



Contents lists available at [ScienceDirect](#)

Journal of Inorganic Biochemistry

journal homepage: www.elsevier.com/locate/jinorgbio



Les injections d'hydroxyde d'aluminium entraînent des déficiences motrices et une dégénérescence des neurones moteurs

Christopher A. Shaw ^{a, b, c, i}, Michael S. Petrik ^c

^a Departments of Ophthalmology and Visual Sciences, University of British Columbia, Vancouver, British Columbia, Canada

^b Experimental Medicine, University of British Columbia, Vancouver, British Columbia, Canada

^c Graduate Program in Neuroscience, University of British Columbia, Vancouver, British Columbia, Canada

Article history:

Received 17 April 2009 Received in revised form 26 May 2009 Accepted 29 May 2009 Available online 20 August 2009

RESUME

Le Syndrome de la Guerre du Golfe (SGG) est un trouble multi systémique qui touche de nombreux anciens combattants des troupes occidentales ayant participé à la Guerre du Golfe dans les années 1990-1991. Un certain nombre de personnes affectées va ainsi développer des déficiences neurologiques comprenant divers dysfonctionnements cognitifs et une maladie du neurone moteur, cette dernière étant impossible à distinguer d'une sclérose latérale amyotrophique (SLA) classique, exception faite de l'âge du déclenchement de la maladie. Ce groupe de SLA est le second groupe de SLA décrit jusqu'à présent dans la littérature. Plusieurs des adjuvants présents dans le vaccin contre l'anthrax et autres vaccins peuvent expliquer le SGG. Le principal responsable semble en être l'hydroxyde d'aluminium. Dans une première série d'expériences, nous avons examiné la toxicité potentielle de l'hydroxyde d'aluminium chez les souris mâles CD-1 non consanguines, à qui nous avons administré, par injection sous-cutanée, une équivalence humaine de deux doses. À l'autopsie, des échantillons de moelle épinière et de cortex ont été examinés par immunohistochimie. Les souris traitées à l'aluminium ont montré une augmentation significative de l'apoptose des neurones moteurs ainsi qu'une augmentation des astrocytes réactifs et une prolifération des cellules microgliales dans la moelle épinière et le cortex. Le colorant Morin a démontré la présence d'aluminium dans le cytoplasme des neurones moteurs, et certains neurones ont également obtenu un résultat positif au test de présence d'hyperphosphorylation de la protéine tau, caractéristique pathologique de diverses maladies neurologiques dont la maladie d'Alzheimer et les démences fronto-temporales. Une deuxième série d'expériences a été menée sur des souris à qui l'on a injecté six doses d'hydroxyde d'aluminium. Les analyses de comportement chez ces souris ont révélé des altérations significatives d'un certain nombre de fonctions motrices ainsi qu'une diminution de la capacité de la mémoire spatiale. La neurotoxicité prouvée de l'hydroxyde d'aluminium et son ubiquité relative en tant qu'adjuvant semblent justifier une surveillance accrue de la part de la communauté scientifique.

© 2009 Elsevier Inc. All rights reserved.

1. Introduction

Différentes études ont établi une corrélation entre une affectation pendant la Guerre du Golfe (1990-1991) et le développement d'un trouble multi systémique communément appelé le Syndrome de la Guerre du Golfe (SGG). Le SGG comprend différents troubles neurologiques, parmi lesquels on note un certain nombre de cas ressemblant à des cas de sclérose latérale amyotrophique [1-4]. Haley [3] décrit les symptômes classiques de la SLA chez les anciens combattants de la guerre du Golfe comme la faiblesse musculaire et l'amaigrissement, les problèmes d'élocution et de déglutition, les difficultés respiratoires, la fasciculation, et ce, plusieurs années après avoir développé d'autres symptômes du SGG. Dix-sept militaires sur vingt diagnostiqués avec la maladie de la guerre du Golfe et formellement identifiés comme porteurs de SLA avaient moins de 45 ans, le plus jeune ayant 20 ans. La totalité des 20 patients présentaient des signes de dégénérescence des neurones moteurs supérieurs (cortex moteur ou zone bulbaire) et inférieurs (moelle épinière). Aucun de ces patients n'avait d'antécédents familiaux de SLA ou d'autres troubles neurodégénératifs. Horner et al. [2] ont mené une étude de cas sur l'ensemble du territoire dans le but d'identifier les niveaux de SLA sur la décennie qui a suivi le mois d'août 1990 au sein du personnel militaire en poste actif. Cent sept cas avérés de SLA ont été identifiés sur environ 2,5 millions de militaires éligibles. Mise à l'échelle de la population totale moyenne américaine en 1990, l'incidence moyenne annuelle de SLA parmi la population militaire non déployée était de 1,4 pour 100 000 personnes par an, comparativement à une incidence sur la population globale généralement acceptée de 1,5 pour 100 000. Le taux d'incidence de SLA parmi la population militaire déployée s'élevait à 3,6 pour 100 000 personnes par an. Weisskopf et al. [4] ont constaté une augmentation générale de SLA au sein des populations militaires américaines remontant à plusieurs décennies, quelles que soient les affectations géographiques.

Le SLA-SGG est l'un des deux groupes de SLA actuellement considérés comme remplissant les conditions de définition d'un groupe de maladie. La deuxième variante de la SLA est celle apparue sur l'île de Guam, pour la première fois décrite après la seconde guerre mondiale et appelée sclérose latérale amyotrophique-complexe de démence de la maladie de Parkinson (SLA-CDP). Cet éventail de troubles, présent avec des niveaux d'incidence plusieurs centaines de fois supérieurs aux niveaux relevés aux États-Unis continentaux (voir Kurland, 1988, pour référence), se traduisait de deux manières différentes. La première était une forme presque classique de SLA, la seconde une forme de maladie de Parkinson associée avec une démence de type Alzheimer (PDC). Environ 10% des victimes ont développé les deux troubles, le phénotype des SLA apparaissant généralement en premier. Les études axées sur l'étiologie potentielle se sont concentrées sur les facteurs environnementaux avec une attention particulière accordée à la consommation de graines contenant des toxines et issues de la variété locale des cycadales [6] ainsi que la présence élevée d'aluminium dans les sols du Sud de l'île de Guam [7].

En ce qui concerne le vaccin SGG-SLA AVA, l'attention a récemment été portée sur le vaccin adsorbé contre l'anthrax (AVA) et différents composants du vaccin, en particulier les adjuvants connus et suspectés que sont l'hydroxyde d'aluminium et le squalène [8]. Un adjuvant est une substance ajoutée au cours de la production d'un vaccin afin de renforcer la réponse immunitaire à un antigène [9]. Les composés de l'aluminium ont été identifiés comme adjuvants pour la première fois il y a plus de 90 ans. Actuellement, l'aluminium, sous formes diverses (hydroxyde d'aluminium, phosphate d'aluminium et sulfate d'aluminium) est l'adjuvant autorisé le plus courant dont l'utilisation est généralement considérée, aussi bien par l'industrie pharmaceutique que par les différentes agences de régulation gouvernementales, comme étant sans danger [10]. Diverses études n'ont pas trouvé d'effet à long terme ou nocif à la santé qui puisse être lié aux adjuvants à base d'aluminium [11-13] et la FDA américaine approuve régulièrement et depuis longtemps les utilisations de l'aluminium sous cette forme.

