1,16	25,8 ± 5,68	29,56 ± 6,89	27,08 ± 2,57	22,32 ± 1,94	26,92 ± 4,73	2,437	ns	0,453	ns	1,759	ns
Distance totale (cm)	335,8 ± 76,46	293,98 ± 91,22	281,68 ± 29,76	374,76 ± 182,87	494,78 ± 213,11	402,1 ± 77,78	269,18 ± 47,72	403,96 ± 146,34	2,454	ns	0,352	ns	1,886	ns
Ratio temps / poids (s/g)	5,5 ± 0,91	6,93 ± 1,37	5,04 ± 0,38	7,74 ± 2,07	6,77 ± 1,8	8,21 ± 1,02	4,88 ± 0,53	8,58 ± 2,28	1,502	ns	25,382	<0,001	1,437	ns

Les résultats des deux tableaux sont exprimés sous forme de moyenne ± écart-type. Les effets étudiés par l'ANOVA à 2 facteurs sont présentés avec les valeurs de F obtenues et la probabilité correspondante.

* : $p < 0,05$ différence statistiquement significative par rapport aux témoins.

ns : non significatif

D : Day (jour d'expérimentation de la cohorte adulte)

Tableau 37 : Effets de l'injection IP d'hydroxychloroquine sur les résultats au test *accelerating rotarod* des animaux de la cohorte juvénile à PND68

Variable	Groupe (mg HCO/kg)										Anova					
	Témoins		15		30		50		70		traitement		sexe		traitement*sexe	
	mâles	femelles	mâles	femelles	mâles	femelles	mâles	femelles	mâles	femelles	F _(4, 64)	p	F _(4, 64)	p	F _(4, 64)	p
Durée avant la chute (s)	191,3 ± 61,98	206,66 ± 39,16	186,59 ± 32,84	222,57 ± 51,03	117,27 ± 40,61	221,73 ± 45,72	214,09 ± 39,9	229,67 ± 48,28	209,6 ± 60,5	198,83 ± 31,4	0,583	ns	3,322	ns	0,729	ns
Vitesse de rotation (rpm)	26,86 ± 7,42	28,57 ± 4,6	26,17 ± 3,89	30,45 ± 5,98	25,07 ± 4,87	30,44 ± 5,56	29,47 ± 4,7	31,34 ± 5,86	28,97 ± 7,25	27,73 ± 3,79	0,57	ns	3,315	ns	0,732	ns
Distance totale (cm)	414,63 ± 235,79	453,01 ± 151,91	378,5 ± 109,11	520,93 ± 175,77	349,98 ± 127,57	514,71 ± 186,65	481,29 ± 160,84	549,3 ± 200,41	476,93 ± 241,55	421,16 ± 116,24	0,534	ns	2,888	ns	0,848	ns
Ratio temps / poids (s/g)	7,11 ± 2,49	9,7 ± 2,11	7,15 ± 1,37	10,38 ± 2,86	6,62 ± 1,46	10,55 ± 2,33	7,8 ± 2,11	11,28 ± 2,77	7,95 ± 2,34	9,61 ± 1,9	0,542	ns	31,245	< 0,001	0,531	ns

Tableau 38 : Effets de l'injection IP d'hydroxychloroquine sur les résultats au test *accelerating rotarod* des animaux de la cohorte juvénile à PND131

Variable	Groupe (mg HCO/kg)										Anova									
	Témoins		15		30		50		70		traitement		sexe		traitement*sexe					
	mâles	femelles	mâles	femelles	mâles	femelles	mâles	femelles	mâles	femelles	F _(4, 64)	p	F _(4, 64)	p	F _(4, 64)	p				
Durée avant la chute (s)	192,51 ± 36,1	172,89 ± 29,8	0	186,77 ± 56,65	195,54 ± 26,16	0	163,09 ± 43,55	189,51 ± 40,78	0	172,64 ± 34,12	190,13 ± 43,58	0	184,98 ± 31,31	189,16 ± 36,59	0,295	ns	0,631	ns	0,698	ns
Vitesse de rotation (rpm)	26,93 ± 4,39	24,54 ± 3,54	0	26,2 ± 6,69	27,34 ± 3,09	0	23,4 ± 5,17	26,63 ± 4,87	0	24,5 ± 4,09	26,63 ± 5,11	0	25,97 ± 3,69	26,5 ± 4,41	0,291	ns	0,696	ns	0,733	ns
Distance totale (cm)	411,71 ± 148,89	330,5 ± 97,94	0	392,87 ± 203,33	407,69 ± 93,35	0	306,49 ± 132,06	393,09 ± 147,33	0	331,84 ± 111,8	395,57 ± 154,13	0	371,18 ± 101,73	388,39 ± 132,7	0,266	ns	0,377	ns	0,78	ns
Ratio temps / poids (s/g)	6,1 ± 1,29	6,55 ± 1,55	0	5,76 ± 1,95	7,95 ± 1,43	0	5,29 ± 1,3	7,9 ± 2,12	0	5,38 ± 1,22	7,62 ± 1,78	0	5,74 ± 1,1	7,82 ± 1,97	0,239	ns	24,269	< 0,001	0,95	ns

Les résultats des deux tableaux sont exprimés sous forme de moyenne ± écart-type. Les effets étudiés par l'ANOVA à 2 facteurs sont présentés avec les valeurs de F obtenues et la probabilité correspondante.

ns : non significatif

PND : *Post Natal Day* (jour d'expérimentation de la cohorte juvénile)

II.1.8.4. *Open field*

a) *Cohorte adulte*

Sur l'ensemble des résultats à ce test pour la cohorte adulte, l'analyse statistique a mis en avant un effet du sexe sur la distance totale parcourue ainsi que les distances parcourues en ZI et en ZP à D72 (**Tableau 39**) mais pas à D135 (**Tableau 40**). Les femelles ont alors présenté une activité motrice plus importante que les mâles.

L'ANOVA à deux facteurs n'a mis en évidence aucun effet du traitement ni aucune interaction entre les deux facteurs.

b) *Cohorte juvénile*

Dans ce test, les animaux exposés aux différentes doses n'ont pas montré de réponse significativement différente pour aucune des variables étudiées. Comme pour la cohorte adulte, un effet du sexe a été détecté par l'analyse statistique. À PND69, les femelles ont parcouru une distance plus importante que les mâles en ZP et ont significativement passé plus de temps en ZP et moins en ZI et en ZC par comparaison avec les mâles (**Tableau 41**).

À PND132, la distance totale ainsi que la distance en ZP des femelles a été plus importante que celles des mâles (**Tableau 42**). De plus, les femelles ont également passé moins de temps en ZI et plus en ZP que les mâles. Enfin, l'analyse statistique n'a mis en évidence aucune interaction entre les deux facteurs étudiés.

Tableau 39 : Effets de l'injection IP d'hydroxychloroquine sur les résultats à l'*open field* des animaux de la cohorte adulte à D72

Variable	Groupe (mg HCQ/kg)								Anova						
	Témoins		30		50		70		traitement	sexe	traitement*sexe				
	mâles	femelles	mâles	femelles	mâles	femelles	mâles	femelles	F _(4,36)	p	F _(4,36)	p	F _(4,36)	p	
Distance parcourue (cm)	zc	96,6 ± 54,09	103,6 ± 53,17	91 ± 51,44	119 ± 55,78	60,2 ± 41,29	74,2 ± 45,26	75,6 ± 47,06	77 ± 36,03	1,423	ns	0,676	ns	0,141	ns
	zi	212,8 ± 124,69	344,4 ± 138,89	218,4 ± 126,14	355,6 ± 140,73	212,8 ± 92,81	277,2 ± 113,37	214,2 ± 115,19	235,2 ± 76,78	0,609	ns	5,642	< 0,05	0,562	ns
	zp	688,8 ± 250,96	1055,6 ± 130,43	772,8 ± 192,44	844,2 ± 266,03	747,6 ± 255,69	834,4 ± 148,11	774,2 ± 159,44	879,2 ± 164,43	0,298	ns	6,058	< 0,05	1,2	ns
	totale	998,2 ± 412,75	1503,6 ± 260,81	1082,2 ± 358,08	1318,8 ± 423,73	1020,6 ± 361,55	1185,8 ± 302,12	1064 ± 261,68	1191,4 ± 147,03	0,426	ns	6,236	< 0,05	0,678	ns
Temps (s)	zc	7,72 ± 2,79	10,36 ± 10	15,19 ± 14,54	11,58 ± 4,93	9,15 ± 11,68	9,53 ± 7,95	12,56 ± 7,73	5,2 ± 2,01	0,613	ns	0,521	ns	0,641	ns
	zi	28,13 ± 21,78	43,01 ± 21,36	33,58 ± 24,18	48,1 ± 24,14	39,62 ± 26,26	37,13 ± 17,28	34,42 ± 27,58	33,32 ± 7,64	0,194	ns	0,853	ns	0,466	ns
	zp	264,14 ± 22,32	246,63 ± 27,54	251,23 ± 37,63	240,31 ± 28,01	251,22 ± 33,74	253,34 ± 21,84	253,02 ± 33,53	261,47 ± 8,12	0,324	ns	0,254	ns	0,449	ns
Redressements	19,8 ± 11,34	27,2 ± 10,4	29,2 ± 6,94	27,4 ± 8,82	28,6 ± 14,38	23,6 ± 13,48	23 ± 12,75	25,2 ± 6,91	0,393	ns	0,041	ns	0,595	ns	

Tableau 40 : Effets de l'injection IP d'hydroxychloroquine sur les résultats à l'*open field* des animaux de la cohorte adulte à D135

Variable	Groupe (mg HCQ/kg)								Anova						
	Témoins		30		50		70		traitement	sexe	traitement*sexe				
	mâles	femelles	mâles	femelles	mâles	femelles	mâles	femelles	F _(4,36)	p	F _(4,36)	p	F _(4,36)	p	
Distance parcourue (cm)	zc	74,2 ± 47,89	75,6 ± 25,91	81,2 ± 46,59	77 ± 38,34	84 ± 47,73	71,4 ± 35,49	60,2 ± 16,12	47,6 ± 20,65	1,028	ns	0,362	ns	0,087	ns
	zi	222,6 ± 119,35	238 ± 86,73	284,2 ± 140,31	256,2 ± 111,63	215,6 ± 112,81	232,4 ± 94,1	179,2 ± 44,44	226,8 ± 87,79	0,741	ns	0,158	ns	0,227	ns
	zp	560 ± 61,62	652,4 ± 85,65	744,8 ± 148,21	740,6 ± 322,51	677,6 ± 215,72	753,2 ± 157,51	602 ± 183,61	750,4 ± 198,57	0,998	ns	1,731	ns	0,282	ns
	totale	856,8 ± 188,58	966 ± 170,53	1110,2 ± 281,81	1073,8 ± 453,4	977,2 ± 341,2	1057 ± 250,1	841,4 ± 224,3	1024,8 ± 208,98	0,88	ns	0,907	ns	0,268	ns
Temps (s)	zc	17,53 ± 18,51	15,43 ± 15,81	7,49 ± 4,73	5,16 ± 2,57	14,29 ± 15,76	6,8 ± 5,5	6,64 ± 2,7	3,68 ± 2,99	2,29	ns	1,206	ns	0,141	ns
	zi	48,93 ± 23,73	53,81 ± 29,2	37,83 ± 14,77	32,62 ± 18,84	58,87 ± 32,78	28,52 ± 16,77	31,43 ± 15,23	31,55 ± 22,47	1,551	ns	1,143	ns	1,207	ns
	zp	233,54 ± 34,98	230,75 ± 32,76	254,68 ± 19,13	262,22 ± 20,72	226,84 ± 46,09	264,68 ± 20,82	261,93 ± 14,31	264,77 ± 23,92	2,433	ns	1,605	ns	1,025	ns
Redressements	28,8 ± 10,31	29,6 ± 15,69	35,2 ± 18,35	27,4 ± 16,13	27,6 ± 15,24	23 ± 11,25	17,6 ± 7,7	21,6 ± 9,56	1,449	ns	0,198	ns	0,385	ns	

Les résultats des deux tableaux sont exprimés sous forme de moyenne ± écart-type. Les effets étudiés par l'ANOVA à 2 facteurs sont présentés avec les valeurs de F obtenues et la probabilité correspondante.

ns : non significatif ; zc : zone centrale ; zi : zone intermédiaire ; zp : zone périphérique ; D : Day (jour d'expérimentation de la cohorte adulte)

Tableau 41 : Effets de l'injection IP d'hydroxychloroquine sur les résultats à l'*open field* des animaux de la cohorte juvénile à PND69

Variable	Groupe (mg HCO/kg)										Anova						
	Témoins		15		30		50		70		traitement	sexe	traitement*sexe				
	mâles	femelles	mâles	femelles	mâles	femelles	mâles	femelles	mâles	femelles	F _(4,64)	p	F _(4,64)	p	F _(4,64)	p	
Distance parcourue (cm)	zc	134 ± 66,58	101 ± 57,7	98,78 ± 60,57	130,67 ± 68,11	134,17 ± 74,79	92 ± 61,22	96 ± 36,76	127 ± 79,65	129,5 ± 42,17	119,42 ± 63,31	0,504	ns	0,022	ns	1,229	ns
	zi	361 ± 188,95	314 ± 152,91	317,33 ± 137,88	367,5 ± 165,81	367,5 ± 178,56	291 ± 169,69	285 ± 68,31	366 ± 250,27	385 ± 118,71	355,52 ± 176,23	0,725	ns	0,155	ns	0,663	ns
	zp	890 ± 496,09	969 ± 178,14	945,78 ± 395	1184,2 ± 414,13	1198,2 ± 481,47	1135 ± 249,41	722 ± 113,84	1246 ± 550,68	1050 ± 342,99	1177,1 ± 371,12	0,309	ns	5,726	< 0,05	1,198	ns
	totale	1385 ± 716,96	1384 ± 357,06	1361,9 ± 503,7	1682,3 ± 529,04	1699,8 ± 695,43	1518 ± 454,76	1103 ± 167,51	1739 ± 843,71	1564,5 ± 453,3	1652 ± 561,59	1,059	ns	3,199	ns	1,207	ns
Temps (s)	zc	20,03 ± 8,75	10,95 ± 7,22	10,3 ± 6,65	15,28 ± 8,59	12,12 ± 4,41	8,04 ± 5,3	12,94 ± 8,32	9,67 ± 4,27	18,9 ± 6,99	11,12 ± 6,53	1,712	ns	4,539	< 0,05	2,089	ns
	zi	55,11 ± 35,37	35,74 ± 15,96	42,82 ± 36,37	37,34 ± 16,07	32,82 ± 11,22	24,36 ± 12,62	45,3 ± 9,26	28,34 ± 17,45	53,7 ± 12,63	32,02 ± 14,63	1,688	ns	8,642	< 0,01	0,372	ns
	zp	224,86 ± 36,19	253,31 ± 20,42	246,89 ± 28,63	247,39 ± 22,43	255,06 ± 15,41	267,6 ± 17,26	241,76 ± 9,22	261,99 ± 21,53	277,4 ± 18,1	256,85 ± 19,31	2,318	ns	10,351	< 0,01	0,887	ns
Redressements		25,43 ± 13,7	24,71 ± 6,4	25,22 ± 15,89	28,83 ± 6,4	25,83 ± 14,05	27,29 ± 11,57	21,29 ± 7,89	25 ± 13,06	30,83 ± 10,8	27,09 ± 9,87	0,701	ns	0,276	ns	0,112	ns

Tableau 42 : Effets de l'injection IP d'hydroxychloroquine sur les résultats à l'*open field* des animaux de la cohorte juvénile à PND132

Variable	Groupe (mg HCO/kg)										Anova										
	Témoins		15		30		50		70		traitement	sexe	traitement*sexe								
	mâles	femelles	mâles	femelles	mâles	femelles	mâles	femelles	mâles	femelles	F _(4,63)	p	F _(4,63)	p	F _(4,63)	p					
Distance parcourue (cm)	zc	110,83 ± 55,55	95 ± 61,27	0	112 ± 49,17	104 ± 40,5	0	128 ± 67,11	118 ± 36,02	0	128 ± 36,53	121 ± 47,77	0	80,5 ± 50,62	119 ± 60,49	0,671	ns	0,001	ns	0,598	ns
	zi	359,33 ± 124,41	344 ± 125,83	0	370 ± 106,73	363 ± 83,36	0	415 ± 143,84	351 ± 103,15	0	408 ± 136,92	356 ± 114,34	0	256,67 ± 138,14	393 ± 176,18	0,481	ns	0	ns	1,302	ns
	zp	950,83 ± 91,96	1346 ± 636,05	0	923 ± 252,34	1416 ± 460,31	0	1040 ± 161,8	1179 ± 159,97	0	1211 ± 224,47	1210 ± 373,49	0	922,83 ± 163,95	1387 ± 383,56	0,164	ns	13,242	< 0,01	1,439	ns
	totale	1421 ± 131,93	1785 ± 635,14	0	1405 ± 371,83	1883 ± 499,21	0	1583 ± 180,85	1648 ± 244,66	0	1747 ± 362,27	1687 ± 490,5	0	1260 ± 336,44	1899 ± 557,75	0,221	ns	8,632	< 0,01	1,646	ns
Temps (s)	zc	14,76 ± 11,03	9,41 ± 7,06	0	12,55 ± 6,96	9,76 ± 6,68	0	15,42 ± 12,79	9,29 ± 2,74	0	10,54 ± 4,32	11,27 ± 6,06	0	6,86 ± 4,99	7,77 ± 4,01	1,018	ns	2,056	ns	0,697	ns
	zi	46,9 ± 24,76	29,73 ± 15,36	0	51,14 ± 11,74	31,2 ± 13,01	0	50,77 ± 27,92	34,79 ± 14,8	0	40,31 ± 9,06	41,6 ± 11,99	0	25,78 ± 15,47	32,67 ± 14,04	1,402	ns	4,937	< 0,05	1,799	ns
	zp	238,34 ± 34,47	260,85 ± 22,12	0	236,3 ± 12,92	259,04 ± 19,4	0	233,74 ± 35,93	255,91 ± 16,22	0	249,15 ± 10,01	247,13 ± 12,72	0	267,36 ± 20,13	259,55 ± 16,79	1,528	ns	4,871	< 0,05	1,667	ns
Redressements		30,5 ± 6,77	28,29 ± 12,62	0	24,29 ± 10,75	26,29 ± 2,5	0	28,43 ± 11,75	26,86 ± 9,04	0	34,71 ± 10,36	28,71 ± 12,62	0	23,33 ± 11,15	27 ± 11,2	0,994	ns	0,107	ns	0,456	ns

Les résultats des deux tableaux sont exprimés sous forme de moyenne ± écart-type. Les effets étudiés par l'ANOVA à 2 facteurs sont présentés avec les valeurs de F obtenues et la probabilité correspondante.

ns : non significatif ; zc : zone centrale ; zi : zone intermédiaire ; zp : zone périphérique ; PND : *Post Natal Day* (jour d'expérimentation de la cohorte juvénile)

II.1.9. Récapitulatif des résultats

II.1.9.1. Effet d'une exposition à l'hydroxychloroquine à l'âge adulte

a) *Effet du traitement sur le poids corporel*

La mesure du poids corporel des animaux entre le début de l'expérimentation et D136 a montré que l'injection IP de HCQ n'a pas eu d'effet sur la croissance pondérale des animaux quelle que soit la dose de composé pharmacologique injectée.

Sans surprise, l'analyse menée a démontré une différence de poids entre les mâles et les femelles. En effet, les femelles de notre étude étaient moins lourdes que les mâles. Cette observation correspond parfaitement au dimorphisme sexuel communément observé chez les souris.

b) *Accumulation sérique de l'hydroxychloroquine*

Une accumulation sérique dose dépendante de la HCQ injectée a été retrouvée chez les animaux traités dès le troisième jour de l'expérimentation. Notons que ce dosage a été réalisé 24 heures après l'injection du composé alors qu'en raison du calendrier d'injection utilisé, les dosages réalisés à D73 et D136 l'ont été sur des échantillons collectés une semaine après la dernière injection. Cette particularité explique, en partie, pourquoi ces dosages n'ont pas permis de suivre l'accumulation sérique du composé sur l'ensemble de la durée de l'expérimentation.

Avec l'augmentation des doses de HCQ, le pourcentage d'animaux chez qui la HCQ a été détectée au niveau sérique a augmenté dans les groupes traités. La comparaison des doses de HCQ sérique a démontré que les groupes traités présentaient une concentration de HCQ significativement supérieure aux témoins prouvant ainsi que la HCQ était présente dans le compartiment sanguin et ainsi potentiellement distribuée à l'ensemble de l'organisme dans des proportions dépendantes de la dose initialement injectée.

Analysés séparément, les mâles et les femelles ont répondu de manière équivalente au traitement. En effet, les concentrations sériques d'agent pharmacologique ont été significativement semblables entre genre au sein des groupes de traitement.

c) *Effet du traitement sur l'autophagie des tissus cibles*

Prises dans leur ensemble, les analyses histochimiques réalisées n'ont pas révélé les changements attendus sur l'expression des protéines majeures de l'autophagie. En effet, l'action de la HCQ par diminution de l'acidification des lysosomes doit théoriquement inhiber l'autophagie dans ses derniers stades. Or une inhibition de ce type devrait être accompagnée d'une augmentation du ratio LC3-II/LC3-I, comparez, une diminution de la présence de la

forme I de la protéine LC3 au profit de la forme II. En effet lors de l'autophagie, la LC3-II, liée aux autophagosomes est détruite par l'action des hydrolases acides du lysosome. Sans action de ces hydrolases, la LC3-II tout comme SQSTM1/p62 devrait s'accumuler.

Cette double accumulation de LC3-II et de SQSTM1/p62 a été observée dans le foie des animaux femelles à D136. Cependant, l'analyse du ratio entre les deux formes de la protéine LC3 ne permet pas de conclure à une réelle inhibition de l'autophagie par le traitement. D'autre part, dans le cas des ganglions lymphatiques, l'action du traitement, s'il devait être présent à D3, n'est pas retrouvé dans les analyses suivantes démontrant, de fait, l'inefficacité de la HCQ à perturber efficacement l'autophagie systémique des animaux adultes avec le calendrier d'injection défini.

d) *Effet du traitement sur le comportement individuel*

Les données recueillies lors de ces quatre tests comportementaux n'ont mis en avant aucun effet délétère du traitement ni sur la force musculaire maximale, ni sur l'endurance à l'effort physique. Les animaux des quatre groupes ont en effet présenté des mesures de force aux pattes avant ou aux quatre pattes ainsi que des performances au test *wire mesh hang*, similaires aux animaux témoins. Des différences liées au sexe des animaux correspondant aux connaissances déjà établies ont en revanche été retrouvées par l'analyse de ces données. Les femelles ont ainsi présenté une force musculaire brute moindre que les mâles surtout à D133 tout en présentant une endurance musculaire plus importante, en particulier à D70.

Par ailleurs, un effet du traitement a été observé au test *accelerating rotarod* puisque le groupe 70 mg/kg de HCQ a parcouru une distance significativement moins importante que les autres groupes à D71. En revanche, les différences d'endurance liée au sexe des animaux n'ont été significatives qu'en prenant en compte le poids des animaux. Les données brutes émanant des mâles et des femelles n'étaient pas significativement différentes.

En ce qui concerne l'activité des animaux, le test *open field* a mis en évidence une activité locomotrice plus importante des femelles par rapport aux mâles à D72 mais pas à D135. Aucune différence significative liée au traitement n'a été observée.

Ainsi l'exposition IP à la HCQ au stade adulte ne semble pas avoir affecté la force musculaire, l'endurance, l'activité locomotrice ou l'anxiété des animaux exposés.

II.1.9.2. Effet d'une exposition postnatale à l'hydroxychloroquine

a) *Effet du traitement sur le poids corporel*

Le suivi pondéral des animaux de PND3 à PND136 démontre que le traitement pharmacologique administré aux animaux n'a pas impacté leur prise de masse au cours de cette étude. En effet, aucune différence n'a été observée entre les animaux contrôles et les animaux traités.

Comme pour les animaux adultes, les analyses ont démontré la présence d'un dimorphisme sexuel sur le poids des souriceaux dès le 3^{ème} jour de vie. Cette différence de poids corporel s'estompe lorsque les souriceaux commencent à consommer une nourriture solide. Durant cette phase de sevrage, l'apport alimentaire maternel diminue ainsi que la prise de masse des souriceaux qui reprend de manière plus marquée dès que les petits sont sevrés. La différence de masse corporelle entre mâles et femelles redevient alors rapidement beaucoup plus prononcée.

b) *Effet du traitement sur l'autophagie des tissus cibles*

Concernant les niveaux d'expressions protéiques relevés, une accumulation conjointe de LC3-II et de SQSTM1/p62 a été observée dans les ganglions lymphatiques des femelles à PND11 et PND73 pour le groupe 30 mg/kg ainsi que dans le cerveau des animaux mâles à PND26 pour les groupes 15 et 50 mg/kg. Cette accumulation des protéines de l'autophagie a été accompagnée d'une augmentation du ratio LC3-II/LC3-I dans le cerveau du groupe d'animaux mâles traités avec 15 mg/kg de HCQ.

Comme pour la cohorte adulte, l'effet du traitement, s'il devait être présent, n'est que transitoire, malgré la prolongation du traitement. L'effet de la HCQ ne semble pas stable ni homogène au sein de l'organisme avec le calendrier d'injection utilisé et ne garantit, de fait, pas une perturbation autophagique systémique fiable chez des animaux traités dès les premiers jours de vie.

c) *Effet du traitement sur le développement moteur et sensoriel*

Le traitement IP à la HCQ ne s'est pas accompagné de conséquences délétères en termes de développement moteur ou sensoriel.

La comparaison des performances des animaux traités par rapport à celles des animaux témoins dans chacun des tests mis en œuvre durant les 26 premiers jours de vie a permis de conclure à une maturation similaire des fonctions sensorielles et locomotrices au sein des cinq groupes d'animaux.

Sur l'ensemble des tests réalisés, en plus de performances équivalentes aux témoins, les animaux traités ont également présenté des niveaux d'amélioration similaires au cours du temps. Cependant, les groupes 15 et 50 mg/kg n'ont pas amélioré leurs performances au test de retournement à PND5. Les animaux traités ont en revanche présenté une amélioration significativement plus importante que les témoins au test de *Cliff avoidance* à PND7 bien que cette amélioration ne soit plus aussi marquée à PND8 pour les groupes 30 et 50 mg/kg. De même, les groupes traités n'ont pas amélioré leurs performances entre le second et le troisième jour au test de réaction antigravitaire. Ces différences de réponses paraissent cependant liées à l'importante variabilité interindividuelle des résultats obtenus ne permettant pas toujours aux tests statistiques de conclure à une différence significative entre les groupes.

Enfin, l'analyse du comportement maternel a été menée non par portée, mais en fonction du groupe de traitement de chaque souriceau afin de prendre en compte la possible implication de l'attention maternelle comme facteur de confusion dans l'étude. Cette analyse n'a mis en évidence aucune différence d'attention maternelle, tant en termes de construction du nid que de temps consacré aux jeunes, entre les différents groupes de traitement.

d) *Effet du traitement sur le comportement individuel à l'âge adulte*

Dans cette étude, les résultats n'ont pas montré d'effets de l'exposition à la HCQ sur la force physique ou la résistance musculaire des animaux. En effet, les animaux traités et témoins ont présenté une force musculaire similaire pour les pattes avant comme pour l'ensemble des quatre pattes ainsi que des performances similaires au WMH. En revanche, les performances ont été significativement impactées par le sexe des animaux, confirmant les résultats obtenus dans la cohorte adulte. Les femelles ont ainsi présenté une force musculaire moins importante au *grip strength* mais une endurance à l'effort significativement plus importante que les mâles au WMH. Cette endurance plus importante des femelles n'a été observée au test AR qu'en prenant en compte le poids des animaux. En effet, les données brutes des mâles et des femelles étaient statistiquement semblables.

Enfin, le traitement n'a significativement modifié ni l'activité locomotrice des animaux, ni leur niveau d'anxiété. Le test OF a, en revanche, mis en avant une activité locomotrice plus importante des femelles par rapport aux mâles à D132 ainsi qu'un temps passé en zone périphérique plus important pour les femelles et pouvant exprimer un niveau d'anxiété plus important.

L'exposition IP à la HCQ au stade juvénile ne semble donc pas avoir affecté la force musculaire, l'endurance, l'activité locomotrice ou l'anxiété des animaux exposés.
--

II.2. Suivi des particules aluminiques chez des souris déficientes en autophagie

II.2.1. Rappel du protocole expérimental

Les données relatives à l'élevage et à l'exposition des animaux ont été décrites dans la section précédente de même que l'ensemble du protocole de prélèvement et d'analyses histologiques (cf Chapitre II.2. de la section méthodologie).

Pour rappel, lors de cette expérimentation, les animaux ont été génotypés dès leur arrivée afin de distinguer les animaux *Atg5* CKO de leurs contrôles de portée. Ils ont ensuite été acclimatés aux conditions d'hébergement durant une semaine puis une injection de particules aluminiques a été réalisée au niveau du TA sous anesthésie à l'isoflurane. Des analyses histologiques ont été menées sur les organes prélevés *post-mortem*, trois semaines après l'injection.

La **Figure 45** illustre l'expérimentation réalisée sous forme de résumé graphique.

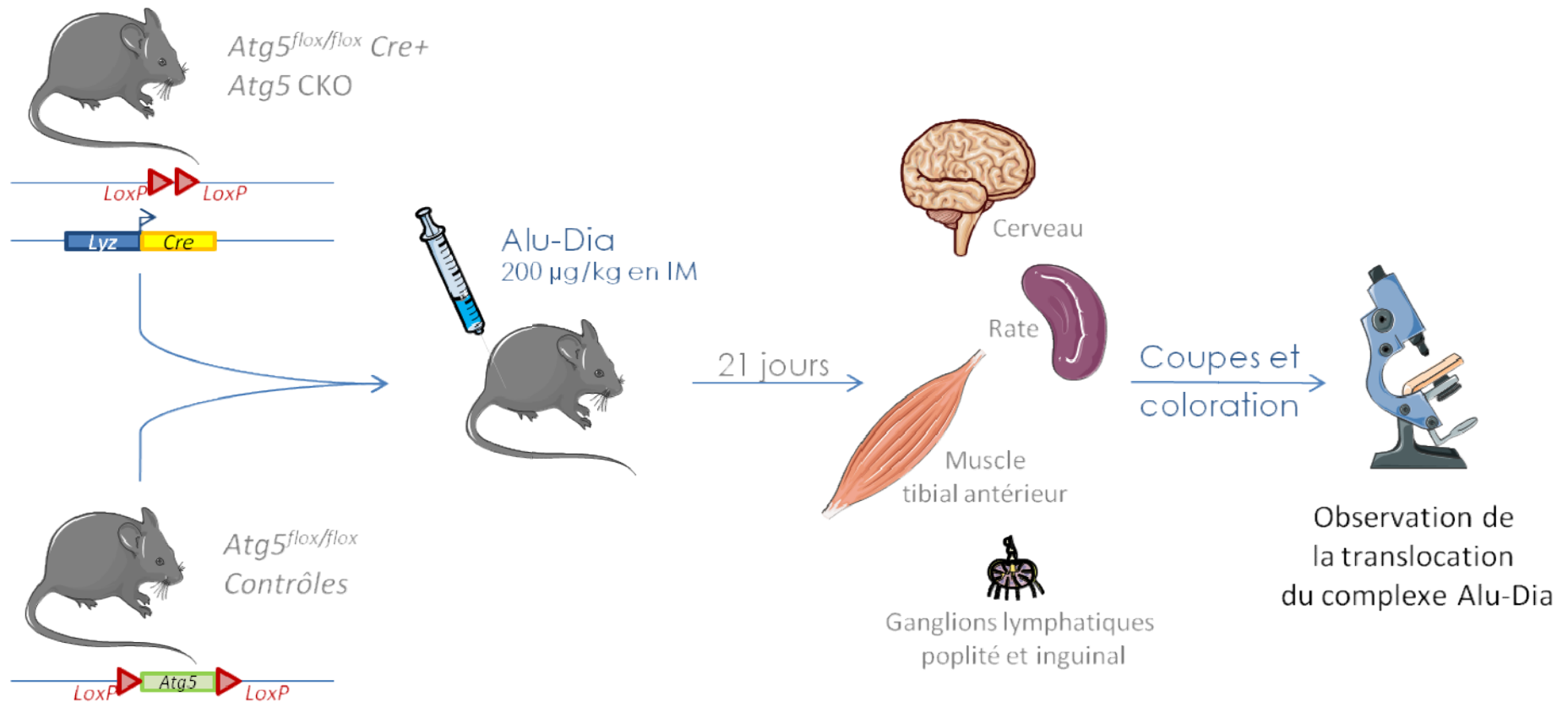


Figure 45 : Représentation graphique du déroulement de l'expérimentation *in vivo* du suivi des particules aluminiques

Alu-dia : adjuvant aluminique rendu fluorescent par l'adjonction de nano-diamant fonctionnalisés

IM : Injection intramusculaire

II.2.2. Génotypage et distribution des effectifs

Les six animaux ont été génotypés selon la méthode décrite dans le paragraphe II.2.1.3. de la section méthodologie. Ces six animaux ont été identifiés comme étant *Atg5* CKO pour moitié et sauvages ou *wild type* (WT) pour l'autre moitié. En effet, la masse des produits de PCR a permis de définir que l'ensemble des animaux étaient bien porteurs des marqueurs flox au niveau du gène *Atg5*. La présence de la Cre-recombinase a donc défini les animaux chez qui le KO génétique était présent par recombinaison Cre-Lox (**Figure 46**).

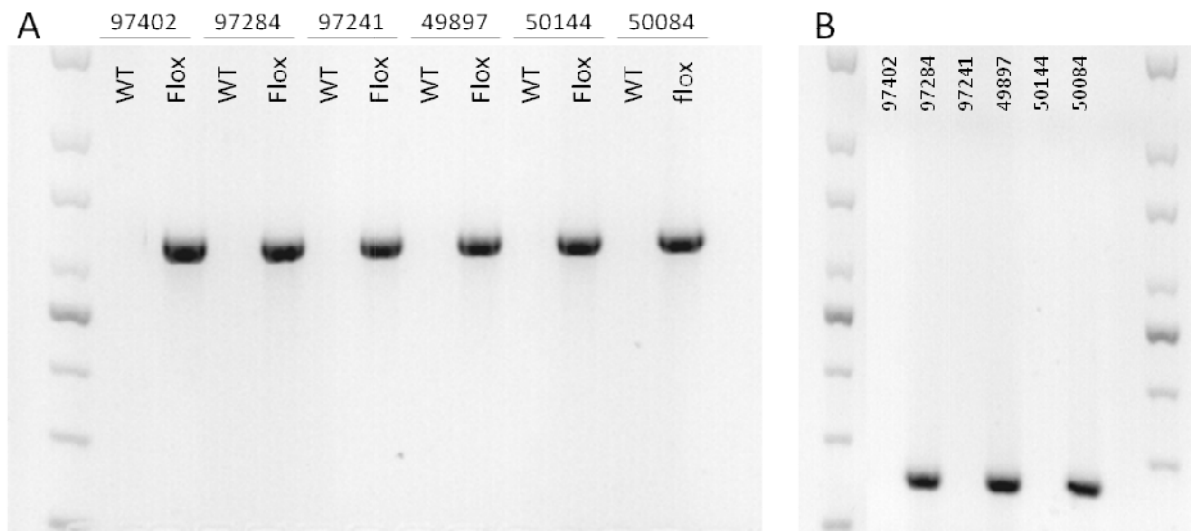


Figure 46 : Résultats de PCR portant sur la présence des gènes *Atg5*^{WT} et *Atg5*^{flox} (A) et sur la présence de la Cre-recombinase (B)

Les individus sont identifiés par leur numéro de puce.

II.2.3. Présence et persistance de granulomes musculaires

L'observation des coupes sériées de muscle colorées en HE a démontré la présence de granulomes chez tous les animaux injectés. En effet, les coupes musculaires des six animaux présentaient des inclusions cellulaires plus ou moins étendues, repérables sur les clichés par leur couleur violacée rendue foncée par la présence d'agglomérats très denses aux électrons, correspondants aux particules d'Al (**Figure 47**).

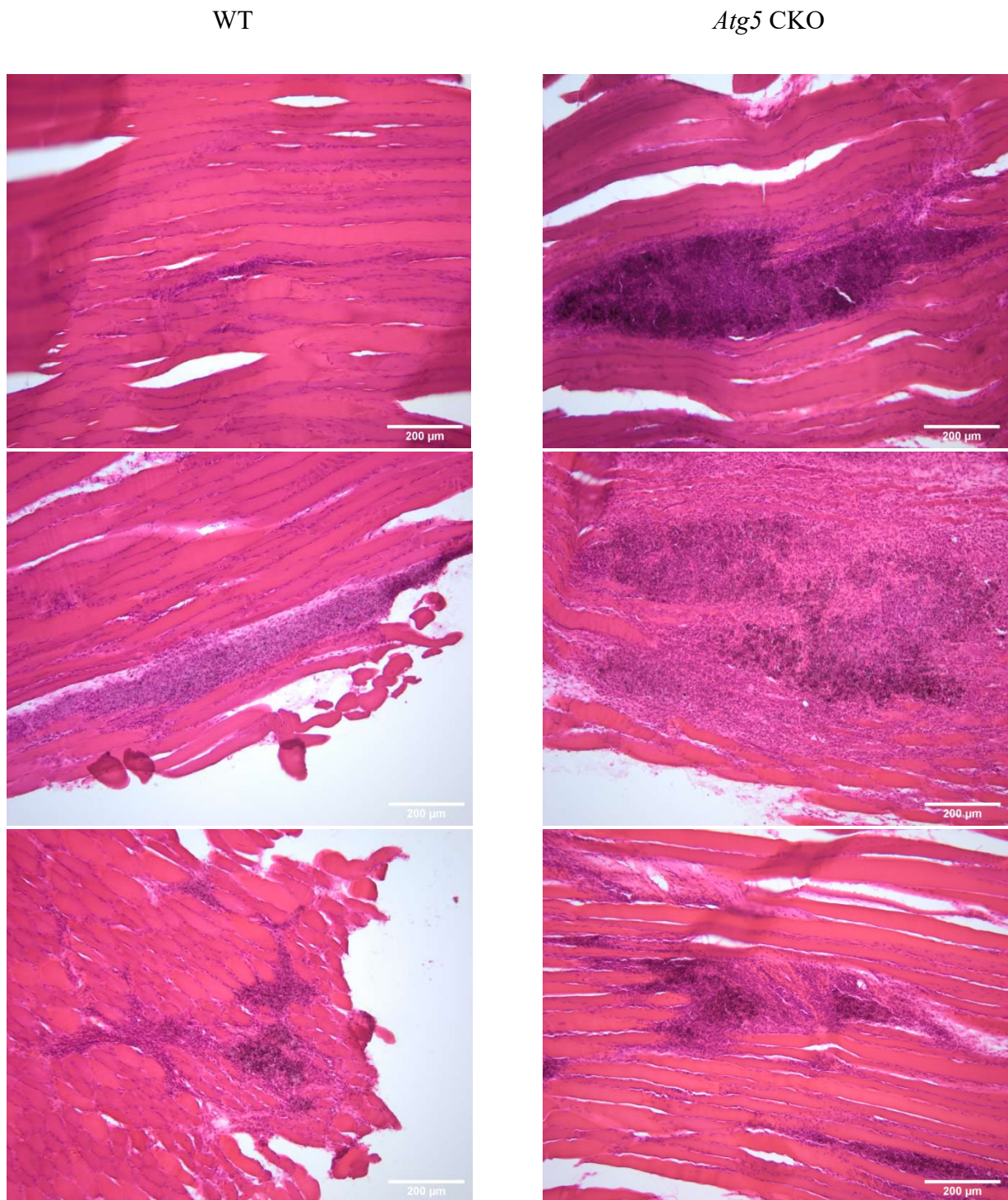


Figure 47 : Observation de la présence de granulomes dans les muscles des animaux $n = 3$ muscles par groupe, observés en microscopie photonique à lumière transmise avec un grossissement de 10X (barre d'échelle de 200 µm)

Des granulomes ont été observés dans 88,13 % des coupes de muscles des animaux WT contre 90,58 % des coupes de muscles des animaux *Atg5* CKO (**Tableau 43**). Le pourcentage de petits granulomes était homogène entre *Atg5* CKO et WT avec un total de 11,64 % des granulomes pour les animaux WT contre 11,02 % pour les animaux *Atg5* CKO. La présence de granulomes de taille moyenne était plus importante pour les animaux WT avec un total de 28,04 % contre 16,33 % pour les *Atg5* CKO alors que les grands granulomes ont majoritairement été observés chez les animaux *Atg5* CKO avec 72,65 % contre 60,32 % pour les animaux WT (**Tableau 43**). Les différences observées entre les animaux WT et *Atg5* CKO ne sont cependant pas statistiquement significatives au regard du faible effectif analysé.

Tableau 43 : Analyse semi-quantitative de la présence de granulomes dans les muscles des animaux en fonction de leur génome

Groupe	0	1	+	++	+++
WT	11,87 %	88,13 %	11,64 %	28,04 %	60,32 %
KO	9,42 %	90,58 %	11,02 %	16,33 %	72,65 %

Pourcentage de coupes analysées ne contenant pas de granulomes : (0) et contenant des granulomes (1). Granulomes divisés en trois catégories en fonction de leur taille : petits granulomes (+), granulomes moyens (++) ou grands granulomes (+++). Pourcentages calculés sur n = 3 individus par groupe.

II.2.4. Présence/translocation d'Alu-Dia dans les organes cibles

Une série de coupes par organe et par individu a été observée après coloration au Morin et analysée selon les modalités décrites dans le paragraphe II.2.3.3. de la section méthodologie afin de quantifier la présence de complexes Alu-Dia dans chaque organe. Les résultats obtenus sont développés ci-dessous organe par organe.

II.2.4.1. Muscle tibial antérieur

La quantification de la présence du complexe Alu-Dia dans le TA des animaux concorde avec l'observation de la présence de granulomes exposée dans le paragraphe précédent. L'ensemble des séries observées présentaient des spots dans le canal FRET, dont la fluorescence correspond à la signature spectrométrique des fND (**Figure 48**), au niveau des amas cellulaires identifiés comme étant des granulomes sur les coupes colorées en HE.

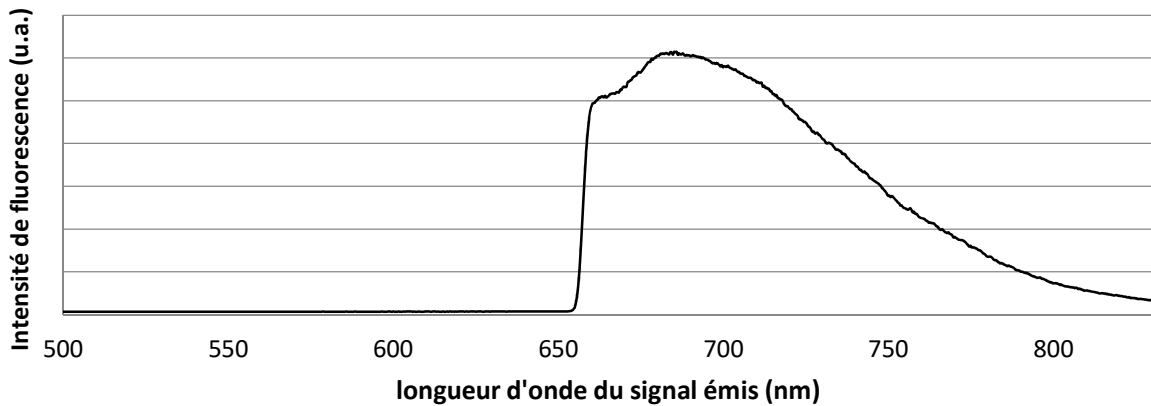


Figure 48 : Spectre d'émission observé dans le canal FRET sur une coupe de muscle tibial antérieur

u.a. : Unité arbitraire obtenue lors de la lecture du signal par le spectromètre.

Les résultats de quantification des particules d'Alu-Dia dans le TA sont résumés dans le **Tableau 44**. Les animaux WT présentaient une moyenne de 91 particules d'Alu-Dia par coupe contre une moyenne de 113 particules par coupe pour les animaux *Atg5* CKO. Les particules retrouvées chez les animaux WT présentaient des aires allant de $0,63 \mu\text{m}^2$ à $98,90 \mu\text{m}^2$ avec une moyenne de $4,11 \mu\text{m}^2$. La distribution de taille des particules présentes chez les animaux *Atg5* CKO s'étendait de $0,63 \mu\text{m}^2$ à $55,50 \mu\text{m}^2$ avec une moyenne de $3,51 \mu\text{m}^2$.

Ces résultats rapportent une densité de particules d'Alu-Dia dans le muscle des animaux *Atg5* CKO légèrement supérieure à celle des animaux WT 21 jours après l'injection avec une majorité de particules de petite taille et quelques gros complexes. Les différences observées entre WT et *Atg5* CKO ne sont pas statistiquement significatives.

Tableau 44 : Quantification de la présence d'Alu-Dia dans le muscle tibial antérieur

id	groupe	nb coupes	nb sites	moy/coupe	aire min	aire moy	aire max
49897	<i>Atg5</i> CKO	15	7	89,07	0,63	3,37	36,20
50084	<i>Atg5</i> CKO	16	12	102,13	0,63	3,58	34,95
97283	<i>Atg5</i> CKO	8	12	179,75	0,63	3,58	55,50
50144	WT	15	9	17,00	0,73	3,47	28,17
97241	WT	15	11	57,67	0,63	4,90	98,90
97402	WT	17	22	186,41	0,63	3,94	63,12

id : numéro d'identifiant des animaux.

nb coupes : nombre de coupes observées en microscopie à fluorescence lors de l'analyse.

nb sites : nombre de localisation de fND sur l'ensemble des coupes ; équivalent au nombre d'images acquises et analysées.

moy/coupe : nombre moyen de particules d'Alu-Dia observées par coupe.

aire min, aire moy, aire max : aire minimale, moyenne et maximale des particules d'Alu-Dia observées en μm^2 .

II.2.4.2. Ganglion lymphatique poplité

L'observation des coupes de ganglions lymphatiques poplités a confirmé la présence de spots, dans le canal FRET, présentant la fluorescence caractéristique des fND 21 jours après l'injection intramusculaire du composé (**Figure 49**). Ces particules d'Alu-Dia ont été observées de façon homogène dans le tissu sans indice particulier d'une distribution pour une zone préférentielle de l'organe.

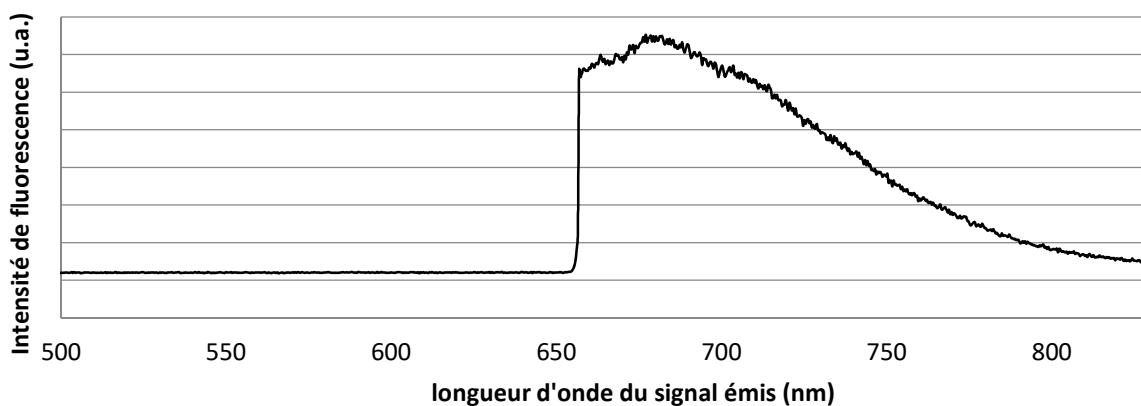


Figure 49 : Spectre d'émission observé dans le canal FRET sur une coupe de ganglion lymphatique poplité

u.a. : Unité arbitraire obtenue lors de la lecture du signal par le spectromètre.

Les données de quantification des particules d'Alu-Dia dans le ganglion lymphatique poplité sont résumées dans le **Tableau 45**. Les particules d'Alu-Dia ont été détectées avec une moyenne de 5 particules par coupe observées pour les animaux WT et 3 particules par coupe pour les animaux *Atg5* CKO. Les particules présentes dans les organes des animaux WT s'étendaient de $0,94 \mu\text{m}^2$ à $13,46 \mu\text{m}^2$ avec une moyenne de $2,77 \mu\text{m}^2$. Les particules retrouvées chez les animaux *Atg5* CKO mesuraient $0,94 \mu\text{m}^2$ à $11,89 \mu\text{m}^2$ avec une moyenne de $2,48 \mu\text{m}^2$.

Les données indiquent que les particules d'Alu-Dia retrouvées au niveau du ganglion lymphatique poplité (ganglions de drainage de la zone injectée) étaient en moyenne plus petites et moins nombreuses que celles retrouvées dans le muscle injecté. Les particules les plus petites et les plus grosses présentent au niveau du TA ne semblent pas avoir été déplacées du site d'injection et ne sont pas retrouvées au niveau du ganglion lymphatique poplité. Les résultats obtenus ne sont pas statistiquement différents entre animaux WT et *Atg5* CKO.

Tableau 45 : Quantification de la présence d'Alu-Dia dans le ganglion lymphatique poplité

id	groupe	nb coupes	nb sites	moy/coupe	aire min	aire moy	aire max
49897	<i>Atg5</i> CKO	11	11	6,09	0,94	2,32	11,89
50084	<i>Atg5</i> CKO	26	1	0,04	1,56	1,56	1,56
97283	<i>Atg5</i> CKO	25	14	3,68	0,94	2,60	10,75
50144	WT	19	19	5,21	0,94	2,55	10,95
97241	WT	19	20	9,89	0,94	2,88	13,46
97402	WT	15	1	0,07	4,90	4,90	4,90

id : numéro d'identifiant des animaux.

nb coupes : nombre de coupes observées en microscopie à fluorescence lors de l'analyse.

nb sites : nombre de localisation de fND sur l'ensemble des coupes ; équivalent au nombre d'images acquises et analysées.

moy/coupe : nombre moyen de particules d'Alu-Dia observées par coupe.

aire min, aire moy, aire max : aire minimale, moyenne et maximale des particules d'Alu-Dia observées en μm^2 .

II.2.4.3. Ganglion lymphatique inguinal

La recherche de particules d'Alu-Dia sur les coupes de ganglions lymphatiques inguinaux a permis la mise en avant de spots présentant la fluorescence caractéristique des fND dans le canal FRET (**Figure 50**). Comme pour les ganglions lymphatiques poplités, les particules d'Alu-Dia ont été retrouvées sans qu'une organisation spatiale particulière ne soit identifiable au sein des organes.

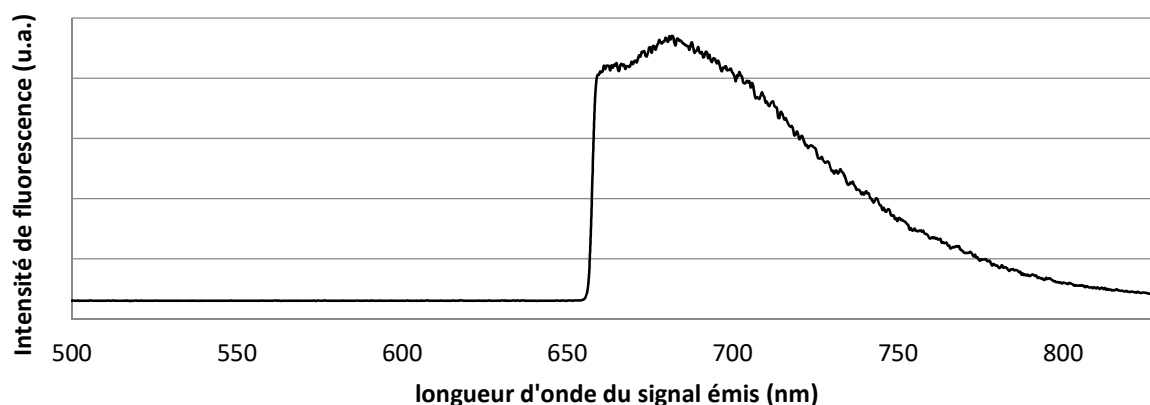


Figure 50 : Spectre d'émission observé dans le canal FRET sur une coupe de ganglion lymphatique inguinal

u.a. : Unité arbitraire obtenue lors de la lecture du signal par le spectromètre.

Les résultats de quantification des particules d'Alu-Dia dans le ganglion lymphatique inguinal sont résumés dans le **Tableau 46**. La quantification moyenne de particules d'Alu-Dia a été de 7 particules par coupe pour les animaux WT et de 6 particules par coupe pour les animaux *Atg5* CKO. Les particules retrouvées chez les animaux WT mesuraient de 0,63 μm^2 à 19,93 μm^2 avec une moyenne de 2,96 μm^2 . La taille des particules présentes chez les animaux *Atg5* CKO était comprise entre 0,94 μm^2 et 15,02 μm^2 avec une moyenne de 2,60 μm^2 .

La taille et la densité des particules d'Alu-Dia retrouvées au niveau du ganglion lymphatique inguinal sont du même ordre de grandeur que celles caractérisant les particules retrouvées au niveau des ganglions lymphatiques poplités. Les différences observées entre WT et *Atg5* CKO ne sont pas statistiquement significatives.

Tableau 46 : Quantification de la présence d'Alu-Dia dans le ganglion lymphatique inguinal

id	groupe	nb coupes	nb sites	moy/coupe	aire min	aire moy	aire max
49897	<i>Atg5</i> CKO	27	27	10,74	0,94	2,65	15,02
50084	<i>Atg5</i> CKO	25	1	0,08	5,53	10,12	14,71
97283	<i>Atg5</i> CKO	13	4	6,08	0,94	2,21	10,54
50144	WT	18	28	12,78	0,63	2,83	19,93
97241	WT	34	34	9,38	0,63	3,03	17,84
97402	WT	26	3	0,12	1,25	4,10	5,63

id : numéro d'identifiant des animaux.

nb coupes : nombre de coupes observées en microscopie à fluorescence lors de l'analyse.

nb sites : nombre de localisation de fND sur l'ensemble des coupes ; équivalent au nombre d'images acquises et analysées.

moy/coupe : nombre moyen de particules d'Alu-Dia observées par coupe.

aire min, aire moy, aire max : aire minimale, moyenne et maximale des particules d'Alu-Dia observées en μm^2 .

II.2.4.4. Rate

L'analyse spectrométrique des signaux fluorescents présents sur les coupes de rates a permis de mettre en avant des spots présentant la fluorescence caractéristique des fND dans le canal FRET (**Figure 51**). Ces particules ont été observées de façon sporadique avec un effectif trop faible pour tirer des conclusions quant à leur possible emplacement préférentiel sur les coupes de rate.

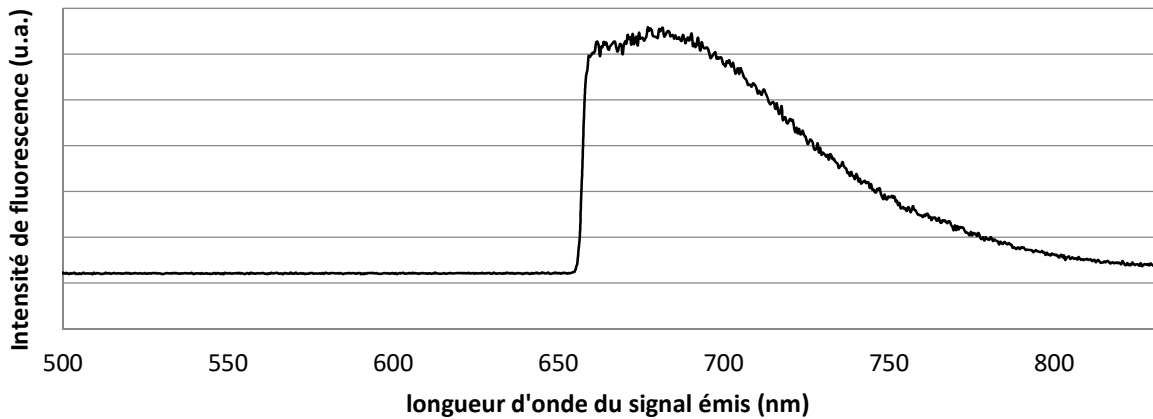


Figure 51 : Spectre d'émission observé dans le canal FRET sur une coupe de rate
u.a. : Unité arbitraire obtenue lors de la lecture du signal par le spectromètre.

Les données de quantification des particules d'Alu-Dia dans la rate sont résumées dans le **Tableau 47**. Des particules d'Alu-Dia ont été détectées chez un individu WT sur les trois, pour une présence moyenne de 0,07 particule par coupe. Les trois animaux *Atg5* CKO présentaient des particules d'Alu-Dia identifiables pour une présence moyenne de 0,08 particule par coupe. Les particules retrouvées chez l'animal WT présentaient des aires allant de $0,79 \mu\text{m}^2$ à $6,37 \mu\text{m}^2$ avec une moyenne de $3,05 \mu\text{m}^2$. Les particules retrouvées chez les animaux *Atg5* CKO mesuraient entre $0,79 \mu\text{m}^2$ et $3,87 \mu\text{m}^2$ avec une moyenne de $1,65 \mu\text{m}^2$.

La densité de particules d'Alu-Dia au niveau de la rate 21 jours après injection IM est faible et traduit une translocation active mais réduite vers cet organe. La taille moyenne des particules d'Alu-Dia retrouvées au niveau de la rate ne diffère pas sensiblement de celles présentes au niveau des ganglions mais la taille maximale de ces particules est réduite par comparaison avec les mesures effectuées dans les ganglions lymphatiques. Les différences observées entre WT et *Atg5* CKO ne sont pas statistiquement significatives.

Tableau 47 : Quantification de la présence d'Alu-Dia dans la rate

id	groupe	nb coupes	nb sites	moy/coupe	aire min	aire moy	aire max
49897	<i>Atg5</i> CKO	21	1	0,05	1,81	1,81	1,81
50084	<i>Atg5</i> CKO	25	2	0,16	0,79	1,71	3,87
97283	<i>Atg5</i> CKO	25	1	0,04	1,24	1,24	1,24
50144	WT	15	0	0,00	0,00	0,00	0,00
97241	WT	18	4	0,22	0,79	3,05	6,37
97402	WT	21	0	0,00	0,00	0,00	0,00

id : numéro d'identifiant des animaux.

nb coupes : nombre de coupes observées en microscopie à fluorescence lors de l'analyse.

nb sites : nombre de localisation de fND sur l'ensemble des coupes ; équivalent au nombre d'images acquises et analysées.

moy/coupe : nombre moyen de particules d'Alu-Dia observées par coupe.

aire min, aire moy, aire max : aire minimale, moyenne et maximale des particules d'Alu-Dia observées en μm^2 .

II.2.4.5. Cerveau

Les analyses effectuées sur les coupes de cerveau ont permis de mettre en évidence la présence anecdotique d'une particule présentant le spectre d'émission des fND (**Figure 52**) chez l'individu 97241 appartenant au groupe WT (**Figure 53**). Cette unique particule située dans le cortex somatomoteur présentait une surface de $1,30 \mu\text{m}^2$. Aucune autre particule d'Alu-Dia n'ayant pu être identifiée sur les coupes de cerveau analysées, les comparaisons statistiques n'ont pas été réalisées pour cet organe.

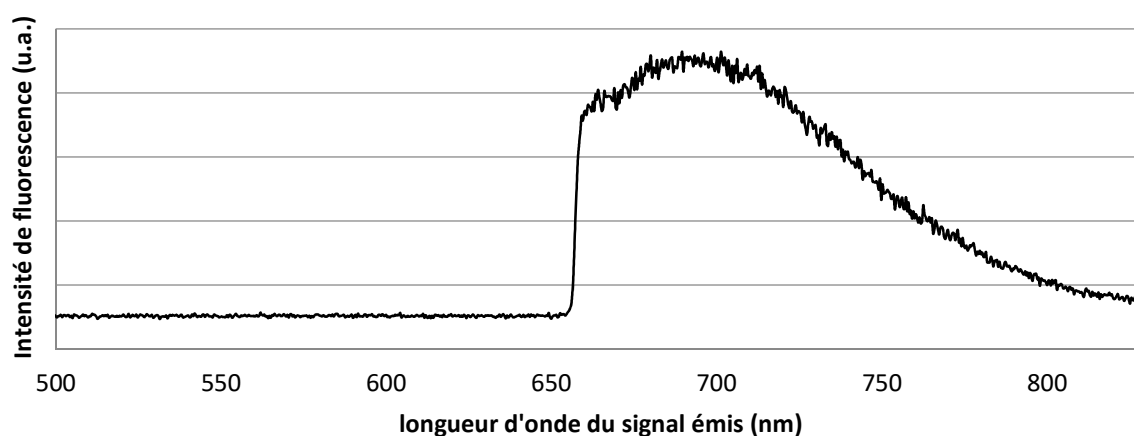


Figure 52 : Spectre d'émission observé dans le canal FRET sur une coupe de cerveau de l'individu 97241

u.a. : Unité arbitraire obtenue lors de la lecture du signal par le spectromètre.

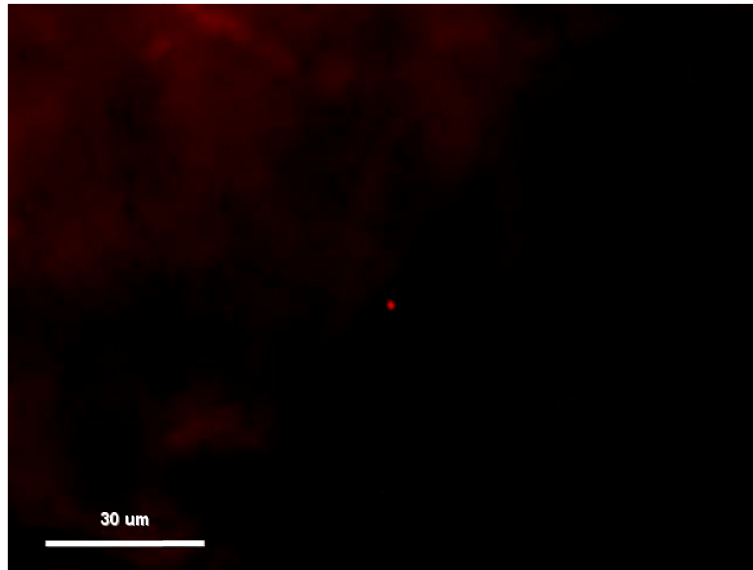


Figure 53 : Signal de la particule d'Alu-Dia dans le canal FRET sur une coupe de cerveau de l'individu 97241
Microscopie à fluorescence avec un grossissement de 63X (barre d'échelle de 30 μm)

II.2.4.6. Récapitulatif des résultats

L'ensemble des résultats de l'expérimentation de suivi des particules aluminiques dans différents organes après injection IM chez la souris déficiente en autophagie ne démontre pas de différence statistique de translocation du composé aluminique entre animaux *Atg5* CKO et animaux WT au regard du faible effectif d'animaux utilisé.

Les données obtenues confirment néanmoins que l'injection IM de nanoparticules aluminiques est en mesure d'induire une lésion musculaire présentant les signes histologiques caractéristiques d'une lésion de MFM. Ces données démontrent également qu'une translocation des particules existe depuis le site d'injection vers des organes distants comme les ganglions lymphatiques de drainage, la rate et jusqu'au cerveau où la présence de particules aluminiques issues de l'expérience est observée trois semaines après l'injection initiale.

Sans que ces données n'ait fait l'objet d'une analyse particulière, il semble que la translocation des particules aluminiques observée dans cette expérimentation s'accompagne d'une diminution progressive de la taille des particules à mesure de l'éloignement de la zone d'injection.

DISCUSSION GÉNÉRALE

I. Rappel des objectifs

Les objectifs des expérimentations effectuées au cours de ce travail de thèse étaient i) d'évaluer les capacités autophagiques et la réponse inflammatoire à l'Al des cellules immunitaires de patients MFM après exposition à l'Al d'origine vaccinal, ii) de tester un traitement pharmacologique chez la souris adulte et juvénile ou d'utiliser une souche de souris présentant un défaut autophagique génétique afin d'évaluer sur un modèle animal l'implication du processus autophagique sur le devenir des particules d'Al injectées par voie IM.

Pour cela, une approche *in vitro* a été menée sur les cellules immunitaires des patientes MFM afin de déterminer quel était leur niveau autophagique basal ainsi que leur réponse inflammatoire et autophagique à la présence d'Al particulaire. Des cellules mononuclées du sang périphérique de huit patientes MFM âgées de 37 à 77 ans ont été mises en culture et différenciées durant une semaine avant d'être exposées à des particules d'AH ou à un vaccin entier durant quatre heures. La capacité autophagique des cellules a été évaluée par western blot des principales protéines de l'autophagie et le statut inflammatoire par dot-blot d'un panel de cytokines communes et précédemment documentées.

Un traitement pharmacologique à base de HCQ a ensuite été testé chez des souris traitées à l'âge adulte ou juvénile afin de tester son efficacité comme agent perturbateur de l'autophagie sur le long terme. Pour cela le composé a été injecté de façon récurrente par voie IP et les animaux ont été suivis durant quatre mois. Une batterie de tests a permis l'évaluation du développement moteur et sensoriel des souriceaux durant les trois premières semaines de vie post-natale afin de s'assurer que le traitement ne perturbe pas la mise en place et le développement du système nerveux.

L'accumulation sérique du composé sur le long terme a été mesurée chez les animaux traités à l'âge adulte après 3 jours puis 2 et 4 mois de traitement hebdomadaire.

Après deux et quatre mois de traitement, le comportement individuel des animaux adultes et juvéniles a été observé sur le plan de la résistance à l'effort physique, de l'activité locomotrice et de l'anxiété.

Parallèlement, des analyses histochimiques ont été menées afin d'évaluer les performances du flux autophagique dans différents tissus cibles plus ou moins distants de la zone d'injection du composé.

Enfin, une approche génétique a été envisagée afin d'étudier la translocation des particules aluminiques au sein de l'organisme après une injection IM. Pour cela, un adjuvant vaccinal marqué de façon permanente par un traceur fluorescent a été injecté par voie IM à des souris présentant un KO conditionnel d'une protéine majeure de l'autophagie. Une analyse histologique d'organes lymphoïdes cibles a été menée afin d'observer la translocation systémique des particules vers des organes distants 21 jours après l'injection.

II. Originalité du modèle

Les études présentées dans ce manuscrit s'inscrivent dans la problématique actuelle de questionnement sur le niveau de sécurité des adjuvants vaccinaux à base d'aluminium puisqu'elles visent à évaluer la persistance, la translocation et la neurotoxicité de ces particules dans un contexte particulier de susceptibilité d'intolérance aux particules aluminiques potentiellement induite par une déficience dans le processus autophagique. De plus, le protocole expérimental développé est original sur plusieurs points :

- L'étude de l'impact de la **composante autophagique** sur la persistance et la translocation des particules aluminiques est un fait nouveau. En effet, l'observation de la séquestration vacuolaire des particules d'Al chez les patientes atteints de MFM est récente et le rôle de l'autophagie dans l'action adjuvante des sels d'Al n'est pas encore clairement caractérisé.
- Les études portant sur l'utilisation de HCQ évaluent généralement son action à des échelles de temps courtes avec une exposition quotidienne au composé et sans que ces potentiels effets sur le neuro-développement ou le comportement ne soient évalués. Le calendrier et les doses qui ont été sélectionnés dans ce travail sont représentatifs du **calendrier prophylactique humain** recommandé par le CDC pour lutter contre la malaria lors de déplacements dans les zones à risques. De plus, les effets du traitement ont été évalués **à long terme** afin de tester la modélisation d'une déficience autophagique chez la souris **aussi bien adulte que juvénile** tout en garantissant l'absence d'effets néfastes sur le **développement sensori-moteur** des jeunes ou sur le **comportement individuel** de souris adultes.
- Enfin, l'utilisation d'un double marquage au Morin et par traceur aux fND analysé par la **technique de FRET** est une originalité de ce travail afin de suivre la **translocation** de particules aluminiques dans différents organes allant du muscle ayant reçu l'injection initiale jusqu'au cerveau de souris présentant une **déficience en autophagie** induite par un KO génétique conditionnel sur un gène majeur de l'autophagie.

Dans la suite de cette discussion, les expérimentations menées étant de nature très différentes, elles seront traitées de façon séquentielle. La discussion commencera par l'expérimentation *in vitro* sur les PBMC de patientes MFM avant de poursuivre avec les expérimentations *in vivo*, d'abord celle dédiée au traitement pharmacologique puis celle relative à l'évaluation de l'impact d'une déficience autophagique sur le devenir des particules aluminiques.

III. Capacité autophagique et réponse inflammatoire *in vitro* des cellules immunitaires

III.1. Morphologie cellulaire et capacité d'internalisation

L'étude de la capacité d'internalisation des particules aluminiques par les PBMC contrôles et issues de patientes MFM a été réalisée en exposant des cultures cellulaires à des particules d'Al fluorescentes. Des sondes ont également été utilisées afin de caractériser la présence de lysosomes dans les cellules étudiées.

Les résultats démontrent que les PBMC issues d'individus MFM présentent une **gamme de taille comparable** aux cellules contrôles. Cette observation est en accord avec les descriptions faites de la lésion de MFM décrivant une infiltration musculaire de macrophages basophiles avec présence de lymphocytes B et T mais sans qu'une morphologie particulière des monocytes ne soit visible (Gherardi *et al.*, 2016).

Notre étude établit que **l'internalisation des particules** d'Al par les PBMC primaires contrôles est déjà effective lors de son observation à 4 h. Les observations cellulaires réalisées montrent en effet un fort signal de fluorescence du lumogallion au niveau intracellulaire après 4 h de mise en contact avec les PBMC préalablement différenciées. Si la phagocytose des particules d'Al a déjà été rapportée dans la littérature scientifique, les études publiées ont cependant principalement travaillé sur la lignée cellulaire THP1 (Ohlsson *et al.*, 2013; Mold *et al.*, 2014; Mile *et al.*, 2015; Shardlow, Mold & Exley, 2020). L'internalisation formelle des particules d'adjuvant aluminique par des PBMC primaires contrôles via un marquage direct reste donc, à notre connaissance, une donnée inédite. Cette détection confirme, par ailleurs, d'autres observations faites par microscopie électronique démontrant l'internalisation de l'AH par la présence d'inclusions cristallines spécifiques dans des PBMC (Rimaniol *et al.*, 2004; Rimaniol, Gras & Clayette, 2007).

Durant cette expérience, les PBMC des individus MFM ont présenté une capacité d'internalisation des particules en 4 h similaire à celle observée sur les cellules contrôles. De plus, le niveau de présence de lysosome dans les PBMC MFM ne s'est pas révélé différent de celui des cellules contrôles. Il s'agit des **premières données** obtenues sur culture de cellules immunitaires isolées issues de patientes atteintes de MFM, ce qui permet une avancée dans la compréhension de la formation de la lésion musculaire caractéristique de la MFM :

- D'une part, la présence d'Al intra-cytoplasmique à un niveau comparable entre cellules MFM et contrôles laisse entrevoir **une capacité normale d'internalisation** des particules aluminiques par les **PBMC des individus MFM**. Ces données indiquent donc que la biopersistance de la lésion histologique de MFM n'est pas due à un retard de prise en charge des particules d'Al chez les patientes MFM. En effet, les connaissances actuelles de la lésion de MFM décrivent la présence de structure cristalline correspondant à l'AH, internalisée par les cellules du granulome musculaire biopersistant sur une longue durée

(Gherardi *et al.*, 1998; 2001a). Ces observations nécessitant d'être faites avec une latence importante entre l'injection vaccinale et le moment de la biopsie, il n'était donc pas exclu que la MFM soit le reflet d'une prise en charge ralentie des particules d'Al par les cellules de l'immunité. Nos données suggèrent cependant que les monocytes des patientes MFM sont capables d'internaliser à court terme les particules d'Al de manière aussi efficace que ceux des individus contrôles et laissent donc envisager un défaut dans le traitement cellulaire de ces particules, plutôt que dans leur internalisation.

- D'autre part, la présence d'un **niveau normal de lysosomes au sein des PBMC MFM** prouve que le défaut de prise en charge de l'Al n'est pas dû à un défaut de présence de l'organelle effectrice de la dégradation des particules internalisées. Cette expérimentation appuie donc les hypothèses actuelles concernant la MFM, évoquant l'idée qu'une défaillance dans un mécanisme intracytoplasmique, intermédiaire entre la phagocytose et la fusion avec le lysosome, est à l'origine de la MFM.

En résumé, les cellules immunitaires isolées d'individus sains, différenciées en culture cellulaire, ont présenté **une internalisation des particules aluminiques en cours**, 4 h après mise en contact. Les cellules isolées de patients MFM ont présenté une capacité d'internalisation des particules aluminiques et une présence lysosomale similaires aux cellules contrôles. La **bonne capacité d'internalisation des particules aluminiques** par les **PBMC MFM** et la **présence « normale » de lysosome** laisse donc penser qu'un défaut doit être présent, chez les patients MFM, dans une étape intermédiaire du mécanisme d'élimination des particules.

III.2. Mesure du flux autophagique

III.2.1. Les modulateurs de l'autophagie : CQ et Rapa

Analyse de l'autophagie : Le processus autophagique (décrit dans le chapitre III. de la section contexte et problématique) est un mécanisme complexe et dynamique dont l'étude n'est pas aisée, en témoigne les presque 400 pages de la dernière revue de référence détaillant les méthodes d'analyse possibles de l'autophagie et leurs limites (Klionsky *et al.*, 2021). La technique de western blot fait partie des méthodes d'analyse listées et reste l'une des plus utilisées dans la littérature. Elle nécessite cependant différents contrôles afin de pouvoir interpréter les résultats obtenus (Mizushima & Yoshimori, 2007; Barth, Glick & Macleod, 2010; Klionsky *et al.*, 2021). L'utilisation d'un anticorps dirigé contre une seule des isoformes de la protéine LC3 est recommandée. De plus, en complément de la quantification de la protéine LC3-II, estimant la présence d'autophagosomes dans les cellules, une évaluation de SQSTM1/p62 est préconisée, permettant ainsi d'appréhender l'efficacité du flux autophagique en distinguant activation de l'autophagie et inhibition de la dégradation des composés séquestrés.

Étapes clés : Pour rappel, les étapes clés du processus autophagique sont : i) la conjugaison de LC3-I à la PE pour former LC3-II ; ii) le recrutement de LC3-II sur les membranes autophagosomales internes et externes ; iii) le marquage du cargo à détruire par SQSTM1/p62 ; iv) la reconnaissance de SQSTM1/p62 par LC3-II pour « arrimage » du cargo dans l'autophagosome en formation ; v) la fermeture de l'autophagosome et le recyclage de LC3-II positionnée sur la membrane externe et vi) la fusion entre l'autophagosome et le lysosome, produisant la destruction du contenu autophagosomal (LC3-II, SQSTM1/p62 et cargo) (**Figure 11 p.98**).

Modulateurs : L'utilisation de modulateurs spécifiques de l'autophagie complète généralement les premières recommandations d'analyse par western blot, en permettant de visualiser la réponse protéique dans des situations particulières et définies. Ainsi la CQ est couramment utilisée en tant qu'agent lysosomotrope afin de bloquer l'autophagie à l'étape de formation de l'autophagolysosome, ce qui limite théoriquement la dégradation des protéines LC3-II et SQSTM1/p62 et accroît le ratio LC3-II/LC3-I. La Rapa est quant à elle utilisée pour son effet stimulateur de l'autophagie augmentant le couplage de la PE à LC3-I pour former LC3-II et aboutissant à la dégradation d'une partie de cette protéine et de SQSTM1/p62 par l'action lysosomale. Les effets attendus de la Rapa en termes de présence protéique seront donc une baisse de LC3-I, qui est rapidement convertie en LC3-II sous l'action de la drogue, accompagnée d'une diminution de SQSTM1/p62 qui est dégradée au niveau du lysosome.

Lors de l'expérimentation *in vitro* réalisée dans ce travail de thèse, les deux modulateurs de l'autophagie ont été utilisés en parallèle des traitements AH et V. Les résultats obtenus témoignent de changements dans le niveau de présence des protéines LC3-I, LC3-II et SQSTM1/p62.

CQ : L'utilisation de CQ a en effet permis l'accumulation de la protéine LC3-II dans les PBMC et l'augmentation du ratio LC3-II/LC3-I, attestant de la sur-présence de la forme II de la protéine LC3 et de l'accumulation d'autophagosomes cytoplasmiques en présence du composé, tels qu'attendus en cas de blocage de l'autophagie. L'accumulation envisagée de SQSTM1/p62 en présence de CQ n'a, en revanche, pas été observée. Cette absence d'accumulation significative pourrait s'expliquer de plusieurs manières. D'une part, la grande dispersion des données en condition témoin limite fortement la probabilité de détecter l'action du traitement avec l'effectif relativement faible utilisé dans cette expérimentation. D'autre part, l'action même de la CQ peut porter à confusion sur la modulation attendue du niveau de SQSTM1/p62. L'inhibition de la dégradation des composés lors du dernier stade de l'autophagie provoque effectivement une accumulation de SQSTM1/p62 dans les autophagosomes. Cependant, sans une forte production *de novo* du composé, son emplacement dans la cellule va lentement évoluer du compartiment cytoplasmique au compartiment autophagosomal sans changement de sa présence globale. Or, si la CQ bloque la formation de l'autophagolysosome, elle n'est en revanche pas connue pour induire la production de SQSTM1/p62. Il est donc possible que la durée sur laquelle le traitement a été observé soit insuffisante pour constater une accumulation de SQSTM1/p62 avec la seule autophagie basale des cellules comme agent de production de cette protéine. De plus, certains

auteurs pointent du doigt un effet perturbateur de la CQ sur l'analyse de l'autophagie : la CQ pourrait en effet activer une autophagie non canonique faisant intervenir une lipodation alternative de LC3 et sans impact sur la protéine SQSTM1/p62, ce qui pourrait expliquer que le traitement à base de CQ ait modulé la quantité de LC3 dans les cellules mais pas celle de SQSTM1/p62 (Jiang & Mizushima, 2015; Jacquin *et al.*, 2017; Klionsky *et al.*, 2021).

Rapa : Le traitement Rapa a un effet inhibiteur sur la protéine kinase mTOR faisant partie du complexe mTORC1, lui-même inhibiteur du complexe ULK impliqué dans l'initiation de l'autophagie. La Rapa permet donc, sans la régulation négative de mTORC1, une mise en marche forcée théorique de l'autophagie. Cette mise en marche augmente la conjugaison de la PE à LC3-I pour produire LC3-II, ce qui a pour conséquence de réduire la quantité de LC3-I cytoplasmique et d'augmenter le ratio LC3-II/LC3-I, tel qu'observé chez les individus MFM. Notons que l'observation individuelle des données confirme la diminution de la présence de LC3-I chez 8 des 11 individus contrôles bien que de manière non significative. Il est donc probable que l'importante variation interindividuelle au sein du groupe contrôle masque les effets du traitement au vu de l'effectif réduit de notre étude. Le processus autophagique étant dynamique, la production *de novo* de LC3-I pourrait également compenser sa baisse de concentration par passage sous la forme LC3-II. Après sa formation, la protéine LC3-II va progressivement être incluse aux membranes des autophagosomes. Les protéines LC3-II situées sur la membrane interne ainsi que SQSTM1/p62, contenue dans les autophagosomes, seront détruites après fusion avec le lysosome quand les protéines LC3-II situées sur la membrane externe seront recyclées vers le cytoplasme par l'action de ATG4. La dégradation des autophagosomes étant visible chez les individus contrôles sous la forme d'une baisse de quantité de la protéine SQSTM1/p62, il semble qu'un subtil jeu d'équilibre existe, dans lequel production et recyclage compensent la dégradation de la protéine LC3-II, aboutissant à une mesure de la protéine stable à 4 h. Signalons également que l'observation individuelle des données semble indiquer une tendance de présence à la baisse de SQSTM1/p62 chez 6 des 8 individus MFM tel qu'observé chez les individus contrôles. La grande hétérogénéité interindividuelle doit donc limiter la possibilité d'observer les effets du traitement avec l'effectif restreint de notre étude. La compréhension fine des mécanismes mis en jeu nécessiterait de pouvoir effectuer cette analyse de façon dynamique, avec plusieurs points de mesures répartis sur une échelle de temps plus longue, et avec un nombre d'individus plus important. Ce type d'analyse est cependant trop consommateur en matériel biologique pour être envisagé avec des cellules primaires dont la quantité disponible est limitée et difficilement accessible.

En résumé, l'effectif utilisé dans cette expérimentation était un peu faible, au vu de la large distribution des données, pour obtenir des conclusions catégoriques. Cependant, les cellules utilisées ont globalement répondu de manière conforme à l'utilisation de modulateurs de l'autophagie (CQ et Rapa). Dans l'ensemble, les cellules traitées **avec CQ** ont présenté une **accumulation d'autophagosomes non dégradés** alors que les cellules traitées **avec Rapa** ont présenté une **activation autophagique** sous la forme d'une dégradation des nouveaux autophagosomes.

III.2.2. Réponse autophagique des PBMC contrôles aux particules aluminiques

Ce chapitre, consacré à la réponse autophagique des PBMC primaires contrôles suite à une exposition à des particules aluminiques commencera par l'étude des données relatives à l'exposition des cellules à l'adjuvant seul (AH) avant de s'intéresser aux données relatives à l'exposition des cellules au vaccin (V). Pour comprendre les mécanismes cellulaires impliqués dans la réponse aux particules aluminiques, les résultats décrits dans le chapitre I.4. de la section Données expérimentales seront discutés par traitements. Les effets du traitement AH seront tout d'abord analysés pour l'ensemble des protéines autophagiques. Puis les traitements auxiliaires avec les modulateurs de l'autophagie (AH + CQ et AH + Rapa) seront pris en compte afin de faire le point sur la signification des variations observées. Une démarche similaire sera appliquée aux traitements V, V + CQ et V + Rapa.

III.2.2.1. Effets de l'AH sur les PBMC contrôles

AH : Après 4 h de mise en contact avec les PBMC contrôles, l'AH produit une action sur les protéines autophagiques en augmentant la présence des deux formes de la protéine LC3 et en diminuant la protéine SQSTM1/p62 par rapport au traitement témoin. Les modulations de présence de LC3-II à la hausse et de SQSTM1/p62 à la baisse laissent penser que l'AH pourrait avoir induit le processus autophagique. En effet, l'augmentation de la présence de LC3-II peut être interprétée comme une augmentation de la présence d'autophagosomes au sein des cellules, sans que l'on ne sache toutefois si cette présence accrue provient d'une augmentation de la production des autophagosomes ou d'une baisse de leur dégradation. La baisse de SQSTM1/p62 est en revanche un indice de destruction des autophagosomes par fusion avec le lysosome laissant supposer que l'accumulation observée de LC3-II provient d'une augmentation de sa production et que le processus autophagique est induit par la présence d'AH (Mizushima & Yoshimori, 2007; Klionsky *et al.*, 2021).

AH + CQ : Cependant, les résultats observés après les traitements auxiliaires (CQ et Rapa) ne confirment pas totalement cette hypothèse. En effet, seul le taux de LC3-II est augmenté en présence d'AH + CQ comparativement au traitement AH seul. La CQ étant un composé empêchant la formation de l'autophagolysosome, elle oblige donc théoriquement les autophagosomes à s'accumuler dans le cytoplasme. En cas d'activation du processus autophagique, une augmentation simultanée des niveaux de LC3-II et de SQSTM1/p62 devrait donc être observée. De plus, la réduction du niveau de SQSTM1/p62 avec le traitement AH + CQ par rapport au traitement CQ seul semble indiquer que les PBMC au contact de l'AH présenteraient une production de SQSTM1/p62 plus faible qu'au niveau basal, ce qui n'est pas cohérent avec une activation de l'autophagie nécessitant l'action de cette protéine.

AH + Rapa : Après utilisation conjointe d'AH + Rapa, une augmentation de quantité de LC3-II et une baisse de SQSTM1/p62 ont été observées par rapport au traitement Rapa seul. Ces modulations pourraient être interprétées comme une activation de l'autophagie plus importante en présence d'AH + Rapa qu'en présence de Rapa. En effet, les changements de niveau protéique pourraient être vus comme étant la preuve d'une dégradation des autophagosomes par la baisse de SQSTM1/p62 signifiant que l'augmentation de la quantité de LC3-II provient d'une augmentation de sa production.

AH et Rapa pourraient cependant agir de concert car une diminution de LC3-I et de SQSTM1/p62 est observée en présence d'AH + Rapa par rapport au traitement AH seul. Dans ce cas, l'activation de l'autophagie serait plus importante en présence d'AH + Rapa qu'en présence d'AH. La diminution de LC3-I serait alors la preuve d'une forte activation du processus allant jusqu'à la dégradation des autophagolysosomes marquée par la baisse de SQSTM1/p62. Dans les deux cas, AH + Rapa semblent induire une consommation de SQSTM1/p62 supérieure aux effets obtenus avec chacun des deux traitements individuels mais AH + Rapa induit également un taux de LC3-II supérieur au traitement Rapa et inférieur au traitement AH seul. Cette distinction de réponse pourrait indiquer une origine non autophagique de LC3-II induite par la présence d'AH.

