

## ***Translocation systémique très retardée d'adjuvant à base d'aluminium chez des souris CD1 après injections intramusculaires***

Nom de la publication en Anglais : ***Highly delayed systemic translocation of aluminum-based adjuvant in CD1 mice following intramuscular injections***

Nom de la publication en Français : ***Translocation systémique très retardée d'adjuvant à base d'aluminium chez des souris CD1 après injections intramusculaires***

Publié en novembre 2015 dans la revue : Journal of Inorganic Biochemistry

Par les auteurs suivants :

Guillemette Crépeaux a, Housam Eidi a,b, Marie-Odile David b, Eleni Tzavara c, Bruno Giros c, Christopher Exley d, Patrick A. Curmi b, Christopher A. Shaw e, Romain K. Gherardi a, Josette Cadusseau a,f

a INSERM U955 E10, Paris Est University, Créteil, France

b INSERM U1204, Evry University, Evry, France

c INSERM U1130, CNRS UMR 8246, UPMC UM CR18, Paris, France

d Birchall Centre, Keele University, Staffordshire, UK

e Department of Ophthalmology, University of British Columbia, Vancouver, BC, Canada

f Faculté des Sciences & Technologie UPEC, Créteil, France

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

### **Résumé :**

Des préoccupations concernant l'innocuité des vaccins ont émergé suite au signalement d'événements indésirables potentiels chez l'homme et l'animal. Dans cette étude, de l'alun, un vaccin aluminique et l'alun marqué avec des nanodiamants fluorescents ont été utilisés pour évaluer i) la durée de persistance au site de l'injection, ii) la translocation de l'alun du site de l'injection vers les organes lymphoïdes et iii) le comportement des souris CD1 suite à l'injection intramusculaire de l'alun (400 µg d'Al/kg). Les résultats ont montré pour la première fois une translocation systémique des particules de l'adjuvant étonnamment retardée. Le granulome induit par l'alun est resté dans le muscle injecté pendant une très longue période malgré une rétraction progressive du jour 45 au jour 270. De manière concomitante, une translocation sensiblement retardée de l'alun dans les ganglions lymphatiques, maximale au jour 270 (fin de l'expérience), a été observée. La translocation vers la rate a été retardée de manière similaire (nombre de particules le plus élevé au jour 270). Contrairement aux souris C57BL/6J, aucune translocation de l'alun dans le cerveau n'a été observée au jour 270 chez les souris CD1. Aucune hausse du niveau d'Al dans le cerveau ni de changement comportemental n'ont été observés. Sur la base de précédents rapports présentant les effets neurotoxiques de l'alun chez les souris CD1, une expérience complémentaire a été menée, montrant une translocation précoce au jour 45 de l'alun injecté par voie sous-cutanée à 200 µg d'Al/kg. Cette étude confirme la biopersistance notable de l'alun. Elle met l'accent sur une diffusion retardée et inattendue de l'adjuvant dans les ganglions lymphatiques et la rate des souris CD1 et démontre l'importance de la souche de souris, de la voie d'administration et des doses pour les études futures se concentrant sur les effets toxiques potentiels des adjuvants à base d'aluminium.

## 1 Introduction

L'aluminium (Al) est le troisième élément le plus abondant dans la croûte terrestre et est présent de manière ubiquitaire dans notre vie quotidienne dans une grande variété d'objets (ustensiles de cuisine, emballage alimentaire, matériaux de construction, produits pharmaceutiques, cosmétiques, etc.). L'aluminium se trouve dans tous les fluides de notre organisme (sang, liquide céphalo-rachidien, liquide interstitiel cérébral, lymphes, sueur, liquide séminal et urine) [1]. Malgré l'utilisation répandue d'aluminium dans notre environnement conduisant à cette augmentation de sa biodisponibilité, l'aluminium n'a pas de rôle biologique connu [2].