Malgré leur utilisation de longue date largement répandue, les interactions physico-chimiques entre les composés de l'aluminium et les antigènes restent relativement peu connues et leurs mécanismes sous-jacents peu étudiés [14]. Il semble également qu'il n'y ait eu aucune expérimentation animale rigoureuse portant sur la toxicité potentielle des adjuvants aluminiques. L'absence de ce genre d'études est étrange étant donné le consensus selon lequel l'aluminium en général peut être neurotoxique sous un certain nombre de conditions [15, 16], et en particulier les adjuvants qui ont été par le passé associés à des maladies neurologiques [17-19]. Le tableau 1 présente les résultats d'études préalables pour lesquelles les animaux avaient été traités à l'hydroxyde d'aluminium. Le tableau établit la liste des conséquences de ce traitement sur le système nerveux. En ce qui concerne l'utilisation de l'aluminium dans les vaccins, les valeurs LD₅₀ de l'hydroxyde d'aluminium n'ont pas encore, à notre connaissance, été publiées à ce jour (fiches de données de sécurité J.T. Baker).

La possibilité que les injections d'aluminium puissent provoquer la myofasciite à macrophages a également été émise dans la littérature [20-22].

Une publication précédente a examiné la toxicité potentielle de plusieurs adjuvants de vaccins connus et suspectés [8]. Dans la présente étude, nous nous concentrerons exclusivement sur les conséquences des injections d'hydroxyde d'aluminium sur les comportements moteurs et cognitifs et sur l'expression de différentes formes de neuropathologie chez une souris *in vivo*.

Tableau 1

Résumé des symptômes humains de la SLA et du SGG comparés aux symptômes observés chez les souris et les rats traités à l'aluminium. Ce tableau met également en lumière les similarités entre la SLA humaine et la maladie de la guerre du Golfe.

| Animal | Age | Dose | Type d'injection | Résultat | Référence |
|---|--------------|--|------------------|---|----------------------|
| Souris NIH femelles | 4 semaines | 315-335 µg/kg | i.p. | Niveaux d'Al notablement élevés dans le cerveau | Redhead et al., 1991 |
| Rats Long-Evan mâles et femelles | 2 mois | 100 ou 300 mg/kg/jour | orale | Capacité d'apprentissage notablement réduite et niveaux d'Al notablement élevés dans le cerveau | Bilkei-Gorzo, 1993 |
| Souris suisses albinos mâles | Non spécifié | ~20 µg/kg/jour | orale | Niveaux d'Al notablement élevés dans le cerveau, les reins et le foie | Sahin et al., 1994 |
| Souris Pzh :SFIS | Non spécifié | 1.0 mg toutes les 2 semaines ou 0.1 mg 5 jours/semaine | i.p. | Niveaux d'Al notablement élevés dans le foie et les tibias (os), mais pas dans le cerveau | Fiejka et al., 1996 |

2. Procédures expérimentales

2.1 Expérimentation animale

Dans notre étude initiale [8], nous avons utilisé des souris jeunes adultes (3 mois d'âge) mâles CD-1 (environ 35 g au début de l'expérience). Les animaux jeunes ont été délibérément choisis de manière à assurer une correspondance optimale avec l'âge typique des militaires en service durant la guerre du Golfe [3]. Pour les injections sous-cutanées (deux injections espacées de 2 semaines), quatre groupes ont été formés : « Phosphate Buffered Solution » (PBS) (n=10) ; hydroxyde d'aluminium (n=11) ; squalène (n=10) et hydroxyde d'aluminium et squalène (n=10). De ces séries d'expériences, la présente étude rendra compte uniquement des groupes traités à l'aluminium et des groupes contrôles. Une deuxième série d'expérience a été menée sur des souris CD-1 mâles de neuf mois ayant reçu six injections d'hydroxyde d'aluminium sur une période de deux semaines. Ces souris, ainsi que les groupes de contrôle et autres groupes traités (qui seront abordés ailleurs), ont été soumis à un régime de tests comportementaux plus rigoureux, décrit ci-dessous. Les analyses histologiques des moelles épinières et cerveaux de ces souris sont en cours.

Tous les animaux des deux expériences ont été individuellement mis en cage dans le centre de soins animaliers du Jack Bell Research Center à Vancouver, B.C., Canada. Une température ambiante de 22° C et un cycle de lumière de 12/12h ont été maintenus tout au long de l'expérience. Toutes les souris ont été nourries avec une alimentation pour souris Purina® et ont eu accès à de l'eau et de la nourriture *ad libitum*.

Les souris issues des deux expériences ont été euthanasiées par une surdose de halothane et une injection par perfusion transcardiale avec 4% de paraformaldéhyde (PFA). Les tissus du SNC ont été soumis à un examen histologique. Les moelles épinières et cerveaux fixés de toutes les souris ont été transférés dans une solution de 30% de sucre/PBS pendant une nuit puis congelés et placés à -80°C jusqu'au moment de la découpe. Tous les blocs de cerveaux et tissus de la moelle ont été placés dans un composé « optimal cutting temperature » (O.C.T) (Tissue-Tek Sakura, Zoeterwoude, Pays-Bas) puis coupés au cryostat en tranches coronales de 30 µm. Les moelles épinières ont été coupées en sections transversales de 25 µm. Les échantillons ont été cryoprotégés dans une solution de 30% d'éthylène glycol – 20% glycérol – phosphate de sodium dibasique et monobasique et sont restés congelés à -20°C jusqu'à leur utilisation.

2.2 Adjuvants

L'alhydrogel®, un gel d'hydroxyde d'aluminium (Al(OH)₃), a été utilisé comme source d'hydroxyde d'aluminium. Alhydrogel est fabriqué par Superfos Biosector a/s (Danemark) et acheté auprès de SIGMA Canada.

2.2.1 Dosage

Pour calculer les dosages humains approximatifs d'hydroxyde d'aluminium, nous nous sommes appuyés sur les informations suivantes : le vaccin humain AVA est fabriqué par Bioport Corporation, Lansing, Michigan. Selon les fiches techniques des produits du Michigan Biologic Products Institute (MBPI, Lansing, Michigan, USA ; prédécesseur de Bioport), une dose unique du vaccin AVA contient 2,4 mg d'hydroxyde d'aluminium (ce qui équivaut à 0,83 mg d'aluminium). Basé sur un poids moyen du corps humain de 70-80 kg, la quantité par kg de poids corporel serait d'environ 30-34 µg/kg. Les soldats ou civils vaccinés auraient reçu entre 30-34 µg/kg (1 injection) et jusqu'à environ 200 µg/kg dans le cas où six 6 injections ont été effectuées.

Pour les deux expériences, les injections d'adjuvants chez les souris traitées ont été ajustées en fonction du poids moyen de l'animal. Une souris CD-1 mâle de 3 mois pèse approximativement 35 g ; à 9 mois elle pèse environ 50 g. Pour la première expérience, nous avons réalisé deux injections d'un gel d'hydroxyde d'aluminium (50µg/kg) dans un volume total de 200 µL de PBS stérile (0,9%), espacées de deux semaines. Pour cette expérience, les souris ont donc reçu 100 µg/kg, contre probablement 68 µg/kg chez les humains. Pour la deuxième expérience, les souris ont reçu six injections d'hydroxyde d'aluminium pour un total de 300 µg/kg sur deux semaines. Dans les deux cas, les groupes contrôles se sont vus administrer 200 µL de PBS.

Pour les êtres humains, la zone d'injection sous-cutanée est généralement située au niveau du muscle du deltoïde. Pour les souris, nous avons effectué une injection sous-cutanée sur la nuque afin de minimiser la gêne et de faciliter l'injection.

