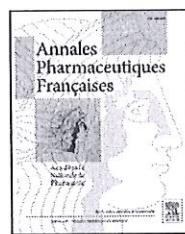




Disponible en ligne sur
ScienceDirect
www.sciencedirect.com

Elsevier Masson France
EM|consulte
www.em-consulte.com



REVUE GÉNÉRALE

Adjuvants aluminiques des vaccins : analyse critique des études toxicocinétiques de référence

Critical analysis of reference studies on aluminium-based adjuvants toxicokinetics

J.-D. Masson^a, G. Crépeaux^{a,b}, F.-J. Authier^a,
C. Exley^c, R.K. Gherardi^{a,*}

^a Inserm U955 E10, centre expert de pathologie neuromusculaire, « Biologie du système neuromusculaire », hôpital Henri-Mondor, faculté de médecine, université Paris-Est-Créteil, 94010 Créteil, France

^b École nationale vétérinaire d'Alfort, 7, avenue du Général-de-Gaulle, 94700 Maisons-Alfort, France

^c Aluminium and Silicon Research Group, The Birchall Centre, Lennard-Jones Laboratories, Keele University, ST5 5BG, Staffordshire, Royaume-Uni

Reçu le 27 février 2017 ; accepté le 19 avril 2017

MOTS CLÉS

Adjuvants vaccinaux ;
Aluminium ;
Toxicocinétique ;
Sécurité vaccinale

Résumé Dans le prolongement de la réflexion menée par l'Académie nationale de pharmacie nous avons réévalué les 3 études de référence suggérant l'innocuité des adjuvants aluminiques. Une seule étude expérimentale a été menée grâce à l'²⁶Al isotopique (Flarend et al., 1997). Cette étude, ignorant la capture cellulaire des adjuvants et menée pendant 28 jours sur seulement 2 lapins par adjuvant, a montré une rétention de 78 % de l'Al de l'adjuvant phosphate de 94 % de l'hydroxyde. Ces résultats sont incompatibles avec une élimination rapide de l'aluminium vaccinal par voie urinaire. L'étude de la distribution tissulaire a omis le muscle injecté, le ganglion de drainage, et l'os. Deux études théoriques ont calculé le risque de l'Al vaccinal chez le nourrisson, par référence au Minimal Risk Level (MRL) par voie orale extrapolé d'expériences animales. Keith et al. (2002) ont utilisé un MRL trop élevé (2 mg/kg/j), un modèle erroné d'absorption immédiate de 100 % de l'Al vaccinal, et n'ont pas tenu compte de l'immaturité du rein et de la barrière hémato-encéphalique. Mitkus et al. (2011) ne considérant que l'Al absorbé ont ignoré l'Al particulaire dont la capture par les cellules immunitaires joue un rôle dans la migration systémique et le potentiel neuro-inflammatoire de l'adjuvant. Son

* Auteur correspondant.

Adresse e-mail : romain.gherardi@aphp.fr (R.K. Gherardi).

utilisation d'un MRL par voie orale est inapproprié et d'un niveau (1 mg/kg/j) bien trop élevé au regard des travaux expérimentaux récents. Les durées d'absorption calculées sont inexactes. Ces faiblesses conceptuelles et méthodologiques rendent souhaitable la réalisation de nouvelles études toxicocinétiques expérimentales de long terme afin que soit garanti l'innocuité des adjuvants à base d'aluminium.

© 2017 Académie Nationale de Pharmacie. Publié par Elsevier Masson SAS. Tous droits réservés.

KEYWORDS

Vaccine adjuvant;
Aluminium;
Toxicokinetics
Vaccine safety

Summary We reviewed the three reference toxicokinetic studies commonly used to suggest innocuity of aluminum (Al)-based adjuvants. A single experimental study was carried out using isotopic ^{26}Al (Flarend et al., 1997). This study ignored adjuvant cell capture. It was conducted over a short period of time (28 days) and used only two rabbits per adjuvant. At the endpoint, Al retention was 78% for aluminum phosphate and 94% for aluminum hydroxide, both results being incompatible with quick elimination of vaccine-derived Al in urines. Tissue distribution analysis omitted three important retention sites: the injected muscle, the draining lymph node and bone. Two theoretical studies have evaluated the potential risk of vaccine Al in infants, by reference to the oral Minimal Risk Level (MRL) extrapolated from animal studies. Keith et al., 2002 used a too 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. (2011) only considered absorbed Al, with erroneous calculations of absorption duration. They ignored particulate Al captured by immune cells, which play a role in systemic diffusion and the neuro-inflammatory potential of the adjuvant. MRL they used was both inappropriate (oral Al vs injected adjuvant) and far too high (1 mg/kg/d) with regard to experimental studies of Al-induced memory and behavioral changes. Both paucity and serious weaknesses of these studies strongly suggest that novel experimental studies of Al adjuvants toxicokinetics should be performed on the long-term, including post-natal and adult exposures, to ensure innocuity and restore population confidence in Al-containing vaccines.

© 2017 Académie Nationale de Pharmacie. Published by Elsevier Masson SAS. All rights reserved.

Introduction

La vaccination a permis l'éradication de la variole, 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 [1]. 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 aussi collectif, par la réduction du nombre de personnes susceptibles de transmettre les maladies infectieuses [1].

Pourtant, bien que l'utilité de nombreux vaccins ait été amplement démontrée, une défiance croissante de la population vis-à-vis de la vaccination a émergé depuis quelques années. Cette réticence, de degré variable, apparaît alors qu'une politique mondiale d'expansion des approches vaccinales est menée par l'OMS qui annonce que plus de 120 nouveaux vaccins sont actuellement en cours d'élaboration, et prévoit une croissance annuelle de 20 % du marché des vaccins, pour un chiffre d'affaires passé de 5 à

43 milliards de dollars de 2000 à 2016 et annoncé à plus de 100 milliards en 2025 [2]. 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, la question vaccinale est 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 [3]. 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. » [3].

Au cœur du débat sur la sécurité des vaccins se trouvent donc les adjuvants, composés essentiels pour une immunisation forte et durable [4]. La controverse s'est essentiellement concentrée sur les sels d'aluminium introduits de façon empirique par Alexander Glenny et al. comme adjuvant des vaccins en 1926 [5]. Elle s'est traduite par diverses actions menées par les associations de patients [6,7], la publication d'ouvrages pour le grand public, soit critiques [8] soit rassurants [9], la tenue de *blogs* scientifiques [10], la rédaction de rapports techniques institutionnels [4,11–13], et la tenue de réunions de réflexion d'initiative parlementaire [14,15]. 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'aluminium est resté l'objet d'un consensus persistant.