En outre, il est largement admis que l'Aluminium (Al) et les composés aluminiques sont neurotoxiques pour les animaux et les humains [3, 4]. À titre d'exemple, l'exposition à l'Al a été impliquée dans la pathologie de plusieurs maladies neurodégénératives associées à des troubles cognitifs, telles que la maladie d'Alzheimer [5–7]. Les mécanismes moléculaires par lesquels les dommages neuronaux ont été causés ne sont pas compris dans leur totalité [8], mais il est généralement admis que le système nerveux est particulièrement sensible aux dommages oxydatifs [9] et que la neurotoxicité de l'Al est causée par sa capacité à augmenter le stress oxydant dans le cerveau [10].

Enfin, la biodisponibilité de l'Al, sa capacité à traverser la barrière hémato-encéphalique et son taux d'élimination du cerveau relativement faible contribuent à l'accumulation progressive d'Al dans le cerveau [11-13] et augmentent le risque neurotoxique [14].

Plusieurs maladies infectieuses graves peuvent être prévenues par les vaccins et certaines d'entre elles ont été éradiquées. En outre, de nouvelles stratégies de vaccination sont actuellement développées en tant que thérapies prometteuses pour venir à bout de maladies telles que le cancer. Néanmoins, bien que les vaccins soient fréquemment utilisés et de manière sécurisée et qu'ils soient généralement bien tolérés par la plupart des gens, ils provoquent occasionnellement des effets indésirables tels que des troubles mal définis se manifestant généralement par des symptômes de type myalgie, arthralgie, fatigue chronique et développement d'auto-anticorps [15]. Il n'existe jusqu'à présent pas de consensus sur une relation de cause à effet, mais les adjuvants vaccinaux ont été suspectés d'être associés à plusieurs troubles inflammatoires/neurodégénératifs ou auto-immuns ayant un impact sur le système nerveux, tels que la sclérose en plaques [16], la sclérose latérale amyotrophique [17] et l'autisme [6]. Un nouveau syndrome a été ainsi identifié par Shoenfeld en 2011, le syndrome auto-immun/auto-inflammatoire induit par les adjuvants (ASIA) [18].

Plusieurs articles de la littérature suggèrent que les vaccins contenant des adjuvants aluminiques puissent être, de manière insidieuse, dangereux sur le long terme. Cette hypothèse est en concordance avec le fait que le rôle de l'aluminium environnemental est continuellement suspecté de représenter un possible co-facteur de plusieurs maladies chroniques [19–21,1].

Parmi les réactions inhabituelles aux vaccins contenant de l'hydroxyde d'aluminium (alun), la myofasciite à macrophages (MFM) est une lésion inflammatoire décrite en 1998 [22] et reconnue en tant qu'« entité histopathologique particulière pouvant être causée par l'injection intramusculaire de vaccins aluminiques » [23].

La MFM affecte principalement les femmes (> 70 % des cas connus) et est caractérisée par des altérations myopathologiques hautement spécifiques observées chez des patients souffrant d'une combinaison de myalgies diffuses, arthralgies, fatigue chronique et troubles cognitifs tels que des altérations affectant la mémoire de travail et l'attention [22, 24–27].

En France, les vaccins à adjuvant aluminique sont généralement administrés chez les adultes par injection intramusculaire dans le muscle deltoïde [28]. Chez les patients atteints de MFM, les biopsies des muscles deltoïdes présentent des inclusions cytoplasmiques cristallines dans les macrophages, correspondant à des agglomérats d'alun d'origine vaccinale [29]. La détection systématique de ces