En résumé, la réponse des **PBMC contrôles** à l'**AH** pourrait être interprétée comme une **activation du processus autophagique**. Cependant, l'absence d'implication apparente de SQSTM1/p62 en présence d'AH accompagné de modulateurs de l'autophagie nous incite à penser qu'un **mécanisme exclusif ou subsidiaire** à l'autophagie pourrait être impliqué.

Une explication à ces observations serait ainsi que l'AH présenté aux PBMC contrôles induit, dans les quatre heures suivant sa mise en contact, un mécanisme faisant intervenir des protéines du processus autophagique sans que l'autophagie canonique ne soit directement ou exclusivement impliquée.

Le mécanisme LC3 dépendant, ne faisant pas intervenir SQSTM1/p62, induit par la présence d'AH dans les premières heures de mise en contact, pourrait ainsi être une **phagocytose associée à LC3** ou *LC3 associated phagocytosis* (LAP). Ce processus d'internalisation à mi-chemin entre la phagocytose et l'autophagie et ayant pour but d'internaliser et de détruire des composés exogènes, partage une partie de la mécanique autophagique (Galais *et al.*, 2019), ce qui pourrait expliquer la **confusion avec l'autophagie canonique** lors de l'analyse protéique. Cette hypothèse semble de plus cohérente avec la présence extracellulaire de l'AH en début d'expérimentation. En effet, la LAP est un mécanisme dont le rôle, similaire à celui de la phagocytose, est d'internaliser des composés exogènes alors que le rôle de l'autophagie est de prendre en charge des composés présents au niveau cytoplasmique (**Figure 54**). Il ne semblerait donc pas étonnant d'observer un mécanisme d'endocytose lors de la mise en contact entre l'AH et les PBMC, d'autant plus que la LAP est connue pour jouer un rôle dans la prise en charge des antigènes pour leur présentation par le complexe majeur d'histocompatibilité de classe II (Romao & Münz, 2014).

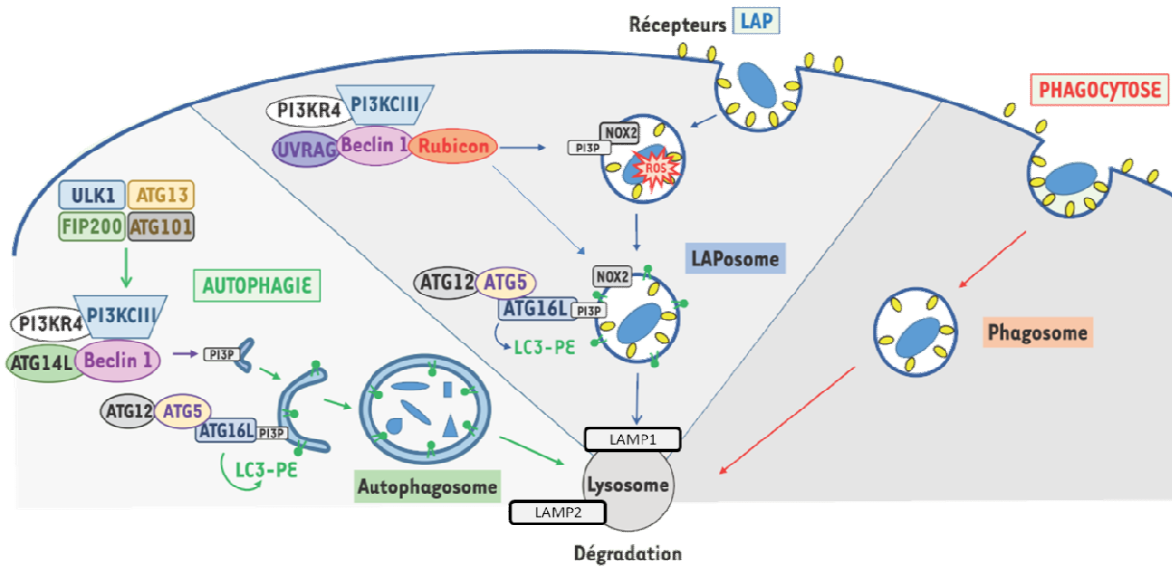


Figure 54 : Adaptation de la figure originale 1 de Galais *et al.*, (2019) schématisant les mécanismes d'autophagie, de LAP et de phagocytose

LAP et autophagie : En dehors de la différence de provenance des composés traités, LAP et autophagie partagent un grand nombre d'étapes et de complexes protéiques dans leur déroulement. La différence la plus notable étant la particularité des LAPosomes d'être uni-membranaires quand les autophagosomes présentent deux membranes (**Figure 54**) (Lai & Devenish, 2012). Il est donc envisageable de vérifier l'hypothèse de la présence de LAP par l'observation en microscopie électronique à transmission des PBMC 4 h après leur mise en contact avec l'AH. Cependant, une autre spécificité de la LAP appuie l'hypothèse de son intervention dans la prise en charge des particules d'Al par les PBMC : **la protéine Rubicon**, dont le nom complet est *RUN domain and cysteine-rich domain containing Beclin 1-interacting protein*. Cette protéine présente en effet la particularité de pouvoir faire basculer la machinerie cellulaire en réprimant le mécanisme autophagique au profit de la LAP (Matsunaga *et al.*, 2009; Boyle & Randow, 2015).

Mécanistique de la LAP : Après détection des composés exogènes par une large variété de récepteurs membranaires, dont pourrait faire partie les TLR et NLR possiblement impliqués dans la reconnaissance des particules d'Al (Jo *et al.*, 2016; Schroder *et al.*, 2018; Mehto *et al.*, 2019), Rubicon va jouer deux rôles clés dans le mécanisme de LAP. Le premier rôle est celui de stabilisateur du complexe PI3K normalement impliqué dans le mécanisme d'initiation de l'autophagie (voir le chapitre III. de la section contexte et problématique pour plus de précisions). Cette inclusion au complexe PI3K permet son recrutement sur la membrane du LAPosome et la production de PI3P (Martinez *et al.*, 2015). Le second rôle de Rubicon repose sur sa capacité d'assemblage et de fonctionnalisation du complexe protéique NOX2, lié à la membrane LAPosomale par la protéine p22, dont il fait partie. NOX2 est un composant important de la LAP via la production de ROS qui aide à la destruction des composés capturés (Yang *et al.*, 2012). Après le recrutement de NOX2 sur la membrane du LAPosome, Les ROS

produits et PI3P assurent la mobilisation du complexe ATG12-ATG5–ATG16 ainsi que la lipidation de LC3-II. La présence de LC3-II sur la membrane LAPosomale permet la dégradation des composés internalisés par fusion avec des lysosomes porteurs de la protéine LAMP1 (**Figure 54**) (Martinez *et al.*, 2015).

Cette explication du mécanisme de la LAP vise à discuter les résultats obtenus lors de l'étude des PBMC contrôles concernant la protéine Rubicon. Les données montrent en effet une disparition assez nette de Rubicon dès lors que des particules d'Al sont présentes au contact des cellules. La protéine Rubicon étant située sur la membrane du LAPosome, au sein des complexes PI3K et NOX2, elle semble donc promise à la destruction après fusion entre le LAPosome et le lysosome. La disparition de Rubicon peut donc être vue comme un signe d'activation de la LAP au détriment de l'autophagie canonique comme le suggèrent les résultats obtenus pour les protéines LC3-II et SQSTM1/p62 discutées ci-dessus. Enfin, une accumulation de Rubicon pourrait être attendue en présence d'AH + CQ étant donné le rôle présumé de CQ comme inhibiteur de la fusion entre vésicules et lysosomes. Cependant, les études sur le sujet expliquent que la fusion avec le lysosome dans le cas de l'autophagie repose de façon importante sur la protéine LAMP2 (Tanaka *et al.*, 2000) alors que la protéine LAMP1 semble être préférentielle dans le cas de la LAP (Martinez *et al.*, 2015). Or l'utilisation de CQ sur plusieurs types cellulaires a mis en avant une augmentation de la présence de LAMP1 en présence de CQ (Chen, Gombart & Chen, 2011; Mauthe *et al.*, 2018). De plus, l'action précise de la CQ en tant qu'inhibiteur de fusion n'est pas clairement établie et pourrait reposer principalement sur la désorganisation du trafic vacuolaire plutôt que par action directe sur le pH lysosomal (Mauthe *et al.*, 2018). Il est donc possible que la fusion entre LAPosome et lysosome reste effective en présence de CQ, ce qui expliquerait que le taux de Rubicon reste faible avec le double traitement AH + CQ.

En résumé, les **PBMC isolées chez les individus sains**, différenciées et mises en contact avec un adjuvant contenant des **particules d'Al** présentent, 4 h après mise en contact, l'**activation d'un mécanisme LC3-dépendant** distinct de l'autophagie canonique par plusieurs aspects formant un faisceau d'indices concordants laissant supposer qu'il s'agit d'une **phagocytose associée à LC3**.

III.2.2.2. Effets du vaccin sur les PBMC contrôles

Vaccin : L'exposition des PBMC contrôles à un vaccin contenant de l'AH durant 4 h n'a produit que peu de changement dans les concentrations protéiques observées. Les seules différences notables avec le traitement témoin sont la baisse des protéines IRGM et Rubicon. L'effet du traitement V sur le niveau d'IRGM est par ailleurs confirmé par une baisse de présence de cette protéine en présence de V + CQ comparativement au traitement CQ seul. IRGM est une protéine charnière entre inflammation et autophagie en régulant l'inflammasome. Lors de cette régulation, IRGM assure l'adressage des composants de

l'inflammasome vers les autophagosomes en jouant un rôle de médiateur avec SQSTM1/p62 (Mehto *et al.*, 2019).

Les observations faites laissent cependant planer le doute quant à la réelle implication de l'autophagie canonique dans cette régulation dans la mesure où aucune baisse du niveau de SQSTM1/p62 n'est visible conjointement à la **baisse d'IRGM** en présence de V. D'autre part, une régulation de l'inflammasome avec IRGM comme médiateur par le biais de l'autophagie canonique aurait dû être visible par l'observation d'une accumulation d'IRGM et de SQSTM1/p62 en présence de V + CQ par rapport au traitement CQ. Or l'absence de ces modulations pourrait signifier qu'un autre mécanisme est mis en jeu. L'étude la plus poussée sur le sujet démontre l'importance de l'activité lysosomale et de la présence d'ATG5 dans la régulation de l'inflammasome (Mehto *et al.*, 2019). Ces composants étant communs à plusieurs voies métaboliques, cela ne prouve pas formellement l'implication de la macroautophagie. L'inflammasome est en effet connu pour être également régulé par le protéasome (Song *et al.*, 2016).

En tout état de cause, la baisse d'IRGM observée lors de notre expérience pourrait donc être le signe précoce de la **présence de l'inflammasome** au niveau cytoplasmique. La réduction observée du niveau d'IRGM à 4 h serait alors un signe de lutte des cellules contre la réaction inflammatoire produite par le traitement V. Cette hypothèse pourrait être appuyée via la quantification des protéines NLRP3 et ASC, composantes de l'inflammasome et cible de l'action d'IRGM (Mehto *et al.*, 2019).

Cependant, l'absence de modulation du niveau d'expression des protéines de l'autophagie LC3 et SQSTM1/p62, avec la seule présence du traitement V, rend l'interprétation des données complexe sur le plan autophagique mais confirme l'importance de la présence des antigènes vaccinaux sur la réponse cellulaire, différente de celle observée après exposition des cellules à l'adjuvant seul.

Vaccin + CQ : Les traitements auxiliaires, modulateurs de l'autophagie, utilisés lors de l'étude apportent des pistes de réflexion intéressantes sur l'interprétation des résultats. En effet, l'accumulation de LC3-I et LC3-II en présence de V + CQ par rapport au traitement V seul, semble indiquer que le traitement V impacte la présence des protéines LC3. L'accumulation de LC3-II en présence de V + CQ par rapport au traitement V pourrait être vue comme une augmentation de la production de cette protéine mais à un niveau plus faible ou retardé par rapport à celui observé avec le traitement AH car non détectable sans CQ. Afin de détecter une éventuelle réponse retardée, une étude cinétique de plus longue durée serait nécessaire.

Cependant, comme pour le traitement AH, le niveau de protéine SQSTM1/p62 a été réduit en présence de V + CQ par rapport au traitement CQ seul, semblant indiquer une production de SQSTM1/p62 plus faible qu'au niveau basal, non cohérente avec une activation de l'autophagie qui devrait se manifester sous la forme d'une augmentation de la présence de cette protéine due à une accumulation des autophagosomes dans les cellules. Il semble donc

que le traitement V fasse intervenir une production de LC3-II sans implication de SQSTM1/p62.

Vaccin + Rapa : L'utilisation de Rapa en complément du traitement V apporte des conclusions similaires à celles obtenues avec le traitement AH. En effet, deux réponses complémentaires sont visibles au niveau des quantifications protéiques. D'une part, la baisse des protéines LC3-I et SQSTM1/p62 en présence du traitement V + Rapa par rapport au traitement V semble indiquer que l'autophagie est plus importante en présence de V + Rapa qu'en présence du traitement V. La diminution de LC3-I pourrait alors être le signe d'une forte activation du processus allant jusqu'à la dégradation des autophagolysosomes se manifestant par la baisse de SQSTM1/p62.

D'autre part, l'augmentation de LC3-II et la baisse de SQSTM1/p62, observées en présence du traitement V + Rapa par rapport au traitement Rapa seul, pourraient indiquer une activation de l'autophagie plus importante en présence de V + Rapa qu'en présence de Rapa seule. En effet, la baisse de SQSTM1/p62 pourrait être expliquée par la dégradation des autophagolysosomes, impliquant donc que l'augmentation de la quantité de LC3-II proviendrait d'une augmentation de sa production.

Enfin, la présence de V au contact des cellules réduit de façon très importante le niveau de Rubicon détectable. Le rôle clé de cette protéine ayant été développé dans le chapitre précédent, il semble raisonnable d'envisager une activation du mécanisme de LAP par le traitement V appliqué aux PBMC contrôles, quoique possiblement de façon retardé par rapport à l'action observée avec l'AH.

En résumé, les **PBMC contrôles** soumises à la **présence du vaccin Engerix B[®]** durant 4 h présentent l'activation d'un mécanisme sensiblement de même nature que celui induit par la présence de l'adjuvant seul, bien que **possiblement retardé** ou de plus **faible intensité**. La **présence d'une inflammation** en cours de régulation n'est pas à exclure bien que les seules données autophagiques ne soit pas suffisantes pour cette interprétation.

III.2.3. Réponse autophagique des PBMC MFM aux particules aluminiques

III.2.3.1. Effets de l'AH sur les PBMC MFM

AH : Mises en culture durant 4 h avec le traitement AH, les PBMC des patientes MFM ont présenté une accumulation de LC3-II et une baisse de SQSTM1/p62 comparativement au traitement témoin. Ces modulations protéiques renseignent sur l'implication d'un mécanisme cellulaire qui pourrait être assimilé à l'autophagie. En effet, l'accumulation de LC3-II couplée à la réduction de SQSTM1/p62 pourrait être interprétée comme une augmentation de la synthèse de nouveaux autophagosomes car la baisse de SQSTM1/p62, signe de destruction d'autophagolysosomes, atteste de l'absence de blocage du flux à l'étape de dégradation, qui aurait également expliqué l'augmentation de LC3-II.

AH + CQ : La baisse du niveau de SQSTM1/p62 en présence du traitement AH + CQ par rapport au traitement CQ seul n'est pas cohérente avec l'activation du mécanisme autophagique. En effet, une activation de l'autophagie transforme LC3-I en LC3-II au niveau des autophagosomes qui renferment SQSTM2/p62 et s'accumulent dans les cellules sous l'action de la CQ, se traduisant théoriquement par une augmentation simultanée de LC3-II et SQSTM2/p62. Dans notre étude, l'accumulation attendue de LC3-II n'est pas observée et la baisse de SQSTM1/p62 semble indiquer que le mécanisme induit par la présence d'AH au contact des PBMC MFM n'est pas de nature autophagique. Il est également possible que l'activation du mécanisme autophagique soit telle en présence d'AH que celle-ci lèverait le blocage imposé par la CQ. Cette hypothèse n'est cependant vérifiable qu'avec des expérimentations complémentaires sur des durées d'exposition différentes et/ou avec des doses d'AH différentes.

AH + Rapa : L'utilisation de Rapa n'apporte que peu d'informations complémentaires si ce n'est la possible action combinée des deux traitements. D'une part le traitement AH + Rapa présente des signes d'activation de l'autophagie sous la forme d'une baisse de présence de LC3-I et de SQSTM1/p62 par rapport au traitement AH seul. Dans ce cas, les données suggèrent une activation du processus autophagique plus importante en présence d'AH + Rapa par rapport au traitement AH. D'autre part, une baisse de SQSTM2/p62 est visible avec le traitement AH + Rapa par rapport au traitement Rapa seul. Dans ce cas la dégradation autophagolysosomale serait plus importante en présence d'AH + Rapa comparativement au traitement Rapa seul. Dans les deux cas, l'action combinée d'AH + Rapa produit une baisse du niveau de SQSTM1/p62 supérieure aux effets individuels de chacun des traitements.

Enfin, la forte baisse du niveau de Rubicon en présence d'AH et son rôle de régulateur entre les mécanismes de LAP et d'autophagie laisse présager d'une activation du mécanisme de LAP par le traitement AH au contact des PBMC MFM.

En résumé, la réponse des **PBMC isolées d'individus MFM** après 4 h de mise en contact avec un adjuvant contenant des **particules d'Al** se présente sous la forme d'une activation d'un **mécanisme LC3 dépendant** dont plusieurs aspects peuvent faire penser qu'il s'agit d'une **phagocytose associé à LC3** comme pour les individus contrôles.

III.2.3.2. Effets du vaccin sur les PBMC MFM

Vaccin : Les PBMC des patientes MFM, mises en contact avec un vaccin complet durant 4 h ont présenté une baisse de LC3-I et une augmentation de LC3-II par rapport au traitement contrôle. L'absence de modulation de la protéine SQSTM1/p62, observée en présence d'AH, laisse supposer que, comme pour les contrôles, la réponse au traitement V par les PBMC MFM pourrait être réduite ou retardée. De la même manière, une étude cinétique serait nécessaire afin de tester cette hypothèse. Les modulations de LC3-II induites par le traitement V pourraient être interprétées comme une augmentation de la formation d'autophagosomes dans les cellules faisant penser à l'activation du processus autophagique.

Vaccin + CQ : Comme pour les autres conditions, les traitements CQ et Rapa nuancent l'interprétation des résultats. En effet, la production de LC3-II en présence du traitement V est confirmée par l'accumulation de LC3-II en présence de V + CQ par rapport au traitement V seul. Aucune différence de concentration de LC3-II n'aurait été observée entre les traitements V et V + CQ si l'augmentation de LC3-II visible avec le traitement V seul avait été due à une inhibition de la formation des autophagolysosomes par le traitement V. De plus, la baisse du niveau de SQSTM1/p62 avec le traitement V + CQ comparativement au traitement CQ indique qu'en présence de V, le niveau de SQSTM1/p62 cytoplasmique est plus faible qu'au niveau basal. Cette baisse ne pouvant être assurée par le mécanisme autophagique en présence de CQ, cela suppose donc également qu'un autre mécanisme que l'autophagie canonique est impliqué en présence du traitement V.

Vaccin + Rapa : L'utilisation de Rapa conduit à la même interprétation des résultats qu'avec les autres conditions. D'une part, le taux de SQSTM1/p62 est réduit en présence de V + Rapa par rapport au traitement Rapa seul. Cela signifie que le traitement Rapa produit une dégradation des autophagolysosomes plus importante que le traitement V et augmente donc l'induction du mécanisme autophagique. D'autre part, le taux de SQSTM1/p62 est réduit et celui de LC3-II est augmenté en présence de V + Rapa par rapport au traitement Rapa seul. Les deux traitements V et Rapa agiraient donc en concordance vers la consommation de SQSTM1/p62 mais en présentant une distinction de réponse sur la production de LC3-II, plus importante en présence de V + Rapa par rapport au traitement Rapa seul. Il n'est donc pas impossible étant donné cette distinction de réponse, que la production de LC3-II induite par la présence de V ne soit pas totalement d'origine autophagique.

Enfin, la réduction de présence de la protéine Rubicon, dont le rôle de bascule entre autophagie canonique et LAP a été développé dans la partie traitant du groupe contrôle, nous amène à penser que ce mécanisme est la principale réponse produite par le traitement V, en 4 h, sur les PBMC MFM.

En résumé, un **mécanisme LC3 dépendant**, que nous supposons être une **phagocytose associé à LC3**, semble également être cohérent avec la réponse des **PBMC MFM** à la présence du **vaccin**, après 4 h de mise en contact.

III.3. Réponse inflammatoire et particules aluminiques

Les PBMC contrôles et MFM exposées à des particules d'Al sous forme d'AH ou d'un vaccin complet (Engerix B[®]) durant 4 h ont présenté des modulations dans l'excrétion de plusieurs cytokines. Certaines des modulations observées doivent être interprétées avec précaution au regard du faible effectif utilisé pour effectuer les tests statistiques. Cependant, le type de cytokines observé en réponse aux traitements semble indiquer que l'action globale des particules d'Al à 4 h est majoritairement pro-inflammatoire, comme cela était attendu, s'agissant d'un adjuvant vaccinal.

Chez les **contrôles**, la réponse des PBMC à la présence d'AH est caractérisée par l'augmentation de **production de TNF- α** par rapport au traitement témoin. Le traitement V induit, quant à lui, la production d'une quantité de TNF- α supérieure au traitement témoin mais également supérieure à celle induite par le traitement AH. La réponse des PBMC contrôles au traitement V se distingue également par l'augmentation de **production de CCL2** comparativement au traitement AH. La production de CCL2 étant significativement différente entre les traitements AH et V, celle-ci semble donc être imputable à la présence des antigènes associés à l'adjuvant. CCL2 étant une chimiokine responsable du recrutement de monocytes en cas de présence de composés exogènes (Rollins, 1996), sa présence suite à la mise en contact entre PBMC et vaccin semble cohérente avec les connaissances actuelles.

Les **PBMC MFM** présentent quant à eux une réponse inflammatoire comprenant une **production de TNF- α** accrue par le traitement AH par comparaison avec le traitement témoin. Pour ces cellules également, la présence du traitement V amplifie encore la production de TNF- α comparativement au traitement AH. De plus, le traitement V induit une **production d'IL-18** significativement supérieure à celle obtenue en présence d'AH. Il semblerait donc que cette réponse en IL-18 soit imputable à la présence des antigènes vaccinaux plutôt qu'aux particules aluminiques elles-mêmes.

Notons que les observations faites avec les PBMC mises en présence d'AH ou de vaccin sur une courte durée semblent indiquer que TNF- α est la première cytokine dont le taux est impacté par la présence de particules d'Al dans la population cellulaire étudiée. Comme précédemment rapporté 24 à 48 h après mise en contact avec un adjuvant seul ou un vaccin entier, la présence d'antigènes en supplément des particules adjuvantes module la réponse inflammatoire des PBMC (Kooijman *et al.*, 2018). Sur l'échelle de temps utilisée dans notre étude, les antigènes présents dans le vaccin Engerix B[®] semblent avoir amplifié la réponse inflammatoire produite par l'adjuvant seul. Cette conclusion repose sur l'hypothèse que la quantité d'adjuvant soit similaire dans les deux conditions. Sur ce point, notre protocole expérimental se base uniquement sur les données du fabricant du vaccin et il demeure donc possible que la quantité d'adjuvant dans les vaccins utilisés ne soit pas identique à la théorie et donc à la quantité d'Al du traitement AH. En effet, un récent article démontre que la quantité d'Al réellement présente dans les vaccins pédiatriques n'est pas toujours conforme aux données du fabricant et présente bien souvent une large gamme de distribution (Shardlow *et al.*, 2021), ce qui pourrait ici perturber l'interprétation de nos résultats.

Par ailleurs, la production de TNF- α en présence de particules d'Al a également été rapportée *in vivo*. En effet, l'exposition de souris au sulfate d'Al sur le long voire le très long terme a également été décrit comme étant inducteur de la production de cette cytokine (Pogue *et al.*, 2017a). Des investigations complémentaires seront nécessaires pour mettre en avant le mécanisme moléculaire impliqué dans cette réponse. Néanmoins, les observations effectuées lors de notre étude pourraient compléter les connaissances actuelles sur l'activation de **l'inflammasome NLRP3** par les particules d'Al. En effet, il a déjà été proposé que les cristaux d'Al induisent l'activation de l'inflammasome par leur action déstabilisatrice sur les lysosomes après phagocytose (Hornung *et al.*, 2008). Cependant, nos données démontrent que l'exposition de PBMC à des particules d'Al induit une **production rapide de TNF- α** et que le mécanisme d'internalisation des particules d'Al pourrait être une LAP. Or, il est clairement établi que la **production de ROS** est une étape clé dans ce mécanisme (Martinez *et al.*, 2015). De plus, TNF- α comme ROS sont des **régulateurs transcriptionnels de NLRP3** (McGeough *et al.*, 2017; Gros Lambert & Py, 2018). Nos données suggèrent donc que le mécanisme d'internalisation des particules d'Al par les PBMC, ainsi que la production de TNF- α induite par ces particules, pourrait augmenter l'expression de NLRP3 dans ces cellules.

L'inflammasome NLRP3 est un complexe protéique, composé des protéines NLRP3 et ASC, et dont l'action principale est l'activation de la Caspase 1 permettant la maturation et le relargage de deux cytokines pro-inflammatoires (IL-1 β et IL-18) (Jo *et al.*, 2016; Schroder *et al.*, 2018). Aucune variation du taux d'IL-1 β n'a été relevée dans notre étude et une légère augmentation du niveau d'IL-18 a été mise en avant avec les PBMC MFM suite au traitement V. La production de TNF- α étant plus importante avec le traitement V, il est possible que TNF- α ne soit pas présente en quantité suffisante, en 4 h de mise en contact, pour initier l'action de l'inflammasome en présence d'AH. L'observation de cette réponse sur une durée plus importante serait souhaitable afin de clarifier cette hypothèse.

En résumé, la **réponse des PBMC aux particules d'Al** est nettement **pro-inflammatoire** avec une **production de TNF- α** augmentée en présence de l'adjuvant seul et encore accrue en présence de vaccin entier. **Les réponses des cellules** contrôles et MFM, bien que toutes deux pro-inflammatoires, **diffèrent** par la nature des cytokines excrétées : CCL2 pour les cellules contrôles et IL-18 pour les cellules MFM.

III.4. Spécificités des PBMC MFM

Les chapitres précédents ont été consacrés à la description des mécanismes au sein de chaque groupe (contrôle et patientes MFM), sans comparaison des deux groupes entre eux. Dans ce chapitre, toutes les différences de réponse entre les deux groupes seront abordées en prenant en compte l'ensemble des informations disponibles concernant les réponses autophagiques et inflammatoires afin de caractériser les spécificités des PBMC MFM par rapport aux PBMC contrôles.

Age : Bien que statistiquement non différents à celui des donneuses contrôles, **l'âge des patientes MFM** pourrait sembler supérieur. Il semblait donc important de prendre en compte cette variable lors de l'analyse des données. En effet, il est aujourd'hui admis que les capacités autophagiques décroissent avec l'âge, en lien notamment avec l'augmentation du niveau de Rubicon chez une grande variété d'animaux (Nakamura *et al.*, 2019). Les analyses menées attestent de l'absence de corrélation entre l'âge des donneuses et le niveau des protéines de l'autophagie mesurées, sur l'ensemble des individus comme au sein de chaque groupe. Les variations protéiques observées, relatives à la mesure du flux autophagique, sont donc bien le fait des traitements appliqués.

Rubicon : De même, l'observation d'un **niveau de Rubicon plus important** sous traitement témoin peut également être considérée comme étant spécifique de la condition MFM car il ne présente pas de corrélation avec l'âge des donneuses. Cependant, l'expérimentation menée ne permet pas de préciser si cette forte présence de Rubicon est la cause de la biopersistance des particules d'Al au sein des cellules immunitaires des patientes MFM ou si elle résulte de la présence prolongée de ces particules depuis la vaccination, chez ces patients. Dans l'hypothèse où Rubicon serait naturellement présent en quantité supérieure chez une partie de la population, cette protéine pourrait alors être **utilisée comme biomarqueur** pour identifier les personnes susceptibles de développer une intolérance aux particules aluminiques d'origine vaccinale. En revanche, si la présence de cette protéine est la conséquence de la présence prolongée des particules aluminiques au sein des cellules immunitaires de l'organisme après vaccination, alors cette spécificité pourrait être **utilisée comme preuve de concept** dans la mise en place d'un modèle cellulaire pour l'étude de l'étiologie de la MFM. En effet, il est possible que la surexpression de Rubicon, conduisant ensuite vers le phénotype observé, puisse être causée par des altérations dans différents mécanismes de régulation de l'homéostasie : régulation du stress oxydant. Il serait alors possible de tester *in vitro* différentes altérations dans ces mécanismes dans le but d'induire la surexpression de Rubicon observée chez les patientes MFM.

Autophagie : De plus, les données obtenues lors de la mesure du flux autophagique démontrent une présence supérieure de la protéine LC3-II en présence du traitement Rapa chez les individus MFM par rapport aux individus contrôles. Il est possible que cette observation soit le reflet de l'existence d'un mécanisme de **LAP supérieur chez les individus MFM** et mis en avant par l'action de la Rapa, favorisant la destruction de LC3-II via le mécanisme autophagique. Le taux de LC3-II serait alors globalement en baisse chez les

individus contrôles alors que le niveau de LC3-II des individus MFM, produit par la LAP, ne serait pas impacté par le traitement Rapa. Cette hypothèse reste néanmoins sujette à discussion car l'action du traitement Rapa sur le taux de LC3-II n'est pas statistiquement significatif, les niveaux de LC3-II observés n'étant pas différents entre la condition Rapa et la condition témoin dans les deux groupes.

Par ailleurs, l'effet du traitement AH appliqué aux PBMC présente une apparente homogénéité entre les deux groupes lorsque l'AH est utilisé seul. Cependant, l'utilisation des modulateurs de l'autophagie fait ressortir des différences de réponse entre individus contrôles et MFM sous la forme d'une absence de modulation de LC3-II chez les patientes MFM. Ce défaut de modulation de LC3-II pourrait résulter de l'action directe de l'AH limitant l'action de la CQ par une activation trop importante de l'autophagie. Il est également possible que, comme le suggèrent les données, les individus MFM présentent une activité de **LAP renforcée** par la **présence de Rubicon** qui, en présence d'AH, produirait une **inhibition du mécanisme autophagique** en amont de l'action de la CQ empêchant ainsi la visualisation de l'effet attendu de ce modulateur sur le taux de LC3-II.

Enfin, une modulation du niveau de LC3 est également visible avec le traitement V, le niveau de LC3-I étant réduit et celui de LC3-II étant augmenté par rapport au traitement témoin chez les individus MFM. Chez les contrôles, la modulation de ces protéines n'est visible qu'après utilisation de traitements auxiliaires, modulateurs de l'autophagie. Il est donc possible que la **réponse au vaccin** soit plus **précoce** chez les **individus MFM** en relation éventuelle avec la surexpression de Rubicon. Toutes ces hypothèses reposent uniquement sur l'observation d'une seule évaluation de la réponse autophagique à 4 h après mise en contact entre les PBMC et les traitements. Une analyse cinétique sur des durées de traitement plus longues permettrait de mieux comprendre les mécanismes impliqués dans la réponse des PBMC aux particules aluminiques. Des durées plus importantes de mise en contact entre les cellules et les différents traitements pourraient également être envisagées afin d'observer les régulations post-transcriptionnelles induites par les différents traitements sur les protéines autophagiques.

En résumé, la principale caractéristique des PBMC MFM est la présence d'un **fort taux initial de Rubicon** non corrélé à l'âge des patientes sans qu'il ne soit **possible de préciser** si ce taux est la **cause** de la condition pathologique ou s'il en est une **conséquence**. Cependant, la présence supérieure de Rubicon chez les patients pourrait **moduler la réponse** des PBMC MFM en contact avec les particules d'AH en permettant une **activation rapide de la LAP** et une **inhibition de l'autophagie canonique**.

Inflammation & CCL2 : Sur le plan inflammatoire, **un niveau supérieur en CCL2** a été observé chez le groupe contrôle suite au traitement V par comparaison avec le traitement AH seul. Une analyse cinétique sur des temps plus longs serait souhaitable pour confirmer cette hypothèse, mais il est possible que la production de cette cytokine ne soit que transitoire chez le groupe contrôle. En effet, dans une précédente étude comparant les cytokines circulantes entre patientes MFM et contrôles, un niveau de CCL2 supérieur chez les patients MFM a été observé (Cadusseau *et al.*, 2014). Les données obtenues sur culture de cellules isolées de sang

total pourraient donc indiquer que la présence de CCL2 observée chez ces patients ne provient pas de l'activité des PBMC sanguins, sans quoi cette cytokine aurait dû être présente en plus grande quantité chez le groupe MFM sous traitement témoin. La présence de CCL2 circulante chez les patients MFM pourrait donc provenir des macrophages, chargés de particules d'Al, piégés au niveau musculaire ou dans le système lymphatique. Il semble également que la production de cette cytokine soit transitoire chez les individus contrôles puisque non observée sur le long terme lors des dosages sanguins, alors qu'elle serait retardée mais persistante chez les individus MFM peut-être en réponse à la persistance des particules aluminiques. Ces hypothèses expliqueraient alors que CCL2 soit retrouvée, sur le long terme, au niveau sanguin chez les patients MFM mais pas chez les individus contrôles.

Inflammation & IL-8 : De plus, les dosages de cytokines ont également mis en avant un niveau **d'IL-8 plus important** dans le groupe MFM par rapport au groupe contrôle avec le traitement AH. La quantité de cette cytokine n'ayant pas été impactée par les traitements utilisés, il semble difficile de conclure sur son implication dans la réponse des PBMC aux particules aluminiques. Cependant il est intéressant de constater qu'une étude récente a identifié IL-8 comme étant **régulateur négatif de l'autophagie** dans une lignée de fibroblastes cancéreux ovariens (Thongchot *et al.*, 2021). Des investigations complémentaires seront nécessaires mais la production de cette cytokine en réponse à la présence d'AH pourrait exacerber un défaut de machinerie autophagique induit par l'action conjointe des particules aluminiques et de la protéine Rubicon, chez les patients MFM.

Inflammation & CXCL1 : De même, **la chimiokine CXCL1**, dosée dans les deux groupes, a été significativement et systématiquement retrouvée à un niveau plus important chez les individus MFM par rapport aux contrôles. Le niveau de cette chimiokine attractive de neutrophiles est connu pour être **corrélé avec la sévérité de l'EM/SFC** (Montoya *et al.*, 2017). Dans la mesure où nos patientes ont été recrutées sur des critères de sévérité de la maladie, il n'est pas impossible que ces individus, ayant de nombreuses similitudes avec l'EM/SFC, présentent cette même corrélation. De plus, le niveau de CXCL1 chez les patientes MFM pourrait également être interprété comme un signe de déficience autophagique. En effet, une surproduction de CXCL1 a été observée en réponse à un agent infectieux chez un modèle murin présentant une **déficience en autophagie** dans la lignée myéloïde (Castillo *et al.*, 2012). De manière surprenante, une corrélation négative entre CXCL1 et l'âge des patientes a été identifiée sur nos données. La réponse autophagique, habituellement décrite comme déclinante avec l'âge (Nakamura *et al.*, 2019), ne peut donc pas expliquer cette corrélation, suggérant l'existence d'un mécanisme de régulation complémentaire restant à identifier. La présence accrue de CXCL1 chez les patientes MFM semble cependant à mettre en lien avec leur condition pathologique et pourrait être considérée comme un bio indicateur à prendre en compte pour la caractérisation de la MFM.

Inflammation, TNF- α et IRGM : Par ailleurs, la différence majeure, dans ces données permettant d'étudier la réponse inflammatoire, observée entre groupe contrôle et groupe MFM au cours de cette étude, concerne la **production de TNF- α** . En effet, le niveau de TNF- α , augmenté en présence d'AH par rapport au traitement témoin l'est encore davantage

en présence de V par rapport au traitement AH, chez les individus du groupe contrôles comme ceux du groupe MFM. La production de TNF- α est cependant constamment significativement **plus faible chez les individus MFM** par rapport aux contrôles en présence de particules aluminiques (AH ou V).

Si, comme nous le supposons, la présence de TNF- α est inductrice de l'inflammasome NLRP3 (McGeough *et al.*, 2017), nous pourrions attendre une présence accrue de l'inflammasome NLRP3 ainsi que d'IL-1 β et d'IL-18 chez le groupe contrôle. En effet, comme expliqué dans le chapitre précédent, IL-1 β et IL-18 sont les deux cytokines produites lors de l'activation de l'inflammasome NLRP3 (Jo *et al.*, 2016; Schroder *et al.*, 2018). Cependant, une diminution de présence de **la protéine IRGM** a été observée en présence du traitement V chez les contrôles alors que cette modulation n'a pas été retrouvée chez les individus MFM. Considérant l'implication de TNF- α dans la régulation positive de l'inflammasome NLRP3 (McGeough *et al.*, 2017) et IRGM ayant un **rôle régulateur sur l'assemblage de l'inflammasome** (Mehto *et al.*, 2019), il semble donc cohérent d'observer l'implication d'IRGM dans la situation où la présence de TNF- α est la plus forte.

Cependant, chez les patientes MFM, la plus faible présence de TNF- α pourrait induire des niveaux de NLRP3 et ASC insuffisants pour amorcer l'assemblage de l'inflammasome et ainsi déclencher la réponse d'IRGM sur la durée de traitement utilisée. Cela expliquerait que la régulation de l'inflammasome par IRGM ne soit pas encore visible chez les individus MFM et que la production d'IL-18 soit supérieure aux contrôles chez qui l'inflammasome semble régulé par IRGM. Il est également possible que le niveau de TNF- α produit soit similaire entre les groupes contrôle et MFM mais que le mécanisme de LAP, plus important chez le groupe MFM, régule négativement le niveau de TNF- α extracellulaire par internalisation de la cytokine dans des LAPosomes. Une étude transcriptomique des protéines de l'inflammasome (NLRP3 et ASC) ainsi que de TNF- α serait nécessaire afin de comprendre plus avant les mécanismes de régulation de la production de TNF- α et de l'inflammasome. De même, l'observation de ce mécanisme sur une période prolongée permettrait de vérifier l'absence de perturbation au niveau de la protéine IRGM chez les individus MFM chez qui la régulation de l'inflammasome par cette protéine pourrait être plus tardive.

Épuisement cellulaire : Qu'il soit constitutif ou régulé, le niveau réduit de TNF- α chez les patientes MFM n'est pas sans rappeler l'état **d'épuisement cellulaire** observé chez les patients EM/SFC suite à la présence d'un **stress chronique** (Morris *et al.*, 2019). Il convient, en effet, de rappeler que les patientes sélectionnées pour notre étude sont des patientes présentant un stress immunitaire chronique et que, parmi les patients MFM, plus de 70 % présentent des symptômes correspondant à l'EM/SFC (Aoun Sebaiti *et al.*, 2018; Gherardi, Crépeaux & Authier, 2019). Il est donc envisageable que les patients MFM aient présenté une phase initiale sur-inflammatoire après l'exposition aux particules d'Al et avant la survenue de leurs premiers symptômes, puis, la persistance des particules aluminiques jouant un rôle immunostimulant permanent, la situation évolue vers un *burn-out* des cellules immunitaires. Ces dernières ne pouvant jamais retrouver un environnement sain, dépourvu de stimulus challengeant la réponse immunitaire, seraient alors tombées dans un état de résilience de type

Dauer afin de faire face au stimulus chronique pseudo-infectieux (Naviaux *et al.*, 2016; Naviaux, 2020).

En résumé, la réponse inflammatoire des PBMC MFM se caractérise par une **production de TNF- α faible**, bien que suivant la même évolution que celles des PBMC contrôles. En présence de particules d'AH, la production de TNF- α s'accompagne chez les patientes, d'une **production d'IL-8** qui pourrait avoir un rôle de **régulateur négatif de l'autophagie** amplifiant les actions potentielles de Rubicon et des particules d'AH. Cette perturbation induite de l'autophagie pourrait alors expliquer la **production d'IL-18** en présence du traitement V par **manque de régulation de l'inflammasome** ainsi que la **présence de CXCL1** en quantité plus importante chez les patientes par rapport aux contrôles. CXCL1 étant une chimiokine dont le taux est **corrélé avec la sévérité de l'EM/SFC** ainsi qu'**à l'âge des patientes** étudiées, celle-ci pourrait se révéler être un bioindicateur intéressant à prendre en compte dans les études futures.

III.5. Hypothèse de prise en charge des particules d'AH par les PBMC

Dans cette section, les données relatives à ce travail de thèse ainsi que des informations issues de la littérature seront compilées dans le but de proposer un mécanisme de prise en charge des particules d'AH par les PBMC et les réactions cellulaires découlant de cette prise en charge. La schématisation de cette hypothétique prise en charge est résumée en **Figure 55 p. 282**.

III.5.1. Une internalisation par phagocytose associée à LC3

L'observation de l'internalisation des particules d'AH, réalisée dans ce travail de thèse, ainsi que les observations antérieures de particules d'AH au sein des macrophages formant le granulome musculaire caractéristique de la MFM, nous renseignent sur les capacités de phagocytose des cellules immunitaires des patients atteints de MFM. Dans différentes études, les particules, observées au niveau des biopsies musculaires de patients MFM, sont au moins partiellement entourées d'une membrane possiblement issue d'une vacuole de phagocytose ou du lysosome (Shivane *et al.*, 2012; Kim *et al.*, 2020), dès lors, l'implication du mécanisme autophagique semble plausible dans la prise en charge de ces particules.

Cependant, la présence accrue de Rubicon chez les patients MFM, l'évaluation du processus autophagique réalisée dans ce travail, ainsi que des observations faites par une équipe de recherche partenaire (données non publiées à ce jour) semblent indiquer que l'autophagie n'est pas le seul mécanisme mis en jeu dans la réponse des cellules aux particules d'AH. Nos collaborateurs ont en effet mis en avant l'implication d'un mécanisme LC3-dépendant suite à la mise en contact de cellules THP1 avec des particules d'AH. Ce mécanisme activant le complexe ATG5-ATG12 et augmentant la production d'ARNm de Rubicon et NOX2 sans que la protéine SQSTM1/p62 ne soit dégradée semble correspondre aux observations faites sur les PBMC isolées, utilisées dans notre étude. Le contrôle de l'implication du complexe ATG5-ATG12 sur nos cellules, ainsi que l'augmentation de présence de NOX2 pourrait être envisagé afin de confirmer cette hypothèse.

Le **mécanisme de LAP** semble donc être la voie d'entrée des particules d'Al dans les cellules de l'immunité. La reconnaissance des particules d'AH par les **TLR et NLR** (Jo *et al.*, 2016; Schroder *et al.*, 2018; Mehto *et al.*, 2019) pourrait être le signal déclenchant l'initiation de la phagocytose, tel que décrit pour d'autres composés impliqués dans l'activation de la LAP (Martinez *et al.*, 2015) (A, **Figure 55**). La reconnaissance des signaux de danger par des récepteurs membranaires pourrait expliquer la différence de réponse observée entre AH seul et vaccin dans la mesure où les récepteurs impliqués sont probablement différents. L'internalisation des particules d'AH par la LAP engagerait alors l'ensemble des processus précédemment décrits, comprenant l'implication de **Rubicon** dans la production de **LAPosomes**, le recrutement de **NOX2** et de **LC3-II** sur la membrane des LAPosomes, la production de **ROS** et la fusion terminale de cette vésicule de phagocytose avec un **lysosome** (B, **Figure 55**). La forte suspicion de l'implication d'un processus de LAP apporte des connaissances nouvelles sur le mode de prise en charge des particules d'AH par des PBMC isolées en condition non pathologique, sujet encore méconnu.

III.5.2. Activation de l'inflammasome

S'il est admis que l'**Al particulaire** est un **inducteur de l'inflammasome** par son rôle perturbateur des membranes lipidiques (Hornung *et al.*, 2008), cette voie d'activation pourrait se révéler plus complexe. Nos données démontrent en effet la forte production de TNF- α en présence de particules d'AH et plus encore en présence de vaccin, composé d'AH et d'antigènes. Or TNF- α , tout comme les ROS produits par la LAP, sont des régulateurs transcriptionnels des composants de l'inflammasome, les protéines ASC et NLRP3 (McGeough *et al.*, 2017; Gros Lambert & Py, 2018). TNF- α , tout comme les **ROS**, pourraient donc être impliquée dans une première étape, dite de **priming** de l'inflammasome (C, **Figure 55**) avant que les **particules d'AH** n'**activent**, directement ou indirectement, l'inflammasome (D, **Figure 55**).

En effet, le mode d'activation précis de l'inflammasome reste, à élucider. Il est possible que l'AH soit libéré dans le cytoplasme des cellules plutôt que d'être réellement dégradé au niveau du lysosome et excrété dans le milieu extracellulaire du fait de son action perturbatrice des membranes lipidiques (Hornung *et al.*, 2008). Cette libération intracytoplasmique pourrait alors entraîner une **activation de l'inflammasome, directe** par les particules d'AH ou **indirecte** via la Cathepsine B relarguée (Jo *et al.*, 2016). Il est également possible que l'activation de l'inflammasome repose sur une reconnaissance des **particules d'AH extracellulaires** par les récepteurs membranaires précédemment évoqués (D, **Figure 55**).

III.5.3. Rôle de l'autophagie

Bien que l'**autophagie** ne semble pas être fortement activée par la présence des particules aluminiques, au moins dans les quatre premières heures de mise en contact entre les particules d'AH et les cellules, ce mécanisme paraît tout de même avoir un **rôle important** à jouer à

long terme. En effet, une mobilisation d'IRGM a été observée dans la réponse des PBMC contrôles après mise en contact avec une solution vaccinale. IRGM ayant une fonction clé d'adressage des protéines ASC et NLRP3 vers les autophagosomes en jouant un rôle de médiateur avec SQSTM1/p62 (Mehto *et al.*, 2019), son implication laisse penser qu'une **régulation des composants de l'inflammasome** par l'autophagie pourrait être en cours, 4 h après mise en contact des cellules avec les particules d'AH d'origine vaccinale, au moins chez le groupe contrôle (E, **Figure 55**).

De plus, l'autophagie pourrait également jouer un rôle en tentant de **séquestrer** les éventuelles **particules d'AH** dont nous venons de dire qu'elles pourraient s'échapper du lysosome avant leur dégradation. Dans ce cas, l'autophagie serait directement impliquée dans la prise en charge des particules d'AH internalisées, mais de façon retardée (F, **Figure 55**).

De même, **La protéine IRGM** qui semble impliquée dans la réponse observée, est également connu pour son rôle dans la **mitophagie** (Kaufman & Mora, 2021) (G, **Figure 55**). Or ce mécanisme de régulation du pool mitochondrial semble primordial dans la mesure où les **particules d'AH** tout comme les **ROS**, produits par la LAP, et la présence de **composés pro-inflammatoires** sont de possibles **perturbateurs mitochondriaux** (Tomas & Newton, 2018; Nie *et al.*, 2019; Tur *et al.*, 2020) (H, **Figure 55**). L'autophagie pourrait donc être impliquée dans le recyclage de mitochondries défectueuses suite à l'exposition des cellules aux particules d'AH.

L'ensemble des processus exposés dans la section III.5. tend à démontrer la grande **complexité des mécanismes** mis en jeux dans la réponse immunitaire des PBMC aux particules d'AH d'origine vaccinale. Beaucoup de questionnements restent en suspens et des études plus poussées reposant sur une **approche pluridisciplinaire** devront être menées pour faire le point sur les voies impliquées dans cette réponse, y compris en situation non pathologique. La **Figure 55** schématise les différents aspects abordés dans cette section sous la forme d'une proposition d'un modèle de prise en charge des particules d'AH par les PBMC.

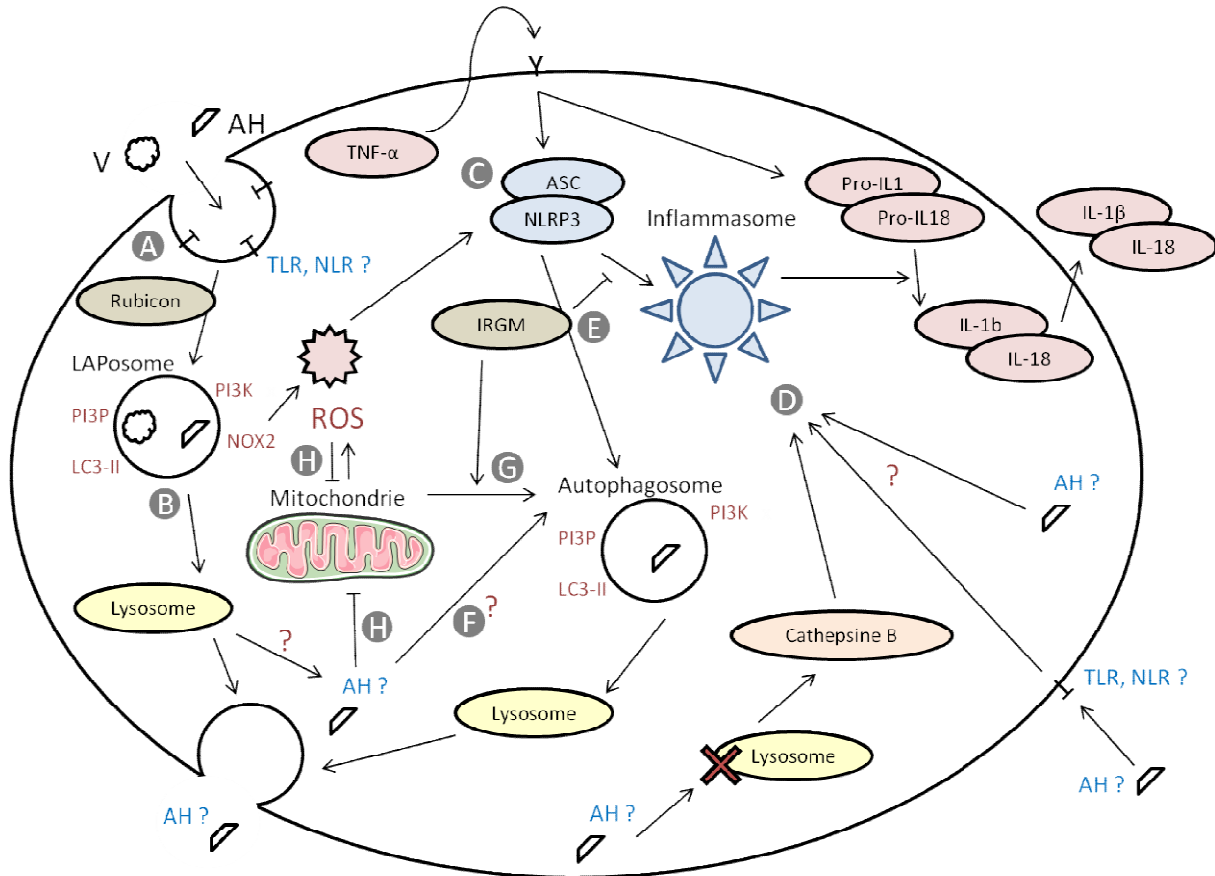


Figure 55 : Proposition d'un modèle de prise en charge des particules d'AH par les PBMC

Représentation hypothétique construite depuis les données obtenues expérimentalement et les informations de la littérature scientifique. A : internalisation des particules d'AH après reconnaissance par des récepteurs de surface ; B : implication de la phagocytose associée à LC3 ; C : régulation transcriptionnelle de l'inflammasome par $TNF-\alpha$ et les ROS produits par la LAP ; D : activation de l'inflammasome par plusieurs voies possibles et complémentaires ; E : régulation de l'inflammasome par IRGM via le processus autophagique ; F : implication autophagique dans la sequestration des particules d'AH cytoplasmiques ; G : médiation du processus mitophagique par IRGM ; H : perturbations mitochondriales induites par les ROS et les particules d'AH
 AH : Oxy-hydroxyde d'aluminium (adjuvant) ; V : vaccin ; ASC : *apoptosis-associated speck-like protein containing a C-terminal caspase recruitment domain* ; NLRP3 : *NACHT, LRR, and PYD domains-containing protein 3* ; $TNF-\alpha$: *tumor necrosis factor- α* ; ROS : *reactive oxygen species*.

Finalemment, considérant :

- *le rôle central que l'autophagie semble jouer, à la fois au niveau inflammatoire, mitochondrial et comme probable agent de séquestration des particules d'AH pouvant être libérées dans le cytoplasme des PBMC ;*
- *la possible perturbation autophagique induite par la présence conjointe de Rubicon, d'IL-8 et des particules d'AH et pouvant être à l'origine de la production de CXCL1 par les PBMC des patientes MFM étudiées,*

des études effectuées in vivo ont été menées afin de tester :

- *la possibilité de perturber le mécanisme autophagique par l'utilisation d'un traitement pharmacologique chez un modèle murin sans induire de phénotype préjudiciable aux analyses ;*
- *l'impact d'un défaut autophagique sur la translocation des particules d'AH depuis le site d'injection jusqu'à des organes distants.*

IV. Perturbation du flux autophagique par un traitement pharmacologique.

La discussion ci-dessous, faisant suite au chapitre II.1. de la section Données expérimentales, fait partie intégrante de l'article publié en 2020 (Masson *et al.*, 2020).

IV.1. Effet de l'injection d'hydroxychloroquine sur le poids des animaux – cohorte adulte & juvénile

Dans l'évaluation de l'efficacité d'un traitement pharmacologique à perturber l'autophagie à long terme sans nuire au développement sensori-moteur ou au comportement des animaux, nous avons injecté de façon répétée 30, 50 ou 70 mg HCQ/kg à des souris adultes et 15, 30, 50 ou 70 mg HCQ/kg à des juvéniles par voie IP. Les différentes doses utilisées n'ont pas influencé le poids corporel des animaux en cours d'expérience.

Ces données peuvent être interprétées de façon encourageante en considérant le traitement comme non toxique pour les animaux. En effet, à défaut d'apporter des preuves sur l'efficacité du traitement, l'absence de modulation pondérale semble indiquer que la HCQ, dans les conditions décrites, ne nuit pas aux animaux traités comparés aux animaux contrôles. La littérature sur le sujet n'est malheureusement pas fournie puisque la majorité des études publiées ont été réalisées sur des durées courtes, non compatibles avec le suivi pondéral des animaux.

S'il a été suivi dans les études de plus longue durée, le poids des animaux n'a que peu fait l'objet de publication nous permettant de comparer les données obtenues relativement à la voie d'admission et aux doses utilisées dans cette étude. Néanmoins, les données publiées suggèrent que l'injection IP de 50 mg/kg/j de HCQ sur 3 semaines n'influence pas le poids des animaux (Liu *et al.*, 2020) alors que l'utilisation, par voie orale, de 33 ou 100 mg/kg/j de HCQ sur 4 ou 8 semaines induit une réduction rapide du poids des individus après le début du traitement (Wang *et al.*, 2007; Liang *et al.*, 2018). Ces résultats rappellent, de plus, l'importance de la voie d'admission d'un composé sur l'effet observé. A dose équivalente, il semble que la voie orale soit plus nocive aux animaux que ne l'est la voie IP, cette dernière ne produisant pas de baisse significative du poids des animaux même avec une injection quotidienne (Liu *et al.*, 2020).

IV.2. Accumulation sérique d'hydroxychloroquine - cohorte adulte

Chez les animaux de la cohorte adulte, le dosage de HCQ sérique a été réalisé trois jours (D3), puis deux mois (D73) et quatre mois (D136) après le début de l'expérimentation. Les dosages réalisés montrent une accumulation sérique dose-dépendante de la HCQ à D3 mais une absence de détection du composé pour les prélèvements réalisés à D73 et D136.

Cette singularité peut résulter du calendrier d'injection appliqué aux animaux qui place le prélèvement de D3 vingt-quatre heures après la dernière injection de HCQ alors que les prélèvements de D73 et D136 ont été réalisés une semaine après la dernière injection. Cette différence de délais peut avoir permis la dégradation et l'élimination du composé avant son dosage. En effet, la HCQ présente une cinétique d'élimination complexe avec un pic de concentration plasmatique 4 à 12h après une unique injection (Al-Bari, 2015) suivi d'une décroissance exponentielle puis d'une élimination graduelle avec une demi-vie, dépendante de la dose initiale, pouvant varier de 74 heures à 50 jours (Ochsendorf, 2010).

De plus, la concentration plasmatique en HCQ est reconnue comme étant inférieure à sa concentration dans le sang total en raison de l'affinité des globules rouges pour le composé (Brocks *et al.*, 1994; Chhonker *et al.*, 2018). La combinaison de ces deux facteurs pourrait expliquer pourquoi nombre de nos échantillons présentaient des concentrations sériques en HCQ inférieures au seuil de détection de 25 ng/ml à D73 et D136.

Bien que la HCQ puisse atteindre un niveau d'équilibre plasmatique en 4 à 6 semaines d'injections journalières à dose constante (Al-Bari, 2015), nos données suggèrent que les concentrations et/ou le calendrier d'injection mis en place n'étaient pas suffisants pour atteindre cet état d'équilibre sur le modèle animal utilisé.

IV.3. Effet de l'injection d'hydroxychloroquine sur le flux autophagique – cohorte adulte & juvénile

La HCQ interfère avec l'acidification lysosomale par déprotonation mais peut surtout conduire à un défaut de fusion phagolysosomale par une sévère désorganisation du trafic vacuolaire, tout comme son homologue la CQ (Mauthe *et al.*, 2018). Le défaut de fusion entre lysosome et phagosome ou le manque d'acidité au niveau du lysosome entrave la dégradation des protéines LC3 et SQSTM1/p62 par les hydrolases acides, ce qui conduit à leur accumulation dans le cytoplasme des cellules. La perturbation du flux autophagique a donc été évaluée par western blot de ces deux protéines selon les recommandations faites dans le guide de Klionsky *et al.* (Klionsky *et al.*, 2016) remis à jour dans sa quatrième version (Klionsky *et al.*, 2021), afin d'attester de l'efficacité du traitement mis en place (Mizushima & Yoshimori, 2007; Barth, Glick & Macleod, 2010; Jiang & Mizushima, 2015). Bien que n'étant pas optimale, une seconde technique basée sur le rapport de LC3-II/LC3-I a été employée pour compléter la première analyse (Barth, Glick & Macleod, 2010). Les différentes analyses menées n'ont que rarement mis en avant l'accumulation protéique attendue dans les organes et tissus cibles, sans confirmation par la seconde méthode et sans corrélation avec la dose de traitement administrée. Le **Tableau 48** résume les effets observés sur le flux autophagique au cours des expérimentations sur la cohorte adulte et juvénile, suite à l'injection de différentes doses de HCQ.

Tableau 48 : Rappel des principaux effets du traitement HCQ sur le flux autophagique

Organe	Cohorte	15 mg/kg	30 mg/kg	50 mg/kg	70 mg/kg
Muscle tibial antérieur	Adulte	n.c.	-	-	-
	Juvenile	-	-	-	-
Ganglions lymphatiques	Adulte	n.c.	-	-	*♀ D3
	Juvenile	-	*♀ PND11; PND73	-	-
Rate	Adulte	n.c.	-	-	-
	Juvenile	-	-	-	-
Foie	Adulte	n.c.	*♀ D136	*♀ D136	*♀ D136
	Juvenile	-	-	-	-
Cerveau	Adulte	n.c.	-	-	-
	Juvenile	*♂ PND26	-	*♂ PND26	-

*♀ : impact du traitement sur le flux autophagique chez les femelles

*♂ : impact du traitement sur le flux autophagique chez les mâles

n.c. : non concerné

D : Day (jour d'expérimentation de la cohorte adulte)

PND : Post Natal Day (jour d'expérimentation de la cohorte juvénile)

De manière générale, l'exposition des animaux à la HCQ par voie IP, à l'âge adulte comme en période postnatale, n'a eu qu'une influence limitée sur le flux autophagique dans les organes analysés. En effet, quelques modulations des protéines majeures de l'autophagie ont été observées sans que cela ne soit confirmé par la seconde méthode d'analyse, sauf dans le cerveau des animaux mâles âgés de 26 jours ayant reçu un traitement postnatal à 15 mg/kg de HCQ. Au contraire, plusieurs cas de baisse conjointe des taux de protéines LC3-II et SQSTM1/p62 laissent présager d'une possible activation autophagique par le traitement mis en place (cf II.1.5. de la section Données expérimentales).

Cette observation est possiblement à mettre en relation avec la souche de souris utilisée. Tout d'abord, les souris en règle générale pourraient être moins sensibles que les humains à la HCQ, ce qui rendrait inefficace toute étude basée sur la posologie humaine malgré l'application de facteurs de correction permettant de prendre en compte la différence de métabolisme entre les espèces. Il a toutefois été montré qu'une dose de 60 mg/kg de CQ, soit approximativement la dose de HCQ reçue lors de la prise d'un comprimé de Plaquenil® chez l'humain, était requise en injection IP pour obtenir une augmentation du niveau de LC3b au niveau du foie au bout de quatre heures chez la souris (Haspel *et al.*, 2011). Ensuite, il s'avère que nous avons utilisé une souche C57bl/6j comme cela est généralement le cas dans les études immunologiques et les recherches sur l'autophagie (Grumati *et al.*, 2010; Mauthe *et al.*, 2018). Cependant, cette souche de souris présente une délétion sur le gène de la *nicotinamide nucleotide transhydrogenase (Nnt)*, porté par le chromosome 13, générant une absence complète de la protéine NNT (Freeman *et al.*, 2006). Cette protéine est une pompe à proton de la membrane interne des mitochondries, impliquée dans la régénération de NADPH (Shimomura *et al.*, 2009). De plus, la protéine NNT joue un rôle significatif dans la modulation de la réponse immunitaire. Les macrophages des souris C57bl/6j pourraient donc

présenter une quantité accrue de ROS et une réponse inflammatoire plus importante aux pathogènes (Ripoll *et al.*, 2012) ainsi, probablement, qu'aux particules inorganiques comme les excipients présents dans le Plaquenil[®], notamment le dioxyde de titane capable, en lien avec la forme de ces particules, d'induire une forte inflammation (Hamilton *et al.*, 2009). Il est également probable que ce dioxyde de titane ainsi qu'une surproduction de ROS conduise à la rupture du compartiment lysosomal (Arnoult *et al.*, 2005) ce qui libérerait dans le cytosol un grand nombre de composés à même d'augmenter le stress et de déclencher l'autophagie (Eidi *et al.*, 2012). Finalement, notre incapacité à détecter une inhibition de l'autophagie par un traitement à base de HCQ pourrait être le reflet d'une condition inhérente à la souche de souris C57bl/6j de surpasser l'action du traitement sur le long terme.

Dans les études publiées, l'action de la HCQ est généralement observée rapidement après injection mais il semble que les doses et le calendrier d'injection que nous avons utilisé ne soient pas en mesure de perturber l'autophagie sur le long terme. Pour rappel, les doses choisies dans notre étude sont conformes à la gamme de doses utilisées en expérimentation animale dans la littérature, allant de 10 à 80 mg/kg et elles concordent avec le traitement appliqué à l'espèce humaine, bien que le calendrier d'injection ne soit pas le même. En effet, dans les études à court terme effectuées chez le rongeur le traitement pharmacologique est généralement injecté de manière quotidienne (Ndolo, Forrest & Krise, 2010; Grumati *et al.*, 2010; Vodicka *et al.*, 2014; Zheng *et al.*, 2017; Feng *et al.*, 2017; Wolfram *et al.*, 2017; Mauthe *et al.*, 2018; Yi *et al.*, 2018). Pour des raisons éthiques, ce type de calendrier d'injection n'est pas approprié aux études de longue durée et nous avons donc basé notre fréquence d'injection sur le calendrier prophylactique humain contre la malaria, qui recommande une administration hebdomadaire de l'agent pharmacologique (Lim *et al.*, 2009). Il apparaît toutefois qu'aux doses conventionnelles utilisées, la dynamique rapide de la HCQ ne permette pas la réduction de la fréquence d'injection sans nuire à l'efficacité du traitement. Cependant, l'augmentation des doses à administrer pour compenser l'espacement des administrations pourrait induire une certaine toxicité bien que la HCQ soit moins toxique que la CQ (McChesney, 1983; Wolf, Wolf & Ruocco, 2000). En effet, des signes de toxicité musculaire ont été rapportés après deux mois d'injections IP de 10 mg/kg de CQ cinq fois par semaine (Jiang *et al.*, 2014) ou après deux mois d'injection SC quotidienne de 15 mg/kg de CQ (Nalbandian *et al.*, 2015). La HCQ administrée à trop forte concentration ou avec une fréquence trop importante conduit à la possible apparition de rétinopathies, cardiomyopathies, neuromyopathies ou myopathies (Al-Bari, 2015; Rabin & Ramirez, 2019). Le compromis entre une fréquence d'injection éthiquement acceptable et une absence de toxicité induite par le composé n'a finalement pas été atteint. Toutefois, il est possible que la toxicité potentielle de la HCQ soit suffisamment faible comparée à celle de la CQ pour permettre une augmentation de la posologie sans causer de troubles aux animaux (McChesney, 1983; An *et al.*, 2017).

La HCQ est généralement administrée par voie orale. Cependant ce mode d'administration n'a pas été retenu en raison des manipulations plus lourdes pour l'animal et de l'impossibilité physique de réaliser ce geste technique chez les animaux très jeunes. Nous avons donc sélectionné les injections IP qui bien que couramment utilisées en recherche (Grumati *et al.*,

2010; Haspel *et al.*, 2011; Vodicka *et al.*, 2014), pourraient sur le long terme être une source de stress chez les animaux, conduisant à des comportements agressifs et des modulations de la réponse immunitaire pouvant perturber les données obtenues. Ce type d'injection offre en revanche plusieurs avantages tels que i) une connaissance précise de la dose administrée, ce qui évite par conséquent les approximations inévitables en travaillant avec un volume de prise volontaire de composé dissout ; ii) une administration rapide et adaptée au traitement d'un grand nombre d'animaux et iii) une limitation des manipulations plus contraignantes des animaux par comparaison avec un gavage oral répété (Walker *et al.*, 2012).

Par ailleurs, l'organisme exposé à la HCQ pourrait s'habituer à sa présence. En effet, la HCQ est une drogue lysosomotrope passive car la pompe à protons des lysosomes reste fonctionnelle et pourrait compenser l'augmentation de pH. Les ions H^+ piégés dans la vacuole acide du lysosome par l'action des pompes à protons consommatrices d'ATP, attirent la HCQ via le gradient de pH généré. La HCQ s'accumule donc dans les lysosomes et en accroit le pH en piégeant les ions H^+ présent (Taveira-DaSilva & Moss, 2012). Puisque le pH doit être maintenu aux environs de 5 pour assurer l'activité optimale des hydrolases (Saftig & Klumperman, 2009), les pompes à protons membranaires doivent essayer de compenser l'élévation de pH causée par la présence de la HCQ en augmentant le flux de protons jusqu'à saturer la HCQ et restaurer un pH optimal. Ce mécanisme pourrait alors rapidement engendrer une boucle de régulation proactive conduisant à une saturation de la HCQ et une habitude à la présence du composé par renforcement du fonctionnement des pompes à protons.

IV.4. Effet de l'injection d'hydroxychloroquine sur le développement moteur et sensoriel (cohorte juvénile) et sur le comportement individuel à l'âge adulte (cohorte adulte & juvénile)

Les tests neuro-développementaux et comportementaux mis en place (Fox, 1965; 1966; Altman & Sudarshan, 1975; Elnar *et al.*, 2012; Crépeaux *et al.*, 2014) pour évaluer le niveau d'activité, l'anxiété, la coordination locomotrice et la force musculaire n'ont pas révélés de dysfonctionnement cérébral précoce ou tardif. Le neuro-développement des souris juvéniles a été relativement similaire chez les contrôles et chez les animaux traités. Ces animaux devenus adultes, tout comme ceux traités directement à l'âge adulte, expriment une motricité et un comportement normal sans distinction des animaux d'un groupe par rapport aux autres. Les seules différences observables sont genre-dépendantes avec des femelles généralement plus anxieuses et plus actives que les mâles, comme cela est décrit dans la littérature (Crépeaux, 2012; Carreira, Cossio & Britton, 2017).

A notre connaissance, peu d'études ont été réalisées à long terme avec la HCQ et de manière encore plus restreinte avec des animaux traités en période périnatale. De plus, la HCQ est généralement étudiée comme traitement dans le cadre d'une pathologie particulière avec un modèle animal spécifique pouvant s'éloigner des souches habituellement utilisées comme animaux contrôles. Qui plus est, rares sont les études incluant des tests comportementaux comme indicateurs d'une éventuelle toxicité du traitement. Cependant, cette composante nous semblait essentielle à prendre en compte pour les raisons développées ci-dessous.

L'autophagie est un mécanisme primordial de la survie des souriceaux dans les premières heures de vie. En effet, il semble que l'autophagie, très peu exprimée avant la naissance, se mette en place dans les heures qui suivent la rupture de l'apport en nutriments via le cordon ombilical afin de répondre à la demande immédiate en énergie. Le flux autophagique se réduit ensuite, une fois l'apport de nutriments assuré par le lait maternel (Kuma *et al.*, 2004). Toutefois, l'importance de l'autophagie ne se limite pas aux premières heures de vie des nouveau-nés. En effet, en tant qu'espèces « non précoces », le développement sensori-moteur de la souris, comme celui de l'Homme, est principalement post-natal (McCain, Mustard & Shanker, 2007). Durant cette phase, un processus dynamique de formation/élimination synaptique se met en place (Purves & Lichtman, 1980; Rakic *et al.*, 1986). La synaptogenèse, dominante durant la petite enfance, se restreint durant l'enfance avant qu'une vague d'élimination synaptique (élagage synaptique ou *synaptic pruning*) ne vienne réduire la densité en synapses et ne permette la sélection et la maturation des circuits neuronaux (Penzes *et al.*, 2011). Or il semble que l'autophagie soit un mécanisme clé mis en jeu dans le mécanisme d'élimination des synapses surnuméraires. En effet, l'étude de souris mutantes présentant une hyper activation de mTOR et une réduction de l'autophagie montre un défaut d'élimination synaptique au niveau de la moelle épinière associé à des troubles comportementaux de type autistiques (Tang *et al.*, 2014). Cette observation a été attestée par l'utilisation de souris KO pour le gène *Atg7* dans la lignée cellulaire myéloïde qui ont présenté un phénotype autistique constitué de comportements sociaux limités et de stéréotypies (Kim *et al.*, 2017). Ces données démontrent l'importance de l'autophagie, notamment au niveau des

cellules microgliales, dans la maturation du système nerveux central et la mise en place des comportements adultes.

Les données obtenues lors de l'analyse du développement moteur et sensoriel associées aux données relatives à l'évaluation du flux autophagique démontrent l'absence d'effet néfaste du traitement dû au manque de perturbation de l'autophagie au niveau cérébral chez les animaux traités dès les premiers jours de vie. En effet aucune accumulation caractéristique des protéines de l'autophagie n'a été relevée et aucune perturbation dans le développement moteur et sensoriel n'a été détectée. Une étude plus approfondie des effets d'une lacune en autophagie au niveau cérébral au stade juvénile pourrait être menée en incluant une étude des comportements sociaux à l'âge adulte afin de rechercher la présence de signes comportementaux caractéristiques d'un phénotype autistique suite au traitement post-natal à base de HCQ.

Chez les adultes comme les jeunes, l'absence d'influence du traitement sur la force musculaire, l'endurance et l'activité locomotrice était une condition *sine qua non* du modèle animal souhaité. En effet, les études expérimentales et cliniques portant sur l'utilisation de dérivés de la quinine tels que la CQ et la HCQ, démontrent une certaine toxicité musculaire de ces composés. Ainsi, la HCQ est connue chez l'Homme pour induire des myopathies caractérisées par la présence de vacuoles dans des fibres musculaires atrophiées, nécrotiques ou en régénération (Kushlaf, 2011). Des signes occasionnels de toxicité de la HCQ peuvent également être observés dans les nerfs (Abdel-Hamid, Oddis & Lacomis, 2008) et bien que ces effets toxiques soient moins importants que ceux de la CQ, ce composé est tout de même capable de provoquer des cardiomyopathies même après un traitement court, des rétinopathies et quelques rares cas de neurotoxicité après un traitement prolongé (Doyno, Sobieraj & Baker, 2021). Chez la souris, l'injection IP de 10 mg/kg de CQ cinq fois par semaine ou SC quotidienne de 15 mg/kg de CQ durant 8 semaines est en mesure de provoquer l'apparition de vacuoles dans les fibres musculaires, un endommagement de ces dernières et une désorganisation musculaire se traduisant par une réduction de l'endurance musculaire constatée au test *accelerating rotarod* (Jiang *et al.*, 2014; Nalbandian *et al.*, 2015). Notre traitement étant composé d'injection IP plus espacées dans le temps et avec une molécule moins toxique pour une dose hebdomadaire identique, il semblait moins probable de voir apparaître les lésions musculaires évoquées ci-dessus. Cependant, les troubles musculaires étant une composante majeure du EM/SFC observés en présence de MFM, le contrôle de l'absence d'altération de la force, de l'endurance et de l'activité locomotrice a permis d'assurer que le traitement pharmacologique visant à induire un défaut autophagique chez les animaux n'était pas à l'origine de troubles fonctionnels pouvant être confondus avec la MFM lors d'une future expérimentation où la MFM aurait été induite par injection IM de particules aluminiques.

IV.5. Conclusion

En dépit du soin apporté à sa mise en place, le traitement pharmacologique conçu pour perturber l'autophagie à long terme développé dans cette expérimentation n'a pas apporté les résultats attendus. Bien que sans effet néfaste notable, le traitement utilisé n'a pas été en mesure de perturber l'autophagie sur le long terme, prérequis nécessaire à son utilisation dans la suite des expérimentations prévues.

Malgré quelques inconvénients, les modèles de rongeurs génétiquement modifiés pourraient donc rester les plus appropriés pour simuler un défaut d'autophagie sur le long terme. Les recombinaisons homologues et la méthode Crispr permettent aujourd'hui de produire des animaux viables avec des délétions ciblées de gènes de l'autophagie comme *Atg7* ou *Atg5* dans les cellules de la lignée myéloïde (Hara *et al.*, 2006; Kim *et al.*, 2017). D'autres modèles de délétion génétique sur les gènes *Map1lc3* (McWilliams *et al.*, 2016), *Ulk1* (Kundu *et al.*, 2008) et *Irgm1* (He *et al.*, 2012) existent et ne semblent pas présenter de troubles phénotypiques incompatibles avec les expérimentations envisagées (Kuma, Komatsu & Mizushima, 2017). Les futures expérimentations *in vivo* mettant en jeu un défaut autophagique sur le long terme devraient préférentiellement se faire via la sélection du modèle génétique le plus approprié tant au niveau du gène que du tissu cible, plutôt qu'un traitement pharmacologique à base de HCQ, sauf à considérer une révision du protocole pharmacologique avec des doses ou des fréquences d'injections supérieures en maintenant une faible toxicité du composé. Forts de cette constatation, notre étude de suivi *in vivo* des particules aluminiques après injection IM chez la souris présentant une déficience en autophagie a été réalisée avec un modèle de KO du gène *Atg5* invalidé dans les cellules de la lignée myéloïde.

V. Impact d'une déficience dans le processus autophagique sur la translocation des particules aluminiques injectées par voie intramusculaire.

V.1. Méthode de suivi des particules

Le suivi des particules d'Al a été réalisé chez des souris présentant un KO génétique sur un gène majeur de l'autophagie ainsi que chez des contrôles de portée. Les particules d'Al ont été tracées par deux méthodes complémentaires, le marquage *in situ* des particules par Morin ciblant l'Al et le marquage direct des particules injectées par adjonction de fND traceurs.

Parmi les différentes études menées sur le devenir des particules aluminiques d'origine vaccinale, différentes méthodes ont été utilisées pour suivre ces particules. Ces méthodes ont toujours eu pour but de garantir le suivi des particules provenant du traitement utilisé sans risquer de les confondre avec d'inévitables contaminations extérieures en Al principalement via l'eau de boisson ou l'alimentation. La méthode théorique optimale repose sur l'utilisation d'un composé identifiable par lui-même et ayant les mêmes propriétés physico-chimiques que l'adjuvant commercial. L'utilisation du complexe Alu-Dia, qui présente des caractéristiques très similaires à l'AH et une fluorescence caractéristique dans le rouge lointain, semble donc répondre à tous les critères pour en faire le traceur idéal des particules d'AH. Cependant, bien que l'apparente stabilité des complexes Alu-Dia ait fait l'objet d'une précédente publication (Eidi *et al.*, 2015), nous avons souhaité dans cette étude poursuivre l'utilisation d'un double marquage Morin et fND afin de garantir la présence d'Al au côté des fND dans l'éventualité où ces derniers puissent se désolidariser des particules d'AH. Ce contrôle avait pour but de garantir l'origine des particules d'Al observées et d'analyser uniquement la translocation des particules d'Alu-Dia intactes via le transfert d'énergie entre le Morin marquant l'Al et les fND.

Cependant, malgré la simplicité théorique de la méthode FRET décrite dans le chapitre II.2.3.3. de la section méthodologie et utilisée dans cette expérimentation, nous avons observé plusieurs imperfections à cette technique dans nos conditions expérimentales. En effet, il semble que certains gros fND puissent être excités par des longueurs d'onde comprises entre 391 et 437 nm donnant lieu à une émission de fluorescence de faible intensité à des longueurs d'ondes supérieures à 647 nm. Cette fluorescence non désirée, due aux centres NNV des fND, doit être prise en compte lors de la prise de vue afin d'ajuster la durée d'exposition pour réduire au maximum ce signal. La seconde imperfection provient de la forte auto-fluorescence des tissus considérés, capable dans une certaine mesure, d'exciter les fND même de petite taille. Cette auto-fluorescence peut être partiellement masquée par l'utilisation d'une coloration au noir du Soudan telle qu'appliquée dans notre protocole (cf II.2.3.3. section méthodologie). Néanmoins, ces deux limitations méthodologiques imposent une grande rigueur lors de la prise de vue afin d'avoir une durée d'exposition optimale pour la détection du signal FRET tout en réduisant au maximum le signal non spécifique de plus faible intensité. De plus, une adaptation de l'analyse des résultats est nécessaire en combinant les signaux FRET et Morin afin de maximiser la pertinence du signal analysé en prenant en

compte l'auto-fluorescence résiduelle des tissus. Bien que non optimale, si l'on considère une possible dissociation des fND de l'Al lors de la prise en charge par les cellules immunitaires, cette méthode de suivi des particules d'Al par double marquage fluorescent via un traceur natif lié aux particules et couplé à une coloration *in situ* sur coupes histologiques reste la plus précise à notre disposition.

V.2. Translocation des particules aluminiques...

Dans l'évaluation de l'impact du processus autophagique sur la translocation des particules aluminiques depuis le site d'injection IM vers des organes distants, nous avons injecté de façon ponctuelle des souris *Atg5* CKO avec 200 µg/kg d'Alu-Dia conçu spécifiquement pour suivre les particules injectées dans l'organisme. La translocation des particules a été observée dans les ganglions poplités et inguinaux, dans la rate et de façon anecdotique dans le cerveau, sans qu'une différence significative ne soit détectée entre les animaux *Atg5* CKO et les contrôles.

Notre étude de la translocation des particules aluminiques chez les souris *Atg5* CKO apporte une preuve supplémentaire de la translocation de l'Al du site d'injection vers des organes distants tels que les ganglions lymphatiques de drainage, la rate ou le cerveau. Ces observations confirment celles faites en 2015 sur la souche de souris C57BL/6, en utilisant toutefois une dose de composé deux fois plus faible que celle utilisée précédemment (Eidi *et al.*, 2015).

Notre étude semble démontrer une translocation cérébrale similaire à celle publiée en 2015 puisque nous avons observé la translocation vers le cerveau d'une particule d'Alu-Dia chez un individu contrôle. Nous souhaitons toutefois préciser que contrairement à l'étude publiée en 2015, nos animaux n'ont pas été perfusés en PBS lors du prélèvement des organes. L'observation du spectre d'émission caractéristique des fND sur une coupe de cerveau atteste donc *a minima* de la translocation d'une particule d'Alu-Dia dans les capillaires cérébraux mais ne permet pas de conclure au franchissement de la BHE par cette particule. Néanmoins, étant donnée son action immunostimulante, la dissémination de l'Al particulaire n'est pas souhaitable et pourrait conduire à une inflammation périphérique beaucoup plus étendue qu'espérée qui, chez le jeune rat, est capable d'altérer les mécanismes cérébraux immunitaires et inflammatoires (Bruce *et al.*, 2019). Notre étude démontre que la translocation cérébrale des particules d'Al est possible après injection IM du composé à une dose deux fois plus faible que les dernières données publiées.

V.2.1. ... impact de la génétique...

Les contraintes d'effectif réduit dans notre étude ne nous ont malheureusement pas permis de mettre en avant une différence significative de translocation entre groupe *Atg5* CKO et groupe contrôle. Cependant, l'observation d'une translocation rapide des particules injectées vers des organes distants en trois semaines confirme les précédentes observations faites sur des souris

C57BL/6 et atteste de l'importance du fond génétique sur le mécanisme de bio-distribution des particules aluminiques. En effet, l'étude de la translocation des adjuvants Al par la méthode de suivi de l'Alu-Dia a été réalisée chez plusieurs souches de souris. Si une translocation systémique rapide, y compris au niveau cérébral, a pu être mise en avant chez les souris C57BL/6 (Eidi *et al.*, 2015), une translocation bien plus lente a été rapportée chez la souche CD1, sans translocation vers le cerveau même sur des durées d'observation plus importantes de plusieurs mois (Crépeaux *et al.*, 2015). La différence de réponse souche-dépendante peut également être mise en relation avec l'hétérogénéité de taille de granulome observée entre les souches de rats Lewis et Spargue-Dawley après injection IM de vaccin contenant un adjuvant Al (Authier *et al.*, 2006).

La translocation des particules injectées par voie IM chez la souris C57BL/6 pourrait en partie s'expliquer par l'importance de la réponse inflammatoire produite suite à l'exposition aux particules d'Al. La souche C57BL/6 est en effet connue pour présenter un statut pro inflammatoire de type Th1 en réponse à un challenge immunitaire (Whitehead *et al.*, 2003; Mills & Ley, 2014). De même, il est intéressant de constater que, comme les patients MFM dont il est un bio marqueur avéré (Cadusseau *et al.*, 2014), les souris C57BL/6 produisent un taux de MCP1/CCL2 plus important que les autres souches de souris (Mills & Ley, 2014). Cette chimiokine inflammatoire attractive des monocytes est par ailleurs connue pour jouer un rôle tant au niveau de la bio-distribution systémique que de la translocation cérébrale des particules d'Al phagocytées par les cellules monocytaires (Khan *et al.*, 2013), l'augmentation du nombre de cellules immunitaires chargées de particules d'Al augmentant la probabilité de translocation. Chez l'Homme, la MFM est majoritairement observée à un âge où la production de MCP1/CCL2 augmente et où la sénescence immunitaire apparaît (Mansfield *et al.*, 2012).

Dans notre étude, il est possible que le défaut d'autophagie chez les animaux *ATG5* CKO joue un rôle protecteur contre la translocation des particules sur une courte durée en comparaison avec les animaux contrôles. En effet, un défaut autophagique pourrait conduire à une inflammation intense des cellules immunitaires au contact des particules d'Alu-Dia par manque de dégradation de l'inflammasome NLRP3 conduisant à la pyroptose de ces cellules (Martinon, Mayor & Tschopp, 2009; Mehto *et al.*, 2019). Les particules d'Al libérées dans l'espace extracellulaire seraient ensuite phagocytées par d'autres cellules immunitaires pour un nouveau cycle. La translocation des particules pourrait alors être retardée par la mort prématurée et séquentielle des cellules phagocytaires. Une translocation plus tardive des particules d'Alu-Dia pourrait donc exister chez les animaux *ATG5* CKO bien que notre protocole sur 21 jours ne soit pas capable de la mettre en avant. Des études plus approfondies sur la balance Th1/Th2 et l'autophagie seront nécessaires afin de comprendre l'importance de l'inflammation et de sa régulation sur la translocation des particules d'Al. De même des analyses génétiques des patients MFM pourraient être envisagées afin de rechercher des facteurs de susceptibilité dans la réponse immunitaire et inflammatoire ou dans les capacités d'élimination des composés xénobiotiques.