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 téton et le papilloma virus humain (HPV) notamment, a été rapportée dans de nombreux pays : Australie [16], Canada [17,18], Danemark [19,20], France [21–23], Grande Bretagne [24,25], Italie [26,27], Israël [28], Japon [28,29], Mexique [30], Portugal [31], et État Unis [32]. 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 suscités, pouvant participer à l'une ou plusieurs entités cliniques [19]— syndrome de fatigue chronique (SFC), syndrome douloureux régional (SDR), syndrome de tachycardie posturale orthostatique (STPO) —émerge au plan épidémiologique [33]. Une étude transversale systématique de 12 études publiées a montré un sur-risque de niveau modéré dans le groupe vacciné contre l'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 29 533 des 29 600 patients étudiés) [34]. Passant outre ce biais majeur [35], l'EMA a émis un avis négatif sur l'existence d'une association [36]. Des études pharmaco-épidémiologiques sont apparemment allées dans le même sens [37,38], mais, uniquement attachées à l'études des grandes maladies auto-immunes spécifiques, elles ont exclu de leur investigation les syndromes de 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* [39]. La question de l'existence d'un lien de causalité, et donc d'un authentique syndrome des adjuvants [40,41], ne sera peut-être jamais tranché par les approches épidémiologiques [42]. Les performances de l'épidémiologie en matière de lien de causalité sont en effet notablement limitées comme on peut le concevoir pour des effets multisystémiques à plus ou moins long terme de faibles doses cumulatives administrées dans un contexte d'expositions multiples. À défaut, le débat ne peut être éclairé qu'en

établissant l'existence ou non, d'une grande plausibilité biologique d'un lien de causalité.

De façon surprenante, les adjuvants aluminiques n'ont été l'objet d'aucune investigation expérimentale officielle à ce jour, et ceci malgré la neurotoxicité bien établie de l'aluminium. L'OMS signale d'ailleurs 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. » [43]. Pour sa part, l'Académie nationale de pharmacie, a souhaité que des études sur l'innocuité des adjuvants aluminiques soient menées en tenant compte d'un ensemble de paramètres jusqu'ici peu étudiés, pouvant contribuer à l'apparition d'un risque éventuel [13]. Dans la revue qui va suivre, nous avons examiné en détail, à la lumière des résultats récents, les quelques articles de toxicocinétiques classiques de la littérature servant de référence aux agences de régulation sanitaire et aux industriels pour affirmer l'innocuité des adjuvants aluminiques.

Généralités sur les adjuvants aluminiques

Les deux principaux sels d'aluminium utilisés sont l'oxy-hydroxyde (AlOOH, Alhydrogel®) et l'hydroxyphosphate (AlOHPO₄, Adjuphos®) d'aluminium. Ils sont présents dans environ 60 % des vaccins humains (voir la liste dans l'annexe de la référence [12]) et vétérinaires. 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 HPV les adjuvants sont l'oxy-hydroxyde d'Al pour le divalent 16/18 Cervarix® (associé à un second adjuvant, le monophosphoryl lipid A, dérivé détoxifié du lipopolysaccharide [44]) 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) [45].

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 [46,47]. La FDA a fixé empiriquement le niveau autorisé d'adjuvant à 0,85 mg d'aluminium par dose de vaccin, sur la base de résultats montrant un bon effet adjuvant à cette concentration (selon Joan May, FDA/CBER, citée dans [48]).

Les deux adjuvants aluminiques possèdent des propriétés physicochimiques différentes à l'état natif. L'oxy-hydroxyde (communément appelé hydroxyde) d'aluminium possède une morphologie cristalline, connue sous le nom de Boehmite, alors que l'hydroxy-phosphate (communément appelé phosphate) est amorphe. L'hydroxyde est composé de nanoparticules d'environ 2,2 nm × 4,5 nm × 10 nm qui forment spontanément des agrégats microniques ayant un aspect nanofibreux en microscopie électronique à transmission [49,50]. 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. Le phosphate d'aluminium possède moins de groupes hydroxyles, et ses capacités d'adsorption antigénique sont donc moindres que celles de l'hydroxyde. L'hydroxyde possède une charge de surface positive, le phosphate une charge négative. Les cinétiques de biodisposition des deux adjuvants sont également significativement différentes : l'hydroxyde est beaucoup plus lentement solubilisé, plus aisement internalisé et moins toxique pour les cellules phagocytaires [50] que le phosphate, suggérant des différences notables de réactions des deux adjuvants lors des interactions avec le phosphate, les acides organiques, les environnements protéiniques et les cellules immunitaires rencontrés *in vivo*.

Analyse critique des articles de référence sur la pharmacocinétique des adjuvants aluminiques

Étude de l'absorption et de l'élimination de l'aluminium vaccinal (Flarend et al., 1997) [51]

Pendant longtemps les réunions internationales spécialisées ont tenu pour un fait acquis que l'aluminium injecté par voie vaccinale était pour l'essentiel rapidement éliminé de l'organisme par voie urinaire [52] et, encore actuellement, ce message est relayé par des sites officiels d'information à destination du grand public [53]. Cette affirmation prend sa source dans des études des années 90 utilisant une nouvelle technique d'étude de la toxicocinétique de l'aluminium. En effet, jusqu'en 1990, il était difficile de connaître le devenir précis de l'aluminium *in vivo* car on ne pouvait différencier l'aluminium 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 de l' ^{27}Al naturel, a permis de détecter de très petites quantités d' Al (10^{-17}g) grâce à la spectrométrie de masse par accélérateur [54]. Priest et al., 1995 [55] furent les premiers à injecter par voie intraveineuse (IV) du citrate d' ^{26}Al , une forme soluble d'aluminium, à un volontaire sain pour étudier la toxicocinétique de l'ion aluminium chez l'homme. Ils ont constaté que plus de la moitié de l'aluminium injecté avait quitté le secteur sanguin après 15 minutes, et qu'il en restait moins de 1 % après deux jours. Au 13^e jour, 83 % de la dose injectée avait été excrétée par voie urinaire et 1,8 % par voie fécale [55]. Les 15 % restant dans l'organisme après cette date déclinaient ensuite très lentement puisque la rétention d' ^{26}Al était encore de 4 % après 3 ans. Des résultats analogues ont été reproduits chez 6 autres volontaires sains, avec néanmoins des variations interindividuelles notables dans le degré de rétention de l'aluminium [56]. 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'aluminium dans l'organisme

au cours de la vie d'un individu [55]. Il est indispensable de bien prendre en compte que, dans ces études toxicocinétiques préliminaires, ni la forme de l'aluminium (soluble) ni la voie d'administration (IV) ne correspondait à la situation vaccinale, où l'aluminium est injecté sous forme nano/microparticulaire et par voie sous-cutanée (SC) ou intramusculaire (IM).

À l'aide du même traceur ^{26}Al , Flarend et Hem [51,54] ont donc réalisé la seule étude pharmacocinétique des adjuvants aluminiques de la littérature. Il faut noter que cette étude était initialement considérée comme une étude préliminaire [52], 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 » [4]. Cette unique étude de référence pâtit de nombreuses faiblesses dans ses hypothèses de travail, son design, et l'interprétation de ses résultats.

Une hypothèse de départ erronée

À 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'aluminium $\text{KAl}(\text{SO}_4)_2$) 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 [47], puis abandonnée [57]. 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'aluminium (citrate) était identique à celle du liquide interstitiel [58]. À pH 7,35 et température ambiante il avait observé une dissolution de 55 % de l'adjuvant phosphate d'aluminium à 12 h contre 0 % pour deux adjuvants à base d'hydroxyde d'aluminium du commerce. En augmentant la concentration du citrate par un facteur $\times 100$ 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. À 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'aluminium *in vitro*, Flarend et al. ont posé comme hypothèse de départ de leur étude *in vivo* que les deux adjuvants injectés dans le tissu 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 fausse à deux titres : la solubilisation de l'hydroxyde d'aluminium antérieurement constatée *in vitro* était nulle en présence d'une concentration physiologique en citrate [58] et, surtout, les auteurs n'ont pas considéré le fait, ultérieurement avéré, qu'une fois injectée dans un tissu, les agglomérats d'adjuvant sont rapidement capturés par les cellules du système immunitaire inné [21,49,59–61] et sont donc rapidement soustrait 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'hydroxyde d'aluminium [62–64], la reconnaîtra implicitement quelques années plus tard en montrant l'importance de la phagocytose dans l'effet immunologique [65].