2.3 Tests de comportement

Dans la première étude, les souris étaient soumises, à intervalles réguliers, à des tests spécifiques de comportement des fonctions motrices et cognitives dont le test du filet métallique suspendu (2x/semaine), celui du champ ouvert (1x/semaine) et le test de la cuve d'eau (1x/semaine) sur une période de six mois suivant les injections (voir [22]). Pour chaque nouvel essai, les souris ont été testées dans un ordre aléatoire. Dans la deuxième étude, nous avons mené un examen comportemental plus détaillé basé sur le système automatisé EthoVison (Noldus Information Technology, Seattle, WA) utilisant une caméra vidéo et un logiciel de suivi (Noldus EthoVision[®] 3.1). Les mouvements individuels des souris ont été suivis pendant 5 minutes en champ ouvert, à intervalle d'une semaine. Le logiciel a permis la prise de mesures quantitatives d'une variété de fonctions motrices, parmi lesquelles la distance parcourue, le pourcentage du temps passé en mouvement, la vitesse et diverses autres. Ces dernières expériences ont continué pendant 28 semaines suivant la dernière injection.

2.4 Mesures histologiques

2.4.1 NeuN et caspase-3 active

Comme l'ont expliqué Petrik et al. [8], cinq souris issues de chaque groupe de traitement ont été utilisées. Pour chacune d'entre elles, plusieurs coupes de cerveau (n=3) et de moelle épinière (n=8), issues de zones différentes ont été examinées. Les niveaux d'intensité fluorescente des NeuN et caspase-3 active ont permis d'identifier, respectivement, l'apoptose des neurones et des cellules. Les zones d'intérêt ont été déterminées en utilisant des points de repère de cerveau de souris et la cible stéréotaxique de la moelle épinière [23,24]. Tous les échantillons ont été comptés de manière non biaisée grâce à un objectif 40x.

2.4.2 Choline acétyltransférase (ChAT) et protéine d'acide fibrillaire du glial (GFAP)

Comme l'ont expliqué Petrik et al. [8], l'anticorps ChAT a été utilisé pour identifier les neurones moteurs cholinergiques dans le cerveau et la moelle épinière [25,26]. La GFAP a permis le marquage des astrocytes réactifs.

2.4.3 Iba-1

Un anticorps polyclonal de lapin contre la molécule adaptatrice de liaison de calcium ionisé (Iba-1) (Wako, Richmond, VA, USA) a été utilisé pour colorer les microglies activées [29]. Pour l'immuno-marquage fluorescent de la Iba-1, le protocole de coloration était identique à celui utilisé pour le marquage de GFAP, à l'exception des modifications suivantes : les coupes ont été incubées dans un anticorps primaire lapin-anti-Iba-1 (PBST avec 1%NGS + 1%BSA, dilution à 1 :1000) à 4°C pour une nuit. Les coupes ont été ensuite incubées dans un anticorps secondaire anti-lapin AlexaFluor 546™ pendant 2 heures à température ambiante (Molecular Probes, Eugene, OR, 1 :200).

2.4.4 Morin (3, 5, 7, 2', 4'-pentahydroxyflavone, BDH)

Le colorant Morin (M4008-2G, Sigma) est un fluorochrome formant un groupement fluorescent, l'aluminium apparaissant en vert fluorescent quand il est présent (longueur d'onde d'excitation de 420 nm) [15,30]. Pour les expériences de cette étude, le test fluorescent Morin de présence d'aluminium a été utilisé afin de visualiser et de détecter l'aluminium dans la moelle épinière lombaire et les autres tissus du SNC. Le colorant Morin a été utilisé comme solution à 0,2% dans 85% d'alcool éthylique contenant 0,5% d'acide acétique. Les échantillons préparés ont tout d'abord tous été lavés à deux reprises, pendant 5 min, avec du PBS. Ils ont ensuite été pré-traités pendant 10 min dans une solution aqueuse d'acide chlorhydrique à 1%, rincés dans une eau doublement distillée (ddH₂O) à deux reprises pendant 5 min, puis immergés dans un colorant Morin à 0,2% pendant 10 min. Les échantillons ont ensuite été lavés à la ddH₂O deux fois pendant 5 min, déshydratés dans un alcool éthylique (EtOH) à 70%, 90% et 100% puis nettoyés avec du xylène à 100%. Tous les échantillons ont ensuite été préparés grâce au milieu de préparation Vectashield (Laboratoires Vector), fermés avec du vernis à ongle transparent puis séchés à l'air libre.

2.4.5 Marquage des protéines tau hyperphosphorylées

Le marquage des protéines tau hyperphosphorylées (Anti-Human PHF-Tau, Pierce Biotechnology, InC, Rockford, IL) a été réalisé grâce à la méthode non-fluorescente diaminobenzidine (DAB). Les coupes contenant des échantillons préparés de moelle épinière lombaire ont tout d'abord été rincées à double reprise au PBS (2 x 5 min) avant démasquage antigénique. L'action des peroxydases endogènes a été bloquée en utilisant 0,3% de peroxyde d'hydrogène mélangé à du méthanol pendant 20 min. Les coupes ont été rincées à deux reprises au PBS (2 x 5 min) avant blocage à température ambiante pendant 1h dans un sérum de blocage (M.O.M. peroxydase, cat # PK 2200, Laboratoires Vector, Inc., Burlingame CA) suivi d'un rinçage rapide dans du PBS et d'une incubation de 5 min dans une solution diluante M.O.M.. Le premier anticorps PHF-Tau a été dilué 100 fois dans la solution diluante M.O.M. et l'incubation a été faite à température ambiante durant 1h. Après l'étape d'incubation avec anticorps primaire, les coupes ont été rincées deux fois au PBS, puis incubées pendant 10 min dans le réactif IgG anti-souris biotinylé M.O.M. Les coupes ont été rincées au PBS avant l'incubation avec anticorps secondaire (kit Vectastain ABC Elite, cat # PK-6101) pendant une heure à température ambiante, puis incubées dans les réactifs Vectorstain ABC Elite pendant 30 minutes supplémentaires. Les coupes ont été de nouveau rincées une fois dans le PBS. Le développement des couleurs a été réalisé avec l'utilisation d'une solution Vector ImmPACT™ DAB (cat # SK-4105). Une fois la couleur désirée obtenue, les coupes ont été rincées au ddH₂O pendant 5 minutes et contre-colorées pendant 5 minutes dans du vert de méthyle. Après la contre-coloration, les coupes ont été brièvement rincées au ddH₂O, deux bains d'éthanol 95% et deux bains d'éthanol 100%. Les coupes ont séchées avant d'être préparées en milieu de montage Permount® (Fischer Scientific, Faire Law, NJ).

2.5 Microscopie

Les échantillons de cerveau et de moelle osseuse traités avec des anticorps fluorescents ou DAB ont été examinés à l'aide d'un microscope Zeiss Axiovert 200M (Carl Zeiss Canada Limited, Toronto, ON, Canada) et un grossissement 40x et 100x (immersion huile). Le DAPI (fluorescence bleue) a été observé avec un filtre 359/461 nm absorption/émission. L'Alexa Fluor 546™ (rouge) et IgG de lapin DuoLuX™ (rouge) ont été observés avec un filtre 556 557/572 573 nm. L'FITC a été observé avec un filtre 490 494/520 525 nm. Les coupes de cerveaux et de moelle épinière lombaire destinées à l'analyse histologique ont été choisies de manière aléatoire dans chaque groupe. Au comptage et grâce à un grossissement de 40 fois, deux images par coupe de moelle épinière ont été enregistrées : ventral gauche, ventral droit. Les images grossies 40 fois mesuraient 350 x 275 µm et les images 100x50x115 µm. Les images ont été enregistrées grâce au logiciel AxioVision 4.3.

