



HAL
open science

Clearance, biodistribution, and neuromodulatory effects of aluminum-based adjuvants. Systematic review and meta-analysis: what do we learn from animal studies?

J.-D. Masson, L. Angrand, G. Badran, R. de Miguel, G. Crepeaux

► To cite this version:

J.-D. Masson, L. Angrand, G. Badran, R. de Miguel, G. Crepeaux. Clearance, biodistribution, and neuromodulatory effects of aluminum-based adjuvants. Systematic review and meta-analysis: what do we learn from animal studies?. *Critical Reviews in Toxicology*, 2022, 52 (6), pp.403 - 419. <10.1080/10408444.2022.2105688>. <hal-05215900>

HAL Id: hal-05215900

<https://hal.science/hal-05215900v1>

Submitted on 20 Oct 2025

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

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



HAL Authorization



Clairance, biodistribution et effets neuromodulateurs des adjuvants à base d'aluminium. Revue systématique et méta-analyse : qu'apprend-on des études animales ?

J.-D. Masson^a, L. Angrand^{a,b}, G. Badran^{a,c}, R. de Miguel^d & G. Crépeaux^{a,b,*}

^a INSERM, IMRB, Univ Paris Est Créteil, Créteil, France

^b École Nationale Vétérinaire d'Alfort, IMRB, Maisons-Alfort, France

^c Laboratoire SABNP, Université d'Evry Val d'Essonne, Paris, France

^d Department of Animal Pathology, University of Zaragoza, Zaragoza, Spain

* guillemette.Crépeaux@vet-alfort.fr

Article reçu le 23 mai 2022, révisé le 19 juillet 2022, accepté le 19 juillet et publié le 16 septembre 2022 dans *Critical Reviews in Toxicology* - <https://doi.org/10.1080/10408444.2022.2105688>

RESUME

Les sels d'aluminium (Al) sont couramment utilisés comme adjuvants dans les vaccins humains et vétérinaires depuis près d'un siècle. Malgré cette longue période d'utilisation et le très grand nombre de personnes exposées, les données de la littérature concernant le devenir de ces molécules après injection et leurs effets potentiels sur le système nerveux sont limitées. Du fait du contexte suivant : (i) augmentation de l'exposition aux sels d'aluminium par la vaccination, (ii) absence de valeurs de sécurité déterminées par les autorités sanitaires, (iii) manque de robustesse des études utilisées comme références pour revendiquer officiellement l'innocuité des adjuvants Al et (iv) publication de plusieurs études animales portant sur la clairance, la biopersistance et la neurotoxicité des sels d'Al, nous avons examiné dans cette revue de la littérature toutes les études publiées réalisées sur des animaux et évaluant la cinétique, la biodistribution et la neuromodulation des adjuvants Al depuis les premiers travaux d'A. Glenny dans les années 1920. La diversité des approches méthodologiques, les résultats et les faiblesses éventuelles des 31 études collectées sont exposés. Une large gamme de protocoles a été utilisée, y compris une diversité de schémas d'exposition et de méthodes d'analyses, ce qui rend les comparaisons entre les études difficiles. Néanmoins, les données publiées soulignent que lorsque la biopersistance, la translocation ou la neuromodulation ont été évaluées, elles ont été documentées quels que soient les différents modèles et méthodes in vivo utilisés. Par ailleurs, les études ont souligné l'importance cruciale des différentes propriétés physicochimiques de l'adjuvant Al et du patrimoine génétique de l'individu sur sa cinétique, sa biodistribution et ses effets neuromodulateurs. En ce qui concerne l'état des connaissances dans ce domaine essentiel de la santé publique, des études supplémentaires sont à l'évidence nécessaires pour déterminer le niveau de sécurité exact des sels d'Al.

Abréviations

AAS : Spectrométrie d'Absorption Atomique ; ABA : Adjuvant à base d'aluminium ; AH : Oxyhydroxyde d'aluminium ; AHS : Sulfate d'hydroxyphosphate d'aluminium ; Al : Aluminium ; AMS : Spectrométrie de masse par accélérateur ; AP : Hydroxyphosphate d'aluminium ; APC : Cellules Présentatrices d'Antigènes ; ASIA : Syndrome auto-immun/auto-inflammatoire induit par les adjuvants ; SNC : Système nerveux central ; FDA : Food and Drug Administration ; GF-AAS : Spectrométrie d'absorption atomique par four graphite ; ICP-MS : Spectrométrie de masse à plasma à couplage inductif ; IM : Intramusculaire ; IP : Intrapéritonéale ; EM/SFC : Encéphalomyélite myalgique/syndrome de fatigue chronique ; MHC : Complexe majeur d'histocompatibilité ; MMF : Myofasciite à Macrophages ; Mo : Mois ; PNH : Primate non humain ; PIXE : Émission de rayons X induite par des protons ; JPN : Jour Postnatal ; RBS : Spectrométrie de rétrodiffusion de Rutherford ; SC : sous-cutané ; W : Semaines

Table des matières

1. Introduction	2
1.1. Adjuvants de vaccins et sels d'Al	2
1.1.1 Historique des adjuvants vaccinaux	2
1.1.2 Adjuvants à base d'aluminium (ABA).....	2
1.1.3 Mécanismes d'action	2
1.2. Vaccins contenant de l'Al	3
1.2.1 ABA dans les vaccins	3
1.2.2 Propriétés structurales et physico-chimiques des sels d'Al.....	3
1.2.3 Exposition individuelle aux ABA	3
1.3. Mobilité des sels d'Al injectés et interrogations sur leur innocuité.....	4
2. Matériels et méthodes.....	4
2.1. Méthodes de recherche bibliographique et critères de sélection	4
2.1.1. Méthodologie	5
2.1.2. Résultats observés.....	5
3. Résultats et discussion	5
3.1. Nombre d'études et années de publication.....	5
3.1.1. Nombre.....	5
3.1.2. Années de publication	5
3.1.3. Discussion	5
3.2. Comparaison entre les méthodes utilisées	6
3.2.1. Formes physiques et chimiques de l'adjuvant Al	6
3.2.1.1. Adjuvants Al	6
3.2.1.2. Vaccins contenant de l'Al	6
3.2.2. Espèces et souches animales, nombre d'animaux, sexe et âge	6
3.2.2.1. Espèces et souches.....	6
3.2.2.2. Nombre d'animaux	7
3.2.2.3. Genre.....	7
3.2.2.4. Âge	7
3.2.3. Modes d'exposition	7
3.2.4. Temps des tests ou des analyses	7

3.2.5. Dose	8
3.2.6. Nombre d'injections	8
3.2.7. Méthodes utilisées pour les analyses des ABA dans les tissus et les échantillons prélevés	8
3.2.8. Discussion	9
3.3. Comparaison des résultats observés.....	9
3.3.1. Biopersistance et translocation	9
3.3.2. Discussion	10
3.3.3. Effets neuromodulateurs ou éthologiques.....	11
3.3.4. Discussion	11
4. Analyse globale	11
4.1. Contexte	11
4.2. Synthèse de nos résultats.....	12
4.3. Résultats sur la biopersistance/translocation	12
4.4. Résultats sur la neuromodulation	12
4.5. Biais et limites des études publiées	13
4.6. Veille bibliographique	13
4.7. Données d'autres études	13
4.8. Cadre idéal pour des études ultérieures	13
5. Conclusion.....	14
Remerciements.....	14
Déclaration d'intérêts	14
Matériel supplémentaire	14
Références	14

1. Introduction

1.1. Adjuvants vaccinaux et sels d'aluminium

1.1.1. Historique des adjuvants vaccinaux

Les adjuvants sont utilisés dans les vaccins humains et vétérinaires depuis plus de 90 ans. Initialement, ces substances ont été ajoutées aux vaccins pour améliorer l'immunogénicité d'antigènes hautement purifiés aux capacités immunostimulantes insuffisantes (Di Pasquale et al. 2015). Cette notion d'adjuvant a été conceptualisée pour la première fois au milieu des années 1920 par Gaston Ramon, un vétérinaire français qui a observé sur des chevaux que la production de sérum antitétanique et antidiphtérique était plus élevée pour les animaux ayant développé un abcès au point d'injection (Ramon 1925, 1926 ; Vogel 2000 ; Vogel et Hem 2004). Par l'injection de toxine inactivée avec de l'huile d'amidon, de la chapelure, de l'agar, de la saponine ou de la farine de tapioca, il a induit des abcès stériles au site d'injection et augmenté la production d'antisérums. Cette augmentation de la production d'anti-sérums a confirmé l'hypothèse qu'une inflammation locale produite par des substances « adjuvantes » (le mot adjuvant venant du mot latin « adjuvare » qui signifie « aider ») localisée au site d'injection favorise la réponse anti-sérums. (Di Pasquale et al. 2015).

Partant de ce constat, le développement de vaccins s'est de plus en plus appuyé sur l'utilisation à la fois d'antigènes purifiés et de molécules adjuvantes.

1.1.2. Adjuvants à base d'aluminium (ABA)

Au même moment à Londres, Alexander Glenny et ses collègues ont découvert les effets immunostimulants des sels d'aluminium (Al). En effet, dans un essai de production d'un vaccin avec des anatoxines diphtériques purifiées (toxine inactive), Glenny et ses collègues ont utilisé du sulfate de potassium et d'aluminium. Ils ont été surpris de découvrir chez des cobayes que les vaccins développés avec du sel d'Al conduisaient à de meilleures réponses en anticorps que les anatoxines solubles seules. Cette expérience a été rapportée comme la première démonstration de l'action adjuvante du sel d'Al (Matsiko 2020). Glenny a déclaré avec justesse dans son article que "la valeur antigénique de l'émulsion de précipité apparaissait supérieure à celle de l'anatoxine dont elle provenait" (Glenny et al. 1926a, 1926b).

Les sels d'aluminium ont ensuite été utilisés pour la première fois dans les vaccins humains en 1932 et ont été les seuls adjuvants utilisés dans les vaccins homologués pendant 70 ans (Di Pasquale et al. 2015). En médecine vétérinaire, les adjuvants Al ont été utilisés dans un grand nombre de formulations de vaccins chez les animaux d'élevage et de compagnie contre les maladies virales et bactériennes à partir des années soixante.

Comme expliqué ci-dessus, le concept d'adjuvants de vaccins, et en particulier les propriétés des adjuvants à base d'Al (ABA), a été initialement introduit dans une approche empirique pour améliorer la réponse immunitaire contre les antigènes. Ensuite, ces composants sont devenus nécessaires dans de nombreux vaccins. Cette combinaison a privilégié les technologies vaccinales basées sur des antigènes purifiés à plus faible immunogénicité par rapport aux approches vaccinales vivantes atténuées et à pathogènes entiers. Ainsi, les vaccins avec adjuvants (dont les sels d'Al) sont de plus en plus utilisés, surtout depuis les années 90 (Di Pasquale et al. 2015).

1.1.3. Mécanismes d'action

Il n'existe pas de consensus sur les mécanismes d'action détaillés et leurs rôles dans les différents aspects de la régulation immunitaire. Ce sujet est à approfondir, il s'agit d'un thème de recherche ancien dans le domaine de la vaccinologie et de l'immunologie (Exley et al. 2010 ; Wen et Shi 2016 ; Shardlow et al. 2018). Les ABA peuvent exercer leurs effets immunomodulateurs via ce que l'on appelle « l'effet dépôt », retardant la clairance de l'antigène du site d'injection (Glenny et al. 1931) et permettant le recrutement et la maturation des cellules présentatrices d'antigène (APC) (Lu et Hogenesch 2013) qui améliorent l'expression des molécules du complexe majeur d'histocompatibilité (MHC) de classe II (Mannhalter et al. 1985 ; Ulanova et al. 2001 ; Morefield et al. 2005). Les ABA peuvent également augmenter les réponses humorales Th2 sans renforcer l'immunité Th1 (Brewer et al. 1996 ; Sokolovska et al. 2007 ; Hem et Hogenesch 2007 ; Cain et al. 2013), ce qui les rend moins indiqués pour les vaccins contre les pathogènes intracellulaires (HogenEsch 2013). Une hypothèse complémentaire suggère une stimulation directe de l'immunité innée, car il a été démontré que les ABA induisent de puissants stimuli pro-inflammatoires au site d'injection, probablement médiés par la production locale d'IL-1b, IL-18 et IL-33 (Li et al 2007, 2008). Les stimuli pro-inflammatoires et l'action adjuvante subséquente des ABA pourraient être dus à leur cytotoxicité éventuellement induite par leur structure cristalline (Marrack et al. 2009). Après phagocytose, ils pourraient produire une perturbation des organelles (comme le lysosome) et de la membrane plasmique entraînant la mort cellulaire et l'inflammation (Lima et al. 2013), la maturation des APC et donc la production d'antigènes. Cependant, le rôle de l'activation de l'inflammasome dépendante de NLRP3 dans ce scénario reste controversé : alors que certaines études chez la souris démontrent que l'activation de l'inflammasome et la production d'IL-1b après l'inoculation d'ABA sont essentielles pour induire des

réponses immunitaires efficaces (Eisenbarth et al. 2008 ; Li et al. 2008 ; HogenEsch 2013), d'autres études ont montré que le déficit en NLRP3 ou en caspase-1 n'a aucun impact sur la production d'anticorps (Franchi et Nunez 2008 ; Kool et al. 2008) ou seulement un impact partiel sur la différenciation des lymphocytes T et la synthèse des IgE (Kool et al. 2008). Ces différences peuvent être associées au patrimoine génétique des souches de souris, au calendrier de vaccination et au type et à la dose d'ABA utilisés (Marrack et al. 2009).

1.2. Vaccins contenant de l'aluminium

1.2.1. ABA dans les vaccins

Trois sels d'Al sont actuellement utilisés comme adjuvants dans les vaccins humains : l'oxyhydroxyde d'Al (AH, disponible dans le commerce sous le nom d'Alhydrogel®), l'hydroxyphosphate d'Al (AP, disponible dans le commerce sous le nom d'Adju-Phos®) et le sulfate d'hydroxyphosphate d'Al (AHS). Alors que les deux premières molécules ont été étudiées, la troisième est la propriété de Merck Sharp & Dohme Corp et n'est pas accessible pour des études indépendantes (Shardlow et al. 2021). Pris ensemble, les trois sels d'Al sont présents dans environ 60 % des vaccins humains (Lyons-Weiler et Ricketson 2018 ; Angrand et al. 2020 ; Shardlow et al. 2021) et vétérinaires (Spickler et Roth 2003 ; Gherardi et al. 2019).