Un protocole d'étude au design limité et imparfait

Flarend et al. [51] ont injecté 0,85 mg d' ^{26}Al sous forme hydroxyde ou phosphate par voie IM à des lapins :

- seulement 2 lapins ont été injectés pour chaque sel d'aluminium étudié : ce nombre semble très insuffisant au regard des fortes variations interindividuelles de l'élimination de l'aluminium décrites antérieurement [56] ;
- l'étude a porté sur une durée très limitée de 28 jours : les résultats in vitro antérieurs de l'équipe (cf supra) rendaient improbable l'élimination de l'hydroxyde d'aluminium après un délai aussi court [58] ;
- l'hydroxyde d'aluminium utilisé, fabriqué par précipitation, diffère de l'oxy-hydroxyde d'aluminium (Alhydrogel[®]) utilisé dans les vaccins commerciaux et de l'hydroxyde d'aluminium (Imject[®]) utilisé comme adjuvant vaccinal expérimental [66]. Une option possible aurait été d'incuber longuement l' ^{26}Al avec de l'Alhydrogel[®] et d'attendre l'échanges entre l' ^{27}Al et l' ^{26}Al afin de marquer l'adjuvant officiel.

Des tissus cibles oubliés ou détruits

Le manque de pertinence des organes prélevés à l'issue de l'étude afin d'étudier la biodistribution de l' ^{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 [49,67,68] ;
- les os (fémurs) prélevés ont été perdus, alors que l'os est le lieu de fixation préférentiel de l'aluminium soluble circulant, loin devant le rein et les autres organes [69,70] ;
- les cerveaux ont bien été prélevés, mais l'un d'eux a été détruit, correspondant à l'animal présentant la plus forte absorption sanguine d' ^{26}Al (animal injecté par du phosphate d'Al).

Des mesures dans le plasma d'emblée contraires à l'hypothèse de travail

Flarend et al. [51] 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 d' ^{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 (Fig. 1A). Les auteurs interprètent ce pic initial comme résultant d'une dissolution précoce de l'hydroxyde ce qui semble douteux au regard de

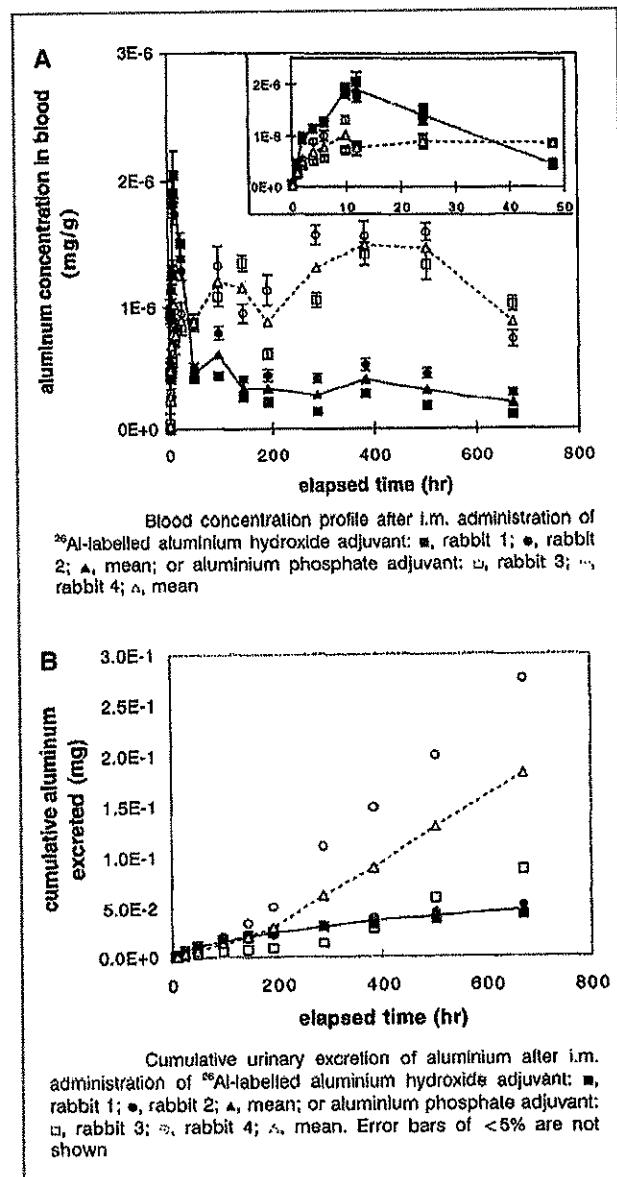


Figure 1. Les courbes de Flarend et al., 1997 montrent la cinétique des concentrations plasmatiques (A) et l'excration urinaire cumulée (B) de l' ^{26}Al après injection IM d'hydroxyde d' ^{26}Al et de phosphate d' ^{26}Al chez le lapin.
Figures from Flarend et al., 1997 showed plasma concentration kinetics (A) and cumulative urinary excretion (B) of ^{26}Al after IM of ^{26}Al hydroxide and ^{26}Al phosphate in rabbit.

l'absence totale de solubilisation de la forme hydroxyde observée à 12 h in vitro [58]. En revanche, la forme phosphate censée se solubiliser plus rapidement que la forme hydroxyde ne provoque qu'une modeste élévation plasmatique d' ^{26}Al initiale, comme en témoigne une aire sous la courbe plus élevée d'un facteur 1,4 en faveur de l'hydroxyde dans les 48 premières heures. L'hypothèse d'un possible fuite sanguine initiale d'hydroxyde d'Al sous forme nano/microparticulaire n'est pas envisagée ;

- à partir de la 48^e heure la concentration plasmatique d'¹²⁶Al devient et restera nettement supérieure pour le phosphate comparé à l'hydroxyde d'aluminium (Fig. 1A). 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 nets pour le phosphate d'aluminium, qui pourraient suggérer des phénomènes cycliques d'absorption, peut-être liés à des phénomènes de capture/relargage cellulaires ou tissulaires. À 28 jours l'absorption de l'¹²⁶Al à partir de l'adjuvant phosphate est 3 fois supérieure à celle observée pour l'hydroxyde d'aluminium ;
- à 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 d'¹²⁶Al. L'examen ultérieur des courbes par le groupe de Mitkus [71] indique qu'en fait l'absorption d'¹²⁶Al a amorcé la phase terminale pour le phosphate d'aluminium et est déjà très proche de zéro pour l'hydroxyde d'aluminium au 28^e jour de l'étude (Fig. 1A). Pour ce dernier les niveaux plasmatiques d'¹²⁶Al sont très bas dès la 100^e heure et l'absorption décroît de façon continue de la 400^e à la 700^e heure, indiquant un passage plasmatique d'Al extrêmement faible après le pic initial pour l'hydroxyde d'aluminium.