2.6 Critères d'identification et de comptage des cellules marquées

En ce qui concerne le comptage, seules ont été prises en compte les cellules bénéficiant d'une bonne mise au point et se situant entièrement dans le champ de vision. Afin d'écartier toute probabilité qu'une cellule soit comptabilisée à deux reprises, pour chaque analyse histologique, les lamelles ont été sorties d'un seul récipient à la fois de la boîte d'échantillons afin de garantir un espacement d'au moins 250 μm entre chaque coupe. Les régions d'intérêt pour le comptage cellulaire ont été définies grâce à l'utilisation de points de repère et de points de référence issus de la moelle épinière de souris et de l'atlas stéréotaxique du cerveau [39,40]. Dans la moelle épinière, seules les cellules en position antérieure au canal central et au fond de l'apex, à l'endroit où la substance grise et blanche se joignent ont été considérées comme faisant partie des cornes ventrales. Inversement, seules les cellules postérieures au canal central et au fond de l'apex ont été considérées comme faisant partie des cornes dorsales. Ces critères ont été appliqués quel que soit l'échantillon de moelle examiné. Pour le cerveau, seules les cellules trouvées dans les structures cérébrales correspondantes ont été comptabilisées. Toutes les coupes ont été comptées de manière non biaisée (un code a été assigné à chacun des animaux pour des raisons de suivi mais ne révélait aucune information sur le traitement suivi par l'animal).

2.7 Statistiques

Pour chaque souris, les valeurs tirées des tests individuels et des comptages cellulaires ont permis de calculer la moyenne \pm SEM pour chaque groupe et chaque condition. Les valeurs comportementales et le comptage des cellules ont été normalisés selon la moyenne des contrôles. Les moyennes ont été comparées grâce à l'analyse de variance à un ou deux facteurs (Statistica, Statsoft Inc., Tulsa, OK ; GraphPad Prism, San Diego, CA).

3. Résultats

Contrairement à l'étude menée par Petrik et al. [8] qui montrait une perte des neurones moteurs ChAT-positifs dans la moelle lombaire des souris traitées à l'hydroxyde d'aluminium, il n'y a pas eu de différence significative dans le marquage ChaT ou le comptage des neurones moteurs, ni dans la région cervicale, ni dans la zone thoracique de la moelle épinière (Fig. 1A et B). Cependant, le groupe ayant subi des injections d'aluminium présentait une augmentation significative des astrocytes positives au GFAP (70%) dans la région cervicale de la moelle épinière. Ces résultats de GFAP vont dans le sens des résultats préalablement obtenus pour la moelle lombaire.

Le marquage Iba-1 a fait apparaître des niveaux élevés significatifs de microglie active dans la moelle osseuse lombaire chez les animaux ayant subi des injections d'aluminium (111%), comparativement aux contrôles (Fig. 1E). Pour cette étude, les autres régions de la moelle n'ont pas subi de test à la microglie.

Seules les souris ayant reçu des injections d'hydroxyde d'aluminium ont présenté une réaction significative au colorant dans la moelle épinière lombaire comparativement aux contrôles (Fig. 2A-E). Inversement, seules les souris ayant subi des injections d'aluminium présentaient une présence anormale de protéine tau dans les neurones moteur du cordon lombaire (Fig. 3). Pour cette étude, les autres régions du cordon n'ont pas subi de test au colorant Morin et à la protéine tau.

Les multiples injections d'hydroxyde d'aluminium de l'expérience 2 ont montré des effets profonds sur la motricité et les autres comportements comme il a été illustré dans les Fig. 4 et 5. Des injections multiples d'aluminium ont provoqué d'importants changements de comportement, parmi lesquels des modifications du comportement locomoteur (Fig.4), et entraîné des déficiences de la mémoire au test de la cuve d'eau (Fig.5). Les autres analyses du comportement, comme la force musculaire et endurance, mesurées par le test du filet métallique suspendu, ainsi que la coordination motrice et l'équilibre, mesurées par rotarod, n'ont pas été affectées de manière significative.

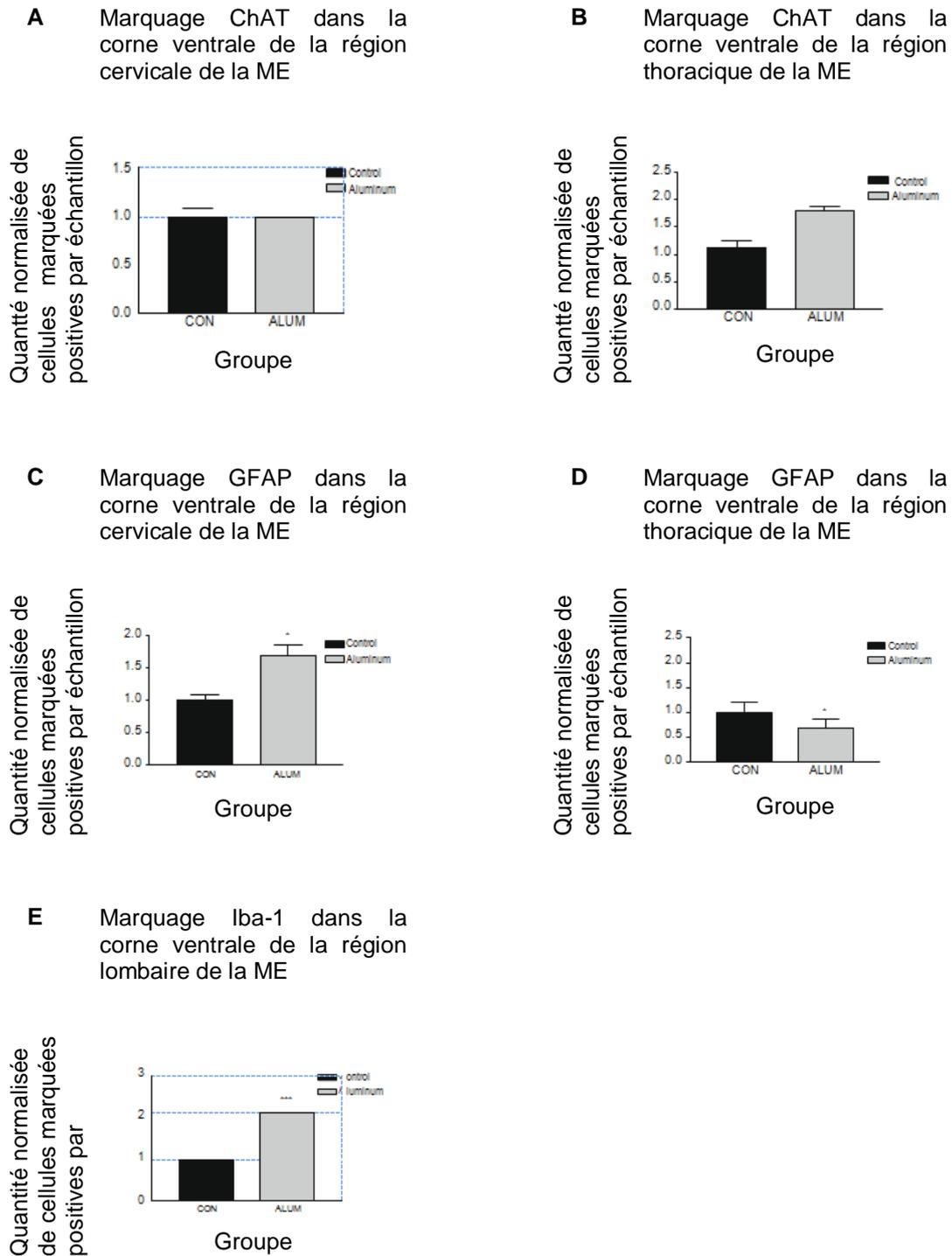


Fig 1. Impact de l'hydroxyde d'aluminium sur différentes régions de la moelle épinière (ME). (A et B) Respectivement, marquage ChAT dans les régions cervicales et thoraciques. (C et D) Respectivement, quantité normalisée pour marquage GFAP d'astrocytes réactives dans les régions cervicale et thoracique de la moelle épinière. Dans la région cervicale, les groupes traités à l'hydroxyde d'aluminium présentaient des niveaux plus élevés au marquage GFAP, le groupe traité à l'aluminium seul étant statistiquement le plus significatif. (E) Marquage fluorescent Iba-1 dans la corne ventrale de la moelle épinière de la souris indiquait que les souris injectées à l'aluminium ont vu leur nombre de microglies actives s'accroître de manière significative. Les données sont des moyennes +/- S.E.M.. $p < 0,001$, analyse de variance à un facteur (*one-way ANOVA*).