Les vaccins chez l'homme contiennent généralement de 0,125 mg (Prevenar 13®, Pfizer, New York, NY) à 0,85 mg (Pediarix®, GSK) d'Al³⁺/dose¹ (le volume d'une dose est généralement de 0,5 ml). Dès les années 1960, la Food and Drug Administration (FDA) fixe empiriquement le taux d'adjuvant autorisé à 0,85 mg d'Al par dose de vaccin, sur la base de résultats montrant un bon effet adjuvant à cette concentration (d'après Joan May, FDA/CBER, cité dans Baylor et al. 2002). Cette valeur réglementaire n'a jamais été modifiée depuis lors. Deux niveaux supplémentaires sont spécifiés par la réglementation (1,14 et 1,250 mg, respectivement), selon la manière dont la concentration est déterminée (par mesure ou par calcul) (US Code of Federal Regulations 2016 ; Lyons-Weiler et Ricketson 2018). Ainsi, la valeur seuil a été définie en fonction de « l'efficacité » définie par la réponse optimale aux vaccins. Les questions de sécurité n'ont pas été prises en compte. La toxicité des injections d'Al ainsi que les interactions entre plusieurs adjuvants Al combinés dans un même vaccin ou dans les administrations simultanées de plusieurs vaccins contenant de l'Al le même jour n'ont pas été évaluées. De plus, il n'y a pas d'évaluation indépendante par les organismes de réglementation de la teneur en Al des vaccins pour nourrissons, et des informations parfois confuses sont disponibles auprès des fabricants (Shardlow et al. 2021). Une étude récente a montré que les niveaux d'Al dans un vaccin peuvent varier considérablement d'un lot à l'autre et peuvent différer de la quantité d'Al indiquée par le fabricant, par exemple de 0,172 à 0,602 mg/vaccin pour Havrix (vaccin contre l'hépatite A de GSK, supposé contenir 0,25 mg d'Al sous forme d'AH) (Shardlow et al. 2021).

1.2.2. Structures et propriétés physico-chimiques des sels d'aluminium

L'AH est composé de nanoparticules d'environ 2,2x4,5x10nm qui s'agrègent spontanément pour former des particules micrométriques d'aspect nanofibreux, observables au microscope électronique. Le point de charge zéro pour l'AH (équivalent au point isoélectrique des protéines) est de 11,4, par conséquent, l'AH montre une charge de surface positive à pH 7,4 et lie efficacement les protéines de charge négative à ce pH (par exemple l'albumine). Au contraire, l'AP est amorphe et son point de charge nulle se situe entre 4,5 et 5,5, fournissant ainsi une charge de surface négative à pH neutre et liant efficacement les protéines de charge positive à ce pH (par exemple le lysozyme) (Seeber et al. 1991 ; Mold et al. 2016 ; Gherardi et al. 2019).

L'AH est préparé en mélangeant une solution d'Al, généralement AlCl_3 ou $\text{AlK}(\text{SO}_4)_2$, avec de l'hydroxyde de sodium. La suspension est ensuite déshydratée dans des conditions hydrothermales (HogenEsch et al. 2018). L'AP est préparé en mélangeant le même type de solution de sel d'Al (c'est-à-dire AlCl_3 ou $\text{AlK}(\text{SO}_4)_2$) avec une solution basique de phosphate trisodique, ou en mélangeant du sel d'Al avec une solution de phosphate, suivi d'une précipitation avec de l'hydroxyde de sodium. La substitution d'hydroxyles au phosphate entraîne la formation d'AP ($\text{Al}(\text{OH})_x(\text{PO}_4)_y$).

Les différentes caractéristiques physico-chimiques de ces adjuvants (forme, taille et charge) peuvent fortement influencer leurs effets. Le taux d'agrégation peut varier en fonction de ces propriétés et de leur environnement biochimique (Shardlow et al. 2016). Par conséquent, la taille des particules injectées modifie leur capture cellulaire par les cellules immunitaires et la cytotoxicité induite (Mold et al. 2016 ; Nies et al. 2020), voire affecte leur capacité à transloquer dans l'organisme. De plus, les deux formes différentes de ces adjuvants peuvent également influencer leur temps d'endocytose, et donc les paramètres toxicocinétiques, toxicodynamiques, ainsi que leur toxicité (Champion et Mitragotri 2009 ; Hsiao et Huang 2011 ; Lee et al. 2014). Compte tenu du potentiel Zeta et du point de charge zéro, Alhydrogel® montre une charge de surface positive à pH 7,4 et forme des liaisons électrostatiques avec des protéines chargées négativement, telles que l'albumine (point isoélectrique 4,8), tandis que Adju-Phos®, avec une charge de surface négative à pH 7,4, a une plus grande affinité pour les protéines chargées positivement, telles que le lysozyme (point isoélectrique 11,0) (Seeber et al. 1991 ; Al-Shakhshir et al. 1994 ; Shardlow et al. 2016 ; Shardlow et al. 2018). Cette différence d'affinité va également influencer les interactions cellulaires avec les adjuvants : l'AH chargé positivement peut interagir de manière plus significative avec les membranes cellulaires et avec l'ADN chargé négativement (Hühn et al. 2013 ; Sukhanova et al. 2018).

1.2.3. Exposition individuelle aux ABA

En termes d'exposition, il est important de noter que l'exposition à l'Al par le biais des calendriers de vaccination modernes peut représenter une exposition aiguë manifeste et répétée à l'Al (Lyons-Weiler et Ricketson 2018 ; Exley 2020).

Aux États-Unis, les enfants sont les plus exposés aux ABA, recevant parfois la première injection d'un vaccin contenant de l'Al à la naissance et un total d'au moins 13 injections de vaccin contenant de l'Al à 18 mois (c'est-à-dire une dose totale de près de 3 à 4 mg Al/nourrisson) (Miller 2016). Une étude récente portant sur le calendrier français de 2018 a principalement montré que (i) la moitié des expositions survient avant l'âge de 1 an, (ii) un adulte suivant les obligations et recommandations vaccinales reçoit entre 2,545 et 7,735 mg d' Al^{3+} au cours de sa vie, (iii) l'exposition varie selon l'âge, le poids, le sexe et le choix des vaccins contenant de l'aluminium (Angrand et al. 2020).

En médecine vétérinaire, les vaccins sont également des éléments clés pour prévenir et contrôler les maladies infectieuses et les ABA sont des adjuvants largement utilisés dans les vaccins vétérinaires (Lindblad 2004 ; Spickler et Roth 2003 ; Roth et Sandbulte 2021). Les calendriers de vaccination varient fortement entre les espèces animales et les zones géographiques (Roth et Sandbulte 2021). Les animaux domestiques sont vaccinés de manière intensive au cours de la première année de vie, recevant généralement la première injection 6 à 8 semaines après la naissance, lorsque les anticorps maternels diminuent et que la sensibilité aux infections augmente (Lacasta et al. 2015 ; Day et al. 2016 ; RUMA Guidelines 2022). De plus, les animaux de compagnie (c'est-à-dire les chiens et les chats) et les animaux d'élevage qui restent plus longtemps dans les fermes (c'est-à-dire les animaux laitiers, les animaux de haute qualité employés comme reproducteurs) reçoivent généralement des rappels périodiques tout au long de

leur vie (Lacasta et al. 2015). Il n'y a pas de limite maximale d'Al dans les vaccins vétérinaires et certains vaccins contiennent plus de 6 mg d'AH par dose.

Enfin, compte tenu des interrogations provenant des études de référence existantes afin de déterminer si l'exposition à l'Al par le biais de vaccins peut être dangereuse, on peut rappeler que de sérieuses faiblesses conceptuelles et méthodologiques ont été décrites par le passé. Il a été en effet démontré que les trois études toxicocinétiques disponibles - un travail expérimental (Flarend et al. 1997) et deux calculs théoriques (Keith et al. 2002 ; Mitkus et al. 2011) - représentent objectivement des bases insuffisantes pour garantir l'innocuité absolue des adjuvants Al (Masson et al. 2018).

1.3. Mobilité des sels d'Al injectés et interrogations sur leur innocuité

Pendant longtemps, des réunions internationales spécialisées ont soutenu que l'Al injecté par voie vaccinale était essentiellement éliminé rapidement de l'organisme dans les urines (Eickhoff et Myers 2002). Cette affirmation trouve ses racines dans certaines études des années 1990 utilisant une nouvelle technique pour étudier la toxicocinétique de l'aluminium. En effet, jusqu'en 1990, il était difficile de connaître le devenir précis de l'Al in vivo, car il n'était pas possible de différencier l'Al injecté de l'Al issu d'autres formes d'exposition ou d'une contamination externe des échantillons. L'utilisation de l'Al-26, un isotope faiblement radioactif, distinct de l'Al-27 naturel, a permis la détection de très petites quantités d'Al (10^{-17} g) par spectrométrie de masse par accélérateur (AMS ; Hem 2002). En utilisant cette technique, Flarend et al. (1997) ont réalisé la première étude pharmacocinétique des adjuvants Al dans un modèle animal. Il est à noter que cette étude était initialement considérée comme une étude préliminaire, mais n'a été suivie d'aucune étude définitive. L'Académie nationale de médecine française souligne que « ce travail expérimental, unique à ce jour, est utilisé pour la modélisation de la pharmacocinétique des adjuvants » (Bégué et al. 2012).

La diffusion des ABA a ainsi été mal étudiée. En outre, les injections intramusculaires ou sous-cutanées de vaccins contenant de l'Al représentent les seules voies d'exposition à ces sels d'Al spécifiques. De plus, cette injection in vivo est associée à une forte réaction immunitaire, qui peut induire un changement local de pH et une forte activité macrophagique, modifiant ainsi le devenir de l'Al injecté. Pour ajouter à ce problème, l'Al est difficile à tracer dans l'organisme. Les concentrations dans les tissus sont extrêmement faibles et pourraient être inférieures à la limite de détection des instruments. Le traçage de l'Al dans les organes de rongeurs peut donc représenter un véritable défi.

D'autre part, l'utilisation d'ABA dans les vaccins humains a été associée à des effets indésirables depuis la fin des années 1990, lorsque la myofasciite à macrophages (MMF) a été décrite [MMF, une lésion musculaire de longue durée induite par l'AH et associée cliniquement à l'encéphalomyélite myalgique/syndrome de fatigue chronique (ME/CFS)] (Gherardi et al. 2001) - pour une revue complète, voir Gherardi et al. 2019. La MMF est considérée comme un paradigme du « syndrome auto-immun (ou auto-inflammatoire) induit par les adjuvants » (ASIA) (Shoenfeld et Agmon-Levin 2011). Plus récemment, des préoccupations croissantes ont émergé concernant le rôle joué par une exposition précoce à ces composés d'Al dans les cas de troubles neurodéveloppementaux (Gallagher et Goodman 2010 ; Tomljenovic et Shaw 2011 ; Seneff et al. 2012 ; Shaw et Tomljenovic 2013 ; Shaw et al. 2013 ; Mold et al. 2018 ; Sheth et al. 2018 ; Wang et al. 2018 ; Eidi et al. 2020).

Dans un contexte où (i) l'exposition aux sels d'Al par le biais de la vaccination est en constante augmentation, en particulier dans des populations très sensibles, comme les bébés, (ii) aucune valeur de

sécurité n'a été définie par les autorités sanitaires, (iii) les études utilisées comme références pour garantir l'innocuité officielle de l'ABA sont faibles et biaisées (Masson et al. 2018), et considérant que plusieurs études animales existent maintenant sur la clairance/biopersistance et la neurotoxicité des sels d'Al, nous avons examiné dans une revue systématique toutes les études publiées réalisées sur des animaux et axées sur la cinétique, la biodistribution et la neurotoxicité des ABA depuis les premiers travaux d'A. Glenny.

2. Matériels et méthodes

2.1. Méthodes de recherche documentaire et critères de sélection

Cette étude vise à faire un état de l'art international sur les données expérimentales *in vivo* concernant le devenir de l'adjuvant Al et sa neurotoxicité. Toutes les données publiées concernant les adjuvants Al utilisés dans les expériences animales *in vivo* ont été recherchées. Une vaste recherche sur PubMed, Web-of-science et Scopus a été réalisée et une revue systématique a été recherchée à partir des mots clés : Al ET adjuvant* ET (animal* OU « *in vivo* » OU mammifère* OU particule* OU biopersistance OU persistance OU translocation OU biotranslocation OU toxicité OU neurotoxicité OU « système nerveux central » (SNC) OU comportement*) NON « *in vitro* ».

Sur la base de cette recherche, 3868 références ont été obtenues auprès de PubMed à la date du 21 janvier 2022 ; 758 références de Web of Science (31 janvier 2022) et 4708 références de Scopus (7 février 2022) (Figure 1). Les orthographes « aluminum » et « aluminium » ont été testées, cette dernière ne modifiant pas la liste des références pertinentes à prendre en compte dans notre examen. Les doublons ont été supprimés et trois références ont été ajoutées à partir des articles trouvés. Enfin, le critère d'éligibilité « résumé disponible en anglais, français ou espagnol » a été appliqué aux publications collectées.

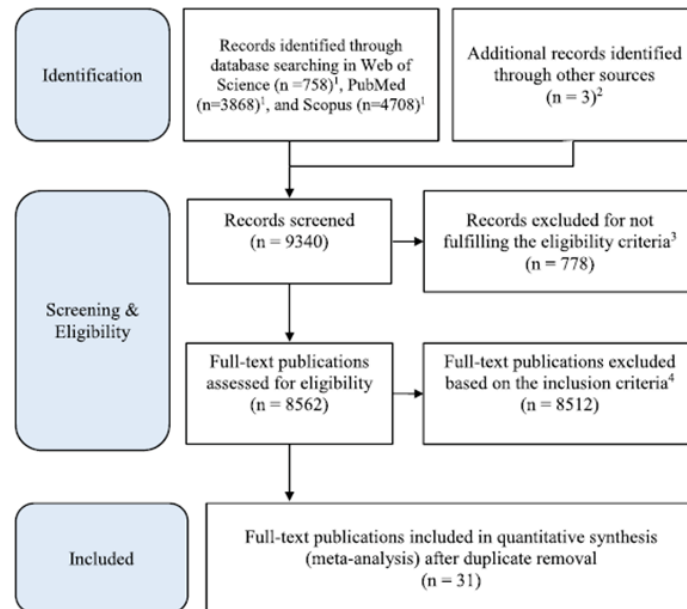


Figure 1. Flow diagram indicating procedure for identification, screening, selection, and inclusion of publications in this review (bibliographic survey from 31 January to 7 February 2022). ¹Keywords used: aluminum AND adjuvant* AND (animal* OR *in vivo** OR mammal* OR particle* OR biopersistance OR persistence OR translocation OR biotranslocation OR toxicity OR neurotoxicity OR "central nervous system" OR behavior*) NOT *in vitro*.* ²Other sources: Sourcing bibliography from cited article; ³Eligibility criteria: At least abstract available in English, French, or Spanish; ⁴Inclusion criteria: Data on biopersistance, translocation, or neuromodulation of relevant forms of aluminum particles injected to mammals by subcutaneous or intramuscular route are kept.