Des conclusions sur l'élimination des adjuvants contraires à celles suggérées par les résultats

Il existe une forte différence d'excration urinaire d'¹²⁶Al entre les deux adjuvants. À 28 jours, 22 % de l'¹²⁶Al de l'adjuvant phosphate a été éliminé dans les urines, avec des écarts importants entre les deux lapins étudiés (10–33 %). À la même date, seulement 5,6 % (5,0–6,2 %) de l'¹²⁶Al de la forme hydroxyde est éliminé. Le niveau de rétention de plus de 94 % à 28 jours observé pour l'hydroxyde d'aluminium 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. supra), les auteurs calculent d'ailleurs que seulement 17 % de l'¹²⁶Al est absorbé à partir de l'hydroxyde à 28j (contre 51 % pour le phosphate). En conséquence, la distribution dans les différents tissus de l'¹²⁶Al montre des concentrations tissulaires constamment plus élevées pour la forme phosphate (avec un facteur d'environ $\times 2,9$). 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 lente translocation de l'hydroxyde d'Al dans les organes lymphoïdes [68] et le cerveau [67].

Les auteurs soulignent que l'élimination de l'¹²⁶Al 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 (Fig. 1B). 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. Plutôt que communiquer sur le caractère rassurant de ces résultats [52], 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 toxicocinétiques complémentaires afin d'éviter la propagation d'informations hasardeuses sur l'élimination rapide des adjuvants aluminiques [53], surtout après avoir pris connaissance des études ultérieures montrant la phagocytose, la persistance intracellulaire, la migration à distance et la neurotoxicité des adjuvants aluminiques [21,49,67,68].

Calculs théoriques suggérant l'innocuité des doses d'Al vaccinal administrées au nourrisson (Keith et al., 2002 ; Mitkus et al., 2011) [71,72]

Deux études ont comparé l'impact théorique de l'aluminium alimentaire et vaccinal chez le nourrisson [71,72]. Le principe des deux études est similaire : il s'agit de calculs théoriques fondés sur l'apport et l'excration d'aluminium de la naissance à 12 mois. L'accumulation calculée d'aluminium 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'aluminium administré par voie orale. Ce MRL oral est fixé à partir de l'expérimentation animale extrapolée 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 [4,53]. Une seule étude directe a été menée sur 24 h chez des prématurés [73].

L'étude de Keith et al. (2002) : un seuil de « sécurité » trop élevé, un modèle erroné d'absorption, une immaturité rénale et cérébro-vasculaire non prise en compte

Description de l'étude

Dans la première étude, Keith et al. [72] ont estimé l'accumulation corporelle d'aluminium 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 diphtérie-tétanos-coqueluche (DTaP)), a été calculé en postulant que la dose d'Al injectée est immédiatement absorbée à 100 % et que le profil toxicocinétique est celui décrit et modélisé par Priest et al. pour l'¹²⁶Al soluble

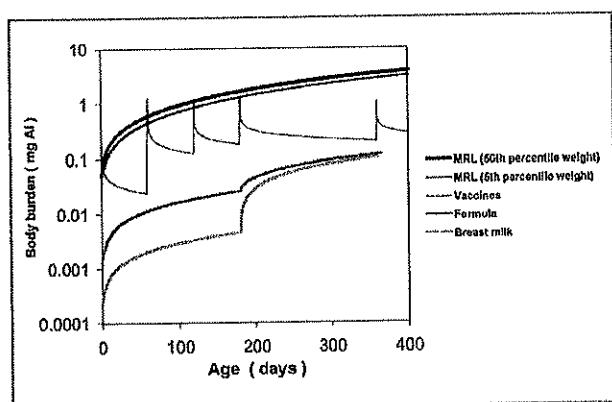


Figure 2. La courbe de Keith et al., 2002 évalue la charge corporelle théorique en Al d'origine vaccinale et alimentaire chez le nourrisson. La courbe limite de sécurité intègre le MRL oral basé sur une NOAEL de 62 mg Al/kg/j et le poids de 50 % ou de 5 % des enfants américains selon les abaques de l'époque. 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.

Figure from Keith et al., 2002 assesses Al body burden contributions from diet and vaccines on baby. Safety limit curve integrates the oral MRL based on a NOAEL value of 62 mg Al/kg/d and body weight of kids according to data from this period. In case of an immediate absorption of 100% of vaccine Al, there is a transient crossing of the safety limit by the Al vaccine at 2 months, and limit peaks at 4 and 6 months.

injecté par voie IV chez l'homme [55]. 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 [74]. Ce MRL a été défini à partir d'une étude ancienne de Golub et al., 1989 [75] qui avait étudié l'activité motrice de souris soumise à une alimentation contenant du lactate d'aluminium. Chez ces souris la No-Observed-Adverse Effect Level (NOAEL) 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 [74]. L'étude de Keith et al. [72] 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, dont celui du 2^e mois dépasse brièvement la courbe MRL et ceux du 4^e et 6^e mois se situent juste à la limite de cette courbe (Fig. 2).

Critique de l'étude

Les limites et imperfections méthodologiques du modèle de Keith et al., 2002 [72] ont justifié l'étude ultérieure de Mitzkus et al., 2011 [71] :

- amplification ultérieure du calendrier vaccinal pédiatrique recommandé aux États-Unis 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 2016, 17 injections aluminiques sont recommandées par les CDC entre l'âge de 0 et 18 mois

Tableau 1. Calendrier des vaccinations recommandées de 0 à 18 mois par le CDC (2016).

Recommended immunization schedule for persons aged 0 through 18 months (CDC 2016).

Âge (mois)	Naissance	2	4	6	12	15	18
Vaccine							
Hépatite B ^a	x		x	x			
Rotavirus		x	x	x			
DTaP (diphtherie, tétanos, coqueluche acellulaire) ^a		x	x	x		x	
Hib (Haemophilus influenza) ^a		x	x	x		x	
Pneumocoque ^a		x	x	x		x	
PVI (Poliovirus inactif)		x	x	x			
Influenza					x	x	
ROR (rougeole-oreillette-rubéole)					x		
Varicelle					x		
Hépatite A ^a					x	x	

^a Vaccin contenant de l'aluminium sous forme hydroxyde et/ou phosphate.

(Tableau 1) [76]. 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 [76] ;
- non-prise en compte de l'immaturité de la fonction de filtration glomérulaire chez le nourrisson pouvant influer sur l'élimination de l'aluminium absorbé [71] ; il faut noter que la question de la barrière hémato-encéphalique n'a pas non plus été prise en compte alors que le développement du système nerveux est notoirement sensible aux expositions toxiques [78]. La question de l'immaturité de la barrière hémato-encéphalique (BHE) est une question importante en matière de toxicologie des adjuvants aluminiques. Dans son rapport, l'Académie nationale de pharmacie [13] considère que « la BHE, incomplètement formée aux stades prénatal et postnatal, 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 » [13] ;
- actualisation nécessaire de la courbe de poids des enfants américains [71] ;
- amélioration en 2004 de la modélisation mathématique de la rétention de l'²⁶Al injecté par voie IV chez l'homme, comportant désormais 3 phases d'absorption avec des demi-vies respectives de l'aluminium de 1,4, 40 et 1727 jours [79] ;
- et surtout, prise en compte des résultats de Flarend et al., 1997 [51] montrant que l'absorption de l'aluminium des adjuvants ne peut en aucun cas être considérée comme étant de 100 % immédiatement après l'injection.