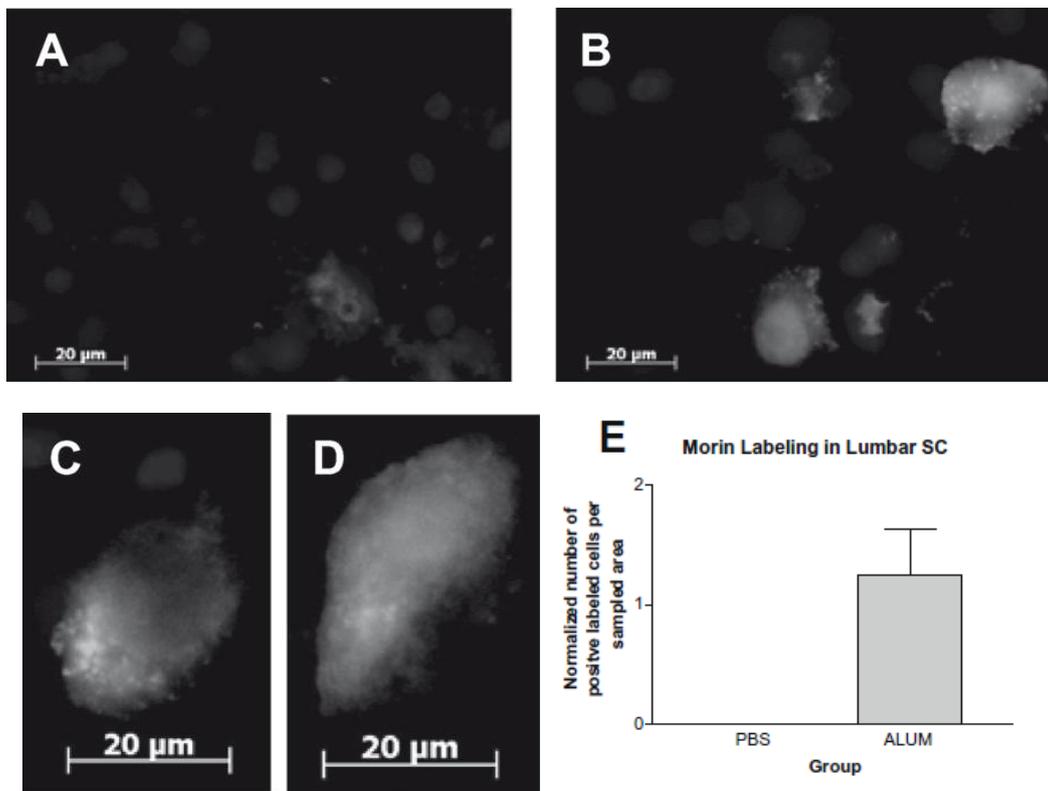


Fig 2. Marquage fluorescent Morin dans la corne ventrale de la moelle épinière lombaire de souris. Les échantillons du groupe contrôle (A) ne présentaient aucun marquage Morin fluorescent. Echelle = 20 μ m. (B) Neurones moteur positifs au colorant Morin chez les souris traitées à l'hydroxyde d'aluminium. (C et D) Croissance accrue des neurones moteurs chez les souris traitées à l'aluminium présentant des niveaux élevés de marquage cytoplasmique Morin. Echelle = 20 μ m. (E) Comptage des cellules positives au colorant Morin au sein des différents groupes de traitement (n = 4 souris/groupe, 4 sections chacun). Les données sont une moyenne \pm S.E.M. Les analyse de variance à un facteur (*one-way ANOVA*) révèlent un niveau élevé de $p < 0,05$.

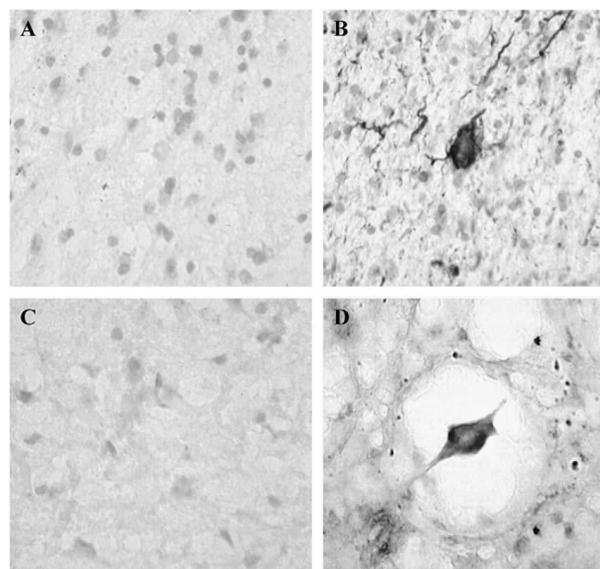


Fig 3. Immunomarquage des Tau-hyperphosphorylées dans la corne ventrale de la moelle épinière lombaire de souris comparé à la maladie d'Alzheimer. (A) Echantillon de cortex entorhinal humain prélevé sur un patient contrôle. (B) Echantillon de cortex entorhinal humain prélevé sur un patient atteint de la maladie d'Alzheimer (échantillons gracieusement fournis par le Dr. P. McGeer). (C) Echantillon de moelle épinière lombaire issu d'une souris injectée à la saline. (D) Echantillon équivalent provenant d'une souris injectée à l'hydroxyde d'aluminium. Toutes les photographies : grossissement x100.