Les articles qui ont passé avec succès cette première étape ont ensuite été soumis aux critères d'inclusion suivants :

1. Source d'exposition Al : ABA (Al oxyhydroxyde, Al hydroxyphosphate, AHS, Potassium Alum) ou un outil pertinent pour le suivi de l'Al seul ou des vaccins contenant de l'Al ;
2. Modèles : mammifères juvéniles ou adultes ;
3. Voies d'exposition : injections intramusculaires ou sous-cutanées ;
4. Étude : évaluation de la biodistribution des ABA (clairance ou rétention, translocation systémique) et/ou évaluation de la neuromodulation des ABA (évaluation des fonctions développementales, comportementales ou motrices ; évaluation de paramètres mesurés dans le SNC).

Les études qui ne répondaient pas à ces 4 critères n'ont pas été prises en compte dans cette revue. En particulier, les études utilisant des administrations intraveineuses, intrapéritonéales ou intranasales ont été exclues. Les études liées au sarcome induit par l'AH chez le chat n'ont pas été prises en compte car il s'agit d'un cas particulier déjà bien documenté par d'autres. Les études rétractées n'ont pas été prises en compte. Les articles épidémiologiques ou les analyses descriptives rétrospectives de cas cliniques ont été exclus en raison du manque général d'attention portée à la biopersistance/translocation/toxicité des adjuvants.

Au final, 31 études ont été incluses dans cette revue (tableau 1).

Table 1. List of the 31 included studies and their internal reference number reported on the other figures (chronological order).

N°	References	Title
#1	Berlyne et al. (1972)	Aluminum toxicity in rats
#2	Goto and Akama (1982)	Histopathological studies of reactions in mice injected with aluminum-adsorbed tetanus toxoid
#3	Flarend et al. (1997)	<i>In vivo</i> absorption of aluminum-containing vaccine adjuvants using 26 Al
#4	Valtulini et al. (2005)	Aluminum hydroxide-induced granulomas in pigs
#5	Verdier et al. (2005)	Aluminum assay and evaluation of the local reaction at several time points after intramuscular administration of aluminum-containing vaccines in the <i>Cynomolgus</i> monkey
#6	Authier et al. (2006)	AlOH ₃ -adjuvanted vaccine-induced macrophagic myofasciitis in rats is influenced by the genetic background
#7	Petrik et al. (2007)	AlOH ₃ -adjuvanted vaccine-induced macrophagic myofasciitis in rats is influenced by the genetic background
#8	Wise et al. (2008)	Lack of effects on fertility and developmental toxicity of a quadrivalent HPV vaccine in Sprague-Dawley rats
#9	Shaw and Petrik (2009)	Aluminum hydroxide injections lead to motor deficits and motor neuron degeneration
#10	Segal et al. (2011)	Evaluation of the intramuscular administration of Cervarix™ vaccine on fertility, pre- and post-natal development in rats
#11	Khan et al. (2013)	Slow CCL2-dependent translocation of biopersistent particles from muscle to brain
#12	Luján et al. (2013)	Autoimmune/autoinflammatory syndrome induced by adjuvants (ASIA syndrome) in commercial sheep
#13	Shaw et al. (2013)	Administration of aluminum to neonatal mice in vaccine-relevant amounts is associated with adverse long-term neurological outcomes
#14	Agmon-Levin et al. (2014)	Administration of aluminum to neonatal mice in vaccine-relevant amounts is associated with adverse long-term neurological outcomes
#15	Crépeaux et al. (2015)	Highly delayed systemic translocation of aluminum-based adjuvant in CD1 mice following intramuscular injections
#16	Eidi et al. (2015)	Fluorescent nanodiamonds as a relevant tag for the assessment of alum adjuvant particle biodisposition
#17	McDougall et al. (2016)	Analysis of aluminum in rat following administration of allergen immunotherapy using either aluminum or microcrystalline-tyrosine-based adjuvants
#18	Crépeaux et al. (2017)	Non-linear dose-response of aluminum hydroxide adjuvant particles: selective low dose neurotoxicity
#19	HogenEsch et al. (2017)	Preclinical safety study of a recombinant <i>Streptococcus pyogenes</i> vaccine formulated with aluminum adjuvant
#20	Inbar et al. (2017)	Behavioral abnormalities in female mice following administration of aluminum adjuvants and the human papillomavirus (HPV) vaccine Gardasil
#21	Kivity et al. (2017)	Phospholipid supplementation can attenuate vaccine-induced depressive-like behavior in mice
#22	Sheth, Li, and Shaw (2018)	Is exposure to aluminum adjuvants associated with social impairments in mice? A pilot study
#23	Asin et al. (2019)	Granulomas Following Subcutaneous Injection With Aluminum Adjuvant-Containing Products in Sheep
#24	Bruce et al. (2019)	Acute peripheral immune activation alters cytokine expression and glial activation in the early postnatal rat brain
#25	Weisser et al. (2019)	Aluminum in plasma and tissues after intramuscular injection of adjuvanted human vaccines in rats
#26	Asin et al. (2020)	Cognition and behavior in sheep repetitively inoculated with aluminum adjuvant-containing vaccines or aluminum adjuvant only
#27	de Miguel et al. (2020)	Detection of aluminum in lumbar spinal cord of sheep subcutaneously inoculated with aluminum-hydroxide containing products
#28	Eidi et al. (2020)	Early postnatal injections of whole vaccines compared to placebo controls: Differential behavioral outcomes in mice
#29	Varela-Martínez et al. (2020)	Whole transcriptome approach to evaluate the effect of aluminum hydroxide in ovine encephalon
#30	Weisser et al. (2020)	Aluminum from adjuvanted subcutaneous allergen immunotherapeutics in rats is mainly detected in bone
#31	de Miguel et al. (2021)	Growth Performance and Clinicopathological Analyses in Lambs Repetitively Inoculated with Aluminum-Hydroxide Containing Vaccines or Aluminum-Hydroxide Only

A partir des publications sélectionnées, nous avons élaboré une base de données pour comparer les questions suivantes traitant à la fois la méthodologie employée et les résultats observés :

2.1.1. Méthodologie

- Formes physiques et chimiques des adjuvants AI ;
- Espèce animale, nombre d'animaux, sexe, âge ;
- Modes d'exposition ;
- Doses et nombre d'injections ;
- Durée d'exposition et délai pour la réalisation des tests ou des analyses ;
- Méthodes utilisées pour les analyses de l'adjuvant AI dans les tissus.

2.1.2. Résultats observés

- Cinétique de la clairance et de la translocation ;
- Effets neuromodulateurs.

3. Résultats et discussion

3.1. Nombre d'études et années de publication

3.1.1. Nombre

Après application des critères de sélection, 31 publications ont finalement été collectées et analysées pour cette revue (tableau 1 et [données supplémentaires](#)).

3.1.2. Années de parution

Le plus ancien article scientifique trouvé a été publié en 1972 et le plus récent en 2021 (Figure 2) : 71 % des articles ont été publiés au cours des 10 dernières années (2011-2021).

3.1.3. Discussion

Sur la base de ces résultats, nous pouvons noter qu'au final, un nombre limité d'études se sont concentrées sur la biopersistance et/ou les effets neurologiques des sels d'AI par voie d'exposition SC ou IM. Ces 31 études ont été principalement publiées au cours des 10 dernières années, montrant une prise en compte récente des effets indésirables potentiels de ces molécules, par rapport à la date de leur première utilisation. Enfin, il convient de noter qu'environ 14 équipes de recherche différentes ont été impliquées dans ces thématiques. Parmi les 14 groupes de recherche, quatre ont un nombre d'études publiées plus élevé que les autres, chacun signant 3 à 6 études sur les 31. Les publications collectées proviennent principalement de laboratoires universitaires, 6 proviennent de l'industrie.



Figure 2. Timeline of the 31 collected studies.

3.2. Comparaison des méthodes réalisées

3.2.1. Formes physiques et chimiques des adjuvants AI

3.2.1.1. Adjuvants AI. L'AH a été utilisé dans 23 études sur 31 (74 %), l'AP dans 2 (6 %), l'AHS dans 1 (3 %). Les études restantes étaient spécifiquement axées sur les injections de vaccins ou les injections de traceurs d'AI.

3.2.1.2. Vaccins contenant de l'Al. Des vaccins contenant de l'oxyhydroxyde d'aluminium ont été utilisés dans 20 des 31 études (65 %), des vaccins contenant de l'hydroxyphosphate d'aluminium dans 3 (10 %) et des vaccins contenant de l'AHS dans 2 (6 %). Les autres études portaient spécifiquement sur des injections des adjuvants (voir ci-dessus).

3.2.2. Espèces et souches animales, nombre d'animaux, sexe et âge

3.2.2.1. Espèces et souches. Dans les 31 études sélectionnées, différentes espèces d'animaux ont été utilisées :

- Souris (14 études) : souches C57BL/6, CD1, NZBWF1,
- Rat (8 études) : Wistar, Sprague Dawley, « souche Weizmann Institute », Lewis, souche Brown Norway,
- Primate non humain (PNH) (1 étude) : Macaque cynomolgus (*Macaca fasciculata*),
- Lapin (2 études) : souche New Zealand White,
- Porc (1 étude) : un croisement entre Italian Landrace et Italian Large White,
- Ovins (6 études) : Aragonesa pure race ou croisement Aragonesa et Romanov.

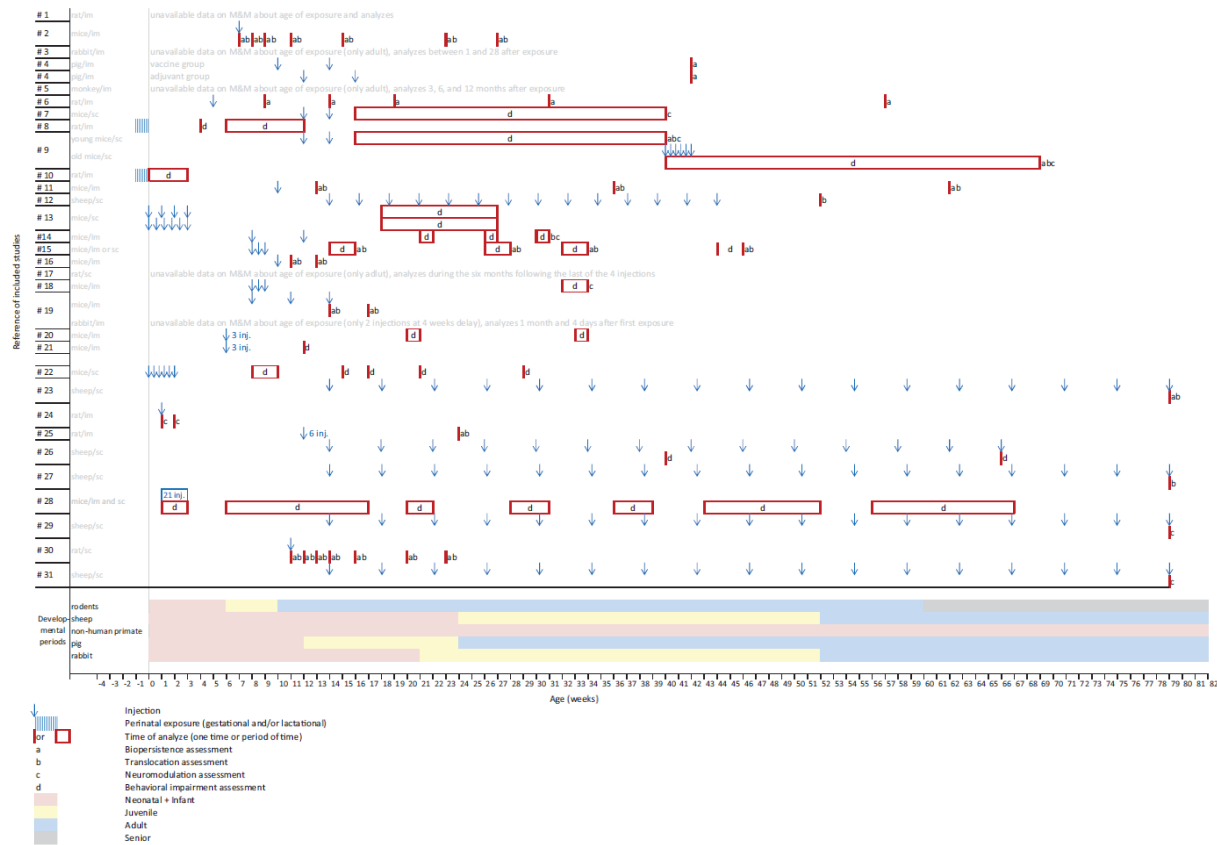


Figure 3. Graphical representation of the timing of injections and analyses performed in each protocol of the 31 included publications.

3.2.2.2. Nombre d'animaux. Le nombre d'animaux par groupe dépendait largement de l'espèce considérée. Les PNH et les lapins composaient les plus petits groupes avec 2 ou 3 animaux par groupe pour les lapins et 4 pour les PNH. L'étude utilisant des porcs a utilisé 10 animaux par groupe. Les groupes de moutons étaient constitués de 3 à 28 animaux, les groupes de rats contenaient 5 à 44 animaux et les groupes de souris contenaient 4 à 64 animaux (généralement 10 animaux par groupe environ).

3.2.2.3. Le genre. Les études incluaient uniquement des mâles (14 études) ou des femelles (10 études) ou des mâles et des femelles (6 études). 1 étude sur des porcs ne mentionne pas cette information.