L'étude de Mitkus et al., 2011 : un seuil de « sécurité » toujours trop élevé, une non-prise en compte de l'Al nano/microparticulaire

Description de l'étude

Dans cette deuxième étude, Mitkus reprend d'abord la méthodologie de Keith en tenant en 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'aluminium 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'aluminium 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'aluminium est de 17 % pour l'hydroxyde à 28 jours, il faudra encore 137 jours pour tout absorber (total 165 jours). La quantité cumulée d'aluminium absorbé à partir des vaccins est nettement supérieure à l'absorption d'aluminium d'origine alimentaire (facteur $\times 2$) mais demeure nettement en deçà du niveau de sécurité pour le phosphate et très nettement pour l'hydroxyde (Fig. 3). Les auteurs en concluent qu'il est peu probable que l'aluminium apporté par les vaccins ait une influence significative sur la charge en aluminium de l'organisme des nourrissons, impliquant une bonne sécurité des adjuvants aluminiques de 0 à 12 mois.

Critique de l'étude

Contrairement aux apparences l'étude de Mitkus souffre de biais importants.

C'est un MRL par voie orale qui a été utilisé pour définir la courbe de sécurité

L'aluminium ingéré parvient à traverser la barrière intestinale sous sa seule forme ionique [72]. 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 [80]. Sous sa forme particulaire l'aluminium est rapidement capturé et ensuite transporté à distance par les cellules immunitaires [21,49,67,68]. La comparaison de la toxicité chimique des ions aluminium, tels que ceux absorbés au niveau intestinal, et de la toxicité particulaire des sels d'aluminium injectés par voie IM est donc un contresens [81]. En témoigne la courbe dose-réponse atypique des effets neurotoxiques de l'hydroxyde d'aluminium, avec un transfert cérébral de l'aluminium et un effet clinique sélectivement observés pour les faibles doses, qui se rapproche de celles décrites en toxicologie particulaire [82]. 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 particulaires pour être conformes à ceux des vaccins, et injectés par voie IM plutôt qu'avec des

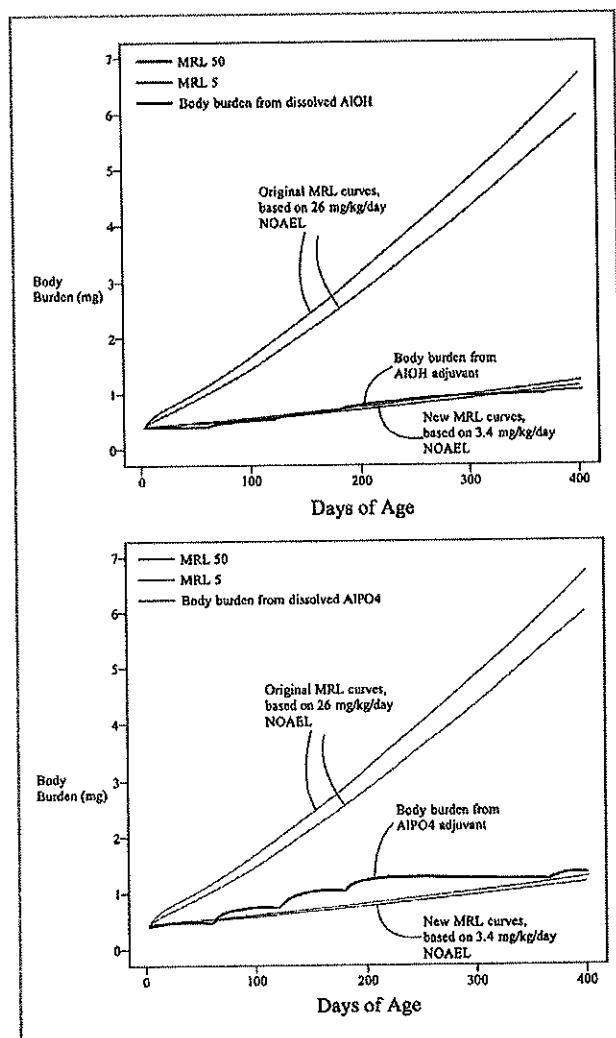


Figure 3. Ces courbes sont réalisées à partir de celles de Mitkus et al., 2011 pour le nourrisson. Sur les deux panneaux sont indiqués les courbes de MRL de l'article original basées sur une NOAEL de 26 mg Al/kg/j (courbes intégrant le poids de 50 % ou de 5 % des enfants américains) ; de nouvelles courbes de MRL basées sur une NOAEL réactualisée de 3,4 mg Al/kg/j [88] montrent un franchissement de la limite de sécurité de l'aluminium absorbé à partir de l'hydroxyde d'aluminium et du phosphate d'aluminium.

These curves are made from those of Mitkus et al., 2011 for the baby. On both panels are MRL curves of the original article based on a NOAEL of 26 mg/kg/d (curves integrate American child body weight); new MRL curves based on a revised NOAEL of 3.4 mg Al/kg/d [88] show a crossing of the safety limit of aluminum absorbed from Al hydroxide and from Al phosphate.

formes solubles d'aluminium (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 [77] a été déterminé sur la base d'une NOAEL observée de 26 mg/kg/j chez la souris en 2001 [83]. 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, 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 [84], 5,6 mg/kg/j rapporté en 2008 et 2009 [85,86], 10 mg/kg/j rapporté en 2016 [87], 3,4 mg/kg/j rapporté en 2016 [88], et même 1,5 mg/kg/j rapporté en 2017 [89]. 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 $\times 17,3$ (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 [89]. 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.

La toxicité potentielle de l'Al particulaire n'a pas été envisagée

Comme Flarend avant lui [51], 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'hydroxyde) repose d'ailleurs sur un calcul simpliste (cf. supra) ne tenant pas compte du caractère imminent (phosphate) ou en cours d'achèvement (hydroxyde) de l'absorption plasmatique au 28^e jour, alors qu'il en fait lui-même le constat sur les courbes de Flarend (cf. supra). Le corollaire de ce calcul simpliste est une sous-estimation de la bio-persistance de l'aluminium sous forme particulaire après injection. Les études histologiques effectuées après injection IM d'hydroxyde d'aluminium ont montré une persistance de l'aluminium particulaire, et du granulome qu'il induit, encore décelable au 12^e mois au niveau du muscle injecté chez l'animal [59,60] et de plusieurs années (jusqu'à plus de 12 ans) chez les patients adultes souffrant d'un syndrome de fatigue chronique post-vaccinal [90]. Même si des facteurs de susceptibilité génétique semblent expliquer la faible solubilisation intracellulaire de l'hydroxyde d'aluminium chez les patients [90], la sous-estimation par Mitkus de la durée d'absorption de l'adjuvant est certaine et importante. Une autre erreur de Mitkus 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'hydroxyde d'aluminium concerne aussi bien les particules observées au site d'injection que celles transportées à distance [68]. Chez la souris les particules d'hydroxyde d'aluminium 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 [49,67]. Après une injection IM unique, la pénétration cérébrale des particules est faible mais elle augmente considérablement sous l'influence de la signalisation MCP-1/CCL2, et s'accompagne d'une expression cellulaire d'IL1beta, témoin attendu de l'activation de l'inflamasome par l'adjuvant [67]. Signons enfin que des effets neurotoxiques ont été observés avec des doses d'hydroxyde d'aluminium reproduisant le schéma vaccinal américain de l'âge de 0 à 18 mois transposé à la souris [91]. Attentif au seul aluminium absorbé, et

pas à l'aluminium particulaire, Mitkus pensait que « le fait que le tissus osseux est probablement le siège principal de résidence de long-terme (de l'aluminium absorbé à partir du site injecté), et pas des organes moins sensibles, est rassurant ». Une étude récente menée chez des prématués vaccinés à l'âge de 2 mois [73], également concentrée sur le seul aluminium absorbé, a trouvé curieusement « rassurant » de ne constater aucune élévation de l'aluminium dans le sérum et les urines 24 heures après l'administration de vaccins contenant une dose totale de 1200 µg d'Al (environ 200 µg/kg) [73]. L'absence d'absorption et d'élimination rapide de l'aluminium des adjuvants nous semblerait plutôt un motif légitime de préoccupation pour la sécurité des adjuvants aluminiques, puisqu'elle a comme corollaire une persistance systémique de particules d'Al immunostimulantes et potentiellement neuromigrantées [68,82].