V.2.2. ... et importance de la taille des composés

Comme mentionné dans le paragraphe précédent, il est possible que la durée entre l'injection des composés et l'observation de la translocation cérébrale ait été trop courte dans notre protocole. Bien qu'une translocation cérébrale ait été relevée chez des souris de souche C57BL/6 sur un timing similaire (Eidi *et al.*, 2015), la souche CD1 présente quant à elle une translocation retardée et possiblement biphasique, avec une translocation dans la rate observée après 270 jours (Crépeaux *et al.*, 2015). Cette translocation lente au niveau de la rate laisse supposer que la translocation cérébrale, si elle existe, serait encore d'avantage retardée. De plus, des signes de neurotoxicité via la présence de troubles comportementaux au niveau de l'activité locomotrice et de l'anxiété ont été mis en avant 180 jours après injection de 200 µg/kg chez des souris CD1 (Crépeaux *et al.*, 2017). Prises dans leur ensemble et puisque la concentration en Al semble conditionner la distribution en taille des agglomérats particulaires présents dans la solution (Crépeaux *et al.*, 2017), ces données pourraient indiquer que la neurotoxicité observée suite à une injection IM d'AH n'est pas conditionnée par une différence de translocation cérébrale des particules mais par une différence de délais de translocation associée à une neurotoxicité plus importante des particules de petite taille. Il est en effet possible que toutes les tailles de particule d'Al soient en mesure d'atteindre le cerveau mais avec une latence de translocation et un potentiel de toxicité relatif à leur taille. L'hypothèse sous-jacente étant qu'une translocation lente des particules jusqu'au cerveau serait conditionnée par une déficience en autophagie préexistante et/ou induite par les particules elles même. L'extrapolation des connaissances existantes pour le dioxyde de titane nous laisse supposer que les particules de grande taille pourraient représenter un challenge phagocytaire pour les macrophages et conduire à la production d'une réponse inflammatoire plus importante (Hamilton *et al.*, 2009). Cette inflammation pourrait alors attirer plus de cellules immunitaires et amplifier le mécanisme de translocation des particules. En effet, les grosses particules de dioxyde de titane ont également comme conséquence de perturber l'organisation lysosomale et de conduire à l'apoptose (Hamilton *et al.*, 2009). Les grosses particules relargées et recapturées pourraient donc migrer de façon séquentielle jusqu'au cerveau, accompagnées de particules plus petites initialement présentes dans la solution ou produites par attaque des particules de plus grande taille. Ces petites particules seraient alors en mesure de franchir la BHE par perturbation des jonctions serrées (Chen *et al.*, 2008), passage par le réseau lymphatique cérébral (Louveau *et al.*, 2015), échange entre cellules au niveau des méninges, de l'espace péri-vasculaire ou des plexus choroïdes (Marques & Sousa, 2015; Kierdorf *et al.*, 2019) ou franchissement directe de la BHE par un mécanisme non identifié. Il est cependant difficile de conclure quant au rôle des particules de grande taille dans le mécanisme de translocation. En effet, les particules plus imposantes pourraient améliorer l'initiation de la translocation par la production d'une inflammation à l'origine d'un plus grand recrutement de cellules immunitaires. Cependant, ces mêmes larges particules, en particulier celles de forme spiculaire, pourraient également freiner la translocation par apoptose des cellules phagocytaires (Hamilton *et al.*, 2009), imposant un nouveau cycle de capture/translocation. L'action de la présence conjointe de particules métalliques de différentes gammes de taille et potentiellement de différentes formes est donc complexe à appréhender dans l'état des connaissances actuelles.

CONCLUSION ET PERSPECTIVES

Quaerendo invenietis (Cherche et tu trouveras)
Formule latine

I. Conclusion générale

L'une des plus grandes avancées de la médecine moderne, la vaccination, doit beaucoup à l'utilisation des adjuvants aluminiques. Utilisés durant des décennies, sans réelles connaissances sur leur mode de fonctionnement dans l'organisme, il n'en demeure pas moins que ces composés remplissent parfaitement leur rôle de déclencheur de la réponse immunitaire.

L'amélioration des connaissances sur l'action des adjuvants et la découverte de leur longue biopersistance chez certaines personnes interroge cependant sur le niveau de sécurité de ces composés. En effet, alors que la fièvre innovatrice n'a épargné aucun domaine depuis la découverte des propriétés adjuvantes des sels d'aluminium, il est étonnant de constater que les adjuvants aluminiques ont traversé le temps sans aucune tentative de perfectionnement. De plus, alors que la sécurité est une préoccupation grandissante, quel que soit le domaine envisagé, il semble que cette composante n'ait pas été prise en compte pour l'utilisation des adjuvants aluminiques dont les quantités réglementaires reposent avant tout sur un souci d'efficacité sans évaluation des risques.

Les recherches scientifiques s'accroissent, faisant lentement prendre conscience des faiblesses entourant l'utilisation de particules d'aluminium comme adjuvant :

- Les tentatives d'évaluation de la toxicité menées par le passé et sur lesquelles s'appuient les réglementations actuelles reposent sur des composés de formes différentes et administrés par des voies non représentatives.
- Alors que l'on pensait les adjuvants inertes et rapidement éliminés via dissolution, les observations *in vivo* démontrent la biopersistance des particules, capturées par les cellules immunitaires, et leur dissémination dans l'organisme.
- Les particules utilisées ne répondent pas au principe de Paracelse, « toutes les choses sont poison, et rien n'est sans poison ; seule la dose détermine ce qui n'est pas un poison », la toxicité particulière étant avant tout basée sur la forme et la taille des composés plutôt que sur leur dose.

La persistance longue des composés adjuvants Al observée dans les cas d'EM/SFC post-vaccination, illustre parfaitement les potentiels effets d'une longue rétention des particules aluminiques dans l'organisme. Les patients atteints de ce syndrome font partie d'une part de la population chez qui les particules d'adjuvant à base d'Al persistent sur une longue période au niveau du site d'injection, formant une lésion histologique caractéristique. Cette lésion, immunologiquement active, est associée à un ensemble de symptômes communs à l'EM/SFC et regroupant des céphalées, des douleurs arthro-musculaires, des troubles mnésiques et attentionnels ainsi qu'un état d'épuisement chronique. La grande variété des symptômes, la difficulté d'obtention d'un diagnostic et l'absence de reconnaissance de leur condition conduisent ces patients vers un état de souffrance physique et psychique extrêmement

handicapant. Pour ces patients, comme pour toutes les personnes susceptibles de présenter une rétention des particules d'Al sur le long terme, les études scientifiques sont primordiales pour la compréhension des effets des particules aluminiques d'origine vaccinale sur l'organisme.

Dans ce contexte, le travail de thèse présenté dans ce manuscrit avait pour objectif d'évaluer les réponses autophagiques et inflammatoires de cellules immunitaires non pathologiques en présence de particules aluminiques afin de les comparer aux réponses de cellules immunitaires de patients atteints de MFM chez qui la biopersistance anormale des particules d'aluminium pourrait provenir d'une déficience dans le mécanisme autophagique. Le projet avait ensuite pour but de tester, sur un modèle animal, une approche pharmacologique afin de recréer une déficience autophagique se voulant représentative de la situation pathologique humaine. Enfin, le projet incluait également l'évaluation, par une approche génétique sur un modèle animal, de l'impact de la déficience autophagique sur la translocation des particules aluminiques.

De façon générale, les données obtenues ont permis de mettre en avant un aspect méconnu de la prise en charge des particules aluminiques par les cellules immunitaires non pathologiques. Une forme particulière de phagocytose, non suspectée jusqu'à présent, semble en effet être impliquée dans l'internalisation des particules aluminiques de manière prépondérante par rapport à l'autophagie canonique. Ce mécanisme de phagocytose associée à LC3 partage cependant une grande partie de la machinerie cellulaire avec l'autophagie, rendant compliqué les conclusions sur la présence d'un éventuel trouble autophagique.

Concernant l'hypothèse de l'implication d'une altération de l'autophagie dans l'étiologie de la MFM, les données obtenues lors de ce travail, associées aux connaissances bibliographiques actuelles, invitent à envisager que cette perturbation pourrait exister comme étant la conséquence de la forte présence de Rubicon chez les patients MFM. En effet, une importante quantité de Rubicon, protéine majeure du mécanisme d'internalisation des particules aluminiques, a été retrouvée chez les patients atteints de MFM. Cette protéine particulière, pouvant produire un effet inhibiteur sur le mécanisme autophagique, pourrait alors expliquer les nombreux symptômes observés chez les patients tels que la rétention longue des particules aluminiques au niveau musculaire, les défauts de réponse inflammatoire sur le long terme, les atteintes cognitives ainsi que l'hypométabolisme généralisé via l'implication de plusieurs mécanismes cellulaires interconnectés que sont l'autophagie, l'inflammation et le métabolisme mitochondrial.

Les essais de traitement pharmacologique chez le modèle animal n'ont pas permis de mettre en place la perturbation autophagique espérée. L'absence d'effets néfastes sur le développement moteur et sensoriel des jeunes animaux ou les capacités d'endurance et de locomotion chez les adultes, attestée par les nombreux tests neuro-développementaux et comportementaux, laissent ouverte la possibilité d'une adaptation du traitement avec des concentrations plus importantes en agent pharmacologique. La solution la plus appropriée semble, néanmoins, être la sélection d'un modèle animal avec un KO génétique sur un gène impliqué dans les mécanismes de lutte contre les composés xénobiotiques ou l'inflammation à

condition de choisir avec précaution un modèle dont le phénotype ne présente pas de similitudes avec les symptômes de la MFM, avant même l'exposition à un challenge environnemental pro-inflammatoire.

Dans cette optique, l'impact de l'autophagie sur la translocation des particules aluminiques depuis le site de vaccination vers des organes distants a été étudié avec un modèle animal présentant un KO génétique sur le gène *Atg5* dans les cellules de la lignée myéloïde. Les résultats prouvent la translocation des particules vers des organes distants sans pour autant que l'expérience ne permette de conclure quant à l'impact de la déficience autophagique sur cette translocation.

Prises dans leur ensemble, les données produites lors de ce travail de thèse ont permis d'apporter des informations sur le mode de prise en charge des particules aluminiques par les cellules de l'immunité. Elles ont également souligné l'importance des interconnexions entre différents mécanismes cellulaires tels que l'autophagie, l'inflammation et le métabolisme mitochondrial dans la réponse des cellules immunitaires aux particules d'Al d'origine vaccinale et la complexité de ces liens. Enfin, elles ont permis d'améliorer la compréhension du syndrome de myofasciite à macrophage en proposant une nouvelle approche étiologique permettant de relier la lésion musculaire aux symptômes observés.

II. Perspectives

II.1. Un défaut de lutte contre le stress oxydant chez les patients MFM ?

Les nouvelles données obtenues sur les cellules isolées d'individus contrôles ou de patients MFM nous encouragent à modifier notre façon d'appréhender l'EM/SFC et la MFM. En effet, il semble aujourd'hui évident que l'autophagie ne peut pas être considérée comme le seul processus dont la déficience induirait les symptômes observés chez les patients.

Dans ce chapitre, nous allons aborder l'hypothèse d'une déficience dans les mécanismes de **lutte contre le stress oxydant** comme facteur d'étiologie de la MFM en faisant le lien avec l'ensemble des réactions impliquées dans le modèle de prise en charge des particules aluminiques proposé dans le chapitre III.5. de la section discussion générale et résumé en **Figure 55 p. 282**. Cette nouvelle approche de la MFM prend en compte de nombreuses observations déjà bien décrites et documentées sur des cohortes importantes de patients EM/SFC et fait le lien avec l'ensemble des symptômes présents chez ces patients.

Le **manque de lutte contre le stress oxydant** est une donnée connue de l'EM/SFC dont les patients présentent un défaut de présence d'antioxydants comme le **zinc** ou la **coenzyme Q10** (Maes *et al.*, 2012). Il semble cependant possible que cette déficience, innée ou acquise, soit le **point de départ** d'une chaîne de réactions aboutissant à la création d'un **cercle vicieux** expliquant les autres spécificités du syndrome, tel que décrit dans la suite de ce chapitre. La quantification d'un panel d'antioxydants circulants, tels que le zinc, la coenzyme Q10, la GSH, la superoxyde dismutase ou la catalase, au sein de la cohorte MFM pourrait être envisagée afin de faire le lien avec les observations décrites pour l'EM/SFC. Enfin, la prise en compte de l'ensemble des voies de lutte contre le stress oxydant devrait être un élément à considérer pour la recherche future d'une susceptibilité génétique à l'EM/SFC et à la MFM.

Un des premiers signes de faiblesse dans la lutte contre le stress antioxydant devrait être une **accumulation de composés pro-oxydants** dans les cellules de l'immunité. Une production accrue de ces composés a été documentée au niveau sérique chez des patients EM/SFC (Maes *et al.*, 2007; Maes, Mihaylova & Bosmans, 2007). Cette augmentation de la quantité de pro-oxydants est cohérente avec la présence réduite d'antioxydants chez ces patients. D'autant que la LAP, apparemment impliquée dans la prise en charge des particules d'AH est un mécanisme producteur de ROS (Martinez *et al.*, 2015). La combinaison d'un défaut dans le mécanisme de lutte contre les composés pro-oxydants avec la présence d'un composé activant un mécanisme nécessitant la production de ROS conduirait alors à l'accumulation de ces ROS au niveau cytoplasmique chez les patients MFM. L'observation *in vitro* de la production de ROS par des PBMC contrôles et MFM devrait être envisagée pour la suite de ce travail. Cette étude, couplée à la quantification de NOX2, permettrait à la fois la confirmation de l'implication de la LAP dans la prise en charge des particules d'AH et la possible observation du défaut antioxydant envisagé.

Par ailleurs, l'accumulation de composés pro-oxydants dans les cellules de patients pourrait avoir un impact sur l'activité mitochondriale. Cet aspect de l'EM/SFC est expliqué par **l'impact négatif** qu'aurait la combinaison de **cytokines pro-inflammatoires** comme TNF- α **et de composés pro-oxydants sur les capacités respiratoires des mitochondries** (Morris & Maes, 2014). Les patients EM/SFC présentent, en effet, des altérations métaboliques mitochondriales au niveau des PBMC ainsi que des défauts de couplage des mitochondries réduisant les capacités de ces dernières à fournir l'ATP adéquat à l'activité cellulaire, sans lien apparent avec la sévérité de la maladie (Tomas *et al.*, 2020; Fernandez-Guerra *et al.*, 2021). Une équipe étudiant des PBMC de patients EM/SFC et d'individus contrôles a ainsi mis en avant une diminution des capacités de phosphorylation oxydative chez les patients EM/SFC suggérant que les cellules immunitaires étudiées ne sont pas en mesure de faire face à la demande énergétique en condition de stress (Tomas *et al.*, 2017; 2018).

De plus, les **défauts mitochondriaux** observés pourraient être **accrus en présence de particules aluminiques**. En effet, des défauts de fusion des mitochondries pourraient être causés par une modulation de la balance fusion/fission des mitochondries en présence de particules d'Al, comme cela a été montré récemment chez des rats exposés au maltoate d'Al par voie intrapéritonéale à des doses comprises entre 0 et 1,62 mg/kg sur des durées allant de 30 à 90 jours, chez lesquels il a été observé une différence dans la régulation des protéines *dynamamin-related protein 1* (Drp1), *fission protein 1* (Fis1), *optic atrophy 1* (Opa1), *mitofusin 1* (Mfn1) et *mitofusin 2* (Mfn2) (Nie *et al.*, 2019). La Mfn2 semble tout particulièrement importante pour le bon déroulement de la réponse immunitaire étant donné son implication dans les mécanismes de phagocytose, de production de cytokines et d'autophagie (Tur *et al.*, 2020). L'importante présence de ROS et de cytokines, combinée à la présence de particules aluminiques, mènerait alors aux dysfonctions mitochondriales acquises décrites chez les patients EM/SFC (Tomas & Newton, 2018) et suspectées d'être la cause de la fatigue persistante et des myalgies présentées par les patients (Fulle *et al.*, 2007). L'analyse transcriptomique des protéines mitochondriales précédemment citées pourrait être envisagée chez les patients MFM afin de rechercher les effets de la présence prolongée des particules d'Al sur ces paramètres. De même, une caractérisation des capacités mitochondriales pourrait être réalisée lors de futures expérimentations.

Take home message : un défaut de lutte contre le stress oxydant chez les patients MFM pourrait être impliqué dans l'accumulation de composés pro-oxydants. L'action cumulée de ces pro-oxydants, des particules d'AH et des cytokines pro-inflammatoires produites en présence de ces particules serait alors en mesure de provoquer un stress mitochondrial menant à une perturbation des capacités respiratoires des mitochondries et à une réduction de la production d'ATP à l'origine des symptômes de myalgie et de fatigue chronique sur le long terme.

Suite à sa prise en charge par les cellules de l'immunité, l'AH produit une suite de réactions menant à la production d'une **réponse pro-inflammatoire**, ce qui est cohérent avec son rôle d'adjuvant. Notre étude démontre l'implication de TNF- α sur un temps court mais d'autres ont rapporté la présence de l'inflammasome NLRP3 (Hornung *et al.*, 2008) et de cytokines

associées, en présence d'adjuvant aluminique (Sokolovska, Hem & HogenEsch, 2007). La présence de cytokines pro-inflammatoires a, par ailleurs, été documentée au niveau sanguin chez les patients EM/SFC (Gupta *et al.*, 1997; Gupta, Aggarwal & Starr, 1999; Maes, Twisk & Johnson, 2012) bien que les résultats obtenus soient sujets à discussion du fait de l'absence d'homogénéité entre les différentes études (Mensah *et al.*, 2017).

Néanmoins, la présence d'une inflammation produite en réaction à la persistance de particules aluminiques pourrait être vue comme une **cause probable des manifestations cognitives** observées chez les patients MFM. En effet, il semble établi qu'une **inflammation, même périphérique**, soit en mesure de causer une **inflammation cérébrale** (Poon *et al.*, 2015). Plusieurs hypothèses existent pour expliquer cette **propagation de l'inflammation** vers le système nerveux central. Une communication lente par voie humorale a ainsi été décrite par le franchissement direct du plexus choroïde par des cytokines alors capables d'activer les cellules immunitaires locales en mesure de répandre l'inflammation (Dantzer, 2001; Dantzer *et al.*, 2008). Une autre action possible, plus rapide, passerait par l'activation des fibres nerveuses au niveau du site de production de la réponse inflammatoire. Un signal activateur de la réponse inflammatoire serait alors directement transmis au niveau du système nerveux central, ce qui augmenterait la sensibilité de ce dernier à la présence de cytokines arrivant par la voie humorale (Dantzer, 2009).

Chez la souris ; des études ont démontré que la présence d'une inflammation périphérique est en mesure de modifier la réponse inflammatoire des cellules microgliales résidentes du SNC (Chiot *et al.*, 2020) et de conduire à une reprogrammation épigénétique de ces cellules, encore visible six mois après l'inflammation initiale (Wendeln *et al.*, 2018). Une inflammation cérébrale, dont l'origine pourrait être soit la présence des particules d'AH directement soit l'inflammation périphérique persistante (soit les deux), a été observée chez un modèle murin, **associé à des troubles comportementaux** (Crépeaux *et al.*, 2017). Une **inflammation neuronale** a également été décrite chez les patients EM/SFC, **associée à la sévérité des troubles neurologiques** présentés (Nakatomi *et al.*, 2014). Cette neuro-inflammation, et les troubles neurologiques en découlant, pourraient par ailleurs engager une forme de **déficience mitochondriale**. Il semble en effet, que l'Al soit en mesure de perturber la dynamique mitochondriale au niveau cérébral chez le rat suite à une inflammation périphérique (Nie *et al.*, 2019) et qu'un défaut de Mnf2 accroisse la réponse neuro-inflammatoire suite à une inflammation périphérique (Harland *et al.*, 2020). Dans les deux cas, des altérations comportementales touchant l'activité locomotrice ou la mémoire ont été observées (Nie *et al.*, 2019; Harland *et al.*, 2020).

Take home message : la réponse inflammatoire périphérique produite en réponse à la présence de particules d'AH au site d'injection des vaccins pourrait être en mesure de se propager au niveau cérébral où elle pourrait, conjointement à l'action délétaire du défaut de lutte contre le stress oxydant sur les mitochondries, être à l'origine des troubles cognitifs observés chez les patients MFM.

De plus, en réponse aux cytokines produites par la présence prolongée des particules aluminiques, les cellules immunitaires doivent mettre en place un arsenal de mesures compensatoires afin de réduire l'inflammation. Un mécanisme possible dans cette lutte pourrait être la LAP (Heckmann *et al.*, 2017), possiblement activée par les cellules apoptotiques renfermant une grande quantité de particules d'AH. **L'activation de la LAP** nécessiterait alors la régulation de Rubicon afin de contrôler les différents mécanismes spécifiques à la LAP, précédemment décrits, et impliquant les complexes protéiques PI3K et NOX2. Ce faisant, la **présence de Rubicon** entrainerait une **diminution des capacités autophagiques** des cellules par son action régulatrice de PI3K faisant basculer le complexe de l'autophagie vers la LAP (Boyle & Randow, 2015).

La perturbation de la machinerie autophagique induite par cette présence de Rubicon pourrait alors entrainer un **défaut de régulation de l'inflammasome** par IRGM conduisant à une **sur-inflammation**. De même, les particules d'AH cytoplasmiques potentiellement libérées dans le cytoplasme ne seraient alors plus prises en charge, ce qui augmenterait leur action délétère sur les mitochondries. De plus, il semble que la présence de Rubicon soit également en mesure d'impacter la qualité des mitochondries (Liu *et al.*, 2019), déjà touchées par la présence de ROS et des particules d'AH. Cet impact de la dynamique mitochondrial pourrait être mis en relation avec le **défaut de mitophagie** que doit produire la présence de Rubicon dans les cellules. La mitophagie, très similaire au mécanisme autophagique, est centré sur le recyclage des mitochondries endommagées afin de maintenir l'état de santé du réseau mitochondrial (Rodger, McWilliams & Ganley, 2018). De plus, ce mécanisme implique également la protéine IRGM (Kaufman & Mora, 2021) qui se présente donc comme une protéine pivot entre autophagie, inflammation et métabolisme mitochondrial. Un défaut dans la machinerie autophagique semble en effet permettre l'accumulation de mitochondries déficientes (Xu, Shen & Ran, 2020). Cette accumulation pourrait ensuite conduire à l'accumulation de composés oxydants, de cytokines, voire conduire à la mort cellulaire par apoptose dont nous avons vu qu'elle pourrait être le déclencheur de la LAP pour les cellules.

Take home message : un défaut de lutte contre le stress oxydant chez les patients MFM pourrait in fine conduire à une tentative de régulation de la présence de particules d'AH et/ou de la réponse inflammatoire et peut-être apoptotique par une forte activation de la LAP. Ce faisant, la présence accrue de Rubicon serait alors en mesure de perturber le mécanisme autophagique, ce qui conduirait à l'accumulation intracytoplasmique de particules d'AH, de mitochondries défectueuses et limiterait les capacités de régulation de l'inflammation par IRGM.

L'hypothèse d'une déficience dans les mécanismes de lutte contre le stress oxydant développé ici mène donc à un cercle vicieux dans lequel la présence de particules d'Al conduit à la production de composés oxydants produisant une réponse inflammatoire menant à la production de plus de composés oxydants, dans une boucle autoentretenu. Sur le long terme, les cellules immunitaires des patients EM/SFC et MFM pourraient alors entrer dans un état de résilience hypométabolique, le Dauer, afin de lutter contre ce phénomène autoentretenu

d'inflammation chronique, expliquant les anomalies métaboliques retrouvées chez ces personnes (Naviaux *et al.*, 2016).

Initialement, l'état de Dauer a été identifié chez le nématode *C elegans* comme un état de survie faisant intervenir une chute du métabolisme et une réduction drastique de la production énergétique en réponse à un stress environnemental tel qu'une faible température ou une restriction respiratoire ou alimentaire (Lant & Storey, 2010). La persistance d'un stress inflammatoire au niveau cellulaire pourrait conduire à l'apparition de cet état pouvant être interprété comme une tentative de fuite dans l'attente de conditions plus favorables. Le Dauer se caractérise par une altération des fonctions mitochondriales et des changements physiques, comportementaux et alimentaires (Lant & Storey, 2010; Naviaux *et al.*, 2016). Les patients EM/SFC présentent ce métabolisme réduit avec des altérations mitochondriales en réponse à un stress environnemental. L'état de Dauer semble être un moyen de survie à un stress trop important, potentiellement capable d'augmenter la résistance face à un panel de troubles métaboliques (Mottillo *et al.*, 2010) mais au prix d'une qualité de vie fortement dégradée, de douleurs, de souffrances et d'une longue infirmité.

II.2. Etudes complémentaires

Bien entendu, les résultats présentés ici soulèvent de nombreuses interrogations et hypothèses à développer, ouvrant la voie à de nouvelles perspectives.

Concernant les études chez l'homme, de nombreuses analyses restent à mener afin de caractériser plus avant la prise en charge des particules aluminiques d'origine vaccinale par les cellules de l'immunité en condition non pathologique. Ainsi la recherche d'expression d'autres protéines caractéristiques de **la phagocytose associée à LC3** devrait être envisagée afin de confirmer pleinement l'implication de ce mécanisme.

De plus, une analyse **cinétique** des effets de la présence des particules aluminiques **sur des temps plus long** et/ou avec **d'autres concentrations** et un **nombre de participant plus important** permettrait une analyse plus fine des interactions entre les différents mécanismes identifiés.

Chez les patients atteints de myofasciite à macrophage, l'hypothèse principale issue de ce travail étant l'implication d'un **défaut antioxydant** comme facteur étiologique, l'étude des capacités antioxydants des cellules immunitaires devrait être envisagée.

De plus, en tant que cible potentielle de l'action des particules aluminiques et des composés pro-oxydants, les **capacités mitochondriales** des cellules immunitaires isolées de patients MFM pourraient faire l'objet d'analyses sur le plan métabolique comme sur le plan de **l'équilibre fusion/fission**. Ces analyses devraient sans doute se faire en ayant pour objectif d'étudier les similitudes et spécificités du statut métabolique des patients MFM par

comparaison avec **l'état hypométabolique de Dauer** décrit sur des cohortes de patients EM/SFC.

Enfin, il semble qu'une **étude génétique** large puisse être envisagée afin de rechercher des **facteurs de susceptibilité** chez les patients MFM, à la fois sur les **processus antioxydants** mais également sur le **mécanisme autophagique**, la **phagocytose** ou le **métabolisme mitochondrial**.

En parallèle des études humaines, des **recherches exploratoires chez l'animal** pourraient être faites afin d'étudier la plausibilité d'un **défaut antioxydant** comme facteur étiologique conduisant à des troubles proches des symptômes observés chez les patients MFM. Ainsi des animaux présentant des troubles dans les mécanismes de lutte contre les molécules oxydantes pourraient être exposés à des particules aluminiques par voie intramusculaire afin de rechercher notamment la présence d'une réponse inflammatoire exacerbée suivie de son effondrement, associé à la présence de Rubicon sur le long terme.

De même, en tant que protéine pivot entre l'autophagie, l'inflammation et le contrôle de la qualité du pool mitochondrial, **IRGM** pourrait être étudiée de façon plus approfondie. Une souche de souris présentant un KO génétique sur *IRGM* pourrait, par exemple, être utilisée afin de caractériser l'importance de cette protéine dans la réponse des cellules immunitaires à la présence de particules aluminiques. Un défaut en IRGM pouvant, en effet, être vu comme un bon modèle de défaut autophagique sur la régulation inflammatoire et mitochondriale.

Plus largement, des **études physico-chimiques** caractérisant précisément la **taille** et la **forme** des particules aluminiques en relation avec différents paramètres tels que le **pH**, la **concentration** en particules, la **composition du solvant** ou la **présence d'antigène** permettraient d'améliorer grandement la compréhension des interactions entre cellules et particules.

Cette première étape de caractérisation des particules aluminiques serait indispensable pour l'étude ultérieure du **passage de la barrière hémato-encéphalique** par ces particules en lien avec le statut inflammatoire, autophagique et métabolique des cellules immunitaires.

Dans l'ensemble de ce travail de thèse et dans les perspectives développées jusqu'ici, l'accent a été mis sur les particules **d'oxy-hydroxyde d'aluminium** car ce composé est le plus utilisé. Cependant, il ne faut pas oublier que ces particules ne sont pas les seules à être utilisées dans les préparations vaccinales. Dès lors, il serait également intéressant d'approfondir l'ensemble des idées développées ci-dessus, aussi bien au niveau des recherches *in vitro* que des études animales, pour les autres composés aluminiques utilisés comme adjuvants vaccinaux parfois utilisés couplés, **l'hydroxy-phosphate d'aluminium** et le **sulfate d'hydroxy-phosphate d'aluminium** (propriété exclusive du laboratoire Merck). Il serait intéressant de prendre en compte ces particules dont la différence de taille ou de forme pourrait mener à une réponse différente de la part des cellules immunitaires isolées ou *in vivo*.

De plus, la possible **combinaison des trois adjuvants et/ou de répétition des expositions** pourrait également être envisagée afin de se rapprocher des conditions réelles. En effet, les manifestations d'EM/SFC sont généralement retrouvées après des injections vaccinales multiples, stimulant le système immunitaire de façon répétée sans que cette composante n'ait réellement fait l'objet d'études approfondies (Gherardi, Crépeaux & Authier, 2019).

Les études envisagées pourraient alors dépasser le cadre de l'EM/SFC car des particules aluminiques (sans précision de leur origine) sont également observées au niveau cérébral dans des cas de maladie **d'Alzheimer, de sclérose en plaque et d'autisme** (Exley & Clarkson, 2020).

De même, un cadre encore plus large pourrait se dessiner dans la mesure où plusieurs composés aux propriétés adjuvantes pourraient produire, chez des personnes probablement prédisposées, des symptômes similaires à ceux de l'EM/SFC et regroupés sous le terme **ASIA** pour syndrome d'auto-immunité/auto inflammation induite par les adjuvants (Shoenfeld & Agmon-Levin, 2011). Parmi ces composés aux propriétés adjuvantes, peuvent être cités les particules aluminiques bien entendu, mais également la silicone utilisée en chirurgie esthétique ou les éléments infectieux naturels tels que les bactéries et virus. Parmi les bactéries, le cas des *Borreliae*, responsables de la **maladie de Lyme** et transmises par les piqûres de tiques, peut être cité. En effet, ces bactéries pourraient, dans certaines circonstances, se soustraire à l'action des mécanismes d'élimination cellulaire dont l'autophagie (Buffen *et al.*, 2016). La dérégulation engendrée par la présence prolongée de ce pathogène dans l'organisme est ainsi suspecté d'être à l'origine de troubles biochimiques dans le système nerveux central pouvant être à l'origine de nombreuses maladies, y compris l'EM/SFC (Bransfield, 2018).

Parmi les virus, le cas très actuel du SARS-CoV-2 peut être cité. Ainsi les observations et hypothèses décrites dans cette thèse pourraient également servir de support dans la compréhension de la pandémie actuelle, en particulier des **formes longues du Covid 19**, présentant des similitudes de symptômes avec l'ASIA notamment par la présence de fatigue chronique et d'un sommeil non réparateur (Mandal *et al.*, 2021).

BIBLIOGRAPHIE

- AARON, L.A. & BUCHWALD, D. A review of the evidence for overlap among unexplained clinical conditions. *Annals of Internal Medicine*. 2001. Vol. 134, n° 9 Pt 2, p. 868-881. DOI:10.7326/0003-4819-134-9_part_2-200105011-00011.
- ABDEL-HAMID, H., ODDIS, C.V. & LACOMIS, D. Severe hydroxychloroquine myopathy. *Muscle & Nerve*. 2008. Vol. 38, n° 3, p. 1206-1210. DOI:10.1002/mus.21091.
- ABU-TAWEEL, G.M., AJAREM, J.S. & AHMAD, M. Neurobehavioral toxic effects of perinatal oral exposure to aluminum on the developmental motor reflexes, learning, memory and brain neurotransmitters of mice offspring. *Pharmacology, Biochemistry, and Behavior*. 2012. Vol. 101, n° 1, p. 49-56. DOI:10.1016/j.pbb.2011.11.003.
- ACADÉMIE NATIONALE DE PHARMACIE. *Les adjuvants aluminiques : le point en 2016*. 2016. http://www.acadpharm.org/dos_public/Rapport_Adjuvants_aluminiques_VF_CORR_5.pdf.
- AFSSAPS. *Etude épidémiologique exploratoire de la myofasciite a macrophages*. 2003. https://ansm.sante.fr/var/ansm_site/storage/original/application/030593fa4e393af7cec8ff7092832215.pdf.
- AFSSAPS. *Évaluation du risque lié à l'utilisation de l'aluminium dans les produits cosmétiques*. 2011. http://ansm.sante.fr/var/ansm_site/storage/original/application/ad548a50ee74cc320c788ce8d11ba373.pdf.
- AGENCE NATIONALE DE SÉCURITÉ DU MÉDICAMENT ET DES PRODUITS DE SANTÉ (ANSM). *Les adjuvants dans les vaccins pandémiques H1N1*. . 2009. p. 2.
- AGENCY FOR TOXIC SUBSTANCES AND DISEASE REGISTRY. *Toxicological Profile for Aluminum*. Atlanta, GA. 1999. <https://www.atsdr.cdc.gov/toxprofiles/tp22.pdf>.
- AGENCY FOR TOXIC SUBSTANCES AND DISEASE REGISTRY. *Toxicological Profile for Aluminum*. Atlanta, GA. 2008. cdcinfo@cdc.gov.
- AGGARWAL, B.B. & PURI, R.K. *Human cytokines: their role in disease and therapy*. Cambridge, Mass. : Blackwell Science. 1995. ISBN:978-0-86542-352-7.
- AGGERBECK, H., FENGER, C. & HERON, I. Booster vaccination against diphtheria and tetanus in man. Comparison of calcium phosphate and aluminium hydroxide as adjuvants--II. *Vaccine*. 1995. Vol. 13, n° 14, p. 1366-1374.
- AGGERBECK, H. & HERON, I. Adjuvanticity of aluminium hydroxide and calcium phosphate in diphtheria-tetanus vaccines—I. *Vaccine*. 1995. Vol. 13, n° 14, p. 1360-1365.
- AGMON-LEVIN, N., ARANGO, M.-T., KIVITY, S., KATZAV, A., GILBURD, B., BLANK, M., TOMER, N., VOLKOV, A., BARSHACK, I., CHAPMAN, J., *et al*. Immunization with hepatitis B vaccine accelerates SLE-like disease in a murine model. *Journal of Autoimmunity*. 2014a. Vol. 54, p. 21-32. DOI:10.1016/j.jaut.2014.06.006.
- AGMON-LEVIN, N. & SHOENFELD, Y. Chronic fatigue syndrome with autoantibodies--the result of an augmented adjuvant effect of hepatitis-B vaccine and silicone implant. *Autoimmunity Reviews*. 2008. Vol. 8, n° 1, p. 52-55. DOI:10.1016/j.autrev.2008.07.026.
- AGMON-LEVIN, N., ZAFRIR, Y., KIVITY, S., BALOFSKY, A., AMITAL, H. & SHOENFELD, Y. Chronic fatigue syndrome and fibromyalgia following immunization with the hepatitis B vaccine: another angle of the « autoimmune (auto-inflammatory) syndrome induced by adjuvants » (ASIA). *Immunologic Research*. 2014b. Vol. 60, n° 2-3, p. 376-383. DOI:10.1007/s12026-014-8604-2.

- AHMED, K.K., GEARY, S.M. & SALEM, A.K. Applying biodegradable particles to enhance cancer vaccine efficacy. *Immunologic Research*. 2014. Vol. 59, n° 1-3, p. 220-228. DOI:10.1007/s12026-014-8537-9.
- AIHARA, N., OCHIAI, M., HORIUCHI, N., YAMAMOTO, A., SUDO, K., ISHIKAWA, Y. & OISHI, K. Incidental induction of secondary bowel disorders in guinea pigs during a batch safety test of veterinary vaccines. *The Journal of Veterinary Medical Science*. 2019. Vol. 81, n° 8, p. 1129-1132. DOI:10.1292/jvms.19-0058.
- AIMANIANDA, V., HAENSLER, J., LACROIX-DESMAZES, S., KAVERI, S.V. & BAYRY, J. Novel cellular and molecular mechanisms of induction of immune responses by aluminum adjuvants. *Trends in Pharmacological Sciences*. 2009. Vol. 30, n° 6, p. 287-295. DOI:10.1016/j.tips.2009.03.005.
- ALAWDI, S.H., EL-DENSHARY, E.S., SAFAR, M.M., EIDI, H., DAVID, M.-O. & ABDEL-WAHHAB, M.A. Neuroprotective Effect of Nanodiamond in Alzheimer's Disease Rat Model: a Pivotal Role for Modulating NF- κ B and STAT3 Signaling. *Molecular Neurobiology*. 2016. DOI:10.1007/s12035-016-9762-0.
- AL-BARI, M.A.A. Chloroquine analogues in drug discovery: new directions of uses, mechanisms of actions and toxic manifestations from malaria to multifarious diseases. *The Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 2015. Vol. 70, n° 6, p. 1608-1621. DOI:10.1093/jac/dkv018.
- ALFREY, A.C., LEGENDRE, G.R. & KAEHNY, W.D. The dialysis encephalopathy syndrome. Possible aluminum intoxication. *The New England Journal of Medicine*. 1976. Vol. 294, n° 4, p. 184-188. DOI:10.1056/NEJM197601222940402.
- AL-SHAKHSHIR, R., REGNIER, F., WHITE, J.L. & HEM, S.L. Effect of protein adsorption on the surface charge characteristics of aluminium-containing adjuvants. *Vaccine*. 1994. Vol. 12, n° 5, p. 472-474.
- ALTMAN, J. & SUDARSHAN, K. Postnatal development of locomotion in the laboratory rat. *Animal Behaviour*. 1975. Vol. 23, n° 4, p. 896-920.
- AMOURA, Z., COSTEDOAT, N., MAISONOBE, T., GODEAU, P. & PIETTE, J.-C. Familial macrophagic myofasciitis. *Annals of the Rheumatic Diseases*. 2000. Vol. 59, n° 11, p. 926-926. DOI:10.1136/ard.59.11.926b.
- AN, N., CHEN, Y., WANG, C., YANG, C., WU, Z.-H., XUE, J., YE, L., WANG, S., LIU, H.-F. & PAN, Q. Chloroquine Autophagic Inhibition Rebalances Th17/Treg-Mediated Immunity and Ameliorates Systemic Lupus Erythematosus. *Cellular Physiology and Biochemistry: International Journal of Experimental Cellular Physiology, Biochemistry, and Pharmacology*. 2017. Vol. 44, n° 1, p. 412-422. DOI:10.1159/000484955.
- ANDERSEN, S.L. Trajectories of brain development: point of vulnerability or window of opportunity? *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*. 2003. Vol. 27, n° 1-2, p. 3-18. DOI:10.1016/s0149-7634(03)00005-8.
- ANDÓN, F.T. & FADEEL, B. Programmed cell death: molecular mechanisms and implications for safety assessment of nanomaterials. *Accounts of Chemical Research*. 2013. Vol. 46, n° 3, p. 733-742. DOI:10.1021/ar300020b.
- ANGRAND, L., ELNAR, A.A., AUTHIER, F.-J., GHERARDI, R.K. & CRÉPEAUX, G. [Aluminium adjuvant exposure through vaccines in France in 2018]. *Annales Pharmaceutiques Françaises*. 2020. DOI:10.1016/j.pharma.2020.01.002.

- ANSES.FR. Avis de l'Agence Française de Sécurité Sanitaire des Aliments : actualisation de l'exposition par voie alimentaire de la population française à l'aluminium. 2008. <https://www.anses.fr/en/system/files/RCCP2008sa0196.pdf>.
- AOUN SEBAITI, M., ABRIVARD, M., BLANC-DURAND, P., VAN DER GUCHT, A., SOUVANNANORATH, S., KAUV, P., GHERARDI, R.K., ITTI, E. & AUTHIER, F.J. Macrophagic myofasciitis-associated dysfunctioning: An update of neuropsychological and neuroimaging features. *Best Practice & Research. Clinical Rheumatology*. 2018. Vol. 32, n° 5, p. 640-650. DOI:10.1016/j.berh.2019.04.003.
- AOUN SEBAITI, M., KAUV, P., CHARLES-NELSON, A., VAN DER GUCHT, A., BLANC-DURAND, P., ITTI, E., GHERARDI, R.K., BACHOUUD-LEVI, A.-C. & AUTHIER, F.J. Cognitive dysfunction associated with aluminum hydroxide-induced macrophagic myofasciitis: A reappraisal of neuropsychological profile. *Journal of Inorganic Biochemistry*. 2017. DOI:10.1016/j.jinorgbio.2017.09.019.
- APRILE, M.A. & WARDLAW, A.C. Aluminium compounds as adjuvants for vaccines and toxoids in man: a review. *Canadian Journal of Public Health*. 1966. Vol. 57, n° 8, p. 343-360.
- ARAB-NOZARI, M., ZAMANI, E., LATIFI, A. & SHAKI, F. Mitochondrial toxicity of aluminium nanoparticles in comparison to its ionic form on isolated rat brain mitochondria. *Bratislavske Lekarske Listy*. 2019. Vol. 120, n° 7, p. 516-522. DOI:10.4149/BLL_2019_083.
- ARNOULT, D., GRODET, A., LEE, Y.-J., ESTAQUIER, J. & BLACKSTONE, C. Release of OPA1 during Apoptosis Participates in the Rapid and Complete Release of Cytochrome c and Subsequent Mitochondrial Fragmentation. *Journal of Biological Chemistry*. 2005. Vol. 280, n° 42, p. 35742-35750. DOI:10.1074/jbc.M505970200.
- ARORA, S., RAJWADE, J.M. & PAKNIKAR, K.M. Nanotoxicology and in vitro studies: the need of the hour. *Toxicology and Applied Pharmacology*. 2012. Vol. 258, n° 2, p. 151-165. DOI:10.1016/j.taap.2011.11.010.
- ASÍN, J., MOLÍN, J., PÉREZ, M., PINCZOWSKI, P., GIMENO, M., NAVASCUÉS, N., MUNIESA, A., DE BLAS, I., LACASTA, D., FERNÁNDEZ, A., *et al.* Granulomas Following Subcutaneous Injection With Aluminum Adjuvant-Containing Products in Sheep. *Veterinary Pathology*. 2018. p. 300985818809142. DOI:10.1177/0300985818809142.
- ASÍN, J., PASCUAL-ALONSO, M., PINCZOWSKI, P., GIMENO, M., PÉREZ, M., MUNIESA, A., DE PABLO-MAISO, L., DE BLAS, I., LACASTA, D., FERNÁNDEZ, A., *et al.* Cognition and behavior in sheep repetitively inoculated with aluminum adjuvant-containing vaccines or aluminum adjuvant only. *Journal of Inorganic Biochemistry*. 2020. Vol. 203, p. 110934. DOI:10.1016/j.jinorgbio.2019.110934.
- ASÍN, J., PÉREZ, M., PINCZOWSKI, P., GIMENO, M. & LUJÁN, L. From the bluetongue vaccination campaigns in sheep to overimmunization and ovine ASIA syndrome. *Immunologic Research*. 2019. DOI:10.1007/s12026-018-9059-7.
- ASSEMBLÉE NATIONALE. Groupe d'Etudes sur la vaccination. Les 11 recommandations. 2012. http://s175833897.onlinehome.fr/wp-content/uploads/2017/04/Groupe_etudes_vaccins.pdf.
- ASSEMBLÉE NATIONALE. Assemblée nationale ~ Première séance du mercredi 26 juillet 2017. 2017. <http://www.assemblee-nationale.fr/15/cr/2016-2017-extra/20171021.asp#P1002773>.

- AUTHIER, F.-J., CHERIN, P., CREANGE, A., BONNOTTE, B., FERRER, X., ABDELMOUMNI, A., RANOUX, D., PELLETIER, J., FIGARELLA-BRANGER, D., GRANEL, B., *et al.* Central nervous system disease in patients with macrophagic myofasciitis. *Brain*. 2001. Vol. 124, n° 5, p. 974-983. DOI:10.1093/brain/124.5.974.
- AUTHIER, F.-J., SAUVAT, S., CHAMPEY, J., DROGOU, I., COQUET, M. & GHERARDI, R.K. Chronic fatigue syndrome in patients with macrophagic myofasciitis. *Arthritis and Rheumatism*. 2003. Vol. 48, n° 2, p. 569-570. DOI:10.1002/art.10740.
- AUTHIER, F.-J., SAUVAT, S., CHRISTOV, C., CHARIOT, P., RAISBECK, G., PORON, M.-F., YIOU, F. & GHERARDI, R. AIOH3-adjuvanted vaccine-induced macrophagic myofasciitis in rats is influenced by the genetic background. *Neuromuscular disorders: NMD*. 2006. Vol. 16, n° 5, p. 347-352. DOI:10.1016/j.nmd.2006.02.004.
- AUTRET-LECA, E., CISSOKO, H., BEAU-SALINAS, F. & JONVILLE-BÉRA, A.-P. Pharmacologie des vaccins. *La Revue du Praticien Médecine Générale*. 2011. Vol. 25, n° 869, p. 715-718.
- AWATE, S., BABIUK, L.A.B. & MUTWIRI, G. Mechanisms of Action of Adjuvants. *Frontiers in Immunology*. 2013. Vol. 4. DOI:10.3389/fimmu.2013.00114.
- AZZAOUI, F.Z., AHAMI, A.O.T. & KHADMAOUI, A. Impact of aluminum sub-chronic toxicity on body weight and recognition memory of wistar rat. *Pakistan journal of biological sciences: PJBS*. 2008. Vol. 11, n° 14, p. 1830-1834.
- BALOUET, G., BARET, M., RELYVELD, E., RAVISSE, P. & LEVADITI, J. Role of antigens and adjuvant substances in the histological response in experimental granulomas (immunogenic granuloma). *Annales D'anatomie Pathologique*. 1977. Vol. 22, n° 2, p. 159-170.
- BALOUET, G., LEVADITI, J.C. & RELYVELD, E. Le granulome immunogène: histopathologie expérimentale des lésions liées à des injections vaccinales associées à divers adjuvants de l'immunité. *Bull. Inst. Pasteur*. 1975. Vol. 73, p. 383-409.
- BANSAL, A.S., BRADLEY, A.S., BISHOP, K.N., KIANI-ALIKHAN, S. & FORD, B. Chronic fatigue syndrome, the immune system and viral infection. *Brain, Behavior, and Immunity*. 2012. Vol. 26, n° 1, p. 24-31. DOI:10.1016/j.bbi.2011.06.016.
- BARTH, S., GLICK, D. & MACLEOD, K.F. Autophagy: assays and artifacts. *The Journal of pathology*. 2010. Vol. 221, n° 2, p. 117-124.
- BAYDAR, T., PAPP, A., AYDIN, A., NAGYMAJTENYI, L., SCHULZ, H., ISIMER, A. & SAHIN, G. Accumulation of aluminum in rat brain: does it lead to behavioral and electrophysiological changes? *Biological Trace Element Research*. 2003. Vol. 92, n° 3, p. 231-244. DOI:10.1385/BTER:92:3:231.
- BAYLOR, N.W., EGAN, W. & RICHMAN, P. Aluminum salts in vaccines. US perspective. *Vaccine*. 2002. Vol. 20 Suppl 3, p. S18-23.
- BAZIN, H. *L'histoire des vaccinations*. Montrouge : J. Libbey Eurotext. 2008. ISBN:978-2-7420-0705-9. RA638 .B39 2008
- BECARIA, A., LAHIRI, D.K., BONDY, S.C., CHEN, D., HAMADEH, A., LI, H., TAYLOR, R. & CAMPBELL, A. Aluminum and copper in drinking water enhance inflammatory or oxidative events specifically in the brain. *Journal of Neuroimmunology*. 2006. Vol. 176, n° 1-2, p. 16-23. DOI:10.1016/j.jneuroim.2006.03.025.

- BÉGUÉ, P., GIRARD, M., BAZIN, H. & BACH, J.-F. Les adjuvants vaccinaux: quelle actualité en 2012? *Bull. Acad. Natle. Med.* 2012. Vol. 196, n° 1, p. 1177-81.
- BEHERA, T. & SWAIN, P. Antigen adsorbed calcium phosphate nanoparticles stimulate both innate and adaptive immune response in fish, *Labeo rohita* H. *Cellular Immunology*. 2011. Vol. 271, n° 2, p. 350-359. DOI:10.1016/j.cellimm.2011.07.015.
- BELLE, V. *Quand l'aluminium nous empoisonne: Essai*. Max Milo. 2010. ISBN:978-2-315-00281-8.
- BERG, T.O., FENGSRUUD, M., STRØMHAUG, P.E., BERG, T. & SEGLEN, P.O. Isolation and characterization of rat liver amphisomes. Evidence for fusion of autophagosomes with both early and late endosomes. *The Journal of Biological Chemistry*. 1998. Vol. 273, n° 34, p. 21883-21892. DOI:10.1074/jbc.273.34.21883.
- BERNUZZI, V., DESOR, D. & LEHR, P.R. Effects of postnatal aluminum lactate exposure on neuromotor maturation in the rat. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*. 1989a. Vol. 42, n° 3, p. 451-455.
- BERNUZZI, V., DESOR, D. & LEHR, P.R. Developmental alternations in offspring of female rats orally intoxicated by aluminum chloride or lactate during gestation. *Teratology*. 1989b. Vol. 40, n° 1, p. 21-27. DOI:10.1002/tera.1420400104.
- BFM TV. *Vaccins, confinement: Olivier Véran répond à vos questions sur BFMTV*. 2021. https://www.bfmtv.com/replay-emissions/le-dezoom/vaccins-confinement-olivier-veran-repond-a-vos-questions-sur-bfmtv_VN-202101070452.html
- BHALLA, P., GARG, M.L. & DHAWAN, D.K. Protective role of lithium during aluminium-induced neurotoxicity. *Neurochemistry International*. 2010. Vol. 56, n° 2, p. 256-262. DOI:10.1016/j.neuint.2009.10.009.
- BHALLA, P., SINGLA, N. & DHAWAN, D.K. Potential of lithium to reduce aluminium-induced cytotoxic effects in rat brain. *Biometals: An International Journal on the Role of Metal Ions in Biology, Biochemistry, and Medicine*. 2010. Vol. 23, n° 2, p. 197-206. DOI:10.1007/s10534-009-9278-4.
- BIHAQI, S.W., SHARMA, M., SINGH, A.P. & TIWARI, M. Neuroprotective role of *Convolvulus pluricaulis* on aluminium induced neurotoxicity in rat brain. *Journal of Ethnopharmacology*. 2009. Vol. 124, n° 3, p. 409-415. DOI:10.1016/j.jep.2009.05.038.
- BILKEI-GORZÓ, A. Neurotoxic effect of enteral aluminium. *Food and Chemical Toxicology: An International Journal Published for the British Industrial Biological Research Association*. 1993. Vol. 31, n° 5, p. 357-361.
- BISHOP, N.J., MORLEY, R., DAY, J.P. & LUCAS, A. Aluminum neurotoxicity in preterm infants receiving intravenous-feeding solutions. *The New England Journal of Medicine*. 1997. Vol. 336, n° 22, p. 1557-1561. DOI:10.1056/NEJM199705293362203.
- BLEAM, W.F., PFEFFER, P.E., GOLDBERG, S., TAYLOR, R.W. & DUDLEY, R. A phosphorus-31 solid-state nuclear magnetic resonance study of phosphate adsorption at the boehmite/aqueous solution interface. *Langmuir*. 1991. Vol. 7, n° 8, p. 1702-1712.
- BLITSHTEYN, S. Postural tachycardia syndrome following human papillomavirus vaccination. *European Journal of Neurology*. 2014. Vol. 21, n° 1, p. 135-139. DOI:10.1111/ene.12272.

- BOLLA, K.I., BRIEFEL, G., SPECTOR, D., SCHWARTZ, B.S., WIELER, L., HERRON, J. & GIMENEZ, L. Neurocognitive Effects of Aluminum. *Archives of Neurology*. 1992. Vol. 49, n° 10, p. 1021-1026. DOI:10.1001/archneur.1992.00530340037015.
- BONNEFONT-ROUSSELOT, D., CHANTALAT-AUGER, C., TEIXEIRA, A., JAUDON, M.-C., PELLETIER, S. & CHERIN, P. Blood oxidative stress status in patients with macrophagic myofasciitis. *Biomedicine & Pharmacotherapy = Biomedecine & Pharmacotherapie*. 2004. Vol. 58, n° 9, p. 516-519. DOI:10.1016/j.biopha.2004.04.012.
- BORNEMANN, A., BOHL, J., SCHNEIDER, H.-M., GOEBEL, H.H., SCHMIDT, P.F. & GHERARDI, R.K. July 2003: 62-year-old female with progressive muscular weakness. *Brain Pathology (Zurich, Switzerland)*. 2004. Vol. 14, n° 1, p. 109-110, 115.
- BOUDOU, J.-P. Boudou JP, David MO, Joshi V, Eidi H, Curmi PA, Hyperbranched polyglycerol modified fluorescent nanodiamond for biomedical research, *Diamond Relat.Mat*. 2013, 38: 131-138. . 2013.
- BOUDOU, J.-P., CURMI, P.A., JELEZKO, F., WRACHTRUP, J., AUBERT, P., MOHAMED SENNOUR, BALASUBRAMANIAN, G., REUTER, R., THOREL, A. & GAFFET, E. High yield fabrication of fluorescent nanodiamonds. *Nanotechnology*. 2009. Vol. 20, n° 23, p. 235602. DOI:10.1088/0957-4484/20/23/235602.
- BOYLE, K.B. & RANDOW, F. Rubicon swaps autophagy for LAP. *Nature Cell Biology*. 2015. Vol. 17, n° 7, p. 843-845. DOI:10.1038/ncb3197.
- BRANSFIELD, R.C. Neuropsychiatric Lyme Borreliosis: An Overview with a Focus on a Specialty Psychiatrist's Clinical Practice. *Healthcare (Basel, Switzerland)*. 2018. Vol. 6, n° 3, p. E104. DOI:10.3390/healthcare6030104.
- BREST, P., LAPAQUETTE, P., SOUIDI, M., LEBRIGAND, K., CESARO, A., VOURET-CRAVIARI, V., MARI, B., BARBRY, P., MOSNIER, J.-F., HÉBUTERNE, X., *et al.* A synonymous variant in IRGM alters a binding site for miR-196 and causes deregulation of IRGM-dependent xenophagy in Crohn's disease. *Nature Genetics*. 2011. Vol. 43, n° 3, p. 242-245. DOI:10.1038/ng.762.
- BRIGITTE, M., SCHILTE, C., PLONQUET, A., BABA-AMER, Y., HENRI, A., CHARLIER, C., TAJBAKHSI, S., ALBERT, M., GHERARDI, R.K. & CHRÉTIEN, F. Muscle resident macrophages control the immune cell reaction in a mouse model of notexin-induced myoinjury. *Arthritis and Rheumatism*. 2010. Vol. 62, n° 1, p. 268-279. DOI:10.1002/art.27183.
- BRINTH, L. Is Chronic Fatigue Syndrome/Myalgic Encephalomyelitis a Relevant Diagnosis in Patients with Suspected Side Effects to Human Papilloma Virus Vaccine? *International Journal of Vaccines & Vaccination*. 2015. Vol. 1, n° 1. DOI:10.15406/ijvv.2015.01.00003.
- BRINTH, L.S., PORS, K., THEIBEL, A.C. & MEHLSSEN, J. Orthostatic intolerance and postural tachycardia syndrome as suspected adverse effects of vaccination against human papilloma virus. *Vaccine*. 2015. Vol. 33, n° 22, p. 2602-2605. DOI:10.1016/j.vaccine.2015.03.098.
- BROCKS, D.R., SKEITH, K.J., JOHNSTON, C., EMAMIBAFRANI, J., DAVIS, P., RUSSELL, A.S. & JAMALI, F. Hematologic Disposition of Hydroxychloroquine Enantiomers. *The Journal of Clinical Pharmacology*. 1994. Vol. 34, n° 11, p. 1088-1097. DOI:https://doi.org/10.1002/j.1552-4604.1994.tb01986.x.

- BRUCE, M., STREIFEL, K.M., BOOSALIS, C.A., HEUER, L., GONZÁLEZ, E.A., LI, S., HARVEY, D.J., LEIN, P.J. & VAN DE WATER, J. Acute peripheral immune activation alters cytokine expression and glial activation in the early postnatal rat brain. *Journal of Neuroinflammation*. 2019. Vol. 16, n° 1, p. 200. DOI:10.1186/s12974-019-1569-2.
- BUFFEN, K., OOSTING, M., LI, Y., KANNEGANTI, T.-D., NETEA, M.G. & JOOSTEN, L.A.B. Autophagy suppresses host adaptive immune responses toward *Borrelia burgdorferi*. *Journal of Leukocyte Biology*. 2016. Vol. 100, n° 3, p. 589-598. DOI:10.1189/jlb.4A0715-331R.
- BURENKOVA, O.V., ALEKSANDROVA, E.A. & ZARAYSKAYA, I.Y. Effects of early-life stress and HDAC inhibition on maternal behavior in mice. *Behavioral Neuroscience*. 2019. Vol. 133, n° 1, p. 39-49. DOI:10.1037/bne0000284.
- BURMAN, C. & KTISTAKIS, N.T. Regulation of autophagy by phosphatidylinositol 3-phosphate. *FEBS letters*. 2010. Vol. 584, n° 7, p. 1302-1312. DOI:10.1016/j.febslet.2010.01.011.
- CADUSSEAU, J., RAGUNATHAN-THANGARAJAH, N., SURENAUD, M., HUE, S., AUTHIER, F.-J. & GHERARDI, R.K. Selective elevation of circulating CCL2/MCP1 levels in patients with longstanding post-vaccinal macrophagic myofasciitis and ASIA. *Current Medicinal Chemistry*. 2014. Vol. 21, n° 4, p. 511-517.
- CAIN, D.W., SANDERS, S.E., CUNNINGHAM, M.M. & KELSOE, G. Disparate adjuvant properties among three formulations of « alum ». *Vaccine*. 2013. Vol. 31, n° 4, p. 653-660. DOI:10.1016/j.vaccine.2012.11.044.
- CALABRESE, E.J. *Pollutants and high risk-groups: the biological basis of increased human susceptibility to environmental and occupational pollutants*. New York: Wiley. 1978. Environmental science and technology. ISBN:978-0-471-02940-3.
- CALABRESE, E.J., GIORDANO, J.J., KOZUMBO, W.J., LEAK, R.K. & BHATIA, T.N. Hormesis mediates dose-sensitive shifts in macrophage activation patterns. *Pharmacological Research*. 2018. Vol. 137, p. 236-249. DOI:10.1016/j.phrs.2018.10.010.
- CAO, Z., YANG, X., ZHANG, H., WANG, H., HUANG, W., XU, F., ZHUANG, C., WANG, X. & LI, Y. Aluminum chloride induces neuroinflammation, loss of neuronal dendritic spine and cognition impairment in developing rat. *Chemosphere*. 2016. Vol. 151, p. 289-295. DOI:10.1016/j.chemosphere.2016.02.092.
- CARBONE, F.R., BELZ, G.T. & HEATH, W.R. Transfer of antigen between migrating and lymph node-resident DCs in peripheral T-cell tolerance and immunity. *Trends in Immunology*. 2004. Vol. 25, n° 12, p. 655-658. DOI:10.1016/j.it.2004.09.013.
- CARREIRA, M.B., COSSIO, R. & BRITTON, G.B. Individual and sex differences in high and low responder phenotypes. *Behavioural Processes*. 2017. Vol. 136, p. 20-27. DOI:10.1016/j.beproc.2017.01.006.
- CARRUTHERS, B.M., JAIN, A.K., MEIRLEIR, K.L.D., PETERSON, D.L., KLIMAS, N.G., LERNER, A.M., BESTED, A.C., FLOR-HENRY, P., JOSHI, P., POWLES, A.C.P., *et al.* Myalgic Encephalomyelitis/Chronic Fatigue Syndrome. *Journal of Chronic Fatigue Syndrome*. 2003. Vol. 11, n° 1, p. 7-115. DOI:10.1300/J092v11n01_02.

- CASTILLO, E.F., DEKONENKO, A., ARKO-MENSAH, J., MANDELL, M.A., DUPONT, N., JIANG, S., DELGADO-VARGAS, M., TIMMINS, G.S., BHATTACHARYA, D., YANG, H., *et al.* Autophagy protects against active tuberculosis by suppressing bacterial burden and inflammation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2012. Vol. 109, n° 46, p. E3168-3176. DOI:10.1073/pnas.1210500109.
- CAUDAL, H., BRIEND-GODET, V., CAROFF, N., MORET, L., NAVAS, D. & HUON, J. Vaccine distrust: Investigation of the views and attitudes of parents in regard to vaccination of their children. *Annales Pharmaceutiques Françaises*. 2020. DOI:10.1016/j.pharma.2020.03.003.
- CAULFIELD, M.J., SHI, L., WANG, S., WANG, B., TOBERY, T.W., MACH, H., AHL, P.L., CANNON, J.L., COOK, J.C., HEINRICHS, J.H., *et al.* Effect of alternative aluminum adjuvants on the absorption and immunogenicity of HPV16 L1 VLPs in mice. *Human Vaccines*. 2007. Vol. 3, n° 4, p. 139-145.
- CENTERS FOR DISEASE CONTROL. Adjuvants help vaccines work better. | Vaccine Safety | CDC. 2019. <https://www.cdc.gov/vaccinesafety/concerns/adjuvants.html>.
- CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION. 2021 Recommended Child and Adolescent Immunization Schedule. <https://www.cdc.gov/vaccines/schedules/downloads/child/0-18yrs-child-combined-schedule.pdf>. 2021. p. 8.
- CHANDLER, R.E., JUHLIN, K., FRANSSON, J., CASTER, O., EDWARDS, I.R. & NORÉN, G.N. Current Safety Concerns with Human Papillomavirus Vaccine: A Cluster Analysis of Reports in VigiBase®. *Drug Safety*. 2017. Vol. 40, n° 1, p. 81-90. DOI:10.1007/s40264-016-0456-3.
- CHATENOUD, L. & BACH, J.-F. *Immunologie*. Paris : Médecine sciences publications-Lavoisier. 2012. ISBN:978-2-257-20529-2.
- CHATTERJEE, S., SARKAR, S. & BHATTACHARYA, S. Toxic metals and autophagy. *Chemical Research in Toxicology*. 2014. Vol. 27, n° 11, p. 1887-1900. DOI:10.1021/tx500264s.
- CHEN, L., YOKEL, R.A., HENNIG, B. & TOBOREK, M. Manufactured Aluminum Oxide Nanoparticles Decrease Expression of Tight Junction Proteins in Brain Vasculature. *Journal of neuroimmune pharmacology : the official journal of the Society on NeuroImmune Pharmacology*. 2008. Vol. 3, n° 4, p. 286-295. DOI:10.1007/s11481-008-9131-5.
- CHEN, P.M., GOMBART, Z.J. & CHEN, J.W. Chloroquine treatment of ARPE-19 cells leads to lysosome dilation and intracellular lipid accumulation: possible implications of lysosomal dysfunction in macular degeneration. *Cell & Bioscience*. 2011. Vol. 1, n° 1, p. 10. DOI:10.1186/2045-3701-1-10.
- CHÉRIN, P., MENARD, D., MOUTON, P., VIALARD, J.F., LE HELLO, C., AUTHIER, F.J., GHÉRARDI, R.K., COQUET, M., HERSON, S. & LEROI, J.P. Macrophagic myofasciitis associated with inclusion body myositis: a report of three cases. *Neuromuscular disorders: NMD*. 2001. Vol. 11, n° 5, p. 452-457.
- CHÉRIN, P., PELLETIER, S., LAFORÊT, P., TEIXEIRA, A., CHANTALAT-AUGER, C., BENVENISTE, O., SIMON, A., EYMARD, B. & HERSON, S. Statut immunologique au cours de la myofasciite à macrophages. </data/revues/02488663/002200S1/01834007/>. 2008.
- CHERRORET, G., BERNUZZI, V., DESOR, D., HUTIN, M.F., BURNEL, D. & LEHR, P.R. Effects of postnatal aluminum exposure on choline acetyltransferase activity and learning abilities in the rat. *Neurotoxicology and Teratology*. 1992. Vol. 14, n° 4, p. 259-264.

- CHERRY, N., CREED, F., SILMAN, A., DUNN, G., BAXTER, D., SMEDLEY, J., TAYLOR, S. & MACFARLANE, G.J. Health and exposures of United Kingdom Gulf war veterans. Part II: The relation of health to exposure. *Occupational and Environmental Medicine*. 2001. Vol. 58, n° 5, p. 299-306. DOI:10.1136/oem.58.5.299.
- CHHONKER, Y.S., SLEIGHTHOLM, R.L., LI, J., OUPICKÝ, D. & MURRY, D.J. Simultaneous quantitation of hydroxychloroquine and its metabolites in mouse blood and tissues using LC-ESI-MS/MS: An application for pharmacokinetic studies. *Journal of Chromatography B*. 2018. Vol. 1072, p. 320-327. DOI:10.1016/j.jchromb.2017.11.026.
- CHIOT, A., ZAÏDI, S., ILTIS, C., RIBON, M., BERRIAT, F., SCHIAFFINO, L., JOLLY, A., DE LA GRANGE, P., MALLAT, M., BOHL, D., *et al.* Modifying macrophages at the periphery has the capacity to change microglial reactivity and to extend ALS survival. *Nature Neuroscience*. 2020. Vol. 23, n° 11, p. 1339-1351. DOI:10.1038/s41593-020-00718-z.
- CHKHEIDZE, R., BURNS, D.K., WHITE, C.L., CASTRO, D., FULLER, J. & CAI, C. Morin Stain Detects Aluminum-Containing Macrophages in Macrophagic Myofasciitis and Vaccination Granuloma With High Sensitivity and Specificity. *Journal of Neuropathology and Experimental Neurology*. 2017. DOI:10.1093/jnen/nlx011.
- CLEARE, A.J., REID, S., CHALDER, T., HOTOPF, M. & WESSELY, S. Chronic fatigue syndrome. *BMJ clinical evidence*. 2015. Vol. 2015.
- CMAJ. Report of the working group on the possible relationship between hepatitis B vaccination and the chronic fatigue syndrome. *CMAJ: Canadian Medical Association journal = journal de l'Association medicale canadienne*. 1993. Vol. 149, n° 3, p. 314-319.
- COHIGNAC, V., LANDRY, M., BOCZKOWSKI, J. & LANONE, S. Autophagy as a Possible Underlying Mechanism of Nanomaterial Toxicity. *Nanomaterials*. 2014. Vol. 4, n° 3, p. 548-582. DOI:10.3390/nano4030548.
- COLOMINA, M.T., ROIG, J.L., SÁNCHEZ, D.J. & DOMINGO, J.L. Influence of age on aluminum-induced neurobehavioral effects and morphological changes in rat brain. *Neurotoxicology*. 2002. Vol. 23, n° 6, p. 775-781. DOI:10.1016/S0161-813X(02)00008-6.
- COLOMINA, M.T., ROIG, J.L., TORRENTE, M., VICENS, P. & DOMINGO, J.L. Concurrent exposure to aluminum and stress during pregnancy in rats: Effects on postnatal development and behavior of the offspring. *Neurotoxicology and Teratology*. 2005. Vol. 27, n° 4, p. 565-574. DOI:10.1016/j.ntt.2005.06.014.
- COMMISSARIS, R.L., CORDON, J.J., SPRAGUE, S., KEISER, J., MAYOR, G.H. & RECH, R.H. Behavioral changes in rats after chronic aluminum and parathyroid hormone administration. *Neurobehavioral Toxicology and Teratology*. 1982. Vol. 4, n° 3, p. 403-410.
- CONSEIL DES COMMUNAUTÉS EUROPÉENNES. Résolution du Conseil et des représentants des gouvernements des États membres, réunis au sein du Conseil, du 16 juin 1986, relative à la protection des patients en dialyse par une réduction maximale de l'exposition à l'aluminium - 41986X0723(03). *Journal officiel n° C 184 du 23/07/1986 p. 0016 - 0018*;1986. [https://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=CELEX:41986X0723\(03\):FR:HTML](https://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=CELEX:41986X0723(03):FR:HTML).

- CONSEIL SUPÉRIEUR DE LA SANTÉ. PUBLICATION DU CONSEIL SUPERIEUR DE LA SANTE N° 8866 : Analyse de la toxicité globale de l'aluminium et calcul de l'exposition avec une attention particulière pour les composés d'aluminium dans les produits cosmétiques. 2015. https://www.health.belgium.be/sites/default/files/uploads/fields/fpshealth_theme_file/19104754/Analyse%20de%20la%20toxicit%C3%A9%20globale%20de%20l%E2%80%99aluminium%20et%20calcul%20de%20l%E2%80%99exposition%20avec%20une%20attention%20particul%C3%A8re%20pour%20les%20compos%C3%A9s%20d%E2%80%99aluminium%20dans%20les%20produit.pdf.
- CONSEIL-ETAT.FR. Vaccination obligatoire. 2017. <http://www.conseil-etat.fr/Actualites/Communiqués/Vaccination-obligatoire>.
- COQUET, M. Myofasciite à Macrophages : Mise en évidence d'une nouvelle entité. *Kinésithérapie Rev.* 2008. N° 79, p. 16-21.
- CORY-SLECHTA, D.A., CROFTON, K.M., FORAN, J.A., ROSS, J.F., SHEETS, L.P., WEISS, B. & MILESON, B. Methods to identify and characterize developmental neurotoxicity for human health risk assessment. I: behavioral effects. *Environmental Health Perspectives.* 2001. Vol. 109 Suppl 1, p. 79-91.
- COUETTE, M., BOISSE, M.-F., MAISON, P., BRUGIERES, P., CESARO, P., CHEVALIER, X., GHERARDI, R.K., BACHOUD-LEVI, A.-C. & AUTHIER, F.-J. Long-term persistence of vaccine-derived aluminum hydroxide is associated with chronic cognitive dysfunction. *Journal of Inorganic Biochemistry.* 2009. Vol. 103, n° 11, p. 1571-1578. DOI:10.1016/j.jinorgbio.2009.08.005.
- COURSAGET, P., YVONNET, B., RELYVELD, E.H., BARRES, J.L., DIOP-MAR, I. & CHIRON, J.P. Simultaneous administration of diphtheria-tetanus-pertussis-polio and hepatitis B vaccines in a simplified immunization program: immune response to diphtheria toxoid, tetanus toxoid, pertussis, and hepatitis B surface antigen. *Infection and Immunity.* 1986. Vol. 51, n° 3, p. 784-787.
- CRAWLEY, E.M., EMOND, A.M. & STERNE, J.A.C. Unidentified Chronic Fatigue Syndrome/myalgic encephalomyelitis (CFS/ME) is a major cause of school absence: surveillance outcomes from school-based clinics. *BMJ open.* 2011. Vol. 1, n° 2, p. e000252. DOI:10.1136/bmjopen-2011-000252.
- CRÉPEAUX, G. *Exposition périnatale à un mélange d'Hydrocarbures Aromatiques Polycycliques chez le rat : évaluation des effets neurotoxiques à court et à long terme.* Thèse de doctorat : Sciences Agronomiques. Nancy : Université de Lorraine. 2012. 449 p.
- CRÉPEAUX, G., AUTHIER, F.-J., EXLEY, C., LUJÁN, L. & GHERARDI, R.K. The role of aluminum adjuvants in vaccines raises issues that deserve independent, rigorous and honest science. *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology.* 2020. p. 126632. DOI:10.1016/j.jtemb.2020.126632.
- CRÉPEAUX, G., EIDI, H., DAVID, M.-O., BABA-AMER, Y., TZAVARA, E., GIROS, B., AUTHIER, F.-J., EXLEY, C., SHAW, C.A., CADUSSEAU, J., *et al.* Non-linear dose-response of aluminium hydroxide adjuvant particles: selective low dose neurotoxicity. *Toxicology.* 2017. Vol. 375, p. 48-57. DOI:10.1016/j.tox.2016.11.018.
- CRÉPEAUX, G., EIDI, H., DAVID, M.-O., TZAVARA, E., GIROS, B., EXLEY, C., CURMI, P.A., SHAW, C.A., GHERARDI, R.K. & CADUSSEAU, J. Highly delayed systemic translocation of aluminum-based adjuvant in CD1 mice following intramuscular injections. *Journal of Inorganic Biochemistry.* 2015. Vol. 152, p. 199-205. DOI:10.1016/j.jinorgbio.2015.07.004.

- CRÉPEAUX, G., GROVA, N., BOUILLAUD-KREMARK, P., SIKHAYEVA, N., SALQUÈBRE, G., RYCHEN, G., SOULIMANI, R., APPENZELLER, B. & SCHROEDER, H. Short-term effects of a perinatal exposure to a 16 polycyclic aromatic hydrocarbon mixture in rats: assessment of early motor and sensorial development and cerebral cytochrome oxidase activity in pups. *Neurotoxicology*. 2014. Vol. 43, p. 90-101. DOI:10.1016/j.neuro.2014.03.012.
- CUTRUFO, C., CAROLI, S., DELLE FEMMINE, P., ORTOLANI, E., PALAZZESI, S., VIOLANTE, N., ZAPPONI, G.A. & LOIZZO, A. Experimental aluminium encephalopathy: quantitative EEG analysis of aluminium bioavailability. *Journal of Neurology, Neurosurgery, and Psychiatry*. 1984. Vol. 47, n° 2, p. 204-206.
- DANIELSSON, R., SANDBERG, T. & ERIKSSON, H. Aluminium Adjuvants – a Nanomaterial used as Adjuvants in Human Vaccines for Decades. *Current Bionanotechnology*. 2017. Vol. 03, n° 999, p. 1-1. DOI:10.2174/2213529403666170310143243.
- DANTZER, R. Cytokine-Induced Sickness Behavior: Where Do We Stand? *Brain, Behavior, and Immunity*. 2001. Vol. 15, n° 1, p. 7-24. DOI:10.1006/brbi.2000.0613.
- DANTZER, R. Cytokine, Sickness Behavior, and Depression. *Immunology and Allergy Clinics of North America*. 2009. Vol. 29, n° 2, p. 247-264. DOI:10.1016/j.iac.2009.02.002.
- DANTZER, R., O'CONNOR, J.C., FREUND, G.G., JOHNSON, R.W. & KELLEY, K.W. From inflammation to sickness and depression: when the immune system subjugates the brain. *Nature Reviews Neuroscience*. 2008. Vol. 9, n° 1, p. 46-56. DOI:10.1038/nrn2297.
- DE DUVE, C. The lysosome. *Scientific American*. 1963. Vol. 208, p. 64-72.
- DE JONG, W.H. & BORM, P.J.A. Drug delivery and nanoparticles: applications and hazards. *International Journal of Nanomedicine*. 2008. Vol. 3, n° 2, p. 133-149. DOI:10.2147/ijn.s596.
- DEBRÉ, P. *Louis Pasteur*. Paris : Flammarion. 2010. ISBN:978-2-08-124077-3.
- DE CHAUMONT, F., DALLONGEVILLE, S., CHENOUEARD, N., HERVÉ, N., POP, S., PROVOOST, T., MEAS-YEDID, V., PANKAJAKSHAN, P., LECOMTE, T., LE MONTAGNER, Y., *et al.* Icy: an open bioimage informatics platform for extended reproducible research. *Nature Methods*. 2012. Vol. 9, n° 7, p. 690-696. DOI:10.1038/nmeth.2075.
- DELAMARRE, L., COUTURE, R., MELLMAN, I. & TROMBETTA, E.S. Enhancing immunogenicity by limiting susceptibility to lysosomal proteolysis. *The Journal of Experimental Medicine*. 2006. Vol. 203, n° 9, p. 2049-2055. DOI:10.1084/jem.20052442.
- DELGADO-GONZALO, R., UHLMANN, V., SCHMITTER, D. & UNSER, M. Snakes on a Plane: A perfect snap for bioimage analysis. *IEEE Signal Processing Magazine*. 2015. Vol. 32, n° 1, p. 41-48. DOI:10.1109/MSP.2014.2344552.
- DELVES, P.J. & ROITT, I.M. *Encyclopedia of Immunology*. 2nd. San Diego : Academic Pr. 1998. ISBN:978-0-12-226768-0.
- DE MIGUEL, R., ASÍN, J., RODRÍGUEZ-LARGO, A., MOLÍN, J., ECHEVERRÍA, I., DE ANDRÉS, D., PÉREZ, M., DE BLAS, I., MOLD, M., REINA, R., *et al.* Detection of aluminum in lumbar spinal cord of sheep subcutaneously inoculated with aluminum-hydroxide containing products. *Journal of Inorganic Biochemistry*. 2020. Vol. 204, p. 110871. DOI:10.1016/j.jinorgbio.2019.110871.

- DI PASQUALE, A., PREISS, S., TAVARES DA SILVA, F. & GARÇON, N. Vaccine Adjuvants: from 1920 to 2015 and Beyond. *Vaccines*. 2015. Vol. 3, n° 2, p. 320-343. DOI:10.3390/vaccines3020320.
- DICE, J.F. Microinjected ribonuclease A as a probe for lysosomal pathways of intracellular protein degradation. *Journal of Protein Chemistry*. 1988. Vol. 7, n° 2, p. 115-127. DOI:10.1007/BF01025241.
- DILA (DIRECTION DE L'INFORMATION LÉGALE ET ADMINISTRATIVE). Vaccins, vaccination: comment rétablir la confiance . En bref - Actualités - Vie-publique.fr. 2016. <https://www.vie-publique.fr/actualite/alaune/vaccins-comment-retablir-confiance-augmenter-couverture-population-20161206.html>.
- DINARELLO, C.A. Biologic basis for interleukin-1 in disease. *Blood*. 1996. Vol. 87, n° 6, p. 2095-2147.
- DOMINGO, J.L., GÓMEZ, M., BOSQUE, M.A. & CORBELLA, J. Lack of teratogenicity of aluminum hydroxide in mice. *Life Sciences*. 1989. Vol. 45, n° 3, p. 243-247. DOI:10.1016/0024-3205(89)90256-7.
- DOROZHKIN, S.V. & EPPLE, M. Biological and medical significance of calcium phosphates. *Angewandte Chemie International Edition*. 2002. Vol. 41, n° 17, p. 3130-3146.
- DOSTERT, C., PÉTRILLI, V., VAN BRUGGEN, R., STEELE, C., MOSSMAN, B.T. & TSCHOPP, J. Innate immune activation through Nalp3 inflammasome sensing of asbestos and silica. *Science (New York, N.Y.)*. 2008. Vol. 320, n° 5876, p. 674-677. DOI:10.1126/science.1156995.
- DOYNO, C., SOBIERAJ, D.M. & BAKER, W.L. Toxicity of chloroquine and hydroxychloroquine following therapeutic use or overdose. *Clinical Toxicology (Philadelphia, Pa.)*. 2021. Vol. 59, n° 1, p. 12-23. DOI:10.1080/15563650.2020.1817479.
- DREVETS, D.A., DILLON, M.J., SCHAWANG, J.S., VAN ROOIJEN, N., EHRCHEN, J., SUNDERKÖTTER, C. & LEENEN, P.J.M. The Ly-6Chigh monocyte subpopulation transports *Listeria monocytogenes* into the brain during systemic infection of mice. *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)*. 2004. Vol. 172, n° 7, p. 4418-4424.
- DUFOUR, A., THIBEAUX, R., LABRUYERE, E., GUILLEN, N. & OLIVO-MARIN, J.-C. 3-D Active Meshes: Fast Discrete Deformable Models for Cell Tracking in 3-D Time-Lapse Microscopy. *IEEE Transactions on Image Processing*. 2011. Vol. 20, n° 7, p. 1925-1937. DOI:10.1109/TIP.2010.2099125.
- E3M. Phosphate de calcium: une alternative aux sels d'aluminium. 2015a. <https://www.vaccinssansaluminium.org/phosphate-calcium-alternative/>.
- E3M. Suspension du DTPolio sans aluminium: des données falsifiées. *Pour des vaccins sans aluminium*. 2015b. <https://www.vaccinssansaluminium.org/suspension-dtpolio-sans-aluminium/>.
- E3M. Association d'Entraide aux Malades de Myofasciite à Macrophages. 2015c. <http://www.asso-e3m.fr/>.
- E3M. Annonce officielle : il existe une alternative à l'aluminium ! *Pour des vaccins sans aluminium*. 2016. <https://www.vaccinssansaluminium.org/alternative-aluminium/>.

- EDETSBERGER, M., GAUBITZER, E., VALIC, E., WAIGMANN, E. & KÖHLER, G. Detection of nanometer-sized particles in living cells using modern fluorescence fluctuation methods. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 2005. Vol. 332, n° 1, p. 109-116. DOI:10.1016/j.bbrc.2005.04.100.
- EICHENBAUM, H. A cortical–hippocampal system for declarative memory. *Nature Reviews Neuroscience*. 2000. Vol. 1, n° 1, p. 41. DOI:10.1038/35036213.
- EICKHOFF, T.C. & MYERS, M. Workshop summary. Aluminum in vaccines. *Vaccine*. 2002. Vol. 20 Suppl 3, p. S1-4.
- EIDI, H., DAVID, M.-O., CRÉPEAUX, G., HENRY, L., JOSHI, V., BERGER, M.-H., SENNOUR, M., CADUSSEAU, J., GHERARDI, R.K. & CURMI, P.A. Fluorescent nanodiamonds as a relevant tag for the assessment of alum adjuvant particle biodisposition. *BMC Medicine*. 2015. Vol. 13, n° 1. DOI:10.1186/s12916-015-0388-2.
- EIDI, H., JOUBERT, O., NÉMOS, C., GRANDEMANGE, S., MOGRABI, B., FOLIGUET, B., TOURNEBIZE, J., MAINCENT, P., LE FAOU, A., ABOUKHAMIS, I., *et al.* Drug delivery by polymeric nanoparticles induces autophagy in macrophages. *International Journal of Pharmaceutics*. 2012. Vol. 422, n° 1, p. 495-503. DOI:10.1016/j.ijpharm.2011.11.020.
- EISENBARTH, S.C., COLEGIO, O.R., O'CONNOR, W., SUTTERWALA, F.S. & FLAVELL, R.A. Crucial role for the Nalp3 inflammasome in the immunostimulatory properties of aluminium adjuvants. *Nature*. 2008. Vol. 453, n° 7198, p. 1122-1126. DOI:10.1038/nature06939.
- ELNAR, A.A., DIESEL, B., DESOR, F., FEIDT, C., BOUAYED, J., KIEMER, A.K. & SOULIMANI, R. Neurodevelopmental and behavioral toxicity via lactational exposure to the sum of six indicator non-dioxin-like-polychlorinated biphenyls (Σ 6 ND-L-PCBs) in mice. *Toxicology*. 2012. Vol. 299, n° 1, p. 44-54. DOI:10.1016/j.tox.2012.05.004.
- ERDOHAZI, M. & NEWMAN, R.L. Aluminium hydroxide granuloma. *British Medical Journal*. 1971. Vol. 3, n° 5775, p. 621-623.
- ESPINOSA, E. & CHILLET, P. *Immunologie*. Paris : Ellipses Marketing. 2010. ISBN:978-2-7298-6076-9.
- ESQUERRE, N., BASSO, L., DUBUQUOY, C., DJOUINA, M., CHAPPARD, D., BLANPIED, C., DESREUMAUX, P., VERGNOLLE, N., VIGNAL, C. & BODY-MALAPEL, M. Aluminum Ingestion Promotes Colorectal Hypersensitivity in Rodents. *Cellular and Molecular Gastroenterology and Hepatology*. 2019. Vol. 7, n° 1, p. 185-196. DOI:10.1016/j.jcmgh.2018.09.012.
- ESSMAN, W.B. & JARVIK, M.E. Extinction of a Response Conditioned in a Single Trial. *Psychological Reports*. 1961. Vol. 8, n° 2, p. 311-312. DOI:10.2466/pr0.1961.8.2.311.
- EUGENIN, E.A., OSIECKI, K., LOPEZ, L., GOLDSTEIN, H., CALDERON, T.M. & BERMAN, J.W. 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. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*. 2006. Vol. 26, n° 4, p. 1098-1106. DOI:10.1523/JNEUROSCI.3863-05.2006.
- EUROPEAN MEDICINES AGENCY. Human papillomavirus (HPV) vaccines. . 2015. p. 40.
- EXLEY, C. A biogeochemical cycle for aluminium? *Journal of Inorganic Biochemistry*. 2003. Vol. 97, n° 1, p. 1-7.