3.2.2.4. Âge. Les études sélectionnées ont été réalisées à différents stades de développement (Figure 3). La majorité des études ont porté sur des expositions au stade adulte : 18 études sur 31, alors que 7 études sur 31 ont été réalisées chez des animaux juvéniles (1 sur des porcs juvéniles et 6 sur des agneaux) et 6 sur 31 ont porté sur des expositions en période périnatale (2 études sur l'exposition gestationnelle sur des rats ; 3 études sur des nouveau-nés de souris et 1 sur des nouveau-nés de rat). Aucune étude ne s'est concentrée sur les individus âgés.

La transposition de l'âge animal à l'âge humain est généralement une question importante et difficile. Il existe des différences notoires entre les espèces animales au cours de la période néonatale, au stade juvénile, au stade adulte et lors de la sénescence (Andersson et al., 1999 ; Morford et al. 2011 ; Andreollo et al. 2012 ; Geifman et Rubin 2013 ; Sengupta 2013 ; Dutta et Sengupta 2016 ; Agoston 2017 ; Dutta et Sengupta 2018 ; Tohyama et Kobayashi 2019 ; Sengupta et Dutta 2020 ; Graves et al. 2020). De plus amples informations sont fournies dans le [tableau 1 supplémentaire](#) et dans la [figure 3](#).

3.2.3. Modes d'exposition

Les 2 voies d'exposition différentes correspondant aux voies d'administration couramment utilisées pour les vaccins ont été représentées de manière homogène, avec 16 études utilisant des injections intramusculaires et 13 études utilisant des injections sous-cutanées. Dans 2 études, plusieurs voies d'administration d'Al ont pu être utilisées.

En ce qui concerne les doses et le nombre d'injections selon le mode d'exposition, le nombre d'injections a tendance à être inférieur pour les injections IM par rapport aux injections SC, mais les doses totales d'Al (considérées en mg/kg de poids corporel) injectées semblent assez similaires pour les deux modes d'exposition.

3.2.4. Délai de réalisation des tests ou des analyses

D'une étude à l'autre, les délais de réalisation des tests ou des analyses d'Al sont très difficiles à évaluer, surtout lorsque le délai entre la première et la dernière exposition est long. En général, ce délai entre l'exposition et les tests comportementaux ou les analyses d'Al est de l'ordre de quelques jours et jusqu'à 9 mois post injections pour les rongeurs adultes ou exposés en périnatal et d'une semaine à plus d'un an pour les ovins en raison de la multiplication des expositions sur une période plus longue ([Figure 3](#)).

3.2.5. Doses

L'éventail des doses administrées n'était pas toujours exprimé de la même manière. Nous avons déterminé que les doses d'Al sous forme d'ABA ou de vaccins contenant de l'Al variaient de 16,8 à 10 000 µg d'Al/kg de poids corporel dans les études sur les adultes et les jeunes (à l'exception de 150 mg Al/kg de poids corporel sous forme d'AH pour Berlyne et al. (1972) et de 240 à 6250 µg d'Al/kg de poids corporel dans les études périnatales (avec tous les ABA) ([Figure 4](#)).

La conversion allométrique pour tenir compte de la différence d'espèce entre l'humain et l'animal a été utilisée dans quatre études par une seule équipe de recherche. Deux types d'études peuvent être différenciées : celles qui modélisent l'exposition humaine et celles qui imitent les schémas vétérinaires de vaccination. D'un point de vue général, toutes les études visaient à s'appuyer sur des niveaux réalistes d'exposition humaine ou vétérinaire aux adjuvants Al.

Les auteurs de 6 études de 3 groupes de recherche ont vérifié au préalable la concentration des vaccins contenant de l'aluminium avant l'injection.

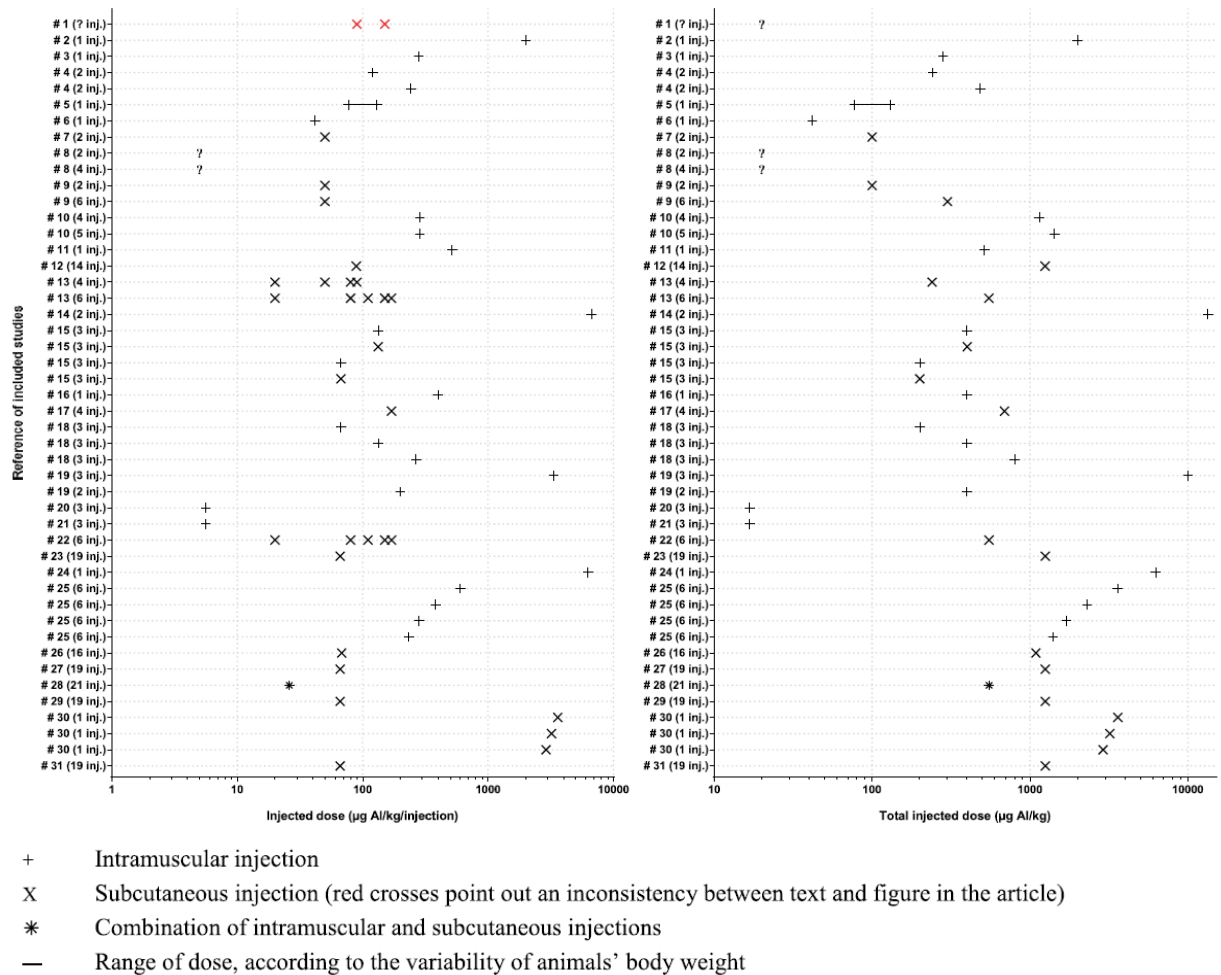


Figure 4. Graphical representation of Al injected dose (dose by injection, number of injection, and total injected dose) in each protocol of the 31 included publications. ?Unknown; *Intramuscular injection; XSubcutaneous injection (red crosses point out an inconsistency between text and figure in the article); †Combination of intramuscular and subcutaneous injections. †Range of dose, according to the variability of animals' body weight.

3.2.6. Nombre d'injections

Le nombre d'injections a été considéré comme un paramètre essentiel (Figure 4). Il variait de 1 à 6 dans les études adultes et pouvait atteindre 21 dans les études post-natales.

3.2.7. Méthodes utilisées pour les analyses ABA dans les tissus et les échantillons prélevés

Deux types d'analyses ABA ont été réalisées : détection histologique d'Al ou dosage des niveaux de concentration d'Al. La détection histologique a été réalisée dans 9 études sur 31 et le dosage d'Al dans 14 études sur 31 (Figure 5). Un large panel de méthodes a été utilisé pour les deux types d'analyses. La localisation histologique d'Al dans les tissus a été réalisée par des colorations fluorescentes, telles que le vert clair, l'azurine Solochrome, l'Aluminon, le Morin ou le Lumogallion, par des traceurs fluorescents tels que le complexe Al-nanodiamants ou par microscopie électronique à transmission et émission de rayons X induite par des protons (PIXE). Les dosages d'Al ont été effectués par spectrométrie de masse par

accélérateur (SMA), spectrométrie de rétrodiffusion de Rutherford (RBS), spectrométrie d'absorption atomique (AAS), spectrométrie de masse à plasma à couplage inductif (ICP-MS) ou spectrométrie d'absorption atomique par four graphite (GF-AAS). Les matrices, dans lesquelles la teneur en Al est quantifiée, restent également très diverses : muscle, os, sérum, foie, rate, ganglions lymphatiques drainants, poumon, rein, cœur et cerveau. Enfin, aucun bilan de masse n'a été réalisé pour estimer la diffusion d'Al et le pourcentage de répartition dans chaque tissu.

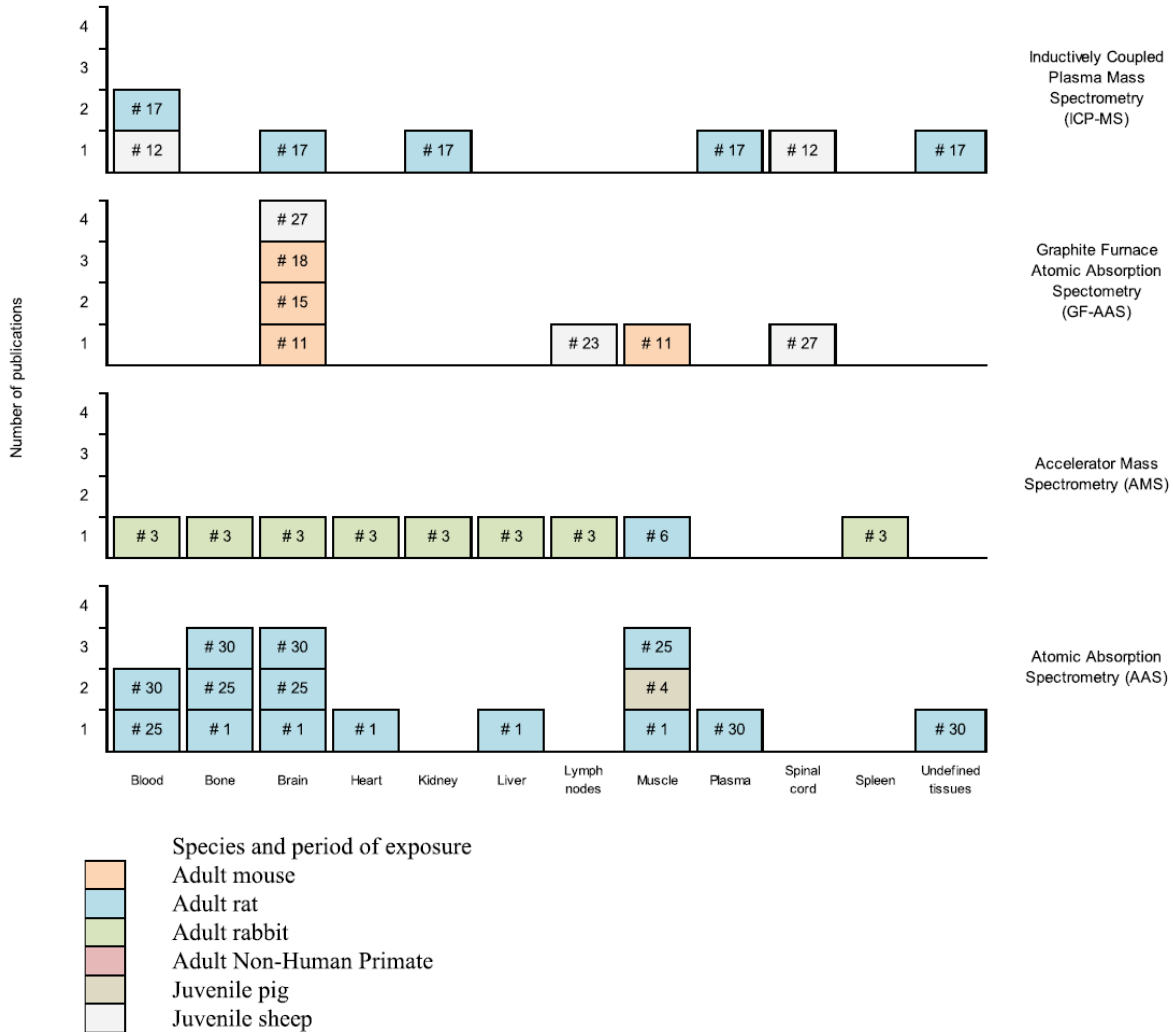


Figure 5. Graphical representation of Al dosage (methods, samples, and animal species) in each protocol of the 31 included publications.

3.2.8. Discussion

Le principal constat est que dans ces 31 études un large éventail de méthodes a été utilisé, en termes de modèles animaux, de doses injectées, d'utilisation de facteurs de conversion allométrique, de moment d'exposition, de délai de réalisation de test, etc. Ce manque d'homogénéité, bien que compréhensible étant donné que ces différents équipes ont travaillé de manière indépendante, rend difficile une vision claire de ce qui a été fait jusqu'à présent dans ce domaine. Une comparaison des résultats obtenus par des méthodes aussi différentes est approximative. Il convient aussi de noter qu'un très faible nombre d'études (6 sur 31) se sont concentrées sur les expositions précoces, bien que les bébés et les nourrissons soient la principale cible vaccinale.

3.3. Comparaison des résultats observés

Chaque équipe a conçu ses expérimentations avec des questionnements, des objectifs et des outils spécifiques. La principale difficulté pour comparer les résultats est l'absence d'une procédure standard unique. Néanmoins, nous présentons quelques éléments qui nous paraissent importants.