agglomérats chez les patients atteints de MFM indique la durée de persistance inhabituellement longue de l'alun chez les individus affectés [30]. (...)Des résultats antérieurs ont démontré que les particules d'Al, tout comme d'autres particules faiblement dégradables, ne restent pas localisées dans le tissu du muscle injecté, mais peuvent au contraire disséminer au sein des cellules phagocytaires jusque dans les ganglions lymphatiques et d'autres organes distants, notamment la rate et le cerveau [39]. Une étude précédente de notre groupe s'est penchée sur la translocation de l'aluminium suite à l'injection intramusculaire d'un vaccin contenant de l'aluminium chez des souris C57BL/6J. De l'aluminium a été détecté dans le muscle injecté mais aussi dans des organes distants tels que la rate, quelques jours après l'injection, puis dans le cerveau où il était encore détecté un an plus tard. Par l'utilisation des substituts de particules marquées contenant de l'alun précipité, une phagocytose rapide des particules injectées par les cellules de la lignée monocyttaire du muscle ainsi que leur translocation par la lymphe et les vaisseaux sanguins ont été confirmées. Les particules ont atteint le cerveau dès 3 semaines après l'injection et nous avons pu observer leur accumulation, bien que très lente et en faible nombre [39]. Nous avons récemment développé un nouvel outil permettant de suivre l'évolution des particules d'Al(OH)<sub>3</sub> en très faibles quantités dans les tissus et sur le long terme [40]. Cette méthode consiste à marquer l'adjuvant Al lui-même (Alhydrogel®) avec des nanodiamants fluorescents (fNDs) fonctionnalisés par du polyglycérol hyper-ramifié (PHR). Le complexe alun-nanodiamants (AluDia) a des propriétés physico-chimiques similaires à celles du vaccin contre l'hépatite B [40]. Une fois injecté dans le muscle *tibial antérieur* (TA) des souris C57BL/6J, nous avons pu évaluer la biodistribution lymphatique et systémique des particules d'AluDia et leur présence dans le tissu cérébral, 3 semaines après l'injection intramusculaire.

L'impact potentiel de l'adjuvant aluminium sur le système nerveux a été étudié sur des modèles murins. L'adjuvant aluminium, dosé à 100 µg d'Al/kg et injecté par voie sous-cutanée dans les souris CD1, a induit des déficits moteurs et une augmentation de l'anxiété associés à la mort de neurones moteurs et à l'astrogliose [17]. Bien qu'aucune mort de neurones moteurs n'ait été observée lors de la multiplication de la dose par 3, Shaw et Petrik [41] ont observé une réactivité microgliale et astrocytique dans la moelle épinière des souris CD1, se traduisant par une augmentation de l'anxiété, des troubles importants dans un certain nombre de fonctions motrices et une capacité de mémoire spatiale diminuée. (...)

Bien qu'une rétraction progressive du granulome local [44, 45] et qu'une translocation rapide de l'alun du site d'injection vers les ganglions lymphatiques drainants (GLD) et vers la rate aient été démontrés à plusieurs reprises [39, 40], l'élimination par l'organisme à long terme des particules d'alun piégées dans le granulome local reste inexplorée. Pour examiner ce point, nous avons conçu une étude longitudinale dans laquelle de l'alun, du vaccin aluminique et de l'alun marqué avec des nanodiamants fluorescents ont été utilisés chez les souris CD1 adultes pour évaluer i) la durée de persistance au site de l'injection, ii) la translocation à long terme de l'alun du site de l'injection vers les organes lymphoïdes et iii) le comportement et la motricité des animaux suite à l'injection intramusculaire de l'alun.

## **2. Matériel et méthodes**

### ***2.1. Dose d'exposition***

La dose d'exposition de 400 µg d'Al/kg a été choisie pour modéliser une plurivaccination avec le vaccin contre l'hépatite B ENGERIX®. (...)

### ***2.2. Animaux***

155 souris CD1 femelles ont été obtenues des laboratoires Charles River (France). (...) Les souris ont été protégées des matériaux contenant de l'Al et avaient à leur disposition de l'eau et de la nourriture en libre accès. Après une période d'acclimatation d'une semaine, les souris ont été séparées en deux séries expérimentales. (...)

#### ***2.2.1. Séries translocation de l'AluDia***

Après la période d'acclimatation, 35 femelles de 8 semaines ont été séparées en 7 groupes

expérimentaux de 5 animaux, recevant chacun 3 injections intramusculaires (im) dans le muscle tibial antérieur gauche ou 3 injections sous-cutanées (sc) dans le cou, chacune de 20 µL avec un intervalle de 4 jours entre les injections. Les 7 groupes ont reçu de l'AluDia : 200 µg d'Al/kg, im ; 400 µg d'Al/kg, im ; 200 µg d'Al/kg, sc ; et 400 µg d'Al/kg, sc. (...)