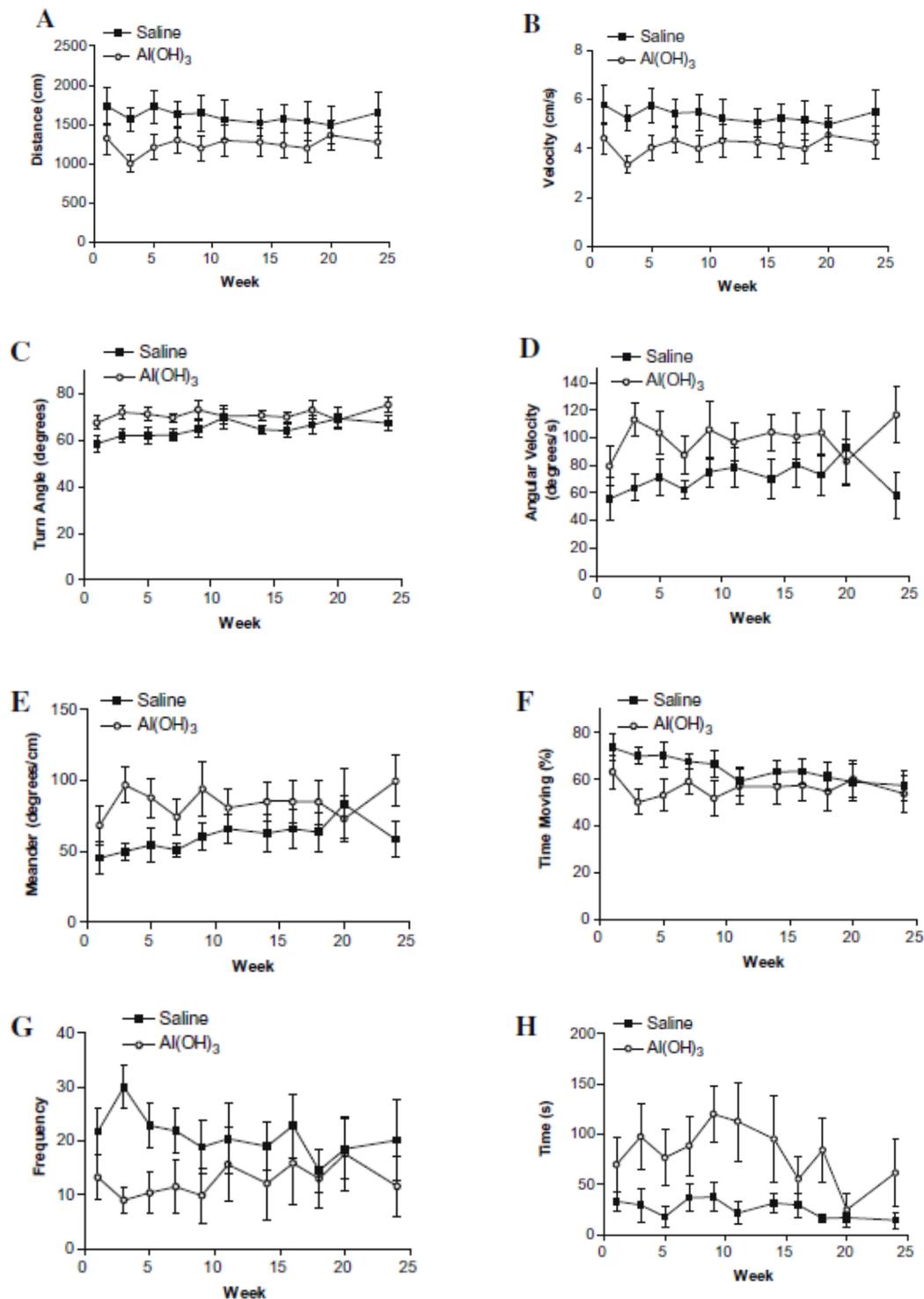


Fig 4. Analyse des comportements en terrain ouvert comme outil d'évaluation de l'activité spontanée et de l'anxiété chez les souris contrôles et les souris injectées à 6 reprises avec de l'hydroxyde d'aluminium. Les souris ayant reçu des injections d'hydroxyde d'aluminium présentaient les modifications comportementales suivantes : (A) distances parcourues plus courtes ($***p < 0,0001$). (B) mouvements plus lents ($***p < 0,0001$). (C) angle de déplacement circulaire moyen plus élevé ($***p < 0,0001$). (D) vitesse de déplacement circulaire plus élevée ($***p < 0,0001$). (E) déplacement sans but précis plus important ($***p < 0,0001$). (F) pourcentage de durée en mouvement par rapport au temps total plus faible ($**p = 0,0030$). (G) nombre de passages au centre du terrain ouvert inférieur ($***p < 0,001$). (H) entrée au centre du terrain décalée dans le temps ($***p < 0,001$). (Pour toutes les mesures, analyse de variance à deux facteurs (two-way ANOVA)).

4. Analyse

Les résultats actuels viennent prolonger les précédents résultats de Petrik et al. [8] en montrant que l'activation des microglies est une pathologie sous-jacente dans la moelle lombaire. Ces données s'ajoutent à celles rapportées précédemment, c'est à dire la perte de neurones moteurs et autres neurones et l'activation des astrocytes réactifs. Si l'on prend en compte les nouvelles données, l'activation globale de la réponse inflammatoire du glial dans la moelle lombaire indique que ce processus est une étape précoce clé des manifestations pathologiques conduisant à la mort des neurones moteurs. Cette explication s'appuie sur l'absence de perte de neurones moteurs et d'activation des astrocytes dans les autres niveaux de la moelle épinière, observée dans cette étude. Pour la SLA et l'exemple animal de la maladie, l'activation des cellules gliales suivie par la mort des neurones moteurs semble souvent continuer de manière séquentielle le long de l'axone ventral, les premiers signes de la pathologie apparaissant tout d'abord dans la moelle lombaire [31]. De ce fait, il semble possible que l'analyse de l'évolution des données présente également des signes pathologiques dans les segments thoraciques et cervicaux. Autrement, l'aluminium se trouvant présent dans les neurones moteurs du cordon lombaire n'aurait peut-être pas atteint ces autres segments de la moelle épinière. Des études actuellement en cours détermineront si les neurones moteurs dans ces segments se révèlent positifs à l'aluminium.

La réaction positive au colorant Morin dans la moelle lombaire montre clairement que l'aluminium après injection pénètre dans cette partie du système nerveux. Une hypothèse serait qu'elle y réussit par le biais d'un transport rétrograde des muscles aux neurones moteurs dans des segments spécifiques.

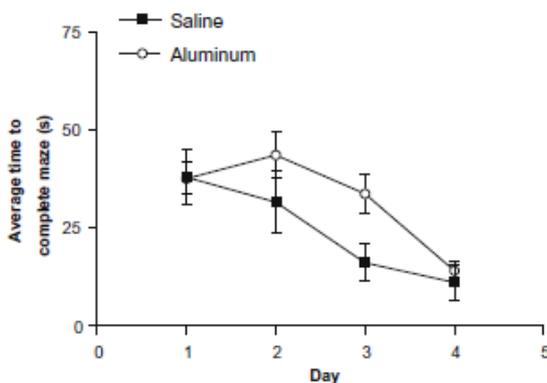


Fig 5. Test de la cuve d'eau, outil d'évaluation de l'apprentissage et de la mémoire. Les souris ayant reçu à 6 reprises une injection d'hydroxyde d'aluminium prenaient généralement plus longtemps pour sortir de la cuve, comparativement aux souris sous injection saline (Analyse de variance à deux facteurs. $p=0.0389$).

Cela semble peu probable compte tenu de notre paradigme selon lequel les injections sous-cutanées ne devraient pas avoir ciblé un segment spécifique de la moelle épinière. Une autre hypothèse est que l'aluminium peut s'introduire dans le SNC de façon systémique s'il pénètre dans le système circulatoire. Des expériences en cours ont pour but de définir quelle serait l'hypothèse la plus probable.

La présence de la protéine Tau-hyperphosphorylée, une des caractéristiques de la maladie d'Alzheimer et de la SLA-CDP de Guam, dans les neurones moteurs de la moelle épinière lombaire, indique clairement que des processus pathologiques supplémentaires associés avec l'aluminium apparaissent.

Les résultats comportementaux de la seconde expérience viennent confirmer les conclusions pathologiques des premières études. Alors que les mesures histologiques de ces expériences sont encore en attente, l'étendue des troubles de comportement indique fortement que nous constaterons des pathologies neuronales étendues. La majeure partie des résultats comportementaux de cette expérience peut être liée au paradigme expérimental qui a triplé le nombre d'injections d'hydroxyde d'aluminium.

D'une manière générale, les résultats rapportés ici vont dans le sens des travaux antérieurs qui démontraient clairement que l'aluminium, qu'il soit administré par voie orale ou par injection, peut être neurotoxique [15, 16, 32, 33]. Les mécanismes potentiels d'action toxique de l'aluminium peuvent inclure une augmentation de l'inflammation (c'est à dire microgliose) et une interférence avec les protections cholinergiques [34], un usage réduit du glucose [33], des anomalies dans les réactions de phosphorylation

ou déphosphorylation [35], une modification du taux de transport transmembranaire et des modifications sélectives des systèmes saturables de transport dans la barrière hémato-encéphalique (BHE) [36], ainsi que des dommages oxydants sur les processus cellulaires par inhibition du système redox du glutathion [37].

De ce fait, il n'est pas surprenant que l'aluminium ait été largement considéré comme un facteur de maladies neurodégénératives et se soit trouvé associé à des neurones dégénérés dans les régions spécifiques du SNC [38-41]. Dans les études animales, l'aluminium a été associé à l'accumulation de protéines tau et protéines bêta-amyloïde et identifié comme cause d'apoptose des neurones *in vivo* et *in vitro*³⁰. Les animaux ayant subi des injections d'aluminium présentaient une sévère dégénérescence antérograde des terminaux cholinergiques dans le cortex et l'hippocampe [42].