3.3.1. Biopersistance et translocation

18 études sur 31 visaient à évaluer la biopersistance et/ou la translocation des ABA (Figure 6). La première a été publiée en 1972, donc 40 ans après la première utilisation des ABA dans les vaccins humains. Après seulement 2 recherches utilisant des particules d'Al dans les années 70 et 80 (Berlyne et al. 1972 ; Goto et Akama 1982), la première étude réellement centrée sur la cinétique des ABA a eu lieu à la fin du siècle dernier et a été menée chez le lapin (Flarend et al. 1997). Depuis cette étude de Flarend, une description de la biopersistance a été mentionnée dans 14 études, et une translocation vers différents organes à différents moments après l'exposition a été observée à chaque évaluation. Le cerveau a été l'échantillon le plus analysé avec 7 publications, toujours chez des animaux adultes ; 3 publications ont rapporté le dosage d'Al dans les os et les muscles, également chez l'adulte.

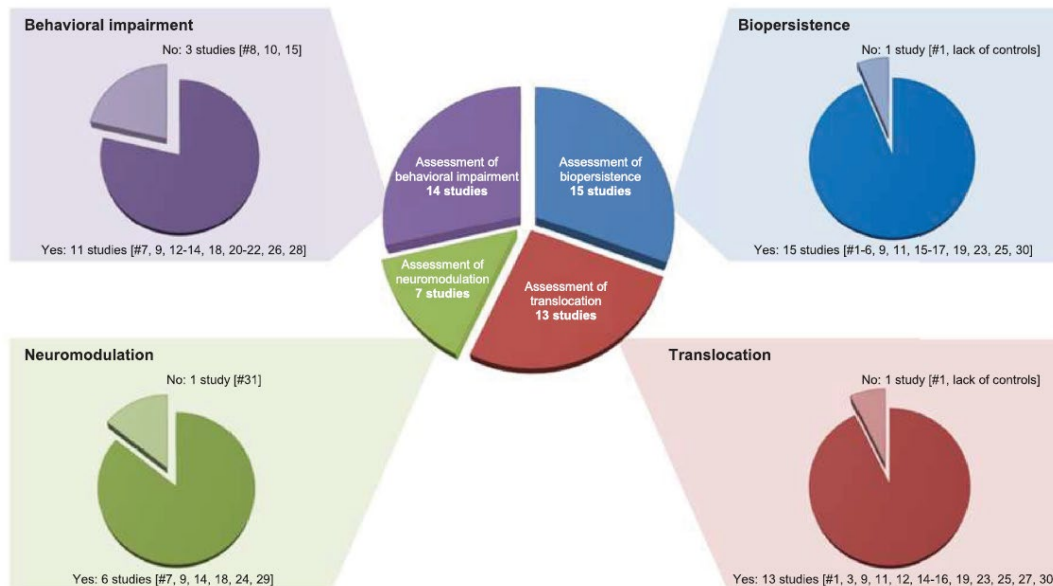


Figure 6. Graphical representation of performed analyses and main result obtained in the 31 included publications. “No”/“Yes” means that the quoted parameter was not/was observed significantly different between exposed and control groups, respectively.

3.3.2. Discussion

L'ensemble des expériences a mis en évidence une longue rétention d'Al, au moins plusieurs mois, dans l'organisme de tous les modèles animaux. Aucune étude n'a démontré l'élimination effective des ABA. En effet, 12 études ont suivi directement ou indirectement le devenir de l'Al des adjuvants vaccinaux après leur disparition du site d'injection et ont confirmé que les ABA sont transloqués dans des organes distants, tels que les ganglions lymphatiques, la rate, le foie, les reins, le cœur, les os, la moelle épinière, et le cerveau. La principale difficulté était de discriminer les particules injectées des particules environnementales (autre exposition ou pollution externe de l'échantillon). Pour éviter toute confusion, 3 études ont utilisé des composés particuliers spécifiquement conçus pour être suivis par fluorescence après translocation, soit à base de noyaux de rhodamine enrobés d'AH, soit de nanodiamants fluorescents incorporés dans des agglomérats d'adjuvants AH (Khan et al. 2013 ; Eidi et al. 2015 ; Crépeaux et al. 2015).

Ces expériences ont prouvé que les particules d'AH peuvent transloquer du site d'injection vers des organes distants, justifiant ainsi l'observation de particules d'adjuvants Al dans ces organes après coloration d'Al par Morin, Lumogallion, Azurine Solochrome ou Aluminon.

La comparaison de la mobilité des sels d'Al après injection dans les différentes études est difficile à faire en raison de l'utilisation d'une large gamme de doses d'Al et de diverses méthodes de détection, chaque méthode présentant sa propre limite de détection. L'ICP-MS est l'instrument avec la limite de détection la plus basse. Seules 2 publications l'ont utilisé, avec une grande variation de la dose d'injection d'Al, allant de 172 µg/animal sous forme d'AH (McDougall et al. 2016) à 56 000 µg /animal sous forme de vaccins vétérinaires contenant de l'Al (Lujan et al. 2013). La plupart des études ont utilisé le GF-AAS dont la limite de détection d'Al est 100 fois plus élevée que l'ICP-MS. De plus, la fraction d'Al transloquée à partir du site d'injection doit être différenciée du bruit de fond dans chaque tissu. L'utilisation de doses réalistes d'Al semble être un modèle pertinent, mais la quantification de la mobilité et de la répartition de l'Al dans l'ensemble de l'organisme, dans ce cas, est une question non encore entièrement résolue.

15 études ont évalué directement ou indirectement la biopersistance de l'Al au site d'injection ou la translocation quelque part dans l'organisme. Cependant, le délai de réalisation des analyses d'Al variait de quelques jours à plusieurs mois, rendant la limite de temps définissant la biopersistance peu claire dans les différents modèles animaux. Il est évident que l'Al pourrait être localement piégé pendant un certain temps et transloqué (par exemple vers les organes lymphatiques) dans le cadre d'un « processus de clairance normal », mais comme ce processus n'est ni clairement défini ni compris, la biopersistance est restée une notion quelque peu floue. En d'autres termes, la question principale peut être « quel est le délai pertinent permettant de considérer que les particules d'adjuvant persistent et peuvent présenter un risque de toxicité chronique ? ». On peut cependant raisonnablement considérer que plusieurs mois de persistance, ainsi que la translocation vers le cerveau et d'autres compartiments sensibles, sont toujours problématiques.

Un autre point important mis en évidence par les études sur les rongeurs était l'importance du bagage génétique dans la biopersistance observée de l'Al. En effet, des expériences similaires ont trouvé des résultats différents en fonction de la souche. Chez la souris, une translocation cérébrale des ABA a été trouvée dans la souche C57BL/6 3 semaines après l'injection d'AH (Eidi et al. 2015) alors qu'à dose, volume d'injection et voie d'exposition comparables, aucune translocation cérébrale n'a été observée chez la souris CD1 même 36 semaines après l'injection (Crépeaux et al. 2015). De plus, chez les rats, il y avait une différence notable dans la taille des granulomes induits par les vaccins à base d'AH au site d'injection entre les souches Sprague-Dawley et Lewis (Authier et al. 2006). Ces résultats montrent clairement l'importance d'explorer les facteurs de susceptibilité individuels (par exemple génétiquement déterminés) avec de nouvelles études.

Lorsque l'on considère les études montrant la translocation d'Al du site d'injection vers le cerveau, soit directement par visualisation d'Al, soit indirectement par dosage d'Al, il faut systématiquement veiller à ce que l'Al soit détecté dans le parenchyme du SNC ou au contraire dans le compartiment vasculaire. Les futures études complémentaires doivent être soigneusement conçues pour éviter toute confusion sur ce point, comme l'ont fait précédemment Khan et al. (2013), et évaluer l'ensemble des mécanismes de transfert cérébral de l'Al dérivé de l'adjuvant en plus du mécanisme du cheval de Troie piloté par MCP1/CCL2 précédemment documenté par ces auteurs. Il est à noter également que les mécanismes de transfert intracérébral de particules Al ne sont pas clairement décrits dans la littérature et nécessiteraient une évaluation minutieuse.

3.3.3. Effets neuromodulateurs ou éthologiques

La première étude identifiée portant sur les effets neuromodulateurs des ABA ou des vaccins contenant de l'Al, utilisant l'Al comme exposition à l'Al, a été publiée en 2007, soit 80 ans après la première utilisation humaine des ABA (Petrik et al. 2007). Nous avons ensuite trouvé 16 autres études traitant de cette question par des analyses cérébrales ou des évaluations comportementales (Figure 6).

3.3.4. Discussion

Il n'y a pas de consensus sur l'évaluation de la neuromodulation induite par les ABA et les études sélectionnées n'ont pas suivi de recommandations spécifiques, comme les recommandations européennes ou internationales (par exemple les guidelines 424 ou 426 de 1997 et 2007 de l'OCDE, pour les rongeurs). De nombreuses méthodes complémentaires mais très diverses ont été utilisées pour évaluer les effets de l'ABA sur le SNC. Certaines de ces méthodes visaient directement à évaluer les modifications du SNC par coloration spécifique des protéines Tau et des types de cellule particulière, comme les astrocytes ou les cellules gliales. D'autres ont analysé différentes fonctions biologiques, telles que l'apoptose par l'activité caspase, l'altération transcriptomique par séquençage d'ARN, ou la réponse inflammatoire par dosage d'un panel de cytokines pro et anti-inflammatoires. Outre ces approches directes, des enquêtes plus indirectes ont été menées à partir d'évaluations éthologiques, portant principalement sur les comportements anxieux, l'apprentissage et la mémoire, le comportement social et la locomotion, ou les performances de force musculaire.

13 des 17 études évaluant la neuromodulation ont mis en évidence des modifications du SNC, évaluées directement ou indirectement, suite à une exposition aux ABA, notamment l'apoptose des neurones de la moelle épinière lombaire (Petrik et al. 2007), l'augmentation des cellules gliales activées (Crépeaux et al. 2017) ou des astrocytes réactifs et de la protéine tau hyper-phosphorylée (Shaw et Petrik 2009) dans différentes zones cérébrales, et une réponse pro-inflammatoire cérébrale globale (Agmon-Levin et al. 2014). 11 des 14 études qui ont effectué des évaluations comportementales ont également indiqué un effet négatif des ABA chez les adultes et les animaux exposés en période périnatale. Des anomalies comportementales ont été uniformément trouvées lors de différentes expériences et incluaient un impact sur les comportements anxieux/dépressifs (Petrik et al. 2007 ; Lujan et al. 2013 ; Shaw et al. 2013 ; Agmon-Levin et al. 2014 ; Crépeaux et al. 2017 ; Inbar et al. 2017 ; Kivity et al. 2017) ; les troubles de la mémoire (Shaw et Petrik 2009 ; Agmon-Levin et al. 2014 ; Eidi et al. 2020) ; la réduction des capacités sociales (Sheth et al. 2018 ; Asin et al. 2020 ; Eidi et al. 2020) ; la diminution de la force musculaire et de l'endurance entraînant une diminution des fonctions et de l'activité locomotrices (Petrik et al. 2007 ; Shaw et Petrik 2009 ; Shaw et al. 2013 ; Crépeaux et al. 2017 ; Inbar et al. 2017).

Les études de l'industrie, y compris l'exposition prénatale au vaccin contre le HPV contenant de l'aluminium ou aux ABA seuls, n'ont pas observé d'effets significatifs entre les groupes exposés et non exposés sur les paramètres évalués (Wise et al. 2008 ; Segal et al. 2011).

4. Analyse globale

4.1. Le contexte

Considérant que la quasi-totalité des individus et de nombreux animaux sont exposés aux ABA par la vaccination, de la naissance à l'âge adulte, la question de la biopersistance et de la neurotoxicité des ABA représente un enjeu majeur de santé publique.

Jusqu'à présent, la sécurité des ABA reposait sur un nombre limité et insuffisant d'expériences (Masson et al. 2018 ; Crépeaux et al. 2020). Depuis leur conception et leur utilisation au début du XXe siècle (Glenny et al. 1926a, 1926b) jusqu'au début du XXIe siècle, très peu de recherches ont été menées sur la pharmacocinétique et la neurotoxicité des ABA, malgré un nombre croissant d'études humaines et animales tirant le signal d'alarme sur un temps de persistance long non anticipé des ABA et sur les troubles neurologiques associés à cette biopersistance, chez l'homme et le mouton.

Même si les vaccins classiques sont largement utilisés et généralement bien tolérés par la plupart des gens, leur administration peut parfois être suivie de l'apparition de manifestations cliniques retardées/chroniques, y compris des affections mal définies associant des symptômes, tels que myalgies, arthralgies, fatigue chronique et développement d'auto-anticorps (Rosenblum et al. 2011). En raison d'un manque d'études épidémiologiques appropriées à long terme et d'une mauvaise compréhension des symptômes post-vaccination (Institute of Medicine [IOM] 2012), aucun consensus n'a été atteint jusqu'à présent pour décider si, oui ou non, il existait une relation de cause à effet. Il convient de noter, cependant, que les ABA ont été soupçonnés d'être associés à plusieurs affections inflammatoires/neurodégénératives ou auto-immunes affectant le SNC chez les adultes, telles que la MMF et le SFC (Gherardi et al. 2019), la sclérose en plaques (Hernan et al. 2004), ou la sclérose latérale amyotrophique (Petrik et al. 2007). Ceci est en accord avec le rôle de l'Al environnemental qui est continuellement soupçonné de représenter un cofacteur possible de plusieurs maladies chroniques (Exley 2013). En outre, plusieurs articles de la littérature, à la fois épidémiologiques et expérimentaux, ont suggéré que l'exposition aux ABA pouvait être insidieusement dangereuse chez les enfants sur le court et le long terme, et pourrait bien participer à l'énorme augmentation actuelle des troubles du neurodéveloppement (Tomljenovic et Shaw 2011 ; Seneff et al. 2012 ; Shaw et Tomljenovic 2013 ; Shaw et al. 2013 ; Miller 2016 ; Morris et al. 2017 ; Mold et al. 2018 ; Sheth et al. 2018 ; Wang et al. 2018 ; Ivanovski et al. 2019 ; Eidi et al. 2020) - pour une revue de la littérature, voir Boretti (2021).