#### *2.2.2. Séries adjuvant/vaccin*

Après la période d'acclimatation, 120 femelles de 8 semaines ont été séparées en 3 sous-groupes expérimentaux de 40 animaux, recevant chacun 3 injections intramusculaires de 20 µL dans le muscle tibial antérieur, avec un intervalle de 4 jours entre les injections.

Les 3 groupes étaient : un groupe Alhydrogel® (400 µg d'Al/kg) (InvivoGen, Toulouse, France) ; un groupe vaccin contre l'hépatite B ENGERIX® (400 µg d'Al/kg) (Glaxo, Rixensart, Belgique) un groupe témoin tampon phosphate salin (InvivoGen, Toulouse, France).

#### *2.2.3. Tests comportementaux et sacrifice*

Les animaux ont subi une série de 8 tests complémentaires deux semaines avant la fin de l'expérience. À l'issue des tests comportementaux (45, 135, 180, 270 jours post-injection), les animaux ont été sacrifiés avec une overdose de pentobarbital (100-150 mg/kg, injection intrapéritonéale) et des échantillons (muscles tibial antérieur - TA, ganglions lymphatiques de drainage GLD, rate et cerveau) ont été prélevés et rapidement congelés dans de l'isopentane, puis stockés à -80 °C jusqu'à utilisation. Des précautions ont été prises afin d'éviter une contamination des échantillons par l'aluminium environnemental externe.

Les échantillons de muscles de 3 animaux de chaque groupe ont été dédiés aux analyses de la taille du granulome dans le muscle injecté tandis que les échantillons de cerveaux de 5 animaux ont été dédiés à la mesure de la concentration en Al.

### *2.3. Taille du granulome du muscle au site de l'injection*

(...) Quatre groupes de granulome ont été déterminés : sans (0), petit (+), moyen (++) et grand (+++) granulome. Le pourcentage de chaque groupe a ensuite été calculé à chaque temps T.

### *2.4. Translocation de l'AluDia*

La translocation de l'AluDia du site d'injection vers les organes cibles (GLD, rate et cerveau) a été évaluée comme décrit précédemment par Eidi et al. [40] pour 7 groupes AluDia : 400 µg d'Al/kg, im 45, 135, 180 ou 270 jours après l'injection ; 200 µg d'Al/kg, im ; 200 µg d'Al/kg, sc et 400 µg d'Al/kg, sc 45 jours post-injection.

#### *2.4.1. Préparation des tissus et comptage des particules*

Des cryosections en série du muscle et de la rate (20 µm d'épaisseur), du ganglion lymphatique inguinal (12 µm d'épaisseur) et du cerveau (plan frontal, 40 µm d'épaisseur) ont été découpées et stockées à -20 °C jusqu'au comptage ou au traitement. Des coupes de tissu ont successivement été déposées sur 10 différentes lames SuperFrost® Plus afin d'obtenir 10 séries identiques. Le nombre total de particules par organe a été évalué en multipliant par 10 le nombre de particules trouvées dans une seule série.

#### *2.4.2. Microscopie en épifluorescence et microspectrométrie*

Pour la détection des fND, un rayon laser DPSSL de 532 nm (200 mW) a été utilisé comme source d'illumination et a été guidé vers le microscope par une fibre optique. Un filtre d'émission passe-haut à 600 nm a été utilisé pour collecter uniquement des longueurs d'ondes supérieures à 600 nm. Des images à fluorescence ont été obtenues à l'aide d'une caméra EMCCD Rolera EM-C2 de Princeton Instruments avec des durées d'expositions habituelles. Les spectres des points fluorescents ont été obtenus en concentrant l'émission de l'objet fluorescent du microscope vers un spectromètre SP2150i Acton (Princeton Instruments) et détectés à l'aide d'une caméra CCD PIXIS-100B-eXcelon (Princeton Instruments).