- EXLEY, C. Aluminium-based adjuvants should not be used as placebos in clinical trials. *Vaccine*. 2011. Vol. 29, n° 50, p. 9289. DOI:10.1016/j.vaccine.2011.08.062.
- EXLEY, C. Human exposure to aluminium. *Environmental Science: Processes & Impacts*. 2013. Vol. 15, n° 10, p. 1807-1816. DOI:10.1039/c3em00374d.
- EXLEY, C. What is the risk of aluminium as a neurotoxin? *Expert review of neurotherapeutics*. 2014a. Vol. 14, n° 6, p. 589-591. DOI:10.1586/14737175.2014.915745.
- EXLEY, C. Why industry propaganda and political interference cannot disguise the inevitable role played by human exposure to aluminum in neurodegenerative diseases, including Alzheimer's disease. *Frontiers in Neurology*. 2014b. Vol. 5, p. 212. DOI:10.3389/fneur.2014.00212.
- EXLEY, C. An aluminium adjuvant in a vaccine is an acute exposure to aluminium. *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology*. 2020. Vol. 57, p. 57-59. DOI:10.1016/j.jtemb.2019.09.010.
- EXLEY, C. & BIRCHALL, J.D. The cellular toxicity of aluminium. *Journal of Theoretical Biology*. 1992. Vol. 159, n° 1, p. 83-98.
- EXLEY, C. & CLARKSON, E. Aluminium in human brain tissue from donors without neurodegenerative disease: A comparison with Alzheimer's disease, multiple sclerosis and autism. *Scientific Reports*. 2020. Vol. 10, n° 1, p. 1-7. DOI:10.1038/s41598-020-64734-6.
- EXLEY, C. & MOLD, M.J. Imaging of aluminium and amyloid β in neurodegenerative disease. *Heliyon*. 2020. Vol. 6, n° 4, p. e03839. DOI:10.1016/j.heliyon.2020.e03839.
- EXLEY, C., SIESJÖ, P. & ERIKSSON, H. The immunobiology of aluminium adjuvants: how do they really work? *Trends in Immunology*. 2010. Vol. 31, n° 3, p. 103-109. DOI:10.1016/j.it.2009.12.009.
- EXLEY, C., SWARBRICK, L., GHERARDI, R.K. & AUTHIER, F.-J. A role for the body burden of aluminium in vaccine-associated macrophagic myofasciitis and chronic fatigue syndrome. *Medical Hypotheses*. 2009. Vol. 72, n° 2, p. 135-139. DOI:10.1016/j.mehy.2008.09.040.
- FATEMI, S.J., KADIR, F.H. & MOORE, G.R. Aluminium transport in blood serum. Binding of aluminium by human transferrin in the presence of human albumin and citrate. *The Biochemical Journal*. 1991. Vol. 280 (Pt 2), p. 527-532.
- FAVARATO, M., ZATTA, P., PERAZZOLO, M., FONTANA, L. & NICOLINI, M. Aluminum(III) influences the permeability of the blood-brain barrier to [14C]sucrose in rats. *Brain Research*. 1992. Vol. 569, n° 2, p. 330-335.
- FENG, X., HOU, H., ZOU, Y. & GUO, L. Defective autophagy is associated with neuronal injury in a mouse model of multiple sclerosis. *Bosnian Journal of Basic Medical Sciences*. 2017. Vol. 17, n° 2, p. 95-103. DOI:10.17305/bjbms.2017.1696.
- FERNANDES-ALNEMRI, T., WU, J., YU, J.-W., DATTA, P., MILLER, B., JANKOWSKI, W., ROSENBERG, S., ZHANG, J. & ALNEMRI, E.S. The pyroptosome: a supramolecular assembly of ASC dimers mediating inflammatory cell death via caspase-1 activation. *Cell Death & Differentiation*. 2007. Vol. 14, n° 9, p. 1590-1604. DOI:10.1038/sj.cdd.4402194.
- FERNANDEZ-GUERRA, P., GONZALEZ-EBSEN, A.C., BOONEN, S.E., COURRAUD, J., GREGERSEN, N., MEHLSSEN, J., PALMFELDT, J., OLSEN, R.K.J. & BRINTH, L.S. Bioenergetic and Proteomic Profiling of Immune Cells in Myalgic Encephalomyelitis/Chronic Fatigue Syndrome Patients: An Exploratory Study. *Biomolecules*. 2021. Vol. 11, n° 7, p. 961. DOI:10.3390/biom11070961.

- FIMIA, G.M., STOYKOVA, A., ROMAGNOLI, A., GIUNTA, L., DI BARTOLOMEO, S., NARDACCI, R., CORAZZARI, M., FUOCO, C., UCAR, A., SCHWARTZ, P., *et al.* Ambral regulates autophagy and development of the nervous system. *Nature*. 2007. Vol. 447, n° 7148, p. 1121-1125. DOI:10.1038/nature05925.
- FISCHER, D., REIMANN, J. & SCHRÖDER, R. [Macrophagic myofasciitis: inflammatory, vaccination-associated muscular disease]. *Deutsche Medizinische Wochenschrift (1946)*. 2003. Vol. 128, n° 44, p. 2305-2308. DOI:10.1055/s-2003-43184.
- FLACH, T.L., NG, G., HARI, A., DESROSIERS, M.D., ZHANG, P., WARD, S.M., SEAMONE, M.E., VILAYSANE, A., MUCSI, A.D., FONG, Y., *et al.* Alum interaction with dendritic cell membrane lipids is essential for its adjuvanticity. *Nature Medicine*. 2011. Vol. 17, n° 4, p. 479-487. DOI:10.1038/nm.2306.
- FLAREND, R.E., HEM, S.L., WHITE, J.L., ELMORE, D., SUCKOW, M.A., RUDY, A.C. & DANDASHLI, E.A. In vivo absorption of aluminium-containing vaccine adjuvants using 26 Al. *Vaccine*. 1997. Vol. 15, n° 12, p. 1314-1318.
- FLENDRIG, J.A., KRUIS, H. & DAS, H.A. Letter: Aluminum and dialysis dementia. *Lancet (London, England)*. 1976. Vol. 1, n° 7971, p. 1235.
- FLORA, S.J.S., MEHTA, A., SATSANGI, K., KANNAN, G.M. & GUPTA, M. Aluminum-induced oxidative stress in rat brain: response to combined administration of citric acid and HEDTA. *Comparative biochemistry and physiology. Toxicology & pharmacology: CBP*. 2003. Vol. 134, n° 3, p. 319-328.
- FORBES, G.B. *Human Body Composition: Growth, Aging, Nutrition, and Activity*. New York : Springer-Verlag. 1987. ISBN:978-1-4612-9100-8.
- FOREST, V., PAILLEUX, M., POURCHEZ, J., BOUDARD, D., TOMATIS, M., FUBINI, B., SENNOUR, M., HOICHEPIED, J.-F., GROSSEAU, P. & COTTIER, M. Toxicity of boehmite nanoparticles: impact of the ultrafine fraction and of the agglomerates size on cytotoxicity and pro-inflammatory response. *Inhalation Toxicology*. 2014. Vol. 26, n° 9, p. 545-553. DOI:10.3109/08958378.2014.925993.
- FOUGEREAU, M. De l'immunité innée à l'immunité adaptative: Un continuum. *Bulletin de l'Académie vétérinaire de France*. 2007.
- FOX, M.W. Natural environment: theoretical and practical aspects for breeding and rearing laboratory animals. *Laboratory Animal Care*. 1966. Vol. 16, n° 4, p. 316-321.
- FOX, W.M. Reflex-ontogeny and behavioural development of the mouse. *Animal Behaviour*. 1965. Vol. 13, n° 2, p. 234-241.
- FRANCHI, L. & NÚÑEZ, G. The Nlrp3 inflammasome is critical for aluminium hydroxide-mediated IL-1beta secretion but dispensable for adjuvant activity. *European Journal of Immunology*. 2008. Vol. 38, n° 8, p. 2085-2089. DOI:10.1002/eji.200838549.
- FREEMAN, H.C., HUGILL, A., DEAR, N.T., ASHCROFT, F.M. & COX, R.D. Deletion of nicotinamide nucleotide transhydrogenase: a new quantitative trait locus accounting for glucose intolerance in C57BL/6J mice. *Diabetes*. 2006. Vol. 55, n° 7, p. 2153-2156. DOI:10.2337/db06-0358.

- FREIBERGER, S.N., LEUTHARD, D.S., DUDA, A., CONTASSOT, E., THALLMAIR, M., KÜNDIG, T.M. & JOHANSEN, P. Intraperitoneal administration of aluminium-based adjuvants produces severe transient systemic adverse events in mice. *European Journal of Pharmaceutical Sciences: Official Journal of the European Federation for Pharmaceutical Sciences*. 2018. Vol. 115, p. 362-368. DOI:10.1016/j.ejps.2018.01.042.
- FREUND, J., CASALS, J. & HOSMER, E.P. Sensitization and antibody formation after injection of tubercle bacilli and paraffin oil. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine*. 1937. Vol. 37, n° 3, p. 509-513.
- FUJITA, N., ITOH, T., OMORI, H., FUKUDA, M., NODA, T. & YOSHIMORI, T. The Atg16L complex specifies the site of LC3 lipidation for membrane biogenesis in autophagy. *Molecular Biology of the Cell*. 2008. Vol. 19, n° 5, p. 2092-2100. DOI:10.1091/mbc.e07-12-1257.
- FUKUDA, K., STRAUS, S.E., HICKIE, I., SHARPE, M.C., DOBBINS, J.G. & KOMAROFF, A. The chronic fatigue syndrome: a comprehensive approach to its definition and study. International Chronic Fatigue Syndrome Study Group. *Annals of Internal Medicine*. 1994. Vol. 121, n° 12, p. 953-959. DOI:10.7326/0003-4819-121-12-199412150-00009.
- FULLE, S., PIETRANGELO, T., MANCINELLI, R., SAGGINI, R. & FANÒ, G. Specific correlations between muscle oxidative stress and chronic fatigue syndrome: a working hypothesis. *Journal of Muscle Research and Cell Motility*. 2007. Vol. 28, n° 6, p. 355-362. DOI:10.1007/s10974-008-9128-y.
- GALAIS, M., PRADEL, B., VERGNE, I., ROBERT-HEBMANN, V., ESPERT, L. & BIARD-PIECHACZYK, M. [LAP (LC3-associated phagocytosis): phagocytosis or autophagy?]. *Medicine Sciences: M/S*. 2019. Vol. 35, n° 8-9, p. 635-642. DOI:10.1051/medsci/2019129.
- GALINDO-VILLEGAS, J., GARCÍA-ALCAZAR, A., MESEGUER, J. & MULERO, V. Aluminum adjuvant potentiates gilthead seabream immune responses but induces toxicity in splenic melanomacrophage centers. *Fish & Shellfish Immunology*. 2019. Vol. 85, p. 31-43. DOI:10.1016/j.fsi.2018.02.047.
- GALLAGHER, C.M. & GOODMAN, M.S. Hepatitis B vaccination of male neonates and autism diagnosis, NHIS 1997-2002. *Journal of Toxicology and Environmental Health. Part A*. 2010. Vol. 73, n° 24, p. 1665-1677. DOI:10.1080/15287394.2010.519317.
- GARCIA, T., ESPARZA, J.L., NOGUÉS, M.R., ROMEU, M., DOMINGO, J.L. & GÓMEZ, M. Oxidative stress status and RNA expression in hippocampus of an animal model of Alzheimer's disease after chronic exposure to aluminum. *Hippocampus*. 2010. Vol. 20, n° 1, p. 218-225. DOI:10.1002/hipo.20612.
- GATEFF, C., RELYVELD, E.H., LE GONIDEC, G., VINCENT, J., LABUSQUIÈRE, R., MCBEAN, M., MONCHICOURT, D. & CHAMBON, L. Study of a new pentavalent vaccine combination. *Annales De Microbiologie*. 1973. Vol. 124, n° 3, p. 387-409.
- GELLY, J.-L. *Effets d'une sous-alimentation quantitative sur la rate et ses jeunes. Etude du développement sensori-moteur à l'aide d'une échelle cohérente de tests. Présentée pour l'obtention du doctorat de 3ème cycle en neurobiologie et biologie du comportement*. Nancy : Université Nancy 1. 1979. 151 p.
- GENG, J. & KLIONSKY, D.J. The Golgi as a potential membrane source for autophagy. *Autophagy*. 2010. Vol. 6, n° 7, p. 950-951. DOI:10.4161/auto.6.7.13009.

- GENG, J., NAIR, U., YASUMURA-YORIMITSU, K. & KLIONSKY, D.J. Post-Golgi Sec proteins are required for autophagy in *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular Biology of the Cell*. 2010. Vol. 21, n° 13, p. 2257-2269. DOI:10.1091/mbc.e09-11-0969.
- GHERARDI, R.K. Lessons from macrophagic myofasciitis: towards definition of a vaccine adjuvant-related syndrome. *Revue Neurologique*. 2003. Vol. 159, n° 2, p. 162-164.
- GHERARDI, R.K. *Toxic story: deux ou trois vérités embarrassantes sur les adjuvants des vaccins*. Paris : Actes sud. 2016. Questions de santé. ISBN:978-2-330-06893-6.
- GHERARDI, R.K., AOUIZERATE, J., CADUSSEAU, J., YARA, S. & AUTHIER, F.J. Aluminum adjuvants of vaccines injected into the muscle: Normal fate, pathology and associated disease. *Morphologie*. 2016. Vol. 100, n° 329, p. 85-94. DOI:10.1016/j.morpho.2016.01.002.
- GHERARDI, R.K. & AUTHIER, F.-J. Aluminum inclusion macrophagic myofasciitis: a recently identified condition. *Immunology and Allergy Clinics of North America*. 2003. Vol. 23, n° 4, p. 699-712.
- GHERARDI, R.K., CADUSSEAU, J. & AUTHIER, F. [Biopersistence and systemic distribution of intramuscularly injected particles: what impact on long-term tolerability of alum adjuvants?]. *Bulletin De l'Academie Nationale De Medecine*. 2014. Vol. 198, n° 1, p. 37-48; discussion 49-53.
- GHERARDI, R.K., COQUET, M., CHERIN, P., AUTHIER, F.J., LAFORÊT, P., BELEC, L., FIGARELLA-BRANGER, D., MUSSINI, J.M., PELLISSIER, J.F. & FARDEAU, M. Macrophagic myofasciitis: an emerging entity. *The Lancet*. 1998. Vol. 352, n° 9125, p. 347-352.
- GHERARDI, R.K., COQUET, M., CHERIN, P., BELEC, L., MORETTO, P., DREYFUS, P.A., PELLISSIER, J.F., CHARIOT, P. & AUTHIER, F.J. Macrophagic myofasciitis lesions assess long-term persistence of vaccine-derived aluminium hydroxide in muscle. *Brain: A Journal of Neurology*. 2001a. Vol. 124, n° 9, p. 1821-1831.
- GHERARDI, R.K., CRÉPEAUX, G. & AUTHIER, F.-J. Myalgia and chronic fatigue syndrome following immunization: macrophagic myofasciitis and animal studies support linkage to aluminum adjuvant persistency and diffusion in the immune system. *Autoimmunity Reviews*. 2019. Vol. 18, n° 7, p. 691-705. DOI:10.1016/j.autrev.2019.05.006.
- GHERARDI, R.K., EIDI, H., CRÉPEAUX, G., AUTHIER, F.J. & CADUSSEAU, J. Biopersistence and Brain Translocation of Aluminum Adjuvants of Vaccines. *Frontiers in Neurology*. 2015. Vol. 6, n° 4. DOI:10.3389/fneur.2015.00004.
- GHERARDI, R.K., PLONQUET, A., ANDRÉ, C., INTRATOR, L., PORON, F. & COQUET, M. Macrophagic myofasciitis: Evidence for chronic local and systemic immune activation associated with persistence of aluminum hydroxide-loaded macrophages in muscle. *Neurology*. 2001b. Vol. 56, p. A62.
- GHIMIRE, T.R., BENSON, R.A., GARSIDE, P. & BREWER, J.M. Alum increases antigen uptake, reduces antigen degradation and sustains antigen presentation by DCs in vitro. *Immunology Letters*. 2012. Vol. 147, n° 1-2, p. 55-62. DOI:10.1016/j.imlet.2012.06.002.
- GILBRIN, E. Gaston Ramon (1886-1963) Le soixantième anniversaire des anatoxines. *HISTOIRE DES SCIENCES MÉDICALES*. 1984. Vol. 18, n° 1, p. 96.
- GINEBRA, M.P., DRIESSENS, F.C.M. & PLANELL, J.A. Effect of the particle size on the micro and nanostructural features of a calcium phosphate cement: a kinetic analysis. *Biomaterials*. 2004. Vol. 25, n° 17, p. 3453-3462. DOI:10.1016/j.biomaterials.2003.10.049.

- GLASER, R. & KIECOLT-GLASER, J.K. Stress-associated immune modulation: relevance to viral infections and chronic fatigue syndrome. *The American Journal of Medicine*. 1998. Vol. 105, n° 3A, p. 35S-42S. DOI:10.1016/s0002-9343(98)00160-0.
- GLENNY, A.T., POPE, C.G., WADDINGTON, H. & WALLACE, U. Immunological notes. XVII–XXIV. *The Journal of Pathology and Bacteriology*. 1926. Vol. 29, n° 1, p. 31-40.
- GOISET, A., DARRIGADE, A.-S., LABRÈZE, C., BORALEVI, F. & MILPIED, B. Aluminium sensitization in a French paediatric patch test population. *Contact Dermatitis*. 2018. Vol. 79, n° 6, p. 382-383. DOI:10.1111/cod.13087.
- GOLUB, M.S., DONALD, J.M., GERSHWIN, M.E. & KEEN, C.L. Effects of aluminum ingestion on spontaneous motor activity of mice. *Neurotoxicology and Teratology*. 1989. Vol. 11, n° 3, p. 231-235.
- GOLUB, M.S. & GERMANN, S.L. Long-term consequences of developmental exposure to aluminum in a suboptimal diet for growth and behavior of Swiss Webster mice. *Neurotoxicology and Teratology*. 2001. Vol. 23, n° 4, p. 365-372.
- GOLUB, M.S., HAN, B., KEEN, C.L. & GERSHWIN, M.E. Effects of dietary aluminum excess and manganese deficiency on neurobehavioral endpoints in adult mice. *Toxicology and Applied Pharmacology*. 1992. Vol. 112, n° 1, p. 154-160.
- GOLUB, M.S., HAN, B., KEEN, C.L., GERSHWIN, M.E. & TARARA, R.P. Behavioral performance of Swiss Webster mice exposed to excess dietary aluminum during development or during development and as adults. *Toxicology and Applied Pharmacology*. 1995. Vol. 133, n° 1, p. 64-72. DOI:10.1006/taap.1995.1127.
- GÓMEZ, M., SÁNCHEZ, D.J., LLOBET, J.M., CORBELLA, J. & DOMINGO, J.L. The effect of age on aluminum retention in rats. *Toxicology*. 1997. Vol. 116, n° 1-3, p. 1-8.
- GONÇALVES, A.K., COBUCCI, R.N., RODRIGUES, H.M., DE MELO, A.G. & GIRALDO, P.C. Safety, tolerability and side effects of human papillomavirus vaccines: a systematic quantitative review. *The Brazilian Journal of Infectious Diseases: An Official Publication of the Brazilian Society of Infectious Diseases*. 2014. Vol. 18, n° 6, p. 651-659. DOI:10.1016/j.bjid.2014.02.005.
- GONG, Q., WU, Q., HUANG, X., SUN, A., NIE, J. & SHI, J. Protective effect of Ginkgo biloba leaf extract on learning and memory deficit induced by aluminum in model rats. *Chinese Journal of Integrative Medicine*. 2006. Vol. 12, n° 1, p. 37-41.
- GONZALEZ-MUÑOZ, M.J., MESEGUER, I., SANCHEZ-REUS, M.I., SCHULTZ, A., OLIVERO, R., BENEDÍ, J. & SÁNCHEZ-MUNIZ, F.J. Beer consumption reduces cerebral oxidation caused by aluminum toxicity by normalizing gene expression of tumor necrotic factor alpha and several antioxidant enzymes. *Food and Chemical Toxicology: An International Journal Published for the British Industrial Biological Research Association*. 2008. Vol. 46, n° 3, p. 1111-1118. DOI:10.1016/j.fct.2007.11.006.
- GOTO, N., KATO, H., MAEYAMA, J., ETO, K. & YOSHIHARA, S. Studies on the toxicities of aluminium hydroxide and calcium phosphate as immunological adjuvants for vaccines. *Vaccine*. 1993. Vol. 11, n° 9, p. 914-918.
- GOTO, N., KATO, H., MAEYAMA, J., SHIBANO, M., SAITO, T., YAMAGUCHI, J. & YOSHIHARA, S. Local tissue irritating effects and adjuvant activities of calcium phosphate and aluminium hydroxide with different physical properties. *Vaccine*. 1997. Vol. 15, n° 12, p. 1364-1371.

- GÖTZSCHE, P., JØRGENSEN, K., JEFFERSON, T., AUKEN, M. & BRINTH, L. Complaint to the European Medicines Agency (EMA) over maladministration at the EMA. 2016. <https://nordic.cochrane.org/sites/nordic.cochrane.org/files/public/uploads/ResearchHighlights/Complaint-to-EMA-over-EMA.pdf>.
- GOULLÉ, J.-P. & GRANGEOT-KEROS, L. Aluminum and vaccines: Current state of knowledge. *Medecine Et Maladies Infectieuses*. 2019. DOI:10.1016/j.medmal.2019.09.012.
- GROSLAMBERT, M. & PY, B.F. NLRP3, un inflammasome sous contrôle. *médecine/sciences*. 2018. Vol. 34, n° 1, p. 47-53. DOI:10.1051/medsci/20183401013.
- GRUMATI, P., COLETTI, L., SABATELLI, P., CESCONE, M., ANGELIN, A., BERTAGLIA, E., BLAAUW, B., URCIUOLO, A., TIEPOLO, T., MERLINI, L., *et al.* Autophagy is defective in collagen VI muscular dystrophies, and its reactivation rescues myofiber degeneration. *Nature Medicine*. 2010. Vol. 16, n° 11, p. 1313-1320. DOI:10.1038/nm.2247.
- GUIS, S., MATTEI, J.P., NICOLI, F., PELLISSIER, J.F., KAPLANSKI, G., FIGARELLA-BRANGER, D., MANEZ, G.C., ANTIPOFF, G.M. & ROUDIER, J. Identical twins with macrophagic myofasciitis: genetic susceptibility and triggering by alumine vaccine adjuvants? *Arthritis and Rheumatism*. 2002a. Vol. 47, n° 5, p. 543-545. DOI:10.1002/art.10666.
- GUIS, S., PELLISSIER, J.-F., NICOLI, F., REVIRON, D., MATTEI, J.-P., GHERARDI, R.K., PELLETIER, J., KAPLANSKI, G., FIGARELLA-BRANGER, D. & ROUDIER, J. HLA-DRB1*01 and macrophagic myofasciitis. *Arthritis and Rheumatism*. 2002b. Vol. 46, n° 9, p. 2535-2537. DOI:10.1002/art.10465.
- GUPTA, R.K. Aluminum compounds as vaccine adjuvants. *Advanced Drug Delivery Reviews*. 1998. Vol. 32, n° 3, p. 155-172.
- GUPTA, R.K., CHANG, A.-C., GRIFFIN, P., RIVERA, R. & SIBER, G.R. In vivo distribution of radioactivity in mice after injection of biodegradable polymer microspheres containing ¹⁴C-labeled tetanus toxoid. *Vaccine*. 1996. Vol. 14, n° 15, p. 1412-1416. DOI:10.1016/S0264-410X(96)00073-4.
- GUPTA, R.K., ROST, B.E., RELYVELD, E. & SIBER, G.R. Adjuvant properties of aluminum and calcium compounds. *Pharmaceutical Biotechnology*. 1995. Vol. 6, p. 229-248. DOI:10.1007/978-1-4615-1823-5_8.
- GUPTA, R.K. & SIBER, G.R. Comparison of adjuvant activities of aluminium phosphate, calcium phosphate and stearyl tyrosine for tetanus toxoid. *Biologicals: Journal of the International Association of Biological Standardization*. 1994. Vol. 22, n° 1, p. 53-63. DOI:10.1006/biol.1994.1008.
- GUPTA, S., AGGARWAL, S., SEE, D. & STARR, A. Cytokine production by adherent and non-adherent mononuclear cells in chronic fatigue syndrome. *Journal of Psychiatric Research*. 1997. Vol. 31, n° 1, p. 149-156. DOI:10.1016/S0022-3956(96)00063-5.
- GUPTA, S., AGGARWAL, S. & STARR, A. Increased production of interleukin-6 by adherent and non-adherent mononuclear cells during « natural fatigue » but not following « experimental fatigue » in patients with chronic fatigue syndrome. *International Journal of Molecular Medicine*. 1999. Vol. 3, n° 2, p. 209-213. DOI:10.3892/ijmm.3.2.209.

- GUTIERREZ, M.G., VÁZQUEZ, C.L., MUNAFÓ, D.B., ZOPPINO, F.C.M., BERÓN, W., RABINOVITCH, M. & COLOMBO, M.I. Autophagy induction favours the generation and maturation of the Coxiella-replicative vacuoles. *Cellular Microbiology*. 2005. Vol. 7, n° 7, p. 981-993. DOI:10.1111/j.1462-5822.2005.00527.x.
- HAILEY, D.W., RAMBOLD, A.S., SATPUTE-KRISHNAN, P., MITRA, K., SOUGRAT, R., KIM, P.K. & LIPPINCOTT-SCHWARTZ, J. Mitochondria supply membranes for autophagosome biogenesis during starvation. *Cell*. 2010. Vol. 141, n° 4, p. 656-667. DOI:10.1016/j.cell.2010.04.009.
- HALL, C.S. & BALLACHEY, E.L. *A study of the rat's behavior in a field; a contribution to method in comparative psychology*. Berkeley : Univ. of California Press. 1932.
- HAMILTON, J.A., BYRNE, R. & WHITTY, G. Particulate adjuvants can induce macrophage survival, DNA synthesis, and a synergistic proliferative response to GM-CSF and CSF-1. *Journal of Leukocyte Biology*. 2000. Vol. 67, n° 2, p. 226-232.
- HAMILTON, R.F., WU, N., PORTER, D., BUFORD, M., WOLFARTH, M. & HOLIAN, A. Particle length-dependent titanium dioxide nanomaterials toxicity and bioactivity. *Particle and Fibre Toxicology*. 2009. Vol. 6, p. 35. DOI:10.1186/1743-8977-6-35.
- HANADA, T., NODA, N.N., SATOMI, Y., ICHIMURA, Y., FUJIOKA, Y., TAKAO, T., INAGAKI, F. & OHSUMI, Y. The Atg12-Atg5 conjugate has a novel E3-like activity for protein lipidation in autophagy. *The Journal of Biological Chemistry*. 2007. Vol. 282, n° 52, p. 37298-37302. DOI:10.1074/jbc.C700195200.
- HARA, T., NAKAMURA, K., MATSUI, M., YAMAMOTO, A., NAKAHARA, Y., SUZUKI-MIGISHIMA, R., YOKOYAMA, M., MISHIMA, K., SAITO, I., OKANO, H., *et al.* Suppression of basal autophagy in neural cells causes neurodegenerative disease in mice. *Nature*. 2006. Vol. 441, n° 7095, p. 885-889. DOI:10.1038/nature04724.
- HARLAND, M., TORRES, S., LIU, J. & WANG, X. Neuronal Mitochondria Modulation of LPS-Induced Neuroinflammation. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*. 2020. Vol. 40, n° 8, p. 1756-1765. DOI:10.1523/JNEUROSCI.2324-19.2020.
- HASPEL, J., SHAIK, R.S., IFEDIGBO, E., NAKAHIRA, K., DOLINAY, T., ENGLERT, J.A. & CHOI, A.M.K. Characterization of macroautophagic flux in vivo using a leupeptin-based assay. *Autophagy*. 2011. Vol. 7, n° 6, p. 629-642.
- HAUSTEINER-WIEHLE, C. & HENNINGSEN, P. Irritable bowel syndrome: relations with functional, mental, and somatoform disorders. *World Journal of Gastroenterology*. 2014. Vol. 20, n° 20, p. 6024-6030. DOI:10.3748/wjg.v20.i20.6024.
- HAUT CONSEIL DE SANTÉ PUBLIQUE. Aluminium et vaccins. 2013. <http://www.hcsp.fr/>.
- HAYASHI, M., AOSHI, T., KOGAI, Y., NOMI, D., HASEDA, Y., KURODA, E., KOBIYAMA, K. & ISHII, K.J. Optimization of physiological properties of hydroxyapatite as a vaccine adjuvant. *Vaccine*. 2016. Vol. 34, n° 3, p. 306-312. DOI:10.1016/j.vaccine.2015.11.059.
- HAYASHI-NISHINO, M., FUJITA, N., NODA, T., YAMAGUCHI, A., YOSHIMORI, T. & YAMAMOTO, A. A subdomain of the endoplasmic reticulum forms a cradle for autophagosome formation. *Nature Cell Biology*. 2009. Vol. 11, n° 12, p. 1433-1437. DOI:10.1038/ncb1991.
- HAZELL, L. & SHAKIR, S.A.W. Under-reporting of adverse drug reactions : a systematic review. *Drug Safety*. 2006. Vol. 29, n° 5, p. 385-396. DOI:10.2165/00002018-200629050-00003.

- HE, Q., MITCHELL, A., MORCOL, T. & BELL, S.J.D. Calcium phosphate nanoparticles induce mucosal immunity and protection against herpes simplex virus type 2. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology*. 2002. Vol. 9, n° 5, p. 1021-1024. DOI:10.1128/CDLI.9.5.1021-1024.2002.
- HE, Q., MITCHELL, A.R., JOHNSON, S.L., WAGNER-BARTAK, C., MORCOL, T. & BELL, S.J.D. Calcium Phosphate Nanoparticle Adjuvant. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology*. 2000. Vol. 7, n° 6, p. 899-903.
- HE, S., WANG, C., DONG, H., XIA, F., ZHOU, H., JIANG, X., PEI, C., REN, H., LI, H., LI, R., *et al.* Immune-related GTPase M (IRGM1) regulates neuronal autophagy in a mouse model of stroke. *Autophagy*. 2012. Vol. 8, n° 11, p. 1621-1627. DOI:10.4161/auto.21561.
- HECKMANN, B.L., BOADA-ROMERO, E., CUNHA, L.D., MAGNE, J. & GREEN, D.R. LC3-Associated Phagocytosis and Inflammation. *Journal of Molecular Biology*. 2017. Vol. 429, n° 23, p. 3561-3576. DOI:10.1016/j.jmb.2017.08.012.
- HEILBRON, D.C., HOLLIDAY, M.A., AL-DAHWI, A. & KOGAN, B.A. Expressing glomerular filtration rate in children. *Pediatric Nephrology (Berlin, Germany)*. 1991. Vol. 5, n° 1, p. 5-11.
- HEM, S.L. Elimination of aluminum adjuvants. *Vaccine*. 2002. Vol. 20 Suppl 3, p. S40-43.
- HERD, H.L., MALUGIN, A. & GHANDEHARI, H. Silica nanoconstruct cellular toleration threshold in vitro. *Journal of Controlled Release: Official Journal of the Controlled Release Society*. 2011. Vol. 153, n° 1, p. 40-48. DOI:10.1016/j.jconrel.2011.02.017.
- HICKIE, I., DAVENPORT, T., WAKEFIELD, D., VOLLMER-CONNA, U., CAMERON, B., VERNON, S.D., REEVES, W.C., LLOYD, A., & DUBBO INFECTION OUTCOMES STUDY GROUP. Post-infective and chronic fatigue syndromes precipitated by viral and non-viral pathogens: prospective cohort study. *BMJ (Clinical research ed.)*. 2006. Vol. 333, n° 7568, p. 575. DOI:10.1136/bmj.38933.585764.AE.
- HOGENESCH, H. Mechanisms of stimulation of the immune response by aluminum adjuvants. *Vaccine*. 2002. Vol. 20 Suppl 3, p. S34-39.
- HOLSAPPLE, M.P., FARLAND, W.H., LANDRY, T.D., MONTEIRO-RIVIERE, N.A., CARTER, J.M., WALKER, N.J. & THOMAS, K.V. Research strategies for safety evaluation of nanomaterials, part II: toxicological and safety evaluation of nanomaterials, current challenges and data needs. *Toxicological Sciences: An Official Journal of the Society of Toxicology*. 2005. Vol. 88, n° 1, p. 12-17. DOI:10.1093/toxsci/kfi293.
- HORNIG, M., GOTTSCHALK, G., PETERSON, D.L., KNOX, K.K., SCHULTZ, A.F., EDDY, M.L., CHE, X. & LIPKIN, W.I. Cytokine network analysis of cerebrospinal fluid in myalgic encephalomyelitis/chronic fatigue syndrome. *Molecular Psychiatry*. 2016. Vol. 21, n° 2, p. 261-269. DOI:10.1038/mp.2015.29.
- HORNIG, M., MONTOYA, J.G., KLIMAS, N.G., LEVINE, S., FELSENSTEIN, D., BATEMAN, L., PETERSON, D.L., GOTTSCHALK, C.G., SCHULTZ, A.F., CHE, X., *et al.* Distinct plasma immune signatures in ME/CFS are present early in the course of illness. *Science Advances*. 2015. Vol. 1, n° 1. DOI:10.1126/sciadv.1400121.
- HORNUNG, V., BAUERNFEIND, F., HALLE, A., SAMSTAD, E.O., KONO, H., ROCK, K.L., FITZGERALD, K.A. & LATZ, E. Silica crystals and aluminum salts activate the NALP3 inflammasome through phagosomal destabilization. *Nature Immunology*. 2008. Vol. 9, n° 8, p. 847-856. DOI:10.1038/ni.1631.

- HOSOVSKI, E., MASTELICA, Z., SUNDERIĆ, D. & RADULOVIĆ, D. Mental abilities of workers exposed to aluminium. *La Medicina Del Lavoro*. 1990. Vol. 81, n° 2, p. 119-123.
- HOTOPF, M., DAVID, A., HULL, L., ISMAIL, K., UNWIN, C. & WESSELY, S. Role of vaccinations as risk factors for ill health in veterans of the Gulf war: cross sectional study. *BMJ (Clinical research ed.)*. 2000. Vol. 320, n° 7246, p. 1363-1367. DOI:10.1136/bmj.320.7246.1363.
- HOTTA, O., TANAKA, A., TORIGOE, A., IMAI, K., IEIRI, N., & JAPANESE FOCAL INFLAMMATION RESEARCH GROUP. Involvement of chronic epipharyngitis in autoimmune (auto-inflammatory) syndrome induced by adjuvants (ASIA). *Immunologic Research*. 2016. DOI:10.1007/s12026-016-8859-x.
- HOUSE, E., ESIRI, M., FORSTER, G., INCE, P.G. & EXLEY, C. Aluminium, iron and copper in human brain tissues donated to the Medical Research Council's Cognitive Function and Ageing Study. *Metallomics: Integrated Biometal Science*. 2012. Vol. 4, n° 1, p. 56-65. DOI:10.1039/c1mt00139f.
- HUBSCHER, T. Immune and biochemical mechanisms in the allergic disease of the upper respiratory tract; role of antibodies, target cells, mediators and eosinophils. *Annals of Allergy*. 1977. Vol. 38, n° 2, p. 83-90.
- HUTCHISON, S., BENSON, R.A., GIBSON, V.B., POLLOCK, A.H., GARSIDE, P. & BREWER, J.M. Antigen depot is not required for alum adjuvanticity. *The FASEB Journal*. 2011. Vol. 26, n° 3, p. 1272-1279. DOI:10.1096/fj.11-184556.
- ICKOVIC, M.R., RELYVELD, E.H., HÉNOCQ, E., DAVID, B. & MARIE, F.N. Calcium-phosphate-adjuvanted allergens: total and specific IgE levels before and after immunotherapy with house dust and Dermatophagoides pteronyssinus extracts. *Annales D'immunologie*. 1983. Vol. 134D, n° 3, p. 385-398.
- INSTITUT DE VEILLE SANITAIRE. Myofasciite à macrophages: rapport d'investigation exploratoire. 2001. [http://invs.santepubliquefrance.fr/pmb/invs/\(id\)/PMB_6076](http://invs.santepubliquefrance.fr/pmb/invs/(id)/PMB_6076).
- INSTITUTE OF MEDICINE COMMITTEE ON THE DIAGNOSTIC CRITERIA FOR ME/CFS. *Beyond Myalgic Encephalomyelitis/Chronic Fatigue Syndrome: Redefining an Illness*. National Academies Press (US). Washington DC. 2015. cr. ISBN:978-0-309-31689-7.
- INVS-AFSSA-AFSSAPS. Aluminium. Quels risques pour la santé? Synthèse des études épidémiologiques. 2003. [http://invs.santepubliquefrance.fr/pmb/invs/\(id\)/PMB_5960](http://invs.santepubliquefrance.fr/pmb/invs/(id)/PMB_5960).
- ISRAELI, E., AGMON-LEVIN, N., BLANK, M. & SHOENFELD, Y. Macrophagic myofasciitis a vaccine (alum) autoimmune-related disease. *Clinical Reviews in Allergy & Immunology*. 2011. Vol. 41, n° 2, p. 163-168. DOI:10.1007/s12016-010-8212-4.
- ISSA, A.M., SALIM, M.S., ZIDAN, H., MOHAMED, A.F. & FARRAG, A.-R.H. Evaluation of the Effects of Aluminum Phosphate and Calcium Phosphate Nanoparticles as Adjuvants in Vaccinated Mice. *International Journal of Chemical Engineering and Applications*. 2014. Vol. 5, n° 5, p. 367-373. DOI:10.7763/IJCEA.2014.V5.411.
- IWAI-KANAI, E., YUAN, H., HUANG, C., SAYEN, M.R., PERRY-GARZA, C.N., KIM, L. & GOTTLIEB, R.A. A method to measure cardiac autophagic flux in vivo. *Autophagy*. 2008. Vol. 4, n° 3, p. 322-329.
- IYER, S., HOGENESCH, H. & HEM, S.L. Effect of the degree of phosphate substitution in aluminum hydroxide adjuvant on the adsorption of phosphorylated proteins. *Pharmaceutical Development and Technology*. 2003. Vol. 8, n° 1, p. 81-86. DOI:10.1081/PDT-120017526.

- IYER, S., ROBINETT, R.S.R., HOGENESCH, H. & HEM, S.L. Mechanism of adsorption of hepatitis B surface antigen by aluminum hydroxide adjuvant. *Vaccine*. 2004. Vol. 22, n° 11-12, p. 1475-1479. DOI:10.1016/j.vaccine.2003.10.023.
- JACOBS, G., WILLIAMS, G. & FENWICK, J. Jacobs, GH, Williams, GA and Fenwick, JA. Influence of cone pigment coexpression on spectral sensitivity and color vision in the mouse. *Vision Res* 44: 1615-1622. *Vision research*. 2004. Vol. 44, p. 1615-22. DOI:10.1016/j.visres.2004.01.016.
- JACQUIN, E., LECLERC-MERCIER, S., JUDON, C., BLANCHARD, E., FRAITAG, S. & FLOREY, O. Pharmacological modulators of autophagy activate a parallel noncanonical pathway driving unconventional LC3 lipidation. *Autophagy*. 2017. Vol. 13, n° 5, p. 854-867. DOI:10.1080/15548627.2017.1287653.
- JÄGER, S., BUCCI, C., TANIDA, I., UENO, T., KOMINAMI, E., SAFTIG, P. & ESKELINEN, E.-L. Role for Rab7 in maturation of late autophagic vacuoles. *Journal of Cell Science*. 2004. Vol. 117, n° Pt 20, p. 4837-4848. DOI:10.1242/jcs.01370.
- JAHREISS, L., MENZIES, F.M. & RUBINSZTEIN, D.C. The itinerary of autophagosomes: from peripheral formation to kiss-and-run fusion with lysosomes. *Traffic (Copenhagen, Denmark)*. 2008. Vol. 9, n° 4, p. 574-587. DOI:10.1111/j.1600-0854.2008.00701.x.
- JAMON, M. & CLARAC, F. Early walking in the neonatal rat: a kinematic study. *Behavioral Neuroscience*. 1998. Vol. 112, n° 5, p. 1218-1228. DOI:10.1037//0735-7044.112.5.1218.
- JASTANIAH, W.A., DOBSON, S., LUGSDIN, J.G. & PETTY, R.E. Complex regional pain syndrome after hepatitis B vaccine. *The Journal of Pediatrics*. 2003. Vol. 143, n° 6, p. 802-804. DOI:10.1067/S0022-3476(03)00536-5.
- JIA, Y., ZHONG, C. & WANG, Y. [Effects of aluminum on amino acid neurotransmitters in hippocampus of rats]. *Zhonghua Yu Fang Yi Xue Za Zhi [Chinese Journal of Preventive Medicine]*. 2001. Vol. 35, n° 6, p. 397-400.
- JIA, Y., ZHONG, C., WANG, Y. & ZHAO, R. [Effects of aluminum intake on the content of aluminum, iron, zinc and lipid peroxidation in the hippocampus of rats]. *Wei Sheng Yan Jiu = Journal of Hygiene Research*. 2001. Vol. 30, n° 3, p. 132-134.
- JIANG, D., CHEN, K., LU, X., GAO, H., QIN, Z. & LIN, F. Exercise ameliorates the detrimental effect of chloroquine on skeletal muscles in mice via restoring autophagy flux. *Acta Pharmacologica Sinica*. 2014. Vol. 35, n° 1, p. 135-142. DOI:10.1038/aps.2013.144.
- JIANG, D., PREMACHANDRA, G.S., JOHNSTON, C. & HEM, S.L. Structure and adsorption properties of commercial calcium phosphate adjuvant. *Vaccine*. 2004. Vol. 23, n° 5, p. 693-698. DOI:10.1016/j.vaccine.2004.06.029.
- JIANG, P. & MIZUSHIMA, N. LC3- and p62-based biochemical methods for the analysis of autophagy progression in mammalian cells. *Methods (San Diego, Calif.)*. 2015. Vol. 75, p. 13-18. DOI:10.1016/j.ymeth.2014.11.021.
- JO, E.-K., KIM, J.K., SHIN, D.-M. & SASAKAWA, C. Molecular mechanisms regulating NLRP3 inflammasome activation. *Cellular & Molecular Immunology*. 2016. Vol. 13, n° 2, p. 148-159. DOI:10.1038/cmi.2015.95.
- JOHN, T.J. & SAMUEL, R. Herd immunity and herd effect: new insights and definitions. *European Journal of Epidemiology*. 2000. Vol. 16, n° 7, p. 601-606.

- JOHNSTON, C.T., WANG, S.-L. & HEM, S.L. Measuring the surface area of aluminum hydroxide adjuvant. *Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2002. Vol. 91, n° 7, p. 1702-1706. DOI:10.1002/jps.10166.
- JOHNSTON, M.V., ISHIDA, A., ISHIDA, W.N., MATSUSHITA, H.B., NISHIMURA, A. & TSUJI, M. Plasticity and Injury in the Developing Brain. *Brain & development*. 2009. Vol. 31, n° 1, p. 1-10. DOI:10.1016/j.braindev.2008.03.014.
- JONES, S., ASOKANATHAN, C., KMIEC, D., IRVINE, J., FLECK, R., XING, D., MOORE, B., PARTON, R. & COOTE, J. Protein coated microcrystals formulated with model antigens and modified with calcium phosphate exhibit enhanced phagocytosis and immunogenicity. *Vaccine*. 2014. Vol. 32, n° 33, p. 4234-4242. DOI:10.1016/j.vaccine.2013.09.061.
- JYOTI, A., SETHI, P. & SHARMA, D. Bacopa monniera prevents from aluminium neurotoxicity in the cerebral cortex of rat brain. *Journal of Ethnopharmacology*. 2007. Vol. 111, n° 1, p. 56-62. DOI:10.1016/j.jep.2006.10.037.
- JYOTI, A. & SHARMA, D. Neuroprotective role of Bacopa monniera extract against aluminium-induced oxidative stress in the hippocampus of rat brain. *Neurotoxicology*. 2006. Vol. 27, n° 4, p. 451-457. DOI:10.1016/j.neuro.2005.12.007.
- KADDAR, M. Global vaccine market features and trends. 2012. https://www.who.int/influenza_vaccines_plan/resources/session_10_kaddar.pdf.
- KAKKAR, V. & KAUR, I.P. Evaluating potential of curcumin loaded solid lipid nanoparticles in aluminium induced behavioural, biochemical and histopathological alterations in mice brain. *Food and Chemical Toxicology: An International Journal Published for the British Industrial Biological Research Association*. 2011. Vol. 49, n° 11, p. 2906-2913. DOI:10.1016/j.fct.2011.08.006.
- KALUEFF, A.V., KEISALA, T., MINASYAN, A., KUUSLAHTI, M., MIETTINEN, S. & TUOHIMAA, P. Behavioural anomalies in mice evoked by « Tokyo » disruption of the Vitamin D receptor gene. *Neuroscience Research*. 2006. Vol. 54, n° 4, p. 254-260. DOI:10.1016/j.neures.2005.12.008.
- KANG, S.-J. & LOCKSLEY, R.M. The inflammasome and alum-mediated adjuvanticity. *F1000 Biology Reports*. 2009. Vol. 1, p. 15. DOI:10.3410/B1-15.
- KAUFMAN, B.A. & MORA, A.L. IRGM1, a guardian of mitochondrial DAMP-mediated autoinflammation. *Nature Immunology*. 2021. Vol. 22, n° 3, p. 272-273. DOI:10.1038/s41590-021-00877-6.
- KAUFMANN, A.M. & KRISE, J.P. Lysosomal sequestration of amine-containing drugs: analysis and therapeutic implications. *Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2007. Vol. 96, n° 4, p. 729-746. DOI:10.1002/jps.20792.
- KAUSHIK, S. & CUERVO, A.M. Chaperone-mediated autophagy: a unique way to enter the lysosome world. *Trends in cell biology*. 2012. Vol. 22, n° 8, p. 407-417. DOI:10.1016/j.tcb.2012.05.006.
- KAWAHARA, M. & KATO-NEGISHI, M. Link between Aluminum and the Pathogenesis of Alzheimer's Disease: The Integration of the Aluminum and Amyloid Cascade Hypotheses. *International Journal of Alzheimer's Disease*. 2011. Vol. 2011, p. 276393. DOI:10.4061/2011/276393.
- KEITH, L.S., JONES, D.E. & CHOU, C.H.S.J. Aluminum toxicokinetics regarding infant diet and vaccinations. *Vaccine*. 2002. Vol. 20 Suppl 3, p. S13-17.

- KENNEDY, G., NORRIS, G., SPENCE, V., MCLAREN, M. & BELCH, J.J.F. Is chronic fatigue syndrome associated with platelet activation? *Blood Coagulation & Fibrinolysis: An International Journal in Haemostasis and Thrombosis*. 2006. Vol. 17, n° 2, p. 89-92. DOI:10.1097/01.mbc.0000214705.80997.73.
- KESSLER, D.A. Introducing MEDWatch. A new approach to reporting medication and device adverse effects and product problems. *JAMA*. 1993. Vol. 269, n° 21, p. 2765-2768.
- KHAN, Z., COMBADIÈRE, C., AUTHIER, F.-J., ITIER, V., LUX, F., EXLEY, C., MAHROUF-YORGOV, M., DECROUY, X., MORETTO, P., TILLEMENT, O., *et al.* Slow CCL2-dependent translocation of biopersistent particles from muscle to brain. *BMC medicine*. 2013. Vol. 11, n° 1, p. 99.
- KIERDORF, K., MASUDA, T., JORDÃO, M.J.C. & PRINZ, M. Macrophages at CNS interfaces: ontogeny and function in health and disease. *Nature Reviews. Neuroscience*. 2019. Vol. 20, n° 9, p. 547-562. DOI:10.1038/s41583-019-0201-x.
- KILBURN, K.H. Neurobehavioral impairment and symptoms associated with aluminum remelting. *Archives of Environmental Health*. 1998. Vol. 53, n° 5, p. 329-335. DOI:10.1080/00039899809605717.
- KIM, H., LIM, K.Y., KANG, J., PARK, J.W. & PARK, S.-H. Macrophagic myofasciitis and subcutaneous pseudolymphoma caused by aluminium adjuvants. *Scientific Reports*. 2020. Vol. 10, n° 1, p. 11834. DOI:10.1038/s41598-020-68849-8.
- KIM, H.-J., CHO, M.-H., SHIM, W.H., KIM, J.K., JEON, E.-Y., KIM, D.-H. & YOON, S.-Y. Deficient autophagy in microglia impairs synaptic pruning and causes social behavioral defects. *Molecular Psychiatry*. 2017. Vol. 22, n° 11, p. 1576-1584. DOI:10.1038/mp.2016.103.
- KIM, K. Perinatal exposure to aluminum alters neuronal nitric oxide synthase expression in the frontal cortex of rat offspring. *Brain Research Bulletin*. 2003. Vol. 61, n° 4, p. 437-441. DOI:10.1016/S0361-9230(03)00159-X.
- KIM, S.E. & CHANG, L. Overlap between functional GI disorders and other functional syndromes: what are the underlying mechanisms? *Neurogastroenterology and Motility: The Official Journal of the European Gastrointestinal Motility Society*. 2012. Vol. 24, n° 10, p. 895-913. DOI:10.1111/j.1365-2982.2012.01993.x.
- KIMURA, S., NODA, T. & YOSHIMORI, T. Dynein-dependent movement of autophagosomes mediates efficient encounters with lysosomes. *Cell Structure and Function*. 2008. Vol. 33, n° 1, p. 109-122. DOI:10.1247/csf.08005.
- KINAWY, A.A. Synergistic oxidative impact of aluminum chloride and sodium fluoride exposure during early stages of brain development in the rat. *Environmental Science and Pollution Research International*. 2019. Vol. 26, n° 11, p. 10951-10960. DOI:10.1007/s11356-019-04491-w.
- KINOSHITA, T., ABE, R.-T., HINENO, A., TSUNEKAWA, K., NAKANE, S. & IKEDA, S.-I. Peripheral sympathetic nerve dysfunction in adolescent Japanese girls following immunization with the human papillomavirus vaccine. *Internal Medicine (Tokyo, Japan)*. 2014. Vol. 53, n° 19, p. 2185-2200.
- KLIONSKY, D.J., ABDEL-AZIZ, A.K., ABDEL-FATAH, S., ABDELLATIF, M., ABDOLI, A., ABEL, S., ABELIOVICH, H., ABILDGAARD, M.H., ABUDU, Y.P., ACEVEDO-ARZENA, A., *et al.* Guidelines for the use and interpretation of assays for monitoring autophagy (4th edition). *Autophagy*. 2021. Vol. 0, n° 0, p. 1-382. DOI:10.1080/15548627.2020.1797280.

- KLIONSKY, D.J., ABDELMOHSEN, K., ABE, A., ABEDIN, M.J., ABELIOVICH, H., ACEVEDO AROZENA, A., ADACHI, H., ADAMS, C.M., ADAMS, P.D., ADELI, K., *et al.* Guidelines for the use and interpretation of assays for monitoring autophagy (3rd edition). *Autophagy*. 2016. Vol. 12, n° 1, p. 1-222. DOI:10.1080/15548627.2015.1100356.
- KNUSCHKE, T., EPPLER, M. & WESTENDORF, A.M. The type of adjuvant strongly influences the T-cell response during nanoparticle-based immunization. *Human Vaccines & Immunotherapeutics*. 2014. Vol. 10, n° 1, p. 164-169. DOI:10.4161/hv.26203.
- KOMAROFF, A.L. & BUCHWALD, D.S. Chronic fatigue syndrome: an update. *Annual Review of Medicine*. 1998. Vol. 49, p. 1-13. DOI:10.1146/annurev.med.49.1.1.
- KONDZIELLA, W. A new method for the measurement of muscle relaxation in white mice. *Archives Internationales De Pharmacodynamie Et De Therapie*. 1964. Vol. 152, p. 277-284.
- KOOIJMAN, S., BRUMMELMAN, J., VAN ELS, C.A.C.M., MARINO, F., HECK, A.J.R., VAN RIET, E., METZ, B., KERSTEN, G.F.A., PENNING, J.L.A. & MEIRING, H.D. Vaccine antigens modulate the innate response of monocytes to Al(OH)₃. *PloS One*. 2018. Vol. 13, n° 5, p. e0197885. DOI:10.1371/journal.pone.0197885.
- KOOL, M., PÉTRILLI, V., DE SMEDT, T., ROLAZ, A., HAMMAD, H., VAN NIMWEGEN, M., BERGEN, I.M., CASTILLO, R., LAMBRECHT, B.N. & TSCHOPP, J. Cutting edge: alum adjuvant stimulates inflammatory dendritic cells through activation of the NALP3 inflammasome. *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)*. 2008. Vol. 181, n° 6, p. 3755-3759.
- KOPPAD, S., RAJ, G.D., GOPINATH, V.P., KIRUBAHARAN, J.J., THANGAVELU, A. & THIAGARAJAN, V. Calcium phosphate coupled Newcastle disease vaccine elicits humoral and cell mediated immune responses in chickens. *Research in Veterinary Science*. 2011. Vol. 91, n° 3, p. 384-390. DOI:10.1016/j.rvsc.2010.09.008.
- KOUPERNIK, C. & DAILLY, R. *Développement neuro-psychique du nourrisson*. Presses universitaires de France. 1972.
- KOWALSKI, W.J., BAHNFLETH, W.P. & WHITTAM, T.S. Filtration of Airborne Microorganisms: Modeling and Prediction. *ASHRAE Transactions*. 1999. Vol. 105, n° 2, p. 4-17.
- KUMA, A., HATANO, M., MATSUI, M., YAMAMOTO, A., NAKAYA, H., YOSHIMORI, T., OHSUMI, Y., TOKUHISA, T. & MIZUSHIMA, N. The role of autophagy during the early neonatal starvation period. *Nature*. 2004. Vol. 432, n° 7020, p. 1032-1036. DOI:10.1038/nature03029.
- KUMA, A., KOMATSU, M. & MIZUSHIMA, N. Autophagy-monitoring and autophagy-deficient mice. *Autophagy*. 2017. Vol. 13, n° 10, p. 1619-1628. DOI:10.1080/15548627.2017.1343770.
- KUMA, A., MIZUSHIMA, N., ISHIHARA, N. & OHSUMI, Y. Formation of the approximately 350-kDa Apg12-Apg5-Apg16 multimeric complex, mediated by Apg16 oligomerization, is essential for autophagy in yeast. *The Journal of Biological Chemistry*. 2002. Vol. 277, n° 21, p. 18619-18625. DOI:10.1074/jbc.M111889200.
- KUMAR, S. Biphasic effect of aluminium on cholinergic enzyme of rat brain. *Neuroscience Letters*. 1998. Vol. 248, n° 2, p. 121-123. DOI:10.1016/S0304-3940(98)00267-5.
- KUNDU, M., LINDSTEN, T., YANG, C.-Y., WU, J., ZHAO, F., ZHANG, J., SELAK, M.A., NEY, P.A. & THOMPSON, C.B. Ulk1 plays a critical role in the autophagic clearance of mitochondria and ribosomes during reticulocyte maturation. *Blood*. 2008. Vol. 112, n° 4, p. 1493-1502. DOI:10.1182/blood-2008-02-137398.

- KUSHLAF, H.A. Emerging toxic neuropathies and myopathies. *Neurologic Clinics*. 2011. Vol. 29, n° 3, p. 679-687. DOI:10.1016/j.ncl.2011.05.009.
- LAI, S. & DEVENISH, R.J. LC3-Associated Phagocytosis (LAP): Connections with Host Autophagy. *Cells*. 2012. Vol. 1, n° 3, p. 396-408. DOI:10.3390/cells1030396.
- LAMBRECHT, B.N., KOOL, M., WILLART, M.A. & HAMMAD, H. Mechanism of action of clinically approved adjuvants. *Current opinion in immunology*. 2009. Vol. 21, n° 1, p. 23-29. DOI:10.1016/j.coi.2009.01.004.
- LANDAY, A.L., JESSOP, C., LENNETTE, E.T. & LEVY, J.A. Chronic fatigue syndrome: clinical condition associated with immune activation. *Lancet (London, England)*. 1991. Vol. 338, n° 8769, p. 707-712.
- LANT, B. & STOREY, K.B. An overview of stress response and hypometabolic strategies in *Caenorhabditis elegans*: conserved and contrasting signals with the mammalian system. *International Journal of Biological Sciences*. 2010. Vol. 6, n° 1, p. 9-50. DOI:10.7150/ijbs.6.9.
- LAPAQUETTE, P., NGUYEN, H.T.T. & FAURE, M. [Regulation of immunity and inflammation by autophagy: « All is well, all is fine, all goes as well as possible »]. *Medecine Sciences: M/S*. 2017. Vol. 33, n° 3, p. 305-311. DOI:10.1051/medsci/20173303018.
- LASKUS, T., RADKOWSKI, M., ADAIR, D., WILKINSON, J., SCHECK, A. & RAKELA, J. Emerging evidence of hepatitis C virus neuroinvasion. *Aids*. 2005. Vol. 19. DOI:10.1097/01.aids.0000192083.41561.00.
- LAUNAY, O. Dossier vaccins et vaccination 2015. 2015. <http://www.inserm.fr/thematiques/immunologie-inflammation-infectiologie-et-microbiologie/dossiers-d-information/vaccins->.
- LAZARO, E., DOUTRE, M.S., COQUET, M., BOUILLOT, S., BEYLOT-BARRY, M. & BEYLOT, C. [Coexistence of dermatomyositis and macrophagic myofasciitis]. *Presse Medicale (Paris, France: 1983)*. 2005. Vol. 34, n° 6, p. 438-440.
- LECADET, A., ICKOVIC, M.R. & THIBAUDON, M. Specific desensitization with allergen extracts absorbed on calcium phosphate (Pasteur Institute). Clinical and biological study apropos of 107 cases. *Allergie et immunologie*. 1988. Vol. 20, n° 4, p. 153-155.
- LEE, S.H. Detection of human papillomavirus (HPV) L1 gene DNA possibly bound to particulate aluminum adjuvant in the HPV vaccine Gardasil. *Journal of Inorganic Biochemistry*. 2012. Vol. 117, p. 85-92. DOI:10.1016/j.jinorgbio.2012.08.015.
- LEE, T.C.B., John Foerster, John W. Athens, John N. Lukens G. Richard. *Wintrobe's Clinical Hematology, Ninth Edition*,. Ninth Edition. Lea & Febiger. 1993.
- LEGIFRANCE.GOUV.FR. *Code de la santé publique - Article L1111-4*. 2002. https://www.legifrance.gouv.fr/affichCodeArticle.do;jsessionid=9E353C14CD5CB42BEC7220D6A8FC1DAB.tplgfr39s_1?cidTexte=LEGITEXT000006072665&idArticle=LEGIARTI000006685766&dateTexte=20180118&categorieLien=id#LEGIARTI000006685766
- LEGIFRANCE.GOUV.FR. *Code de la santé publique - Article L3116-4*. 2007. <https://www.legifrance.gouv.fr/affichCodeArticle.do?cidTexte=LEGITEXT000006072665&idArticle=LEGIARTI000006687829>
- LEGIFRANCE.GOUV.FR. Décret n° 2018-42 du 25 janvier 2018 relatif à la vaccination obligatoire. 2018. <https://www.legifrance.gouv.fr/eli/decret/2018/1/25/SSAP1732098D/jo/texte>.

- LÉRY, L. Haemolytic activity of calcium phosphate adjuvant. *Vaccine*. 1994. Vol. 12, n° 5, p. 475.
- LETZEL, S., LANG, C.J., SCHALLER, K.H., ANGERER, J., FUCHS, S., NEUNDÖRFER, B. & LEHNERT, G. Longitudinal study of neurotoxicity with occupational exposure to aluminum dust. *Neurology*. 2000. Vol. 54, n° 4, p. 997-1000. DOI:10.1212/wnl.54.4.997.
- LEVADITI, J.C. & RELYVELD, E. Local tolerance of vaccines adsorbed on immuno-stimulating substances. *Semaine Des Hôpitaux. Thérapeutique*. 1975. Vol. 51, n° 2, p. 117-118.
- LEVINE, B. & KROEMER, G. Biological Functions of Autophagy Genes: A Disease Perspective. *Cell*. 2019. Vol. 176, n° 1-2, p. 11-42. DOI:10.1016/j.cell.2018.09.048.
- LI, H., LI, Y., JIAO, J. & HU, H.-M. Alpha-alumina nanoparticles induce efficient autophagy-dependent cross-presentation and potent antitumour response. *Nature Nanotechnology*. 2011. Vol. 6, n° 10, p. 645-650. DOI:10.1038/nnano.2011.153.
- LI, H., WILLINGHAM, S.B., TING, J.P.-Y. & RE, F. Cutting edge: inflammasome activation by alum and alum's adjuvant effect are mediated by NLRP3. *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)*. 2008. Vol. 181, n° 1, p. 17-21.
- LI, Q., QI, F., YANG, J., ZHANG, L., GU, H., ZOU, J., YUAN, Q. & YAO, Z. Neonatal vaccination with bacillus Calmette–Guérin and hepatitis B vaccines modulates hippocampal synaptic plasticity in rats. *Journal of Neuroimmunology*. 2015. Vol. 288, p. 1-12. DOI:10.1016/j.jneuroim.2015.08.019.
- LI, W., LI, J. & BAO, J. Microautophagy: lesser-known self-eating. *Cellular and Molecular Life Sciences*. 2012. Vol. 69, n° 7, p. 1125-1136. DOI:10.1007/s00018-011-0865-5.
- LI, X., YANG, Y., HU, H. & WANG, Q. [Effect of aluminum trichloride on dissociated Ca²⁺ in Hippocampus neuron cell as well as learning and memory]. *Zhonghua Lao Dong Wei Sheng Zhi Ye Bing Za Zhi = Zhonghua Laodong Weisheng Zhiyebing Zazhi = Chinese Journal of Industrial Hygiene and Occupational Diseases*. 2006. Vol. 24, n° 3, p. 161-163.
- LIANG, C., FENG, P., KU, B., DOTAN, I., CANAANI, D., OH, B.-H. & JUNG, J.U. Autophagic and tumour suppressor activity of a novel Beclin1-binding protein UVRAG. *Nature Cell Biology*. 2006. Vol. 8, n° 7, p. 688-699. DOI:10.1038/ncb1426.
- LIANG, C., LEE, J., INN, K., GACK, M.U., LI, Q., ROBERTS, E.A., VERGNE, I., DERETIC, V., FENG, P., AKAZAWA, C., *et al.* Beclin1-binding UVRAG targets the class C Vps complex to coordinate autophagosome maturation and endocytic trafficking. *Nature Cell Biology*. 2008. Vol. 10, n° 7, p. 776-787. DOI:10.1038/ncb1740.
- LIANG, N., ZHONG, Y., ZHOU, J., LIU, B., LU, R., GUAN, Y., WANG, Q., LIANG, C., HE, Y., ZHOU, Y., *et al.* Immunosuppressive effects of hydroxychloroquine and artemisinin combination therapy via the nuclear factor- κ B signaling pathway in lupus nephritis mice. *Experimental and Therapeutic Medicine*. 2018. Vol. 15, n° 3, p. 2436-2442. DOI:10.3892/etm.2018.5708.
- LIANG, X.-F., WANG, H.-Q., WANG, J.-Z., FANG, H.-H., WU, J., ZHU, F.-C., LI, R.-C., XIA, S.-L., ZHAO, Y.-L., LI, F.-J., *et al.* Safety and immunogenicity of 2009 pandemic influenza A H1N1 vaccines in China: a multicentre, double-blind, randomised, placebo-controlled trial. *Lancet (London, England)*. 2010. Vol. 375, n° 9708, p. 56-66. DOI:10.1016/S0140-6736(09)62003-1.
- LIAO, H., FRANCK, E., FRÉRET, M., ADRIOUCH, S., BABA-AMER, Y., AUTHIER, F.-J., BOYER, O. & GHERARDI, R.K. Myoinjury transiently activates muscle antigen-specific CD8⁺ T cells in lymph nodes in a mouse model. *Arthritis and Rheumatism*. 2012. Vol. 64, n° 10, p. 3441-3451. DOI:10.1002/art.34551.

- LIM, H.-S., IM, J.-S., CHO, J.-Y., BAE, K.-S., KLEIN, T.A., YEOM, J.-S., KIM, T.-S., CHOI, J.-S., JANG, I.-J. & PARK, J.-W. Pharmacokinetics of Hydroxychloroquine and Its Clinical Implications in Chemoprophylaxis against Malaria Caused by *Plasmodium vivax*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 2009. Vol. 53, n° 4, p. 1468-1475. DOI:10.1128/AAC.00339-08.
- LIMA, H., JACOBSON, L.S., GOLDBERG, M.F., CHANDRAN, K., DIAZ-GRIFFERO, F., LISANTI, M.P. & BROJATSCH, J. Role of lysosome rupture in controlling Nlrp3 signaling and necrotic cell death. *Cell Cycle (Georgetown, Tex.)*. 2013. Vol. 12, n° 12, p. 1868-1878. DOI:10.4161/cc.24903.
- LIU, K., ZHAO, E., ILYAS, G., LALAZAR, G., LIN, Y., HASEEB, M., TANAKA, K.E. & CZAJA, M.J. Impaired macrophage autophagy increases the immune response in obese mice by promoting proinflammatory macrophage polarization. *Autophagy*. 2015. Vol. 11, n° 2, p. 271-284. DOI:10.1080/15548627.2015.1009787.
- LIU, P., ZHAO, L., FERRERE, G., ALVES-COSTA-SILVA, C., LY, P., WU, Q., TIAN, A.-L., DEROSA, L., ZITVOGEL, L., KEPP, O., *et al.* Combination treatments with hydroxychloroquine and azithromycin are compatible with the therapeutic induction of anticancer immune responses. *Oncoimmunology*. 2020. Vol. 9, n° 1, p. 1789284. DOI:10.1080/2162402X.2020.1789284.
- LIU, X., ZHANG, S., AN, L., WU, J., HU, X., LAI, S., MAZHAR, H., ZOU, Y., HE, L. & ZHU, H. Loss of Rubicon ameliorates doxorubicin-induced cardiotoxicity through enhancement of mitochondrial quality. *International Journal of Cardiology*. 2019. Vol. 296, p. 129-135. DOI:10.1016/j.ijcard.2019.07.074.
- LODDER, J., DENAËS, T., CHOBERT, M.-N., WAN, J., EL-BENNA, J., PAWLITSKY, J.-M., LOTERSZTAJN, S. & TEIXEIRA-CLERC, F. Macrophage autophagy protects against liver fibrosis in mice. *Autophagy*. 2015. Vol. 11, n° 8, p. 1280-1292. DOI:10.1080/15548627.2015.1058473.
- LOUVEAU, A. Le drainage lymphatique cérébral: Implication dans la tolérance immunitaire. *médecine/sciences*. 2015. Vol. 31, n° 11, p. 953-956. DOI:10.1051/medsci/20153111005.
- LOUVEAU, A., SMIRNOV, I., KEYES, T.J., ECCLES, J.D., ROUHANI, S.J., PESKE, J.D., DERECKI, N.C., CASTLE, D., MANDELL, J.W., LEE, K.S., *et al.* Structural and functional features of central nervous system lymphatic vessels. *Nature*. 2015. Vol. 523, n° 7560, p. 337-341. DOI:10.1038/nature14432.
- LU, F. & HOGENESCH, H. Kinetics of the inflammatory response following intramuscular injection of aluminum adjuvant. *Vaccine*. 2013. Vol. 31, n° 37, p. 3979-3986. DOI:10.1016/j.vaccine.2013.05.107.
- LUCCHINI, R., ALBINI, E., PLACIDI, D. & ALESSIO, L. Mechanism of neurobehavioral alteration. *Toxicology Letters*. 2000. Vol. 112-113, p. 35-39.
- LUJÁN, L., PÉREZ, M., SALAZAR, E., ÁLVAREZ, N., GIMENO, M., PINCZOWSKI, P., IRUSTA, S., SANTAMARÍA, J., INSAUSTI, N., CORTÉS, Y., *et al.* Autoimmune/autoinflammatory syndrome induced by adjuvants (ASIA syndrome) in commercial sheep. *Immunologic Research*. 2013. Vol. 56, n° 2-3, p. 317-324. DOI:10.1007/s12026-013-8404-0.
- LYONS-WEILER, J. & RICKETSON, R. Reconsideration of the immunotherapeutic pediatric safe dose levels of aluminum. *Journal of trace elements in medicine and biology: organ of the Society for Minerals and Trace Elements (GMS)*. 2018. Vol. 48, p. 67-73. DOI:10.1016/j.jtemb.2018.02.025.

- MACKENZIE, A.H. Dose refinements in long-term therapy of rheumatoid arthritis with antimalarials. *The American Journal of Medicine*. 1983. Vol. 75, n° 1A, p. 40-45.
- MADEWELL, B.R., GRIFFEY, S.M., MCENTEE, M.C., LEPPERT, V.J. & MUNN, R.J. Feline vaccine-associated fibrosarcoma: an ultrastructural study of 20 tumors (1996-1999). *Veterinary Pathology*. 2001. Vol. 38, n° 2, p. 196-202. DOI:10.1354/vp.38-2-196.
- MAES, M., MIHAYLOVA, I. & BOSMANS, E. Not in the mind of neurasthenic lazybones but in the cell nucleus: patients with chronic fatigue syndrome have increased production of nuclear factor kappa beta. *Neuro Endocrinology Letters*. 2007. Vol. 28, n° 4, p. 456-462.
- MAES, M., MIHAYLOVA, I., KUBERA, M. & BOSMANS, E. Not in the mind but in the cell: increased production of cyclo-oxygenase-2 and inducible NO synthase in chronic fatigue syndrome. *Neuro Endocrinology Letters*. 2007. Vol. 28, n° 4, p. 463-469.
- MAES, M., MIHAYLOVA, I., KUBERA, M., LEUNIS, J.-C., TWISK, F.N.M. & GEFFARD, M. IgM-mediated autoimmune responses directed against anchorage epitopes are greater in Myalgic Encephalomyelitis/Chronic Fatigue Syndrome (ME/CFS) than in major depression. *Metabolic Brain Disease*. 2012. Vol. 27, n° 4, p. 415-423. DOI:10.1007/s11011-012-9316-8.
- MAES, M., TWISK, F.N.M. & JOHNSON, C. Myalgic Encephalomyelitis (ME), Chronic Fatigue Syndrome (CFS), and Chronic Fatigue (CF) are distinguished accurately: Results of supervised learning techniques applied on clinical and inflammatory data. *Psychiatry Research*. 2012. Vol. 200, n° 2, p. 754-760. DOI:10.1016/j.psychres.2012.03.031.
- MALÉ, C. *La myofasciite à macrophages et le rôle de l'aluminium d'origine vaccinal*. Univ. PICARDIE JULES VERNE. 2016.
- MALININ, G.I. & MALININ, T.I. Rapid microscopic detection of malaria parasites permanently fluorochrome stained in blood smears with aluminum and morin. *American Journal of Clinical Pathology*. 1991. Vol. 95, n° 3, p. 424-427. DOI:10.1093/ajcp/95.3.424.
- MANDAL, S., BARNETT, J., BRILL, S.E., BROWN, J.S., DENNENY, E.K., HARE, S.S., HEIGHTMAN, M., HILLMAN, T.E., JACOB, J., JARVIS, H.C., *et al.* « Long-COVID »: a cross-sectional study of persisting symptoms, biomarker and imaging abnormalities following hospitalisation for COVID-19. *Thorax*. 2021. Vol. 76, n° 4, p. 396-398. DOI:10.1136/thoraxjnl-2020-215818.
- MANOLOVA, V., FLACE, A., BAUER, M., SCHWARZ, K., SAUDAN, P. & BACHMANN, M.F. Nanoparticles target distinct dendritic cell populations according to their size. *European Journal of Immunology*. 2008. Vol. 38, n° 5, p. 1404-1413. DOI:10.1002/eji.200737984.
- MANSFIELD, A.S., NEVALA, W.K., DRONCA, R.S., LEONTOVICH, A.A., SHUSTER, L. & MARKOVIC, S.N. Normal ageing is associated with an increase in Th2 cells, MCP-1 (CCL1) and RANTES (CCL5), with differences in sCD40L and PDGF-AA between sexes. *Clinical & Experimental Immunology*. 2012. Vol. 170, n° 2, p. 186-193. DOI:10.1111/j.1365-2249.2012.04644.x.
- MAO, Z., ZHOU, X. & GAO, C. Influence of structure and properties of colloidal biomaterials on cellular uptake and cell functions. *Biomaterials Science*. 2013. Vol. 1, n° 9, p. 896-911. DOI:10.1039/C3BM00137G.

- MARICHAL, T., OHATA, K., BEDORET, D., MESNIL, C., SABATEL, C., KOBIYAMA, K., LEKEUX, P., COBAN, C., AKIRA, S., ISHII, K.J., *et al.* DNA released from dying host cells mediates aluminum adjuvant activity. *Nature Medicine*. 2011. Vol. 17, n° 8, p. 996-1002. DOI:10.1038/nm.2403.
- MARIÑO, G., NISO-SANTANO, M., BAEHRECKE, E.H. & KROEMER, G. Self-consumption: the interplay of autophagy and apoptosis. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. 2014. Vol. 15, n° 2, p. 81-94. DOI:10.1038/nrm3735.
- MARQUES, F. & SOUSA, J.C. The choroid plexus is modulated by various peripheral stimuli: implications to diseases of the central nervous system. *Frontiers in Cellular Neuroscience*. 2015. Vol. 9, p. 136. DOI:10.3389/fncel.2015.00136.
- MARRACK, P., MCKEE, A.S. & MUNKS, M.W. Towards an understanding of the adjuvant action of aluminium. *Nature Reviews Immunology*. 2009. Vol. 9, n° 4, p. 287-293. DOI:10.1038/nri2510.
- MARTINEZ, C.S., ALTERMAN, C.D.C., PEÇANHA, F.M., VASSALLO, D.V., MELLO-CARPES, P.B., MIGUEL, M. & WIGGERS, G.A. Aluminum exposure at human dietary levels for 60 days reaches a threshold sufficient to promote memory impairment in rats. *Neurotoxicity Research*. 2017. Vol. 31, n° 1, p. 20-30. DOI:10.1007/s12640-016-9656-y.
- MARTINEZ, J., MALIREDDI, R.K.S., LU, Q., CUNHA, L.D., PELLETIER, S., GINGRAS, S., ORCHARD, R., GUAN, J.-L., TAN, H., PENG, J., *et al.* Molecular characterization of LC3-associated phagocytosis reveals distinct roles for Rubicon, NOX2 and autophagy proteins. *Nature Cell Biology*. 2015. Vol. 17, n° 7, p. 893-906. DOI:10.1038/ncb3192.
- MARTÍNEZ-LAVÍN, M., MARTÍNEZ-MARTÍNEZ, L.-A. & REYES-LOYOLA, P. HPV vaccination syndrome. A questionnaire-based study. *Clinical Rheumatology*. 2015. Vol. 34, n° 11, p. 1981-1983. DOI:10.1007/s10067-015-3070-3.
- MARTINON, F., MAYOR, A. & TSCHOPP, J. The Inflammasomes: Guardians of the Body. *Annual review of immunology*. 2009. Vol. 27, p. 229-65. DOI:10.1146/annurev.immunol.021908.132715.
- MARTINON, F., PÉTRILLI, V., MAYOR, A., TARDIVEL, A. & TSCHOPP, J. Gout-associated uric acid crystals activate the NALP3 inflammasome. *Nature*. 2006. Vol. 440, n° 7081, p. 237-241. DOI:10.1038/nature04516.
- MARZELLA, L., AHLBERG, J. & GLAUMANN, H. Autophagy, heterophagy, microautophagy and crinophagy as the means for intracellular degradation. *Virchows Archiv B Cell Pathology Including Molecular Pathology*. 1981. Vol. 36, n° 1, p. 219-234. DOI:10.1007/BF02912068.
- MASSON, J.-D., BLANCHET, B., PERIOU, B., AUTHIER, F.-J., MOGRABI, B., GHERARDI, R.K. & CRÉPEAUX, G. Long Term Pharmacological Perturbation of Autophagy in Mice: Are HCQ Injections a Relevant Choice? *Biomedicines*. 2020. Vol. 8, n° 3, p. 47. DOI:10.3390/biomedicines8030047.
- MASSON, J.-D., CRÉPEAUX, G., AUTHIER, F.-J., EXLEY, C. & GHERARDI, R.K. Critical analysis of reference studies on the toxicokinetics of aluminum-based adjuvants. *Journal of Inorganic Biochemistry*. 2018. Vol. 181, p. 87-95. DOI:10.1016/j.jinorgbio.2017.12.015.
- MASSON, J.-D., THIBAUDON, M., BÉLEC, L. & CRÉPEAUX, G. Calcium phosphate: a substitute for aluminum adjuvants? *Expert Review of Vaccines*. 2016. N° 3, p. 289-299. DOI:10.1080/14760584.2017.1244484.

- MATSUNAGA, K., SAITOH, T., TABATA, K., OMORI, H., SATOH, T., KUROTORI, N., MAEJIMA, I., SHIRAHAMA-NODA, K., ICHIMURA, T., ISOBE, T., *et al.* Two Beclin 1-binding proteins, Atg14L and Rubicon, reciprocally regulate autophagy at different stages. *Nature Cell Biology*. 2009. Vol. 11, n° 4, p. 385-396. DOI:10.1038/ncb1846.
- MAURISSEN, J.P.J., MARABLE, B.R., ANDRUS, A.K. & STEBBINS, K.E. Factors affecting grip strength testing. *Neurotoxicology and Teratology*. 2003. Vol. 25, n° 5, p. 543-553.
- MAUTHE, M., ORHON, I., ROCCHI, C., ZHOU, X., LUHR, M., HIJLKEMA, K.-J., COPPES, R.P., ENGEDAL, N., MARI, M. & REGGIORI, F. Chloroquine inhibits autophagic flux by decreasing autophagosome-lysosome fusion. *Autophagy*. 2018. Vol. 14, n° 8, p. 1435-1455. DOI:10.1080/15548627.2018.1474314.
- MCCAIN, M.N., MUSTARD, F. & SHANKER, S. *Early years study 2: Putting science into action*. ON: Council for Early Child Development. Toronto. 2007.
- MCCHESENEY, E.W. Animal toxicity and pharmacokinetics of hydroxychloroquine sulfate. *The American Journal of Medicine*. 1983. Vol. 75, n° 1A, p. 11-18.
- MCCORMACK, K.M., OTTOSEN, L.D., SANGER, V.L., SPRAGUE, S., MAYOR, G.H. & HOOK, J.B. Effect of prenatal administration of aluminum and parathyroid hormone on fetal development in the rat. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine. Society for Experimental Biology and Medicine (New York, N.Y.)*. 1979. Vol. 161, n° 1, p. 74-77. DOI:10.3181/00379727-161-40493.
- MCFARLAND, G., LA JOIE, E., THOMAS, P. & LYONS-WEILER, J. Acute exposure and chronic retention of aluminum in three vaccine schedules and effects of genetic and environmental variation. *Journal of trace elements in medicine and biology: organ of the Society for Minerals and Trace Elements (GMS)*. 2020. Vol. 58, p. 126444. DOI:10.1016/j.jtemb.2019.126444.
- MCGEOUGH, M.D., WREE, A., INZAUGARAT, M.E., HAIMOVICH, A., JOHNSON, C.D., PEÑA, C.A., GOLDBACH-MANSKY, R., BRODERICK, L., FELDSTEIN, A.E. & HOFFMAN, H.M. TNF regulates transcription of NLRP3 inflammasome components and inflammatory molecules in cryopyrinopathies. *The Journal of Clinical Investigation*. 2017. Vol. 127, n° 12, p. 4488-4497. DOI:10.1172/JCI90699.
- MCLACHLAN, D.R., LUKIW, W.J. & KRUCK, T.P. New evidence for an active role of aluminum in Alzheimer's disease. *The Canadian Journal of Neurological Sciences. Le Journal Canadien Des Sciences Neurologiques*. 1989. Vol. 16, n° 4 Suppl, p. 490-497.
- MCMAHON, B.J., HELMINIAK, C., WAINWRIGHT, R.B., BULKOW, L., TRIMBLE, B.A. & WAINWRIGHT, K. Frequency of adverse reactions to hepatitis B vaccine in 43,618 persons. *The American Journal of Medicine*. 1992. Vol. 92, n° 3, p. 254-256.
- MCWILLIAMS, T.G., PRESCOTT, A.R., ALLEN, G.F.G., TAMJAR, J., MUNSON, M.J., THOMSON, C., MUQIT, M.M.K. & GANLEY, I.G. mito-QC illuminates mitophagy and mitochondrial architecture in vivo. *The Journal of Cell Biology*. 2016. Vol. 214, n° 3, p. 333-345. DOI:10.1083/jcb.201603039.
- MEDAWAR, P.B. Immunity to homologous grafted skin; the fate of skin homografts transplanted to the brain, to subcutaneous tissue, and to the anterior chamber of the eye. *British Journal of Experimental Pathology*. 1948. Vol. 29, n° 1, p. 58-69.

- MEHPARA FARHAT, S., MAHBOOB, A. & AHMED, T. Oral exposure to aluminum leads to reduced nicotinic acetylcholine receptor gene expression, severe neurodegeneration and impaired hippocampus dependent learning in mice. *Drug and Chemical Toxicology*. 2019. p. 1-9. DOI:10.1080/01480545.2019.1587452.
- MEHRPOUR, M., ESCLATINE, A., BEAU, I. & CODOGNO, P. Overview of macroautophagy regulation in mammalian cells. *Cell Research*. 2010. Vol. 20, n° 7, p. 748-762. DOI:10.1038/cr.2010.82.
- MEHTO, S., JENA, K.K., NATH, P., CHAUHAN, S., KOLAPALLI, S.P., DAS, S.K., SAHOO, P.K., JAIN, A., TAYLOR, G.A. & CHAUHAN, S. The Crohn's Disease Risk Factor IRGM Limits NLRP3 Inflammasome Activation by Impeding Its Assembly and by Mediating Its Selective Autophagy. *Molecular Cell*. 2019. Vol. 73, n° 3, p. 429-445.e7. DOI:10.1016/j.molcel.2018.11.018.
- MENG, H., WANG, S., GUO, J., ZHAO, Y., ZHANG, S., ZHAO, Y. & NIU, Q. Cognitive impairment of workers in a large-scale aluminium factory in China: a cross-sectional study. *BMJ open*. 2019. Vol. 9, n° 6, p. e027154. DOI:10.1136/bmjopen-2018-027154.
- MENSAH, F.K.F., BANSAL, A.S., FORD, B. & CAMBRIDGE, G. Chronic fatigue syndrome and the immune system: Where are we now? *Neurophysiologie Clinique = Clinical Neurophysiology*. 2017. Vol. 47, n° 2, p. 131-138. DOI:10.1016/j.neucli.2017.02.002.
- METTRA, M. *Edward Jenner et le vaccin contre la variole: les premiers pas de la vaccination*. Namur : 50minutes. 2015. ISBN:978-2-8062-5673-7.
- MIJALJICA, D., PRESCOTT, M. & DEVENISH, R.J. Microautophagy in mammalian cells: Revisiting a 40-year-old conundrum. *Autophagy*. 2011. Vol. 7, n° 7, p. 673-682. DOI:10.4161/auto.7.7.14733.
- MILE, I., SVENSSON, A., DARABI, A., MOLD, M., SIESJÖ, P. & ERIKSSON, H. Al adjuvants can be tracked in viable cells by lumogallion staining. *Journal of Immunological Methods*. 2015. Vol. 422, p. 87-94. DOI:10.1016/j.jim.2015.04.008.
- MILLS, C.D., KINCAID, K., ALT, J.M., HEILMAN, M.J. & HILL, A.M. M-1/M-2 macrophages and the Th1/Th2 paradigm. *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)*. 2000. Vol. 164, n° 12, p. 6166-6173.
- MILLS, C.D. & LEY, K. M1 and M2 Macrophages: The Chicken and the Egg of Immunity. *Journal of Innate Immunity*. 2014. Vol. 6, n° 6, p. 716-726. DOI:10.1159/000364945.
- MILNER, B., CORKIN, S. & TEUBER, H.-L. Further analysis of the hippocampal amnesic syndrome: 14-year follow-up study of H.M. *Neuropsychologia*. 1968. Vol. 6, n° 3, p. 215-234. DOI:10.1016/0028-3932(68)90021-3.
- MIN, S.S., QUAN, H.Y., MA, J., HAN, J.-S., JEON, B.H. & SEOL, G.H. Chronic brain inflammation impairs two forms of long-term potentiation in the rat hippocampal CA1 area. *Neuroscience Letters*. 2009. Vol. 456, n° 1, p. 20-24. DOI:10.1016/j.neulet.2009.03.079.
- MIODOVNIK, A. Environmental neurotoxicants and developing brain. *The Mount Sinai Journal of Medicine, New York*. 2011. Vol. 78, n° 1, p. 58-77. DOI:10.1002/msj.20237.
- MIRZA, A., KING, A., TROAKES, C. & EXLEY, C. The Identification of Aluminum in Human Brain Tissue Using Lumogallion and Fluorescence Microscopy. *Journal of Alzheimer's disease: JAD*. 2016. Vol. 54, n° 4, p. 1333-1338. DOI:10.3233/JAD-160648.

- MIRZA, A., KING, A., TROAKES, C. & EXLEY, C. Aluminium in brain tissue in familial Alzheimer's disease. *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology*. 2017. Vol. 40, p. 30-36. DOI:10.1016/j.jtemb.2016.12.001.
- MITKUS, R.J., KING, D.B., HESS, M.A., FORSHEE, R.A. & WALDERHAUG, M.O. Updated aluminum pharmacokinetics following infant exposures through diet and vaccination. *Vaccine*. 2011. Vol. 29, n° 51, p. 9538-9543. DOI:10.1016/j.vaccine.2011.09.124.
- MIU, A.C., ANDREESCU, C.E., VASIU, R. & OLTEANU, A.I. A behavioral and histological study of the effects of long-term exposure of adult rats to aluminum. *The International Journal of Neuroscience*. 2003. Vol. 113, n° 9, p. 1197-1211. DOI:10.1080/00207450390232292.
- MIYOSHI, K. Hypergammaglobulinemia by prolonged adjuvanticity in man: disorders developed after augmentation mammoplasty. *Jpn Med J (Ijiushimpo)*. 1964. Vol. 2122, p. 9-14.
- MIZUSHIMA, N. Methods for monitoring autophagy. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*. 2004. Vol. 36, n° 12, p. 2491-2502. DOI:10.1016/j.biocel.2004.02.005.
- MIZUSHIMA, N., KUMA, A., KOBAYASHI, Y., YAMAMOTO, A., MATSUBAE, M., TAKAO, T., NATSUME, T., OHSUMI, Y. & YOSHIMORI, T. Mouse Apg16L, a novel WD-repeat protein, targets to the autophagic isolation membrane with the Apg12-Apg5 conjugate. *Journal of Cell Science*. 2003. Vol. 116, n° Pt 9, p. 1679-1688. DOI:10.1242/jcs.00381.
- MIZUSHIMA, N., YAMAMOTO, A., HATANO, M., KOBAYASHI, Y., KABEYA, Y., SUZUKI, K., TOKUHISA, T., OHSUMI, Y. & YOSHIMORI, T. Dissection of autophagosome formation using Apg5-deficient mouse embryonic stem cells. *The Journal of Cell Biology*. 2001. Vol. 152, n° 4, p. 657-668.
- MIZUSHIMA, N. & YOSHIMORI, T. How to interpret LC3 immunoblotting. *Autophagy*. 2007. Vol. 3, n° 6, p. 542-545.
- MIZUSHIMA, N., YOSHIMORI, T. & OHSUMI, Y. The role of Atg proteins in autophagosome formation. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*. 2011. Vol. 27, p. 107-132. DOI:10.1146/annurev-cellbio-092910-154005.
- MIZUSHIMA, N., YOSHIMORI, T. & LEVINE, B. Methods in Mammalian Autophagy Research. *Cell*. 2010. Vol. 140, n° 3, p. 313-326. DOI:10.1016/j.cell.2010.01.028.
- MOLD, M., ERIKSSON, H., SIESJÖ, P., DARABI, A., SHARDLOW, E. & EXLEY, C. Unequivocal identification of intracellular aluminium adjuvant in a monocytic THP-1 cell line. *Scientific Reports*. 2014. Vol. 4, p. 6287. DOI:10.1038/srep06287.
- MOLD, M., SHARDLOW, E. & EXLEY, C. Insight into the cellular fate and toxicity of aluminium adjuvants used in clinically approved human vaccinations. *Scientific Reports*. 2016. Vol. 6, p. 31578. DOI:10.1038/srep31578.
- MOLD, M., UMAR, D., KING, A. & EXLEY, C. Aluminium in brain tissue in autism. *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology*. 2017. DOI:10.1016/j.jtemb.2017.11.012.
- MOLD, M.J., KUMAR, M., CHU, W. & EXLEY, C. Unequivocal imaging of aluminium in human cells and tissues by an improved method using morin. *Histochemistry and Cell Biology*. 2019. DOI:10.1007/s00418-019-01809-0.