Conclusion

La glorieuse histoire des vaccins s'est construite sur des bases souvent empiriques au cours du XX^e siècle. C'est le cas, en particulier, des adjuvants de première génération à base d'aluminium qui ont rendu 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 [2]. Dans ce contexte, compte tenu de leurs sérieuses faiblesses conceptuelles et méthodologiques, les 3 études toxicocinétiques 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^e siècle est une science moderne et forte. À 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 toxicocinétiques expérimentales, incluant des études sur le temps long, afin de confirmer ou d'inflimer l'absolue innocuité des sels d'aluminium du point de vue de la toxicologie fondamentale.

Remerciements

Nous remercions l'ANSM, la Région Île-de-France (programme PICRI), et le CMSRI pour leurs financements, ainsi que Daniel Steinberg pour nos échanges méthodologiques et la confection de la Fig. 3.

Déclaration de liens d'intérêts

Les auteurs ne déclarent aucun lien d'intérêts.

Références

- [1] Launay O. Dossier vaccins et vaccination 2015; 2015 <http://www.inserm.fr/thematiques/immunologie-inflammation-infectiologie-et-microbiologie/dossiers-d-information/vaccins-et-vaccination>.
- [2] Kaddar M. Global Vaccine market features and trends 2012; 2012 [http://www.who.int/influenza vaccines plan/resources/session_10_kaddar.pdf](http://www.who.int/influenza_vaccines_plan/resources/session_10_kaddar.pdf).
- [3] Direction de l'information légale et administrative (DILA). Vaccins: comment rétablir la confiance et augmenter la couverture de la population; 2016 <http://www.vie-publique.fr/actualite/alaune/vaccins-comment-retablir-confiance-augmenter-couverture-population-20161206.html>.
- [4] Bégué P, Girard M, Bazin H, Bach JF. Les adjuvants vaccinaux: quelle actualité en 2012 ? *Bull Acad Natl Med* 2012;196:1177–81.
- [5] Glenny AT, Pope CG, Waddington H, Wallace U. Immunological notes XVII–XXIV. *J Pathol Bacteriol* 1926;29:31–40.
- [6] E3M Association d'entraide aux malades de myofascite à macrophages. 2015. <http://www.asso-e3m.fr/>.
- [7] Association des victimes du vaccin hépatite B (REVAHB). 2016. <http://www.revahb.fr/>.
- [8] Gherardi RK. Toxic story: deux ou trois vérités embarrassantes sur les adjuvants des vaccins. Paris: Actes sud; 2016.
- [9] Sansonetti P. Vaccins. Paris: Odile Jacob; 2017.
- [10] Vaccine papers. <http://www.vaccinepapers.org/>.
- [11] InVS-Afssa-Afssaps. Aluminium. Quels risques pour la santé ? Synthèse des études épidémiologiques; 2003 http://www.invs.santepubliquefrance.fr/publications/2003/aluminium/rapport_alu.pdf.
- [12] Haut Conseil de Santé Publique. Aluminium et vaccins; 2013 <http://www.hcsp.fr/>.
- [13] Académie nationale de pharmacie. Les adjuvants aluminiums; 2016 http://www.acadpharm.org/dos_public/Rapport_Adjuvants_aluminiques_VF.CORR.5.pdf.
- [14] Groupe d'études sur la vaccination;1; Assemblée Nationale. Les 11 recommandations; 2012 http://www.alis-france.com/download/Groupe_etudes_vaccins.pdf.
- [15] Office parlementaire d'évaluation des choix scientifiques et technologiques (OPECST), <http://www.ladocumentationfrancaise.fr> Les adjuvants vaccinaux: une question controversée; 2014 [Rapports publics].
- [16] Richards S, Chalkiadis G, Lakshman R, Buttery JP, Crawford NW. Complex regional pain syndrome following immunisation. *Arch Dis Child* 2012;97:913–5, <http://dx.doi.org/10.1136/archdischild-2011-301307>.
- [17] Report of the working group on the possible relationship between hepatitis B, vaccination and the chronic fatigue syndrome. *CMAJ* 1993;149:314–9.
- [18] Jastaniah WA, Dobson S, Lugsdin JG, Petty RE. Complex regional pain syndrome after hepatitis B vaccine. *J Pediatr* 2003;143:802–4, [http://dx.doi.org/10.1067/S0022-3476\(03\)00536-5](http://dx.doi.org/10.1067/S0022-3476(03)00536-5).
- [19] Brinth L, Pors K, Hoppe AAG, Badreldin I, Mehlsen J. Is chronic fatigue syndrome/myalgic encephalomyelitis a relevant diagnosis in patients with suspected side effects to human papilloma virus vaccine? *Int J Vaccines Vaccination* 2015;1, <http://dx.doi.org/10.15406/ijvv.2015.01.00003>.
- [20] Brinth LS, Pors K, Theibel AC, Mehlsen J. Orthostatic intolerance and postural tachycardia syndrome as suspected adverse effects of vaccination against human papilloma virus. *Vaccine* 2015;33:2602–5, <http://dx.doi.org/10.1016/j.vaccine.2015.03.098>.
- [21] Gherardi RK, Coquet M, Cherin P, Belec L, Moretto P, Dreyfus PA, et al. Macrophagic myofasciitis lesions assess long-term persistence of vaccine-derived aluminium hydroxide in muscle. *Brain* 2001;124:1821–31.
- [22] Authier F-J, Sauvat S, Champey J, Drogou I, Coquet M, Gherardi RK. Chronic fatigue syndrome in patients with macrophagic myofasciitis. *Arthritis Rheum* 2003;48:569–70, <http://dx.doi.org/10.1002/art.10740>.
- [23] Bonnefont-Rousselot D, Chantalat-Auger C, Teixeira A, Jaudon M-C, Pelletier S, Cherin P. Blood oxidative stress status in patients with macrophagic myofasciitis. *Biomed Pharmacother* 2004;58:516–9, <http://dx.doi.org/10.1016/j.bioph.2004.04.012>.
- [24] Exley C, Swarbrick L, Gherardi RK, Authier F-J. A role for the body burden of aluminium in vaccine-associated macrophagic myofasciitis and chronic fatigue syndrome. *Med Hypotheses* 2009;72:135–9, <http://dx.doi.org/10.1016/j.mehy.2008.09.040>.
- [25] Shivan A, Hilton DA, Moate RM, Bond PR, Endean A. Macrophagic myofasciitis: a report of second case from UK. *Neuropathol Appl Neurobiol* 2012;38:734–6, <http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-2990.2012.01293.x>.
- [26] 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. *Immunol Res* 2016, <http://dx.doi.org/10.1007/s12026-016-88206-z>.
- [27] Agmon-Levin N, Zafir 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). *Immunol Res* 2014;60:376–83, <http://dx.doi.org/10.1007/s12026-014-8604-2>.
- [28] 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. *Intern Med* 2014;53:2185–200.
- [29] 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). *Immunol Res* 2016, <http://dx.doi.org/10.1007/s12026-016-8859-x>.
- [30] Martínez-Lavín M, Martínez-Martínez L-A, Reyes-Loyola P. HPV vaccination syndrome. A questionnaire-based study. *Clin Rheumatol* 2015;34:1981–3, <http://dx.doi.org/10.1007/s10067-015-3070-3>.
- [31] Santiago T, Rebelo O, Negrão L, Matos A. Macrophagic myofasciitis and vaccination: consequence or coincidence? *Rheumatol Int* 2015;35:189–92, <http://dx.doi.org/10.1007/s00296-014-3065-4>.
- [32] Blitshteyn S. Postural tachycardia syndrome following human papillomavirus vaccination. *Eur J Neurol* 2014;21:135–9, <http://dx.doi.org/10.1111/ene.12272>.
- [33] Chandler RE, Juhlin K, Fransson J, Caster O, Edwards IR, Norén GN. Current Safety Concerns with Human Papillomavirus Vaccine: A Cluster Analysis of Reports in Vigibase®. *Drug Saf* 2017;40:81–90, <http://dx.doi.org/10.1007/s40264-016-0456-3>.
- [34] Gonçalves AK, Cobucci RN, Rodrigues HM, de Melo AG, Giraldo PC. Safety, tolerability and side effects of human papillomavirus vaccines: a systematic quantitative review. *Braz J Infect Dis* 2014;18:651–9, <http://dx.doi.org/10.1016/j.bjid.2014.02.005>.
- [35] Exley C. Aluminium-based adjuvants should not be used as placebos in clinical trials. *Vaccine* 2011;29:9289, <http://dx.doi.org/10.1016/j.vaccine.2011.08.062>.
- [36] European Medicines Agency. Assessment report Human papilloma virus (HPV) vaccines; 2015.