### *2.5. Concentration d'Al dans le cerveau*

Des analyses ont été menées sur 5 cerveaux par groupe (groupes Tampon Phosphate Salin -TPS, Alhydrogel® (400 µg d'Al/kg) et vaccin contre l'hépatite B (400 µg d'Al/kg), 45, 135, 180 ou 270 jours suivant l'injection) selon la méthode publiée de House et al. [49]. Des précautions importantes ont été prises au cours de l'étude afin de minimiser la contamination par de l'aluminium. (...)

L'Al total a été mesuré immédiatement en utilisant un spectromètre d'absorption atomique AAnalyst 600 avec un atomiseur à tube graphite chauffé transversalement (THGA) et un correcteur de fond à effet Zeeman ainsi qu'un autoéchantillonneur AS-800 avec le logiciel WinLab32 (Perkin Elmer, UK). Des tubes en graphite pyrolytique THGA standard avec plateforme L'Vov (Perkin Elmer, UK) ont été utilisés. La zone de pic de fond corrigé par effet Zeeman du signal d'absorption atomique a été utilisée pour les déterminations.

Les résultats ont été exprimés en µg d'Al/g de poids sec des tissus. Chaque détermination était la moyenne arithmétique de trois injections avec un écart-type relatif b 10 %.

### *2.6. Tests comportementaux et moteurs*

Une série de 8 tests cognitifs ou moteurs ont été réalisés à 45, 135, 180 ou 270 jours suivant la troisième injection dans les groupes TPS, Alhydrogel® (400 µg d'Al/kg) et vaccin contre l'hépatite B (400 µg d'Al/kg). Les tests ont été choisis dans le but d'évaluer l'activité locomotrice en milieu ouvert[50], le niveau d'anxiété dans le labyrinthe en O [51, 52], la mémoire à court terme dans le test de reconnaissance d'objet [53-56], la force musculaire dans le test de suspension à une grille métallique [57] et dans le test d'agrippement [58], la coordination locomotrice dans le test rotarod [59], la dépression dans le test de suspension caudale [60] et la sensibilité à la douleur dans le test de la plaque chaude [61]. (...)

## **3. Résultats**

### *3.1. Taille du granulome du muscle au site de l'injection*

Les coupes en séries du muscle injecté ont montré une rétraction progressive du granulome du muscle 45, 135, 180 et 270 jours après l'injection d'Alhydrogel® (400 µg d'Al/kg) ou du vaccin contre l'hépatite B (400 µg d'Al/kg) (Tableau 1). À J45, tous les animaux avaient un granulome avec une majorité de coupes présentant un granulome (93 % pour l'Alhydrogel®, 67 % pour le vaccin contre l'hépatite B). À J270, contrairement aux temps T précédents, un animal ne présentait pas de granulome et un grand nombre de coupes musculaires n'ont montré aucun granulome (65 % pour Alhydrogel®, 69 % pour le vaccin contre l'hépatite B) (Tableau 1).

### *3.2. La translocation de l'AluDia vers les GLD et la rate*

L'étude de la translocation des particules d'AluDia (400 µg d'Al/kg) depuis le muscle vers les organes distants a montré une augmentation progressive des particules d'AluDia dans les GLD inguinaux depuis J45 jusqu'à J270 après injection (Tableau 2). En effet, 1 145 et 115 478 particules d'AluDia ont été comptées dans les GLD inguinaux respectivement à J45 et J270 (Fig. 1). À J270, cette multiplication par 100 est apparue comme une accumulation remarquable de l'AluDia dans les zones interfolliculaires des GLD (Tableau 2 et Fig. 1). De la même façon, les particules d'AluDia ont été multipliées par 52 dans la rate (15 à 785 particules) entre J45 et J270 (Tableau 2 et Fig. 1). Il convient de remarquer que les concentrations de particules continuaient à augmenter à J270 (fin de l'expérience) dans les GLD et la rate.