- MONTOYA, J.G., HOLMES, T.H., ANDERSON, J.N., MAECKER, H.T., ROSENBERG-HASSON, Y., VALENCIA, I.J., CHU, L., YOUNGER, J.W., TATO, C.M. & DAVIS, M.M. Cytokine signature associated with disease severity in chronic fatigue syndrome patients. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2017. Vol. 114, n° 34, p. E7150-E7158. DOI:10.1073/pnas.1710519114.
- MOREFIELD, G.L., SOKOLOVSKA, A., JIANG, D., HOGENESCH, H., ROBINSON, J.P. & HEM, S.L. Role of aluminum-containing adjuvants in antigen internalization by dendritic cells in vitro. *Vaccine*. 2005. Vol. 23, n° 13, p. 1588-1595. DOI:10.1016/j.vaccine.2004.07.050.
- MORRIS, G., BERK, M., WALDER, K. & MAES, M. The Putative Role of Viruses, Bacteria, and Chronic Fungal Biotoxin Exposure in the Genesis of Intractable Fatigue Accompanied by Cognitive and Physical Disability. *Molecular Neurobiology*. 2016. Vol. 53, n° 4, p. 2550-2571. DOI:10.1007/s12035-015-9262-7.
- MORRIS, G. & MAES, M. Mitochondrial dysfunctions in myalgic encephalomyelitis/chronic fatigue syndrome explained by activated immuno-inflammatory, oxidative and nitrosative stress pathways. *Metabolic Brain Disease*. 2014. Vol. 29, n° 1, p. 19-36. DOI:10.1007/s11011-013-9435-x.
- MORRIS, G., MAES, M., BERK, M. & PURI, B.K. Myalgic encephalomyelitis or chronic fatigue syndrome: how could the illness develop? *Metabolic Brain Disease*. 2019. Vol. 34, n° 2, p. 385-415. DOI:10.1007/s11011-019-0388-6.
- MOTTILLO, S., FILION, K.B., GENEST, J., JOSEPH, L., PILOTE, L., POIRIER, P., RINFRET, S., SCHIFFRIN, E.L. & EISENBERG, M.J. The metabolic syndrome and cardiovascular risk a systematic review and meta-analysis. *Journal of the American College of Cardiology*. 2010. Vol. 56, n° 14, p. 1113-1132. DOI:10.1016/j.jacc.2010.05.034.
- MOULIN, A.-M. *L'Aventure de la vaccination*. Fayard. 1996. ISBN:978-2-213-65752-3.
- MOVSAS, T.Z., PANETH, N., RUMBEIHA, W., ZYSKOWSKI, J. & GEWOLB, I.H. Effect of routine vaccination on aluminum and essential element levels in preterm infants. *JAMA pediatrics*. 2013. Vol. 167, n° 9, p. 870-872.
- MRAK, R.E. Muscle granulomas following intramuscular injection. *Muscle & Nerve*. 1982. Vol. 5, n° 8, p. 637-639. DOI:10.1002/mus.880050808.
- MUÑOZ-WOLF, N. & LAVELLE, E.C. A Guide to IL-1 family cytokines in adjuvanticity. *The FEBS journal*. 2018. Vol. 285, n° 13, p. 2377-2401. DOI:10.1111/febs.14467.
- NAKAMURA, S., OBA, M., SUZUKI, M., TAKAHASHI, A., YAMAMURO, T., FUJIWARA, M., IKENAKA, K., MINAMI, S., TABATA, N., YAMAMOTO, K., *et al.* Suppression of autophagic activity by Rubicon is a signature of aging. *Nature Communications*. 2019. Vol. 10, n° 1, p. 847. DOI:10.1038/s41467-019-08729-6.
- NAKATOMI, Y., MIZUNO, K., ISHII, A., WADA, Y., TANAKA, M., TAZAWA, S., ONOE, K., FUKUDA, S., KAWABE, J., TAKAHASHI, K., *et al.* Neuroinflammation in Patients with Chronic Fatigue Syndrome/Myalgic Encephalomyelitis: An 11C-(R)-PK11195 PET Study. *Journal of Nuclear Medicine*. 2014. Vol. 55, n° 6, p. 945-950. DOI:10.2967/jnumed.113.131045.
- NALBANDIAN, A., LLEWELLYN, K.J., NGUYEN, C., YAZDI, P.G. & KIMONIS, V.E. Rapamycin and Chloroquine: The In Vitro and In Vivo Effects of Autophagy-Modifying Drugs Show Promising Results in Valosin Containing Protein Multisystem Proteinopathy. *PLOS ONE*. 2015. Vol. 10, n° 4, p. e0122888. DOI:10.1371/journal.pone.0122888.

- NATELSON, B.H. Brain dysfunction as one cause of CFS symptoms including difficulty with attention and concentration. *Frontiers in Physiology*. 2013. Vol. 4, p. 109. DOI:10.3389/fphys.2013.00109.
- NAVANEETHARAJA, N., GRIFFITHS, V., WILEMAN, T. & CARDING, S.R. A Role for the Intestinal Microbiota and Virome in Myalgic Encephalomyelitis/Chronic Fatigue Syndrome (ME/CFS)? *Journal of Clinical Medicine*. 2016. Vol. 5, n° 6, p. E55. DOI:10.3390/jcm5060055.
- NAVIAUX, R.K. Perspective: Cell danger response Biology-The new science that connects environmental health with mitochondria and the rising tide of chronic illness. *Mitochondrion*. 2020. Vol. 51, p. 40-45. DOI:10.1016/j.mito.2019.12.005.
- NAVIAUX, R.K., NAVIAUX, J.C., LI, K., BRIGHT, A.T., ALAYNICK, W.A., WANG, L., BAXTER, A., NATHAN, N., ANDERSON, W. & GORDON, E. Metabolic features of chronic fatigue syndrome. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2016. Vol. 113, n° 37, p. E5472-5480. DOI:10.1073/pnas.1607571113.
- NDOLO, R.A., FORREST, M.L. & KRISE, J.P. The Role of Lysosomes in Limiting Drug Toxicity in Mice. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*. 2010. Vol. 333, n° 1, p. 120-128. DOI:10.1124/jpet.109.160226.
- NEUMANN, S., KOVTUN, A., DIETZEL, I.D., EPPLE, M. & HEUMANN, R. The use of size-defined DNA-functionalized calcium phosphate nanoparticles to minimise intracellular calcium disturbance during transfection. *Biomaterials*. 2009. Vol. 30, n° 35, p. 6794-6802. DOI:10.1016/j.biomaterials.2009.08.043.
- NEVINS, M.E., NASH, S.A. & BEARDSLEY, P.M. Quantitative grip strength assessment as a means of evaluating muscle relaxation in mice. *Psychopharmacology*. 1993. Vol. 110, n° 1-2, p. 92-96. DOI:10.1007/BF02246955.
- NEVO, Y., KUTAI, M., JOSSIPHOV, J., LIVNE, A., NEEMAN, Z., ARAD, T., POPOVITZ-BIRO, R., ATSMON, J., SHAPIRA, Y. & SOFFER, D. Childhood macrophagic myofasciitis-consanguinity and clinicopathological features. *Neuromuscular disorders: NMD*. 2004. Vol. 14, n° 4, p. 246-252. DOI:10.1016/j.nmd.2003.12.005.
- NIE, J., LV, S., FU, X. & NIU, Q. Effects of Al Exposure on Mitochondrial Dynamics in Rat Hippocampus. *Neurotoxicity Research*. 2019. Vol. 36, n° 2, p. 334-346. DOI:10.1007/s12640-019-00045-7.
- NIU, Q. Overview of the Relationship Between Aluminum Exposure and Health of Human Being. *Advances in Experimental Medicine and Biology*. 2018. Vol. 1091, p. 1-31. DOI:10.1007/978-981-13-1370-7_1.
- NORTON, S. & KIMLER, B.F. Correlation of behavior with brain damage after in utero exposure to toxic agents. *Neurotoxicology and Teratology*. 1987. Vol. 9, n° 2, p. 145-150. DOI:10.1016/0892-0362(87)90091-2.
- NYQUIST, P., ZHANG, J. & DE GRABA, T.J. The -928 G/C and -362 G/C Single-Nucleotide Polymorphisms in the Promoter of MCP-1: Increased Transcriptional Activity and Novel Binding Sites. *Cerebrovascular Diseases*. 2010. Vol. 29, n° 3, p. 242-247. DOI:10.1159/000267849.
- OBERDÖRSTER, G., MAYNARD, A., DONALDSON, K., CASTRANOVA, V., FITZPATRICK, J., AUSMAN, K., CARTER, J., KARN, B., KREYLING, W., LAI, D., *et al.* Principles for characterizing the potential human health effects from exposure to nanomaterials: elements of a screening strategy. *Particle and Fibre Toxicology*. 2005. Vol. 2, p. 8. DOI:10.1186/1743-8977-2-8.

- OCHSENDORF, F.R. Use of antimalarials in dermatology. *Journal der Deutschen Dermatologischen Gesellschaft = Journal of the German Society of Dermatology: JDDG*. 2010. Vol. 8, n° 10, p. 829-844; quiz 845. DOI:10.1111/j.1610-0387.2010.07490.x.
- OFFIT, P.A. & JEW, R.K. Addressing parents' concerns: do vaccines contain harmful preservatives, adjuvants, additives, or residuals? *Pediatrics*. 2003. Vol. 112, n° 6 Pt 1, p. 1394-1397.
- OHLSSON, L., EXLEY, C., DARABI, A., SANDÉN, E., SIESJÖ, P. & ERIKSSON, H. Aluminium based adjuvants and their effects on mitochondria and lysosomes of phagocytosing cells. *Journal of Inorganic Biochemistry*. 2013. Vol. 128, p. 229-236. DOI:10.1016/j.jinorgbio.2013.08.003.
- OKAMOTO, L.E., RAJ, S.R., PELTIER, A., GAMBOA, A., SHIBAO, C., DIEDRICH, A., BLACK, B.K., ROBERTSON, D. & BIAGGIONI, I. Neurohumoral and haemodynamic profile in postural tachycardia and chronic fatigue syndromes. *Clinical Science (London, England: 1979)*. 2012. Vol. 122, n° 4, p. 183-192. DOI:10.1042/CS20110200.
- OLIVO-MARIN, J.-C. Extraction of spots in biological images using multiscale products. *Pattern Recognition*. 2002. Vol. 35, n° 9, p. 1989-1996. DOI:10.1016/S0031-3203(01)00127-3.
- OLMEDO, H., HERRERA, M., ROJAS, L., VILLALTA, M., VARGAS, M., LEIGUEZ, E., TEIXEIRA, C., ESTRADA, R., GUTIÉRREZ, J.M., LEÓN, G., *et al.* Comparison of the adjuvant activity of aluminum hydroxide and calcium phosphate on the antibody response towards *Bothrops asper* snake venom. *Journal of Immunotoxicology*. 2014. Vol. 11, n° 1, p. 44-49. DOI:10.3109/1547691X.2013.772267.
- OPECST. Les adjuvants vaccinaux. *videos.assemblee-nationale.fr*2014a. http://videos.assemblee-nationale.fr/video.2349500_5559968dd8b53.opecst--les-adjuvants-vaccinaux-22-mai-2014.
- OPECST. Les adjuvants vaccinaux : une question controversée. *Office Parlementaire d'Évaluation des Choix Scientifiques et Technologiques*.2014b. <https://www.ladocumentationfrancaise.fr/rapports-publics>.
- OXFORD VACCINE GROUP. University of Oxford. Vaccine Knowledge Project. Authoritative information for All. 2015. <http://vk.ovg.ox.ac.uk/>.
- OXFORD VACCINE GROUP. Vaccine ingredients | Vaccine Knowledge Project. 2019. <http://vk.ovg.ox.ac.uk/vaccine-ingredients#aluminium>.
- PALMIERI, B., PODDIGHE, D., VADALÀ, M., LAURINO, C., CARNOVALE, C. & CLEMENTI, E. Severe somatoform and dysautonomic syndromes after HPV vaccination: case series and review of literature. *Immunologic Research*. 2016. DOI:10.1007/s12026-016-8820-z.
- PANKIV, S., CLAUSEN, T.H., LAMARK, T., BRECH, A., BRUUN, J.-A., OUTZEN, H., ØVERVATN, A., BJØRKØY, G. & JOHANSEN, T. p62/SQSTM1 binds directly to Atg8/LC3 to facilitate degradation of ubiquitinated protein aggregates by autophagy. *The Journal of Biological Chemistry*. 2007. Vol. 282, n° 33, p. 24131-24145. DOI:10.1074/jbc.M702824200.
- PAPEZ, J.W. A PROPOSED MECHANISM OF EMOTION. *Archives of Neurology & Psychiatry*. 1937. Vol. 38, n° 4, p. 725-743. DOI:10.1001/archneurpsyc.1937.02260220069003.
- PAPO, T. Macrophagic myofasciitis: focal or systemic? *Joint, Bone, Spine: Revue Du Rhumatisme*. 2003. Vol. 70, n° 4, p. 242-245.
- PARK, J.H., NA, K.S., PARK, Y.W., PAIK, S.S. & YOO, D.H. Macrophagic myofasciitis unrelated to vaccination. *Scandinavian Journal of Rheumatology*. 2005. Vol. 34, n° 1, p. 65-67.

- PASSERI, E., VILLA, C., COUETTE, M., ITTI, E., BRUGIERES, P., CESARO, P., GHERARDI, R.K., BACHOUD-LEVI, A.-C. & AUTHIER, F.-J. Long-term follow-up of cognitive dysfunction in patients with aluminum hydroxide-induced macrophagic myofasciitis (MMF). *Journal of Inorganic Biochemistry*. 2011. Vol. 105, n° 11, p. 1457-1463. DOI:10.1016/j.jinorgbio.2011.08.006.
- PATEL, D. *Louis Pasteur: Principles of Vaccination*. Independently published. 2016. ISBN:978-1-5202-6801-9.
- PATTINGRE, S., TASSA, A., QU, X., GARUTI, R., LIANG, X.H., MIZUSHIMA, N., PACKER, M., SCHNEIDER, M.D. & LEVINE, B. Bcl-2 antiapoptotic proteins inhibit Beclin 1-dependent autophagy. *Cell*. 2005. Vol. 122, n° 6, p. 927-939. DOI:10.1016/j.cell.2005.07.002.
- PENZES, P., CAHILL, M.E., JONES, K.A., VANLEEUEWEN, J.-E. & WOOLFREY, K.M. Dendritic spine pathology in neuropsychiatric disorders. *Nature Neuroscience*. 2011. Vol. 14, n° 3, p. 285-293. DOI:10.1038/nn.2741.
- PERROT, A. & SCHWARTZ, M. *Pasteur et Koch: un duel de géants dans le monde des microbes*. Paris : Odile Jacob. 2014. Sciences. ISBN:978-2-7381-3178-2. QR30 .P47 2014
- PERROT, A., SCHWARTZ, M. & POISSENOT, J.-M. *Pasteur, des microbes au vaccin: Annick Perrot et Maxime Schwartz ; illustrations Jean-Marie Poissenot*. Casterman. Tournai; Paris : Casterman ; Institut Pasteur. 1999. ISBN:978-2-203-14041-7.
- PETRIK, M.S., WONG, M.C., TABATA, R.C., GARRY, R.F. & SHAW, C.A. Aluminum adjuvant linked to Gulf War illness induces motor neuron death in mice. *Neuromolecular Medicine*. 2007. Vol. 9, n° 1, p. 83-100.
- PETROVSKY, N. Comparative Safety of Vaccine Adjuvants: A Summary of Current Evidence and Future Needs. *Drug Safety*. 2015a. Vol. 38, n° 11, p. 1059-1074. DOI:10.1007/s40264-015-0350-4.
- PETROVSKY, N. Comparative Safety of Vaccine Adjuvants: A Summary of Current Evidence and Future Needs. *Drug Safety*. 2015b. Vol. 38, n° 11, p. 1059-1074. DOI:10.1007/s40264-015-0350-4.
- PETROVSKY, N. & AGUILAR, J.C. Vaccine adjuvants: current state and future trends. *Immunology and Cell Biology*. 2004. Vol. 82, n° 5, p. 488-496. DOI:10.1111/j.0818-9641.2004.01272.x.
- PLATT, B., CARPENTER, D.O., BÜSSELBERG, D., REYMANN, K.G. & RIEDEL, G. Aluminum impairs hippocampal long-term potentiation in rats in vitro and in vivo. *Experimental Neurology*. 1995. Vol. 134, n° 1, p. 73-86. DOI:10.1006/exnr.1995.1038.
- POGUE, A.I., JABER, V., ZHAO, Y. & LUKIW, W.J. Systemic Inflammation in C57BL/6J Mice Receiving Dietary Aluminum Sulfate; Up-Regulation of the Pro-Inflammatory Cytokines IL-6 and TNF α , C-Reactive Protein (CRP) and miRNA-146a in Blood Serum. *Journal of Alzheimer's Disease & Parkinsonism*. 2017a. Vol. 7, n° 6. DOI:10.4172/2161-0460.1000403.
- POGUE, A.I. louv, ZHAO, Y., JABER, V., PERCY, M.E., CONG, L. & LUKIW, W.J. Selective Targeting and Accumulation of Aluminum in Tissues of C57BL/6J Mice Fed Aluminum Sulfate Activates a Proinflammatory NF-kB-microRNA-146a Signaling Program. *Journal of Neurology and Neuro Toxicology*. 2017b. Vol. 1, n° 1.
- POLIDO PEREIRA, J., BARROSO, C., EVANGELISTA, T., FONSECA, J.E. & PEREIRA DA SILVA, J.A. Macrophagic myofasciitis: a case report of autoimmune/inflammatory syndrome induced by adjuvants (ASIA). *Acta Reumatologica Portuguesa*. 2011. Vol. 36, n° 1, p. 75-76.

- POLIZZI, S., PIRA, E., FERRARA, M., BUGIANI, M., PAPALEO, A., ALBERA, R. & PALMI, S. Neurotoxic effects of aluminium among foundry workers and Alzheimer's disease. *Neurotoxicology*. 2002. Vol. 23, n° 6, p. 761-774. DOI:10.1016/S0161-813X(02)00097-9.
- POON, D.C.-H., HO, Y.-S., CHIU, K., WONG, H.-L. & CHANG, R.C.-C. Sickness: From the focus on cytokines, prostaglandins, and complement factors to the perspectives of neurons. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*. 2015. Vol. 57, p. 30-45. DOI:10.1016/j.neubiorev.2015.07.015.
- PRAKASH, D., GOPINATH, K. & SUDHANDIRAN, G. Fisetin Enhances Behavioral Performances and Attenuates Reactive Gliosis and Inflammation During Aluminum Chloride-Induced Neurotoxicity. *NeuroMolecular Medicine*. 2013. Vol. 15, n° 1, p. 192-208. DOI:10.1007/s12017-012-8210-1.
- PRATTE, M., PANAYOTIS, N., GHATA, A., VILLARD, L. & ROUX, J.-C. Progressive motor and respiratory metabolism deficits in post-weaning Mecp2-null male mice. *Behavioural Brain Research*. 2011. Vol. 216, n° 1, p. 313-320. DOI:10.1016/j.bbr.2010.08.011.
- PRIEST, N.D. The biological behaviour and bioavailability of aluminium in man, with special reference to studies employing aluminium-26 as a tracer: review and study update. *Journal of environmental monitoring: JEM*. 2004. Vol. 6, n° 5, p. 375-403. DOI:10.1039/b314329p.
- PRIEST, N.D., NEWTON, D., DAY, J.P., TALBOT, R.J. & WARNER, A.J. Human metabolism of aluminium-26 and gallium-67 injected as citrates. *Human & Experimental Toxicology*. 1995. Vol. 14, n° 3, p. 287-293. DOI:10.1177/096032719501400309.
- PURVES, D. & LICHTMAN, J.W. Elimination of synapses in the developing nervous system. *Science*. 1980. Vol. 210, n° 4466, p. 153-157. DOI:10.1126/science.7414326.
- QU, Y., NOE, G., BREAUD, A.R., VIDAL, M., CLARKE, W.A., ZAHR, N., DERVIEUX, T., COSTEDOAT-CHALUMEAU, N. & BLANCHET, B. Development and validation of a clinical HPLC method for the quantification of hydroxychloroquine and its metabolites in whole blood. *Future science OA*. 2015. Vol. 1, n° 3, p. FSO26. DOI:10.4155/fso.15.24.
- RABIN, J.C. & RAMIREZ, K. Hydroxychloroquine Ocular Toxicity: Lessons Learned. *The Journal of Rheumatology*. 2019. Vol. 46, n° 12, p. 1640-1641. DOI:10.3899/jrheum.181375.
- RAGUNATHAN-THANGARAJAH, N., LE BELLER, C., BOUTOUYRIE, P., BASSEZ, G., GHERARDI, R.K., LAURENT, S. & AUTHIER, F.-J. Distinctive clinical features in arthromyalgic patients with and without aluminum hydroxyde-induced macrophagic myofasciitis: An exploratory study. *Journal of Inorganic Biochemistry*. 2013. Vol. 128, p. 262-266. DOI:10.1016/j.jinorgbio.2013.07.020.
- RAKIC, P., BOURGEOIS, J.P., ECKENHOFF, M.F., ZECEVIC, N. & GOLDMAN-RAKIC, P.S. Concurrent overproduction of synapses in diverse regions of the primate cerebral cortex. *Science*. 1986. Vol. 232, n° 4747, p. 232-235. DOI:10.1126/science.3952506.
- RAMON, G. Sur l'augmentation anormale de l'antitoxine chez les chevaux producteurs de sérum antidiphthériques. *Bull. Soc. Centr. Med. Vet.* 1925. Vol. 101, p. 227-234.
- RAVIKUMAR, B., ACEVEDO-ARZENA, A., IMARISIO, S., BERGER, Z., VACHER, C., O'KANE, C.J., BROWN, S.D.M. & RUBINSZTEIN, D.C. Dynein mutations impair autophagic clearance of aggregate-prone proteins. *Nature Genetics*. 2005. Vol. 37, n° 7, p. 771-776. DOI:10.1038/ng1591.

- RAVIKUMAR, B., MOREAU, K., JAHREISS, L., PURI, C. & RUBINSZTEIN, D.C. Plasma membrane contributes to the formation of pre-autophagosomal structures. *Nature Cell Biology*. 2010. Vol. 12, n° 8, p. 747-757. DOI:10.1038/ncb2078.
- RAVIKUMAR, B., MOREAU, K. & RUBINSZTEIN, D.C. Plasma membrane helps autophagosomes grow. *Autophagy*. 2010. Vol. 6, n° 8, p. 1184-1186. DOI:10.4161/auto.6.8.13428.
- REDGROVE, J., RODRIGUEZ, I., MAHADEVAN-BAVA, S. & EXLEY, C. Prescription Infant Formulas Are Contaminated with Aluminium. *International Journal of Environmental Research and Public Health*. 2019. Vol. 16, n° 5, p. 899. DOI:10.3390/ijerph16050899.
- REDHEAD, K., QUINLAN, G.J., DAS, R.G. & GUTTERIDGE, J.M. Aluminium-adsorbed vaccines transiently increase aluminium levels in murine brain tissue. *Pharmacology & Toxicology*. 1992. Vol. 70, n° 4, p. 278-280.
- REID, S., CHALDER, T., CLEARE, A., HOTOPI, M. & WESSELY, S. Chronic fatigue syndrome. *BMJ (Clinical research ed.)*. 2000. Vol. 320, n° 7230, p. 292-296. DOI:10.1136/bmj.320.7230.292.
- RELYVELD, E., BENGOUNIA, A., HUET, M. & KREEFTENBERG, J.G. Antibody response of pregnant women to two different adsorbed tetanus toxoids. *Vaccine*. 1991. Vol. 9, n° 5, p. 369-372.
- RELYVELD, E.H. Immunoglobulins and reaginic activity. *Revue Française D'allergologie*. 1969. Vol. 9, n° 4, p. 219-232.
- RELYVELD, E.H. Calcium phosphate gel for adsorbing vaccines. 4016252. 1977. 05/639926
- RELYVELD, E.H. Preparation and use of calcium phosphate adsorbed vaccines. *Developments in Biological Standardization*. 1986. Vol. 65, p. 131-136.
- RELYVELD, E.H., HENOCQ, E. & RAYNAUD, M. Etude de la vaccination antidiphtherique de sujets allergiques, avec une anatoxine pure adsorbée sur phosphate de calcium. *Bulletin of the World Health Organization*. 1964. Vol. 30, n° 3, p. 321.
- RELYVELD, E.H., LAVERGNE, M. & DE RUDDER, J. Titers of immunoglobulins (IgG, IgA, IgM, and IgE) after antigenic stimulation in European and African subjects. *Developments in Biological Standardization*. 1974. Vol. 27, p. 79-90.
- RELYVELD, E.H., LEVADITI, J.-C. & RAVISSE, P. Adjuvants minéraux. *Médecine et Maladies Infectieuses*. 1978. Vol. 8, n° 11, p. 494-499. DOI:10.1016/S0399-077X(78)80116-4.
- RELYVELD, E.H., MARTIN, R., RAYNAUD, M., DAMAS, J.P., THÉRON, C., HÉNOCCQ, E., ROMAIN, F., TURPIN, A., CÉOLIN, G., CHEVÉ, J., *et al.* Calcium phosphate as adjuvant in vaccinations in man. *Annales De l'Institut Pasteur*. 1969. Vol. 116, n° 3, p. 300-326.
- RELYVELD, E.H., MARTIN, R., RAYNAUD, M., HÉNOCCQ, E. & DAMAS, J.P. Vaccination with calcium phosphate adsorbed antigens. *Progress in Immunobiological Standardization*. 1970a. Vol. 4, p. 540-547.
- RELYVELD, E.H. & RAYNAUD, M. Etudes sur le phosphate de calcium comme adjuvant de l'immunité. In : *International Symposium on Adjuvants of Immunity*. Karger Heidelberg, New York. 1967. p. 77-78.
- RELYVELD, E.H., RAYNAUD, M., MARTIN, R., HÉNOCCQ, E. & DAMAS, J.P. Tolerance in humans of pertussis vaccines adsorbed onto calcium phosphate. In : *Symp. Series Immunobiol. Standard*. 1970b. p. 171-179.

- RENNA, M., SCHAFFNER, C., WINSLOW, A.R., MENZIES, F.M., PEDEN, A.A., FLOTO, R.A. & RUBINSZTEIN, D.C. Autophagic substrate clearance requires activity of the syntaxin-5 SNARE complex. *Journal of Cell Science*. 2011. Vol. 124, n° Pt 3, p. 469-482. DOI:10.1242/jcs.076489.
- RESHETNIKOV, V.V., RYABUSHKINA, Y.A. & BONDAR, N.P. Impact of mothers' experience and early-life stress on aggression and cognition in adult male mice. *Developmental Psychobiology*. 2020. Vol. 62, n° 1, p. 36-49. DOI:10.1002/dev.21887.
- REVAHB. Association des victimes du vaccin hepatite B. 2016. <http://www.revahb.fr/>.
- RIBES, D., COLOMINA, M.T., VICENS, P. & DOMINGO, J.L. Effects of oral aluminum exposure on behavior and neurogenesis in a transgenic mouse model of Alzheimer's disease. *Experimental Neurology*. 2008. Vol. 214, n° 2, p. 293-300. DOI:10.1016/j.expneurol.2008.08.017.
- RIBES, D., COLOMINA, M.T., VICENS, P. & DOMINGO, J.L. Impaired spatial learning and unaltered neurogenesis in a transgenic model of Alzheimer's disease after oral aluminum exposure. *Current Alzheimer Research*. 2010. Vol. 7, n° 5, p. 401-408.
- RIBES, D., TORRENTE, M., VICENS, P., COLOMINA, M.T., GÓMEZ, M. & DOMINGO, J.L. Recognition memory and β -amyloid plaques in adult Tg2576 mice are not modified after oral exposure to aluminum. *Alzheimer Disease and Associated Disorders*. 2012. Vol. 26, n° 2, p. 179-185. DOI:10.1097/WAD.0b013e3182211ab1.
- RICHARDS, S., CHALKIADIS, G., LAKSHMAN, R., BUTTERY, J.P. & CRAWFORD, N.W. Complex regional pain syndrome following immunisation. *Archives of Disease in Childhood*. 2012. Vol. 97, n° 10, p. 913-915. DOI:10.1136/archdischild-2011-301307.
- RIFAT, S.L., EASTWOOD, M.R., MCLACHLAN, D.R. & COREY, P.N. Effect of exposure of miners to aluminium powder. *Lancet (London, England)*. 1990. Vol. 336, n° 8724, p. 1162-1165.
- RIGOLET, M., AOUIZERATE, J., COUETTE, M., RAGUNATHAN-THANGARAJAH, N., AOUN-SEBAITI, M., GHERARDI, R.K., CADUSSEAU, J. & AUTHIER, F.J. Clinical Features in Patients with Long-Lasting Macrophagic Myofasciitis. *Frontiers in Neurology*. 2014. Vol. 5. DOI:10.3389/fneur.2014.00230.
- RIMANIOL, A.-C., GRAS, G. & CLAYETTE, P. In vitro interactions between macrophages and aluminum-containing adjuvants. *Vaccine*. 2007. Vol. 25, n° 37-38, p. 6784-6792. DOI:10.1016/j.vaccine.2007.06.051.
- RIMANIOL, A.-C., GRAS, G., VERDIER, F., CAPEL, F., GRIGORIEV, V.B., PORCHERAY, F., SAUZEAT, E., FOURNIER, J.-G., CLAYETTE, P., SIEGRIST, C.-A., *et al.* Aluminum hydroxide adjuvant induces macrophage differentiation towards a specialized antigen-presenting cell type. *Vaccine*. 2004. Vol. 22, n° 23-24, p. 3127-3135. DOI:10.1016/j.vaccine.2004.01.061.
- RINALDI, M., PERRICONE, R., BLANK, M., PERRICONE, C. & SHOENFELD, Y. Anti-Saccharomyces cerevisiae autoantibodies in autoimmune diseases: from bread baking to autoimmunity. *Clinical Reviews in Allergy & Immunology*. 2013. Vol. 45, n° 2, p. 152-161. DOI:10.1007/s12016-012-8344-9.
- RIPOLL, V.M., MEADOWS, N.A., BANGERT, M., LEE, A.W., KADIOGLU, A. & COX, R.D. Nicotinamide nucleotide transhydrogenase (NNT) acts as a novel modulator of macrophage inflammatory responses. *FASEB journal: official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*. 2012. Vol. 26, n° 8, p. 3550-3562. DOI:10.1096/fj.11-199935.

- RIVERA GIL, P., HÜHN, D., DEL MERCATO, L.L., SASSE, D. & PARAK, W.J. Nanopharmacy: Inorganic nanoscale devices as vectors and active compounds. *Pharmacological Research*. 2010. Vol. 62, n° 2, p. 115-125. DOI:10.1016/j.phrs.2010.01.009.
- RODELLA, L.F., RICCI, F., BORSANI, E., STACCHIOTTI, A., FOGGIO, E., FAVERO, G., REZZANI, R., MARIANI, C. & BIANCHI, R. Aluminium exposure induces Alzheimer's disease-like histopathological alterations in mouse brain. *Histology and Histopathology*. 2008. Vol. 23, n° 4, p. 433-439. DOI:10.14670/HH-23.433.
- RODGER, C.E., MCWILLIAMS, T.G. & GANLEY, I.G. Mammalian mitophagy - from in vitro molecules to in vivo models. *The FEBS journal*. 2018. Vol. 285, n° 7, p. 1185-1202. DOI:10.1111/febs.14336.
- RODRIGUEZ-CARUNCHO, C. & BIELSA MARSOL, I. Antimalarials in dermatology: mechanism of action, indications, and side effects. *Actas Dermo-Sifiliograficas*. 2014. Vol. 105, n° 3, p. 243-252. DOI:10.1016/j.adengl.2012.10.021.
- ROIG, J.L., FUENTES, S., TERESA COLOMINA, M., VICENS, P. & DOMINGO, J.L. Aluminum, restraint stress and aging: Behavioral effects in rats after 1 and 2 years of aluminum exposure. *Toxicology*. 2006. Vol. 218, n° 2, p. 112-124. DOI:10.1016/j.tox.2005.10.006.
- ROLLINS, B.J. Monocyte chemoattractant protein 1: a potential regulator of monocyte recruitment in inflammatory disease. *Molecular Medicine Today*. 1996. Vol. 2, n° 5, p. 198-204. DOI:10.1016/1357-4310(96)88772-7.
- ROMAO, S. & MÜNZ, C. LC3-associated phagocytosis. *Autophagy*. 2014. Vol. 10, n° 3, p. 526-528. DOI:10.4161/auto.27606.
- ROSENBLUM, H., SHOENFELD, Y. & AMITAL, H. The common immunogenic etiology of chronic fatigue syndrome: from infections to vaccines via adjuvants to the ASIA syndrome. *Infectious Disease Clinics of North America*. 2011. Vol. 25, n° 4, p. 851-863. DOI:10.1016/j.idc.2011.07.012.
- RYAN, A.M., BERMINGHAM, N., HARRINGTON, H.J. & KEOHANE, C. Atypical presentation of macrophagic myofasciitis 10 years post vaccination. *Neuromuscular disorders: NMD*. 2006. Vol. 16, n° 12, p. 867-869. DOI:10.1016/j.nmd.2006.07.017.
- SABELLA, S., CARNEY, R.P., BRUNETTI, V., MALVINDI, M.A., AL-JUFFALI, N., VECCHIO, G., JANES, S.M., BAKR, O.M., CINGOLANI, R., STELLACCI, F., *et al.* A general mechanism for intracellular toxicity of metal-containing nanoparticles. *Nanoscale*. 2014. Vol. 6, n° 12, p. 7052-7061. DOI:10.1039/c4nr01234h.
- SAFTIG, P. & KLUMPERMAN, J. Lysosome biogenesis and lysosomal membrane proteins: trafficking meets function. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology*. 2009. Vol. 10, n° 9, p. 623-635. DOI:10.1038/nrm2745.
- SAHBAI, S., KAUV, P., ABRIVARD, M., BLANC-DURAND, P., AOUN-SEBATI, M., EMSEN, B., LUCIANI, A., HODEL, J., AUTHIER, F.-J. & ITTI, E. Severe posterior hypometabolism but normal perfusion in a patient with chronic fatigue syndrome/myalgic encephalomyelitis revealed by PET/MRI. *European Journal of Nuclear Medicine and Molecular Imaging*. 2019. Vol. 46, n° 2, p. 531-532. DOI:10.1007/s00259-018-4229-3.
- 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 aluminum hydroxide. *Biological Trace Element Research*. 1994. Vol. 41, n° 1-2, p. 129-135.

- SANSONETTI, P. *Vaccins*. Odile Jacob. 2017. ISBN:978-2-7381-3661-9.
- SANTÉ PUBLIQUE FRANCE. Couverture vaccinale / Maladies à prévention vaccinale / Maladies infectieuses / Dossiers thématiques / Accueil. 2018. <http://invs.santepubliquefrance.fr/Dossiers-thematiques/Maladies-infectieuses/Maladies-a-prevention-vaccinale/Couverture-vaccinale>.
- SANTEFORD, A., WILEY, L.A., PARK, S., BAMBA, S., NAKAMURA, R., GDOURA, A., FERGUSON, T.A., RAO, P.K., GUAN, J.-L., SAITOH, T., *et al.* Impaired autophagy in macrophages promotes inflammatory eye disease. *Autophagy*. 2016. Vol. 12, n° 10, p. 1876-1885. DOI:10.1080/15548627.2016.1207857.
- SANTIAGO, T., REBELO, O., NEGRÃO, L. & MATOS, A. Macrophagic myofasciitis and vaccination: consequence or coincidence? *Rheumatology International*. 2015. Vol. 35, n° 1, p. 189-192. DOI:10.1007/s00296-014-3065-4.
- SANTUCCI, D., RANKIN, J., LAVIOLA, G., ALOE, L. & ALLEVA, E. Early exposure to aluminium affects eight-arm maze performance and hippocampal nerve growth factor levels in adult mice. *Neuroscience Letters*. 1994. Vol. 166, n° 1, p. 89-92.
- SARIN, S., GUPTA, V. & GILL, K.D. Alterations in lipid composition and neuronal injury in primates following chronic aluminium exposure. *Biological Trace Element Research*. 1997. Vol. 59, n° 1-3, p. 133-143. DOI:10.1007/BF02783238.
- SARIN, S., JULKA, D. & GILL, K.D. Regional alterations in calcium homeostasis in the primate brain following chronic aluminium exposure. *Molecular and Cellular Biochemistry*. 1997. Vol. 168, n° 1-2, p. 95-100.
- SHELLER, N.M., SVANSTRÖM, H., PASTERNAK, B., ARNHEIM-DAHLSTRÖM, L., SUNDSTRÖM, K., FINK, K. & HVIID, A. Quadrivalent HPV vaccination and risk of multiple sclerosis and other demyelinating diseases of the central nervous system. *JAMA*. 2015. Vol. 313, n° 1, p. 54-61. DOI:10.1001/jama.2014.16946.
- SCHNEIDER, C.A., RASBAND, W.S. & ELICEIRI, K.W. NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. *Nature Methods*. 2012. Vol. 9, n° 7, p. 671-675. DOI:10.1038/nmeth.2089.
- SCHONDORF, R., BENOIT, J., WEIN, T. & PHANEUF, D. Orthostatic intolerance in the chronic fatigue syndrome. *Journal of the Autonomic Nervous System*. 1999. Vol. 75, n° 2-3, p. 192-201. DOI:10.1016/s0165-1838(98)00177-5.
- SCHRODER, K., KANNEGANTI, T.-D., SHAO, F. & BROZ, P. Mechanisms and Consequences of Inflammasome Activation. *Journal of Molecular Biology*. 2018. Vol. 430, n° 2, p. 131-132. DOI:10.1016/j.jmb.2017.12.005.
- SCOTT, H.D., ROSENBAUM, S.E., WATERS, W.J., COLT, A.M., ANDREWS, L.G., JUERGENS, J.P. & FAICH, G.A. Rhode Island physicians' recognition and reporting of adverse drug reactions. *Rhode Island Medical Journal*. 1987. Vol. 70, n° 7, p. 311-316.
- SEEBER, S.J., WHITE, J.L. & HEM, S.L. Predicting the adsorption of proteins by aluminium-containing adjuvants. *Vaccine*. 1991. Vol. 9, n° 3, p. 201-203.
- SELEVERSTOV, O., ZABIRNYK, O., ZSCHARNACK, M., BULAVINA, L., NOWICKI, M., HEINRICH, J.-M., YEZHELYEV, M., EMMRICH, F., O'REGAN, R. & BADER, A. Quantum dots for human mesenchymal stem cells labeling. A size-dependent autophagy activation. *Nano Letters*. 2006. Vol. 6, n° 12, p. 2826-2832. DOI:10.1021/nl0619711.

- SESARDIC, D., RIJKEMA, S. & PATEL, B.P. New adjuvants: EU regulatory developments. *Expert Review of Vaccines*. 2007. Vol. 6, n° 5, p. 849-861. DOI:10.1586/14760584.6.5.849.
- SETHI, P., JYOTI, A., HUSSAIN, E. & SHARMA, D. Curcumin attenuates aluminium-induced functional neurotoxicity in rats. *Pharmacology, Biochemistry, and Behavior*. 2009. Vol. 93, n° 1, p. 31-39. DOI:10.1016/j.pbb.2009.04.005.
- SETHI, P., JYOTI, A., SINGH, R., HUSSAIN, E. & SHARMA, D. Aluminium-induced electrophysiological, biochemical and cognitive modifications in the hippocampus of aging rats. *Neurotoxicology*. 2008. Vol. 29, n° 6, p. 1069-1079. DOI:10.1016/j.neuro.2008.08.005.
- SHAH, R.R., O'HAGAN, D.T., AMIJI, M.M. & BRITO, L.A. The impact of size on particulate vaccine adjuvants. *Nanomedicine (London, England)*. 2014. Vol. 9, n° 17, p. 2671-2681. DOI:10.2217/nmm.14.193.
- SHARDLOW, E., LINHART, C., CONNOR, S., SOFTELY, E. & EXLEY, C. The measurement and full statistical analysis including Bayesian methods of the aluminium content of infant vaccines. *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology*. 2021. Vol. 66, p. 126762. DOI:10.1016/j.jtemb.2021.126762.
- SHARDLOW, E., MOLD, M. & EXLEY, C. Unraveling the enigma: elucidating the relationship between the physicochemical properties of aluminium-based adjuvants and their immunological mechanisms of action. *Allergy, Asthma & Clinical Immunology*. 2018. Vol. 14, n° 1, p. 80. DOI:10.1186/s13223-018-0305-2.
- SHARDLOW, E., MOLD, M. & EXLEY, C. The interaction of aluminium-based adjuvants with THP-1 macrophages in vitro: Implications for cellular survival and systemic translocation. *Journal of Inorganic Biochemistry*. 2020. Vol. 203, p. 110915. DOI:10.1016/j.jinorgbio.2019.110915.
- SHARIF, K., WATAD, A., BRAGAZZI, N.L., LICHTBROUN, M., MARTINI, M., PERRICONE, C., AMITAL, H. & SHOENFELD, Y. On chronic fatigue syndrome and nosological categories. *Clinical Rheumatology*. 2018. Vol. 37, n° 5, p. 1161-1170. DOI:10.1007/s10067-018-4009-2.
- SHARIFI, S., BEHZADI, S., LAURENT, S., FORREST, M.L., STROEVE, P. & MAHMOUDI, M. Toxicity of nanomaterials. *Chemical Society Reviews*. 2012. Vol. 41, n° 6, p. 2323-2343. DOI:10.1039/c1cs15188f.
- SHARMA, V. & MCNEILL, J.H. To scale or not to scale: the principles of dose extrapolation. *British Journal of Pharmacology*. 2009. Vol. 157, n° 6, p. 907-921. DOI:10.1111/j.1476-5381.2009.00267.x.
- SHAW, C.A., LI, Y. & TOMLJENOVIC, L. Administration of aluminium to neonatal mice in vaccine-relevant amounts is associated with adverse long term neurological outcomes. *Journal of Inorganic Biochemistry*. 2013. Vol. 128, p. 237-244. DOI:10.1016/j.jinorgbio.2013.07.022.
- SHAW, C.A. & PETRIK, M.S. Aluminum hydroxide injections lead to motor deficits and motor neuron degeneration. *Journal of Inorganic Biochemistry*. 2009. Vol. 103, n° 11, p. 1555-1562. DOI:10.1016/j.jinorgbio.2009.05.019.
- SHEPHERD, C.B. Is CFS Linked to Vaccinations? *The CFS Res Rev*. 2001. Vol. 2, p. 6-8.
- SHETH, S.K.S., LI, Y. & SHAW, C.A. Is exposure to aluminium adjuvants associated with social impairments in mice? A pilot study. *Journal of Inorganic Biochemistry*. 2018. Vol. 181, p. 96-103. DOI:10.1016/j.jinorgbio.2017.11.012.

- SHI, J., GAO, W. & SHAO, F. Pyroptosis: Gasdermin-Mediated Programmed Necrotic Cell Death. *Trends in Biochemical Sciences*. 2017. Vol. 42, n° 4, p. 245-254. DOI:10.1016/j.tibs.2016.10.004.
- SHI, Y. To forge a solid immune recognition. *Protein & Cell*. 2012. Vol. 3, n° 8, p. 564-570. DOI:10.1007/s13238-012-2933-5.
- SHI, Y., EVANS, J.E. & ROCK, K.L. Molecular identification of a danger signal that alerts the immune system to dying cells. *Nature*. 2003. Vol. 425, n° 6957, p. 516-521. DOI:10.1038/nature01991.
- SHI, Y., HOGENESCH, H. & HEM, S.L. Change in the degree of adsorption of proteins by aluminum-containing adjuvants following exposure to interstitial fluid: freshly prepared and aged model vaccines. *Vaccine*. 2001. Vol. 20, n° 1-2, p. 80-85.
- SHIMOMURA, K., GALVANOVSKIS, J., GOLDSWORTHY, M., HUGILL, A., KAIZAK, S., LEE, A., MEADOWS, N., QUWAILID, M.M., RYDSTRÖM, J., TEBOUL, L., *et al.* Insulin secretion from beta-cells is affected by deletion of nicotinamide nucleotide transhydrogenase. *Methods in Enzymology*. 2009. Vol. 457, p. 451-480. DOI:10.1016/S0076-6879(09)05025-3.
- SHIN, J.-S., EBERSOLD, M., PYPAERT, M., DELAMARRE, L., HARTLEY, A. & MELLMAN, I. Surface expression of MHC class II in dendritic cells is controlled by regulated ubiquitination. *Nature*. 2006. Vol. 444, n° 7115, p. 115-118. DOI:10.1038/nature05261.
- SHINGDE, M., HUGHES, J., BOADLE, R., WILLS, E.J. & PAMPHLETT, R. Macrophagic myofasciitis associated with vaccine-derived aluminium. *The Medical Journal of Australia*. 2005. Vol. 183, n° 3, p. 145-146.
- SHIVANE, A., HILTON, D.A., MOATE, R.M., BOND, P.R. & ENDEAN, A. Macrophagic myofasciitis: a report of second case from UK. *Neuropathology and Applied Neurobiology*. 2012. Vol. 38, n° 7, p. 734-736. DOI:10.1111/j.1365-2990.2012.01293.x.
- SHOAIB, B.O. & PATTEN, B.M. Human adjuvant disease: presentation as a multiple sclerosis-like syndrome. *Southern medical journal*. 1996. Vol. 89, n° 2, p. 179-188.
- SHOENFELD, Y. & AGMON-LEVIN, N. « ASIA » - autoimmune/inflammatory syndrome induced by adjuvants. *Journal of Autoimmunity*. 2011. Vol. 36, n° 1, p. 4-8. DOI:10.1016/j.jaut.2010.07.003.
- SIEGRIST, C.-A. [Vaccine adjuvants and macrophagic myofasciitis]. *Archives De Pédiatrie: Organe Officiel De La Société Française De Pédiatrie*. 2005. Vol. 12, n° 1, p. 96-101. DOI:10.1016/j.arcped.2004.06.017.
- SILVA, A.F.J., AGUIAR, M.S.S., CARVALHO, O.S.J., SANTANA, L. de N.S., FRANCO, E.C.S., LIMA, R.R., SIQUEIRA, N.V.M. de, FEIO, R.A., FARO, L.R.F. & GOMES-LEAL, W. Hippocampal neuronal loss, decreased GFAP immunoreactivity and cognitive impairment following experimental intoxication of rats with aluminum citrate. *Brain Research*. 2013. Vol. 1491, p. 23-33. DOI:10.1016/j.brainres.2012.10.063.
- SIMONSEN, L., JOHNSEN, H., LUND, S.P., MATIKAINEN, E., MIDTGÅRD, U. & WENNBERG, A. Methodological approach to the evaluation of neurotoxicity data and the classification of neurotoxic chemicals. *Scandinavian Journal of Work, Environment & Health*. 1994. Vol. 20, n° 1, p. 1-12.
- SIMPSON, D.A. Systemic histiocytosis presenting as macrophagic myofasciitis. *Journal of Clinical Neuromuscular Disease*. 2002. Vol. 4, n° 1, p. 19-22.

- SIŃCZUK-WALCZAK, H., SZYMCZAK, M., RAŻNIEWSKA, G., MATCZAK, W. & SZYMCZAK, W. Effects of occupational exposure to aluminum on nervous system: clinical and electroencephalographic findings. *International Journal of Occupational Medicine and Environmental Health*. 2003. Vol. 16, n° 4, p. 301-310.
- SINGH, M. *Vaccine adjuvants and delivery systems*. Hoboken, N.J : Wiley-Interscience. 2007. ISBN:978-0-471-73907-4.
- SINGH, M., UGOZZOLI, M., KAZZAZ, J., CHESKO, J., SOENAWAN, E., MANNUCCI, D., TITTA, F., CONTORNI, M., VOLPINI, G. & GUIDICE, G. A preliminary evaluation of alternative adjuvants to alum using a range of established and new generation vaccine antigens. *Vaccine*. 2006. Vol. 24, n° 10, p. 1680-1686. DOI:10.1016/j.vaccine.2005.09.046.
- SIVANANDA, N. & SUNDARAN, B. Studies on adsorption of diphtheria toxoid on aluminium phosphate gel. *Indian Journal of Science and Technology*. 2010. Vol. 3, n° 3, p. 248-249.
- SJÖGREN, B., GUSTAVSSON, P. & HOGSTEDT, C. Neuropsychiatric symptoms among welders exposed to neurotoxic metals. *British Journal of Industrial Medicine*. 1990. Vol. 47, n° 10, p. 704-707.
- SLATER, D.N., UNDERWOOD, J.C., DURRANT, T.E., GRAY, T. & HOPPER, I.P. Aluminium hydroxide granulomas: light and electron microscopic studies and X-ray microanalysis. *The British Journal of Dermatology*. 1982. Vol. 107, n° 1, p. 103-108.
- SLIKKER, W. & BOWYER, J.F. Biomarkers of adult and developmental neurotoxicity. *Toxicology and Applied Pharmacology*. 2005. Vol. 206, n° 2, p. 255-260. DOI:10.1016/j.taap.2004.09.022.
- SOKOLOVA, V., KNUSCHKE, T., BUER, J., WESTENDORF, A.M. & EPPLER, M. Quantitative determination of the composition of multi-shell calcium phosphate-oligonucleotide nanoparticles and their application for the activation of dendritic cells. *Acta Biomaterialia*. 2011. Vol. 7, n° 11, p. 4029-4036. DOI:10.1016/j.actbio.2011.07.010.
- SOKOLOVSKA, A., HEM, S.L. & HOGENESCH, H. Activation of dendritic cells and induction of CD4(+) T cell differentiation by aluminum-containing adjuvants. *Vaccine*. 2007. Vol. 25, n° 23, p. 4575-4585. DOI:10.1016/j.vaccine.2007.03.045.
- SOLIDARITES-SANTE.GOUV.FR. Agnès Buzyn, ministre des Solidarités et de la Santé précise la mise en œuvre des 11 vaccinations indispensables, obligatoires depuis le 1er janvier 2018. 2019. <https://solidarites-sante.gouv.fr/actualites/presse/communiqués-de-presse/article/agnes-buzyn-ministre-des-solidarites-et-de-la-sante-precise-la-mise-en-oeuvre>.
- SONG, H., LIU, B., HUAI, W., YU, Z., WANG, W., ZHAO, J., HAN, L., JIANG, G., ZHANG, L., GAO, C., *et al.* The E3 ubiquitin ligase TRIM31 attenuates NLRP3 inflammasome activation by promoting proteasomal degradation of NLRP3. *Nature Communications*. 2016. Vol. 7, p. 13727. DOI:10.1038/ncomms13727.
- SONG, Y., XUE, Y., LIU, X., WANG, P. & LIU, L. Effects of acute exposure to aluminum on blood-brain barrier and the protection of zinc. *Neuroscience Letters*. 2008. Vol. 445, n° 1, p. 42-46. DOI:10.1016/j.neulet.2008.08.081.
- SPICKLER, A.R. & ROTH, J.A. Adjuvants in veterinary vaccines: modes of action and adverse effects. *Journal of Veterinary Internal Medicine*. 2003. Vol. 17, n° 3, p. 273-281.
- SPREAFICO, R., RICCIARDI-CASTAGNOLI, P. & MORTELLARO, A. The controversial relationship between NLRP3, alum, danger signals and the next-generation adjuvants. *European Journal of Immunology*. 2010. Vol. 40, n° 3, p. 638-642. DOI:10.1002/eji.200940039.

- SRIDHAR, S., BOTBOL, Y., MACIAN, F. & CUERVO, A.M. Autophagy and disease: always two sides to a problem. *The Journal of Pathology*. 2012. Vol. 226, n° 2, p. 255-273. DOI:10.1002/path.3025.
- STEELE, L. Prevalence and patterns of Gulf War illness in Kansas veterans: association of symptoms with characteristics of person, place, and time of military service. *American Journal of Epidemiology*. 2000. Vol. 152, n° 10, p. 992-1002.
- STEJSKAL, V. Metals as a common trigger of inflammation resulting in non-specific symptoms: diagnosis and treatment. *The Israel Medical Association journal: IMAJ*. 2014. Vol. 16, n° 12, p. 753-758.
- STERN, S.T., ADISESHIAH, P.P. & CRIST, R.M. Autophagy and lysosomal dysfunction as emerging mechanisms of nanomaterial toxicity. *Particle and Fibre Toxicology*. 2012. Vol. 9, p. 20. DOI:10.1186/1743-8977-9-20.
- STERN, S.T. & JOHNSON, D.N. Role for nanomaterial-autophagy interaction in neurodegenerative disease. *Autophagy*. 2008. Vol. 4, n° 8, p. 1097-1100.
- STRUYS-PONSAR, C., KERKHOF, A., GAUTHIER, A., SOFFIÉ, M. & VAN DEN BOSCH DE AGUILAR, P. Effects of aluminum exposure on behavioral parameters in the rat. *Pharmacology, Biochemistry, and Behavior*. 1997. Vol. 56, n° 4, p. 643-648.
- SUN, B., JI, Z., LIAO, Y.-P., WANG, M., WANG, X., DONG, J., CHANG, C.H., LI, R., ZHANG, H., NEL, A.E., *et al.* Engineering an Effective Immune Adjuvant by Designed Control of Shape and Crystallinity of Aluminum Oxyhydroxide Nanoparticles. *ACS Nano*. 2013a. Vol. 7, n° 12, p. 10834-10849. DOI:10.1021/nm404211j.
- SUN, B., WANG, X., JI, Z., LI, R. & XIA, T. NLRP3 Inflammasome Activation Induced by Engineered Nanomaterials. *Small*. 2013b. Vol. 9, n° 9-10, p. 1595-1607. DOI:10.1002/smll.201201962.
- SUN, B. & XIA, T. Nanomaterial-based vaccine adjuvants. *Journal of Materials Chemistry B*. 2016. Vol. 4, n° 33, p. 5496-5509. DOI:10.1039/C6TB01131D.
- SUREAU, P., FABRE, P.S., N'GARO, S.B., BUTOR, S.C., POULOUGOU, M.M. & RELYVELD, E.H. Vaccination simultanée de nourrissons en milieu tropical contre le tétanos et la poliomyélite. *Bulletin of the World Health Organization*. 1977. Vol. 55, n° 6, p. 739.
- TAKAHASHI, Y., COPPOLA, D., MATSUSHITA, N., CUALING, H.D., SUN, M., SATO, Y., LIANG, C., JUNG, J.U., CHENG, J.Q., MULÉ, J.J., *et al.* Bif-1 interacts with Beclin 1 through UVRAG and regulates autophagy and tumorigenesis. *Nature Cell Biology*. 2007. Vol. 9, n° 10, p. 1142-1151. DOI:10.1038/ncb1634.
- TALBOT, R.J., NEWTON, D., PRIEST, N.D., AUSTIN, J.G. & DAY, J.P. Inter-subject variability in the metabolism of aluminium following intravenous injection as citrate. *Human & Experimental Toxicology*. 1995. Vol. 14, n° 7, p. 595-599. DOI:10.1177/096032719501400707.
- TAN, H.-Y., WANG, N., LI, S., HONG, M., WANG, X. & FENG, Y. The Reactive Oxygen Species in Macrophage Polarization: Reflecting Its Dual Role in Progression and Treatment of Human Diseases. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*. 2016. Vol. 2016, p. 2795090. DOI:10.1155/2016/2795090.

- TANAKA, Y., GUHDE, G., SUTER, A., ESKELINEN, E.L., HARTMANN, D., LÜLLMANN-RAUCH, R., JANSSEN, P.M., BLANZ, J., VON FIGURA, K. & SAFTIG, P. Accumulation of autophagic vacuoles and cardiomyopathy in LAMP-2-deficient mice. *Nature*. 2000. Vol. 406, n° 6798, p. 902-906. DOI:10.1038/35022595.
- TANG, G., GUDSNUK, K., KUO, S.-H., COTRINA, M.L., ROSOKLIJA, G., SOSUNOV, A., SONDEERS, M.S., KANTER, E., CASTAGNA, C., YAMAMOTO, A., *et al.* Loss of mTOR-dependent macroautophagy causes autistic-like synaptic pruning deficits. *Neuron*. 2014. Vol. 83, n° 5, p. 1131-1143. DOI:10.1016/j.neuron.2014.07.040.
- TANIDA, I., MINEMATSU-IKEGUCHI, N., UENO, T. & KOMINAMI, E. Lysosomal turnover, but not a cellular level, of endogenous LC3 is a marker for autophagy. *Autophagy*. 2005. Vol. 1, n° 2, p. 84-91.
- TANIDA, I., SOU, Y., EZAKI, J., MINEMATSU-IKEGUCHI, N., UENO, T. & KOMINAMI, E. HsAtg4B/HsApg4B/autophagin-1 cleaves the carboxyl termini of three human Atg8 homologues and delipidates microtubule-associated protein light chain 3- and GABAA receptor-associated protein-phospholipid conjugates. *The Journal of Biological Chemistry*. 2004. Vol. 279, n° 35, p. 36268-36276. DOI:10.1074/jbc.M401461200.
- TANIDA, I., UENO, T. & KOMINAMI, E. LC3 conjugation system in mammalian autophagy. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*. 2004. Vol. 36, n° 12, p. 2503-2518. DOI:10.1016/j.biocel.2004.05.009.
- TAVEIRA-DASILVA, A.M. & MOSS, J. Optimizing treatments for lymphangioliomyomatosis. *Expert Review of Respiratory Medicine*. 2012. Vol. 6, n° 3, p. 267-276. DOI:10.1586/ers.12.26.
- THEELER, B.J., SIMPER, N.B. & NEY, J.P. Polyglandular autoimmunity with macrophagic myofasciitis. *Clinical Rheumatology*. 2008. Vol. 27, n° 5, p. 667-669. DOI:10.1007/s10067-007-0793-9.
- THOMPSON, B.S., CHILTON, P.M., WARD, J.R., EVANS, J.T. & MITCHELL, T.C. The low-toxicity versions of LPS, MPL adjuvant and RC529, are efficient adjuvants for CD4+ T cells. *Journal of Leukocyte Biology*. 2005. Vol. 78, n° 6, p. 1273-1280. DOI:10.1189/jlb.0305172.
- THONGCHOT, S., JAMJUNTRA, P., THERASAKVICHYA, S., WARNNISSORN, M., FERRARESI, A., THUWAJIT, P., ISIDORO, C. & THUWAJIT, C. Interleukin-8 released by cancer-associated fibroblasts attenuates the autophagy and promotes the migration of ovarian cancer cells. *International Journal of Oncology*. 2021. Vol. 58, n° 5, p. 14. DOI:10.3892/ijo.2021.5194.
- THORNE, B.M., DONOHOE, T., LIN, K.N., LYON, S., MEDEIROS, D.M. & WEAVER, M.L. Aluminum ingestion and behavior in the Long-Evans rat. *Physiology & Behavior*. 1986. Vol. 36, n° 1, p. 63-67.
- TILSON, H.A. Behavioral indices of neurotoxicity: what can be measured? *Neurotoxicology and Teratology*. 1987. Vol. 9, n° 6, p. 427-443. DOI:10.1016/0892-0362(87)90055-9.
- TOMAS, C., BROWN, A., STRASSHEIM, V., ELSON, J.L., NEWTON, J. & MANNING, P. Cellular bioenergetics is impaired in patients with chronic fatigue syndrome. *PloS One*. 2017. Vol. 12, n° 10, p. e0186802. DOI:10.1371/journal.pone.0186802.
- TOMAS, C., BROWN, A., STRASSHEIM, V., ELSON, J.L., NEWTON, J. & MANNING, P. Correction: Cellular bioenergetics is impaired in patients with chronic fatigue syndrome. *PloS One*. 2018. Vol. 13, n° 2, p. e0192817. DOI:10.1371/journal.pone.0192817.

- TOMAS, C., ELSON, J.L., STRASSHEIM, V., NEWTON, J.L. & WALKER, M. The effect of myalgic encephalomyelitis/chronic fatigue syndrome (ME/CFS) severity on cellular bioenergetic function. *PLOS ONE*. 2020. Vol. 15, n° 4, p. e0231136. DOI:10.1371/journal.pone.0231136.
- TOMAS, C. & NEWTON, J. Metabolic abnormalities in chronic fatigue syndrome/myalgic encephalomyelitis: a mini-review. *Biochemical Society Transactions*. 2018. Vol. 46, n° 3, p. 547-553. DOI:10.1042/BST20170503.
- TOMLJENOVIC, L. Aluminum and Alzheimer's disease: after a century of controversy, is there a plausible link? *Journal of Alzheimer's disease: JAD*. 2011. Vol. 23, n° 4, p. 567-598. DOI:10.3233/JAD-2010-101494.
- TOMLJENOVIC, L. & SHAW, C.A. Aluminum vaccine adjuvants: are they safe? *Current medicinal chemistry*. 2011. Vol. 18, n° 17, p. 2630-2637.
- TREIB, J., GRAUER, M.T., HAASS, A., LANGENBACH, J., HOLZER, G. & WOESSNER, R. Chronic fatigue syndrome in patients with Lyme borreliosis. *European Neurology*. 2000. Vol. 43, n° 2, p. 107-109. DOI:10.1159/000008144.
- TROMBETTA, E.S., EBERSOLD, M., GARRETT, W., PYPART, M. & MELLMAN, I. Activation of lysosomal function during dendritic cell maturation. *Science (New York, N.Y.)*. 2003. Vol. 299, n° 5611, p. 1400-1403. DOI:10.1126/science.1080106.
- TSUNODA, M. & SHARMA, R.P. Altered Dopamine Turnover in Murine Hypothalamus after Low-dose Continuous Oral Administration of Aluminum. *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology*. 1999. Vol. 13, n° 4, p. 224-231. DOI:10.1016/S0946-672X(99)80040-6.
- TUR, J., PEREIRA-LOPES, S., VICO, T., MARÍN, E.A., MUÑOZ, J.P., HERNÁNDEZ-ALVAREZ, M., CARDONA, P.-J., ZORZANO, A., LLOBERAS, J. & CELADA, A. Mitofusin 2 in Macrophages Links Mitochondrial ROS Production, Cytokine Release, Phagocytosis, Autophagy, and Bactericidal Activity. *Cell Reports*. 2020. Vol. 32, n° 8, p. 108079. DOI:10.1016/j.celrep.2020.108079.
- ULANOVA, M., TARKOWSKI, A., HAHN-ZORIC, M. & HANSON, L.A. The Common vaccine adjuvant aluminum hydroxide up-regulates accessory properties of human monocytes via an interleukin-4-dependent mechanism. *Infection and Immunity*. 2001. Vol. 69, n° 2, p. 1151-1159. DOI:10.1128/IAI.69.2.1151-1159.2001.
- VACCINATION-INFO-SERVICE.FR. Vaccins d'hier à aujourd'hui. 2018a. <https://vaccination-info-service.fr/Generalites-sur-les-vaccinations/Histoire-de-la-vaccination/Vaccins-d-hier-a-aujourd-hui>.
- VACCINATION-INFO-SERVICE.FR. Politique vaccinale à l'étranger. 2018b. <https://professionnels.vaccination-info-service.fr/Aspects-reglementaires/Politique-vaccinale/Politique-vaccinale-a-l-etranger>.
- VACCINATION-INFO-SERVICE.FR. Composants des vaccins. 2021. <https://professionnels.vaccination-info-service.fr/Aspects-scientifiques/Compositions-des-vaccins/Composants-des-vaccins>.
- VACCINE PAPERS. 2015. <http://vaccinepapers.org/>.
- VAN DER GUCHT, A., ABULIZI, M., BLANC-DURAND, P., AOUN-SEBAITI, M., EMSÉN, B., GHERARDI, R.K., VERGER, A., AUTHIER, F.-J. & ITTI, E. Predictive value of brain 18F-FDG PET/CT in macrophagic myofasciitis?: A case report. *Medicine*. 2017. Vol. 96, n° 39, p. e8134. DOI:10.1097/MD.0000000000008134.

- VAN DER GUCHT, A., AOUN SEBAITI, M., ITTI, E., AOUIZERATE, J., EVANGELISTA, E., CHALAYE, J., GHERARDI, R.K., RAGUNATHAN-THANGARAJAH, N., BACHOUD-LEVI, A.-C. & AUTHIER, F.-J. Neuropsychological Correlates of Brain Perfusion SPECT in Patients with Macrophagic Myofasciitis. *PLoS One*. 2015. Vol. 10, n° 6. DOI:10.1371/journal.pone.0128353.
- VAN DER GUCHT, A., AOUN-SEBAÏTI, M., GUEDJ, E., AOUIZERATE, J., YARA, S., GHERARDI, R., EVANGELISTA, E., CHALAYE, J., COTTEREAU, A. s, VERGER, A., *et al.* Brain FDG-PET metabolic abnormalities in patients with long-lasting macrophagic myofasciitis. *Journal of Nuclear Medicine*. 2016. Vol. 58. DOI:10.2967/jnumed.114.151878.
- VARELA-MARTÍNEZ, E., ABENDAÑO, N., ASÍN, J., SISTIAGA-POVEDA, M., PÉREZ, M.M., REINA, R., DE ANDRÉS, D., LUJÁN, L. & JUGO, B.M. Molecular Signature of Aluminum Hydroxide Adjuvant in Ovine PBMCs by Integrated mRNA and microRNA Transcriptome Sequencing. *Frontiers in Immunology*. 2018. Vol. 9, p. 2406. DOI:10.3389/fimmu.2018.02406.
- VASSILEV, T.L. Aluminium phosphate but not calcium phosphate stimulates the specific IgE response in guinea pigs to tetanus toxoid. *Allergy*. 1978a. Vol. 33, n° 3, p. 155-159.
- VASSILEV, T.L. Aluminium phosphate but not calcium phosphate stimulates the specific IgE response in guinea pigs to tetanus toxoid. *Allergy*. 1978b. Vol. 33, n° 3, p. 155-159.
- 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. Vol. 23, n° 11, p. 1359-1367. DOI:10.1016/j.vaccine.2004.09.012.
- VERMEULEN, R.C.W. & SCHOLTE, H.R. Rupture of silicone gel breast implants and symptoms of pain and fatigue. *The Journal of Rheumatology*. 2003. Vol. 30, n° 10, p. 2263-2267.
- VIGNAL, C., DESREUMAUX, P. & BODY-MALAPEL, M. Gut: An underestimated target organ for Aluminum. *Morphologie: Bulletin De l'Association Des Anatomistes*. 2016. Vol. 100, n° 329, p. 75-84. DOI:10.1016/j.morpho.2016.01.003.
- VISWANATHAN, K., GOPINATH, V.P. & RAJ, G.D. Formulation of Newcastle disease virus coupled calcium phosphate nanoparticles: an effective strategy for oculonasal delivery to chicken. *Colloids and Surfaces. B, Biointerfaces*. 2014. Vol. 116, p. 9-16. DOI:10.1016/j.colsurfb.2013.12.017.
- VODICKA, P., LIM, J., WILLIAMS, D.T., KEGEL, K.B., CHASE, K., PARK, H., MARCHIONINI, D., WILKINSON, S., MEAD, T., BIRCH, H., *et al.* Assessment of chloroquine treatment for modulating autophagy flux in brain of WT and HD mice. *Journal of Huntington's disease*. 2014. Vol. 3, n° 2, p. 159-174.
- WALKER, M.K., BOBERG, J.R., WALSH, M.T., WOLF, V., TRUJILLO, A., DUKE, M.S., PALME, R. & FELTON, L.A. A less stressful alternative to oral gavage for pharmacological and toxicological studies in mice. *Toxicology and Applied Pharmacology*. 2012. Vol. 260, n° 1, p. 65-69. DOI:10.1016/j.taap.2012.01.025.
- WALKER, V.R., SUTTON, R.A., MEIRAV, O., SOSSI, V., JOHNSON, R., KLEIN, J., FINK, D. & MIDDLETON, R. Tissue disposition of 26aluminum in rats measured by accelerator mass spectrometry. *Clinical and Investigative Medicine. Medecine Clinique Et Experimentale*. 1994. Vol. 17, n° 5, p. 420-425.

- WALSH, R.N. & CUMMINS, R.A. The Open-Field Test: a critical review. *Psychological Bulletin*. 1976. Vol. 83, n° 3, p. 482-504.
- WANG, X., LI, X., ITO, A., WATANABE, Y., SOGO, Y., HIROSE, M., OHNO, T. & TSUJI, N.M. Rod-shaped and substituted hydroxyapatite nanoparticles stimulating type 1 and 2 cytokine secretion. *Colloids and Surfaces. B, Biointerfaces*. 2016a. Vol. 139, p. 10-16. DOI:10.1016/j.colsurfb.2015.12.004.
- WANG, X., LI, X., ITO, A., WATANABE, Y. & TSUJI, N.M. Rod-shaped and fluorine-substituted hydroxyapatite free of molecular immunopotentiators stimulates anti-cancer immunity in vivo. *Chemical Communications (Cambridge, England)*. 2016b. Vol. 52, n° 44, p. 7078-7081. DOI:10.1039/c6cc02848a.
- WANG, X.-Y., YAO, X., WAN, Y.-M., WANG, B., XU, J.-Q. & WEN, Y.-M. Responses to multiple injections with alum alone compared to injections with alum adsorbed to proteins in mice. *Immunology Letters*. 2013. Vol. 149, n° 1-2, p. 88-92. DOI:10.1016/j.imlet.2012.11.005.
- WANG, Y., YAN, T., SHEN, J., GUO, H. & XIANG, X. Preventive effect of *Ophiopogon japonicus* polysaccharides on an autoallergic mouse model for Sjogren's syndrome by regulating the Th1/Th2 cytokine imbalance. *Journal of Ethnopharmacology*. 2007. Vol. 114, n° 2, p. 246-253. DOI:10.1016/j.jep.2007.08.014.
- WEBB, J.L., RAVIKUMAR, B. & RUBINSZTEIN, D.C. Microtubule disruption inhibits autophagosome-lysosome fusion: implications for studying the roles of aggresomes in polyglutamine diseases. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*. 2004. Vol. 36, n° 12, p. 2541-2550. DOI:10.1016/j.biocel.2004.02.003.
- WEISS, B. Vulnerability of children and the developing brain to neurotoxic hazards. *Environmental Health Perspectives*. 2000. Vol. 108 Suppl 3, p. 375-381. DOI:10.1289/ehp.00108s3375.
- WEISS, B. & LANDRIGAN, P.J. The developing brain and the environment: an introduction. *Environmental Health Perspectives*. 2000. Vol. 108 Suppl 3, p. 373-374. DOI:10.1289/ehp.00108s3373.
- WEISSER, K., GÖEN, T., ODURO, J.D., WANGORSCH, G., HANSCHMANN, K.-M.O. & KELLER-STANISLAWSKI, B. Aluminium in plasma and tissues after intramuscular injection of adjuvanted human vaccines in rats. *Archives of Toxicology*. 2019. Vol. 93, n° 10, p. 2787-2796. DOI:10.1007/s00204-019-02561-z.
- WEN, G.Y. & WISNIEWSKI, H.M. Histochemical localization of aluminum in the rabbit CNS. *Acta Neuropathologica*. 1985. Vol. 68, n° 3, p. 175-184.
- WENDELN, A.-C., DEGENHARDT, K., KAURANI, L., GERTIG, M., ULAS, T., JAIN, G., WAGNER, J., HÄSLER, L.M., WILD, K., SKODRAS, A., *et al.* Innate immune memory in the brain shapes neurological disease hallmarks. *Nature*. 2018. Vol. 556, n° 7701, p. 332-338. DOI:10.1038/s41586-018-0023-4.
- WESSELY, S., HOTOPF, M. & SHARPE, M. *Chronic Fatigue and its Syndromes*. Oxford, New York : Oxford University Press. 1999. ISBN:978-0-19-263046-9.
- WHITEHEAD, G.S., WALKER, J.K.L., BERMAN, K.G., FOSTER, W.M. & SCHWARTZ, D.A. Allergen-induced airway disease is mouse strain dependent. *American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology*. 2003. Vol. 285, n° 1, p. L32-L42. DOI:10.1152/ajplung.00390.2002.

- WILLHITE, C.C., KARYAKINA, N.A., YOKEL, R.A., YENUGADHATI, N., WISNIEWSKI, T.M., ARNOLD, I.M.F., MOMOLI, F. & KREWSKI, D. Systematic review of potential health risks posed by pharmaceutical, occupational and consumer exposures to metallic and nanoscale aluminum, aluminum oxides, aluminum hydroxide and its soluble salts. *Critical Reviews in Toxicology*. 2014. Vol. 44 Suppl 4, p. 1-80. DOI:10.3109/10408444.2014.934439.
- WOLF, R., WOLF, D. & RUOCCO, V. Antimalarials: unapproved uses or indications. *Clinics in Dermatology*. 2000. Vol. 18, n° 1, p. 17-35.
- WOLFRAM, J., NIZZERO, S., LIU, H., LI, F., ZHANG, G., LI, Z., SHEN, H., BLANCO, E. & FERRARI, M. A chloroquine-induced macrophage-preconditioning strategy for improved nanodelivery. *Scientific Reports*. 2017. Vol. 7, n° 1, p. 13738. DOI:10.1038/s41598-017-14221-2.
- WORLD HEALTH ORGANIZATION. Adjuvants de l'immunité. *Série de rapports techniques*. 1976. Vol. 595, p. 43.
- WORLD HEALTH ORGANIZATION. Macrophagic myofasciitis and aluminum-containing vaccines. *Weekly Epidemiological Record*. 1999. Vol. 74, p. 338-340.
- WORLD HEALTH ORGANIZATION. Relevé épidémiologique hebdomadaire. . 2004. N° 29, p. 269.
- WORLD HEALTH ORGANIZATION. OMS | Programme d'éradication de la variole (1966-1980). *WHO2010*. <https://www.who.int/features/2010/smallpox/fr/>.
- WORLD HEALTH ORGANIZATION. OMS | Adjuvants à base d'aluminium. 2012. https://www.who.int/vaccine_safety/committee/topics/adjuvants/Jun_2012/fr/.
- WORLD HEALTH ORGANIZATION. Les bases de la sécurité des vaccins. 2013. <http://fr.vaccine-safety-training.org/accueil.html>.
- WYLLER, V.B. The chronic fatigue syndrome – an update. *Acta Neurologica Scandinavica*. 2007. Vol. 115, n° s187, p. 7-14. DOI:<https://doi.org/10.1111/j.1600-0404.2007.00840.x>.
- XU, N., MAJIDI, V., MARKESBERY, W.R. & EHMANN, W.D. Brain aluminum in Alzheimer's disease using an improved GFAAS method. *Neurotoxicology*. 1992. Vol. 13, n° 4, p. 735-743.
- XU, Y., SHEN, J. & RAN, Z. Emerging views of mitophagy in immunity and autoimmune diseases. *Autophagy*. 2020. Vol. 16, n° 1, p. 3-17. DOI:10.1080/15548627.2019.1603547.
- YANG, C.-S., LEE, J.-S., RODGERS, M., MIN, C.-K., LEE, J.-Y., KIM, H.J., LEE, K.-H., KIM, C.-J., OH, B., ZANDI, E., *et al.* Autophagy protein Rubicon mediates phagocytic NADPH oxidase activation in response to microbial infection or TLR stimulation. *Cell Host & Microbe*. 2012. Vol. 11, n° 3, p. 264-276. DOI:10.1016/j.chom.2012.01.018.
- YANG, J., QI, F., YANG, Y., YUAN, Q., ZOU, J., GUO, K. & YAO, Z. Neonatal hepatitis B vaccination impaired the behavior and neurogenesis of mice transiently in early adulthood. *Psychoneuroendocrinology*. 2016. Vol. 73, p. 166-176. DOI:10.1016/j.psyneuen.2016.08.002.
- YAQUB, O., CASTLE-CLARKE, S., SEVDALIS, N. & CHATAWAY, J. Attitudes to vaccination: A critical review. *Social Science & Medicine*. 2014. Vol. 112, p. 1-11. DOI:10.1016/j.socscimed.2014.04.018.
- YI, H., YE, T., GE, M., YANG, M., ZHANG, L., JIN, S., YE, X., LONG, B. & LI, L. Inhibition of autophagy enhances the targeted therapeutic effect of sorafenib in thyroid cancer. *Oncology Reports*. 2018. Vol. 39, n° 2, p. 711-720. DOI:10.3892/or.2017.6118.

- YIN, Y., SUN, G., LI, E., KISELYOV, K. & SUN, D. ER stress and impaired autophagy flux in neuronal degeneration and brain injury. *Ageing Research Reviews*. 2017. Vol. 34, p. 3-14. DOI:10.1016/j.arr.2016.08.008.
- YLÄ-ANTTILA, P., VIHINEN, H., JOKITALO, E. & ESKELINEN, E.-L. 3D tomography reveals connections between the phagophore and endoplasmic reticulum. *Autophagy*. 2009. Vol. 5, n° 8, p. 1180-1185. DOI:10.4161/auto.5.8.10274.
- YOKOYAMA, T., TAM, J., KURODA, S., SCOTT, A.W., AARON, J., LARSON, T., SHANKER, M., CORREA, A.M., KONDO, S., ROTH, J.A., *et al.* EGFR-targeted hybrid plasmonic magnetic nanoparticles synergistically induce autophagy and apoptosis in non-small cell lung cancer cells. *PLoS One*. 2011. Vol. 6, n° 11, p. e25507. DOI:10.1371/journal.pone.0025507.
- ZHAO, L., SETH, A., WIBOWO, N., ZHAO, C.-X., MITTER, N., YU, C. & MIDDELBERG, A.P.J. Nanoparticle vaccines. *Vaccine*. 2014. Vol. 32, n° 3, p. 327-337. DOI:10.1016/j.vaccine.2013.11.069.
- ZHENG, X., JIN, X., LI, F., LIU, X., LIU, Y., YE, F., LI, P., ZHAO, T. & LI, Q. Inhibiting autophagy with chloroquine enhances the anti-tumor effect of high-LET carbon ions via ER stress-related apoptosis. *Medical Oncology (Northwood, London, England)*. 2017. Vol. 34, n° 2, p. 25. DOI:10.1007/s12032-017-0883-8.
- ZHOU, W., MOGUCHE, A.O., CHIU, D., MURALI-KRISHNA, K. & BANEYX, F. Just-in-time vaccines: Biomaterialized calcium phosphate core-immunogen shell nanoparticles induce long-lasting CD8(+) T cell responses in mice. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine*. 2014. Vol. 10, n° 3, p. 571-578. DOI:10.1016/j.nano.2013.11.007.
- ZOLA-MORGAN, S., SQUIRE, L.R. & AMARAL, D.G. Human amnesia and the medial temporal region: enduring memory impairment following a bilateral lesion limited to field CA1 of the hippocampus. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*. 1986. Vol. 6, n° 10, p. 2950-2967.
- ZUREIK, M., DRAY-SPIRA, R., MIRANDA, S. & COLLIN, C. *Vaccins anti-HPV et risque de maladies auto-immunes : étude pharmacoépidémiologique (Rapport CNAM/ANSM)*. 2015. http://ansm.sante.fr/var/ansm_site/storage/original/application/ea5e12b9c18ae41c2b8163ae5d7cb6f3.pdf.

VALORISATION SCIENTIFIQUE

Publications scientifiques*Acceptées*

MASSON, J.-D., BLANCHET, B., PERIOU, B., AUTHIER, F.-J., MOGRABI, B., GHERARDI, R.K. & CRÉPEAUX, G. Long Term Pharmacological Perturbation of Autophagy in Mice: Are HCQ Injections a Relevant Choice? *Biomedicines*. 2020. Vol. 8, n ° 3, p. 47. DOI:[10.3390/biomedicines8030047](https://doi.org/10.3390/biomedicines8030047).

MASSON, J.-D., CRÉPEAUX, G., AUTHIER, F.-J., EXLEY, C. & GHERARDI, R.K. Critical analysis of reference studies on the toxicokinetics of aluminum-based adjuvants. *Journal of Inorganic Biochemistry*. 2018. Vol. 181, p. 87-95. DOI:[10.1016/j.jinorgbio.2017.12.015](https://doi.org/10.1016/j.jinorgbio.2017.12.015).

MASSON, J.-D., CRÉPEAUX, G., AUTHIER, F.-J., EXLEY, C. & GHERARDI, R.K. Adjuvants aluminiques des vaccins : analyse critique des études toxicocinétiques de référence. *Annales Pharmaceutiques Françaises*. 2017. Vol. 75, n ° 4, p. 245-256. DOI:[10.1016/j.pharma.2017.04.004](https://doi.org/10.1016/j.pharma.2017.04.004).

MASSON, J.-D., THIBAUDON, M., BÉLEC, L. & CRÉPEAUX, G. Calcium phosphate: a substitute for aluminum adjuvants? *Expert Review of Vaccines*. 2016. N ° 3, p. 289-299. DOI:[10.1080/14760584.2017.1244484](https://doi.org/10.1080/14760584.2017.1244484).

En préparation

MASSON, J.-D., AUTHIER, F.-J., GHERARDI, R.K., CRÉPEAUX, G. Inflammatory response to immune challenge and clearance mechanism in a paradigm of myalgic encephalomyelitis/chronic fatigue syndrome: an exploratory study

ANGRAND*, L., **MASSON***, J.-D., BADRAN. G., EL NAR. A., RODRIGUEZ. LARGO ; A., DE MIGUEL. R., ESCOUBE. R., CRÉPEAUX, G. Clearance, biodistribution and neurotoxicity of Aluminium adjuvants: what do we learn from animal studies?

(* First co-authors)

Communications lors de congrès

Communications orales

Masson J.-D., Thibaudon M., Bélec L., Crépeaux G., Le phosphate de calcium : un substitut aux adjuvants aluminiques ?, *7ème journée scientifique du Centre de Recherche des Maladies Neuromusculaires*, 31/03/2017, Paris, France

Communications affichées

Masson, J.-D., Angrand, L., Petitjean, M., Crépeaux, G., Authier, F.-J., Gherardi R.K., A dose-response study of hydroxychloroquine: autophagy disturbance without neurodevelopmental troubles. *Colloque annuel de l'institut Mondor de Recherche Biomédicale*, 10/10/2018, Paris, France

Crépeaux G., **Masson J.-D.**, Authier F.-J., Gherardi R.K., Aluminium salts in vaccines: From ancient concepts to current knowledge, *Congrès annuel EUROTOX*, 08-11/09/2019, Helsinki, Finlande

Masson J.-D., Roméo B., Domdom M.-A., Crépeaux G., Authier F.-J., Mograbi B., Gherardi R.K., Single Nucleotide Polymorphisms of autophagy related genes could explain the inability of macrophagic myofasciitis patients to clear out the Aluminum adjuvant from their body. *Colloque annuel de l'institut Mondor de Recherche Biomédicale*, 09/10/2019, Paris, France

Publication 1 : Long Term Pharmacological Perturbation of Autophagy in Mice: Are HCQ Injections a Relevant Choice?



Article

Long Term Pharmacological Perturbation of Autophagy in Mice: Are HCQ Injections a Relevant Choice?