Adjuvants aluminiques des vaccins : analyse critique des études toxicocinétiques de référence

11

- [37] Zureik M, Dray-Spira R, Miranda S, Collin C. Vaccins anti-HPV et risque de maladies auto-immunes: étude pharmacoépidémiologique (Rapport CNAM/ANSM); 2015.
- [38] Scheller NM, Svanström H, Pasternak B, Arnheim-Dahlström L, Sundström K, Fink K, et al. Quadrivalent HPV vaccination and risk of multiple sclerosis and other demyelinating diseases of the central nervous system. *JAMA* 2015;313:54–61.
- [39] Gøtzsche PC, Jørgensen KJ, Jefferson T, Aukem 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>.
- [40] Gherardi RK. Lessons from macrophagic myofasciitis: towards definition of a vaccine adjuvant-related syndrome. *Rev Neurol (Paris)* 2003;159:162–4.
- [41] Shoenfeld Y, Agmon-Levin N. Autoimmune/Inflammatory Syndrome Induced by Adjuvants (ASIA). *J Autoimmun* 2011;36:4–8, <http://dx.doi.org/10.1016/j.jaut.2010.07.003>.
- [42] Petrovsky N. Comparative safety of vaccine adjuvants: A Summary of current evidence and future needs. *Drug Safety* 2015;38:1059–74, <http://dx.doi.org/10.1007/s40264-015-0350-4>.
- [43] OMS. Relevé épidémiologique hebdomadaire, 29; 2004. p. 269.
- [44] Thompson BS, Chilton PM, Ward JR, Evans JT, Mitchell TC. The low-toxicity versions of LPS, MPL adjuvant and RC529, are efficient adjuvants for CD4+ T cells. *J Leukoc Biol* 2005;78:1273–80, <http://dx.doi.org/10.1189/jlb.0305172>.
- [45] Caulfield MJ, Shi L, Wang S, Wang B, Tobery TW, Mach H, et al. Effect of alternative aluminum adjuvants on the absorption and immunogenicity of HPV16 L1 VLPs in mice. *Hum Vaccine* 2007;3:139–45.
- [46] Exley C, Siesjö P, Eriksson H. The immunobiology of aluminum adjuvants: how do they really work? *Trends Immunol* 2010;31:103–9, <http://dx.doi.org/10.1016/j.it.2009.12.009>.
- [47] Marrack P, McKee AS, Munkys MW. Towards an understanding of the adjuvant action of aluminum. *Nat Rev Immunol* 2009;9:287–93, <http://dx.doi.org/10.1038/nri2510>.
- [48] Baylor NW, Egan W, Richman P. Aluminum salts in vaccines. A US perspective. *Vaccine* 2002;20(3):S18–23.
- [49] Eidi H, David M-O, Crépeaux G, Henry L, Joshi V, Berger M-H, et al. Fluorescent nanodiamonds as a relevant tag for the assessment of alum adjuvant particle biodistribution. *BMC Med* 2015;13, <http://dx.doi.org/10.1186/s12916-015-0388-2>.
- [50] Mold M, Shardlow E, Exley C. Insight into the cellular fate and toxicity of aluminium adjuvants used in clinically approved human vaccinations. *Sci Rep* 2016;6:31578, <http://dx.doi.org/10.1038/srep31578>.
- [51] Flarend RE, Hem SL, White JL, Elmore D, Suckow MA, Rudy AC, et al. In vivo absorption of aluminium-containing vaccine adjuvants using 26 Al. *Vaccine* 1997;15:1314–8.
- [52] Eickhoff TC, Myers M. Workshop summary. Aluminum in vaccines. *Vaccine* 2002;20(3):S1–4.
- [53] Oxford Vaccine Group, University of Oxford. Vaccine Knowledge Project. Authoritative information for All; 2015 <http://vk.ovg.ox.ac.uk/>.
- [54] Hem SL. Elimination of aluminum adjuvants. *Vaccine* 2002;20(3):S40–3.
- [55] Priest ND, Newton D, Day JP, Talbot RJ, Warner AJ. Human metabolism of aluminium-26 and gallium-67 injected as citrates. *Hum Exp Toxicol* 1995;14:287–93, <http://dx.doi.org/10.1177/096032719501400309>.
- [56] Talbot RJ, Newton D, Priest ND, Austin JG, Day JP. Inter-subject variability in the metabolism of aluminium following intravenous injection as citrate. *Hum Exp Toxicol* 1995;14:595–9, <http://dx.doi.org/10.1177/096032719501400707>.
- [57] Hutchison S, Benson RA, Gibson VB, Pollock AH, Garside P, Brewer JM. Antigen depot is not required for alum adjuvanticity. *FASEB J* 2012;26:1272–9, <http://dx.doi.org/10.1096/fj.11-184556>.
- [58] Seeber SJ, White JL, Hem SL. Solubilization of aluminium-containing adjuvants by constituents of interstitial fluid. *J Parenter Sci Technol* 1991;45:156–9.
- [59] Verdier F, Burnett R, Michelet-Habchi C, Moretto P, Fievet-Groyne F, Sauzeat E. Aluminium assay and evaluation of the local reaction at several time points after intramuscular administration of aluminium containing vaccines in the *Cynomolgus* monkey. *Vaccine* 2005;23:1359–67, <http://dx.doi.org/10.1016/j.vaccine.2004.09.012>.
- [60] Authier F-J, Sauvat S, Christov C, Chariot P, Raisbeck G, Poron M-F, et al. AlOH3-adjuvanted vaccine-induced macrophagic myofasciitis in rats is influenced by the genetic background. *Neuromuscul Disord* 2006;16:347–52, <http://dx.doi.org/10.1016/j.nmd.2006.02.004>.
- [61] 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. *Sci Rep* 2014;4:6287, <http://dx.doi.org/10.1038/srep06287>.
- [62] Erdohazi M, Newman RL. Aluminium hydroxide granuloma. *Br Med J* 1971;3:621–3.
- [63] Mrak RE. Muscle granulomas following intramuscular injection. *Muscle Nerve* 1982;5:637–9, <http://dx.doi.org/10.1002/mus.880050808>.
- [64] Slater DN, Underwood JC, Durrant TE, Gray T, Hopper IP. Aluminium hydroxide granulomas: light electron microscopic studies. X-ray microanalysis. *Br J Dermatol* 1982;107:103–8.
- [65] Morefield GL, Sokolovska A, Jiang D, HogenEsch H, Robinson JP, Hem SL. Role of aluminium-containing adjuvants in antigen internalization by dendritic cells in vitro. *Vaccine* 2005;23:1588–95, <http://dx.doi.org/10.1016/j.vaccine.2004.07.050>.
- [66] Cain DW, Sanders SE, Cunningham MM, Kelsoe G. Disparate adjuvant properties among three formulations of "alum". *Vaccine* 2013;31:653–60, <http://dx.doi.org/10.1016/j.vaccine.2012.11.044>.
- [67] Khan Z, Combadiere C, Authier F-J, Itier V, Lux F, Exley C, et al. Slow CCL2-dependent translocation of biopersistent particles from muscle to brain. *BMC Med* 2013;11:99.
- [68] Crépeaux G, Eidi H, David M-O, Tzavara E, Giros B, Exley C, et al. Highly delayed systemic translocation of aluminum-based adjuvant in CD1 mice following intramuscular injections. *J Inorg Biochem* 2015;152:199–205, <http://dx.doi.org/10.1016/j.jinorgbio.2015.07.004>.
- [69] Walker VR, Sutton RA, Meirav O, Sossi V, Johnson R, Klein J, et al. Tissue disposition of 26-aluminum in rats measured by accelerator mass spectrometry. *Clin Invest Med* 1994;17:420–5.
- [70] Afssaps. Rapport d'expertise: 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/>.
- [71] Mithrus RJ, King DB, Hess MA, Forshee RA, Walderhaug MO. Updated aluminum pharmacokinetics following infant exposures through diet and vaccination. *Vaccine* 2011;29:9538–43, <http://dx.doi.org/10.1016/j.vaccine.2011.09.124>.
- [72] Keith LS, Jones DE, Chou CHSJ. Aluminum toxicokinetics regarding infant diet and vaccinations. *Vaccine* 2002;20(3):S13–7.
- [73] Movsas TZ, Paneth N, Rumbelha W, Zyskowski J, Gewolb IH. Effect of routine vaccination on aluminum and essential element levels in preterm infants. *JAMA Pediatrics* 2013;167:870–2.
- [74] ATSDR (Agency for Toxic Substances and Disease Registry). Toxicological profile for aluminum. Atlanta, GA; 1999. <https://www.atsdr.cdc.gov/toxprofiles/tp22.pdf>.