### *3.3. Translocation de l'AluDia dans le cerveau et tests comportementaux et moteurs*

De manière surprenante, aucune particule n'a été observée dans le cerveau à chaque moment étudié après injection intramusculaire de l'AluDia (Tableau 2). Invariablement, comme évalué par la spectrométrie d'absorption atomique au four, les animaux recevant une injection im d'Alhydrogel® (400 µg d'Al/kg) ou de vaccin contre l'hépatite B (400 µg d'Al/kg) n'ont pas montré d'élévation du niveau d'Al<sup>3+</sup> cérébral en comparaison avec les animaux témoins ayant reçu une injection de TPS

(Tableau 3). De manière similaire, les tests comportementaux et moteurs n'ont montré aucun changement essentiel dans le labyrinthe sur-élevé, le milieu ouvert, le test de reconnaissance d'objet, le test de suspension à une grille métallique, le test d'agrippement, le test rotarod, le test de suspension caudale et le test de la plaque chaude (données supplémentaires).

En prenant en compte le fait que les effets neurotoxiques ont été précédemment rapportés chez les souris CD1 après injection sous-cutanée d'Alhydrogel® à 100 µg d'Al/kg [17] et 300 µg d'Al/kg [41], nous avons examiné si la voie d'administration ou la dose pouvait influencer la translocation de l'AluDia dans le cerveau. Nous avons observé que 3 souris CD1 sur 4 injectées par voie sous-cutanée avec 200 µg d'Al/kg ont montré une incorporation de particules dans le cerveau 45 jours après l'injection (Tableau 4 et Fig. 2). Ceci n'a pas été observé à une dose supérieure (400 µg d'Al/kg) pour la voie sous-cutanée et à aucune dose pour la voie intra-musculaire.

#### **4. Discussion**

Cette étude longitudinale a montré que l'alun (Alhydrogel® ou vaccin contre l'hépatite B) injecté dans le muscle induit constamment un granulome similaire à la MFM qui rétrécit avec le temps avec une élimination nette des lésions granulomateuse observées de J180 à J270. (...) La rétraction du granulome dans le muscle était associée au remplissage en parallèle des GLD inguinaux (multiplication par 100 du nombre de particules d'AluDia du J45 au J270). Une translocation similaire de l'alun du muscle vers les GLD a été observée auparavant à des temps beaucoup plus précoces chez les souris C57BL/6J [39]. Nous pensons que deux vagues de translocation lymphatique peuvent survenir après une injection intramusculaire de l'alun : l'une précoce atteignant son sommet à J4 [39] et l'autre nettement retardée associée à la rétraction du granulome musculaire observée dans la présente étude grâce à l'évaluation sur le long terme, ce qui n'avait pas été effectuée dans les études précédentes. Nous supposons que ce flux drainant lymphatique retardé est le moyen d'élimination normal de l'alun piégé dans le granulome post-vaccinal. De manière similaire à la translocation vers les GLD, nous avons observé une translocation nettement retardée de l'AluDia vers la rate, avec un nombre maximum de particules détectées dans cet organe à J270. Il a précédemment été démontré que la translocation de l'alun du muscle vers la rate passe par la sortie des particules des vaisseaux lymphatiques vers le flux sanguin [39]. Puisqu'il a été démontré que la rate incorpore un premier pic de particules à J7 après l'injection chez les souris C57BL/6J [40], la présente étude suggère l'existence d'une deuxième vague retardée de la translocation de l'adjuvant vers la rate conformément à ce qui a été observé dans les ganglions lymphatiques.

La présente étude confirme que l'alun est extrêmement biopersistant [29, 37] et que cette biopersistance peut être observée à la fois dans le muscle injecté et dans des organes distants, dont les ganglions lymphatiques de drainage et la rate. Compte-tenu des puissants effets immunostimulants de l'alun et de la formation non nécessaire d'un dépôt pour son activité d'adjuvant [36], la biopersistance à long terme de l'alun dans les organes lymphoïdes est clairement indésirable et peut jeter des doutes sur le niveau exact d'innocuité sur le long terme des vaccins aluminiques [37]. L'absence de translocation d'alun dans le cerveau après l'injection intramusculaire de 400 µg d'Al/kg était déroutante. Notamment, aucune concentration élevée d'Al dans le cerveau ni de changements neurocomportementaux n'ont été observés dans ces conditions expérimentales, écartant l'hypothèse d'une translocation importante d'Al soluble vers le cerveau en l'absence d'incorporation physique de particules d'alun, et de l'induction d'effets neurocomportementaux par l'activation immunitaire périphérique chronique liée à la persistance de l'alun au sein des cellules de l'immunités [35].