Jean-Daniel Masson ¹, Benoît Blanchet ^{2,3}, Baptiste Periou ^{1,4}, François-Jérôme Authier ^{1,4}, Baharia Mograbi ⁵, Romain K. Gherardi ¹ and Guillemette Crépeaux ^{1,6,*}

- ¹ Univ Paris Est Creteil, INSERM, IMRB, F-94010 Creteil, France; jean-daniel.masson@inserm.fr (J.-D.M.); baptiste.periou@inserm.fr (B.P.); francois-jerome.authier@aphp.fr (F.-J.A.); romain.gherardi@aphp.fr (R.K.G.)
² AP-HP, Hôpital Cochin, Biologie du médicament - Toxicologie, 27 rue du Faubourg Saint-Jacques, 75014 Paris, France; benoit.blanchet@aphp.fr
³ University Paris Descartes, Faculty of Pharmacy, UMR8038 CNRS, U1268 INSERM, PRES Sorbonne Paris Cité, 75006 Paris, France
⁴ Hôpitaux Universitaires Henri Mondor (APHP), Centre Expert de Pathologie Neuromusculaire, 94010 Créteil, France
⁵ Université Côte d'Azur, CNRS, INSERM, IRCAN, FHU-OncoAge, Centre Antoine Lacassagne, 06107 Nice France; baharia.mograbi@unice.fr
⁶ Ecole Nationale Vétérinaire d'Alfort, IMRB, F-94700 Maisons-Alfort, France
 * Correspondence: guillemette.crepeaux@vet-alfort.fr

Received: 13 February 2020; Accepted: 27 February 2020; Published: 1 March 2020



Abstract: Macroautophagy (hereafter referred to as autophagy) is an evolutionarily conserved catabolic process whose loss-of-function has been linked to a growing list of pathologies. Knockout mouse models of key autophagy genes have been instrumental in the demonstration of the critical functions of autophagy, but they display early lethality, neurotoxicity and unwanted autophagy-independent phenotypes, limiting their applications for in vivo studies. To avoid problems encountered with autophagy-null transgenic mice, we investigated the possibility of disturbing autophagy pharmacologically in the long term. Hydroxychloroquine (HCQ) ip injections were done in juvenile and adult C57bl/6j mice, at range doses adapted from the human malaria prophylactic treatment. The impact on autophagy was assessed by western-blotting, and juvenile neurodevelopment and adult behaviours were evaluated for four months. Quite surprisingly, our results showed that HCQ treatment in conditions used in this study neither impacted autophagy in the long term in several tissues and organs nor altered neurodevelopment, adult behaviour and motor capabilities. Therefore, we recommend for future long-term in vivo studies of autophagy, to use genetic mouse models allowing conditional inhibition of selected *Atg* genes in appropriate lineage cells instead of HCQ treatment, until it could be successfully revisited using higher HCQ doses and/or frequencies with acceptable toxicity.

Keywords: autophagy; hydroxychloroquine; mice; long term; dose-response

1. Introduction

Autophagy is a detoxification pathway preserving cellular homeostasis in physiological conditions and more importantly under environmental stress by ensuring the turnover of damaged organelles and long-lived proteins [1]. The term “autophagy” was first introduced by Christian De Duve [2] more than five decades ago. Three forms of autophagy are commonly described: microautophagy able to engulf the cytoplasmic cargo by lysosomal membrane invagination [3], chaperone-mediated autophagy,

which used specific proteins to internalize cytosolic cargo through the lysosome membrane [4] and macroautophagy (hereafter referred to as autophagy). Autophagy, as protein and organelles major degradative pathway, plays essential roles in cell survival, tissue remodelling and tumour suppression and its dysfunction is crucially involved in a variety of pathologic states [5]. Autophagy is mediated by over 30 autophagy-related (ATG) genes that have been mainly disclosed in *S. cerevisiae* and found well-conserved in mammals. The autophagy process begins with the formation of a double-membrane compartment (“phagophore”) that sequesters cargo from the cytosol. Phagophore expands into a completed vesicle (“autophagosome”) which subsequently fuses with a lysosome (“autolysosome”) allowing degradation of the luminal content by acid hydrolases [6]. Before fusion with a lysosome, the autophagosome can also fuse with an endosome to form an amphisome connecting autophagy with phagocytosis [7]. As a highly dynamic multi-step process, autophagy is hard to measure, and evaluation of autophagy flux remains essential. According to Klionsky’s et al. guidelines [8], several techniques can be used to distinguish increased autophagy induction, impaired autophagosome/lysosome fusion, and the inability to clear autophagosomes, which can all produce the same response. One of the most common methods relies on the quantification of both microtubule-associated protein 1A/1B-light chain 3 (LC3)-I and LC3-II, a specific autophagosome marker, and the degradation of the autophagy substrated SQSTM1/p62 proteins by Western blotting.

Autophagy usually occurs at a basal rate in all cell-type to maintain cellular homeostasis by eliminating misfolded proteins and damaged organelles. However, this process can be induced by stress conditions such as metabolic stress (starvation) or hypoxia and can modulate the oxidative stress or the inflammatory response [9]. A related mechanism is implicated in the digestion of unwanted foreign invading material (“xenophagy”) such as bacteria and viruses. Several ATG and additional genes, ensure the rapid delivery of extracellular cargo to the lysosome through a non-canonical autophagy pathway called LC3-associated phagocytosis (LAP) [10]. Xenobiotics, metals and particles are known to interplay with the autophagy machinery [11], and xeno/autophagy is involved in the biodisposition and toxicity of mineral [12,13] and metallic particles [14,15], which can, in turn, destabilize lysosomes [16–20]. As a result, even at low doses, close to an environmental exposure level, xenobiotics, metals and pesticides are able to suppress autophagy, explaining their adverse toxic and inflammatory effects [21–24].

Autophagy defects have been involved in a growing list of pathologies, including toxic injury, infections, neurologic, neurodevelopmental, myopathic, autoimmune or inflammatory conditions [25]. Single nucleotide polymorphisms (SNPs) in several autophagy genes have been found in patients with inflammatory bowel disease (IBD) [9,26,27], leading to a reduced expression of ATG16 protein [28,29]. A mouse model expressing the *Atg16LI* T300A variant showed that autophagy deficiency was associated with increased pro-inflammatory cytokine (IL1 β) secretion by macrophages [29]. Other genetic models targeting *Atg16LI* or *IRGM* were shown to present higher sensitivity to xenobiotics, like dextran sulphate sodium, than control mice [29–31]. Furthermore, it has been proposed that SNPs in autophagy genes may predispose to inflammatory diseases only upon a particular environmental exposure [9]. For example, promising preliminary data have been obtained by DNA screening of 34 genes directly involved in the xeno-autophagy machinery. It is suggesting that the abnormal biopersistence of Aluminium (Al) particle adjuvants observed in the Macrophagic myofasciitis (MMF) lesion may reflect genetically-determined inability of some individuals to efficiently dispose of injected Al adjuvants (European patent 18207583.8-1118, manuscript deposited) [32]. Thus, in addition to the already reported impaired autophagic response to Al oxide particles [16,17,33], it appears that the poor clearance of Al adjuvants in MMF patients could be related to a genetically susceptibility inducing limited autophagy, likely causing longstanding immune stimulation and favouring translocation of the adjuvant-loaded immune cells to distant organs and the brain [34]. Thus, as in IBD in which chronic inflammation has been attributed to lack of autophagic clearance of intracellular microbial particles [35], abnormal sensitivity to vaccine adjuvant particles may well be linked to genetically impaired ability to clear out Al particles, involving autophagy deficiency [32].

Altogether, those observations highly suggest that impaired autophagy and/or altered AI particle detoxification may be involved in AI-particle induced neurotoxicity and MMF pathogenesis. This prompted us to develop an *in vivo* model to further study the consequences of autophagy inhibition on toxicity and MMF pathogenesis. The most common way to model autophagy-deficiency conditions *in vivo* is to use genetically modified mice with deleted *ATG* genes, but this approach presents some disadvantages. Among all genes controlling autophagy, 14 have been knocked out in mice. Moreover, due to the multiple and crucial functions of autophagy at different developmental stages, *Atg* null mice are often nearly unusable: some KO mice die *in utero*, other die a few days after birth prohibiting long term studies, and the viable animals may show dysfunctional phenotypes interfering with planned analyses [36]. For example, *Atg5* KO and *Atg7* KO are lethal at very early stages of life, and, when KO was restricted to myeloid lineage cells, different unexpected phenotypes may ensue: *Atg7* KO in myeloid lineage cells impairs synaptic pruning and causes social behavioural defects in mice pups [37] whereas *Atg5* KO in myeloid lineage cells is associated with abnormal intracellular proteins accumulation in neurons accompanied by neurodegeneration and progressive deficit of motor function [38].

To circumvent genetic model limitations, we searched for a pharmacological method to globally disturb autophagy after birth, in both juvenile and adult mice. Hydroxychloroquine (HCQ), and chloroquine (CQ), are drugs used to treat malaria and have anti-inflammatory properties that have long been recognized and used to treat rheumatoid arthritis and systemic lupus erythematosus [39]. HCQ differs from CQ only by a hydroxyl group, but this difference allows it to be three time less toxic than CQ [40,41]. It is a fully water-soluble diprotic weak base, highly attracted by acidic compartments (lysosomotropic agent). It can cross the lysosome's membrane under unprotonated form. Once protonated, HCQ stays trapped in lysosomes, where it induces pH increase by proton capturing [42]. Interference with lysosomal acidification leads to default in phagolysosomal fusion [43]. HCQ kinetics are a bit complex with a quick plasma concentration peak 4 to 12 h after injection, followed by an exponential decrease with a half-life of 74 h to 50 days, depending on initial dosage [42,44]. HCQ and CQ are currently and successfully used to induce short time perturbations of the autophagy pathway through intraperitoneal (ip) injections in mice and rats [45–50]. Doses used for mice treatment range from 10 to 80 mg/kg with the effect observed from some hours to some days after the last injection, with a maximum treatment duration of two weeks in the literature [50–55]. Moreover, CQ and HCQ are recommended as autophagy inhibitors for the autophagy flux measurement *in vitro* [8,56,57]. However, doses used and schedule applied should be carefully selected because CQ and to a lesser extent, HCQ, are toxic compounds able to produce vacuolar myopathy [58,59], retinopathy [60], cardiomyopathy and neuromyopathy [42]. As a lysosomotropic drug such as CQ, HCQ allows LC3-II and SQSTM1/p62 to accumulate as a probable result of lysosome deprotonation and/or inhibition of the fusion between lysosome and autophagosome, and the subsequent impairment of autolysosomal degradation [50].

In the present study, we aimed to develop a murine model of long-term systemic autophagy dysfunction, by the way of repeated injections of HCQ in both juvenile and adult animals, while ensuring a limited impact on development, behaviour and motricity. This model could allow to perform long-term toxicokinetic studies and to understand the role of autophagy in toxicity and kinetic of immune-stimulating particles.

2. Materials and Methods

In this study, two experiments were carried out in parallel: the first one included juvenile mice treated from birth to their fourth month and the second one included adult. Juvenile mice were tested for neurobehavioural development between post-natal day (PND) 5 to 25 and were then evaluated with a battery of behavioural or physical tests during one week before PND73 and PND136. Adult mice were evaluated with the same array of tests than juvenile mice with the same delay elapsed from the beginning of treatment and behavioural evaluation.

2.1. Animals

2.1.1. Juvenile Experiment

Twenty-eight females (7 weeks) and 14 males (8 months) C57BL/6J mice were purchased from Janvier Labs (France). Upon arrival, females were housed 5 per cage, and males were housed lonely in a regulated environment (temperature 22 ± 2 °C; humidity $55 \pm 10\%$) under a 12 h light cycle (lights on from 7:00 a.m. to 7:00 p.m.). Animals were given free access to food (Granovit AG, Kaiseraugst, Switzerland) and water. After one week for acclimatization, females were mated with breeding males (two females with one male) and were examined the following evening by vaginal smear to assess successful mating. When successful, females were removed from the cage and were housed individually. At birth (day of birth = post-natal day PND0), litters were reduced to 6 pups if necessary to standardize the litter size and to prevent any other litter effects on pup development. All pups were tested for developmental behaviour from PND5 to PND25.

Males and females were separated after weaning (PND28). Adult behavioural tests were performed during a week from PND73 and PND136. At PND11, 26, 73 and 136, seven animals per gender per treatment were sacrificed, and samples removed for Western-blotting analyses and analytical protocol (see Section 2.3).

All the animal experiments were performed following the rules provided by the European Union (Directive 2010/63/EU) and were approved by the institutional ethics committee of the National Veterinary school of Maisons-Alfort (authorization number APAFIS#13038-2018011509088600, 23 August 2018).

2.1.2. Adult Experiment

A total of 60 female and 60 male (8 weeks) C57BL/6J mice were purchased from Janvier Labs (France). Upon arrival, animals were housed 5 per cage in a regulated environment (temperature 22 ± 2 °C; humidity $55 \pm 10\%$) under a 12 h light cycle (lights on from 7:00 a.m. to 7:00 p.m.). Animals were given free access to food (Granovit AG, Kaiseraugst, Switzerland) and water. After one week for acclimatization, animals were randomly assigned to one of the experimental groups. Day 1 (D1) of this adult experiment is defined as the first injection day. Animals were sacrificed at three different endpoints: one at the beginning of the experiments, one two months later, and one four months and a half (exact days 3, 73 and 136 after the first injection). Samples removed for Western-blotting analyses and analytical protocol (see Section 2.3). Animals were tested for behaviour before the two last endpoints (73 or 136 days after the first HCQ injection).

All experiments were performed following the rules provided by the European Union (Directive 2010/63/EU) and were approved and supervised by the institutional ethics committee of the National Veterinary school of Maisons-Alfort (authorization number APAFIS#9767-2017042116187889, 30 November 2017 and APAFIS#11633-2017100309523784, 6 April 2018).

2.2. Doses and Protocol of Exposure

2.2.1. Juvenile Experiment

Five experimental groups were formed, each including a minimum of 5 animals/sex/endpoint. In each litter, animals were randomly assigned to one of the HCQ-dose group. The five groups were exposed to 0; 15; 30; 50 or 70 mg of hydroxychloroquine (HCQ) per kg through ip injections, at PND6, 10, 14, 21 then once a week until this end of the experiment. From PND6 to PND21 mice received a common injection volume of 25 μ L, from PND22 to PND35 the injected volume was 100 μ L and then 200 μ L for adult mice. Doses used were calculated from the CDC human recommendation of 310 mg per week. A 75 kg man taking this medicine receives around 4 mg of HCQ per kilogram of body weight. We used an allometry calculation based on body surface area that reflects the metabolic rate to determine the human equivalent dose per kg to extrapolate human to mouse dosage. This $\times 12.3$

allometric conversion factor from human to mouse [61] is easy to apply. The conversion resulted in 50 mg HCQ/kg mouse body weight for one human dose. This basis dose was subsequently adjusted with a stronger one (70 mg/kg) if mice were resistant to HCQ action and two small doses (15 and 30 mg/kg) to prevent animal damages if mice were responsive to treatment especially the dose 15 mg/kg for juvenile which were not fully developed and probably more sensitive to pharmacological therapies. HCQ (Plaquenil[®], Sanofi-Aventis, Gentilly, France) was prepared to mimic the human prophylactic treatment against malaria which can be maintained in the long term. Some components of the pills are probably able to modulate the autophagy process (e.g., excipients), therefore we have chosen to work with the whole human treatment and not the only active principle. Plaquenil[®] pills were grinded and dissolved in physiological serum to obtain the desired concentration of HCQ by vortex homogenizer. HCQ solutions were prepared extemporaneously. Concentrations of HCQ were calculated according to the mean weight of each group to fix a common injected volume for all animals.

2.2.2. Adult Experiment

After the acclimatization period, four experimental groups were formed, each including 5 animals/sex/endpoint. The four groups were exposed to 0; 30; 50 or 70 mg of hydroxychloroquine (HCQ) per kg through ip injections with a common volume of 200 μ L, at D1, 2, 6, 10 then once a week until the end of the experiment. The distribution of the animals within the groups of exposure is presented in Table 1. HCQ was prepared from Plaquenil[®], as explained above.

Table 1. Distribution of animals.

A	Juvenile Experiment Group (mg HCQ/kg)										Adult Experiment Group (mg HCQ/kg)							
	0		15		30		50		70		0		30		50		70	
	Males	Females	Males	Females	Males	Females	Males	Females	Males	Females	Males	Females	Males	Females	Males	Females	Males	Females
Number of animals	28	28	30	26	28	28	28	28	27	29	15	15	15	15	15	15	15	15
Numbers of litters	27	28	29	26	28	28	28	28	26	28								
Number of pup/litters	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6								
Number of animals tested up to PND25	21	21	23	19	21	21	21	21	20	22								
Numbers of litters tested up to PND25	21	21	22	19	21	21	21	21	19	21								
Number of animals tested at PN73	7	7	9	6	7	7	7	7	6	8	5	5	5	5	5	5	5	5
Numbers of litters tested at PND73	7	7	9	6	7	7	7	7	6	7								
Number of animals tested at PND136	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7								
Numbers of litters tested at PND136	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7	5	5	5	5	5	5	5	5
Time of developmental testing	PND5-PND25																	
Time of behavioral testing	week before endpoint for PND73 and PND136										week before endpoint for D73 and D136							
Endpoint	PND11; PND26; PND73; PND136										D3; D73; D136							

2.3. Removed Sample Analyses

2.3.1. Tissue Preparation

A whole litter was sacrificed by decapitation at PND11 or cervical dislocation at PND26, 73 and 136 to reach a total number of 5 animals/sex/group and samples removed for Western-blotting analyses. The following samples were removed intact, flash-frozen in liquid nitrogen, and stored at -80°C : anterior tibialis anterior muscle (TA), popliteal and inguinal lymph nodes, liver, spleen and brain.

Five animals/sex/group was sacrificed by cervical dislocation at D3, D73 and D136, and samples removed for western-blotting analyses and analytical protocol. The following samples were removed intact, flash-frozen in liquid nitrogen, and stored at -80°C : anterior TA, popliteal and inguinal draining lymph nodes, liver, spleen, brain and blood.

2.3.2. Analytical Dosage of HCQ

After sampling, blood was let at room temperature (RT) 30 min to coagulate, and then it was centrifuged 10 min at $1000\times g$ and RT. After the centrifugation, the supernatant (serum) was carefully removed and store at -80°C . The method used for HCQ assay in serum was adapted from a previously published method [62]. The intraday and interday precision ranged from 4.3% to 10.3%. The lower limit of quantification in serum was 25 ng/mL.

2.3.3. Western Blot of Autophagy Proteins

For both juvenile and adult experiments, removed organs from 5 animals/sex/group were homogenized in lysis buffer (RIPA) supplemented with protease phosphatase inhibitor (Fisher Scientific, A32959, Illkirch, France) using precellys homogenizer (Bertin Instruments, Montigny-le-Bretonneux, France) and clarified by centrifugation. Protein quantifications were performed by Pierce™ BCA Protein Assay Kit (Fisher Scientific, 23225, Illkirch, France) and an equal protein mass of 10 μg in 10 μL was subjected to NuPAGE™ 10% Bis-Tris Midi Protein Gels (Invitrogen™, WG1203BOX, Illkirch, France) in Xcell4 Surelock tank (Life Technology SAS, WR0100, Illkirch, France) using NuPAGE™ MES SDS Running Buffer (20X) (Invitrogen™, NP000202, Illkirch, France). Protein transfer to polyvinylidene difluoride (PVDF) membrane was performed using iBlot2 Dry Blotting System (Fisher Scientific, IB21001, Illkirch, France) and iBlot™ 2 Transfer Stacks (Invitrogen™, IB24001, Illkirch, France). Membranes were blocked in cold water fish skin gelatin solution 2.5%, then probed with rabbit anti-LC3B (1:1000; Life Technology, PA1-46286, Courtaboeuf, France) or rabbit anti-SQSTM1 (1:3000; Life Technology, PA5-20839, Courtaboeuf, France) overnight at 4°C . Membranes were then washed and exposed (60 min) to HRP-conjugated goat anti-rabbit secondary antibody (1:5000; Santa Cruz, sc-2054, Heidelberg, Germany) or mouse anti- β -actin HRP-conjugated (1:10,000; Santa Cruz, sc-47 778 HRP, Heidelberg, Germany). Proteins were visualized by an enhanced chemiluminescence assay kit (SuperSignal™ West Femto; Fisher scientific, 34096, Illkirch, France) using a c600 scanner (Azure Biosystems, Inc., Dublin, OH, USA) and signals were quantified using ImageJ software (V1.52s, National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA). To perform level expression comparison, the quantification of each protein was divided by the β -actin quantification, which was the normalizing protein used in this study.

2.4. Behavioural Testing

2.4.1. Neurobehavioural Development in Juvenile Experiment

In addition to behavioural testing, daily inspections were made to assess the effects of HCQ exposure on pup body weight, hearing sensitivity (PND12-13) and eye-opening (PND15-16). All pups were subjected to a whole testing battery to evaluate motor coordination and vestibular function in righting reflex test (PND5), grasping reflex (PND6), ability to perceive cliff and gravity in cliff avoidance (PND7) and negative geotaxis tests (PND8), muscular strength in forelimb grip strength test (PND10), locomotor coordination in water escape climbing (PND23) and locomotor activity in open

field (PND25). All these tests, being standardized to the normal maturation of the central nervous system in rodents [63–69], were performed in a separated room, under a red light, between 9 a.m. and 13 p.m. The testing order was randomized between animals from the five groups of exposure to avoid circadian variation. A total number of 210 pups including both males and females, were tested up to PND25. The distribution of the animals within the groups of exposure is presented in Table 1.

For more details on neurobehavioural development in juvenile see supplementary materials.

2.4.2. Maternal Behaviour in the Juvenile Experiment

Maternal behaviour was also assessed to avoid any influence of maternal care on pup development. It also confirms that the injections of HCQ in young mice do not impact their mother's behaviour towards them. Nest building was conducted at PND3, 6 and 8, and the retrieving test was performed at PND4, 7 and 10. These two tests allowed evaluating the level of care given by the mother to pups. For more details, see supplementary materials.

2.4.3. Mature Behavioural Testing

For both juvenile and adult experiments, four behavioural or physical tests were performed the week before D73 or before D136 for adult experiment and before PND73 or PND136 for the juvenile experiment. Tests were chosen to assess locomotor activity in the open-field [70], muscular strength in the wire mesh hang [71], and grip strength test [72] and locomotor coordination in the rotarod test [73]. These tests were shared on four days: the first day was dedicated to the first rotarod training, the second day to grip strength test followed by wire-mesh hang test, then the second rotarod training, the third day to accelerating rotarod test and the fourth to the open field test. For more details, see supplementary materials.

2.5. Statistical Analysis

To determine the use of parametric vs. nonparametric tests, data were analysed by the Shapiro–Wilk test assessing distribution normality.

- Data from behavioural developmental tests were analysed using a non-parametric Kruskal–Wallis test followed by a Mann–Whitney procedure modified for multiple comparisons when appropriate. Pearson Chi-square procedure was used to analyse the number of successful animals. All males and females were tested together up to PND25 then gender was used as a variable for analysis.
- Pup weight was analysed using a one-way analysis of variance (one-way ANOVA). Post hoc comparisons have been performed using the Dunnett's test when ANOVA was significant.
- Data from adult behavioural testing in both experiments were analysed using a one-way analysis of variance (one-way ANOVA). Post hoc comparisons have been performed using the Dunnett's test when ANOVA was significant.
- Western-blot data and analytical HCQ dosages were analysed using a non-parametric Kruskal–Wallis test followed by a Mann–Whitney procedure modified for multiple comparisons when appropriate, due to the low number of animals in each group. For statistical comparison reasons, each gender was analysed separately because they were generated with two successive Western blots and multiple comparisons were exclusively performed for treated groups compared to controls.

Significance was set at $p < 0.05$. All statistical analyses were carried out using SPSS 25 software (SPSS INC., Chicago, IL, USA).

3. Results

3.1. HCQ Assay in Plasma

This dosage was conducted to monitor serum HCQ concentration and to check whether blood accumulation of HCQ remains low during the four months of treatment in adults. HCQ was not detected for any control animal and was found in the range of 0 to 415 ng/mL in treated animals.

At D3, HCQ was detected in 7 of 11 animals (63%) from group 30 mg/kg, in 9 of 10 animals (90%) from group 50 mg/kg, and in 10 of 10 animals (100%) from group 70 mg/kg. The median serum HCQ concentration was 39 ng/mL, 90 ng/mL and 96 ng/mL in 30 mg/kg, 50 mg/kg and 70 mg/kg group, respectively ($p < 0.001$) (Figure 1). Mann–Whitney test modified for multiple comparisons confirmed higher serum concentration of HCQ in mice treated with 30 mg/kg ($p < 0.01$), 50 and 70 mg/kg ($p < 0.001$) compared to untreated at D3 (Figure 1). At D73 and D136, all serum HCQ concentrations were below the lower limit of quantification (<25 ng/mL) except one from group 30 mg/kg at D73 (37 ng/mL, not considered for statistical analysis).

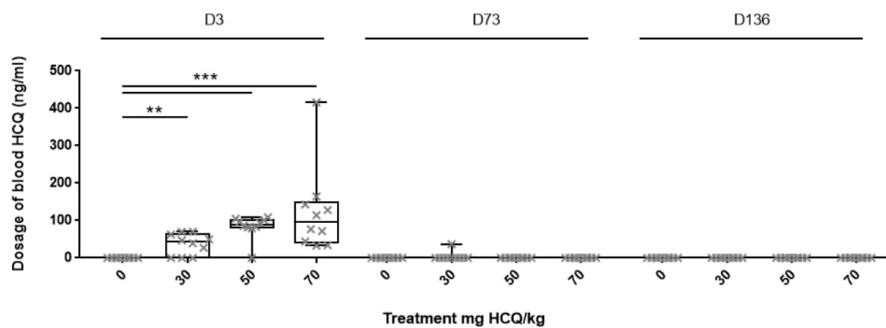


Figure 1. Serum hydroxychloroquine (HCQ) levels in C57BL/6J mice treated with intraperitoneal injection of HCQ. Each cross represents one animal's dosage. Boxplot expressed median and quartile. Dosages were analysed by the Kruskal–Wallis test. Mann–Whitney was used for multiple comparisons. ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$.

When serum HCQ concentration was analysed per gender, male median serum HCQ concentration was 50 ng/mL, 94 ng/mL and 143 ng/mL in 30 mg/kg, 50 mg/kg and 70 mg/kg group, respectively ($p < 0.01$) and female median serum HCQ concentration was 14 ng/mL, 83 ng/mL and 77 ng/mL in 30 mg/kg, 50 mg/kg and 70 mg/kg group, respectively ($p < 0.01$) (Figure 2). Mann–Whitney test modified for multiple comparisons confirmed higher male serum HCQ concentrations in group 30 mg/kg ($p < 0.05$), 50 and 70 mg/kg ($p < 0.01$) as well as higher female serum concentration in group 50 mg/kg ($p < 0.05$) and 70 mg/kg ($p < 0.01$), compared to controls (Figure 2). There was no difference of HCQ serum concentration between male and female for any treatment.

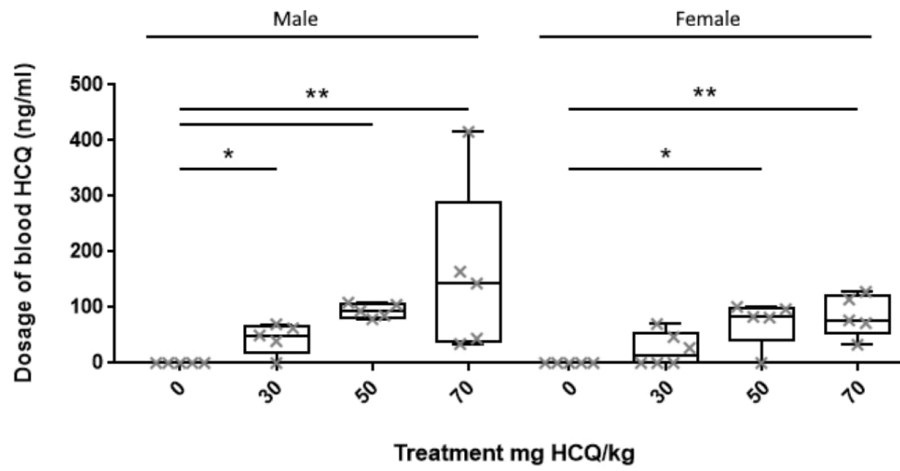


Figure 2. Dosage of blood HCQ expressed by gender at D3. Each cross represents one animal's dosage. Boxplot expressed median and quartile. Dosages were analysed by the Kruskal–Wallis test. Mann–Whitney was used for multiple comparisons. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$.

3.2. Western Blot of Autophagy Proteins

3.2.1. Juvenile Experiments

Results for protein quantification comparisons are summarized in Table 2.

Table 2. Effects of HCQ treatment on LC3 and SQSTM1/p62 proteins tissular level at several endpoints of juvenile experiment.

Endpoint	Gender	Organ	Protein	Tibial Anterior Muscle				Draining Lymph Nodes				Spleen				Liver				Brain			
				Group (mg HCQ/kg)				Group (mg HCQ/kg)				Group (mg HCQ/kg)				Group (mg HCQ/kg)				Group (mg HCQ/kg)			
				15	30	50	70	15	30	50	70	15	30	50	70	15	30	50	70	15	30	50	70
PND11	♂	Tibial Anterior Muscle	LC3-I	-	-	-	↓	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	↓	↓	
			LC3-II	-	↓	↓	↓	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	↓	↓
			SQSTM1/p62	-	-	↓	-	-	-	-	-	↑	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	♀	Tibial Anterior Muscle	LC3-I	-	-	-	-	↑	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
			LC3-II	-	-	-	-	-	↑	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
			SQSTM1/p62	-	-	-	-	↑	↑	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
PND26	♂	Tibial Anterior Muscle	LC3-I	-	-	-	-	-	-	-	↑	-	-	-	-	-	-	-	-	-	↑	-	
			LC3-II	-	↑	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	↑	↑
			SQSTM1/p62	-	-	-	-	-	-	-	-	↑	-	-	↓	-	-	-	-	-	-	↑	↑
	♀	Tibial Anterior Muscle	LC3-I	-	-	-	-	↑	-	-	↓	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	↑	
			LC3-II	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	↑	-
			SQSTM1/p62	↑	↑	-	-	-	-	-	-	-	↓	↓	↓	-	-	-	-	-	-	-	-
PND73	♂	Tibial Anterior Muscle	LC3-I	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
			LC3-II	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
			SQSTM1/p62	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
	♀	Tibial Anterior Muscle	LC3-I	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	↓	-	-	↓	-	-	-	-	
			LC3-II	-	-	-	-	-	↑	-	-	↓	↓	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
			SQSTM1/p62	-	-	-	-	-	↑	-	↓	↓	↓	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
PND136	♂	Tibial Anterior Muscle	LC3-I	-	-	-	-	↑	↑	↑	↑	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		
			LC3-II	-	-	-	-	-	↑	-	↑	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		
			SQSTM1/p62	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		
	♀	Tibial Anterior Muscle	LC3-I	-	↓	↓	-	-	-	-	-	-	-	-	↑	↑	-	↑	↑	-	-	↓	
			LC3-II	-	-	↓	-	-	-	-	-	-	-	-	-	↑	↑	↑	↑	-	-	↓	
			SQSTM1/p62	-	-	↓	-	-	-	-	-	↑	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	

Standardized protein level were analysed by Kruskal-Wallis test. Mann-Whitney was used for multiple comparisons. *n* = 5 mice/sex/group. -: no statistical difference compared to controls. ↑: statistical protein accumulation compared to controls (*p* < 0.05). ↓: statistical protein depletion compared to controls (*p* < 0.05).

Compared to controls, some proteins were accumulated or depleted in treated animals without apparent rule or organization (Table 2).

PND11:

Male skeletal muscles, spleen and brain were impacted by the pharmacological treatment with a majority of protein decrease. LC3-II was significantly depleted in skeletal muscle for groups 30, 50 and 70 mg/kg and in the brains for all HCQ groups. SQSTM1/p62 was more present in skeletal muscle for group 50 mg/kg and less present in the spleen for group 30 mg/kg than controls.

Female lymph nodes showed a statistically significant LC3-II accumulation for group 30 mg/kg and a SQSTM1/p62 increase for groups 15 and 30 mg/kg.

PND26:

The pharmacological treatment statistically modulated male skeletal muscles, spleen and brain protein amount. LC3-II was accumulated in skeletal muscle for group 30 mg/kg and in the brain for groups 15, 30 and 50 mg/kg. SQSTM1/p62 was found in higher quantity in the spleen for group 15 mg/kg and in the brain for groups 15, 50 and 70 mg/kg but in lower quantity in the spleen for group 70 mg/kg.

Female skeletal muscle, draining lymph nodes, spleen and brain expressed statistically proteins amount modulation. LC3-II was accumulated in the brain for group 50 mg/kg and SQSTM1/p62 amount was increased in skeletal muscle for groups 15 and 30 mg/kg and decreased in the spleen for groups 30, 50 and 70 mg/kg.

PND73:

Male organs did not present protein amount modification for any groups of treatment.

Female lymph nodes, spleen and liver were impacted by the pharmacological treatment. LC3-II amount was increased in lymph nodes for group 30 mg/kg and decreased in the spleen for groups 15 and 30 mg/kg. SQSTM1/p62 was accumulated in lymph nodes for groups 30 and 70 mg/kg and reduced in the spleen for groups 15 and 30 mg/kg.

PND136:

Male lymph nodes showed a statistically significant LC3-II accumulation for groups 30 and 70 mg/kg.

Female skeletal muscle, spleen, liver and brain protein quantities were statistically modulated by the treatment. LC3-II was significantly depleted in skeletal muscle for group 50 mg/kg and in the brain for groups 50 and 70 mg/kg but accumulated in the liver for all groups. SQSTM1/p62 was found in lower quantity in skeletal muscle for group 50 mg/kg and in higher quantity in the spleen for group 30 mg/kg.

Finally, no organ appeared to be selectively impacted by the HCQ treatment at any endpoint. There was no accumulation of LC3-II and SQSTM1/p62 except in lymph nodes of females treated with 30 mg HCQ/kg at PND11 and PND73, but these effects did not appear to be stable in time, as confirmed by results at PND26 and PND136 (Table 2). Moreover, an additional analysis using LC3-II/LC3-I ratio was conducted to confirm the first result. The LC3 ratio was not modified in any organs, but in males' brain at PND26 for the group 15 mg/kg, at the same time of SQSTM1/p62 accumulation (data not shown). As distant organs from the injection site, TA muscle, did not present the accumulation of protein LC3-II or SQSTM1/p62 for both males and females (Figure 3).

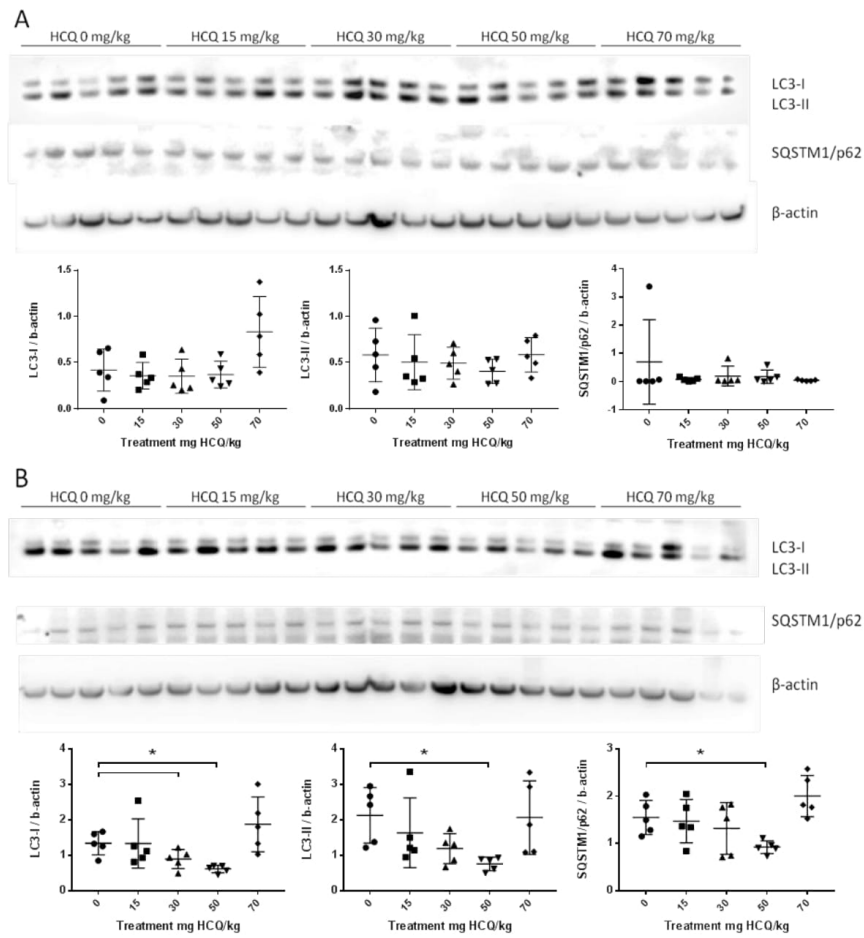


Figure 3. Representative western blots of LC3 and SQSTM1/p62 proteins in the anterior tibialis muscle of juvenile mice sacrificed at post-natal day (PND)136 showing the inter-individual and inter-group variation of protein expression: (A) Male data $n = 5$ /group; (B) Female data $n = 5$ /group. Standardized protein levels were analysed by the Kruskal–Wallis test. Mann–Whitney was used for multiple comparisons; * $p < 0.05$.

3.2.2. Adult Experiments

Results for protein quantification comparisons are summarized in Table 3.

Table 3. Effects of HCQ treatment on LC3 and SQSTM1/p62 proteins tissular level at several endpoints of the adult experiment.

Endpoint	Organ	Gender	Protein	Tibial Anterior Muscle			Draining Lymph Nodes			Spleen			Liver			Brain			
				Group (mg HCQ/kg)			Group (mg HCQ/kg)			Group (mg HCQ/kg)			Group (mg HCQ/kg)			Group (mg HCQ/kg)			
				30	50	70	30	50	70	30	50	70	30	50	70	30	50	70	
D3	♂	LC3-I	-	-	-	-	↑	↑	-	-	-	-	↓	↓	-	-	-	-	
		LC3-II	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	↓	↓	-	-	-	
		SQSTM1/p62	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	↓	↓	-	-	-	
	♀	LC3-I	-	-	-	-	-	↑	↑	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
		LC3-II	-	-	-	-	↑	↑	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
		SQSTM1/p62	-	-	-	-	-	↑	↑	-	-	-	-	-	-	↓	-	-	-
D73	♂	LC3-I	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
		LC3-II	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
		SQSTM1/p62	-	-	↓	-	-	-	-	-	↓	-	-	↓	↓	-	-	-	-
	♀	LC3-I	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	↓	-	-	-
		LC3-II	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	↓	-	-
		SQSTM1/p62	-	-	-	-	-	-	-	-	-	↓	-	-	-	-	-	-	-
D136	♂	LC3-I	-	-	-	-	↑	↑	-	-	-	-	-	↓	↓	-	-	↓	
		LC3-II	-	-	-	↑	↑	-	-	↓	-	-	-	↓	↓	-	-	↓	
		SQSTM1/p62	-	↓	-	↓	-	-	-	↓	↓	↓	↓	↓	↓	-	-	-	-
	♀	LC3-I	-	-	-	-	↑	-	-	-	-	-	↑	↑	↑	-	-	-	
		LC3-II	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	↑	↑	↑	-	-	-	
		SQSTM1/p62	-	-	-	-	-	-	-	-	-	↓	↑	↑	↑	-	-	-	

Standardized protein level were analysed by Kruskal-Wallis test. Mann-Whitney was used for multiple comparisons. *n* = 5 mice/sex/group. -: no statistical difference compared to controls. ↑: statistical protein accumulation compared to controls (*p* < 0.05). ↓: statistical protein depletion compared to controls (*p* < 0.05).

As in juvenile experiments, some proteins were significantly accumulated or depleted compared to controls, without any apparent rule or organization (Table 3)

D3:

Male lymph nodes and liver were impacted by the pharmacological treatment. LC3-II was statistically downregulated in the liver for group 70 mg/kg and the SQSTM1/p62 amount was lower in the liver for group groups 50 and 70 mg/kg.

Female lymph nodes and brain protein quantities were statistically modulated by the treatment. LC3-II was accumulated in lymph nodes for groups 50 and 70 mg/kg. SQSTM1/p62 was statistically higher in lymph nodes for group 70 mg/kg and lower in the brain for group 30 mg/kg.

D73:

Male skeletal muscle, spleen and liver protein quantities were statistically impacted by the treatment. SQSTM1/p62 was depleted in skeletal muscle for group 70 mg/kg, in the spleen for group 50 mg/kg and in the liver for groups 50 and 70 mg/kg.

Female spleen and brain were impacted by the pharmacological treatment. LC3-II amount was lower in the brain for group 50 mg/kg, and SQSTM1/p62 quantity was lower in the spleen for group 70 mg/kg.

D136:

All male organs expressed proteins amount modulation. LC3-II was more concentrated in lymph nodes for groups 30 and 50 mg/kg and less concentrated in the spleen for group 50 mg/kg, in the liver for group 70 mg/kg and in the brain for groups 30 and 70 mg/kg. SQSTM1/p62 was depleted in skeletal muscle for group 50 mg/kg, in lymph nodes for group 30 mg/kg, in the spleen for all groups and in the liver for group 70 mg/kg.

Female lymph nodes, spleen and liver presented an affected amount of proteins. LC3-II was accumulated in the liver for all groups and SQSTM1/p62 amount was significantly lower in the spleen for group 70 mg/kg but higher in the liver for all groups.

The expected accumulation of LC3-II and SQSTM1/p62 was only observed in the liver of females at D136 (Table 3). Moreover, the additional analysis using LC3-II/LC3-I ratio was conducted to confirm the first result. The LC3 ratio was not modified in any organs at the same time of SQSTM1/p62 accumulation (Data not shown). As distant organ from the injection site, TA muscle, did not show accumulation of protein LC3-II or SQSTM1/p62 for both males and females (Figure 4).

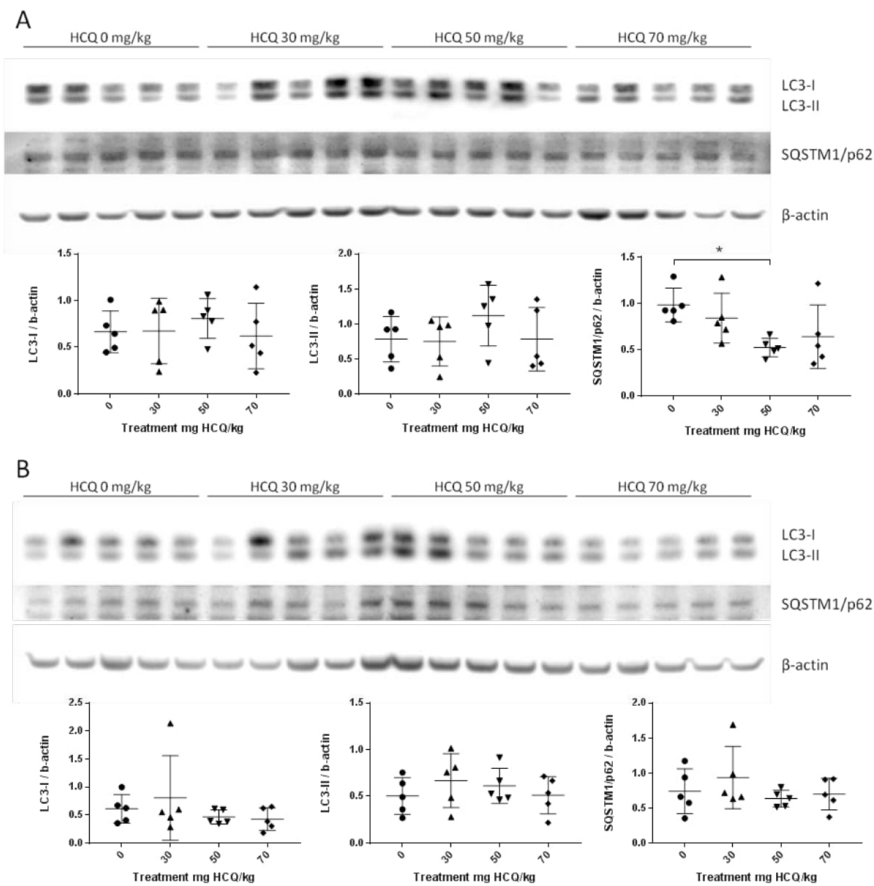


Figure 4. Representative Western blot of LC3 and SQSTM1/p62 proteins in the anterior tibialis muscle of adult mice sacrificed at PND136 showing the inter-individual and inter-group variation of protein expression: (A) Male data $n = 5/\text{group}$; (B) Female data $n = 5/\text{group}$. Standardized protein levels were analysed by Kruskal–Wallis test. Mann–Whitney was used for multiple comparisons; * $p < 0.05$.

3.3. Behavioural Testing

3.3.1. Juvenile Experiments

No effect of HCQ exposure on pup growth was observed since the weight of pups was not statistically different across all groups from PND3 to PND25 (Table S1). Similarly, neurobehavioural and motor tests yielded no salient changes in righting reflex, grasping reflex, cliff avoidance, negative geotaxis, forelimb grip strength, hearing pups, eye opening pups, water escape pole climbing and open field test (see supplementary materials). Results for developmental tests are summarized in Table S2.

Furthermore, the nest building test as well as the retrieving test performed to assess maternal behaviour over the first 10 days of post-natal life did not highlight an HCQ-treatment effect on maternal care (data not shown).

Mature mice body weight was not statistically different between treated and untreated mice from PND26 to PND136 (Table S3). Analyses showed significant differences between males and females.

No differences were reported between groups of treatment except at PND95 but post-hoc analysis refutes difference between treated groups and controls. There was no significant difference between treated and untreated animals in open field, wire-mesh hang test, grip strength test and accelerating rotarod (see supplementary materials). Results for mature behavioural tests are summarized in Table S4 for results at PND73 and in Table S5 for results at PND136.

3.3.2. Adult Experiments

No effect of HCQ exposure on adult mice body weight was observed since the body weight was statistically equivalent between treated and untreated mice from D1 to D136. As expected, analyses showed significant differences between males and females (Table S6). Such as in mature behavioural testing, no significant change was highlighted by statistical analysis between treated and control mice in open field, wire-mesh hang test, grip strength test, and accelerating rotarod (see supplementary materials). Results for adult behavioural tests are summarized in Table S7 for results at D73 and in Table S8 for results at D136.

4. Discussion

In order to determine if HCQ treatment can down-regulate autophagy on the long term and mimic a functional alteration of autophagy, we performed ip injections of HCQ in adult and, presumably more sensitive, juvenile mice.

The monitoring of HCQ serum levels showed a dose-dependent increase at D3, and this was not found at later time points. Notably, blood collection for HCQ assay in serum at D3 was done 24 h after the last HCQ ip injection, while, according to our injection schedule, blood samples assayed at D73 and D136 were collected one week after the last injection. Additionally, the red blood cell to plasma partition coefficient is high for HCQ in mice [74], suggesting that whole blood concentrations exceed plasma concentrations. Taken together, these elements could explain why most of serum HCQ levels were below the lower of quantification (<25 ng/mL) at these time points. In addition, HCQ is known to have a long steady-state half-life about 22 days and up to 50 days [44]. It also has complex kinetics with a quick plasma peak concentration 4 to 12 h after a single dose and steady-state is reached in plasma after 4 to 6 weeks of daily dosing [42]. Our pharmacokinetic data suggest that a weekly injection of HCQ would not be sufficient to reach pharmacokinetic steady-state in the mouse.

Nevertheless, tissue accumulation of HCQ is known to occur, as documented in skeletal muscle [59], and it remained plausible that biological effects on autophagy could be detected at this level. HCQ action interferes with lysosomal acidification by deprotonation and may lead to default in phagolysosomal fusion such as its homologous, the CQ, do [50]. The lack of fusion between lysosome and autophagosome or the lack of acidic activity in lysosome impedes the degradation of LC3 and SQSTM1/p62 proteins by lysosomal acidic hydrolases and so are accumulated in cells. Western blot of LC3 and SQSTM1/p62 proteins was therefore used to evaluate autophagy disturbance according to Klionsky's et al. guidelines [8] in order to follow the efficacy of treatment [56,75,76]. Despite the plausible method's limitations [56], a second evaluation was conducted using LC3-II/LC3-I ratio to check the autophagy flux. In fact, their expected protein accumulation was very rarely observed in the different tested tissues and organs (Tables 2 and 3) and no correlation with the administered dose was found.

Finally, neurodevelopmental tests [63–67] and behavioural tests evaluating activity, anxiety, locomotor coordination and strength were unable to document early or subtle signs of brain dysfunction. Juvenile mice neurodevelopment was very similar in treated and untreated animals, and these mice once reaching adulthood or mice treated directly at the adult stage exhibited normal behaviour and motricity. The only differences were based on gender only, with proactive and more anxious females compared to males, as previously documented [77,78].

In published studies, HCQ effects can generally be observed rapidly, but it seems that doses and injection schedules we used were unable to stably disturb autophagy in the long term. Of note, we

used HCQ at doses similar to what has been reported in the literature, ranging from 10 to 80 mg/kg, that are relevant to human curative treatment but with a lower frequency of injection. Indeed, short term rodent studies generally use a daily injection of pharmacological treatment [45,48,50,79–83] but this daily schedule is inappropriate for long term studies. Therefore, instead of basing the injection schedule on curative HCQ treatment, we based the schedule on the prophylactic HCQ treatment in humans which recommends weekly injections of the pharmacological agent [84].

However, it appears that at the conventional HCQ doses we used the quick dynamic of HCQ would forbid a reduction of injection frequency. Higher doses of treatment could have exposed to high toxicity even using HCQ, which is less toxic than CQ [40,41]. Indeed, detrimental effects for skeletal muscle have been reported after two months of intraperitoneal injection of 10 mg/kg CQ five times per week [58] or after two months of daily subcutaneous injection of 15 mg/kg CQ [59]. HCQ administered at high concentration and too high frequency, induce retinopathy, cardiomyopathy, neuromyopathy and myopathy [42,60]. Searching for a compromise between ethical acceptance in terms of injections number and toxicity of the drug was finally unsuccessful. It is possible that HCQ toxicity was sufficiently low to allow more important doses without causing injury [40,49] but the repeated ip administration on a long time in large cohorts of mice could cause stress to the animals, inducing aggressive behaviours and modulation of immune responses, thus interfering with data read-out.

HCQ is usually administered orally. Though ip injection has been very commonly used [45,46,48] this might not be the optimal mode of delivery. Admittedly, however, ip injections offer several advantages, including precise knowledge of the delivered dose, thus avoiding uncertainties linked to voluntarily liquid intake, rapid administration adapted to studies of large animal cohorts and the limited stress they induce compared to oral gavage [85].

The mouse model we used can also be questioned. Mice might be less sensitive to HCQ than humans rendering the human-based doses ineffective even after the correction we did to take into account the mouse metabolic status. Indeed, Haspel et al. [46] showed that a high dose of CQ, i.e., single ip injection of 60 mg/kg, was required to obtain a significant increase in LC3b in the liver four hours after injection in mouse. Moreover, we used the inbred mouse strain C57bl/6j as commonly done in immunological and autophagy studies [45,50]. However, this mouse strain exhibits a five-exon deletion of nicotinamide nucleotide transhydrogenase (*Nnt*) on chromosome 13, leading to a complete absence of NNT protein [86]. NNT is an inner mitochondrial membrane redox-driven proton pump involved in regenerating NADPH [87]. Moreover, NNT plays a significant role in the modulation of an immune response and C57bl/6j macrophages could exhibit more reactive oxygen species (ROS) and a stronger inflammatory response to pathogens [88] and probably to non-microbial particles, like Plaquenil® excipients. Increasing ROS production could be followed by a lysosomal disruption [89] which liberates several components in the cytosol, increasing the stress and triggering autophagy [12]. Our inability to document autophagy inhibition under HCQ treatment could reflect an inherent condition of C57bl/6j mice to offset the drug action in the long term.

HCQ is a passive lysosomotropic drug, but proton pumps are still functional and can compensate pH increase. Indeed, H⁺ ions are trapped into the acidic vacuole by the action of the ATP-dependent pumps, attracting HCQ by the pH gradient generated, leading to an accumulation of HCQ in lysosome, which causes an elevation of pH due to H⁺ ions trapped by HCQ [90]. pH must be maintained around 5.0 to assure the optimal activity of hydrolases [91] and proton pumps might try to compensate the pH elevation produced by HCQ presence until HCQ saturation and pH restoration. This proactive loop could lead to a rapid overload of HCQ and habituation to HCQ presence by proton pump reinforcement.

5. Conclusions

Despite their potential disadvantages, genetic models probably remain the most appropriate approach to mimic long-term autophagy deficiency. Homologous recombination and Crispr methods allow producing viable mice with specific tissue genetic KO like *Atg7* KO and *Atg5* KO in myeloid lineage [37,38]. Some other models like *Map1lc3b* KO [92], *Ulk1* KO [93] or *Irgm1* KO [94] are available

and seem free of obvious abnormality [36]. Therefore, we recommend for future long-term in vivo studies of autophagy, to use genetic mouse models allowing conditional inhibition of selected *Atg* genes in appropriate lineage cells instead of HCQ treatment, until it could be successfully revisited using higher HCQ doses and/or frequencies with acceptable toxicity.

Supplementary Materials: Supplementary materials can be found at <http://www.mdpi.com/2227-9059/8/3/47/s1>.

Author Contributions: J.-D.M., G.C. and R.K.G. designed the research study; G.C., F.-J.A. and R.K.G. supervised the research study; J.-D.M., B.P. and B.B. conducted the experiments and acquired the data; J.-D.M., G.C. and R.K.G. contributed to the analysis and interpretation of the results; G.C., R.K.G. and B.M. contributed to finding acquisition; J.-D.M., G.C. and R.K.G. were involved in writing and correction of the manuscript. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This study was supported by the Children Medical Safety Research Institute (CMSRI, Vaccinophagy project R17033DJA) & young researcher French National Research Agency (ANR) grant (AD-ME project R19162DD); BP's salary was funded by RHU CARMMA (ANR-15-RHUS-0003).

Acknowledgments: The authors thank Loïc Angrand, Oriane Bergiers, Marie-Angela Domdom, Manon Jeannest, Arnaud Ly, and Marie Petitjean for their technical help.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

Abbreviations

Al	Aluminium
ATG	Autophagy related
CQ	Chloroquine
HCQ	Hydroxychloroquine
ip	Intra-peritoneal
LC3	Microtubule-associated protein 1A/1B-light chain 3
MMF	Macrophagic myofasciitis
PND	Post-natal day
PVDF	Polyvinylidene difluoride
ROS	Reactive oxygen species
RT	Room temperature
TA	Tibialis anterior

References

1. Stern, S.T.; Adiseshaiah, P.P.; Crist, R.M. Autophagy and lysosomal dysfunction as emerging mechanisms of nanomaterial toxicity. *Part. Fibre Toxicol.* **2012**, *9*, 20. [CrossRef]
2. De Duve, C.; Wattiaux, R. Functions of lysosomes. *Annu. Rev. Physiol.* **1966**, *28*, 435–492. [CrossRef]
3. Li, W.; Li, J.; Bao, J. Microautophagy: Lesser-known self-eating. *Cell. Mol. Life Sci.* **2012**, *69*, 1125–1136. [CrossRef] [PubMed]
4. Kaushik, S.; Cuervo, A.M. Chaperone-mediated autophagy: A unique way to enter the lysosome world. *Trends Cell Biol.* **2012**, *22*, 407–417. [CrossRef] [PubMed]
5. Shintani, T.; Klionsky, D.J. Autophagy in health and disease: A double-edged sword. *Science* **2004**, *306*, 990–995. [CrossRef]
6. Tanida, I.; Minematsu-Ikeguchi, N.; Ueno, T.; Kominami, E. Lysosomal turnover, but not a cellular level, of endogenous LC3 is a marker for autophagy. *Autophagy* **2005**, *1*, 84–91. [CrossRef]
7. Berg, T.O.; Fengsrud, M.; Strømhaug, P.E.; Berg, T.; Seglen, P.O. Isolation and characterization of rat liver amphisomes. Evidence for fusion of autophagosomes with both early and late endosomes. *J. Biol. Chem.* **1998**, *273*, 21883–21892. [CrossRef] [PubMed]
8. Klionsky, D.J.; Abdelmohsen, K.; Abe, A.; Abedin, M.J.; Abeliovich, H.; Acevedo Arozena, A.; Adachi, H.; Adams, C.M.; Adams, P.D.; Adeli, K.; et al. Guidelines for the use and interpretation of assays for monitoring autophagy (3rd edition). *Autophagy* **2016**, *12*, 1–222. [CrossRef] [PubMed]
9. Brest, P.; Corcelle, E.A.; Cesaro, A.; Chargui, A.; Belaïd, A.; Klionsky, D.J.; Vouret-Craviari, V.; Hebuterne, X.; Hofman, P.; Mograbi, B. Autophagy and Crohn's disease: At the crossroads of infection, inflammation, immunity, and cancer. *Curr. Mol. Med.* **2010**, *10*, 486–502. [CrossRef] [PubMed]

10. Levine, B.; Kroemer, G. Biological Functions of Autophagy Genes: A Disease Perspective. *Cell* **2019**, *176*, 11–42. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
11. Pesonen, M.; Vähäkangas, K. Autophagy in exposure to environmental chemicals. *Toxicol. Lett.* **2019**, *305*, 1–9. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
12. Eidi, H.; Joubert, O.; Némós, C.; Grandemange, S.; Mograbi, B.; Foliguet, B.; Tournebize, J.; Maincent, P.; Le Faou, A.; Aboukhamis, I.; et al. Drug delivery by polymeric nanoparticles induces autophagy in macrophages. *Int. J. Pharm.* **2012**, *422*, 495–503. [[CrossRef](#)]
13. Choi, A.M.K.; Ryter, S.W.; Levine, B. Autophagy in human health and disease. *N. Engl. J. Med.* **2013**, *368*, 651–662. [[CrossRef](#)]
14. Chen, L.; Zhang, B.; Toborek, M. Autophagy is involved in nanoalumina-induced cerebrovascular toxicity. *Nanomed. Nanotechnol. Biol. Med.* **2013**, *9*, 212–221. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
15. Cohignac, V.; Landry, M.; Boczkowski, J.; Lanone, S. Autophagy as a Possible Underlying Mechanism of Nanomaterial Toxicity. *Nanomaterials* **2014**, *4*, 548–582. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
16. Hornung, V.; Bauernfeind, F.; Halle, A.; Samstad, E.O.; Kono, H.; Rock, K.L.; Fitzgerald, K.A.; Latz, E. Silica crystals and aluminum salts activate the NALP3 inflammasome through phagosomal destabilization. *Nat. Immunol.* **2008**, *9*, 847–856. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
17. Lima, H.; Jacobson, L.S.; Goldberg, M.F.; Chandran, K.; Diaz-Griffero, F.; Lisanti, M.P.; Brojatsch, J. Role of lysosome rupture in controlling Nlrp3 signaling and necrotic cell death. *Cell Cycle Georget. Tex* **2013**, *12*, 1868–1878. [[CrossRef](#)]
18. Sabella, S.; Carney, R.P.; Brunetti, V.; Malvindi, M.A.; Al-Juffali, N.; Vecchio, G.; Janes, S.M.; Bakr, O.M.; Cingolani, R.; Stellacci, F.; et al. A general mechanism for intracellular toxicity of metal-containing nanoparticles. *Nanoscale* **2014**, *6*, 7052–7061. [[CrossRef](#)]
19. Chatterjee, S.; Sarkar, S.; Bhattacharya, S. Toxic metals and autophagy. *Chem. Res. Toxicol.* **2014**, *27*, 1887–1900. [[CrossRef](#)]
20. Zhang, Z.; Miah, M.; Culbreth, M.; Aschner, M. Autophagy in Neurodegenerative Diseases and Metal Neurotoxicity. *Neurochem. Res.* **2016**, *41*, 409–422. [[CrossRef](#)]
21. Corcelle, E.; Djerbi, N.; Mari, M.; Nebout, M.; Fiorini, C.; Fénichel, P.; Hofman, P.; Poujeol, P.; Mograbi, B. Control of the autophagy maturation step by the MAPK ERK and p38: Lessons from environmental carcinogens. *Autophagy* **2007**, *3*, 57–59. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
22. Chargui, A.; Zekri, S.; Jacquillet, G.; Rubera, I.; Ilie, M.; Belaid, A.; Duranton, C.; Tauc, M.; Hofman, P.; Poujeol, P.; et al. Cadmium-induced autophagy in rat kidney: An early biomarker of subtoxic exposure. *Toxicol. Sci. Off. J. Soc. Toxicol.* **2011**, *121*, 31–42. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
23. Belaid, A.; Roméo, B.; Filippakis, H.; Meyer, M.; Grosjean, I.; Yazbeck, N.; Domdom, M.A.; Crépeaux, G.; Gherardi, R.K.; Lagadic-Gossmann, D.; et al. Autophagy-Driven Cancer Drug Development. In *Autophagy and Cardiometabolic Diseases*; Ren, J., Sowers, J.R., Zhang, Y., Eds.; Academic Press: Cambridge, UK, 2018; pp. 255–275. ISBN 978-0-12-805253-2.
24. Pellacani, C.; Costa, L.G. Role of autophagy in environmental neurotoxicity. *Environ. Pollut.* **2018**, *235*, 791–805. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
25. Wang, F.; Li, B.; Schall, N.; Wilhelm, M.; Muller, S. Assessing Autophagy in Mouse Models and Patients with Systemic Autoimmune Diseases. *Cells* **2017**, *6*, 16. [[CrossRef](#)]
26. Rioux, J.D.; Xavier, R.J.; Taylor, K.D.; Silverberg, M.S.; Goyette, P.; Huett, A.; Green, T.; Kuballa, P.; Barmada, M.M.; Datta, L.W.; et al. Genome-wide association study identifies new susceptibility loci for Crohn disease and implicates autophagy in disease pathogenesis. *Nat. Genet.* **2007**, *39*, 596–604. [[CrossRef](#)]
27. Brest, P.; Lapaquette, P.; Souidi, M.; Lebrigand, K.; Cesaro, A.; Vouret-Craviari, V.; Mari, B.; Barbry, P.; Mosnier, J.-F.; Hébuterne, X.; et al. A synonymous variant in IRGM alters a binding site for miR-196 and causes deregulation of IRGM-dependent xenophagy in Crohn's disease. *Nat. Genet.* **2011**, *43*, 242–245. [[CrossRef](#)]
28. Murthy, A.; Li, Y.; Peng, I.; Reichelt, M.; Katakam, A.K.; Noubade, R.; Roose-Girma, M.; DeVoss, J.; Diehl, L.; Graham, R.R.; et al. A Crohn's disease variant in Atg16l1 enhances its degradation by caspase 3. *Nature* **2014**, *506*, 456–462. [[CrossRef](#)]

29. Lassen, K.G.; Kuballa, P.; Conway, K.L.; Patel, K.K.; Becker, C.E.; Peloquin, J.M.; Villablanca, E.J.; Norman, J.M.; Liu, T.-C.; Heath, R.J.; et al. Atg16L1 T300A variant decreases selective autophagy resulting in altered cytokine signaling and decreased antibacterial defense. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2014**, *111*, 7741–7746. [[CrossRef](#)]
30. Cadwell, K.; Liu, J.Y.; Brown, S.L.; Miyoshi, H.; Loh, J.; Lennerz, J.K.; Kishi, C.; Kc, W.; Carrero, J.A.; Hunt, S.; et al. A key role for autophagy and the autophagy gene Atg16l1 in mouse and human intestinal Paneth cells. *Nature* **2008**, *456*, 259–263. [[CrossRef](#)]
31. Liu, B.; Gulati, A.S.; Cantillana, V.; Henry, S.C.; Schmidt, E.A.; Daniell, X.; Grossniklaus, E.; Schoenborn, A.A.; Sartor, R.B.; Taylor, G.A. Irgm1-deficient mice exhibit Paneth cell abnormalities and increased susceptibility to acute intestinal inflammation. *AJP Gastrointest. Liver Physiol.* **2013**, *305*, G573–G584. [[CrossRef](#)]
32. Gherardi, R.K.; Crépeaux, G.; Authier, F.-J. Myalgia and chronic fatigue syndrome following immunization: Macrophagic myofasciitis and animal studies support linkage to aluminum adjuvant persistency and diffusion in the immune system. *Autoimmun. Rev.* **2019**, *18*, 691–705. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
33. Flach, T.L.; Ng, G.; Hari, A.; Desrosiers, M.D.; Zhang, P.; Ward, S.M.; Seamone, M.E.; Vilaysane, A.; Mucci, A.D.; Fong, Y.; et al. Alum interaction with dendritic cell membrane lipids is essential for its adjuvanticity. *Nat. Med.* **2011**, *17*, 479–487. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
34. Khan, Z.; Combadiere, C.; Authier, F.-J.; Itier, V.; Lux, F.; Exley, C.; Mahrouf-Yorgov, M.; Decrouy, X.; Moretto, P.; Tillement, O.; et al. Slow CCL2-dependent translocation of biopersistent particles from muscle to brain. *BMC Med.* **2013**, *11*, 99. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
35. Wang, S.-L.; Shao, B.-Z.; Zhao, S.-B.; Chang, X.; Wang, P.; Miao, C.-Y.; Li, Z.-S.; Bai, Y. Intestinal autophagy links psychosocial stress with gut microbiota to promote inflammatory bowel disease. *Cell Death Dis.* **2019**, *10*, 391. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
36. Kuma, A.; Komatsu, M.; Mizushima, N. Autophagy-monitoring and autophagy-deficient mice. *Autophagy* **2017**, *13*, 1619–1628. [[CrossRef](#)]
37. Kim, H.-J.; Cho, M.-H.; Shim, W.H.; Kim, J.K.; Jeon, E.-Y.; Kim, D.-H.; Yoon, S.-Y. Deficient autophagy in microglia impairs synaptic pruning and causes social behavioral defects. *Mol. Psychiatry* **2017**, *22*, 1576–1584.
38. Hara, T.; Nakamura, K.; Matsui, M.; Yamamoto, A.; Nakahara, Y.; Suzuki-Migishima, R.; Yokoyama, M.; Mishima, K.; Saito, I.; Okano, H.; et al. Suppression of basal autophagy in neural cells causes neurodegenerative disease in mice. *Nature* **2006**, *441*, 885–889. [[CrossRef](#)]
39. Fox, R.I. Mechanism of action of hydroxychloroquine as an antirheumatic drug. *Semin. Arthritis Rheum.* **1993**, *23*, 82–91. [[CrossRef](#)]
40. McChesney, E.W. Animal toxicity and pharmacokinetics of hydroxychloroquine sulfate. *Am. J. Med.* **1983**, *75*, 11–18. [[CrossRef](#)]
41. Wolf, R.; Wolf, D.; Ruocco, V. Antimalarials: Unapproved uses or indications. *Clin. Dermatol.* **2000**, *18*, 17–35. [[CrossRef](#)]
42. Al-Bari, M.A.A. Chloroquine analogues in drug discovery: New directions of uses, mechanisms of actions and toxic manifestations from malaria to multifarious diseases. *J. Antimicrob. Chemother.* **2015**, *70*, 1608–1621. [[CrossRef](#)]
43. Kaufmann, A.M.; Krise, J.P. Lysosomal sequestration of amine-containing drugs: Analysis and therapeutic implications. *J. Pharm. Sci.* **2007**, *96*, 729–746. [[CrossRef](#)]
44. Ochsendorf, F.R. Use of antimalarials in dermatology. *J. Dtsch. Dermatol. Ges. J. Ger. Soc. Dermatol. JDDG* **2010**, *8*, 829–844, quiz 845. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
45. Grumati, P.; Coletto, L.; Sabatelli, P.; Cescon, M.; Angelin, A.; Bertaggia, E.; Blaauw, B.; Urciuolo, A.; Tiepolo, T.; Merlini, L.; et al. Autophagy is defective in collagen VI muscular dystrophies, and its reactivation rescues myofiber degeneration. *Nat. Med.* **2010**, *16*, 1313–1320. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
46. Haspel, J.; Shaik, R.S.; Ifedigbo, E.; Nakahira, K.; Dolinay, T.; Englert, J.A.; Choi, A.M.K. Characterization of macroautophagic flux in vivo using a leupeptin-based assay. *Autophagy* **2011**, *7*, 629–642. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
47. Kwon, I.; Lee, Y.; Cosio-Lima, L.M.; Cho, J.-Y.; Yeom, D.-C. Effects of long-term resistance exercise training on autophagy in rat skeletal muscle of chloroquine-induced sporadic inclusion body myositis. *J. Exerc. Nutr. Biochem.* **2015**, *19*, 225–234. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

48. Vodicka, P.; Lim, J.; Williams, D.T.; Kegel, K.B.; Chase, K.; Park, H.; Marchionini, D.; Wilkinson, S.; Mead, T.; Birch, H.; et al. Assessment of chloroquine treatment for modulating autophagy flux in brain of WT and HD mice. *J. Huntingt. Dis.* **2014**, *3*, 159–174. [[CrossRef](#)]
49. An, N.; Chen, Y.; Wang, C.; Yang, C.; Wu, Z.-H.; Xue, J.; Ye, L.; Wang, S.; Liu, H.-F.; Pan, Q. Chloroquine Autophagic Inhibition Rebalances Th17/Treg-Mediated Immunity and Ameliorates Systemic Lupus Erythematosus. *Cell. Physiol. Biochem.* **2017**, *44*, 412–422. [[CrossRef](#)]
50. Mauthe, M.; Orhon, I.; Rocchi, C.; Zhou, X.; Luhr, M.; Hijlkema, K.-J.; Coppes, R.P.; Engedal, N.; Mari, M.; Reggiori, F. Chloroquine inhibits autophagic flux by decreasing autophagosome-lysosome fusion. *Autophagy* **2018**, *14*, 1435–1455. [[CrossRef](#)]
51. Iwai-Kanai, E.; Yuan, H.; Huang, C.; Sayen, M.R.; Perry-Garza, C.N.; Kim, L.; Gottlieb, R.A. A method to measure cardiac autophagic flux in vivo. *Autophagy* **2008**, *4*, 322–329. [[CrossRef](#)]
52. Collins, K.P.; Jackson, K.M.; Gustafson, D.L. Hydroxychloroquine: A Physiologically-Based Pharmacokinetic Model in the Context of Cancer-Related Autophagy Modulation. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **2018**, *365*, 447–459. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
53. Gurney, M.A.; Huang, C.; Ramil, J.M.; Ravindran, N.; Andres, A.M.; Sin, J.; Linton, P.-J.; Gottlieb, R.A. Measuring cardiac autophagic flux in vitro and in vivo. *Methods Mol. Biol. Clifton NJ* **2015**, *1219*, 187–197.
54. Campos, J.C.; Queliconi, B.B.; Bozi, L.H.M.; Bechara, L.R.G.; Dourado, P.M.M.; Andres, A.M.; Jannig, P.R.; Gomes, K.M.S.; Zambelli, V.O.; Rocha-Resende, C.; et al. Exercise reestablishes autophagic flux and mitochondrial quality control in heart failure. *Autophagy* **2017**, *13*, 1304–1317. [[CrossRef](#)]
55. Lewis, M.D.; Pfeil, J.; Mueller, A.-K. Continuous oral chloroquine as a novel route for Plasmodium prophylaxis and cure in experimental murine models. *BMC Res. Notes* **2011**, *4*, 262. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
56. Barth, S.; Glick, D.; Macleod, K.F. Autophagy: Assays and artifacts. *J. Pathol.* **2010**, *221*, 117–124. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
57. Moulis, M.; Vindis, C. Methods for Measuring Autophagy in Mice. *Cells* **2017**, *6*, 14. [[CrossRef](#)]
58. Jiang, D.; Chen, K.; Lu, X.; Gao, H.; Qin, Z.; Lin, F. Exercise ameliorates the detrimental effect of chloroquine on skeletal muscles in mice via restoring autophagy flux. *Acta Pharmacol. Sin.* **2014**, *35*, 135–142. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
59. Nalbandian, A.; Llewellyn, K.J.; Nguyen, C.; Yazdi, P.G.; Kimonis, V.E. Rapamycin and Chloroquine: The In Vitro and In Vivo Effects of Autophagy-Modifying Drugs Show Promising Results in Valosin Containing Protein Multisystem Proteinopathy. *PLoS ONE* **2015**, *10*, e0122888. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
60. Rabin, J.C.; Ramirez, K. Hydroxychloroquine Ocular Toxicity: Lessons Learned. *J. Rheumatol.* **2019**, *46*, 1640–1641. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
61. Sharma, V.; McNeill, J.H. To scale or not to scale: The principles of dose extrapolation. *Br. J. Pharmacol.* **2009**, *157*, 907–921. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
62. Qu, Y.; Noe, G.; Breaud, A.R.; Vidal, M.; Clarke, W.A.; Zahr, N.; Dervieux, T.; Costedoat-Chalumeau, N.; Blanchet, B. Development and validation of a clinical HPLC method for the quantification of hydroxychloroquine and its metabolites in whole blood. *Future Sci. OA* **2015**, *1*, FSO26. [[CrossRef](#)]
63. Fox, W.M. Reflex-ontogeny and behavioural development of the mouse. *Anim. Behav.* **1965**, *13*, 234–241. [[CrossRef](#)]
64. Fox, M.W. Natural environment: Theoretical and practical aspects for breeding and rearing laboratory animals. *Lab. Anim. Care* **1966**, *16*, 316–321. [[PubMed](#)]
65. Altman, J.; Sudarshan, K. Postnatal development of locomotion in the laboratory rat. *Anim. Behav.* **1975**, *23*, 896–920. [[CrossRef](#)]
66. Elnar, A.A.; Diesel, B.; Desor, F.; Feidt, C.; Bouayed, J.; Kiemer, A.K.; Soulimani, R. Neurodevelopmental and behavioral toxicity via lactational exposure to the sum of six indicator non-dioxin-like-polychlorinated biphenyls ($\Sigma 6$ NDL-PCBs) in mice. *Toxicology* **2012**, *299*, 44–54. [[CrossRef](#)]
67. Crépeaux, G.; Grova, N.; Bouillaud-Kremarik, P.; Sikhayeva, N.; Salquière, G.; Rychen, G.; Soulimani, R.; Appenzeller, B.; Schroeder, H. Short-term effects of a perinatal exposure to a 16 polycyclic aromatic hydrocarbon mixture in rats: Assessment of early motor and sensorial development and cerebral cytochrome oxidase activity in pups. *Neurotoxicology* **2014**, *43*, 90–101. [[CrossRef](#)]
68. Meyer, O.A.; Tilton, H.A.; Byrd, W.C.; Riley, M.T. A method for the routine assessment of fore- and hindlimb grip strength of rats and mice. *Neurobehav. Toxicol.* **1979**, *1*, 233–236.

69. Bouayed, J.; Desor, F.; Rammal, H.; Kiemer, A.K.; Tybl, E.; Schroeder, H.; Rychen, G.; Soulimani, R. Effects of lactational exposure to benzo[alpha]pyrene (B[alpha]P) on postnatal neurodevelopment, neuronal receptor gene expression and behaviour in mice. *Toxicology* **2009**, *259*, 97–106. [[CrossRef](#)]
70. Walsh, R.N.; Cummins, R.A. The Open-Field Test: A critical review. *Psychol. Bull.* **1976**, *83*, 482–504. [[CrossRef](#)]
71. Kondziella, W. A new method for the measurement of muscle relaxation in white mice. *Arch. Int. Pharmacodyn. Ther.* **1964**, *152*, 277–284.
72. Maurissen, J.P.J.; Marable, B.R.; Andrus, A.K.; Stebbins, K.E. Factors affecting grip strength testing. *Neurotoxicol. Teratol.* **2003**, *25*, 543–553. [[CrossRef](#)]
73. Pratte, M.; Panayotis, N.; Ghata, A.; Villard, L.; Roux, J.-C. Progressive motor and respiratory metabolism deficits in post-weaning Mecp2-null male mice. *Behav. Brain Res.* **2011**, *216*, 313–320. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
74. Chhonker, Y.S.; Sleightholm, R.L.; Li, J.; Oupický, D.; Murry, D.J. Simultaneous quantitation of hydroxychloroquine and its metabolites in mouse blood and tissues using LC-ESI-MS/MS: An application for pharmacokinetic studies. *J. Chromatogr. B* **2018**, *1072*, 320–327. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
75. Mizushima, N.; Yoshimori, T. How to interpret LC3 immunoblotting. *Autophagy* **2007**, *3*, 542–545. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
76. Jiang, P.; Mizushima, N. LC3- and p62-based biochemical methods for the analysis of autophagy progression in mammalian cells. *Methods San Diego Calif* **2015**, *75*, 13–18. [[CrossRef](#)]
77. Crépeaux, G. *Exposition périnatale à un mélange d'Hydrocarbures Aromatiques Polycycliques chez le rat: Evaluation des effets neurotoxiques à court et à long terme*; Sciences Agronomiques, Université de Lorraine: Nancy, France, 2012.
78. Carreira, M.B.; Cossio, R.; Britton, G.B. Individual and sex differences in high and low responder phenotypes. *Behav. Processes* **2017**, *136*, 20–27. [[CrossRef](#)]
79. Ndolo, R.A.; Forrest, M.L.; Krise, J.P. The Role of Lysosomes in Limiting Drug Toxicity in Mice. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **2010**, *333*, 120–128. [[CrossRef](#)]
80. Wolfram, J.; Nizzero, S.; Liu, H.; Li, F.; Zhang, G.; Li, Z.; Shen, H.; Blanco, E.; Ferrari, M. A chloroquine-induced macrophage-preconditioning strategy for improved nanodelivery. *Sci. Rep.* **2017**, *7*, 13738. [[CrossRef](#)]
81. Feng, X.; Hou, H.; Zou, Y.; Guo, L. Defective autophagy is associated with neuronal injury in a mouse model of multiple sclerosis. *Bosn. J. Basic Med. Sci.* **2017**, *17*, 95–103. [[CrossRef](#)]
82. Zheng, X.; Jin, X.; Li, F.; Liu, X.; Liu, Y.; Ye, F.; Li, P.; Zhao, T.; Li, Q. Inhibiting autophagy with chloroquine enhances the anti-tumor effect of high-LET carbon ions via ER stress-related apoptosis. *Med. Oncol. Northwood Lond. Engl.* **2017**, *34*, 25. [[CrossRef](#)]
83. Yi, H.; Ye, T.; Ge, M.; Yang, M.; Zhang, L.; Jin, S.; Ye, X.; Long, B.; Li, L. Inhibition of autophagy enhances the targeted therapeutic effect of sorafenib in thyroid cancer. *Oncol. Rep.* **2018**, *39*, 711–720. [[CrossRef](#)]
84. Lim, H.-S.; Im, J.-S.; Cho, J.-Y.; Bae, K.-S.; Klein, T.A.; Yeom, J.-S.; Kim, T.-S.; Choi, J.-S.; Jang, I.-J.; Park, J.-W. Pharmacokinetics of Hydroxychloroquine and Its Clinical Implications in Chemoprophylaxis against Malaria Caused by Plasmodium vivax. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2009**, *53*, 1468–1475. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
85. Walker, M.K.; Boberg, J.R.; Walsh, M.T.; Wolf, V.; Trujillo, A.; Duke, M.S.; Palme, R.; Felton, L.A. A less stressful alternative to oral gavage for pharmacological and toxicological studies in mice. *Toxicol. Appl. Pharm.* **2012**, *260*, 65–69. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
86. Freeman, H.C.; Hugill, A.; Dear, N.T.; Ashcroft, F.M.; Cox, R.D. Deletion of nicotinamide nucleotide transhydrogenase: A new quantitative trait locus accounting for glucose intolerance in C57BL/6J mice. *Diabetes* **2006**, *55*, 2153–2156. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
87. Shimomura, K.; Galvanovskis, J.; Goldsworthy, M.; Hugill, A.; Kaizak, S.; Lee, A.; Meadows, N.; Quwailid, M.M.; Rydström, J.; Teboul, L.; et al. Insulin secretion from beta-cells is affected by deletion of nicotinamide nucleotide transhydrogenase. *Methods Enzymol.* **2009**, *457*, 451–480.
88. Ripoll, V.M.; Meadows, N.A.; Bangert, M.; Lee, A.W.; Kadioglu, A.; Cox, R.D. Nicotinamide nucleotide transhydrogenase (NNT) acts as a novel modulator of macrophage inflammatory responses. *FASEB J.* **2012**, *26*, 3550–3562. [[CrossRef](#)]
89. Amoult, D.; Grodet, A.; Lee, Y.-J.; Estaquier, J.; Blackstone, C. Release of OPA1 during Apoptosis Participates in the Rapid and Complete Release of Cytochrome c and Subsequent Mitochondrial Fragmentation. *J. Biol. Chem.* **2005**, *280*, 35742–35750. [[CrossRef](#)]

90. Taveira-DaSilva, A.M.; Moss, J. Optimizing treatments for lymphangioleiomyomatosis. *Expert Rev. Respir. Med.* **2012**, *6*, 267–276. [[CrossRef](#)]
91. Saftig, P.; Klumperman, J. Lysosome biogenesis and lysosomal membrane proteins: Trafficking meets function. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2009**, *10*, 623–635. [[CrossRef](#)]
92. McWilliams, T.G.; Prescott, A.R.; Allen, G.F.G.; Tamjar, J.; Munson, M.J.; Thomson, C.; Muqit, M.M.K.; Ganley, I.G. mito-QC illuminates mitophagy and mitochondrial architecture in vivo. *J. Cell Biol.* **2016**, *214*, 333–345. [[CrossRef](#)]
93. Kundu, M.; Lindsten, T.; Yang, C.-Y.; Wu, J.; Zhao, F.; Zhang, J.; Selak, M.A.; Ney, P.A.; Thompson, C.B. Ulk1 plays a critical role in the autophagic clearance of mitochondria and ribosomes during reticulocyte maturation. *Blood* **2008**, *112*, 1493–1502. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
94. He, S.; Wang, C.; Dong, H.; Xia, F.; Zhou, H.; Jiang, X.; Pei, C.; Ren, H.; Li, H.; Li, R.; et al. Immune-related GTPase M (IRGM1) regulates neuronal autophagy in a mouse model of stroke. *Autophagy* **2012**, *8*, 1621–1627. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]



© 2020 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

Publication 2 : Critical analysis of reference studies on the toxicokinetics of aluminum-based adjuvants

Journal of Inorganic Biochemistry 181 (2018) 87–95



Contents lists available at ScienceDirect

Journal of Inorganic Biochemistry

journal homepage: www.elsevier.com/locate/jinorgbio

Review article

Critical analysis of reference studies on the toxicokinetics of aluminum-based adjuvants[☆]



Jean-Daniel Masson^{a,1}, Guillemette Crépeaux^{a,b,1}, François-Jérôme Authier^a, Christopher Exley^c, Romain K. Gherardi^{a,*}

^a INSERM U955 E10, Biologie du système neuromusculaire, Faculté de Médecine, Université Paris Est Créteil, Créteil 94010, France

^b Génétique médicale comparée des affections neuromusculaires, Ecole Nationale Vétérinaire d'Alfort, 7 Avenue du général de Gaulle, 9400 Maisons-Alfort, France

^c The Birchall Centre, Lennard-Jones Laboratories, Keele University, Staffordshire ST5 5BG, UK

ARTICLE INFO

Keywords:

Vaccine adjuvant
Aluminum
Toxicokinetics
Vaccine safety

ABSTRACT

We reviewed the three toxicokinetic reference studies commonly used to suggest that aluminum (Al)-based adjuvants are innocuous. A single experimental study was carried out using isotopic ²⁶Al (Flarend et al., Vaccine, 1997). This study used aluminum salts resembling those used in vaccines but ignored adjuvant uptake by cells that was not fully documented at the time. It was conducted over a short period of time (28 days) and used only two rabbits per adjuvant. At the endpoint, Al elimination in the urine accounted for 6% for Al hydroxide and 22% for Al phosphate, both results being incompatible with rapid elimination of vaccine-derived Al in urine. Two theoretical studies have evaluated the potential risk of vaccine Al in infants, by reference to an oral "minimal risk level" (MRL) extrapolated from animal studies. Keith et al. (Vaccine, 2002) used a high MRL (2 mg/kg/d), an erroneous model of 100% immediate absorption of vaccine Al, and did not consider renal and blood-brain barrier immaturity. Mitkus et al. (Vaccine, 2011) only considered solubilized Al, with erroneous calculations of absorption duration. Systemic Al particle diffusion and neuro-inflammatory potential were omitted. The MRL they used was both inappropriate (oral Al vs. injected adjuvant) and still too high (1 mg/kg/d) regarding recent animal studies. Both paucity and serious weaknesses of reference studies strongly suggest that novel experimental studies of Al adjuvants toxicokinetics should be performed on the long-term, including both neonatal and adult exposures, to ensure their safety and restore population confidence in Al-containing vaccines.

1. Introduction

Vaccination helped with the eradication of smallpox, a 99% decline in poliomyelitis between 1988 and 2003, and a 40% decrease in measles cases between 1999 and 2003 worldwide, as well as a decrease in cases of mumps of 859 to 9 per 100,000 inhabitants between 1986 and 2013 in France [1]. The maintenance of good vaccination coverage, i.e. a high rate of vaccinated persons in the population, is necessary to avoid the resurgence of other infectious diseases, as was observed for pertussis or rubella, with a double benefit, both individually and collectively, by reducing the number of people who can transmit infectious diseases [1].

Although the success of many vaccines has been amply demonstrated, a growing public distrust of vaccination has emerged in recent years. This reluctance, of varying degrees, appears concomitantly with an expanding

global World Health Organization (WHO) policy for burgeoning vaccination programs with > 120 new vaccines currently being developed and an annual growth of 20% of vaccine business is expected, realizing a turnover which has increased from 5 to 43 billion dollars between 2000 and 2016, and will be > 100 billion dollars in 2025 [2].