- [75] Golub MS, Donald JM, Gershwin ME, Keen CL. Effects of aluminum ingestion on spontaneous motor activity of mice. *Neurotoxicol Teratol* 1989;11:231–5.
- [76] Centers for Disease Control Prevention (CDC). Recommended immunization schedule for persons aged 0 through 18 years; 2016 <https://www.cdc.gov/vaccines/schedules/hcp/imz/child-adolescent>.
- [77] Agency for Toxic Substances Disease Registry (ATSDR). Toxicological profile for aluminum. Atlanta: GA; 2008 [cdcinfo@cdc.gov].
- [78] Miodovnik A. Environmental neurotoxicants developing brain. *Mt Sinai J Med* 2011;78:58–77, <http://dx.doi.org/10.1002/msj.20237>.
- [79] Priest ND. 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* 2004;6:375–403, <http://dx.doi.org/10.1039/b314329p>.
- [80] Sharifi S, Behzadi S, Laurent S, Forrest ML, Stroeve P, Mahmoudi M. Toxicity of nanomaterials. *Chem Soc Rev* 2012;41:2323–43, <http://dx.doi.org/10.1039/c1cs1518f>.
- [81] Willhite CC, Karyakina NA, Yokel RA, Yerugadhati N, Wisniewski TM, Arnold IMF, et al. 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* 2014;44(4):1–80, <http://dx.doi.org/10.3109/10408444.2014.934439>.
- [82] Crépeaux G, Eidi H, David M-O, Baba-Amer Y, Tzavara E, Giros B, et al. Non-linear dose-response of aluminum hydroxide adjuvant particles: selective low dose neurotoxicity. *Toxicology* 2017;375:48–57, <http://dx.doi.org/10.1016/j.tox.2016.11.018>.
- [83] Golub MS, Germann SL. Long-term consequences of developmental exposure to aluminum in a suboptimal diet for growth and behavior of Swiss Webster mice. *Neurotoxicol Teratol* 2001;23:365–72.
- [84] Bilkei-Gorzo A. Neurotoxic effect of enteral aluminium. *Food Chem Toxicol* 1993;31:357–61.
- [85] 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;29:1069–79, <http://dx.doi.org/10.1016/j.neuro.2008.08.005>.
- [86] Sethi P, Jyoti A, Hussain E, Sharma D. Curcumin attenuates aluminium-induced functional neurotoxicity in rats. *Pharmacol Biochem Behav* 2009;93:31–9, <http://dx.doi.org/10.1016/j.pbb.2009.04.005>.
- [87] Cao Z, Yang X, Zhang H, Wang H, Huang W, Xu F, et al. Aluminum chloride induces neuroinflammation, loss of neuronal dendritic spine and cognition impairment in developing rat. *Chemosphere* 2016;151:289–95, <http://dx.doi.org/10.1016/j.chemosphere.2016.02.092>.
- [88] Alawdi SH, El-Denshary ES, Safar MM, Eidi H, David M-O, Abdel-Wahhab MA. Neuroprotective effect of nanodiamond in alzheimer's disease rat model: a pivotal role for modulating NF- κ B and STAT3 signaling. *Mol Neurobiol* 2016, <http://dx.doi.org/10.1007/s12035-016-9762-0>.
- [89] Martinez CS, Alterman CDC, Peçanha FM, Vassallo DV, Mello-Carpes PB, Miguel M, et al. Aluminum exposure at human dietary levels for 60 days reaches a threshold sufficient to promote memory impairment in rats. *Neurotox Res* 2017;31:20–30, <http://dx.doi.org/10.1007/s12640-016-9656-y>.
- [90] Gherardi RK, Eidi H, Crépeaux G, Authier FJ, Cadusseau J. Biopersistence and brain translocation of aluminum adjuvants of vaccines. *Front Neurol* 2015;6, <http://dx.doi.org/10.3389/fneur.2015.00004>.
- [91] Shaw CA, Li Y, Tomljenovic L. Administration of aluminium to neonatal mice in vaccine-relevant amounts is associated with adverse long-term neurological outcomes. *J Inorg Biochem* 2013;128:237–44, <http://dx.doi.org/10.1016/j.jinorgbio.2013.07.022>.