L'effet neurotoxique de l'Al est connu depuis longtemps, mais la majorité des études ont exclusivement pris en compte les effets toxiques de l'Al soluble (principalement du chlorure d'Al, du nitrate d'Al ou du lactate d'Al) ingéré par la nourriture ou l'eau ou injecté par voie intrapéritonéale. Or les ABA sont complètement différents. Leur forme particulière (amorphe ou cristalline) et leur faible solubilité à pH neutre (notamment AH) sont associées à un temps de biopersistance beaucoup plus long que la forme soluble dont la majeure partie est rapidement éliminée par les urines. Leur voie d'administration est également différente puisque les vaccins sont principalement injectés par voie intramusculaire (vaccins humains et vaccins vétérinaires) ou sous-cutanée (vaccins vétérinaires). Par conséquent, la pharmacocinétique et la pharmacodynamique de l'Al soluble ne peuvent être comparées à celles des ABA. On connaît trop peu la pharmacocinétique et la pharmacodynamique des ABA qui, outre les spécificités conférées par leurs propriétés physico-chimiques (taille, charge, structure et agglomération) présentent la particularité d'être captés par les phagocytes rapidement après injection, ajoutant ainsi à la complexité du sujet. D'un point de vue toxicologique, les ABA exercent de puissants effets immunostimulants propres, non décrits pour l'Al soluble. De plus, les ABA prolongent significativement la demi-vie des antigènes adsorbés à leur surface (Glenny et al. 1931 ; Ghimire et al. 2012) ce qui peut influencer les potentiels effets immunologiques nocifs de ces antigènes. Il est donc impératif d'étudier séparément à la fois la toxicité individuelle de chaque type d'ABA et celle du complexe qu'ils forment avec les différents types d'antigènes adsorbés.

En résumé, la connaissance établie des ABA est faible et largement basée sur des conceptions erronées anciennes. Il faut en savoir plus sur la biopersistance, la translocation et la neurotoxicité des ABA et des vaccins contenant de l'Al. Dans ce contexte, l'expérimentation animale est essentielle et peut permettre aux fabricants de vaccins d'aborder des questions précédemment sous-étudiées liées à la cinétique, à la dynamique et aux risques à court et à long terme associés à l'exposition à ces composés. En utilisant des mots simples, les questions sont : comment ces composés sont-ils distribués dans le corps ? Sont-ils métabolisés et si oui, comment sont-ils métabolisés ? Sont-ils biopersistants et si oui, combien de temps ? Sont-ils éliminés, après combien de temps et comment ? Quels peuvent être leurs effets immédiats et à long terme sur l'organisme et notamment sur le SNC ?

4.2. Résumé de nos résultats

Nous avons identifié 31 études sur les composés ABA qui ont été réalisées sur différentes espèces : PNH, porc, lapin, rat, souris et mouton. Il est à noter que nombre de ces études ont porté sur les ABA associés à des antigènes puisque ces composés sont administrés lors des procédures de vaccination et de désensibilisation sous cette forme. De plus, la présence de ces antigènes peut jouer un rôle important dans la cinétique et la dynamique des ABA et inversement (voir ci-dessus). Dans certaines études, l'exposition est réalisée à travers des vaccins contenant de l'Al sans groupe expérimental ABA (Verdier et al. 2005 ; Authier et al. 2006 ; Lujan et al. 2013 ; Eidi et al. 2020), il est donc compliqué de conclure indiscutablement sur le rôle joué par les adjuvants dans les effets observés, notamment concernant la neuromodulation ou les analyses éthologiques.

Au vu des études recueillies, il est indispensable de prendre en compte plusieurs paramètres expérimentaux pouvant avoir une influence significative sur les résultats, notamment la dose, la concentration, le volume injecté, la composition en sel, le nombre et le schéma d'administration, l'espèce animale, et la souche utilisée et d'avoir des groupes de contrôle pertinents.

Comme évoqué précédemment, la principale difficulté lors de la comparaison de ces études toxicologiques est que, à l'exception des études réalisées sur les ovins - un seul groupe de recherche travaillant sur ce modèle -, tous les protocoles varient beaucoup d'une étude à l'autre, ce qui conduit à des comparaisons hasardeuses.

Par ailleurs, plusieurs difficultés peuvent être identifiées dans ce domaine de recherche notamment concernant le protocole d'exposition. En effet, les calendriers de vaccination étant différents d'un pays à l'autre, les doses d'exposition définies pour modéliser une exposition réaliste peuvent varier. Une question clé concernant les doses injectées expérimentales est la véritable quantité d'Al dans les vaccins ou les solutions d'adjuvants, car cela peut différer de la quantité indiquée par le fabricant (Shardlow et al. 2021) et seules deux équipes l'ont vérifiée comme première étape de leurs travaux. De plus, comme le devenir et la toxicité des ABA sont liés au vaste domaine de la toxicité des particules, et comme les propriétés physico-chimiques des particules sont des paramètres clés du devenir et des effets des particules (Nies et al. 2020) plus que les doses, la taille des particules d'adjuvant, le potentiel zêta, la forme des agglomérats doivent être caractérisés lorsque cela est possible. La dilution des vaccins à des fins d'injection entraîne une modification de la taille des particules d'aluminium (Shardlow et al. 2016 ; Badran et al. 2022). A notre connaissance, cette approche n'a jamais été envisagée dans le domaine des effets des ABA dans les modèles animaux. De même, l'impact de la composition saline et de la dilution sur les caractéristiques physico-chimiques des adjuvants doit être soigneusement étudié comme autre étape préalable. En effet, la variabilité des concentrations, des charges, du milieu et des tailles affecte principalement la mobilité de

l'Al et la réaction immunitaire conduisant à une rétroaction sur la mobilité de l'Al (Li et al. 2014, 2017 ; Thakkar et al. 2018).

4.3. Résultats sur la biopersistance/translocation

Ces résultats ont confirmé que l'Al issu des adjuvants peut être transloqué et persister dans des tissus distants. Les dépôts d'Al détectés dans la rate et le cerveau pourraient résulter soit d'une translocation physique de particules d'adjuvant, soit d'une agrégation in situ d'Al soluble, soit des deux. Une observation très importante a été faite à partir des groupes travaillant sur le modèle rat ou mouton : le devenir de l'Al est différent selon que l'Al est inclus dans le vaccin entier ou est injecté comme adjuvant seul, probablement en raison d'une différence de taille de particules injectées. Dans l'étude sur le rat, la concentration moyenne d'Al dans l'hémisphère droit du cerveau était statistiquement plus élevée que les valeurs du véhicule (groupe contrôle) dans les trois groupes vaccinés, mais elle n'était pas significativement différente des témoins pour le groupe adjuvant seul (Weisser et al. 2019). Au contraire, dans l'étude ovine, on observe la présence de niveaux plus élevés d'Al dans la moelle épinière lombaire dans le groupe Adjuvant seul par rapport au groupe Vaccin (de Miguel et al. 2020).

4.4. Résultats sur la neuromodulation

L'ensemble des résultats observés atteste que les ABA pourraient être associés à diverses altérations du SNC et à des troubles éthologiques. L'activation immunitaire produite par ces adjuvants induit une réponse inflammatoire qui peut être visible au niveau du SNC, éventuellement associée à l'apoptose des motoneurones et à des troubles neurodéveloppementaux. De plus, l'impact des ABA sur le SNC a également été attesté par une approche comportementale montrant l'émergence de comportements de type anxieux, des troubles de la mémoire et l'apparition d'un déficit social suite à une exposition à l'Al. Il est nécessaire de garder à l'esprit que la présence ou l'absence d'Al dans le cerveau n'est pas une condition préalable à la neurotoxicité, car différents mécanismes indirects de neurotoxicité sont liés à l'activation immunitaire périphérique (c'est-à-dire EM/SFC, effets inflammatoires précoces sur le développement cérébral, etc.) et peuvent exister ou se combiner avec une neurotoxicité directe de l'Al.

4.5. Biais et limites des études publiées

Nous avons choisi de conserver toutes les données publiées qui correspondent à nos critères d'inclusion, car elles ont été revues par des pairs avant acceptation de leurs publications, de manière très classique. Cependant, parmi les 31 études recueillies, nous avons personnellement constaté différentes faiblesses dans les protocoles ou l'interprétation. Par exemple, certains vaccins utilisés contenaient du mercure, ceci n'étant pas pris en compte dans l'interprétation des résultats. Parfois, des groupes de contrôle adéquats manquaient ou les données étaient très incohérentes entre le texte et les chiffres dans la section des résultats. Une étude a qualifié le groupe adjuvant de « groupe témoin placebo », ce qui était perturbant pour le lecteur, même si les résultats étaient présentés correctement.

La question des conflits d'intérêts peut également être légitimement soulevée lorsqu'une industrie privée publie des résultats sur la sécurité de ses propres produits.

La question du calcul de la dose est parfois difficile à appréhender pour le lecteur et il peut parfois apparaître insuffisamment précis, notamment lorsqu'on considère une dose unique par poids corporel pour des individus en croissance vaccinés de façon répétitive.

Enfin, le volume d'injections IM pratiquées chez des souris adultes dans deux études semble dépasser le volume qu'un muscle de souris pourrait absorber, remettant en question la véritable voie d'exposition « IM » pour l'ensemble de la dose.

4.6. Veille bibliographique

Lors de la veille bibliographique, il a été trouvé un pourcentage énorme de publications traitant de l'efficacité ou des réponses immunitaires des ABA, mais notre recherche bibliographique s'est concentrée sur la persistance, la translocation sur les effets neurotoxiques, et non pas sur les mécanismes immunitaires. De plus, nous avons remarqué que certaines études très intéressantes avaient des mots clés liés ni à l'Al ni aux adjuvants ni aux vaccins, étant plus axées sur les réponses immunitaires ou la libération de cytokines, donc difficilement détectées par la recherche bibliographique standard.

Compte tenu des limites ou des faiblesses de certaines études et du choix problématique des mots-clés qui influencent les classifications des articles dans les bases de données, nous espérons avoir travaillé pour aider à l'amélioration des études futures et à la rédaction des articles dans ce domaine.

4.7. Données d'autres études

Différentes études exclues de cette revue, par exemple en raison d'autres voies d'administration non pertinentes, sont néanmoins intéressantes à examiner brièvement. En effet, il a été démontré de manière constante que l'administration néonatale intrapéritonéale (IP) d'un vaccin contre le VHB contenant de l'oxyhydroxyde d'aluminium induit une réponse immunitaire périphérique Th2 tout en augmentant l'IL-1b, l'IL-6 et le TNF- α dans l'hippocampe et en entravant la plasticité synaptique de l'hippocampe, alors que la vaccination intradermique néonatale au Bacille Calmette-Guerin (BCG) induit des effets opposés (Li et al. 2015). Récemment, il a été rapporté à deux reprises que l'injection IP d'un vaccin contre l'hépatite B contenant de l'Al au cours des trois premières semaines d'âge interfère avec le cerveau en développement chez des souris C57BL/6 (Yang et al. 2016 ; Wang et al. 2018). Nous avons également trouvé trois études avec exposition intranasale, montrant que l'exposition aux nanoparticules d'Al par goutte à goutte intranasale a été liée à une toxicité neurodéveloppementale et/ou à des altérations comportementales et à une neurotoxicité impliquant des voies de stress oxydatif chez la souris (Zhang et al. 2011, 2018 ; Li et al. 2020). De plus, la translocation d'Al vers la rate ou le cerveau a été démontrée, respectivement, après une exposition adulte ou prénatale (Zhang et al. 2018 ; Li et al. 2020). Même si le type de particules utilisées n'était pas le même que celui des ABA utilisés dans les vaccins, ces données méritent d'être prises en compte et approfondies dans le cadre du développement de l'administration intranasale de vaccins contenant de l'Al.

4.8. Cadre idéal pour des études ultérieures

À la lumière de l'ensemble des données analysées dans la présente revue, nous proposons quelques principes méthodologiques (liste non exhaustive) qui pourraient idéalement être suivis pour améliorer de futures études expérimentales ainsi que les articles publiés, sur le thème des ABA :

- Vérifier la teneur en Al des vaccins ou des adjuvants commerciaux utilisés, ainsi que de l'eau potable et de la nourriture ;
- Vérifier la taille et la charge des particules, surtout si une dilution est appliquée ;
- Privilégier une voie d'administration habituelle du vaccin (i.e. IM) ;

- Compléter les études éthologiques par une étude toxicocinétique des adjuvants Al dans l'organisme et de la biodistribution d'Al dans les organes étudiés ;
- Être très précis dans toutes les étapes de la procédure technique pouvant impacter les résultats (modèle animal, conditions d'hébergement, seringue et aiguille et leur effet potentiel sur la désagrégation des particules, lieu d'injection exact, température de conservation des solutions, préparation des solutions, choix des volumes et doses, précautions pour éviter une contamination externe lors du prélèvement d'échantillons, etc.).

Suivre toutes les recommandations n'est peut-être pas toujours faisable, mais les garder à l'esprit au moment de la conception d'une étude expérimentale peut aider à combler les insuffisances mises en évidence dans notre présente revue.

5. Conclusion

Depuis le début de l'utilisation des ABA dans les vaccins, un nombre limité d'études toxicologiques ont été publiées. Ce nombre est encore plus faible si l'on considère la partie la plus sensible de la population (femmes enceintes, bébés, nourrissons et personnes âgées). Malgré une grande variabilité dans les protocoles exécutés, la neuromodulation, la biopersistance et la translocation des ABA à partir du site d'injection ont été presque constamment documentées, méritant ainsi clairement des recherches plus approfondies dans ce domaine critique. Une meilleure connaissance de la sécurité des ABA est cruciale pour l'évaluation optimale de leur balance bénéfices-risques, ce qui conduira à une augmentation de la confiance du public et à l'optimisation des protocoles de vaccination.

A noter

1. Dans toutes les études ou documents consultés pour rédiger la présente revue, la manière d'indiquer la quantité d'aluminium présente dans un vaccin ou une solution peut différer, entre Al et Al³⁺. Nous avons choisi dans ce manuscrit de citer précisément les références utilisées. Lorsque le terme aluminium est écrit en toutes lettres nous avons gardé l'abréviation Al.

Remerciements

Les auteurs remercient les financeurs Entraide aux Malades de Myofasciite à Macrophages (E3M), I For Lyme, BioSanté éditions, l'Agence Nationale pour la Recherche, et le Département de l'Innovation, de la Recherche de l'Université d'Aragon (Espagne). Les auteurs remercient les relecteurs anonymes sélectionnés par l'Editeur pour la valeur de leurs commentaires, qui ont permis d'améliorer cette revue. Nous tenons à remercier le Pr RK Gherardi pour sa relecture attentive et ses conseils.

Déclaration d'intérêt

Les auteurs déclarent qu'ils n'ont pas de conflits d'intérêts. Ce travail a été initié pour avoir une synthèse de tous les travaux publiés sur le sujet, dans un but de diffusion des connaissances mais aussi dans le but d'élaborer de futurs protocoles de recherche. Aucun des auteurs n'a été rémunéré spécifiquement pour ce travail, la publication de données scientifiques faisant partie intégrante de leurs missions professionnelles. Les auteurs n'ont pas participé et ne prévoient pas de participer à des démarches juridiques, réglementaires ou de plaidoyer liées au contenu de l'article.