Unlike conventional medicines, vaccines are administered to healthy subjects that need to be convinced of their value and safety. In this context, the vaccine issue has become a major societal issue, leading to the establishment of a national citizen consultation on vaccination chaired by Alain Fischer in France [3]. According to the findings of its final report of 30th of November 2016, several factors contribute to mistrust of vaccination, especially:

- Suspicions of collusion between health authorities and the drug industry as a result of mediated scandals;

[☆] This paper has been previously published in French in *Annales Pharmaceutiques Françaises*. It is released in English in the *Journal of Inorganic Biochemistry* with due permission of the publisher.

* Corresponding author at: Centre Expert de Pathologie Neuromusculaire, Hôpital Henri Mondor, 94010 Créteil, France.

E-mail address: romain.gherardi@aphp.fr (R.K. Gherardi).

¹ These authors contribute equally to this work.

<https://doi.org/10.1016/j.jinorgbio.2017.12.015>

Received 29 May 2017; Received in revised form 21 December 2017; Accepted 22 December 2017

Available online 28 December 2017

0162-0134/ © 2017 Elsevier Inc. All rights reserved.

- The disappearance of many infectious diseases that question the appropriateness of continuing vaccination;
- The issue of adjuvants in vaccines;
- The position of doctors who complain of a lack of training to convince reluctant patients;
- The complexity of the vaccination course (mandatory medical prescription, pharmacy purchase of the vaccine, medical vaccination, etc.);
- Lack of information from doctors on the immunization status of their patients (health book lost or not presented);
- Health crises (mediator, contaminated blood, etc.) and the insufficient responsiveness of the answer and the commitment of the public authorities which have left the field open to anti-vaccination propaganda [3].

A key question in the debate on vaccine safety concerns the adjuvants, compounds essential for strong and lasting immunization [4]. The controversy focuses on the aluminum salts which were empirically introduced by Alexander Glenny as adjuvants to vaccines in 1926 [5]. It has resulted in various actions brought by patient associations [6,7], publication of books for the general public, either critical [8] or reassuring [9], scientific blogs [10], drafting of institutional technical reports [4,11–13], and holding of parliamentary initiative discussion meetings [14,15]. Although the principle of vaccination has never been questioned during these exchanges, the exact degree of safety of aluminum-containing vaccines has remained the subject of persistent disagreement.

The occurrence of myalgia and arthralgia, chronic fatigue and neurological disorders following multiple injections of aluminum-containing vaccines against hepatitis B, tetanus and human papilloma virus (HPV) has been reported in many countries: Australia [16], Canada [17,18], Denmark [19,20], France [21–23], United Kingdom [24,25], Italy [26], Israel [27], Japan [28–29], Mexico [30], Portugal [31], and USA [32]. Nevertheless, beyond the temporal association, the existence of a causal link remains debated. For vaccination against HPV for example, the risk of occurrence of adverse events, which may form part of one or more of the clinical entities [19] - chronic fatigue syndrome (CFS), regional pain syndrome (RPS), orthostatic postural tachycardia syndrome (POTS) - emerges from an epidemiologic point of view [33]. A systematic cross-sectional study of 12 published studies showed a slight increase of adverse events in the HPV-vaccinated group, but this information must take account of the quasi-systematic use of control groups that received aluminum adjuvants in the form of a placebo containing the adjuvant or, more rarely, the hepatitis A vaccine (11 of the 12 publications analyzed, comprising 29,533 of the 29,600 patients studied) [34]. Despite this major bias [35], European Medicines Agency (EMA) issued a negative opinion on the existence of an association between HPV-vaccination and increasing of adverse events [36]. Some pharmaco-epidemiological studies were seemingly in support of this opinion [37,38], but having focused on most specific auto-immune diseases, they have excluded CFS, RPS, and POTS from their investigations. The EMA's decision caused strong dissatisfaction of Cochrane Nordic and a complaint was lodged against EMA [39]. The question of the existence of a causal link, and thus of an authentic adjuvant syndrome [40,41], may never be resolved by epidemiological approaches [42]. The performance of epidemiology to establish causality is notoriously limited, as it can be conceived for multi-systemic effects in the more or less long term of low cumulative doses administered in a context of multiple exposures. Failing this, the debate can be enlightened only by establishing the existence or not of an unequivocal biological plausibility of a causal link.

To date, aluminum adjuvants per se have, perhaps surprisingly, not been the subject of any official experimental investigation, and this being in spite of the well-established neurotoxicity of aluminum. The WHO also notes: "Adjuvant safety is an important and neglected field. Since adjuvants have their own pharmacological properties, which

might affect both the immunogenicity and the safety of vaccines, safety assessment is essential" [43]. For its part, the National French Academy of Pharmacy asked that studies on the safety of the aluminum-based adjuvants be carried out taking into account a set of parameters so far little studied, which can contribute to the appearance of risk [13]. In the following review, we have examined in detail in the light of recent findings the few articles of classical toxicokinetics in the literature that serve as a reference for health regulators and industrialists to apparently confirm the safety of aluminum adjuvants.

2. Generality on Al adjuvants

The two main aluminum salts used as adjuvants are Al oxy-hydroxide (AlOOH, Alhydrogel®) and Al hydroxyphosphate (AlOHPO₄, AdjuPhos®). They are present in about 60% of human vaccines (Table 1) and veterinary vaccines [44]. The oxy-hydroxide form is the most widely used adjuvant in vaccines distributed in France (the most commonly used vaccines against hepatitis B, hepatitis A, or tetanus, many other vaccines, as well as products for immunotherapy subcutaneous desensitization). For HPV vaccines, the adjuvants are Al-oxy-hydroxide for the divalent 16/18 Cervarix® (combined with a second adjuvant, monophosphoryl lipid A, detoxified derivative of lipopolysaccharide [45]), and amorphous Al hydroxyphosphate sulfate for the quadrivalent 6/11/16/18/ Gardasil® (an adjuvant more immunostimulating than conventional aluminum-based adjuvants) [46].

The two major types of aluminum adjuvant strongly potentiate the production of antibodies (humoral response by activation of CD4 + Th2 lymphocytes and B-cell priming) and not, or very little, production of cytotoxic T lymphocytes. The mechanisms involved are still incompletely understood [47,48]. The Food and Drug Administration (FDA) empirically fixed the authorized level of adjuvant at 0.85 mg of aluminum per dose of vaccine, based on results showing a good adjuvant effect at this concentration (according to Joan May, FDA/CBER, quoted in [49]).

The two Al-adjuvants have different physicochemical properties in the native state. The oxyhydroxide (commonly called Al hydroxide) has a crystalline morphology, known as Boehmite, while hydroxyphosphate (commonly called Al phosphate) is amorphous. Al hydroxide is composed of nanoparticles of about 2.2 nm × 4.5 nm × 10 nm which spontaneously form micron-sized aggregates having a nano-fibrous appearance under transmission electron microscopy [50,51]. This adjuvant is highly hydrated, forming a stable gel whose antigenic adsorption capacities are uniformly high. Hydrostatic interactions and exchange of hydroxyl groups with phosphate are the main forces explaining the adsorption at the surface of the adjuvant. Al phosphate has fewer hydroxyl groups and therefore its antigenic adsorption capacities are lower than those of Al hydroxide. Al hydroxide has a positive surface charge, Al phosphate a negative charge. The kinetics of biodisposition of the two adjuvants are also significantly different: Al hydroxide is much slower solubilized, more avidly internalized and less toxic to the phagocytic cells [51] than Al phosphate, suggesting notable differences in the reactions of the two adjuvants during the interactions with phosphate, organic acids, protein environments and immune cells encountered in vivo.

3. Critical analysis of reference articles on the toxicokinetics of Al adjuvants

3.1. Study of absorption and elimination of vaccine aluminum [52]

For a long time specialized international meetings have held that Al injected by the vaccine route was essentially rapidly eliminated from the body in the urine [53] and this message was relayed by general public official information sites, until recent withdrawal [54]. This claim has its roots in studies from the 1990s using a new technique to study Al toxicokinetics. Indeed, until 1990, it was difficult to know the

Table 1
Aluminum adjuvant-containing vaccines licensed for human use (2013).

Vaccine's name	Laboratory	Aluminum	Other adjuvant
<i>Both bacteria and viruses</i>			
Diphtheria, Tetanus, Acellular pertussis, Poliomyelitis, <i>Haemophilus influenzae</i> B and hepatitis B			
InfanrixHexa	GSK	Al-phosphate: 0.3 mg/dose Al-hydroxide: 0.5 mg/dose (0.5 ml)	
Diphtheria, Tetanus, Acellular pertussis, Poliomyelitis and <i>Haemophilus influenzae</i> B			
InfanrixQuinta	GSK	Al-hydroxide: 0.5 mg/dose (0.5 ml)	
Pentavac	Sanofi Pasteur MSD	Al-hydroxide: 0.3 mg/dose (0.5 ml)	
Diphtheria, Tetanus, Acellular pertussis and poliomyelitis			
DTCaPolio			
InfanrixTetra	GSK	Al-hydroxide: 0.5 mg/dose (0.5 ml)	
Tetravac acellulaire	Sanofi Pasteur MSD	Al-hydroxide: 0.3 mg/dose (0.5 ml)	
dTcaPolio			
Boostrixtetra	GSK	Al-hydroxide: 0.3 mg/dose + Al-phosphate: 0.2 mg/dose (0.5 ml)	
Repevax	Sanofi Pasteur MSD	Al-phosphate: 0.33 mg/dose (5 ml)	
Diphtheria, Tetanus and poliomyelitis			
Revaxis	Sanofi Pasteur MSD	Al-hydroxide: 0.35 mg/dose (0.5 ml)	
<i>Bacteria</i>			
Meningococcus			
Meningococcus C			
Meningitec	Pfizer Holding	Al-phosphate: 0.125 mg/dose (5 ml)	
Menjugatekit	Novartis Vaccines and Diagnostics	Al-hydroxide: 0.3 to 0.4 mg/dose (0.5 ml)	
Neisvac			
Meningococcus B	Baxter	Al-hydroxide: 0.5 mg/dose (0.5 ml)	
Bexsero			
	Novartis Vaccines and Diagnostics	Al-hydroxide: 0.5 mg/dose (0.5 ml)	
Pneumococcus			
Prevenar 13			
Pasteur tetanic vaccin	Pfizer Holding Sanofi Pasteur MSD	Al-phosphate: 0.125 mg/dose (5 ml) Al-hydroxide: 0.6 mg/dose (0.5 ml)	
<i>Viruses</i>			
Hepatitis B			
Engerix 10 µg/0.5 ml	GSK	Al-hydroxide: 0.25 mg/dose (0.5 ml)	
Engerix 20 µg/1 ml	GSK	Al-hydroxide: 0.5 mg/dose (1 ml)	
HBVAXPRO 5 µg/0.5 ml	Sanofi Pasteur MSD	Al-hydroxyphosphate sulfate 0.25 mg/dose (0.5 ml)	
HBVAXPRO 10 µg/1 ml	Sanofi Pasteur MSD	Al-hydroxyphosphate sulfate 0.5 mg/dose (1 ml)	
HBVAXPRO 40 µg/1 ml	Sanofi Pasteur MSD	Al-hydroxyphosphate sulfate 0.5 mg/dose (1 ml)	
GenHevac B Pasteur	Sanofi Pasteur	Al-hydroxide ≤ 1.25 mg/dose (1 ml)	
Hepatitis A			
Avaxim adult	Sanofi Pasteur	Al-hydroxide: 0.3 mg/dose (0.5 ml)	
Havrix 1440 U/1 ml adult	GSK	Al-hydroxide: 0.5 mg/dose (1 ml)	
Havrix 720 U/0.5 ml infant and pregnant women	GSK	Al-hydroxide: 0.25 mg/dose (0.5 ml)	
Tick-borne encephalomyelitis			
Ticovac 0.5 ml adult			
Ticovac 0.25 ml infant	Baxter	Al-hydroxide: 0.35 mg/dose (0.5 ml) Al-hydroxide: 0.17 mg/dose (0.25 ml)	
Encepur	Novartis Vaccines and Diagnostics	Al-hydroxide: 0.3 to 0.4 mg/dose (0.5 ml)	
Japanese encephalitis			
Ixiaro		Al-hydroxide: 0.25 mg/dose (0.5 ml)	
Human papillomavirus			
Cervarix			
	GSK	Al-hydroxide: 0.5 mg/dose (0.5 ml)	3-O-desacyl-4'-monophosphoryl lipid A (50 µg)
Gardasil	Sanofi Pasteur MSD	Al-hydroxyphosphate sulfate 225 µg/dose (0.5 ml)	
Both hepatitis A and B			
Twinrix adult			
	GSK	Al-hydroxide: 0.05 mg/dose + Al-phosphate: 0.4 mg/dose (1 ml)	
Twinrix infant	GSK	Al-hydroxide: 0.025 mg/dose + Al-phosphate: 0.2 mg/dose (0.5 ml)	

precise fate of Al in vivo, since it was not possible to differentiate administered Al from Al obtained from other forms of exposure or from external contamination of the samples. The use of ²⁶Al, a low-level radioactive isotope, which is distinct from the natural ²⁷Al, has allowed the detection of very small quantities of Al (10⁻¹⁷ g) using accelerator mass spectrometry [55].

Priest et al. [56] were the first to inject intravenously (IV) ²⁶Al citrate, a soluble form of aluminum, into a healthy volunteer to study the

toxicokinetics of aluminum in a human. They observed that more than half of the injected aluminum had left the bloodstream after 15 min and < 1% remained in the bloodstream after two days. On day 13, 83% of the injected dose had been excreted in urine and 1.8% had been excreted in feces [56]. The remaining 15% in the organism after that date then declined very slowly as the retention of ²⁶Al was still 4% after 3 years. Similar results were reported in 6 other healthy volunteers, with significant inter-individual variations in the degree of retention of

aluminum [57]. This work thus showed a multiphase elimination of the circulating Al, comprising an initial rapid elimination phase, followed by phases of elimination which are much slower. Multiple environmental exposures will thus favor the progressive accumulation of aluminum in the body during the life of an individual [56]. It is essential to take into account that in these preliminary toxicokinetic studies, neither the form of aluminum (soluble) nor the route of administration (IV) corresponded to the vaccine situation, where aluminum is subcutaneously (SC) or intramuscularly (IM) injected in nano/microparticle form. The point is crucial: the dynamics of Al adjuvants have very little relevance to any 'normal' exposure to Al in everyday life, and injection of Al citrate into the blood doesn't really tell you much at all about normal chronic exposure to Al via any route and including vaccination.

Using the same tracer ^{26}Al , Flarend and Hem [52,55] therefore carried out the only pharmacokinetic study of Al adjuvants and in an animal model. It should be noted that this study was initially considered as a preliminary study [53] but was not followed by any definitive study. The French National Academy of Medicine emphasizes that "this experimental work, unique to date, is used for the modeling of the pharmacokinetics of adjuvants" [4]. This unique reference study suffers from many weaknesses in its working hypotheses, its design, and the interpretation of its results.

3.1.1. An incorrect starting hypothesis

At the time of the study, the working hypothesis on how aluminum-based adjuvants work was that of Glennly [5], according to which Al adjuvant [initially Al potassium sulfate $\text{KAl}(\text{SO}_4)_2$] formed a local deposit from which a gradual desorption of the vaccine antigen took place, at the origin of the observed adjuvant effect. The depot theory, as it is called, has recently been questioned [48], and now largely abandoned [58]. On the basis of this initial dogma, Stanley Hem, a chemist, had studied in vitro the dissolution kinetics of a dose of Al adjuvant (corresponding to 0.85 mg of Al) in 25 ml of a medium adjusted for citrate to mimic the concentration of Al chelating acid found in the interstitial fluid [59]. At pH 7.35 and ambient temperature, he observed that 55% of Al phosphate was dissolved at 12 h, compared to 0% for two commercial Al hydroxide adjuvants. By increasing the concentration of citrate by a factor $\times 100$ and raising the temperature to 37 °C, dissolution of 100% of the phosphate form was observed at 12 h compared with < 6% for the hydroxide forms. At 132 h (final study time), the dissolution of the hydroxide forms was only 7 to 10%. While mentioning the existence of different dissolution kinetics of Al phosphate and Al hydroxide forms in vitro, Flarend et al. have assumed as a starting point of their in vivo study that the two adjuvants injected into the tissue would be solubilized in contact with the organic chelating acids having an alpha-hydroxy-carboxylic acid group (citric acid, lactic acid and malic acid) present in the interstitial fluid.

This initial hypothesis is largely false in two aspects: the solubilization of Al hydroxide previously observed in vitro was nil in the presence of a physiological concentration of citrate and remained very low (6%) when citrate concentration was increased by 100 fold [59] and, above all, the authors were probably unaware of particles capture by immune cells. The fact that once injected into a tissue, agglomerates of adjuvant are rapidly captured by the cells of the innate immune system and thus rapidly taken away from the dissolving effect of the chelating agents present in the interstitial fluid was fully demonstrated several years later [21,50,60–62] but only occasionally documented prior to their study [63–65]. The authors implicitly recognized particles cellular uptake a few years later by showing the importance of phagocytosis in the adjuvant immunologic effect [66]. Incorrect starting hypothesis does not negate study results, of course, but phagocytosis obviously represents a critical factor that must be taken into account to interpret the results. One may argue that cells contain citric and malic acids as part of the citric-acid cycle and lactic acid from the anaerobic breakdown of glycogen, but the exact contribution, if any, of these intracellular chelating acids in adjuvant solubilization in vivo is

unknown. Moreover, another mean of mineral particle corrosion by the autophagy-lysosome machinery has been described [67], suggesting that aluminum-based adjuvant solubilization may largely depend on cell-specific genetically-driven mechanisms.

3.1.2. A study protocol with a limited and imperfect design

Flarend et al. [52] injected intramuscularly 0.85 mg of ^{26}Al as hydroxide or phosphate to rabbits.

- Only two rabbits were injected for each Al salt studied which appears to be a too small number of animals per condition required for reliable interpretation of data from biological experiments. Indeed, the experiments will show strong inter-individual variation of Al urinary elimination after Al-phosphate injection (see below and Fig. 1). Such inter individual variations were previously observed after intravenous Al injection in man [57];
- The study was conducted for a very limited period of 28 days: the team's previous in vitro results (see above) made it unlikely that Al hydroxide would be removed after such a short period of time [59];
- Al hydroxide used, manufactured by precipitation, differs from Al oxyhydroxide (Alhydrogel®) found in commercial vaccines [68]. [The same was true for Al phosphate that differed from Adju-Phos®].

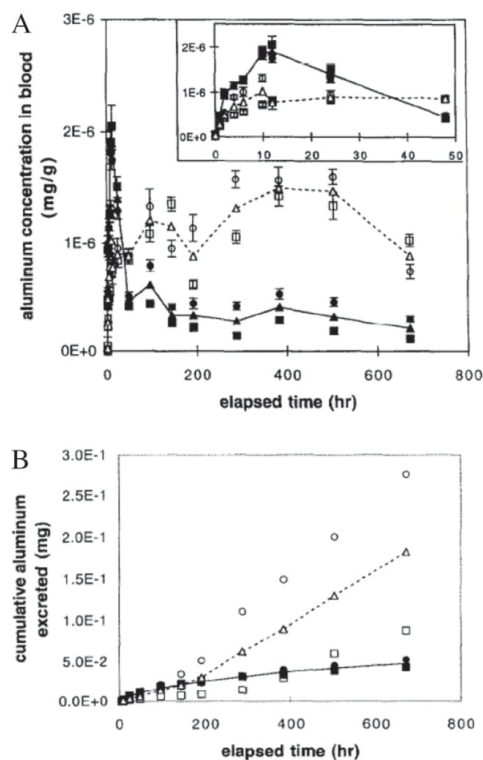


Fig. 1. A: This figure corresponds to the original Fig. 1 in Flarend et al. [52], showing plasma concentration kinetics of ^{26}Al after intramuscular injection of ^{26}Al hydroxide and ^{26}Al phosphate in rabbits.

B: This figure corresponds to the original Fig. 2 in Flarend et al. [52], showing cumulative urinary excretion of ^{26}Al after intramuscular injection of ^{26}Al hydroxide and ^{26}Al phosphate in rabbits. Reproduction of these figures with permission (Elsevier license # 4101280853249).

One possible option would have been to incubate the ^{26}Al for a long time with Alhydrogel® [or Adju-Phos®] and wait for the exchange between ^{27}Al and ^{26}Al in order to mark the official adjuvant.

3.1.3. Forgotten or destroyed target tissues

The lack of relevance of the organs removed at the end of the study to assess the biodistribution of ^{26}Al is striking:

- Muscle tissues at the injection site were not sampled making it impossible to determine the amount of adjuvant left at the injection site even though the study was based on “depot theory”;
- The sampled lymph nodes were intestinal lymph nodes and not the drainage ganglia of the injected area, whereas drainage of the adjuvant to the regional lymph nodes is a recognized route of systemic dissemination of adjuvant [50,69,70];
- The sampled bones (femur) were lost, which was unfortunate as bone is a known sink for circulating soluble aluminum, perhaps more useful than the kidney or other organs [71,72];
- The brains were sampled, though one of them was destroyed, the one which was taken from the animal with the highest blood content of ^{26}Al (animal injected with Al phosphate).

3.1.4. Initial plasma measurements contradictory to preliminary in vitro results

Flarend et al. [52] measured ^{26}Al in blood and urine during 28 days of the study and then in the post-mortem samples.

- Their first finding was the occurrence of an initial blood peak of ^{26}Al . Unexplainably, it was the hydroxide salt which induced the sharpest peak, the increase being noted from the first point (1 h), culminating at 10 h and ending at 48 h (Fig. 1A). The authors interpreted this initial peak as resulting from an early dissolution of Al hydroxide, which seems doubtful in the light of previous research which showed little solubilization of hydroxide adjuvant in vitro after 12 h [59]. On the other hand, the phosphate salt, which should solubilize more rapidly than the hydroxide, produced only a modest increase in plasma ^{26}Al , as evidenced by a higher area under the curve of a factor $\times 1.4$, for hydroxide within the first 48 h. One possible explanation for the higher plasma ^{26}Al in the rabbit receiving hydroxide adjuvant, which was not considered by the authors, is that nano or microparticulate Al hydroxide leaked from the injection site in blood due to needle damage at the injection site.
- From 48 h the plasma concentration of ^{26}Al plasma was higher for Al phosphate and remained higher than that for Al hydroxide thereafter (Fig. 1A). The authors do not comment on the existence of undulations in the plasma concentrations of ^{26}Al with peaks at 100 h and 400 h. These changes were seen in both adjuvants but were sharper for Al phosphate, which might suggest cyclical absorption phenomena, perhaps linked to cellular or tissue capture/release phenomena. At 28 days after the injections, the absorption, i.e. solubilization, of ^{26}Al from Al phosphate adjuvant is 3 times higher than that observed for Al hydroxide.
- At the end of the study, the authors insist on the absence of terminal phase in the curve of plasma concentrations, that is to say of terminal phase of blood absorption of ^{26}Al . Examination of the same curves by the Mitkus et al. [73] indicated that, in fact, the passage of ^{26}Al into the blood had initiated the terminal phase for Al phosphate and was already very close to zero for Al hydroxide on the 28th day of the study (Fig. 1A). For Al hydroxide, the plasma levels of ^{26}Al were very low since the 100th hour and absorption in blood further decreased from the 400th to the 700th hour, indicating an extremely low Al plasma passage after the initial peak observed from 0 to 48 h.

3.1.5. Statements on the elimination of adjuvants are not suggested by the results

There is a strong difference in urinary excretion of ^{26}Al between the

two adjuvants. At 28 days after the injections, 22% of the ^{26}Al originating from the phosphate adjuvant was eliminated in the urine, with substantial differences between the two studied rabbits (10–33%). At the same time, only 5.6% (5.0–6.2%) of the ^{26}Al originating from the hydroxide adjuvant was eliminated in the urine. The retention level of $> 94\%$ at 28 days observed for Al hydroxide is consistent with its expected low solubilization rate. Taking into account the initial blood peak, which interpretation in terms of solubilization is uncertain (see above), the authors calculate that only 17% of the ^{26}Al is absorbed from the hydroxide at 28 days of study (compared to 51% for phosphate). As a result, the distribution in the different tissues of ^{26}Al shows consistently higher tissue concentrations for the phosphate form (with a factor of about $\times 2.9$).

The distribution is similar for both adjuvants (kidney $>$ spleen $>$ liver $>$ heart $>$ lymph node $>$ brain), with reservations due to the lack of analyses of muscle at the injection site, the draining lymph nodes and bone. This tissue distribution of ^{26}Al is only valid for the short time of the study. This point is particularly important if one considers the possibility of a slow translocation of Al hydroxide from the injection site to the lymphoid organs [70] and the brain [69].

The authors correctly emphasize that urinary elimination of ^{26}Al persists in steady-state for both adjuvants at 28 days after the injections. However, the excreted cumulative dose study showed a clear increase over time in one of the rabbits for the phosphate adjuvant, while the slope was markedly lower for the second rabbit and quasi-flat for the aluminum hydroxide adjuvant (Fig. 1B). These results indicate that excretion may be slow for Al phosphate, and is very slow for Al hydroxide. The authors state that “the dissolution, absorption, distribution and elimination of Al adjuvants has been demonstrated” by their study. Rather than talking about the reassuring nature of these results [53], an inverse conclusion should have been made by the authors from a vaccine safety perspective, highlighting the low dissolution and low elimination of Al adjuvants, especially the hydroxide-based adjuvant, and the need for further long-term studies on a larger number of animals. The regulatory agencies themselves would have been well advised to order complementary toxicokinetic studies in order to avoid the propagation of hazardous information on the rapid elimination of Al adjuvants [54], especially after they had become aware of subsequent studies showing phagocytosis, intracellular persistence, distance migration and neurotoxicity of Al adjuvants [21,50,69,70].

3.2. Theoretical calculations which suggested the safety of multiple doses of Al vaccine administered to infants [73,74]

Two studies compared the theoretical impact of dietary Al and vaccine-derived Al in infants [73,74]. The principle of the two studies is similar: these are theoretical calculations based on the intake and excretion of aluminum from birth to 12 months. The calculated accumulation of aluminum is compared to the safety level determined for the oral route by the Agency for Toxic Substances and Disease Registry in Atlanta (ATSDR). The ATSDR defines a minimal risk level (MRL) that takes into account the risk of neurotoxicity of aluminum administered orally. This oral MRL is fixed from animal experiments extrapolated to humans using correction factors. The “reassuring” results of these two theoretical studies have been a strong argument in favor of the safety of Al adjuvants [4,54]. In addition, a single direct study was conducted in human infants, on the short term (24 h) in preterm infants [75].

3.2.1. Study by Keith et al. [74]: too high “safety” threshold, erroneous absorption model, and key organ's immaturity were not considered

3.2.1.1. Description of the study. Keith et al. [74] estimated the accumulation of aluminum in the body according to the age and weight of children from 0 to 12 months. Dietary accumulation (breastfeeding and/or artificial feeding) was calculated by taking into account an intestinal absorption factor of 0.78%. Contribution from vaccines, i.e. 7 injections administered at 0, 2, 4, 6 and 12 months (3

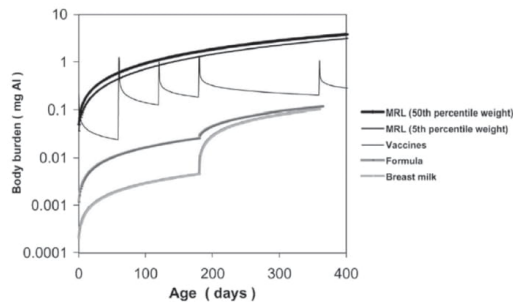


Fig. 2. Figure from Keith et al. [74] assessing Al body burden contributions from diet and vaccines in infants. Safety limit curve integrates the oral Minimum Risk Level (MRL) based on an experimental Non Observable Adverse Effect Level (NOAEL) value of 62 mg Al/kg/d, and the body weight of US kids. In case of an immediate absorption of 100% of vaccine Al, there is a transient overstep of the safety limit by the Al vaccine at 2 months, and peaks reaching the limit at 4 and 6 months. Reproduction of this figure with permission (Elsevier license # 4101280948254).

anti-hepatitis B and 4 DTaP (diphtheria-tetanus-acellular pertussis)) was calculated assuming that injected Al is immediately absorbed at 100% and that the toxico-kinetic profile is the one described and modeled by Priest for the soluble ²⁶Al intra-venously injected in man [56].

These intakes were compared with a “safety” profile taking into account the 0–12 month weight increase and an MRL of 2 mg Al/kg/day [76]. This MRL was defined from an earlier study of Golub et al. [77] who had studied the motor activity of mice subjected to a feed containing Al lactate. In these mice the Non-Observable Adverse Effect Level (NOAEL) was 62 mg Al/kg/d, corrected by a factor × 30 [extrapolation factor × 3 from mouse to human and factor × 10 for inter-individual variability], which produced an oral MRL of 2 mg Al/kg/d [75]. The study by Keith et al. [74] showed that accumulation of Al from vaccines was about twice that of dietary intake but remained largely below the MRL curve. However, the authors pointed out that in their model, vaccines in the vaccine schedule produced peaks at each injection, and the one from the 2nd month briefly exceeded the MRL curve and those of the 4th and 6th month were just at the limit of this curve (Fig. 2).

3.2.1.2. Critique of the study. The limitations and methodological imperfections of the model of Keith et al. [74] justified the subsequent study of Mitkus et al. [73]. Mitkus et al. felt that several limitations in the Keith work, detailed below, deserved a novel study:

- Subsequent amplification of the pediatric vaccine schedule recommended in the USA between the ages of 0 and 12 months; 3 Al-adjuvanted vaccines (7 injections) were added to the hepatitis B and DTaP vaccines, including vaccines against *Haemophilus influenzae*, *Pneumococcus* and hepatitis A. In 2016, 17 Al-adjuvanted injections were recommended by the CDC for infants between the age of 0 and 18 months (Table 2) [78]. This number is a maximum because of the possible use of various multivalent vaccines;
- Subsequent lowering of the safety level for Al, with the oral MRL decreasing from 2 to 1 mg Al/kg/d in 2008 [78];
- Failure to take into account the immaturity of the glomerular filtration function in the infant which may affect the removal of aluminum [73]; it should be noted that the issue of the blood-brain barrier has not been taken into account even though the development of the nervous system is notoriously sensitive to toxic exposures [80]. The issue of blood-brain barrier immaturity is an important issue in the potential toxicity of Al adjuvants. In its report, the French National Academy of Pharmacy [13] considers that “the blood-brain barrier, which is incompletely formed in the pre-natal

Table 2
Recommended immunization schedule for infants aged 0 through 18 months [CDC 2016].

Age [months]	Birth	2	4	6	12	15	18
Vaccine							
Hepatitis B ^a	x	x	x				
Rotavirus		x	x	x			
DTaP (diphtheria, tetanus, acellular pertussis) ^a		x	x	x		x	
Hib (<i>Haemophilus influenzae</i>) ^a		x	x	x		x	
Pneumococcus ^a		x	x	x		x	
PVI (inactivated poliovirus)		x	x	x			
Influenza					x		x
Measles-mumps-rubella					x		
Small pox					x		
Hepatitis A ^a					x		x

^a Al-containing vaccine (Al hydroxide and/or Al phosphate).

and post-natal stages, is more permeable to toxic substances. In addition, the brain is more perfused between 6 and 13 years because of its increased needs for maturation. [...] Experimental toxicological studies conducted in juvenile animals [...] are mandatory since epidemiological studies in children [...] are hardly feasible” [13].

- Necessary updating of the weight curve of American children [72];
- Improvement in 2004 of the mathematical modeling of the retention of IV-injected ²⁶Al in humans, now comprising 3 phases of absorption with respective Al half-lives of 1.4, 40 and 1727 days [81];
- And above all, taking into account the results of Flarend et al. [52] showing that Al absorption (solubilization) from the adjuvants can under no circumstances be considered as 100% immediately after injection.

3.2.2. The study by Mitkus et al. [73]: “safety” threshold still too high, nano/microparticulate Al not considered as potentially noxious

3.2.2.1. Description of the study. In this study, Mitkus et al. revisited Keith's methodology, taking into account all limitations listed above. At first, they did not take into account Flarend's pharmacokinetic results, confirming Keith's paper assumption that, if plasma uptake of Al from vaccines would immediately represent 100% of the dose -an hypothesis that maximizes the body burden-, there would be a transient crossing of the calculated security threshold at 2 months and a peak at the limit of the threshold at 4 months. Then Mitkus et al. took into account the slow absorption (solubilization) of Al from adjuvants shown by Flarend, and, in so-doing, found a seemingly high safety margin. To build their model, Mitkus et al. reasoned as follows: since the blood absorption of aluminum was 51% for phosphate adjuvant at 28 days after the injections in the Flarend study, it would take 28 more days to absorb the whole injected dose of adjuvant (total 56 days). Similarly since blood absorption of Al was 17% for Al hydroxide at 28 days, complete absorption would take 137 additional days (total 165 days). The calculated cumulative amount of aluminum absorbed from vaccines was significantly higher than the dietary Al uptake (factor × 2) but remained below the safety level for Al phosphate, and very largely below for Al hydroxide (Fig. 3). The author's conclusion is that the Al from vaccines is unlikely to have a significant influence on Al body burden of the infant's organism, implying a good safety of Al adjuvants from 0 to 12 months.

3.2.2.2. Mitkus' study suffers from a number of important biases.

- An inappropriate oral MRL was used to define the safety curve. The ingested Al was said to cross the intestinal barrier in its ionic form [74]. On the other hand, the adjuvants are nanoparticles aggregated in microparticles administered directly beyond the skin barrier. However, particulate toxicology involves many other parameters than the dose. In particular, the particle surface increases exponentially as the particle size decreases [and the number of

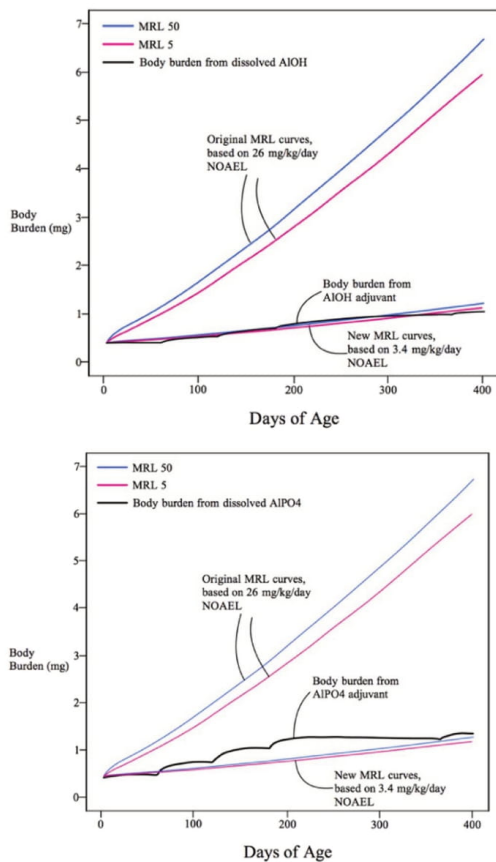


Fig. 3. These curves are derived from those of Mitkus et al. [73], in infants. On both panels oral Minimum Risk Level (MRL) curves (the two upper curves) of the original article were based on an experimental Non Observable Adverse Effect Level (NOAEL) of 26 mg/kg/d and integrated actualized American child body weight curves; revised MRL curves (the two lower curves) are based on an actualized NOAEL of 3.4 mg Al/kg/d [88,91]. Al absorbed from both Al hydroxide and Al phosphate according to Flarend et al. [52] absorption rates, show over-step of the safety limit.

particles increases] for a given mass of material [82]. In its particulate form, Al is rapidly captured and then transported at a distance by immune cells [21,50,69,70]. The comparison of the chemical toxicity of Al ions, such as those absorbed at the intestinal level, and the particulate toxicity of Al salts injected IM is therefore nonsense [83]. This is evidenced by the atypical dose-response curve of the neurotoxic effects of Al hydroxide, with cerebral transfer of aluminum and a clinical effect selectively observed for low dose, which approximates those described in particulate toxicology [84]. Strictly speaking, MRL used for vaccine risk modeling should be defined on the basis of animal experiments carried out with Al adjuvants, monitored for their particle parameters to be in accordance with those of the vaccines, and injected IM, rather than studies with soluble forms of Al [chloride or lactate] added to food or drinking water.

- Based on experimental data, oral MRL sets the safety curve too high. The MRL of 1 mg/kg/d [79] was determined based on a NOAEL of

26 mg/kg/day observed in mice in 2001 [85]. However, there are numerous reports of neurotoxic effects in mice and rats, confirmed by coherent neurobiological alterations, for oral doses of Al much < 26 mg/kg/d: 6 mg/kg/d reported in 1993 [86], 5.6 mg/kg/d reported in 2008 and 2009 [87,88], 10 mg/kg/d reported in 2016 [89], 3.4 mg/kg/d reported in 2016 and 2017 [90,91], and even 1.5 mg/kg/d reported in 2017 [92]. By using the “official” oral MRL, Mitkus therefore set the safety curve at a much higher level. This level was overestimated by a factor of up to 17.3 (i.e. 26/1.5) when the most recent study was taken into account. It should be noted that the 1.5 mg/kg/day reported is not even a NOAEL since effects have been documented at this dose [92]. Fig. 3 shows that even if one uses higher experimental NOAEL levels for calculation, e.g. 3.4 mg/kg/d, the safety limit is reached (hydroxide) or overstepped (phosphate) by Al from vaccine adjuvants. Under these conditions, the safety of Al adjuvants in infants cannot be guaranteed without doubts on the basis of the Mitkus study.

- Potential toxicity of particulate Al was not considered. Like Flarend before him [52], Mitkus et al. seemingly considered that only the soluble Al has toxic potential. His estimation of the duration of complete translocation of Al from the injected site to blood (< 2 months for the phosphate, 5.5 months for the hydroxide) is based on a simplistic calculation (see above) not taking into account that Flarend’s curves suggest that the termination of Al translocation to plasma is either underway (phosphate) or nearly achieved (hydroxide) on the 28th day (see above). The corollary of this over-simplistic calculation is an underestimation of the bio-persistence time of Al in particulate form. Histological studies carried out after IM injection of Al hydroxide showed that particulate Al and the granulomas it induces, are still detectable in the injected muscle after months in animal studies [60,61] and several years (up to 12 years) in adult patients with chronic post-vaccine fatigue syndrome [93]. Although genetic factors might explain the low intracellular solubilization of Al hydroxide in susceptible individuals [93], the Mitkus underestimation of the stability towards dissolution of aluminum adjuvants is certain and significant.

Another limitation of the Mitkus study is that it does not take into account that the adjuvant can migrate away from the muscle in its particulate form. Experimental studies have shown that the long intracellular bio-persistence of Al hydroxide relates to particles observed at the injection site as well as those transported to distant organs [70]. In mice Al hydroxide particles are indeed transported by cells of monocytic lineage, first to the draining lymph nodes and then, probably via the thoracic duct, to the bloodstream, then reaching distant organs such as the spleen or even the brain, where slow and delayed accumulation can be observed in microglial cells and neurons [50,69]. After a single IM injection, cerebral penetration of the particles is low but increases considerably under the influence of Monocyte Chemoattractant Protein-1/Chemokine Ligand (MCP-1/CCL2) signaling, and is accompanied by cellular expression of Interleukin IL1beta, an expected effect of Al adjuvant-induced activation of the inflammasome [69]. Finally, it should be noted that neurotoxic effects have been observed in mice injected with doses of Al hydroxide reproducing an equivalent of the American vaccination schedule from age 0 to 18 months [94]. Considering soluble Al only, Mitkus thought that “long-term storage depot (of Al solubilized from the injected site), is likely to be skeletal and not a more sensitive soft organ system is reassuring”. This reassuring assumption did not take into account the fate of particulate Al. In the same way, a recent study performed in premature infants vaccinated at the age of 2 months [75], only focused on soluble Al detectable in body fluids: the authors curiously felt “reassuring” the fact that they did not notice elevation of Al in serum and urine 24 h after administration of vaccines containing a total dose of 1200 µg Al (about 200 µg/kg) [75]. The absence of both detectable absorption and rapid elimination of Al from adjuvants rather represents a legitimate reason

of concern, since, as a corollary, it likely indicates systemic persistence of immunostimulating and neurotoxic Al particles translocated to lymphoid organs and potentially reaching the brain [70,84].

4. Conclusion

The glorious history of vaccines was largely built on an empirical basis during the last century. This was the case for the first-generation aluminum-based adjuvants which, nevertheless, proved to be very useful since their introduction in 1926. These adjuvants are still intended to be administered to billions of individuals over the next years, because of a massive expansion of vaccine prevention strategies announced worldwide [2]. In this context, given their serious conceptual and methodological weaknesses, the 3 available toxico-kinetic studies objectively constitute insufficient bases to guarantee the absolute safety of aluminum adjuvants administered at very large scale, in particular over the long term. Vaccinology in the 21st century is a modern and strong science. As such, it cannot simply rely on its past successes, and make no effort to finely understand the *in vivo* fate of aluminum adjuvants, with the risk of losing the necessary confidence of populations which became extremely sensitive to every dimensions of global health. It seems to us highly mandatory to conduct new toxico-kinetic experiments, including long-term studies, under the tight control of health authorities, in order to ensure a maximum level of safety of both classical and new generation aluminum adjuvants used in vaccines.

Disclosure

The authors report no conflicts of interest.

Acknowledgments

We thank the ANSM (BNAA-vacc project, # HAAP grant 2013), the Ile-de-France Region (NEUROTOXALU project, # PICRI grant 36) and the CMSRI (VACCINOPHAGY project, #20617) for their funding.

References

- O. Launay, Dossier vaccins et vaccination, <http://www.inserm.fr/thematiques/immunologie-inflammation-infectiologie-et-microbiologie/dossiers-d-information/vaccins-et-vaccination/>, (2015).
- M. Kaddar, Global Vaccine Market Features and Trends, http://www.who.int/immunization/programmes_systems/procurement/market/world_vaccine_market_trends.pdf, (2012), Accessed date: 16 December 2010.
- DILA (Direction de l'information légale et administrative), Vaccins: comment rétablir la confiance et augmenter la couverture de la population, <http://www.vie-publique.fr/actualite/alaune/vaccins-comment-retablir-confiance-augmenter-couverture-population-20161206.html/>, (2016).
- P. Bégué, M. Girard, H. Bazin, J.-F. Bach, Les adjuvants vaccinaux: quelle actualité en 2012? *Bull. Acad. Natl. Med.* 196 (2012) 1177–1181.
- A.T. Glenn, C.G. Pope, H. Waddington, O. Wallace, Immunological notes. XVII–XXIV, *J. Pathol. Bacteriol.* 29 (1926) 31–40.
- E3M, Association d'Entraide aux Malades de Myofasciite à Macrophages, <http://www.asso-e3m.fr/>, (2015).
- REVAHB, Association des victimes du vaccin hépatite B, <http://www.revahb.fr/>, (2016).
- R.K. Gherardi, Toxic story: deux ou trois vérités embarrassantes sur les adjuvants des vaccins, *Actes sud*, Paris, 2016.
- P. Sansonetti, Vaccins, Odile Jacob, Paris, 2017.
- Vaccine Papers, an Objective Look at Vaccine Dangers, <http://vaccinepapers.org/>, (2015).
- InVS-Afssa-Afssaps, Aluminium, Quels risques pour la santé? Synthèse des études épidémiologiques, http://invs.santepubliquefrance.fr/publications/2003/aluminium_2003/rapport_alu.pdf/, (2003).
- Haut Conseil de Santé Publique, Aluminium et vaccins, <http://www.hcsp.fr/>, (2013).
- Académie nationale de Pharmacie, Les adjuvants aluminiques, http://www.acadpharm.org/dos_public/Rapport_Adjuvants_aluminiques_VF_CORR_5.pdf/, (2016).
- Groupe d'Etudes sur la vaccination, Assemblée Nationale, Les 11 recommandations, http://www.alis-france.com/download/Groupe_etudes_vaccins.pdf/, (2012).
- Office Parlementaire d'Évaluation des Choix Scientifiques et Technologiques (OPECST), Les adjuvants vaccinaux: une question controversée, http://www.ladocumentationfrancaise.fr/Rapports_publics/, (2014).
- S. Richards, G. Chalkiadis, R. Lakshman, J.P. Buttery, N.W. Crawford, Complex regional pain syndrome following immunisation, *Arch. Dis. Child.* 97 (2012) 913–915, <http://dx.doi.org/10.1136/archdischild-2011-301307>.
- Report of the working group on the possible relationship between hepatitis B vaccination and the chronic fatigue syndrome, *CMAJ* 149 (1993) 314–319.
- W.A. Jastaniah, S. Dobson, J.G. Lugsdin, R.E. Petty, Complex regional pain syndrome after hepatitis B vaccine, *J. Pediatr.* 143 (2003) 802–804, [http://dx.doi.org/10.1067/S0022-3476\(03\)00536-5](http://dx.doi.org/10.1067/S0022-3476(03)00536-5).
- L. Brinth, Is chronic fatigue syndrome/myalgic encephalomyelitis a relevant diagnosis in patients with suspected side effects to human papilloma virus vaccine? *Int. J. Vaccines Vaccination* 1 (2015), <http://dx.doi.org/10.15406/ijvv.2015.01.00003>.
- L.S. Brinth, K. Pors, A.C. Theibel, J. Mehlsen, Orthostatic intolerance and postural tachycardia syndrome as suspected adverse effects of vaccination against human papilloma virus, *Vaccine* 33 (2015) 2602–2605, <http://dx.doi.org/10.1016/j.vaccine.2015.03.098>.
- R.K. Gherardi, M. Coquet, P. Cherin, L. Belec, P. Moretto, P.A. Dreyfus, J.F. Pellissier, P. Chariot, F.J. Authier, Macrophagic myofasciitis lesions assess long-term persistence of vaccine-derived aluminium hydroxide in muscle, *Brain* 124 (2001) 1821–1831.
- F.-J. Authier, S. Sauvat, J. Champey, I. Drogou, M. Coquet, R.K. Gherardi, Chronic fatigue syndrome in patients with macrophagic myofasciitis, *Arthritis Rheum.* 48 (2003) 569–570, <http://dx.doi.org/10.1002/art.10740>.
- D. Bonnefont-Rousselot, C. Chantalat-Auger, A. Teixeira, M.-C. Jaudon, S. Pelletier, P. Cherin, Blood oxidative stress status in patients with macrophagic myofasciitis, *Biomed Pharmacother* 58 (2004) 516–519, <http://dx.doi.org/10.1016/j.biopha.2004.04.012>.
- C. Exley, L. Swarbrick, R.K. Gherardi, F.-J. Authier, A role for the body burden of aluminium in vaccine-associated macrophagic myofasciitis and chronic fatigue syndrome, *Med. Hypotheses* 72 (2009) 135–139, <http://dx.doi.org/10.1016/j.mehy.2008.09.040>.
- A. Shivane, D.A. Hilton, R.M. Moate, P.R. Bond, A. Edean, Macrophagic myofasciitis: a report of second case from UK, *Neuropathol. Appl. Neurobiol.* 38 (2012) 734–736, <http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-2990.2012.01293.x>.
- B. Palmieri, D. Poddighe, M. Vadalà, C. Laurino, C. Carnovale, E. Clementi, Severe somatoform and dysautonomic syndromes after HPV vaccination: case series and review of literature, *Immunol. Res.* (2016), <http://dx.doi.org/10.1007/s12026-016-8820-z>.
- N. Agmon-Levin, Y. Zafir, S. Kivity, A. Balofsky, H. Amital, Y. Shoenfeld, Chronic fatigue syndrome and fibromyalgia following immunization with the hepatitis B vaccine: another angle of the "autoimmune (auto-inflammatory) syndrome induced by adjuvants" (ASIA), *Immunol. Res.* 60 (2014) 376–383, <http://dx.doi.org/10.1007/s12026-014-8604-2>.
- T. Kinoshita, R.-T. Abe, A. Hineno, K. Tsunekawa, S. Nakane, S.-I. Ikeda, Peripheral sympathetic nerve dysfunction in adolescent Japanese girls following immunization with the human papillomavirus vaccine, *Intern. Med.* 53 (2014) 2185–2200.
- O. Hotta, A. Tanaka, A. Torigoe, K. Imai, N. Ieiri, Japanese Focal Inflammation Research Group, Involvement of chronic epipharyngitis in autoimmune (auto-inflammatory) syndrome induced by adjuvants (ASIA), *Immunol. Res.* (2016), <http://dx.doi.org/10.1007/s12026-016-8859-x>.
- M. Martínez-Lavín, L.-A. Martínez-Martínez, P. Reyes-Loyola, HPV vaccination syndrome. A questionnaire-based study, *Clin. Rheumatol.* 34 (2015) 1981–1983, <http://dx.doi.org/10.1007/s10067-015-3070-3>.
- T. Santiago, O. Rebelo, L. Negrão, A. Matos, Macrophagic myofasciitis and vaccination: consequence or coincidence? *Rheumatol. Int.* 35 (2015) 189–192, <http://dx.doi.org/10.1007/s00296-014-3065-4>.
- S. Blitshteyn, Postural tachycardia syndrome following human papillomavirus vaccination, *Eur. J. Neurol.* 21 (2014) 135–139, <http://dx.doi.org/10.1111/ene.12272>.
- R.E. Chandler, K. Juhlin, J. Fransson, O. Caster, I.R. Edwards, G.N. Norén, Current safety concerns with human papillomavirus vaccine: a cluster analysis of reports in VigiBase®, *Drug Saf.* 40 (2017) 81–90, <http://dx.doi.org/10.1007/s40264-016-0456-3>.
- A.K. Gonçalves, R.N. Cobucci, H.M. Rodrigues, A.G. de Melo, P.C. Giraldo, Safety, tolerability and side effects of human papillomavirus vaccines: a systematic quantitative review, *Braz. J. Infect. Dis.* 18 (2014) 651–659, <http://dx.doi.org/10.1016/j.bjid.2014.02.005>.
- C. Exley, Aluminium-based adjuvants should not be used as placebos in clinical trials, *Vaccine* 29 (2011) 9289, <http://dx.doi.org/10.1016/j.vaccine.2011.08.062>.
- European Medicines Agency, Assessment Report. Human Papilloma Virus (HPV) Vaccines, http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Referrals_document/HPV_vaccines_20/Opinion_provided_by_Committee_for_Medicinal_Products_for_Human_Use/WC500197129.pdf, (2015).
- M. Zureik, R. Dray-Spira, S. Miranda, C. Collin, Vaccins anti-HPV et risque de maladies auto-immunes: étude pharmacoépidémiologique (Rapport CNAM/ANSM), http://ansm.sante.fr/var/ansm_site/storage/original/application/ea5e12b9c18ae41c2b8163ae5d7cb6f3.pdf/, (2015), Accessed date: 17 April 2012.
- N.M. Scheller, H. Svanström, B. Pasternak, L. Arnheim-Dahlström, K. Sundström, K. Fink, A. Hviid, Quadrivalent HPV vaccination and risk of multiple sclerosis and other demyelinating diseases of the central nervous system, *JAMA* 313 (2015) 54–61, <http://dx.doi.org/10.1001/jama.2014.16946>.
- P.C. Gotzsche, K.J. Jørgensen, T. Jefferson, M. Auku, L. Brinth, Complaint to the European Medicines Agency (EMA) Over Maladministration at the EMA, <https://nordic.cochrane.org/sites/nordic.cochrane.org/files/public/uploads/ResearchHighlights/Complaint-to-EMA-over-EMA.pdf>, (2016).
- R.K. Gherardi, Lessons from macrophagic myofasciitis: towards definition of a vaccine adjuvant-related syndrome, *Rev. Neurol. (Paris)* 159 (2003) 162–164.

- [41] Y. Shoenfeld, N. Agmon-Levin, "ASIA" - autoimmune/inflammatory syndrome induced by adjuvants, *J. Autoimmun.* 36 (2011) 4–8, <http://dx.doi.org/10.1016/j.jaut.2010.07.003>.
- [42] N. Petrovsky, Comparative safety of vaccine adjuvants: a summary of current evidence and future needs, *Drug Saf.* 38 (2015) 1059–1074, <http://dx.doi.org/10.1007/s40264-015-0350-4>.
- [43] WHO, Weekly Epidemiological Record, 79(29) Global Advisory Committee on Vaccine Safety, 2004, p. 269.
- [44] A.R. Spickler, J.A. Roth, Adjuvants in veterinary vaccines: modes of action and adverse effects, *J. Vet. Intern. Med.* 17 (2003) 273–281.
- [45] B.S. Thompson, P.M. Chilton, J.R. Ward, J.T. Evans, T.C. Mitchell, The low-toxicity versions of LPS, MPI adjuvant and RC529, are efficient adjuvants for CD4+ T cells, *J. Leukoc. Biol.* 78 (2005) 1273–1280, <http://dx.doi.org/10.1189/jlb.0305172>.
- [46] M.J. Caulfield, L. Shi, S. Wang, B. Wang, T.W. Tobery, H. Mach, P.L. Ahl, J.L. Cannon, J.C. Cook, J.H. Heinrichs, R.D. Sitrin, Effect of alternative aluminum adjuvants on the absorption and immunogenicity of HPV16 L1 VLPs in mice, *Hum. Vaccin.* 3 (2007) 139–145.
- [47] C. Exley, P. Siesjö, H. Eriksson, The immunobiology of aluminum adjuvants: how do they really work? *Trends Immunol.* 31 (2010) 103–109, <http://dx.doi.org/10.1016/j.it.2009.12.009>.
- [48] P. Marrack, A.S. McKee, M.W. Munks, Towards an understanding of the adjuvant action of aluminium, *Nat. Rev. Immunol.* 9 (2009) 287–293, <http://dx.doi.org/10.1038/nri2510>.
- [49] N.W. Baylor, W. Egan, P. Richman, Aluminum salts in vaccines. US perspective, *Vaccine* 20 (Suppl. 3) (2002) S18–23.
- [50] H. Eidi, M.-O. David, G. Crépeaux, L. Henry, V. Joshi, M.-H. Berger, M. Senour, J. Cadusseau, R.K. Gherardi, P.A. Curmi, Fluorescent nanodiamonds as a relevant tag for the assessment of alum adjuvant particle biodistribution, *BMC Med.* 13 (2015), <http://dx.doi.org/10.1186/s12916-015-0388-2>.
- [51] M. Mold, E. Shardlow, C. Exley, Insight into the cellular fate and toxicity of aluminum adjuvants used in clinically approved human vaccinations, *Sci. Rep.* 6 (2016) 31578, <http://dx.doi.org/10.1177/096032719501400707>.
- [52] R.E. Flarend, S.L. Hem, J.L. White, D. Elmore, M.A. Suckow, A.C. Rudy, E.A. Dandashli, In vivo absorption of aluminium-containing vaccine adjuvants using ²⁶Al, *Vaccine* 15 (1997) 1314–1318.
- [53] T.C. Eickhoff, M. Myers, Workshop summary. Aluminum in vaccines, *Vaccine* 20 (Suppl. 3) (2002) S1–4.
- [54] Oxford Vaccine Group, University of Oxford. Vaccine Knowledge Project. Authoritative Information for All 2015, <http://vk.ovg.ox.ac.uk/> (accessed in 2016, content subsequently modified).
- [55] S.L. Hem, Elimination of aluminum adjuvants, *Vaccine* 20 (Suppl. 3) (2002) S40–43.
- [56] N.D. Priest, D. Newton, J.P. Day, R.J. Talbot, A.J. Warner, Human metabolism of aluminium-26 and gallium-67 injected as citrates, *Hum. Exp. Toxicol.* 14 (1995) 287–293, <http://dx.doi.org/10.1177/096032719501400309>.
- [57] R.J. Talbot, D. Newton, N.D. Priest, J.G. Austin, J.P. Day, Inter-subject variability in the metabolism of aluminium following intravenous injection as citrate, *Hum. Exp. Toxicol.* 14 (1995) 595–599, <http://dx.doi.org/10.1177/096032719501400707>.
- [58] S. Hutchison, R.A. Benson, V.B. Gibson, A.H. Pollock, P. Garside, J.M. Brewer, Antigen depot is not required for alum adjuvanticity, *FASEB J.* 26 (2012) 1272–1279, <http://dx.doi.org/10.1096/fj.11-184556>.
- [59] S.J. Seeber, J.L. White, S.L. Hem, Solubilization of aluminium-containing adjuvants by constituents of interstitial fluid, *J. Parenter. Sci. Technol.* 45 (1991) 156–159.
- [60] F. Verdier, R. Burnett, C. Michelet-Habchi, P. Moretto, F. Fievet-Groynne, E. Sauzeat, Aluminium assay and evaluation of the local reaction at several time points after intramuscular administration of aluminium containing vaccines in the cynomolgus monkey, *Vaccine* 23 (2005) 1359–1367, <http://dx.doi.org/10.1016/j.vaccine.2004.09.012>.
- [61] F.-J. Authier, S. Sauvat, C. Christov, P. Chariot, G. Raisbeck, M.-F. Poron, F. Yiou, R. Gherardi, AIOH3-adjuvanted vaccine-induced macrophagic myofasciitis in rats is influenced by the genetic background, *Neuromuscul. Disord.* 16 (2006) 347–352, <http://dx.doi.org/10.1016/j.nmd.2006.02.004>.
- [62] M. Mold, H. Eriksson, P. Siesjö, A. Darabi, E. Shardlow, C. Exley, Unequivocal identification of intracellular aluminium adjuvant in a monocytic THP-1 cell line, *Sci. Rep.* 4 (2014) 6287, <http://dx.doi.org/10.1038/srep06287>.
- [63] M. Erdohazi, R.L. Newman, Aluminium hydroxide granuloma, *Br. Med. J.* 3 (1971) 621–623.
- [64] R.E. Mrak, Muscle granulomas following intramuscular injection, *Muscle Nerve* 5 (1982) 637–639, <http://dx.doi.org/10.1002/mus.880050808>.
- [65] D.N. Slater, J.C. Underwood, T.E. Durrant, T. Gray, L.P. Hopper, Aluminium hydroxide granulomas: light and electron microscopic studies and X-ray microanalysis, *Br. J. Dermatol.* 107 (1982) 103–108.
- [66] G.L. Morefield, A. Sokolovska, D. Jiang, H. HogenEsch, J.P. Robinson, S.L. Hem, Role of aluminium-containing adjuvants in antigen internalization by dendritic cells in vitro, *Vaccine* 23 (2005) 1588–1595, <http://dx.doi.org/10.1016/j.vaccine.2004.07.050>.
- [67] S. Sabella, R.P. Carney, V. Brunetti, M.A. Malvindi, N. Al-Juffali, G. Vecchio, S.M. Janes, O.M. Bakr, R. Cingolani, F. Stellacci, P.P. Pompa, A general mechanism for intracellular toxicity of metal-containing nanoparticles, *Nanoscale* 6 (2014) 7052–7061, <http://dx.doi.org/10.1039/c4nr01234h>.
- [68] D.W. Cain, S.E. Sanders, M.M. Cunningham, G. Kelseo, Disparate adjuvant properties among three formulations of "alum", *Vaccine* 31 (2013) 653–660, <http://dx.doi.org/10.1016/j.vaccine.2012.11.044>.
- [69] Z. Khan, C. Combadiere, F.-J. Authier, V. Itier, F. Lux, C. Exley, M. Mahrouf-Yorgov, X. Decroup, P. Moretto, O. Tillement, R.K. Gherardi, J. Cadusseau, Slow CCL2-dependent translocation of biopersistent particles from muscle to brain, *BMC Med.* 11 (2013) 99.
- [70] G. Crépeaux, H. Eidi, M.-O. David, E. Tzavara, B. Giros, C. Exley, P.A. Curmi, C.A. Shaw, R.K. Gherardi, J. Cadusseau, Highly delayed systemic translocation of aluminum-based adjuvant in CD1 mice following intramuscular injections, *J. Inorg. Biochem.* 152 (2015) 199–205, <http://dx.doi.org/10.1016/j.jinorgbio.2015.07.004>.
- [71] V.R. Walker, R.A. Sutton, O. Meirav, V. Sossi, R. Johnson, J. Klein, D. Fink, R. Middleton, Tissue disposition of 26aluminum in rats measured by accelerator mass spectrometry, *Clin. Invest. Med.* 17 (1994) 420–425.
- [72] Affsaps, Rapport d'expertise: Évaluation du risque lié à l'utilisation de l'aluminium dans les produits cosmétiques, http://ansm.sante.fr/var/ansm_site/storage/original/application/ad548a50ee74cc320c788ce8d11ba373.pdf, (2011).
- [73] R.J. Mitkus, D.B. King, M.A. Hess, R.A. Forshee, M.O. Walderhaug, Updated aluminum pharmacokinetics following infant exposures through diet and vaccination, *Vaccine* 29 (2011) 9538–9543, <http://dx.doi.org/10.1016/j.vaccine.2011.09.124>.
- [74] L.S. Keith, D.E. Jones, C.H.S.J. Chou, Aluminum toxicokinetics regarding infant diet and vaccinations, *Vaccine* 20 (Suppl. 3) (2002) S13–17.
- [75] T.Z. Movsas, N. Paneth, W. Rumbelha, J. Zyskowski, I.H. Gewolb, Effect of routine vaccination on aluminum and essential element levels in preterm infants, *JAMA Pediatr.* 167 (2013) 870–872.
- [76] ATSDR (Agency for Toxic Substances and Disease Registry), Toxicological Profile for Aluminum, Atlanta, GA, <https://www.atsdr.cdc.gov/toxprofiles/tp22.pdf>, (1999).
- [77] M.S. Golub, J.M. Donald, M.E. Gershwin, C.L. Keen, Effects of aluminum ingestion on spontaneous motor activity of mice, *Neurotoxicol. Teratol.* 11 (1989) 231–235.
- [78] Centers for Disease Control and Prevention (CDC), Recommended Immunization Schedule for Persons Aged 0 Through 18 Years, <https://www.cdc.gov/vaccines/schedules/hcp/imz/child-adolescent.html>, (2016).
- [79] ATSDR (Agency for Toxic Substances and Disease Registry), Toxicological Profile for Aluminum, Atlanta, GA, (2008) (cdcinfo@cdc.gov).
- [80] A. Miodovnik, Environmental neurotoxins and developing brain, *Mt Sinai J. Med.* 78 (2011) 58–77, <http://dx.doi.org/10.1002/msj.20237>.
- [81] N.D. Priest, The biological behaviour and bioavailability of aluminium in man, with special reference to studies employing aluminium-26 as a tracer: review and study update, *J. Environ. Monit.* 6 (2004) 375–403, <http://dx.doi.org/10.1039/b314329p>.
- [82] S. Sharif, S. Behzadi, S. Laurent, M.L. Forrest, P. Stroeve, M. Mahmoudi, Toxicity of nanomaterials, *Chem. Soc. Rev.* 41 (2012) 2323–2343, <http://dx.doi.org/10.1039/c1cs15188f>.
- [83] C.C. Willhite, N.A. Karyakina, R.A. Yokel, N. Yenugadhati, T.M. Wisniewski, I.M.F. Arnold, F. Momoli, D. Krewski, Systematic review of potential health risks posed by pharmaceutical, occupational and consumer exposures to metallic and nanoscale aluminum, aluminum oxides, aluminum hydroxide and its soluble salts, *Crit. Rev. Toxicol.* 44 (Suppl. 4) (2014) 1–80, <http://dx.doi.org/10.3109/10408444.2014.934439>.
- [84] G. Crépeaux, H. Eidi, M.-O. David, Y. Baba-Amer, E. Tzavara, B. Giros, F.-J. Authier, C. Exley, C.A. Shaw, J. Cadusseau, R.K. Gherardi, Non-linear dose-response of aluminium hydroxide adjuvant particles: selective low dose neurotoxicity, *Toxicology* 375 (2017) 48–57, <http://dx.doi.org/10.1016/j.tox.2016.11.018>.
- [85] M.S. Golub, S.L. Germann, Long-term consequences of developmental exposure to aluminum in a suboptimal diet for growth and behavior of Swiss Webster mice, *Neurotoxicol. Teratol.* 23 (2001) 365–372.
- [86] A. Bilkei-Gorzó, Neurotoxic effect of external aluminium, *Food Chem. Toxicol.* 31 (1993) 357–361.
- [87] P. Sethi, A. Jyoti, R. Singh, E. Hussain, D. Sharma, Aluminium-induced electrophysiological, biochemical and cognitive modifications in the hippocampus of aging rats, *Neurotoxicology* 29 (2008) 1069–1079, <http://dx.doi.org/10.1016/j.neuro.2008.08.005>.
- [88] P. Sethi, A. Jyoti, E. Hussain, D. Sharma, Curcumin attenuates aluminium-induced functional neurotoxicity in rats, *Pharmacol. Biochem. Behav.* 93 (2009) 31–39, <http://dx.doi.org/10.1016/j.pbb.2009.04.005>.
- [89] Z. Cao, X. Yang, H. Zhang, H. Wang, W. Huang, F. Xu, C. Zhuang, X. Wang, Y. Li, Aluminum chloride induces neuroinflammation, loss of neuronal dendritic spine and cognition impairment in developing rat, *Chemosphere* 151 (2016) 289–295, <http://dx.doi.org/10.1016/j.chemosphere.2016.02.092>.
- [90] S.H. Alawadi, E.S. El-Denshary, M.M. Safar, H. Eidi, M.-O. David, M.A. Abdel-Wahhab, Neuroprotective effect of nanodiamond in Alzheimer's disease rat model: a pivotal role for modulating NF-κB and STAT3 signaling, *Mol. Neurobiol.* (2016), <http://dx.doi.org/10.1007/s12035-016-9762-0>.
- [91] I.H. Borai, M.K. Ezz, M.Z. Rizk, H.F. Aly, M. El-Sherbiny, A.A. Matloub, G.I. Fouad, Therapeutic impact of grape leaves polyphenols on certain biochemical and neurological markers in Aβ(1–42)-induced Alzheimer's disease, *Biomed Pharmacother* 93 (2017 Sep) 837–851, <http://dx.doi.org/10.1016/j.biopha.2017.07.038>.
- [92] C.S. Martinez, C.D.C. Alterman, F.M. Peçanha, D.V. Vassallo, P.B. Mello-Carpes, M. Miguel, G.A. Wiggers, Aluminum exposure at human dietary levels for 60 days reaches a threshold sufficient to promote memory impairment in rats, *Neurotox. Res.* 31 (2017) 20–30, <http://dx.doi.org/10.1007/s12640-016-9656-y>.
- [93] R.K. Gherardi, H. Eidi, G. Crépeaux, F.J. Authier, J. Cadusseau, Biopersistence and brain translocation of aluminum adjuvants of vaccines, *Front. Neurol.* 6 (2015), <http://dx.doi.org/10.3389/fneur.2015.00004>.
- [94] C.A. Shaw, Y. Li, L. Tomljenovic, Administration of aluminium to neonatal mice in vaccine-relevant amounts is associated with adverse long term neurological outcomes, *J. Inorg. Biochem.* 128 (2013) 237–244, <http://dx.doi.org/10.1016/j.jinorgbio.2013.07.022>.

Publication 3 : Calcium phosphate: a substitute for aluminum adjuvants?

EXPERT REVIEW OF VACCINES, 2016
<http://dx.doi.org/10.1080/14760584.2017.1244484>



REVIEW

Calcium phosphate: a substitute for aluminum adjuvants?

Jean-Daniel Masson^a, Michel Thibaudon^b, Laurent Bélec^c and Guillemette Crépeaux^{d,e}

^aAssociation E3M (Entraide aux Malades de Myofasciite à Macrophages), Monprimblanc, France; ^bPharmacien « Service des Allergènes », de l'Institut Pasteur, Paris, France; ^cLaboratoire de Microbiologie, hôpital Européen Georges Pompidou, Assistance Publique-Hôpitaux de Paris, & Faculté de Médecine Paris Descartes, Université Paris Descartes, Sorbonne Paris Cité, Paris, France; ^dÉcole nationale vétérinaire d'Alfort, Maisons-Alfort, France; ^eInserm U955 E10, Université Paris Est Créteil, Créteil, France

ABSTRACT

Introduction: Calcium phosphate was used as an adjuvant in France in diphtheria, tetanus, pertussis and poliomyelitis vaccines. It was later completely substituted by alum salts in the late 80's, but it still remains as an approved adjuvant for the World Health Organization for human vaccination.

Area covered: Thus, calcium phosphate is now considered as one of the substances that could replace alum salts in vaccines. The aim of this paper is to draw a review of existing data on calcium phosphate as an adjuvant in order to bring out the strengths and weaknesses for its use on a large scale.

Expert commentary: Calcium phosphate is a compound naturally present in the organism, safe and already used in human vaccination. Beyond comparisons with the other adjuvants, calcium phosphate represents a good candidate to replace or to complete alum salts as a vaccine adjuvant.

ARTICLE HISTORY

Received 12 May 2016
 Accepted 30 September 2016
 Published online 25 October 2016

KEYWORDS

Vaccine; adjuvant; calcium phosphate; safety; immune response; aluminum salts

1. Introduction

Adjuvants used in vaccines can be defined as substances added to antigens to enhance immunity response to these antigens [1,2]. First pastorian vaccines, such as rabies vaccine, were developed at the end of the nineteenth century without adjuvants because they were designed from whole viruses or bacteria. The notion of adjuvant was developed at the beginning of the twentieth century when traditional technique failed to produce an efficient immunity response in horses with diphtheria and tetanus purified toxoids [3,4].

(Toxoid = toxin with intact immunogenic properties, but whose toxicity has been destroyed by heat or formaldehyde for example.)

Concomitantly, alum salts (aluminum hydroxide $\text{Al}(\text{OH})_3$ and aluminum phosphate AlPO_4) have shown their effectiveness to produce a quality immune response with the same toxoids as in horses. Indeed, the injection of alum potassium ($\text{KAl}(\text{SO}_4)_2$) with diphtheria toxoid produced higher plasma concentration of antitoxin than the same vaccine without alum [5].

The substantially equivalent result in humans explains that aluminum salts are now the most frequently used adjuvants although other substances such as oil in water emulsion, saponin, or polysaccharides have been developed too [4].

Adjuvants such as aluminum salts aim to improve the vaccine antibody response in order to make them more effective [3]. However, one should recall controversies on these adjuvants, notably the one dealing with hepatitis B and human papillomavirus vaccine, causing autoimmune or neurological diseases [6]. Among unusual reactions to vaccines

containing aluminum hydroxide, macrophagic myofasciitis is an inflammatory lesion described in 1998 [7] and recognized as a 'distinctive histopathological entity that may be caused by intramuscular injection of Al-containing vaccines' [8,9]. Diseases attributed to vaccines, quoted in this article, have in common the presence of neurological disorders. The neurotoxicity of aluminum is now well recognized, and the possible relationship between aluminum and chronic neurological diseases such as Alzheimer's disease has been the key issue of studies for many years [4,10,11].

The total safety of aluminum adjuvant for human use is still debated [12]. Many studies demonstrate the link between vaccinal aluminum and different diseases, but the French National Academy of Medicine has not admitted this relationship yet [4,13].

Nevertheless, the question of vaccine safety is of significant concern and associations of patients advocate, as a precaution measure, the substitution of Al-adjuvant by calcium phosphate, which is another adjuvant already used in human vaccination.

Calcium phosphate was initially developed by the Pasteur Institute in hydroxyapatite form ($\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$) although the patent describes it as the tricalcium phosphate form ($\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$) (see Section 2.1.) [14]. This adjuvant was used in diphtheria, tetanus, pertussis, and poliomyelitis vaccines [15–17]. The preparation method of this compound is detailed in Section 2.1. Although calcium phosphate was later substituted by alum salts in the late 1980s, when the industrial sectors of Pasteur Institute and Merieux Institute merged, it still remains as an approved adjuvant for the World Health Organization (WHO) for human vaccination.

CONTACT Guillemette Crépeaux ✉ guillemette.crepeaux@gmail.com ☎ Inserm U955 E10, Université Paris Est Créteil (UPEC), 8 rue du Général Sarrail, Créteil 94010, France

© 2016 Informa UK Limited, trading as Taylor & Francis Group

Thus, calcium phosphate is now considered as one of the substances that can replace the alum salts in vaccines [18,19]. The nonspecific use of calcium phosphate with any antigen has already been proposed but was never fully researched due to the success of the aluminum adjuvants [20].

However, since 1984, Pasteur Institute has marketed delayed-effect allergens adsorbed on calcium phosphate in order to highlight the delay effect of calcium phosphate and its immunogenic effect. As the use of allergens in specific desensitization required an increasing number of injections and since the only delayed-effect allergens were allergens on aluminum hydroxides (alum-pyridine or aluminum hydroxide *in situ*), Pasteur Institute then moved towards the only alternative to aluminum hydroxide: calcium phosphate [21].

Recent demands of associations of patients to use again calcium phosphate instead of vaccinal aluminum have revived studies on this molecule, but very few data are available in the scientific literature. Opinions differ about efficiency and innocuity of calcium phosphate adjuvants. In this context, we intend to draw a review of existing data on calcium phosphate as an adjuvant in order to bring out the strengths and weaknesses for its use on a large scale.

2. Adsorption capacity and adjuvanticity

In the lights of the currently available scientific literature, we should clearly define the concepts of adsorption capacity and antigenicity, which sometimes seem confused. We will therefore consider that adsorption capacity is the adjuvant capacity to adsorb a certain amount of antigen per unit of volume. Antigenicity is the capacity of an adjuvant to induce an adequate immune response to vaccination in terms of antibody blood concentration or titre. In other words, its capacity to present an antigen in an efficient manner to induce the optimal production of antibodies by the organism according to the initial antigen dose injected. This point was also fundamental in the choice of calcium phosphate as adjuvant adsorbed with allergens for specific desensitization [21].

2.1. Preparation and quality of calcium phosphate

Two preparation methods are possible to obtain vaccinal calcium phosphate. The first is the *in situ* co-precipitation with disodium hydrogen phosphate, calcium chloride, and antigen (gel form). The second is the direct adsorption onto a preformed gel (suspension form) [15,20,22–24]. The calcium phosphate gel form is prepared by contacting an antigen with an aqueous gel obtained through a reaction between an aqueous solution of dibasic sodium phosphate (Na_2HPO_4) and an aqueous solution of calcium chloride (CaCl_2). The calcium chloride solution is poured into the phosphate solution as rapidly as possible (within 3 min), in a proportion substantially equal to 1 mol of Na_2HPO_4 for 1 mol of CaCl_2 , stirring constantly. The mixture thus obtained is stirred on and on while its pH is adjusted to a value very near 7 with sodium hydroxide, and the gel formed is subsequently decanted and washed. The gel is composed of calcium and phosphate ions in proportions such that the ratio Ca/P is 1.62–

Table 1. Presentation of calcium phosphate compositions (formula, name, and Ca/P ratio).

Ca/P ratio	Formula	Name
0.5	$\text{Ca}(\text{H}_2\text{PO}_4)_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$	Monocalcium phosphate monohydrate
1.0	$\text{CaHPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	Hydrated calcium phosphate/brushite
1.0	CaHPO_4	Anhydrous calcium phosphate/monettite
1.33	$\text{Ca}_3\text{H}_2(\text{PO}_4)_6 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	Octacalcium phosphate
1.5	$\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$	Tricalcium phosphate/whitlockite
1.5	$\text{Ca}_9(\text{HPO}_4)(\text{PO}_4)_5(\text{OH})$	Calcium-deficient hydroxyapatite
1.67	$\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$	Hydroxyapatite
2.0	$\text{CaO} \cdot \text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$	Tetracalcium phosphate/hilgenstockite

1.85 and exhibits a settling rate of 1–20 mm in 10 min at 20°C when containing 0.07 atoms Ca per liter [14,17,22–24].

Calcium phosphate can be found in many forms presenting different Ca/P ratios (Table 1). The theoretical molecular composition of calcium phosphate used in vaccination is $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ [25], but in the filed patent, the ratio Ca/P is from 1.62 to 1.85, which approximates the ratio of hydroxyapatite ($\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$) [14]. Although the ratio Ca/P is not sufficient to define a compound, it seems that the calcium phosphate adjuvant is not chemical tricalcium phosphate ($\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$) as the name implies but hydroxyapatite (hereafter referred to as calcium phosphate) under different forms with different Ca/P ratios including the calcium-deficient (non-stoichiometric) hydroxyapatite ($\text{Ca}_9(\text{HPO}_4)(\text{PO}_4)_5(\text{OH})$) that have the same ratio Ca/P as tricalcium phosphate [26]. The presence of a hydroxyl group is important as compounds containing metallic hydroxyls exhibit a pH-dependent surface charge. In addition, adsorption of phosphorylated antigens by ligand exchange with surface hydroxyls may also occur, thus impacting on the adsorption capacity of the adjuvant [26–28].

The quality of the calcium phosphate gel depends on the concentration of the reactants and the rate at which the reactants are mixed. The best adjuvant quality was obtained in equimolar solution with a quick mixing (shorter than 3 min) [17]. Indeed, in the patent, the author observed that the very rapid addition of the calcium salt leads to a calcium phosphate compound that differs from brushite ($\text{CaHPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) and other forms [14]. Slow mixing of the reactants (longer than 3 min) results in a gel with a calcium-to-phosphorus ratio of 1.35–1.55, whereas quick mixing of the reactants (10 s) gives a calcium-to-phosphorus ratio of 1.83 (Table 2) [14,17].

The mixing rate of reactants also affects the physical characteristics and adsorption of antigens onto the gel. Calcium phosphate gel prepared by rapid pouring of calcium chloride into disodium hydrogen phosphate and mixing within 10 s results in a gel with a lower pH and that sediments more slowly than the calcium phosphate gel made by slow mixing

Table 2. Effect of reactant mixing time (equal volumes of 0.07 M disodium hydrogen phosphate and 0.07 M calcium chloride) on the chemical composition of calcium phosphate gel.

Reaction time ^a	Concentration (mg/mL) in				
	Reactants		Gel		Ca/P ratio
	Ca	P	Ca	P	
10 s	1.41	1.07	1.38	0.76	1.83
10 min	1.47	1.15	1.40	1.03	1.35
20 min	1.43	1.12	1.39	0.92	1.51
30 min	1.44	1.07	1.39	0.90	1.55

^aTime taken to pour calcium chloride into disodium hydrogen phosphate.

Table 3. Effect of reactant mixing time (equal volumes of 0.07 M disodium hydrogen phosphate and 0.07 M calcium chloride) on the physical characteristics of calcium phosphate gel.

Reaction time ^a	pH of gel	Height ^b (mm) of clear solution in					
		mL/L of NaOH to bring the pH to 6.85	5 min	10 min	20 min	75 min	17 h
10 s	5.7	14.8	2.5	3.8	6.3	21.2	85.0
10 min	6.5	1.2	48.0	82.0	92.0	100.0	105.0
20 min	6.0	7.0	48.0	83.0	91.0	95.0	105.0
30 min	6.1	5.2	57.0	89.0	95.0	105.0	109.0

^aTime taken to pour calcium chloride into disodium hydrogen phosphate.

^bHeight of clear liquid at top of gel in 125-mm-long tube containing 50 mL of gel, held at 20°C.

of reactants (≥ 10 min) (Table 3). Calcium phosphate adjuvant precipitated by rapid mixing adsorbed 100% of diphtheria toxoid, while the adjuvant produced by slow mixing only adsorbed 58% of the same dose of diphtheria toxoid [14,17,26]. Some authors suggested a method of preparation with established conditions to produce calcium phosphate gel with constant properties [20].

2.2. Adsorption capacity

The calcium phosphate adsorption capacity is dependent on many factors and involves several phenomena such as hydrogen bonds or electrostatic attractions [26,29]. pH plays a major role in the determination of this capacity although it should be close to a physiological value for human vaccination [17]. The point of zero charge (pH at which the surface charge of a molecule is nil) is 5.5 for calcium phosphate, 5 for aluminum phosphate, and 11.1 for aluminum hydroxide. The net surface charge or zeta potential is positive when the pH is below the point of zero charge or isoelectric point. Consequently, at physiological pH, commercial calcium phosphate and aluminum phosphate adjuvants exhibit a negative zeta potential, but aluminum hydroxide exhibits a positive zeta potential [26,30,31]. An isoelectric point also characterizes antigens. As a general guideline, for many antigens, adsorption is best accomplished in the pH interval between the isoelectric point of the antigen and the point of zero charge of the adjuvant [32]. The pH-dependent zeta potential suggests that calcium phosphate adjuvant can adsorb positively charged antigens at physiological pH by electrostatic attraction. The negative zeta potential of calcium phosphate explains the effective electrostatic adsorption of lysozyme. Indeed, lysozyme has an isoelectric point of 11 and has a positive surface charge at physiological pH [26]. In the same way, this explains why aluminum hydroxide is more efficient to adsorb diphtheria and tetanus toxoid having a respective isoelectric point at 4.1 and 5 [33,34].

However, zeta potential of calcium phosphate cannot explain the good adsorption of casein, which is also negatively charged at pH 7.4. Another bonding form between calcium phosphate and the antigen is possible in addition to electrostatic attractions. The hydroxyl group in commercial calcium phosphate adjuvant makes it a candidate to strongly adsorb phosphorylated antigens as the adsorption of phosphate anion by hydroxylated mineral surfaces occurs by ligand

exchange or hydrophobic attractive forces [28]. Previous studies on aluminum hydroxide adjuvant have demonstrated that phosphorylated proteins and antigens are adsorbed by ligand exchange too [35,36]. Adsorption capacity is greatly impacted by the presence of hydroxyl group on adjuvants. Indeed, it enables the adsorption of antigen with the same surface charge as the adjuvant. Moreover, this adsorption is strong, and it is not affected by pH variation [26].

The last factor influencing the adsorption capacity is the specific surface area. This parameter takes into account the shape and the size of adjuvant particles in order to determine the real surface in contrast with the apparent surface. Calcium phosphate, as aluminum hydroxide, can be found in particle form. But contrary to aluminum hydroxide, calcium phosphate, which is a main component of bone or teeth, is a biodegradable and biocompatible material. In fact, calcium phosphate has been shown to be degraded by macrophages [37]. As the particle size decreases, the specific surface area increases. For example, two tricalcium phosphate powders used as cement have been characterized. The first one has a median particle size of 10.88 μm and a specific surface area of 0.54 m^2/g , while the second one has a median particle size of 2.22 μm and a specific surface area of 2.73 m^2/g [38]. Nanoparticles are therefore the form that presents the highest specific surface area due to its very small size. Since the adsorption capacity increases like the specific surface area, hydroxyapatite nanoparticles are the calcium phosphate form with the best adsorption capacity [39].

Due to its zeta potential, the presence of a hydroxyl group, and its specific surface area, calcium phosphate presents an adsorption capacity equal or higher than aluminum hydroxide for ovalbumin and various fractions of snake venom [40,41]. To conclude, calcium phosphate can have a good adsorption capacity of positively charged and phosphorylated antigens, and it is a biodegradable and biocompatible adjuvant even at a nanoscale.

2.3. Antigenicity

The calcium phosphates antigenicity is a topic raising many questions, and it must be highlighted that properties of calcium phosphate required for the antigenicity have not been fully characterized yet. Previous studies showed diverging and random results depending on the biological model, the used antigen, and the form (suspension or gel; see Section 2.1.) of the preparation. It seems that the adjuvant adsorption capacity does not necessarily determine its antigenicity. Indeed, for a comparable adsorption rate in antigen of snake venom, calcium phosphate gel presents a greater antigenicity than aluminum hydroxide in mice, so antigenicity does not correlate only with adsorption capacity [41]. Suspension or gel form of calcium phosphate also would have a different antigenicity, and gel form seems to have a higher antigenicity [41,42]. This antigenicity difference could come from the different properties of the compounds. Indeed, it seems likely that gel type and suspension type are not caught in the same way by phagocytes which are the source of immunogenicity [42]. Moreover, this different way taken by the suspension form could cause troubles because if calcium phosphate suspension

replaces aluminum hydroxide in vaccine formulations at the same concentration, then the potency test might show that some lots of vaccine would fail to pass the test because of small lot-to-lot variations [33].

Recent studies have shown that the physicochemical properties of particles such as the size, shape, surface charge, and surface area are important parameters that influence the adsorption capacity, antigenicity, and innocuity (for advanced information, see [43]) [26,38]. Generally, particulates with a comparable size to pathogens such as virus are easily recognized and destroyed by dendritic cells or macrophages [44]. Small particles (20–200 nm) are preferentially caught via endocytosis by dendritic cells, and larger particles (<5 µm) are phagocytosed by macrophages, leading to efficient coadministered antigen presentation and subsequent adaptive immune response [45]. Comparison of six sizes of calcium phosphate particles from 40 nm to 5 µm in mice highlighted that particles of size from 100 to 400 nm present the greater antigenicity. However, we should be careful with the trials of size because it seems that an optimal size range exists for each particulate adjuvant [37]. Commercial calcium phosphate presents a mean particle size distribution of 9.2 µm to 905 nm [46]. Antigenicity is also impacted by the vaccination schedule and booster injection (an extra amount of vaccine that is later injected to maintain an adequate level of antibody). Indeed, in humans, if antibody production to diphtheria and tetanus toxoids measured after the first injection is more important with aluminum hydroxide than with tricalcium phosphate, the final antibody production measured after the booster is more important with tricalcium phosphate [24,47].

As suggested by their successful uses in the past, the antigenicity of calcium phosphate-based vaccines may be compatible with human vaccination. The use of allergens adsorbed on calcium phosphate during desensitization treatment showed excellent immunogenicity [48]. In humans, the calcium phosphate antigenicity calculated by serum antibody concentration is important for diphtheria, tetanus, poliomyelitis, pertussis vaccines, and five associations of these various vaccines. Moreover, post-vaccine reaction rates are low and often benign including allergic subjects to the vaccine antigens [49–51].