Il n'est pas exclu que la différence observée dans la biodisposition de l'alun chez les souris C57BL/6J et CD1, y compris dans la cinétique de diffusion et dans la survenue de la translocation cérébrale, puisse en partie refléter les différences de fond génétique des deux souches [62]. Nous avons précédemment démontré que la taille du granulome induit par l'alun chez les rats

est considérablement influencée par le fond génétique de ceux-ci, le granulome étant plus petit chez les rats Lewis avec des réponses immunes de type Th1 en comparaison avec les rats Sprague–Dawley avec un équilibre Th1/Th2 [45]. La souche de souris C57BL/6 est connue pour présenter une réaction à la blessure de type pro-inflammatoire et à tendance Th1 [63,64]. (...)

De manière intéressante, les souris C57BL/6 produisent plus de MCP-1/CCL2 que les autres souches [64] et cet important chimioattractant des monocytes inflammatoires est impliqué de manière cruciale à la fois dans la biodistribution systémique et dans la neurodélivrance de particules d'Al capturées par les cellules de la lignée monocyttaire [39]. La hausse de la circulation de MCP-1/CCL2 est notamment l'unique biomarqueur identifié chez les patients atteints d'encéphalomyélite myalgique avec MFM [65]. En outre, la MFM humaine est principalement observée chez des individus d'âge moyen ou âgés, un âge où la production de MCP-1/CCL2 augmente et où l'immunosénescence apparaît [66]. La clarification de l'influence des réponses immunes biaisées Th1 et Th2 des souches de souris sur la translocation de l'AluDia dans le cerveau mérite clairement de futures études.

Dans des études précédemment publiées, des troubles moteurs et comportementaux ont été observés suite à l'injection sous-cutanée (derrière le cou) d'Alhydrogel® sur des souris CD1 avec des doses de 100 et 300 µg d'Al/kg [17, 41]. Ces effets ont été associés aux dépôts d'Al dans le système nerveux central (moelle épinière) évalués par une coloration de Morin. Pour étudier si la voie d'administration peut représenter un facteur important pour la toxicité de l'alun, une étude supplémentaire a été menée au sein de la présente étude, montrant que les particules d'alun peuvent pénétrer dans le cerveau à J45 suivant l'injection sous-cutanée (et non intra-musculaire), réalisée à une dose de 200 µg d'Al/kg (et non à une dose de 400 µg d'Al/kg). (...) Le fait qu'une dose réduite de moitié entraîne une translocation dans le cerveau, ce qui n'a pas été observé à une dose supérieure, rappelle les courbes dose/réponse non monotones observées auparavant avec des toxines environnementales, notamment des composés particuliers [67]. Dans une autre étude, nous avons observé de manière similaire des changements neurocomportementaux à 200 mais pas à 400 µg d'Al/kg (Crépeaux et al., manuscrit en cours de préparation). La portée exacte de ces observations est inconnue, mais il est possible d'imaginer le fait que de très grandes quantités d'alun injectées dans le tissu peuvent bloquer des fonctions essentielles des macrophages, telles que la migration et l'élimination xéno/autophagique des particules, comme cela a été rapporté pour des particules infectieuses [37].

## **5. Conclusion**

Nous avons observé une translocation systémique étonnamment retardée des particules d'alun injectées dans le muscle, un fait jusqu'ici ignoré, avec des accumulations d'alun manifestes dans le système lymphatique et la rate 9 mois après l'injection. En plus du facteur temps essentiel, nos résultats montrent clairement l'influence de la souche de la souris, de la dose et de la voie d'administration sur l'élimination de l'alun par l'organisme. Tous ces paramètres devraient être pris en considération dans la conception des futures études toxicologiques de l'alun.