Matériel supplémentaire

Des données supplémentaires pour cet article sont disponibles en ligne sur :

<https://doi.org/10.1080/10408444.2022.2105688>

Références

- Agmon-Levin N, Arango MT, Kivity S, Katzav A, Gilburd B, Blank M, Tomer N, Volkov A, Barshack I, Chapman J, et al. 2014. Immunization with hepatitis B vaccine accelerates SLE-like disease in a murine model. *J Autoimmun.* 54:21–32.
- Agoston DV. 2017. How to translate time? The temporal aspect of human and rodent biology. *Front Neurol.* 8:92.
- Andersson HK, Hullberg A, Malmgren L, Lundström K, Rydhmer L, Squires J. 1999. Sexual maturity in entire male pigs: environmental effects, relations to skatole level and female puberty. *Null.* 49(2):103–112.
- Andreollo NA, Santos E d, Araujo MR, Lopes LR. 2012. Rat's age versus human's age: what is the relationship? *Arq Bras Cir Dig.* 25(1):49–51.
- Angrand L, Elnar AA, Authier FJ, Gherardi RK, Crépeaux G. 2020. [Aluminium adjuvant exposure through vaccines in France in 2018]. *Ann Pharm Fr.* 78(2):111–128.
- Asin J, Molin J, Perez M, Pinczowski P, Gimeno M, Navascues N, Muniesa A, de Blas I, Lacasta D, Fernandez A, et al. 2019 May. Granulomas following subcutaneous injection with aluminum adjuvant-containing products in sheep. *Vet Pathol.* 56(3):418–428.
- Asin J, Pascual-Alonso M, Pinczowski P, Gimeno M, Perez M, Muniesa A, de Pablo-Maiso L, de Blas I, Lacasta D, Fernandez A, et al. 2020. Cognition and behavior in sheep repetitively inoculated with aluminum adjuvant-containing vaccines or aluminum adjuvant only. *J Inorg Biochem.* 203(110934):110934.
- Authier F-J, Sauvat S, Christov C, Chariot P, Raisbeck G, Poron MF, Yiou F, Gherardi R. 2006. AIOH3-adjuvanted vaccine-induced macrophagic myofasciitis in rats is influenced by the genetic background. *Neuromuscul Disord.* 16(5):347–352.
- Badran G, Angrand L, Masson JD, Crépeaux G, David MO. 2022. Physicochemical properties of aluminum adjuvants in vaccines: implications for toxicological evaluation. *Vaccine.* 40(33):4881–4888. Baylor NW, Egan W, Richman P. 2002. Aluminum salts in vaccines—US perspective. *Vaccine.* 20(3):S18–S23.
- Begue P, Girard M, Bazin H, Bach J-F. 2012. Les adjuvants vaccinaux : quelle actualite en 2012? *Bull L'Acad Natl Med.* 196(6):1177–1181.
- Berlyne GM, Yagil R, Ari JB, Weinberger G, Knopf E, Danovitch GM. 1972. Aluminium toxicity in rats. *Lancet.* 1(7750):564–568.
- Boretti A. 2021. Reviewing the association between aluminum adjuvants in the vaccines and autism spectrum disorder. *J Trace Elem Med Biol.* 66:126764.
- Brewer JM, Conacher M, Satoskar A, Bluethmann H, Alexander J. 1996. In interleukin-4-deficient mice, alum not only generates T helper 1 responses equivalent to freund's complete adjuvant, but continues to induce T helper 2 cytokine production. *Eur J Immunol.* 26(9): 2062–2066.
- Bruce M, Streifel KM, Boosalis CA, Heuer L, Gonz_alez EA, Li S, Harvey DJ,
- Lein PJ, Van de Water J. 2019. Acute peripheral immune activation alters cytokine expression and glial activation in the early postnatal rat brain. *J Neuroinflamm.* 16(1):200.
- Cain DW, Sanders SE, Cunningham MM, Kelsoe G. 2013. Disparate adjuvant properties among three formulations of “alum”. *Vaccine.* 31(4): 653–660.
- Champion JA, Mitragotri S. 2009. Shape induced inhibition of phagocytosis of polymer particles. *Pharm Res.* 26(1):244–249.
- Crépeaux G, Authier F-J, Exley C, Luj_an L, Gherardi RK. 2020. The role of aluminum adjuvants in vaccines raises issues that deserve independent, rigorous and honest science. *J Trace Elem Med Biol.* 62:126632.
- Crépeaux G, Eidi H, David M-O, Baba-Amer Y, Tzavara E, Giros B, Authier F-J, Exley C, Shaw CA, Cadusseau J, et al. 2017. Non-linear dose response of aluminium hydroxide adjuvant particles: Selective low dose neurotoxicity. *Toxicology.* 375:48–57.
- Crépeaux G, Eidi H, David M-O, Tzavara E, Giros B, Exley C, Curmi PA, Shaw CA, Gherardi RK, Cadusseau J. 2015. Highly delayed systemic translocation of aluminum-based adjuvant in CD1 mice following intramuscular injections. *J Inorg Biochem.* 152:199–205.
- Day MJ, Horzinek MC, Schultz RD, Squires RA, Vaccination Guidelines Group (VGG) of the World Small Animal Veterinary Association (WSAVA). 2016. WSAVA Guidelines for the vaccination of dogs and cats. *J Small Anim Pract.* 57(1):E1–E45.
- de Miguel R, Asin J, Rodriguez-Largo A, Molin J, Echeverr_ia I, de Andres D, Perez M, de Blas I, Mold M, Reina R, et al. 2020. Detection of aluminum in lumbar spinal cord of sheep subcutaneously inoculated with aluminum-hydroxide containing products. *J Inorg Biochem.* 204:110871.
- de Miguel R, As_in J, Rodr_iguez-Largo A, Echeverr_ia I, Lacasta D, Pinczowski P, Gimeno M, Mol_in J, Fern_andez A, de Blas I, et al. 2021. Growth performance and clinicopathological analyses in lambs repetitively inoculated with aluminum-hydroxide containing vaccines or aluminum-hydroxide only. *Animals.* 11(1):146.
- Di Pasquale A, Preiss S, Tavares Da Silva F, Garc_on N. 2015. Vaccine adjuvants : from 1920 to 2015 and beyond. *Vaccines.* 3(2):320–343.
- Dutta S, Sengupta P. 2016. Men and mice: relating their ages. *Life Sci.* 152:244–248.
- Dutta S, Sengupta P. 2018. Rabbits and men: relating their ages. *J Basic Clin Physiol Pharmacol.* 29(5):427–435.
- Eickhoff TC, Myers M. 2002. Workshop summary. Aluminum in vaccines. *Vaccine.* 20(3):S1–S4.
- Eidi H, David M-O, Cr_épeaux G, Henry L, Joshi V, Berger M-H, Sennour M, Cadusseau J, Gherardi RK, Curmi PA. 2015. Fluorescent nanodiamonds as a relevant tag for the assessment of alum adjuvant particle biodisposition. *BMC Med.* 13(1):144
- Eidi H, Yoo J, Bairwa SC, Kuo M, Sayre EC, Tomljenovic L, Shaw CA. 2020. Early postnatal injections of whole vaccines compared to placebo controls: differential behavioural outcomes in mice. *J Inorg Biochem.* 212:111200.
- Eisenbarth SC, Colegio OR, O'Connor W, Sutterwala FS, Flavell RA. 2008. Crucial role for the Nalp3 inflammasome in the immunostimulatory properties of aluminium adjuvants. *Nature.* 453(7198):1122–1126.
- Exley C. 2013. Human exposure to aluminium. *Environ Sci Process Impacts.* 15(10):1807–1816.
- Exley C. 2020. An aluminium adjuvant in a vaccine is an acute exposure to aluminium. *J Trace Elem Med Biol.* 57:57–59.
- Exley C, Siesj_ø P, Eriksson H. 2010. The immunobiology of aluminium adjuvants: how do they really work? *Trends Immunol.* 31(3):103–109.

Flarend RE, Hem SL, White JL, Elmore D, Suckow MA, Rudy AC, Dandashli EA. 1997. In vivo absorption of aluminium-containing vaccine adjuvants using 26Al. *Vaccine*. 15(12–13):1314–1318.

Franchi L, Nunez G. 2008. The Nlrp3 inflammasome is critical for aluminium hydroxide-mediated IL-1beta secretion but dispensable for adjuvant activity. *Eur J Immunol*. 38(8):2085–2089.

Gallagher CM, Goodman MS. 2010. Hepatitis B vaccination of male neonates and autism diagnosis, NHIS 1997–2002. *J Toxicol Environ Health A*. 73(24):1665–1677.

Geifman N, Rubin E. 2013. The mouse age phenome knowledgebase and disease-specific inter-species age mapping. *PLOS One*. 8(12):e81114.

Gherardi RK, Coquet M, Cherin P, Belec L, Moretto P, Dreyfus PA, Pellissier JF, Chariot P, Authier FJ. 2001. Macrophagic myofasciitis lesions assess long-term persistence of vaccine-derived aluminium hydroxide in muscle. *Brain*. 124(9):1821–1831.

Gherardi RK, Crepeaux G, Authier F-J. 2019. Myalgia and chronic fatigue syndrome following immunization: macrophagic myofasciitis and animal studies support linkage to aluminum adjuvant persistency and diffusion in the immune system. *Autoimmun Rev*. 18(7):691–705.

Ghimire TR, Benson RA, Garside P, Brewer JM. 2012. Alum increases antigen uptake, reduces antigen degradation and sustains antigen presentation by DCs in vitro. *Immunol Lett*. 147(1–2):55–62.

Glenny AT, Pope CG, Waddington H, Wallace V. 1926a. The antigenic value of toxoid precipitated by potassium alum. *J Pathol Bacteriol*. 29:38–45.

Glenny AT, Pope CG, Waddington H, Wallace U. 1926b. Immunological notes. XVII–XXIV. *J Pathol*. 29(1):31–40.

Glenny AT, Buttle GAH, Stevens MF. 1931. Rate of disappearance of diphtheria toxoid injected into rabbits and guinea pigs: toxoid precipitated with Alum. *J Pathol*. 34(2):267–275.

Goto N, Akama K. 1982. Histopathological studies of reactions in mice injected with aluminum-adsorbed tetanus toxoid. *Microbiol Immunol*. 26(12):1121–1132.

Graves KL, Mordhorst BR, Wright EC, Hale BJ, Stalder KJ, Keating AF, Ross JW. 2020. Identification of measures predictive of age of puberty onset in gilts. *Transl Anim Sci*. 4(1):285–292.

Hem SL. 2002. Elimination of aluminum adjuvants. *Vaccine*. 20(3):S40–S43.

Hem SL, Hogenesch H. 2007. Relationship between physical and chemical properties of aluminum-containing adjuvants and immunopotentiality. *Expert Rev Vaccines*. 6(5):685–698.

Hernan MA, Jick SS, Olek MJ, Jick H. 2004. Recombinant hepatitis B vaccine and the risk of multiple sclerosis: a prospective study. *Neurology*. 63(5):838–842.

Hogenesch H. 2013. Mechanism of immunopotentiality and safety of aluminum adjuvants. *Front Immunol* 3:406.

Hogenesch H, Dunham A, Bulet E, Lu F, Mosley Y-YC, Morefield G. 2017. Preclinical safety study of a recombinant *Streptococcus pyogenes* vaccine formulated with aluminum adjuvant. *J Appl Toxicol*. 37(2):222–230.

Hogenesch H, O'Hagan DT, Fox CB. 2018. Optimizing the utilization of aluminum adjuvants in vaccines: you might just get what you want. *NPJ Vaccines*. 3:51.

Hsiao I-L, Huang Y-J. 2011. Effects of various physicochemical characteristics on the toxicities of ZnO and TiO nanoparticles toward human lung epithelial cells. *Sci Total Environ*. 409(7):1219–1228.

Hühn D, Kantner K, Geidel C, Brandholt S, De Cock I, Soenen SJH, Rivera Gil P, Montenegro J-M, Braeckmans K, M€ullen K, et al. 2013. Polymercoated nanoparticles interacting with proteins and cells: focusing on the sign of the net charge. *ACS Nano*. 7(4):3253–3263.

Inbar R, Weiss R, Tomljenovic L, Arango MT, Deri Y, Shaw CA, Chapman J, Blank M, Shoenfeld Y. 2017. Behavioral abnormalities in female mice following administration of aluminum adjuvants and the human papillomavirus (HPV) vaccine Gardasil. *Immunol Res*. 65(1):136–149.

[IOM] Institute of Medicine. 2012. Adverse effects of vaccines: evidence and causality. Washington (DC): The National Academies Press

Ivanovski I, Fletcher MW, Ivanovski A, Nikolić D, Ivanovski P. 2019. Do the vaccines harm? *J Trace Elem Med Biol*. 55:107–109.

Keith LS, Jones DE, Chou CH. 2002. Aluminum toxicokinetics regarding infant diet and vaccinations. *Vaccine*. 20:S13–S17.

Khan Z, Combadiere C, Authier FJ, Itier V, Lux F, Exley C, Mahrouf-Yorgov M, Decrouy X, Moretto P, Tillement O, et al. 2013. Slow CCL2-dependent translocation of biopersistent particles from muscle to brain. *BMC Med*. 11(99):99.

Kivity S, Arango M-T, Molano-Gonzalez N, Blank M, Shoenfeld Y. 2017. Phospholipid supplementation can attenuate vaccine-induced depressive-like behavior in mice. *Immunol Res*. 65(1):99–105.

Kool M, Petrilli V, De Smedt T, Rolaz A, Hammad H, van Nimwegen M, Bergen IM, Castillo R, Lambrecht BN, Tschopp J. 2008. Cutting edge: alum adjuvant stimulates inflammatory dendritic cells through activation of the NALP3 inflammasome. *J Immunol*. 181(6):3755–3759.

Lacasta D, Ferrer LM, Ramos JJ, Gonzalez JM, Ortin A, Fthenakis GC. 2015. Vaccination schedules in small ruminant farms. *Vet Microbiol*. 181(1–2):34–46.

Lee JH, Ju JE, Kim BI, Pak PJ, Choi EK, Lee HS, Chung N. 2014. Rod-shaped iron oxide nanoparticles are more toxic than sphere-shaped nanoparticles to murine macrophage cells. *Environ Toxicol Chem*. 33(12):2759–2766.