Without attempting to compare the antigenicity of calcium phosphate with alum salts, these studies demonstrate the effectiveness of calcium phosphate as adjuvant for mentioned vaccines. Calcium phosphate is therefore likely to be reused in human vaccination without discrimination of individuals allergic to toxoids.

Indeed, anti-polio vaccine based on calcium phosphate allows sustainable vaccination of total polio-unimmunized persons [50]. Furthermore, associations of antigens diphtheria, tetanus, pertussis, and polio, possible with calcium phosphate, have allowed the simplification of the vaccination schedule [49]. Rare and mild local reactions make that kind of vaccines well tolerated, including for persons previously allergic to antigens, for which vaccination was until contraindicated [50,51]. The generally lower antigenicity of calcium phosphate could be actually a reflection of its lower capacity adsorption than aluminum adjuvants with certain antigens and in certain preparation conditions [52]. Despite its lower antigenicity than

alum salts, calcium phosphate has demonstrated its effectiveness making it usable in vaccination [31,53].

On the other hand, it seems obvious for some authors that the improved vaccine safety comes at the expense of immunogenicity resulting from a compromise between antigenicity and safety [54,55]. The inflammatory or danger-signal model of adjuvant action implies that increased vaccine reactogenicity is the inevitable price for improved antigenicity. Hence, adjuvant reactogenicity may be avoidable only if it is possible to separate inflammation from adjuvant action [56]. This is an encouraging observation for the nanoparticulate calcium phosphate because inflammasome activation could not be required for its antigenicity [37]. Other factors such as the age of the vaccinated organism could play a role in vaccine and adjuvant effectiveness [57]. Similarly, data obtained using animal model may not always be reported to humans, as reflected in the saying that 'mice lie' [56]. Human trials would be more appropriate to provide information specifically about the ability of calcium phosphate to induce an appropriate immune response.

Under well-defined conditions, highly purified toxoids adsorbed on calcium phosphate gel produce a highly immunogenic vaccine to induce great immune response [1,20]. A study onto various allergens adsorbed on calcium phosphate (dust mites, pollens, and cat hairs) in both adults and children allowed a very good response at the level of desensitization and especially a lack of secondary reactions. Indeed, allergens adsorbed on calcium phosphate were considered safe and effective [21].

To conclude, antigenicity of calcium phosphate is size dependent, and the optimal size range would be 100–400 nm. The preparation form affects antigenicity, and the gel form should be preferentially used. Finally, beyond the comparison with alum salts, calcium phosphate has demonstrated its effectiveness for use in human vaccination although some additional analyses are needed.

3. Antigenicity, immunoglobulins, and antibody

3.1. Immunoglobulins and antibody

Immunoglobulin (Ig) and antitoxin production as antigenicity depends on many factors such as antigen, way of preparation, and particle size. Thus, tetanus toxoid adsorbed on calcium phosphate or aluminum hydroxide used in Guinea pigs showed that calcium phosphate is less efficient.

Indeed, the production of IgG 1a and 1b is lower with calcium phosphate compared to aluminum hydroxide [58]. However, the same tetanus toxoids or diphtheria toxoids adsorbed on tricalcium phosphate at higher concentration induce in both animals and humans similar or greater IgG production than what is induced by aluminum adjuvants, especially after the booster [29,47,59]. The use of different forms of calcium phosphate (hydroxyapatite, moneite, and tricalcium phosphate) at different doses makes complex the comparison of the results of these studies. It is difficult to say if the concentration or the type of compound is the most impacting on the antibody response, but both parameters must have an impact on this factor. As a natural constituent

of the human organism [15], calcium phosphate provides a slow release of adsorbed antigens at the injection site. This slow release induced high antibody production with calcium phosphate gel [41]. In humans, the concentration of anti-tetanus antibodies is equal after calcium phosphate or aluminum vaccine injection. On the other hand, 3.5 months after the booster, antibody concentration is much greater in people who have been vaccinated with calcium phosphate vaccines. Furthermore, the number of not reacting subjects after two injections is lower with calcium phosphate-based vaccines [24]. It was also possible to make successful multi-antigen vaccines on calcium phosphate (diphtheria, tetanus, polio, Bacille Calmette Guérin (BCG), yellow fever, and measles) as well as simultaneous injections, including a hepatitis B vaccine [17,60].

In addition, with the adjuvant concentration, animal model, antigen used, and others, an important factor can also operate to explain the difference of antibody production between studies, the particle size. As already mentioned in Section 2.3, small particles (20–200 nm) are preferentially caught via endocytosis by dendritic cells, and larger particles (<5 µm) are phagocytosed by macrophages, leading to efficient coadministered antigen presentation and subsequent adaptive immune response [45]. This size-dependent antigenicity has been shown by various particulates. Some adjuvants have a nanometric optimal size, and others have a micrometric optimal size, so it seems that an optimal size range exists for each particulate adjuvant. Calcium phosphate particles of 100–400 nm present the greater antibody production and the most virus neutralization for influenza in mice [37].

Although animal model results are divergent depending on antigen and adjuvant concentrations, human data suggest that calcium phosphate is an effective adjuvant and potentially more effective than alum after the booster. It has a reasonable capacity to adsorb antigens, induces high levels of IgG antibodies, and does not increase IgE production [15,17,61].

3.2. Immunoglobulin E

Vaccine adjuvants generally cause the preferential synthesis of one or more antigen group [62]. Calcium phosphate gel has a major advantage because it does not induce an increase of the rate of IgE during its use in booster in both human and animals, contrary to aluminum hydroxide [58,63,64].

The extended production of IgE could cause allergy in case of regular injections [58]. Calcium phosphate induces a very low IgE production probably because it is a natural constituent of the body [15]. The use of a higher concentration of calcium phosphate may also lead to the IgE production, but only at concentrations higher than those used for human vaccination [65].

Calcium phosphate formulation also plays a role in the IgE response. Used in humans or in mice, monetite (CaHPO₄) or tricalcium phosphate may induce low IgE levels like aluminum hydroxide in function of adsorbed antigen, while this effect is not found in Guinea pigs [47,59]. Tricalcium phosphate is defined by the authors as more effective but does not

represent a reliable alternative to aluminum hydroxide in terms of their comparable IgE production in study conditions [47,58].

In any event, the presence of specific IgE antibodies in human serum must be regarded as a potential negative effect which can appear also after booster immunization, especially for hyperimmunized and allergic persons [58]. Human IgE production is conditioned by a hereditary factor; however, many authors associate the increasing frequency of allergic diseases with the intensive mass immunization programs without regard for the possible mechanisms [66,67].

Indeed, the IgE presence in the body could stimulate an IgE response to other immunogens which come into contact with the immune system of the body at the same time. This might result in the development of an IgE response to different environmental antigens and in some cases lead to clinically manifested reactions of hypersensitivity [58], while the IgE production by aluminum vaccine has been known for a long time [68–71].

4. Innocuity

Like most adjuvants, calcium phosphate may cause small under-skin nodules, which can be palpable for 30 days after injections. These nodules then tend to be resorbed leaving a final scarry lesion with clumps of calcium deposit surrounded by a thin and mostly acellular fibrous layer [72–74]. However, the under-skin nodules may be avoided with deeper intramuscular injection [50].

It should be noted that calcium phosphate is a compound classified as safe and biocompatible by the FDA [39,75], due to its natural occurrence in the organism. While having similar properties with alum salts, calcium phosphate has the advantage that it is a natural compound to the human organism and may therefore be exceptionally well tolerated. Calcium phosphate particles are biodegradable material caught via endocytosis by macrophage or dendritic cells and degraded in lysosome [37,76]. Products of biodegradation (Ca²⁺ and PO₄³⁻) are also physiologically present in blood in relatively high concentrations [39,77,78]. Nonbiodegradable particles such as aluminum hydroxide, widely used for human vaccines, can be retained for a long time, raising the question of bio-persistence and biotranslocation, thus inducing potential toxicity (for review, see Gherardi et al. [79]). Thus, biodegradable particles are supposed to be less toxic than nonbiodegradable particles [80]. The excellent biocompatibility of calcium phosphate makes it a biomaterial used in orthopedics and dental prostheses [75].

4.1. Inflammatory reaction

The route of administration of vaccines, particularly those adsorbed onto mineral adjuvants such as calcium phosphates or alum salts, plays an important part to avoid adverse local reactions [81]. In subcutaneous injections, calcium phosphate induced active inflammation involving neutrophils and macrophages [42]. It should be noted that the subcutaneous way is now replaced by the intramuscular way because

subcutaneous injections induce nodules which are not observed when the vaccine is administered intramuscularly [50,81]. Used in Guinea pigs, intramuscular injections of calcium phosphate suspension cause histopathological effects similar to those of aluminum hydroxide [42]. However, the gel form causes more moderate reactions compared to the suspension form or to aluminum adjuvants [42,58]. It seems likely that gel form is not easily caught by phagocytes. This may explain the fact that the inflammation due to the suspension form is severer than that induced by the gel form.

The calcium phosphate gel inflammatory reaction does not last more than 4 weeks, contrary to the one induced by aluminum adjuvants that can last twice as long [42]. Some local reactions following vaccination, such as severe pain, while not directly damaging to physical health, may still have a strong negative impact on the public's perception of the risk-benefits of immunization and thus should be limited [56].

The shorter inflammatory reaction observed with calcium phosphate gel may be explained by an easier dissemination of calcium phosphate that is a natural constituent of the human body [15]. Unlike aluminum adjuvants, calcium phosphate is not toxic *in vitro* for macrophages at the concentration range used in vaccination [42,82].

This is an important point to consider calcium phosphate as an adjuvant for human vaccination and for specific immunity because the role of macrophages is recognized in the induction of immune response [62]. Moreover, the inflammatory reaction remains short even at high concentration of calcium phosphate [42]. This makes the use of calcium phosphate vaccine possible, even in case of overconcentration, a condition potentially required depending on the antigen used.

4.2. Antigen-adjuvant interaction and innocuity

Histological reactions are not equal in the presence of single adjuvant, single antigen, or combinations of both. Predicting the vaccine local reaction seems complicated as antigen adsorbed on calcium phosphate influences the overall safety of the vaccine.

For instance, in rabbits, when considered individually, calcium phosphate as in tetanus toxoid injection cause a moderate reaction with respective presence of a granuloma or vascular inflammation, which can cause small bruises. However, the combination of two molecules may induce an intense granulocytic reaction from the sixth hour accompanied by cytolysis of polynuclear leukocytes in the twenty-fourth hour.

The association of three antigens on calcium phosphate caused a relatively similar reaction to tetanus toxoid adsorbed alone on calcium phosphate in rabbits, but the addition of pertussis antigen caused a granulocytes influx to the third day, which may lead to a lesion similar to acute fibrinous inflammation [73].

Moreover, the vaccine preparation quality is crucial to ensure safety. Indeed, some of the local vaccine effects may directly reflect chemical irritation due to a non-physiological pH or osmolarity and salt concentrations toxic for cells [56].

4.3. Hemolytic activity

Calcium phosphate gel shows high hemolytic activity in human, mouse, sheep, and rabbit blood samples taken after vaccination. Indeed, analyses show a high rate of free hemoglobin, indicating the erythrocytes lysis *in vitro*. This activity is reduced by 50% when the adjuvant is used in suspension form [82].

The hemolytic effect is dose dependent and remains equal to the one induced by aluminum compounds at concentration less than 1.3 mg/mL of calcium, leading to the establishment of a superior limit of 1.3 mg of calcium phosphate per vaccine dose by the WHO and the European Pharmacopoeia [26,39,40,59].

If calcium phosphate concentration is higher than 1.3 mg, the hemolytic effect of calcium phosphate becomes higher than that produced by aluminum hydroxide probably because this concentration might disrupt the delicate chemical balance of the organism. However, it is possible to greatly reduce the calcium phosphate hemolytic effect by the addition of phosphate ions to the solution. This addition also decreases the adsorption capacity of the adjuvants [40,83]. However, adjustments of adjuvant and phosphate ions concentrations allow to obtain aluminum hydroxide and calcium phosphate solutions with the same adsorption capabilities and hemolytic effect [40].

It seems important to point out that these results come of *in vitro* experiments and that they are not unanimously accepted. Indeed, calcium phosphate, while exhibiting a proved hemolytic activity, is not designed, as an adjuvant, to be injected into vascular vessels but intramuscularly or subcutaneously injected, thus leading to consider that kind of data as invalid from a clinical point of view [84]. It therefore seems important to respect strictly intramuscular injection mode to avoid hemolytic reaction at the injection site [84]. This example perfectly illustrates the fact that available safety data on a vaccine are strictly specific to the vaccine and its way of administration [19].

4.4. Nano-particular form and innocuity

Recent studies present data on the safety of calcium phosphate nanoparticles. Keeping in mind that this specific form does not probably have the same characteristics as microparticles, we wanted to add recent data to the present review.

Among adjuvant developments, many researches now focus on nanoparticle compounds. Indeed, their small size provides a high surface area to volume ratios [39]. Apart from its excellent storage stability, cold preparation, and relatively inexpensive development, calcium phosphate nanoparticles have positive characteristics in all areas studied [85,86].

In mice, calcium phosphate nanoparticles with herpes or Epstein-Barr viruses induce a sustainable total IgG, IgG2a, and IgA production without producing IgE. No inflammation evidence at the injection sites and no sign of toxicity have been shown in this study [85-87]. In studies on cultured fish, bird, and human cells, this nanoparticle adjuvant was readily absorbed and dissolved in lysosomes prior to being evacuated out of the cells [86,88-90].

It was suggested to develop a single-dose vaccine with sustained-release capabilities [85]. This form is effective for vaccination through mucosal way (intranasally and intravaginally), allowing systemic vaccination [85,87].

Alum salts selectively stimulate humoral immune responses, especially type-2 helper (Th2) immune responses, which are characterized by the production of interleukin (IL)-4 and IL-5 and the induction of IgE and IgG1 [91–93]. Calcium phosphate nanoparticles exist as rod shaped and sphere shaped. Rod-shaped one can induce both cellular immune response (development of T lymphocytes) by type-1 helper (Th1) way and humoral immune response by Th2 way [37,94,95]. Microparticle-sized adjuvants may not be able to induce the same response due to a greater size [87,96–99]. Nanoparticle adjuvants also allow the optimization of a selective cell response for the antigen release [39,100].

However, in mice, a comparison of two tetanus vaccines based on calcium or aluminum phosphate nanoparticle allowed to highlight the presence of histological lesions in brain, kidney, liver, and injected muscle. These lesions included hepatocellular necrosis infiltrated by mononuclear cells, hydropic degeneration, and appearance of Küppfer cells. They are generally less acute with the calcium phosphate except for muscle damage showing signs of hemorrhage [101].

The nanoparticle compounds are currently too new to ensure a sufficient view on their safety. These compounds, unlike the microparticle form, have higher permeability through cell membranes and thus influence the physiology of most cells and translocation to other distant organs [101,102]. This high membrane permeability requires further studies to bring out the advantages and disadvantages for vaccination [101,103,104].

4.5. Old studies, *in situ* data

The interest for calcium phosphate greatly decreased after discontinuation of its use in the 1980s, and thus, research on this molecule was progressively reduced. At present, there are only a few studies on the safety of calcium phosphate microparticles used as adjuvant, and the most recent was published at the end of the 1990s [42]. To the best of our knowledge, calcium phosphate does not seem to show evidence of any activity likely to cause allergic problems or reactions, making it incompatible with its use for human or animal vaccination. On the contrary, calcium phosphate seems to be very well tolerated [17,25,42,51,58,105,106].

Furthermore, calcium phosphate was used in France until the mid-1980s, mainly for the diphtheria–pertussis–tetanus vaccine group, without any mention of adverse reactions by physicians. It has been successfully used in the pentavalent human vaccination (smallpox, yellow fever, measles, BCG, and tetanus), without any reported adverse reaction [60].

According to several authors, calcium phosphate is a natural constituent of the human organism, thus providing a greater guarantee for the absence of adverse effects, and may be considered as safer than aluminum hydroxide [107]. Other authors recognize that an ascertained safety profile makes it interesting for the evaluation of new vaccines, but keeping in mind that as with adjuvanticity, studies conducted

on animals to test the safety of vaccines and of their adjuvants do not guarantee that they are a perfect reflection of the human situation and would thus require new studies [31,56].

5. Perspectives

Within the scientific literature on the calcium phosphate as a vaccine adjuvant, some publications highlight several perspectives for its use, potentially deserving further investigations.

In the 1990s, calcium phosphate was studied for the development of an anti-HIV vaccine in rabbits [108]. Thanks to the adsorption of the HIV-1 gp160 antigen on calcium phosphate gel [25], the final vaccine allowed a good immune response in rabbits. Although not leading to the production of anti-HIV vaccine in humans, these studies highlighted the calcium phosphate capabilities as adjuvant for the development of future promising vaccines [108,109].

Calcium phosphate has been the subject of recent research for the development of new vaccines. Another study shows the possible use of calcium phosphate in the hepatitis B DNA vaccine development on murine model [83]. This vaccine induces protective humoral- (through antibodies) and cell-mediated immune responses (through CD8 T lymphocytes) [83].

Calcium phosphate nanoparticles remain a development requiring further research. Indeed, this new formulation may present several advantages such as the adsorption capacity, duration of the immune response, and induction of cellular response or mucosal immunity, but their different adverse effects are not fully characterized or understood [39,85,87,89].

Finally, in association with mesoporous silica, calcium phosphate has been studied to develop a cancer vaccine on murine model [110]. Cancer vaccines allow the activation of immune cells, which specifically recognize and destroy tumor cells without harming normal cells. The use of cancer vaccines attempts to harness the specific power of the immune system for cancer treatment. The crucial point for cancer vaccines is the inclusion of an appropriate adjuvant [111]. In this role, the combination of mesoporous silica with calcium phosphate or Zn- and Mg-tricalcium phosphates allows a higher potent systemic antitumor immunity, which inhibits the growth of tumor both *in vitro* and *in vivo* [110,111].

In addition, since the end of the 1990s, the allergens adsorbed on the Pasteur Institute calcium phosphate were taken over by the Stallergènes laboratory and are still very widely disseminated at the international level, such as in some specific desensitization treatments by Stallergènes-Greer.

6. Expert commentary

Before considering a compound for use as an adjuvant in human vaccines, it is necessary to consider several factors, mainly to determine experimentally if the preparation is suitable and safe. These factors include safety by tests of acute and chronic toxicity, local and general tolerance teratogenicity, biodegradability, carcinogenicity or co-carcinogenicity, the degree of immunopotentiality, unacceptable or pharmacologic adverse effects, and the definition of action [62]. Calcium phosphate has successfully passed these various tests including high efficiency in terms of concentration of

Table 4. Summary of advantages and disadvantages of the use of calcium phosphate (CaP) as an adjuvant in human vaccines.

Advantages	Disadvantages
<ul style="list-style-type: none"> • CaP was used as an adjuvant up to 1985; data are available to use it again in a fast but not expensive way compared to the development of new adjuvants • CaP is present in the general monographic on human vaccines of the European Pharmacopoeia 8.0 • CaP is classified as safe and biocompatible by the US FDA • CaP is a natural compound of the human body, thus suggesting its good tolerance for individuals • Adsorption capability is equivalent to aluminum adjuvants, depending on preparation mode, considered antigens, and particle size • Booster antigenicity is potentially better than with aluminum adjuvants • CaP is used in allergic desensitization • CaP does not induce immunoglobulin E production that may cause an allergic reaction • Inflammatory reaction is moderate and shorter with CaP than with aluminum adjuvants • CaP does not lead to macrophagic toxicity • Good tolerance of CaP is highlighted by the lack of negative return during its commercial use 	<ul style="list-style-type: none"> • Several forms of preparations exist: suspension and gel form (the suspension form does not appear suited for vaccinal use), micro- and nano-metric size, some formulation (see Table 1), and sphere shape or rod shape • Sensitivity of the quality of the gel form depends on the conditions of preparation • Global primo-injection antigenicity is weaker than with aluminum adjuvants • Due to severe hemolytic effect with intravascular injection, intramuscular injection is imperative

circulating antibody, which allowed its use in several human vaccines for 20 years [1,4].

In the development of novel adjuvants for vaccination, several tracks are promising but represent expensive and long-lasting research. The immediate use of calcium phosphate is therefore desirable because the information collected for human vaccination has demonstrated that its use is possible. The lack of data on this molecule does not allow a strict conclusion about its safety. However, the available human data suggest an adequate ability of calcium phosphate to produce an effective immune response with diphtheria, tetanus, polio, and pertussis antigens in certain defined conditions [25]. Calcium phosphate is a compound naturally present in the organism, characterized as safe by the FDA. To the best of our knowledge, no study has revealed adverse effects when used under clinical conditions; thus, no reason seems to justify the sidelining of this adjuvant in human vaccination for cited antigens. This is confirmed by its use in specific desensitization for more than 30 years.

To conclude, beyond the knowledge of differences between calcium phosphate and aluminum salts, and comparisons to determine if calcium phosphate is more or less efficient than aluminum salts, we showed in this review that calcium phosphate and specially the hydroxyapatite form represents a good candidate to replace or to complete alum salts as a vaccine adjuvant (Table 4). The calcium phosphate use as nonspecific adjuvant for other antigens should be subjected to further research, focusing particularly on the response of the compound gel form that has already been used in humans. This compound is present in the International Pharmacopoeia and is part of the additives approved by the WHO. It is also mentioned as a possible adjuvant in the European Pharmacopoeia. In addition, the president of French Technical Committee of Vaccinations admitted that calcium phosphate is as effective as aluminum. Finally, the patent of calcium phosphate is now in the public domain, making it accessible for further utilization in different future vaccines.

7. Five-year view

Research on calcium phosphate should be resumed. In the next 5 years, studies and clinical trials necessary for the

calcium phosphate reuse in human vaccination could be completed. This would offer a greater range of vaccines. This wider range would enable patients to choose an adjuvant. Patients who do not want to be vaccinated with aluminum adjuvants would thus have access to immunization with calcium phosphate, thus ensuring a great vaccinal coverage.

Key issues

- Calcium phosphate was used as a vaccine adjuvant.
- It was replaced by aluminum salts at the end of 80's.
- Aluminum salts raise safety questions.
- Calcium phosphate can be as effective as aluminum salts.
- It is a natural compound of the human body.
- Human data highlight the good tolerance of calcium phosphate.
- The widespread use of calcium phosphate requires further studies.

Acknowledgments

We are grateful to E & R Jandot for their careful revision and critical comments on this paper.

Funding

This work has been carried out with E3M association with the financial support of Mutuelle Familiale.

Declaration of interest

The authors have no relevant affiliations or financial involvement with any organization or entity with a financial interest in or financial conflict with the subject matter or materials discussed in the manuscript. This includes employment, consultancies, honoraria, stock ownership or options, expert testimony, grants or patents received or pending, or royalties.

Documentary research methodology

The aim of this study has been to make an international state of the art about the use of calcium phosphate as an adjuvant in vaccine. Exhaustive documentary research has been conducted in order to establish a

quantitative and qualitative usable data assessment. All published data concerning advantages and disadvantages of the use of calcium phosphate have been sought. Points of View or recommendations on the inclusion of the calcium phosphate in vaccines or more broadly on the adjuvant safety have been identified. Documentary sources database, grey literature, relevant internet sites as well as (French) regulatory information have been sorted, assessed and interviewed in a systematic way. The recommendations, meta-analysis and systematic reviews have been sought in Medline from key words: ('Adjuvants, Immunologic'[Mesh] OR Adjuvant*) And (vaccine* OR immunol*)(title) then scientific publications on the use of calcium phosphate as adjuvant from key words: 'Calcium phosphate' [Supplementary Concept] OR 'Calcium Compounds'[Mesh] OR 'Calcium Phosphates'[Mesh] OR calcium phosphate Or CaP Field: Title AND ('Adjuvants, Immunologic'[Mesh] or adjuvant* Field: Title). 160 references, with various quality and relevance, have been obtained on the basis of this research and a hundred of them have proved workable.

References

Papers of special note have been highlighted as either of interest (*) or of considerable interest (**) to readers.

- Relyveld EH, Levaditi J-C, Ravisse P. Adjuvants minéraux. *Médecine Mal Infect.* 1978;8:494–499.
- De Souza Apostólico J, Lunardelli VAS, Coirada FC, et al. Adjuvants: classification, modus operandi, and licensing. *J Immunol Res.* 2016;2016:1459394.
- Ramon G. Sur l'augmentation anormale de l'antitoxine chez les chevaux producteurs de sérum antidiphthériques. *Bull Soc Cent Med Vet.* 1925;101:227–234.
- Bégué P, Girard M, Bazin H, et al. Les adjuvants vaccinaux: quelle actualité en 2012? *Bull Acad Natle Med.* 2012;196:1177–1181.
- Glenny AT, Pope CG, Waddington H, et al. Immunological notes. XVII–XXIV. *J Pathol Bacteriol.* 1926;29:31–40.
- Tomljenovic L, Shaw CA. Aluminum vaccine adjuvants: are they safe? *Curr Med Chem.* 2011;18:2630–2637.
- Gherardi RK, Coquet M, Cherin P, et al. Macrophagic myofasciitis: an emerging entity. *The Lancet.* 1998;352:347–352.
- World Health Organization. Macrophagic myofasciitis and aluminum-containing vaccines. *Wkly Epidemiol Rec.* 1999;74:338–340.
- Exley C, Swarbrick L, Gherardi RK, et al. A role for the body burden of aluminium in vaccine-associated macrophagic myofasciitis and chronic fatigue syndrome. *Med Hypotheses.* 2009;72:135–139.
- Exley C. Human exposure to aluminium. *Environ Sci Process Impacts.* 2013;15:1807–1816.
- Exley C. Why industry propaganda and political interference cannot disguise the inevitable role played by human exposure to aluminium in neurodegenerative diseases, including Alzheimer's disease. *Front Neurol.* 2014;5:212.
- Aprile MA, Wardlaw AC. Aluminium compounds as adjuvants for vaccines and toxoids in man: a review. *Can J Public Health.* 1966;57:343–360.
- Exley C. What is the risk of aluminium as a neurotoxin? *Expert Rev Neurother.* 2014;14:589–591.
- Relyveld EH. Calcium phosphate gel for adsorbing vaccines. 4016252. 1977.
- Relyveld EH, Henocq E, Raynaud M. Etude de la vaccination anti-diphthérique de sujets allergiques, avec une anatoxine pure adsorbée sur phosphate de calcium. *Bull World Health Organ.* 1964;30:321.
- Coursaget P, Yvonne B, Relyveld EH, et al. Simultaneous administration of diphtheria-tetanus-pertussis-polio and hepatitis B vaccines in a simplified immunization program: immune response to diphtheria toxoid, tetanus toxoid, pertussis, and hepatitis B surface antigen. *Infect Immun.* 1986;51:784–787.
- Gupta RK, Rost BE, Relyveld E, et al. Adjuvant properties of aluminium and calcium compounds. *Pharm Biotechnol.* 1995;6:229–248.
- ** This book chapter explains two different ways of preparation of calcium phosphate and discusses the different properties of obtained adjuvant.**
- Moulin A-M. L'Aventure de la vaccination. Paris: Fayard; 1996.
- Sesardic D, Rijpkema S, Patel BP. New adjuvants: EU regulatory developments. *Expert Rev Vaccines.* 2007;6:849–861.
- Relyveld EH, Raynaud M. Etudes sur le phosphate de calcium comme adjuvant de l'immunité. *Int. Symp. Adjuv. Immun., vol. 6, Karger Heidelberg.* New York; 1967. p. 77–78.
- Lecadet A, Ickovic MR, Thibaudon M. Specific desensitization with allergen extracts absorbed on calcium phosphate (Pasteur Institute). Clinical and biological study apropos of 107 cases. *Allerg Immunol (Leipz).* 1988;20:153–155.
- Relyveld EH. Etudes sur la toxine et l'antitoxine diphthériques et la réaction toxine-antitoxine (Thèse Paris). Paris: Editions scientifiques Hermann; 1958.
- Raynaud M, Relyveld EH, Turpin A, et al. Preparation of highly purified diphtheric, tetanic & staphylococccic anatoxins absorbed on calcium phosphate (brushite). *Ann Inst Pasteur.* 1959;96:60–71.
- ** This article is the first presentation of preparation mode of calcium phosphate for adjuvant use.**
- Relyveld E, Bengounia A, Huet M, et al. Antibody response of pregnant women to two different adsorbed tetanus toxoids. *Vaccine.* 1991;9:369–372.
- Relyveld EH. Preparation and use of calcium phosphate adsorbed vaccines. *Dev Biol Stand.* 1986;65:131–136.
- Jiang D, Premachandra GS, Johnston C, et al. Structure and adsorption properties of commercial calcium phosphate adjuvant. *Vaccine.* 2004;23:693–698.
- Dixon JB, Weed SB. Minerals in soil environments. Madison, WI: Soil Science Society of America (SSSA); 1989.
- Bleam WF, Pfeffer PE, Goldberg S, et al. A phosphorus-31 solid-state nuclear magnetic resonance study of phosphate adsorption at the boehmite/aqueous solution interface. *Langmuir.* 1991;7:1702–1712.
- Seeber SJ, White JL, Hem SL. Predicting the adsorption of proteins by aluminium-containing adjuvants. *Vaccine.* 1991;9:201–203.
- Al-Shakhshir R, Regnier F, White JL, et al. Effect of protein adsorption on the surface charge characteristics of aluminium-containing adjuvants. *Vaccine.* 1994;12:472–474.
- Singh M, Ugozzoli M, Kazzaz J, et al. A preliminary evaluation of alternative adjuvants to alum using a range of established and new generation vaccine antigens. *Vaccine.* 2006;24:1680–1686.
- Lindblad EB. Aluminium compounds for use in vaccines. *Immunol Cell Biol.* 2004;82:497–505.
- Aggerbeck H, Heron I. Adjuvanticity of aluminium hydroxide and calcium phosphate in diphtheria-tetanus vaccines—I. *Vaccine.* 1995;13:1360–1365.
- Sivananda N, Sundaran B. Studies on adsorption of diphtheria toxoid on aluminium phosphate gel. *Indian J Sci Technol.* 2010;3:248–249.
- Iyer S, HogenEsch H, Hem SL. Effect of the degree of phosphate substitution in aluminum hydroxide adjuvant on the adsorption of phosphorylated proteins. *Pharm Dev Technol.* 2003;8:81–86.
- Iyer S, Robinett RSR, HogenEsch H, et al. Mechanism of adsorption of hepatitis B surface antigen by aluminum hydroxide adjuvant. *Vaccine.* 2004;22:1475–1479.
- Hayashi M, Aoshi T, Kogai Y, et al. Optimization of physiological properties of hydroxyapatite as a vaccine adjuvant. *Vaccine.* 2016;34:306–312.
- Ginebra MP, Driessens FCM, Planell JA. Effect of the particle size on the micro and nanostructural features of a calcium phosphate cement: a kinetic analysis. *Biomaterials.* 2004;25:3453–3462.
- Rivera Gil P, Hühn D, Del Mercato LL, et al. Nanopharmacy: inorganic nanoscale devices as vectors and active compounds. *Pharmacol Res.* 2010;62:115–125.
- Kato H, Shibano M, Saito T, et al. Relationship between hemolytic activity and adsorption capacity of aluminum hydroxide and calcium phosphate as immunological adjuvants for biologicals. *Microbiol Immunol.* 1994;38:543–548.
- Olmedo H, Herrera M, Rojas L, et al. Comparison of the adjuvant activity of aluminum hydroxide and calcium phosphate on the

- antibody response towards Bothrops asper snake venom. *J Immunotoxicol.* 2014;11:44–49.
- **This article highlights the good adsorption capacity of calcium phosphate for several fraction of snake venom. In this study, venom adsorbed on calcium phosphate induced a high antibody response.**
42. Goto N, Kato H, Maeyama J, et al. Local tissue irritating effects and adjuvant activities of calcium phosphate and aluminium hydroxide with different physical properties. *Vaccine.* 1997;15:1364–1371.
- **This article presents the irritating effect of aluminum hydroxide and calcium phosphate adjuvant to local tissue. The more interesting result is the duration of inflammatory reaction twice as short with the calcium phosphate as aluminum hydroxide.**
43. Kuroda E, Coban C, Ishii KJ. Particulate adjuvant and innate immunity: past achievements, present findings, and future prospects. *Int Rev Immunol.* 2013;32:209–220.
44. Zhao L, Seth A, Wibowo N, et al. Nanoparticle vaccines. *Vaccine.* 2014;32:327–337.
45. Shah RR, O'Hagan DT, Amiji MM, et al. The impact of size on particulate vaccine adjuvants. *Nanomed.* 2014;9:2671–2681.
46. Ibrahim-Saeed M, Omar AR, Hussein MZ, et al. Systemic antibody response to nano-size calcium phosphate biocompatible adjuvant adsorbed HEV-71 killed vaccine. *Clin Exp Vaccine Res.* 2015;4:88–98.
47. Aggerbeck H, Fengler C, Heron I. Booster vaccination against diphtheria and tetanus in man. Comparison of calcium phosphate and aluminium hydroxide as adjuvants–II. *Vaccine.* 1995;13:1366–1374.
48. Donat N, Thibaudon M, Peltre G, et al. Desensitization for 4 successive years using calcium phosphate-adsorbed pollen extracts: study of sera with RAST and PRIST immunoinprints. *Allerg Immunol (Leipzig).* 1986;18:24–31.
49. Martin R, Relyveld EH, Raynaud M, et al. Immunizing strength and tolerance by the human organism of vaccines adsorbed on calcium phosphate. *Presse Médicale.* 1969;77:341–344.
50. Relyveld EH, Martin R, Raynaud M, et al. Calcium phosphate as adjuvant in vaccinations in man. *Ann Inst Pasteur.* 1969;116:300–326.
51. Relyveld EH, Martin R, Raynaud M, et al. Vaccination with calcium phosphate adsorbed antigens. *Prog Immunobiol Stand.* 1970;4:540–547.
52. Edelman R. Vaccine adjuvants. *Rev Infect Dis.* 1980;2:370–383.
53. Wack A, Baudner BC, Hilbert AK, et al. Combination adjuvants for the induction of potent, long-lasting antibody and T-cell responses to influenza vaccine in mice. *Vaccine.* 2008;26:552–561.
54. Gupta RK, Relyveld EH, Lindblad EB, et al. Adjuvants a balance between toxicity and adjuvanticity. *Vaccine.* 1993;11:293–306.
55. Poolman JT. Shortcomings of pertussis vaccines: why we need a third generation vaccine. *Expert Rev Vaccines.* 2014;13:1159–1162.
56. Petrovsky N. Comparative safety of vaccine adjuvants: a summary of current evidence and future needs. *Drug Saf.* 2015;38:1059–1074.
57. Mastelic B, Ahmed S, Egan WM, et al. Mode of action of adjuvants: implications for vaccine safety and design. *Biologicals.* 2010;38:594–601.
58. Vassilev TL. Aluminium phosphate but not calcium phosphate stimulates the specific IgE response in guinea pigs to tetanus toxoid. *Allergy.* 1978;33:155–159.
- **This comparison of aluminum phosphate and calcium phosphate antigenicities demonstrates that booster immunization with aluminum but not calcium phosphate-adsorbed toxoid leads to a prolonged synthesis of specific IgE. This article is an extension of older study mentioned.**
59. Gupta RK, Siber GR. Comparison of adjuvant activities of aluminium phosphate, calcium phosphate and stearyl tyrosine for tetanus toxoid. *Biol J Int Assoc Biol Stand.* 1994;22:53–63.
60. Gateff C, Relyveld EH, Le Gonidec G, et al. Study of a new pentavalent vaccine combination. *Ann Microbiol (Paris).* 1973;124:387–409.
61. Petrovsky N, Aguilar JC. Vaccine adjuvants: current state and future trends. *Immunol Cell Biol.* 2004;82:488–496.
62. Organisation Mondiale de la Santé. Adjuvants de l'immunité. *Sér Rapp Tech.* 1976;595:43.
63. Relyveld EH, Lavergne M, De Rudder J. Titers of immunoglobulins (IgG, IgA, IgM, and IgE) after antigenic stimulation in European and African subjects. *Dev Biol Stand.* 1974;27:79–90.
64. Ickovic MR, Relyveld EH, Hénocq E, et al. Calcium-phosphate-adjuvanted allergens: total and specific IgE levels before and after immunotherapy with house dust and Dermatophagoides pteronyssinus extracts. *Ann Immunol.* 1983;134D:385–398.
65. Parish WE. Homologous serum passive cutaneous anaphylaxis in Guinea pigs mediated by two $\gamma 1$ or $\gamma 1$ -type heat-stable globulins and a non- $\gamma 1$ heat-labile reagin. *J Immunol.* 1970;105:1296–1298.
66. Relyveld EH. Immunoglobulins and reaginic activity. *Rev Fr Allergol.* 1969;9:219–232.
67. Hubscher T. Immune and biochemical mechanisms in the allergic disease of the upper respiratory tract; role of antibodies, target cells, mediators and eosinophils. *Ann Allergy.* 1977;38:83–90.
68. Kishimoto T, Ishizaka K. Regulation of antibody response in vitro. VII. Enhancing soluble factors for IgG and IgE antibody response. *J Immunol Baltim Md* 1950. 1973;111:1194–1205.
69. Nagel J, Svec D, Waters T, et al. IgE synthesis in man. I. Development of specific IgE antibodies after immunization with tetanus-diphtheria (Td) toxoids. *J Immunol Baltim Md* 1950. 1977;118:334–341.
70. Mitani S, Yamamoto A, Ikegami H, et al. Immunoglobulin E-suppressing and immunoglobulin G-enhancing tetanus toxoid prepared by conjugation with pullulan. *Infect Immun.* 1982;36:971–976.
71. Cogné M, Ballet JJ, Schmitt C, et al. Total and IgE antibody levels following booster immunization with aluminum adsorbed and non-adsorbed tetanus toxoid in humans. *Ann Allergy.* 1985;54:148–151.
72. Balouet G, Levaditi JC, Relyveld E. Le granulome immunogène: histopathologie expérimentale des lésions liées à des injections vaccinales associées à divers adjuvants de l'immunité. *Bull Inst Pasteur.* 1975;73:383–409.
73. Balouet G, Baret M, Relyveld E, et al. Role of antigens and adjuvant substances in the histological response in experimental granulomas (immunogenic granuloma). *Ann Anat Pathol (Paris).* 1977;22:159–170.
74. Levaditi JC, Relyveld E. Local tolerance of vaccines adsorbed on immuno-stimulating substances. *Sem Hôp Ther.* 1975;51:117–118.
75. Dorozhkin SV, Epple M. Biological and medical significance of calcium phosphates. *Angew Chem Int Ed.* 2002;41:3130–3146.
76. Jarcho M. Calcium phosphate ceramics as hard tissue prosthetics. *Clin Orthop.* 1981;157:259–278.
77. Alberts B, Johnson A, Lewis J, et al. *Molecular biology of the cell.* 4th ed. New York: Garland Science; 2002.
78. Wang S, McDonnell EH, Sedor FA, et al. pH effects on measurements of ionized calcium and ionized magnesium in blood. *Arch Pathol Lab Med.* 2002;126:947–950.
79. Gherardi RK, Eidi H, Crépeaux G, et al. Biopersistence and brain translocation of aluminum adjuvants of vaccines. *Front Neurol.* 2015;6:4.
80. Ahmed KK, Geary SM, Salem AK. Applying biodegradable particles to enhance cancer vaccine efficacy. *Immunol Res.* 2014;59:220–228.
81. Relyveld EH, Bizzini B, Gupta RK. Rational approaches to reduce adverse reactions in man to vaccines containing tetanus and diphtheria toxoids. *Vaccine.* 1998;16:1016–1023.
82. Goto N, Kato H, Maeyama J, et al. Studies on the toxicities of aluminium hydroxide and calcium phosphate as immunological adjuvants for vaccines. *Vaccine.* 1993;11:914–918.
- **This study highlights the interest of calcium phosphate because of the absence of toxic effects on macrophages.**
83. Wang S, Liu X, Fisher K, et al. Enhanced type I immune response to a hepatitis B DNA vaccine by formulation with calcium- or aluminium phosphate. *Vaccine.* 2000;18:1227–1235.
84. Léry L. Haemolytic activity of calcium phosphate adjuvant. *Vaccine.* 1994;12:475.
85. He Q, Mitchell AR, Johnson SL, et al. Calcium phosphate nanoparticle adjuvant. *Clin Diagn Lab Immunol.* 2000;7:899–903.

86. Koppad S, Raj GD, Gopinath VP, et al. Calcium phosphate coupled Newcastle disease vaccine elicits humoral and cell mediated immune responses in chickens. *Res Vet Sci*. 2011;91:384–390.
87. He Q, Mitchell A, Morcol T, et al. Calcium phosphate nanoparticles induce mucosal immunity and protection against herpes simplex virus type 2. *Clin Diagn Lab Immunol*. 2002;9:1021–1024.
88. Neumann S, Kovtun A, Dietzel ID, et al. The use of size-defined DNA-functionalized calcium phosphate nanoparticles to minimise intracellular calcium disturbance during transfection. *Biomaterials*. 2009;30:6794–6802.
89. Behera T, Swain P. Antigen adsorbed calcium phosphate nanoparticles stimulate both innate and adaptive immune response in fish, *Labeo rohita* H. *Cell Immunol*. 2011;271:350–359.
90. Viswanathan K, Gopinath VP, Raj GD. Formulation of Newcastle disease virus coupled calcium phosphate nanoparticles: an effective strategy for ocular delivery to chicken. *Colloids Surf B Biointerfaces*. 2014;116:9–16.
91. Gupta RK. Aluminum compounds as vaccine adjuvants. *Adv Drug Deliv Rev*. 1998;32:155–172.
92. Aimaniananda V, Haensler J, Lacroix-Desmazes S, et al. Novel cellular and molecular mechanisms of induction of immune responses by aluminum adjuvants. *Trends Pharmacol Sci*. 2009;30:287–295.
93. Marrack P, McKee AS, Munks MW. Towards an understanding of the adjuvant action of aluminium. *Nat Rev Immunol*. 2009;9:287–293.
94. Wang X, Li X, Ito A, et al. Rod-shaped and substituted hydroxyapatite nanoparticles stimulating type 1 and 2 cytokine secretion. *Colloids Surf B Biointerfaces*. 2016;139:10–16.
95. Wang X, Li X, Ito A, et al. Rod-shaped and fluorine-substituted hydroxyapatite free of molecular immunopotentiators stimulates anti-cancer immunity in vivo. *Chem Commun Camb Engl*. 2016;52:7078–7081.
96. Sokolova V, Knuschke T, Buer J, et al. Quantitative determination of the composition of multi-shell calcium phosphate-oligonucleotide nanoparticles and their application for the activation of dendritic cells. *Acta Biomater*. 2011;7:4029–4036.
97. Knuschke T, Epple M, Westendorf AM. The type of adjuvant strongly influences the T-cell response during nanoparticle-based immunization. *Hum Vaccines Immunother*. 2014;10:164–169.
98. Zhou W, Mogueche AO, Chiu D, et al. Just-in-time vaccines: biomimetic calcium phosphate core-immunogen shell nanoparticles induce long-lasting CD8(+) T cell responses in mice. *Nanomed Nanotechnol Biol Med*. 2014;10:571–578.
99. Jones S, Asokanathan C, Kmiec D, et al. Protein coated microcrystals formulated with model antigens and modified with calcium phosphate exhibit enhanced phagocytosis and immunogenicity. *Vaccine*. 2014;32:4234–4242.
100. Jilek S, Merkle HP, Walter E. DNA-loaded biodegradable microparticles as vaccine delivery systems and their interaction with dendritic cells. *Adv Drug Deliv Rev*. 2005;57:377–390.
101. Issa AM, Salim MS, Zidan H, et al. Evaluation of the effects of aluminum phosphate and calcium phosphate nanoparticles as adjuvants in vaccinated mice. *Int J Chem Eng Appl*. 2014;5:367–373.
102. Muddana HS, Morgan TT, Adair JH, et al. Photophysics of Cy3-encapsulated calcium phosphate nanoparticles. *Nano Lett*. 2009;9:1559–1566.
103. Oberdörster E. Manufactured nanomaterials (fullerenes, C60) induce oxidative stress in the brain of juvenile largemouth bass. *Environ Health Perspect*. 2004;112:1058–1062.
104. Tamuly S, Saxena MK. Preparation of calcium phosphate nanoparticles and evaluation of their effects on muscle cells of rat. *Curr Sci*. 2012;102:610–612.
105. Relyveld EH, Raynaud M, Martin R, et al. Tolerance in humans of pertussis vaccines adsorbed onto calcium phosphate. *Symp Ser Immunobiol Stand*. 1970;13:171–179.
106. Sureau P, Fabre PS, N'Garou SB, et al. Vaccination simultanée de nourrissons en milieu tropical contre le tétanos et la poliomyélite. *Bull World Health Organ*. 1977;55:739.
107. McLachlan DR, Lukiw WJ, Kruck TP. New evidence for an active role of aluminum in Alzheimer's disease. *Can J Neurol Sci J Can Sci Neurol*. 1989;16:490–497.
108. Relyveld E, Chermann JC. Humoral response in rabbits immunized with calcium phosphate adjuvanted HIV-1 gp160 antigen. *Biomed Pharmacother Bioméd Pharmacothér*. 1994;48:79–83.
109. Relyveld E, Bizzini B. Production in rabbits of high levels of anti-HIV-1 gp160 antibodies. *Cell Mol Biol Noisy-Gd Fr*. 1995;41:389–393.
110. Li X, Wang X, Sogo Y, et al. Mesoporous silica-calcium phosphate-tuberculin purified protein derivative composites as an effective adjuvant for cancer immunotherapy. *Adv Healthc Mater*. 2013;2:863–871.
111. Wang X, Li X, Onuma K, et al. Zn- and Mg- containing tricalcium phosphates-based adjuvants for cancer immunotherapy. *Sci Rep*. 2013;3:2203.

ANNEXES

A.1. Aspect sociétal et réflexion autour des adjuvants aluminiques.

Afin de compléter la section Contexte et problématique de ce manuscrit de thèse et de faire le lien entre l'aspect scientifique abordé ici et l'aspect sociétal, il semble intéressant de développer quelques notions fréquemment abordées par les médias. Dans un contexte global où la désinformation est de plus en plus décriée, il est en effet important de replacer les connaissances scientifiques actuelles dans un contexte sociétal.

Les notions développées ici ne cherchent en aucune façon à alimenter la polémique sur la vaccination. Son but est d'apporter des réponses argumentées à la lumière des connaissances scientifiques actuelles en réponse aux principaux arguments avancés comme preuve de l'innocuité des adjuvants aluminiques et justifiant leur utilisation en médecine humaine. S'il est aisé pour le grand public de tomber dans un extrême anti-vaccin, il ne faut pas non plus appliquer la logique inverse et faire confiance aveuglément. N'oublions pas que « Douter de tout ou tout croire sont deux solutions également commodes, qui l'une et l'autre nous dispensent de réfléchir. » (Henri Poincaré).

A.1.1. Le choix de la vaccination

Ce chapitre est des plus à propos dans la situation pandémique liée au Covid 19 et à son variant delta, en particulier en France, après que le président de la République a annoncé le 12 juillet 2021 son intention de rendre obligatoire la vaccination contre le SARS-CoV-2 pour les professionnels au contact des personnes vulnérables. Ce manuscrit ne traite cependant pas du sujet Covid 19 bien que plusieurs éléments développés dans la suite de ce chapitre soient applicables dans un cadre plus large que celui des vaccins aluminiques.

Dès son obligation pour les enfants au Royaume-Uni en 1853, le vaccin contre la variole qui ne deviendra obligatoire en France qu'en 1902, suscite une virulente vague de contestation. Certains ne veulent pas être vaccinés par choix éclairé, par idéologie ou par peur de réaction indésirable, entre autre (Yaqub *et al.*, 2014). En 1898 l'introduction dans la loi britannique, d'une « clause de conscience » autorise les réfractaires à se soustraire à la vaccination. Ce débat, toujours d'actualité, entre les partisans de la liberté vaccinale et les adeptes de la couverture maximale ne sera peut-être jamais tranché (Bazin, 2008).

En France, la lutte contre l'obligation vaccinale s'appuie souvent sur l'article L1111-4 du code de la santé publique français concernant les droits des patients et stipulant qu' « aucun acte médical ni aucun traitement ne peut être pratiqué sans le consentement libre et éclairé de la personne et ce consentement peut être retiré à tout moment. » (legifrance.gouv.fr, 2002). L'obligation vaccinale peut donc, à juste titre, être perçue comme une atteinte à cette liberté de consentement éclairé. Cependant, cet article stipule également, que « dans le cas où le refus d'un traitement par la personne titulaire de l'autorité parentale ou par le tuteur risque d'entraîner des conséquences graves pour la santé du mineur ou du majeur sous tutelle, le médecin délivre les soins indispensables. ». Le médecin est donc garant de la prise de décision

concernant la vaccination des mineurs en vertu de son expertise en matière de santé. De plus, l'article conclut par « *les dispositions du présent article s'appliquent sans préjudice des dispositions particulières relatives au consentement de la personne pour certaines catégories de soins ou d'interventions.* ». Or, jusqu'au 1^{er} janvier 2018 les vaccins faisaient partie de ces catégories définies par l'article L3116-4 du même code : « *le refus de se soumettre ou de soumettre ceux sur lesquels on exerce l'autorité parentale ou dont on assure la tutelle aux obligations de vaccination prévues ou la volonté d'en entraver l'exécution sont punis de six mois d'emprisonnement et de 3750 Euros d'amende.* » (legifrance.gouv.fr, 2007). Cette condamnation pénale a cependant été abrogée par la loi du 30 décembre 2017 rendant obligatoire les 11 vaccins présentés **Tableau 49** pour les enfants nés après le 1^{er} janvier 2018. La France impose donc aujourd'hui de faire vacciner les enfants avec 11 vaccins mais autorise les parents à se soustraire à cette obligation avec pour « seule » conséquence que les enfants non vaccinés se verront refuser l'accès aux crèches, écoles, colonies ou autres collectivités.

Le discours pro-vaccinal met généralement en avant le taux de couverture vaccinale pour convaincre de l'importance de la vaccination en plus de la protection individuelle contre les maladies visées par les vaccins. Ce taux mesure la proportion de personnes vaccinées dans une population à un moment donné et permet aux pouvoirs publics d'analyser l'application d'un programme de vaccination (Santé publique France, 2018). Ce taux est un indice primordial pour estimer la protection d'une population face à une maladie infectieuse. En effet, pour empêcher une maladie de se répandre dans une population, il faut qu'un certain pourcentage de personnes au sein de cette population soit vacciné afin que les personnes non vaccinées et donc sensibles, soient suffisamment éloignées les unes des autres pour ne pas se transmettre la maladie depuis le patient zéro. Plus une maladie est contagieuse, plus le nombre de personnes vaccinées devra être important pour protéger ceux qui ne le sont pas : c'est l'immunité de groupe (John & Samuel, 2000). Cette notion explique clairement que le choix de se faire vacciner ou non n'a pas uniquement un impact sur sa propre santé mais également sur la santé globale de la population à laquelle le décisionnaire appartient en empêchant, ou non, la propagation de maladies vers d'autres personnes non vaccinées ou vers des personnes plus fragiles comme les personnes âgées, les femmes enceintes ou les jeunes enfants.

En France, jusqu'au 1^{er} janvier 2018, les trois vaccins obligatoires pour les enfants étaient dirigés contre le tétanos, la diphtérie et la poliomyélite. Les 8 autres vaccins présents dans le **Tableau 49** étaient alors recommandés mais pas obligatoires, bien qu'appliqués par les parents à plus de 70 % (Solidarites-sante.gouv.fr, 2019). Cependant, selon le même procédé que pour les vaccins DTPolio sans A1 (E3M, 2015b), le vaccin trivalent seul était en rupture de stock depuis janvier 2015, obligeant les patients à choisir des vaccins multivalents contenant jusqu'à trois valences supplémentaires (coqueluche, haemophilus influenza B et hépatite B) qui étaient recommandées mais pas obligatoires. Or, selon les données émanant du conseil d'état, le 8 février 2017, après que « *plusieurs dizaines de personnes ont demandé au ministre chargé de la santé de prendre les mesures permettant de rendre disponibles des vaccins correspondant uniquement aux trois obligations de vaccinations* », le conseil d'état et la juridiction administrative ont jugé que si la loi n'imposait que trois valences, il devait être

possible de s’y conformer (conseil-etat.fr, 2017). Cette décision laissait donc 6 mois au gouvernement pour prendre les mesures nécessaires à la remise sur le marché d’un vaccin DTPolio seul.

La réponse du ministère des solidarités et de la santé s’est présentée sous la forme d’un projet de loi datant d’octobre 2017 suivi d’un décret d’application du 25 janvier 2018 (legifrance.gouv.fr, 2018). Ce décret a fait passer le nombre de vaccins obligatoires de 3 à 11 (**Tableau 49**), englobant ainsi les 8 vaccins recommandés et soustrayant le gouvernement à son obligation de remise sur le marché du DTPolio seul puisque le vaccin hexavalent DTPolio, coqueluche, hépatite B, *haemophilus influenzae* B permettait maintenant de répondre à l’obligation vaccinale française. Officiellement, le gouvernement, qui n’avait aucun moyen de pression sur les industries pharmaceutiques pour le retour d’un vaccin trivalent, souhaitait par cette mesure forte permettre de faire remonter la couverture vaccinale insuffisante pour les maladies contre lesquelles les vaccins étaient jusqu’alors recommandés mais pas obligatoires. Face à la recrudescence de maladies comme la rougeole ou la méningite, la Ministre de la santé de l’époque a fait de l’amélioration de la couverture vaccinale sur les 8 maladies introduites dans la nouvelle obligation vaccinale, une priorité de santé publique (Solidarites-sante.gouv.fr, 2019).

Tableau 49 : Vaccinations obligatoires sur la première année pour les nourrissons nés à partir du 1er janvier 2018

Âge (mois)	2	4	5	11	12
Diphthérie, Tétanos, Poliomyélite, Coqueluche acellulaire, haemophilus influenzae B Hépatite B *	X	X		X	
Pneumocoque *	X	X		X	
Méningocoque C *			X		X
Rougeole-Oreillons-Rubéole					X

* vaccins contenant un adjuvant aluminique (oxy-hydroxyde d’Al et/ou phosphate d’Al)

Notons cependant que les pays nordiques (Suède, Finlande et Pays-Bas) qui ne possèdent aucune obligation vaccinale, disposent d’un taux de couverture vaccinale excellent pour tous les vaccins, protégeant ainsi la population contre les épidémies (vaccination-info-service.fr, 2018b). Il ne semble donc pas nécessaire de rendre obligatoire la vaccination pour que le taux de couverture vaccinale soit apte à protéger la population. Une enquête récente sur la défiance vaccinale en France démontre que la plupart des personnes ne sont pas opposées à la vaccination mais demeurent inquiètes quant aux risques d’effets indésirables notamment dus aux adjuvants (Caudal *et al.*, 2020). Cette étude rapporte une demande citoyenne vers plus d’informations scientifiques objectives et une plus grande transparence sur la composition des vaccins, leur efficacité et leurs effets indésirables.

A.1.2. La garantie de la sécurité

Une nouvelle catégorie de personnes vient aujourd'hui s'ajouter aux anti-vaccins refusant catégoriquement la vaccination et aux pro-vaccins convaincus par les bienfaits d'une vaccination globale sans aucune remise en question : les critiques, dont le slogan pourrait être « *Vaccinons nous, oui mais pas n'importe comment !* ». Ces personnes bienveillantes envers la vaccination et généralement vaccinées, ne souhaitent en aucun cas abroger la vaccination mais se posent des questions sur les composés utilisés et regrettent le manque d'informations disponibles pour trancher, notamment sur l'efficacité exacte des vaccins, et sur la garantie de sécurité de leurs composants. Généralement cataloguées comme étant anti-vaccins par les personnes ne souhaitant pas se poser de questions et par celles que ces questions dérangent, les questions posées n'en sont pas moins pertinentes, en particulier sur les adjuvants. En effet, de façon surprenante, les adjuvants aluminiques n'ont fait l'objet d'aucune investigation expérimentale officielle à ce jour, et ceci malgré la neurotoxicité bien établie de l'Al. L'OMS signalait d'ailleurs en 2004 que « *l'innocuité des adjuvants est un domaine important et négligé. Dans la mesure où les adjuvants ont leurs propres propriétés pharmacologiques susceptibles de modifier l'immunogénicité et la sécurité des vaccins, l'évaluation de leur innocuité est indispensable.* » (World Health Organization, 2004). Pour sa part, l'Académie Nationale de Pharmacie, « est favorable à ce que des travaux expérimentaux rigoureux soient réalisés pour tenter d'évaluer la réalité de la responsabilité des adjuvants aluminiques dans les manifestations cliniques observées » (Académie nationale de Pharmacie, 2016). Ces études sur l'innocuité des adjuvants aluminiques seraient menées en tenant compte d'un ensemble de paramètres jusqu'ici peu étudiés, pouvant contribuer à l'apparition d'un risque éventuel.

Contrairement aux médicaments conventionnels, les vaccins sont administrés à des sujets sains qu'il faut convaincre de leur utilité et de leur innocuité. Dans ce contexte, et avant même la crise sanitaire débutée en 2020, la question vaccinale était devenue une question sociétale majeure, ce qui a conduit à la mise en place d'une concertation citoyenne nationale sur la vaccination, présidée par Alain Fischer (DILA (Direction de l'information légale et administrative), 2016). Selon les conclusions de son rapport final rendues le 30 novembre 2016, plusieurs facteurs contribuent à la défiance vis-à-vis de la vaccination, «*notamment* :

- *Les soupçons de collusion entre autorités de santé et industrie du médicament sous l'effet de scandales médiatisés ;*
- *La disparition de nombreuses maladies infectieuses qui interroge sur le bien-fondé de poursuivre la vaccination ;*
- *La question des adjuvants dans les vaccins ;*
- *La position des médecins qui se plaignent d'un déficit de formation pour convaincre des patients réticents ;*
- *La complexité du parcours de vaccination (obligation d'une ordonnance médicale, achat en pharmacie du vaccin, puis vaccination médicale, etc.) ;*
- *Le manque d'information des médecins sur le statut vaccinal de leurs patients (carnets perdus ou non présentés) ;*

- *Les crises sanitaires (Médiator, sang contaminé, etc.) et l'insuffisante réactivité des réponses et de l'engagement des pouvoirs publics qui ont laissé le champ libre à la propagande anti-vaccinale.*” (DILA (Direction de l'information légale et administrative), 2016).

Au cœur du débat sur la sécurité des vaccins se trouvent donc les adjuvants, composés essentiels pour une immunisation forte et durable. La controverse s'est essentiellement concentrée sur les sels d'Al et s'est traduite par diverses actions menées par les associations de patients (E3M, 2015c; REVAHB, 2016), la publication d'ouvrages pour le grand public, soit critiques (Gherardi, 2016) soit rassurants (Sansone, 2017), la tenue de blogs scientifiques (Vaccine papers, 2015), la rédaction de rapports techniques institutionnels (InVS-AFSSA-AFSSAPS, 2003; Bégué *et al.*, 2012; Haut Conseil de Santé Publique, 2013), et la tenue de réunions de réflexion d'initiative parlementaire (Assemblée Nationale, 2012; OPECST, 2014b). Si le principe même de la vaccination n'a jamais été remis en cause au cours de ces échanges, le degré exact de sécurité des vaccins contenant de l'Al est resté l'objet d'un disensus persistant. Signalons d'autre part qu'aucun adjuvant aluminique n'a été approuvé pour l'injection IM ou SC chez l'homme puisque les adjuvants ne sont approuvés qu'en tant que part de la préparation vaccinale et que cette préparation est utilisée comme placebo dans les essais sur l'innocuité des vaccins, garantissant de fait l'approbation clinique de nombreux vaccins (Shardlow, Mold & Exley, 2018). Les études comparant la survenue d'effets secondaires des vaccins à de réels placebos sont rares. Une étude en double aveugle portant sur le vaccin anti-H1N1 a recensé les effets secondaires survenus à la suite d'une injection de placebo, de vaccin total ou d'antigènes à différentes doses. Si le placebo, dépourvu d'antigènes et d'adjuvant, présente tout de même un taux d'apparition d'effets indésirables non négligeable de l'ordre de 16 %, ce taux augmente à 30 % en présence d'antigènes seuls et atteint 41 % si l'antigène est couplé à un adjuvant. Avec une dose d'antigène inférieure, le taux d'effets secondaires recensé est de 10 % avec l'antigène seul contre 28 % quand l'Al est présent (Liang *et al.*, 2010). Bien que les auteurs ne communiquent pas sur cet aspect de leur travail, le triplement de l'incidence des effets adverses des vaccins en présence d'Al semble démontrer que l'utilisation de vrais placebos rendrait bien plus compliquée l'approbation de l'Al pour une utilisation vaccinale.

La survenue de douleurs musculaires et articulaires, d'une fatigue chronique et de troubles neurologiques postérieurement à de multiples injections de vaccins aluminiques, contre l'hépatite B, le tétanos et le papilloma virus humain (HPV) notamment, a été rapportée dans de nombreux pays : Australie (Richards *et al.*, 2012), Canada (CMAJ, 1993; Jastaniah *et al.*, 2003), Danemark (Brinth *et al.*, 2015; Brinth, 2015), France (Gherardi *et al.*, 2001a; Authier *et al.*, 2003; Bonnefont-Rousselot *et al.*, 2004), Grande Bretagne (Exley *et al.*, 2009; Shivane *et al.*, 2012), Italie (Palmieri *et al.*, 2016), Israël (Agmon-Levin *et al.*, 2014b), Japon (Kinoshita *et al.*, 2014; Hotta *et al.*, 2016), Mexique (Martínez-Lavín, Martínez-Martínez & Reyes-Loyola, 2015), Portugal (Santiago *et al.*, 2015), et USA (Blitshteyn, 2014). Néanmoins, au-delà de l'association temporelle, l'existence d'un lien de causalité reste une question non résolue, ni dans un sens ni dans l'autre. Pour la vaccination contre le HPV par exemple, le risque de survenue des symptômes sus-cités, pouvant participer à l'une ou

plusieurs entités cliniques (Brinth, 2015) – Encéphalomyélite myalgique ou syndrome de fatigue chronique (EM/SFC), syndrome douloureux régional (SDR), syndrome de tachycardie posturale orthostatique (STPO) – émerge au plan épidémiologique (Chandler *et al.*, 2017). Une étude transversale systématique de 12 études publiées a montré un sur-risque de niveau modéré dans le groupe vacciné contre le HPV mais cette information doit tenir compte de l'utilisation quasi-systématique de groupes contrôles ayant reçu des adjuvants aluminiques, sous la forme d'un placebo contenant l'adjuvant ou, plus rarement, du vaccin contre l'hépatite A (soit 11 des 12 publications analysées, regroupant 29533 des 29600 patientes étudiées) (Gonçalves *et al.*, 2014). Passant outre ce biais majeur mis en lumière dans la littérature scientifique (Exley, 2011), l'EMA a émis un avis négatif sur l'existence d'une association (European Medicines Agency, 2015). Des études pharmaco-épidémiologiques sont apparemment allées dans le même sens (Zureik *et al.*, 2015; Scheller *et al.*, 2015), mais, uniquement attachées à l'étude des grandes maladies auto-immunes spécifiques, elles ont exclu de leurs investigations les syndromes de EM/SFC, SDR et STPO ne permettant pas de conclure. La décision de l'EMA a provoqué une forte réaction de mécontentement et l'engagement de poursuites par la Cochrane Nordic (Gøtzsche *et al.*, 2016). La question de l'existence d'un lien de causalité, et donc d'un authentique syndrome des adjuvants (Gherardi, 2003; Shoenfeld & Agmon-Levin, 2011), ne sera peut-être jamais tranché par les approches épidémiologiques (Petrovsky, 2015b). Les performances de l'épidémiologie en matière de lien de causalité sont en effet notoirement limitées comme on peut le concevoir pour des effets multi systémiques à plus ou moins long terme de faibles doses cumulatives administrées dans un contexte d'expositions multiples. A défaut, le débat ne peut être éclairé qu'en établissant l'existence, ou non, d'un lien de causalité plausible sur le plan biologique.

A.1.3. Vaccination et économie

La réticence plus ou moins marquée de la population face aux vaccins et aux adjuvants apparaît alors qu'une politique mondiale d'expansion des approches vaccinales est menée par l'OMS qui annonçait en 2012 l'élaboration de plus de 120 nouveaux vaccins, avant même la nécessité d'en développer d'autres pour endiguer la pandémie de Covid 19 (Kaddar, 2012). Cette crise sanitaire sans précédent a, en effet, créé une véritable course au vaccin pour la gestion de la pandémie. L'OMS prévoit une croissance annuelle de 20 % du marché des vaccins, pour un chiffre d'affaire passé de 5 à 43 milliards de dollars entre 2000 et 2016 et annoncé à plus de 100 milliards en 2025, sans prendre en compte les vaccins dirigés contre le SARS-CoV-2 (Kaddar, 2012).

Cette rentabilité économique de la vaccination est en partie assurée par les adjuvants car « *L'utilisation d'un adjuvant permet de réduire la quantité d'antigène par dose de vaccin tout en conservant une réponse vaccinale optimale et ainsi de produire davantage de doses dans un rapport qui peut aller de 1 à 2 à 1 à 4 pour une même quantité globale d'antigène disponible.* » (Agence nationale de sécurité du médicament et des produits de santé (ANSM), 2009).

Plus explicitement, les adjuvants, au-delà de leur rôle d'aide, peuvent également être utilisés pour réduire la quantité d'antigène nécessaire dans un vaccin sans changer la réponse vaccinale produite. Or le composé le plus onéreux des vaccins est justement l'antigène et l'utilisation d'adjuvant permet donc de réelles économies au vu de la quantité de doses produites annuellement. Dans ces conditions, il n'est donc pas étonnant que l'obligation vaccinale engendre le doute quant à une politique du profit au détriment de la santé publique (Belle, 2010).

A.1.4. Communication médiatique

A.1.4.1. Les adjuvants « *ne sont pas nocifs* »

Les organismes sanitaires sont unanimes quant à l'innocuité des adjuvants Al alors que les scientifiques et une partie de la population se posent des questions quant à leur pharmacocinétique et à leur potentielle toxicité une fois injectés, notamment durant le développement d'individus immatures dans le cas des vaccins pédiatriques. Selon ces organismes, l'innocuité de l'Al vaccinal a été démontrée par de nombreuses recherches et études scientifiques. Ainsi, Madame la Ministre de la santé, a déclaré à la première séance de l'Assemblée Nationale du 26 juillet 2017 « *Vous me demandez si nous pouvons trouver des adjuvants moins nocifs ; mais ils ne sont pas nocifs pour la santé, ainsi que tous les rapports le montrent.* », « *Je vous renvoie notamment à l'excellent rapport de l'Organisation mondiale de la santé publié en 2003 et à toutes les études scientifiques. Nous sommes dans l'irrationnel le plus total. Nous travaillons aujourd'hui à lutter contre les réseaux sociaux et contre la désinformation.* » (Assemblée Nationale, 2017). Des propos similaires ont par ailleurs été

tenus par Mr le Ministre de la santé sur le plateau de BFM TV lors de la soirée spéciale du 7 janvier 2021 « *les sels d'aluminium... je ne crois pas du tout que les adjuvants soient dangereux, ça a été montré que ça ne l'était pas. Peu importe... y'a des gens qui se sont mis en tête que ça l'était, et c'est leur droit* » (BFM TV, 2021).

Cependant, « *toutes les études scientifiques* » citées sont au nombre de deux, l'étude de Keith *et al.*, 2002 et sa mise à jour, Mitkus *et al.*, 2011, dont les biais ont été exposés dans le chapitre I.3. de la section Contexte et problématique. Ces études théoriques, produites à la demande de la FDA par Mitkus *et al.*, 2011, et bien que cette administration considère aujourd'hui cette étude comme obsolète, sont la référence pour l'OMS, le Center for Disease Control and Prevention (CDC) américain ou pour le vaccine knowledge project de la prestigieuse université d'Oxford (World Health Organization, 2012; Oxford vaccine group, 2019; Centers for Disease Control, 2019).

De plus, le rapport de l'OMS de 2003 évoqué par Madame la Ministre de la santé reste introuvable contrairement à un rapport de 2004 évoquant le fait que « *l'innocuité des adjuvants est un domaine important et négligé. Dans la mesure où les adjuvants ont leurs propres propriétés pharmacologiques susceptibles de modifier l'immunogénicité et la sécurité des vaccins, l'évaluation de leur innocuité est indispensable.* » (World Health Organization, 2004). Finalement, le manque d'études démontrant indiscutablement la toxicité de l'Al vaccinal semble plus être le fait d'une absence de recherches en ce sens qu'une réelle absence de risque.

A.1.4.2. L'Al est commun dans notre environnement

Le caractère commun de l'Al dans notre environnement pourrait laisser présager de son innocuité, aussi il est facile de penser que l'Al vaccinal ne peut pas être néfaste pour la santé au regard de la dose infime injectée en comparaison avec les doses d'Al quotidiennement absorbées par la nourriture, les boissons ou l'exposition environnementale. La dose d'Al injectée est en effet très faible et toujours en deçà des doses maximales autorisées par l'OMS. Ces doses à ne pas dépasser ont été extrapolées à partir d'études dans lesquelles la voie d'exposition est la voie orale, puisque l'ingestion est la principale source de contamination à l'Al en termes de quantité.

a) *Ingestion et injection : une comparaison incorrecte*

Il existe en effet une grande différence entre l'Al ingéré et l'Al injecté (McFarland *et al.*, 2020). L'Al alimentaire est, pour un individu adulte sain, éliminé à 99,7 % dans les selles car la barrière intestinale mature est assez hermétique (**Figure 56**). Les enfants, principaux sujets de la vaccination, présentent néanmoins une barrière intestinale immature pouvant laisser passer jusqu'à 10 fois plus de métaux que la barrière mature (Calabrese, 1978). 0,3 % de l'Al ingéré peut donc être absorbé sous forme atomique dans la circulation sanguine, puis les reins vont filtrer environ 80 % de l'Al soluble (Al^{3+}) qui sera éliminé dans les urines (Fatemi, Kadir & Moore, 1991; Priest *et al.*, 1995). Ce taux d'élimination n'est également valable que chez l'adulte sain car le nourrisson possède une fonction rénale immature qui ne sera donc pas en mesure d'éliminer aussi efficacement l'Al sanguin soluble (Heilbron *et al.*, 1991). Sur la totalité de l'Al ingéré, seul 0,06 % sera donc retenu et distribué dans l'ensemble de l'organisme avec une fixation préférentielle pour la matrice extracellulaire osseuse mais aussi dans les reins, la rate, la thyroïde et parathyroïde ou encore le cerveau. Au niveau cérébral, les dépôts d'Al observés restent majoritairement extracellulaires (Mirza *et al.*, 2016). Au final, une très faible proportion de l'Al ingéré pénètre dans l'organisme sous forme ionique et se distribue dans un espace très large, les cellules constituant 41 % du poids du corps et l'espace extracellulaire, les 59 % restant (Forbes, 1987).

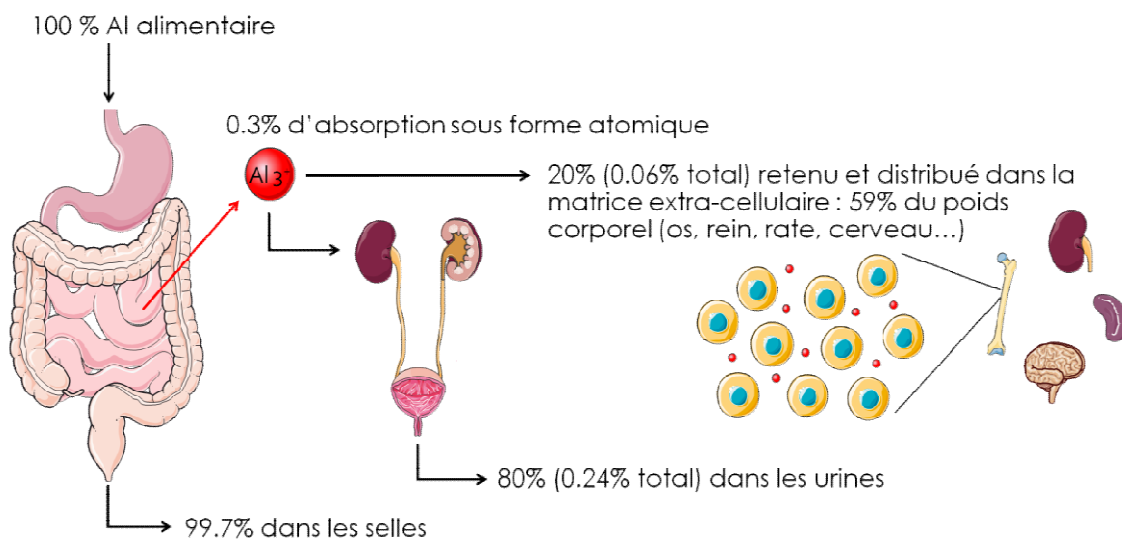


Figure 56 : Devenir de l'Al ingéré

d'après (Forbes, 1987; Fatemi, Kadir & Moore, 1991; Mirza *et al.*, 2016)

Pour l'Al vaccinal, la situation est bien différente puisqu'il est injecté directement dans un muscle. L'aiguille transperçant la barrière cutanée, 100 % de l'Al se trouve introduit dans l'organisme (**Figure 57**). Les agglomérats présents dans les vaccins sont très peu solubles (Mold, Shardlow & Exley, 2016) et l'élimination dans les urines est donc relativement limitée (environ 6 % chez le lapin) : 94 % de l'Al injecté est donc retenu dans l'organisme sous forme

particulaire (Flarend *et al.*, 1997; Masson *et al.*, 2018). Les agglomérats sont massivement capturés par les macrophages immédiatement après l'injection (Khan *et al.*, 2013; Gherardi, Cadusseau & Authier, 2014). Cette phagocytose massive augmente la durée de survie cellulaire (Hamilton, Byrne & Whitty, 2000) et permet une action immunologique prolongée de l'AH (Morefield *et al.*, 2005) ainsi que l'activation des cellules immunitaires des organes distants (Wang *et al.*, 2013) et le transfert de particules entre les cellules présentatrices d'antigènes (Carbone, Belz & Heath, 2004). Les agglomérats phagocytés vont donc rester intracellulaires et être déplacés dans l'organisme (système lymphatique et éventuellement système nerveux) par les cellules du système immunitaire (Khan *et al.*, 2013). Comparé à l'Al alimentaire, le volume de diffusion de l'Al vaccinal est donc très faible, limité au cytoplasme des seuls macrophages, un des 200 types cellulaires de l'organisme. Même si ces derniers circulent et distribuent leur cargo aux cellules de leur lignée (comme les cellules microgliales du système nerveux central), la dilution de la dose initiale est faible car il n'y a pas de dilution notable dans l'espace extracellulaire, et la distribution intracellulaire n'intéresse qu'un maximum possible de 2.10^{12} cellules, le nombre total de cellules de la lignée des macrophages (Lee, 1993).

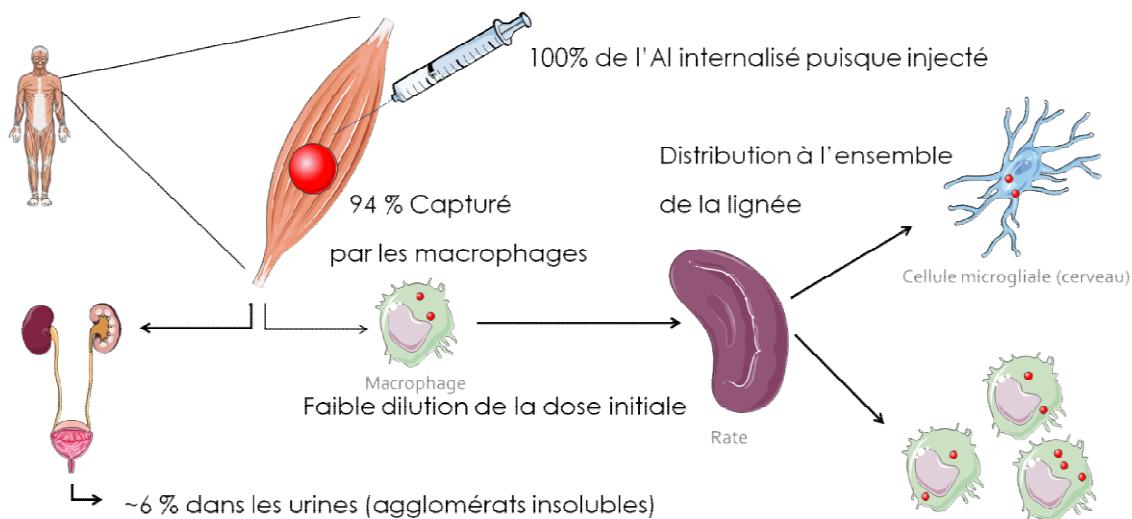


Figure 57 : Devenir de l'Al injecté
d'après (Lee, 1993; Masson *et al.*, 2018)

En conclusion, les toxicologues avertis ont maintenant compris qu'il n'est pas pertinent de comparer la toxicité d'Al de forme différente (soluble vs particulaire) et administré par voie différente (orale vs IM) (Willhite *et al.*, 2014; McFarland *et al.*, 2020). Cette précaution est d'autant plus nécessaire qu'il est maintenant établi que « *ce n'est pas la dose qui fait le poison* » en matière de neurotoxicité chronique des adjuvants aluminiques, mais plutôt les caractéristiques particulières de l'adjuvant (notamment la taille des particules, cf paragraphe I.4.1.2. de la section Contexte et problématique) (Crépeaux *et al.*, 2017).

b) *Ingestion et injection : une histoire de dose*

Selon un rapport de l'Agence Française de Sécurité Sanitaire des Aliments (AFSSA), devenue Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail (ANSES) en 2010, l'apport moyen en Al lié aux denrées alimentaires est de 0,43 mg/kg/semaine chez les nourrissons (0-3 ans), de 0,26 mg/kg/semaine en moyenne chez les enfants (3-17 ans) et 0,16 mg/kg/semaine chez l'adulte (18 ans et plus) (anses.fr, 2008). Bien qu'ancien d'une dizaine d'années, ce rapport est cohérent avec les données plus récentes émanant du conseil supérieur de la santé belge (Conseil supérieur de la santé, 2015) et ne semble pas donner de valeurs aberrantes au vu des récentes mesures de concentration en Al effectuées dans diverses préparations alimentaires infantiles (Redgrove *et al.*, 2019).

D'après les calculs, un adulte ingère 0,16 mg d'Al par kilogramme de poids corporel par semaine soit $(0,16 / 7)$ 0,023 mg/kg/jour ou 23 µg d'Al/kg/j. De ces 23 µg, seul 0,06 % vont réellement être absorbés par la barrière intestinale soit $(23 * 0,0006)$ 0,014 µg d'Al/kg/j et donc $(0,014 * 60)$ 0,84 µg/j pour un adulte de 60 kg. Pour le nourrisson, la méthode de calcul est la même en partant d'une exposition initiale de 0,43 mg d'Al/kg/semaine soit $(0,43 / 7)$ 0,06 mg d'Al/kg/j ou 60 µg d'Al/kg/j. Avec une absorption sous-évaluée du fait de l'immaturation de la barrière intestinale, $(0,0006 * 60)$ 0,037 µg d'Al/kg est absorbé soit un total de 0,185 µg/j pour un nourrisson de 5 kg.

Chez l'adulte, un calcul basé sur le vaccin Engerix B[®] contenant 500 µg d'Al dont 94 % est effectivement capturé par les macrophages après injection, estime l'apport d'Al vaccinal à 470 µg d'Al contre 0,84 µg d'Al pour l'apport alimentaire. Pour le nourrisson de 2,5 mois, la première vaccination est composée le plus souvent de l'Infanrix hexa[®] (GSK Vaccines) contenant 820 µg d'Al et du Prevenar 13[®] (Pfizer) contenant 125 µg d'Al pour un total de 945 µg d'Al (Angrand *et al.*, 2020). En considérant 94 % de capture cellulaire, cela correspond à un apport de 888,3 µg d'Al en une journée contre 0,185 µg/j pour l'apport alimentaire. L'apport d'Al par la vaccination représente donc, le jour de l'injection, 560 fois l'apport alimentaire pour les adultes et 4 802 fois cette dose pour les nourrissons.

Sur l'ensemble de la première année de vie, le bébé ingère une quantité théorique de $(0,43 * 52 * 8)$ 178 mg d'Al dont 0,06 % au minimum sont absorbés soit 0,107 mg ou 107 µg pour un enfant de un an pesant 8 kg. Sur cette même première année, la dose d'Al injecté par les vaccins représente 3 835 µg d'Al (soit 3 injections d'Infanrix hexa[®], 3 injections de Prevenar 13[®] (Pneumocoque) et 2 injections de Neisvac[®] (Méningocoque) (Pfizer) contenant 500 µg d'Al, selon le calendrier détaillé en (**Tableau 49**), le vaccin Rougeole-Oreillons-Rubéole ne contenant pas d'Al. La quantité d'Al diffusant dans l'organisme est de 94 % de cette quantité soit 3 605 µg. Cette dose est environ 34 fois supérieure à l'Al absorbé par voie alimentaire durant la même période.

Les vaccins contenant de l'Al sont ainsi en réalité la principale source d'exposition à l'Al et les calendriers vaccinaux pédiatriques modernes induisent pour les nourrissons un risque d'exposition aiguë, répétée et éventuellement chronique à des niveaux toxiques d'Al dont les

seuils en matière d'innocuité reposent uniquement sur des études d'exposition alimentaire chez des souris et des rats adultes (Lyons-Weiler & Ricketson, 2018) (cf le chapitre I.3.3.4. de la section Contexte et problématique). L'exposition à l'aluminium par le biais d'un vaccin doit donc être considérée, par rapport au régime alimentaire, comme une exposition aiguë, et non comme une exposition sans risque car particulièrement faible (Exley, 2020).

A.1.4.3. Un recul de 90 ans

La première séance de l'assemblée nationale du 26 juillet 2017 a également vu Madame la Ministre de l'époque expliquer que « *nous avons sur les adjuvants un recul d'utilisation de quatre-vingt-dix ans et plusieurs centaines de millions de doses ont été utilisées depuis que les vaccins existent.* » (Assemblée Nationale, 2017). Il faut cependant avoir à l'esprit que le système de pharmacovigilance n'a été mis en place que dans les années 70 après une suite de catastrophes sanitaires dont le plus marquant est certainement le scandale de la Thalidomide® à la fin des années 50. Ce composé a été prescrit aux femmes enceintes comme sédatif ou pour lutter contre les nausées matinales dans de nombreux pays dont l'Allemagne, premier pays de synthèse et de commercialisation de cette molécule (Weiss, 2000). Les graves malformations congénitales (absence de membres, doigts surnuméraires) observées dans les années qui ont suivi, chez près de 15 000 enfants nés de mères ayant pris de la thalidomide pendant leur grossesse, ont eu un fort impact auprès du grand public, du monde scientifique et des gouvernements (Weiss & Landrigan, 2000). A Atlanta en 1967, un programme de surveillance des malformations congénitales a été mis en place à la suite de cette affaire au sein du CDC (Weiss & Landrigan, 2000), et la réglementation des médicaments a fortement évolué, notamment grâce à la création du centre mondial de la pharmacovigilance, aujourd'hui situé en Suède. Les premiers centres hospitaliers de pharmacovigilance se mettent en place, en France, à partir de 1973 et l'équivalent américain, les *Vaccine Adverse Event Reporting System*, spécialisés dans les accidents vaccinaux, sont opérationnels aux USA à partir de 1990 après le vote du *National childhood vaccine injury act* de 1986. Le recul sur l'utilisation des vaccins et de leurs adjuvants ne date donc que d'une quarantaine d'années.

A cela s'ajoute le fait que la réelle utilisation massive des adjuvants aluminiques dans les vaccins obligatoires, notamment pour les nourrissons, date des années 1990 (Di Pasquale *et al.*, 2015). En effet jusqu'à l'introduction du vaccin contre l'hépatite B dans les années 90, seuls les vaccins contre la diphtérie, le tétanos et la poliomyélite pouvaient contenir un adjuvant à base d'Al. C'est dans les années 90 que la politique vaccinale s'est intensifiée avec une augmentation du nombre d'injections de vaccins adjuvés sur Al, ce qui signifie que le recul maximal sur l'Al vaccinal à l'échelle mondiale remonte au mieux à 30 ans.

Par ailleurs, il semblerait que le système de pharmacovigilance sous-estime le nombre d'effets indésirables graves des vaccins étant donné que seul 1 à 10 % de ces effets sont effectivement recensés en France, soit par manque de temps, soit par manque de compréhension de l'intérêt en termes de santé publique, soit par manque de lien effectué par le médecin entre l'effet et la cause (Autret-Leca *et al.*, 2011). Ce chiffre est d'ailleurs retrouvé pour plusieurs autres pays

comme le Royaume-Uni (Hazell & Shakir, 2006) ou les États-Unis (Scott *et al.*, 1987; Kessler, 1993) suggérant une large sous-estimation des effets secondaires des vaccins au niveau mondial. Les derniers scandales sanitaires concernant le mediator[®] ou la dépakine[®] nous montrent bien les limites de la pharmacovigilance. Le bon sens voudrait donc que le principe de précaution soit appliqué lorsque des doutes sont émis au sujet d'une molécule en la retirant du marché le temps que des contrôles indépendants et adéquats soient effectués quant à sa réelle innocuité, en particulier quand des molécules analogues sont susceptibles de la remplacer.