L'aluminium, sous sa forme d'adjuvant, peut atteindre le SNC [42-44]. Cependant, une administration orale de gel d'hydroxyde d'aluminium ne semble pas être neurotoxique pour les êtres humains [45], bien que le chlorure d'aluminium le soit pour les rats. Le biais de l'exposition et peut-être également la forme d'aluminium peuvent constituer des facteurs importants déterminant une potentielle toxicité.

Nous supposons que les effets neurotoxiques de l'hydroxyde d'aluminium observés dans la présente étude émanent de voies « directes » et « indirectes », certains d'entre eux étant cités ci-dessus. La toxicité directe se réfère à la présence physique (ou la proximité) de l'aluminium et sa probabilité à initier des voies de mort cellulaire. L'accumulation de l'aluminium dans le cytoplasme via des mécanismes d'absorption cellulaire ou de diffusion peut engendrer des transformations de la glutaminase et de la glutamine-synthétase et altérer facilement la disponibilité du neurotransmetteur glutamate [47]. L'aluminium causant une accumulation anormale de protéines tau peut également augmenter les enchevêtrements neurofibrillaires et détériorer les mécanismes de transport cellulaire [48]. Hormis les cellules, l'aluminium peut affecter les neurones en altérant les synapses. L'aluminium a par exemple été présenté comme réduisant la grosseur de la densité post-synaptique, augmentant la taille de la fente synaptique et le nombre de synapses plats [49]. L'aluminium peut également bloquer les canaux calciques activés par voltage [50], augmenter l'activité des acétylcholinestérases [51] ou interférer avec la transmission synaptique en s'accumulant simplement dans la fente synaptique [52]. L'aluminium peut également provoquer l'apoptose des astrocytes [53]. Dans la mesure où les astrocytes sont essentiels au maintien de la santé neuronale, toute perte de fonction des astrocytes peut se révéler toxique pour les neurones. La toxicité indirecte de l'aluminium peut se manifester de différentes manières : soit en activant différentes cytokines [54], en débloquent une cascade excitotoxique de glutamate ou en modifiant différentes voies enzymatiques [55].

En plus des mécanismes décrits ci-dessus touchant spécifiquement les cellules neurales, l'aluminium peut agir indirectement en stimulant des réponses immunitaires anormales et généralisées. C'est en fait le rôle initial qui a été donné aux adjuvants intégrés aux vaccins. La neurotoxicité des adjuvants pourrait donc être le résultat d'une réponse immunitaire déséquilibrée. Rook et Zumla [56] ont émis l'hypothèse que de multiples vaccinations, le stress et la méthode de vaccination pouvaient engendrer une mutation des réponses immunitaires [56, 57]. L'hydroxyde d'aluminium a été identifié comme stimulant une réponse des cytokine-Th2 [9, 58].

Alors que les résultats actuels et les études précédentes ont fait apparaître des conséquences comportementales et neuropathologiques significatives dues à l'hydroxyde d'aluminium et quelques autres résultats importants dus à l'alliance des adjuvants, il est important de reconnaître que ceux-ci ont été obtenus dans des conditions minimales. Le tableau 1 résume des types de symptômes de la SLA chez l'homme et du SGG comparativement aux résultats observés chez les souris ayant subi des injections d'aluminium. Il existe une probabilité qu'un effet synergique entre les adjuvants et d'autres variables telles que le stress, les vaccinations multiples et l'exposition à d'autres toxines se produisent. Une étude récente examinant certains de ces facteurs combinés a montré que le stress, la vaccination et le bromure de pyridostigmine (un inhibiteur carbamate anticholinestérasique (AChE)), peuvent, de manière synergique, agir sur de multiples kinases activés par le stress dans le cerveau et causer des déficiences neurologiques chez les patients atteints du SGG [59]. De plus, le patrimoine génétique, dans le contexte d'exposition à l'aluminium, peut jouer un rôle majeur et devenir un domaine de recherche important pour l'avenir.

La présentation des résultats neuropathologiques et des troubles de comportement chez les souris ayant reçu des injections d'hydroxyde d'aluminium peut fournir des informations sur les causes non seulement de SGG-SLA, mais peut aussi ouvrir des voies de recherche pour d'autres maladies neurologiques.

4. Abréviations

| | |
|---------|--|
| ChE | Anticholinestérase |
| SLA-CDP | Sclérose latérale amyotrophique-complexe de démence de la maladie de Parkinson |
| AVA | Vaccin adsorbé contre l'anthrax |
| ASB | Albumine de sérum bovin |
| PAFG | Protéine acide fibrillaire gliale |
| ChAT | Choline acétyltransférase |
| SGG | Syndrome de la guerre du Golfe |
| SNC | Sérum normal de chèvre |
| OCT | optimum cutting temperature |
| PBST | Tampon phosphate salin – Tween 20 |
| PFA | Paraformaldéhyde |

Approbation éthique de l'expérimentation animale

Les protocoles régissant l'utilisation des animaux ont été approuvés par les comités de surveillance de l'Université de la Colombie-Britannique et sont conformes aux directives publiées par le Conseil canadien de protection des animaux et les directives internationales, parmi lesquelles le Guide pour les soins et l'utilisation des animaux de laboratoire publié par le NIH, ainsi que les directives du conseil CEE.

Conflit d'intérêts

Aucun des auteurs n'a reçu de subventions ou financements de la part de Bioport, Chiron, Corixa ou aucune autre entreprise pharmaceutique citée dans cet article.

Remerciements

Ce travail a été soutenu par des subventions de la Scottish Rite Charitable Foundation Of Canada et le Conseil de recherche en sciences naturelles et en génie du Canada (CAS). Nous remercions le Dr. Meryl Nass (Mount Desert Island Hospital, Maine, États-Unis) et le Lt. Col. John A. Richardson (USAFR, ret.) pour leurs précieuses observations et contributions apportées à ce projet et au manuscrit.

Références

- [1] F. Charatan, *BMJ* 324 (2002) 65.
- [2] R.D. Horner, K.G. Kamins, J.R. Feussner, S.C. Grambow, J. Hoff-Lindquist, Y. Harati, H. Mitsumoto, R. Pascuzzi, P.S. Spencer, R. Tim, D. Howard, T.C. Smith, M.A. Ryan, C.J. Coffman, E.J. Kasarskis, *Neurology* 61 (2003) 742–749.
- [3] R.W. Haley, *Neurology* 61 (2003) 750–756.
- [4] M.G. Weisskopf, E.J. O'Reilly, M.L. McCullough, E.E. Calle, M.J. Thun, M. Cudkowicz, A. Ascherio, *Neurology* 64 (2005) 32–37.
- [5] L.T. Kurland, *Trends Neurosci.* 11 (1988) 51–54.
- [6] M.G. Whiting, *Econ. Bot.* 17 (1963) 271–302.
- [7] R.M. Garruto, S.K. Shankar, R. Yanagihara, A.M. Salazar, H.L. Amyx, D.C. Gajdusek, *Acta Neuropathol. Berl.* 78 (1989) 210–219.
- [8] M.S. Petrik, M.C. Wong, R.C. Tabata, R.F. Garry, C.A. Shaw, *Neuromol. Med.* 9 (2007) 83–100.
- [9] J.M. Brewer, M. Conacher, C.A. Hunter, M. Mohrs, F. Brombacher, J. Alexander, *J. Immunol.* 163 (1999) 6448–6454.
- [10] E.B. Lindblad, *Vaccine* 22 (2004) 3658–3668.
- [11] N.W. Baylor, W. Egan, P. Richman, *Vaccine* 20 (Suppl. 3) (2002) S18–S23.
- [12] G. Kanra, S. Viviani, K. Yurdakok, E. Ozmert, A. Anemona, S. Yalcin, O. Demiralp, N. Bilgili, A. Kara, A.B. Cengiz, B. Mutlu, A. Baldini, E. Marchetti, A. Podda, *Pediatr. Int.* 45 (2003) 314–318.
- [13] T. Jefferson, M. Rudin, C. Di Pietrantonj, *Lancet Infect. Dis.* 4 (2004) 84–90.