Li H, Huang T, Wang Y, Pan B, Zhang L, Zhang Q, Niu Q. 2020. Toxicity of alumina nanoparticles in the immune system of mice. *Nanomedicine*. 15(9):927–946.

Li H, Nookala S, Re F. 2007. Aluminum hydroxide adjuvants activate caspase-1 and induce IL-1beta and IL-18 release. *J Immunol*. 178(8):5271–5276.

Li H, Willingham SB, Ting JP-Y, Re F. 2008. Cutting edge: inflammasome activation by alum and alum's adjuvant effect are mediated by NLRP3. *J Immunol*. 181(1):17–21.

Li Q, Qi F, Yang J, Zhang L, Gu H, Zou J, Yuan Q, Yao Z. 2015. Neonatal vaccination with bacillus Calmette-Guérin and hepatitis B vaccines modulates hippocampal synaptic plasticity in rats. *J Neuroimmunol*. 288:1–12.

Li X, Aldayel AM, Cui Z. 2014. Aluminum hydroxide nanoparticles show a stronger vaccine adjuvant activity than traditional aluminum hydroxide microparticles. *J Control Release*. 173:148–157.

Li X, Hufnagel S, Xu H, Valdes SA, Thakkar SG, Cui Z, Celio H. 2017. Aluminum (Oxy) hydroxide nanosticks synthesized in bicontinuous reverse microemulsion have potent vaccine adjuvant activity. *ACS Appl Mater Interfaces*. 9(27):22893–22901.

Lima H, Jacobson LS, Goldberg MF, Chandran K, Diaz-Griffero F, Lisanti MP, Brojatsch J. 2013. Role of lysosome rupture in controlling Nlrp3 signaling and necrotic cell death. *Cell Cycle*. 12(12):1868–1878.

Lindblad EB. 2004. Aluminium adjuvants—in retrospect and prospect. *Vaccine*. 22(27–28):3658–3668.

Lu F, Hogenesch H. 2013. Kinetics of the inflammatory response following intramuscular injection of aluminum adjuvant. *Vaccine*. 31(37):3979–3986.

Lujan L, Perez M, Salazar E, Alvarez N, Gimeno M, Pinczowski P, Irusta S, Santamaria J, Insausti N, Cortes Y, et al. 2013. Autoimmune/autoinflammatory syndrome induced by adjuvants (ASIA syndrome) in commercial sheep. *Immunol Res*. 56(2–3):317–324.

Lyons-Weiler J, Ricketson R. 2018. Reconsideration of the immunotherapeutic pediatric safe dose levels of aluminum. *J Trace Elem Med Biol*. 48:67–73.

Mannhalter JW, Neychev HO, Zlabinger GJ, Ahmad R, Eibl MM. 1985. Modulation of the human immune response by the non-toxic and non-pyrogenic adjuvant aluminium hydroxide: effect on antigen uptake and antigen presentation. *Clin Exp Immunol*. 61(1):143–151.

Marrack P, McKee AS, Munks MW. 2009. Towards an understanding of the adjuvant action of aluminium. *Nat Rev Immunol*. 9(4):287–293.

Masson JD, Crepeaux G, Authier FJ, Exley C, Gherardi RK. 2018. Critical analysis of reference studies on the toxicokinetics of aluminum-based adjuvants. *J Inorg Biochem*. 181:87–95.

Matsiko A. 2020. Alum adjuvant discovery and potency nature materials. <https://www.nature.com/articles/d42859-020-00011-w?sf245768437=1>

McDougall SA, Heath MD, Kramer MF, Skinner MA. 2016. Analysis of aluminium in rat following administration of allergen immunotherapy using either aluminium or microcrystalline-tyrosine-based adjuvants. *Bioanalysis*. 8(6):547–556.

Miller NZ. 2016. Aluminum in childhood vaccines is unsafe. *J Amer Physic Surg*. 21(4):9.

Mitkus RJ, King DB, Hess MA, Forshee RA, Walderhaug MO. 2011. Updated aluminum pharmacokinetics following infant exposures through diet and vaccination. *Vaccine*. 29(51):9538–9543.

Mold M, Shardlow E, Exley C. 2016. Insight into the cellular fate and toxicity of aluminium adjuvants used in clinically approved human vaccinations. *Sci Rep*. 6(1):31578.

Mold M, Umar D, King A, Exley C. 2018. Aluminium in brain tissue in autism. *J Trace Elem Med Biol*. 46:76–82.

Morefield GL, Sokolovska A, Jiang D, Hogenesch H, Robinson JP, Hem SL. 2005. Role of aluminum-containing adjuvants in antigen internalization by dendritic cells in vitro. *Vaccine*. 23(13):1588–1595.

Morford LL, Bowman CJ, Blanset DL, Bøgh IB, Chellman GJ, Halpern WG, Weinbauer GF, Coogan TP. 2011. Preclinical safety evaluations supporting pediatric drug development with biopharmaceuticals: strategy, challenges, current practices. *Birth Defects Res B Dev Reprod Toxicol*. 92(4):359–380.

Morris G, Puri BK, Frye RE. 2017. The putative role of environmental aluminium in the development of chronic neuropathology in adults and children. How strong is the evidence and what could be the mechanisms involved? *Metab Brain Dis*. 32(5):1335–1355.

Nies I, Hidalgo K, Bondy SC, Campbell A. 2020. Distinctive cellular response to aluminum based adjuvants. *Environ Toxicol Pharmacol*. 78:103404.

OECD. 1997. Test No. 424: neurotoxicity study in rodents, OECD guidelines for the testing of chemicals, section 4. Paris: OCDE.

OECD. 2007. Test No. 426: developmental neurotoxicity study, OECD guidelines for the testing of chemicals, section 4. Paris: OCDE.

Petrik MS, Wong MC, Tabata RC, Garry RF, Shaw CA. 2007. Aluminum adjuvant linked to Gulf War illness induces motor neuron death in mice. *Neuromolecular Med*. 9(1):83–100.

Ramon G. 1926. Procédés pour accroître la production des antitoxines. *Ann Inst Pasteur*. 40:1–10.

Ramon G. 1925. Sur l'augmentation anormale de l'antitoxine chez les chevaux producteurs de serum antidiphtérique. *Bull Soc Centr Med Vet*. 101:227–234.

Rosenblum H, Shoenfeld Y, Amital H. 2011. The common immunogenic etiology of chronic fatigue syndrome: from infections to vaccines via adjuvants to the ASIA syndrome. *Infect Dis Clin North Am*. 25(4):851–863.

Roth J, Sandbulte M. 2021. The role of veterinary vaccines in livestock production, animal health and public health. In: Metwally S, Viljoen G, El Idrissi A, editors. *Veterinary vaccines: principles and applications*. Hoboken (NJ): Wiley Blackwell. 1–10.

RUMA Guidelines. 2022. Vaccines – responsible use of medicines in agriculture alliance. [accessed 2022 Mar 21]. <https://www.ruma.org.uk/vaccines/>.

Seeber SJ, White JL, Hem SL. 1991. Predicting the adsorption of proteins by aluminium-containing adjuvants. *Vaccine*. 9(3):201–203.

Segal L, Wilby OK, Willoughby CR, Veenstra S, Deschamps M. 2011. Evaluation of the intramuscular administration of Cervarix™ vaccine on fertility, pre- and post-natal development in rats. *Reprod Toxicol*. 31(1):111–120.

Seneff S, Davidson R, Liu J. 2012. Empirical data confirm autism symptoms related to aluminum and acetaminophen exposure. Basel: MDPI Publishing [Internet] [accessed 2019 Jul 12]. <https://dspace.mit.edu/handle/1721.1/77575>.

Sengupta P. 2013. The laboratory rat: relating its age with human's. *Int J Prev Med*. 4(6):624–630.

Sengupta P, Dutta S. 2020. Mapping the age of laboratory rabbit strains to human. *Int J Prev Med*. 11(194):194.

Al-Shakhshir R, Regnier F, White JL, Hem SL. 1994. Effect of protein adsorption on the surface charge characteristics of aluminium-containing adjuvants. *Vaccine*. 12(5):472–474.

Shardlow E, Linhart C, Connor S, Softely E, Exley C. 2021. The measurement and full statistical analysis including Bayesian methods of the aluminium content of infant vaccines. *J Trace Elem Med Biol*. 66:126762.

Shardlow E, Mold M, Exley C. 2016. From stock bottle to vaccine: elucidating the particle size distributions of aluminum adjuvants using dynamic light scattering. *Front Chem.* 4:48.

Shardlow E, Mold M, Exley C. 2018. Unraveling the enigma: elucidating the relationship between the physicochemical properties of aluminium-based adjuvants and their immunological mechanisms of action. *Allergy, Asthma Clin Immunol* 14:80.

Shaw CA, Li Y, Tomljenovic L. 2013. Administration of aluminium to neonatal mice in vaccine-relevant amounts is associated with adverse long term neurological outcomes. *J Inorg Biochem.* 128:237–244.

Shaw CA, Petrik MS. 2009. Aluminum hydroxide injections lead to motor deficits and motor neuron degeneration. *J Inorg Biochem.* 103(11):1555–1562.

Shaw CA, Tomljenovic L. 2013. Aluminum in the central nervous system (CNS): toxicity in humans and animals, vaccine adjuvants, and autoimmunity. *Immunol Res.* 56(2–3):304–316.

Sheth SKS, Li Y, Shaw CA. 2018. Is exposure to aluminium adjuvants associated with social impairments in mice? A pilot study. *J Inorg Biochem.* 181:96–103.

Shoenfeld Y, Agmon-Levin N. 2011. “ASIA” – autoimmune/inflammatory syndrome induced by adjuvants. *J Autoimmun.* 36(1):4–8.

Sokolovska A, Hem SL, HogenEsch H. 2007. Activation of dendritic cells and induction of CD4_bT cell differentiation by aluminum-containing adjuvants. *Vaccine.* 25(23):4575–4585.

Spickler AR, Roth JA. 2003. Adjuvants in veterinary vaccines: modes of action and adverse effects. *J Vet Intern Med.* 17(3):273–281.

Sukhanova A, Bozrova S, Sokolov P, Berestovoy M, Karaulov A, Nabiev I. 2018. Dependence of nanoparticle toxicity on their physical and chemical properties. *Nanoscale Res Lett.* 13(1):44.

Thakkar SG, Xu H, Li X, Cui Z. 2018. Uric acid and the vaccine adjuvant activity of aluminium (oxy)hydroxide nanoparticles. *J Drug Target.* 26(5–6):474–480.

Tohyama S, Kobayashi E. 2019. Age-appropriateness of porcine models used for cell transplantation. *Cell Transplant.* 28(2):224–228.

Tomljenovic L, Shaw CA. 2011. Do aluminum vaccine adjuvants contribute to the rising prevalence of autism? *J Inorg Biochem.* 105(11):1489–1499.

Ulanova M, Tarkowski A, Hahn-Zoric M, Hanson LA. 2001. The Common vaccine adjuvant aluminum hydroxide up-regulates accessory properties of human monocytes via an interleukin-4-dependent mechanism. *Infect Immun.* 69(2):1151–1159.

Valtulini S, Macchi C, Ballanti P, Cheral Y, Laval A, Theaker JM, Bak M, Ferretti E, Morvan H. 2005. Aluminium hydroxide-induced granulomas in pigs. *Vaccine.* 23(30):3999–4004

Varela-Martinez E, Bilbao-Arribas M, Abendano N, Asin J, Perez M, de Andres D, Lujan L, Jugo BM. 2020. Whole transcriptome approach to evaluate the effect of aluminium hydroxide in ovine encephalon. *Sci Rep.* 10(1):15240.

Verdier F, Burnett R, Michelet-Habchi C, Moretto P, Fievet-Groynne F, Sauzeat E. 2005. Aluminium assay and evaluation of the local reaction at several time points after intramuscular administration of aluminium containing vaccines in the Cynomolgus monkey. *Vaccine.* 23(11):1359–1367.

Vogel FR. 2000. Improving vaccine performance with adjuvants. *Clin Infect Dis.* 30(3):S266–S270.

Vogel F, Hem SL. 2004. Immunologic adjuvants. In: *Vaccines.* Philadelphia (PA): Saunders Elsevier; p. 69–79.

Wang X, Yang J, Xing Z, Zhang H, Wen Y, Qi F, Zuo Z, Xu J, Yao Z. 2018. IL-4 mediates the delayed neurobehavioral impairments induced by neonatal hepatitis B vaccination that involves the down-regulation of the IL-4 receptor in the hippocampus. *Cytokine.* 110:137–149.

Weisser K, G€oen T, Oduro JD, Wangorsch G, Hanschmann KO, Keller-Stanislawski B. 2019. Aluminium toxicokinetics after intramuscular, subcutaneous, and intravenous injection of Al citrate solution in rats. *Arch Toxicol.* 93(1):37–47.

Weisser K, G€oen T, Oduro JD, Wangorsch G, Hanschmann KO, Keller-Stanislawski B. 2020. Aluminium from adjuvanted subcutaneous allergen immunotherapeutics in rats is mainly detected in bone. *Allergy.* 75(1):215–217.

Wen Y, Shi Y. 2016. Alum: an old dog with new tricks. *Emerg Microbes Infect.* 5:e25.

Wise LD, Wolf JJ, Kaplanski CV, Pauley CJ, Ledwith BJ. 2008. Lack of effects on fertility and developmental toxicity of a quadrivalent HPV vaccine in Sprague-Dawley rats. *Birth Defects Res B Dev Reprod Toxicol.* 83(6):561–572.

Yang J, Qi F, Yang Y, Yuan Q, Zou J, Guo K, Yao Z. 2016. Neonatal hepatitis B vaccination impaired the behavior and neurogenesis of mice transiently in early adulthood. *Psychoneuroendocrinology.* 73:166–176.

Zhang Q, Ding Y, He K, Li H, Gao F, Moehling TJ, Wu X, Duncan J, Niu Q. 2018. Exposure to alumina nanoparticles in female mice during pregnancy induces neurodevelopmental toxicity in the offspring. *Front Pharmacol.* 9(253):253.

Zhang QL, Li MQ, Ji JW, Gao FP, Bai R, Chen CY, Wang ZW, Zhang C, Niu Q. 2011. In vivo toxicity of nano-alumina on mice neurobehavioral profiles and the potential mechanisms. *Int J Immunopathol Pharmacol.* 24(1):23S–29S.