- [14] E.B. Lindblad, *Immunol. Cell Biol.* 82 (2004) 497–505.
- [15] D.R. Crapper, S.S. Krishnan, A.J. Dalton, *Science* 180 (1973) 511–513.
- [16] M. Kawahara, M. Kato, Y. Kuroda, *Brain Res. Bull.* 55 (2001) 211–217.
- [17] R.M. Garruto, R. Yanagihara, D.C. Gajdusek, *Neurology* 35 (1985) 193–198.
- [18] M. Wagner-Recio, A.D. Toews, P. Morell, *J. Neurochem.* 57 (1991) 1891–1901.
- [19] A. Bilkei-Gorzo, *Food Chem. Toxicol.* 31 (1993) 357–361.
- [20] F. Verdier, R. Burnett, C. Michelet-Habchi, P. Moretto, F. Fievet-Groyne, E. Sauzet, *Vaccine* 23 (2005) 1359–1367.
- [21] R.K. Kalil, A. Monteiro Jr, M.I. Lima, E.B. Silveira, F.S. Foltran, C.E. Martins, I.M. Rizzo, *Ultrastruct. Pathol.* 31 (2007) 45–50.
- [22] C. Exley, L. Swarbrick, R.K. Gherardi, F.J. Authier, *Med. Hypotheses* 72 (2009) 135–139.
- [23] R.L. Sidman, J.B. Angevine Jr., E.T. Pierce, *Atlas of the Mouse Brain and Spinal Cord*, Harvard University Press, Massachusetts, 1971.
- [24] G. Paxinos, K.B.J. Franklin, *The Mouse Brain in Stereotaxic Coordinates*, second ed., Academic Press, San Diego, 2001.
- [25] R. Wetts, J.E. Vaughn, *Exp. Neurol.* 141 (1996) 248–255.
- [26] A. Maatkamp, A. Vlug, E. Haasdijk, D. Troost, P.J. French, D. Jaarsma, *Eur. J. Neurosci.* 20 (2004) 14–28.
- [27] V.M. Lee, C.D. Page, H.L. Wu, W.W. Schlaepfer, *J. Neurochem.* 42 (1984) 25–32.
- [28] T. Tohyama, V.M. Lee, L.B. Rorke, J.Q. Trojanowski, *J. Comp. Neurol.* 310 (1991) 285–299.
- [29] Y. Imai, I. Iyata, D. Ito, K. Ohsawa, S. Kohsaka, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 224 (1996) 855–862.
- [30] U. De Boni, J.W. Scott, D.R. Crapper, *Histochemistry* 40 (1974) 31–37.
- [31] R.C. Tabata, J.M.B. Wilson, P. Ly, P. Zwiegers, D. Kwok, J.M. Van Kampen, N. Cashman, C.A. Shaw, *Neuromol. Med.* 10 (2008) 24–39.
- [32] W.A. Banks, A.J. Kastin, *Neurosci. Biobehav. Rev.* 13 (1989) 47–53.
- [33] J.G. Joshi, *Biofactors* 2 (1990) 163–169.
- [34] B. Platt, G. Fiddler, G. Riedel, Z. Henderson, *Brain Res. Bull.* 55 (2001) 257–267.
- [35] J.M. Cordeiro, V.S. Silva, C.R. Oliveira, P.P. Goncalves, *J. Inorg. Biochem.* 97 (2003) 132–142.
- [36] M. Kaya, R. Kalayci, N. Arican, M. Kucuk, I. Elmas, *Biol. Trace Elem. Res.* 92 (2003) 221–230.
- [37] N.J. Murakami, *J. Neurol.* 256 (Suppl. 2) (1999) II16–II18.
- [38] D.P. Perl, D.C. Gajdusek, R.M. Garruto, R.T. Yanagihara, C.J. Gibbs, *Science* 217 (1982) 1053–1055.
- [39] D.P. Perl, W.W. Penderbury, *Can. J. Neurol. Sci.* 13 (1986) 441–445.
- [40] J.K. Rao, C.D. Katsetos, M.M. Herman, J. Savory, *Clin. Lab. Med.* 18 (1998) 687–698.
- [41] J. Savory, R.M. Garruto, *Nutrition* 14 (1998) 313–314.
- [42] G.Y. Wen, H.M. Wisniewski, *Acta Neuropathol. (Berl)* 68 (1985) 175–184.
- [43] K. Redhead, G.J. Quinlan, R.G. Das, J.M. Gutteridge, *Pharmacol. Toxicol.* 70 (1992) 278–280.
- [44] G. Sahin, I. Varol, A. Temizer, K. Benli, R. Demirdamar, S. Duru, *Biol. Trace Elem. Res.* 41 (1994) 129–135.
- [45] G. Rosati, P. De Bastiani, P. Gilli, E. Paolino, *J. Neurol.* 223 (1980) 251–257.
- [46] J.R. Walton, *Neurosci. Lett.* 412 (2007) 29–33.
- [47] H.R. Zielke, M.J. Jackson, J.T. Tildon, S.R. Max, *Mol. Chem. Neuropathol.* 19 (1993) 219–233.
- [48] A. Bizzi, R.C. Crane, L. Autilio-Gambetti, P. Gambetti, *J. Neurosci.* 4 (1984) 722–731.
- [49] Y. Jing, Z. Wang, Y. Song, *Synapse* 15 (2004) 292–298.
- [50] D. Busselberg, B. Platt, H.L. Haas, D.O. Carpenter, *Brain Res.* 622 (1993) 163–168.
- [51] P. Zatta, M. Ibn-Lkhatay-Idrissi, P. Zambenedetti, M. Kilyen, T. Kiss, *Brain Res. Bull.* 59 (2002) 41–45.
- [52] E. Banin, H. Meiri, *Brain Res.* 423 (1987) 359–363.
- [53] D.A. Aremu, S. Meshitsuka, *Brain Res.* 1031 (2005) 284–296.
- [54] V.J. Johnson, R.P. Sharma, *Neurotoxicity* 24 (2003) 261–268.
- [55] P. Nayak, A.K. Chatterjee, *Food Chem. Toxicol.* 39 (2001) 1285–1289.
- [56] G.A. Rook, A. Zumla, *Lancet* 349 (1997) 1831–1833.
- [57] G.A. Rook, A. Zumla, *Hosp. Med.* 59 (1998) 10–11.
- [58] J.P. Valensi, J.R. Carlson, G.A. Van Nest, *J. Immunol.* 153 (1994) 4029–4039.
- [59] D. Wang, G. Perides, Y.F. Liu, *J. Neurochem.* 93 (2005) 1010–1020.

Le document ci-dessus a été traduit par :
Florence Ciret-Strecker, Ph.D, Professeur d'université
Titulaire d'un Doctorat de Littérature Française de l'Université de Tulane,
(La Nouvelle-Orléans, Etats-Unis)
Simmons College
300 the Fenway
Boston, MA 02115 – Etats-Unis
Tél. : (617) 960-7142
Email : ciret@simmons.edu

En ma qualité de professeur d'université, je certifie que le document ci-dessus est une traduction conforme à l'original qui m'a été fourni.

Florence Ciret-Strecker
Le 31 août 2011