

PROTOCOLE

**ETUDE EPIDEMIOLOGIQUE EXPLORATOIRE
DE LA MYOFASCIITE A MACROPHAGES**

AGENCE FRANCAISE DE SECURITE SANITAIRE DES PRODUITS DE SANTE

143/147, Boulevard Anatole-France
93285 SAINT-DENIS CEDEX

INSTITUT NATIONAL DE VEILLE SANITAIRE

12, rue du Val d'Osne
94415 SAINT-MAURICE CEDEX

**GROUPE D'ETUDE ET DE RECHERCHE
SUR LES MALADIES MUSCULAIRES ACQUISES ET DYSIMMUNITAIRES
(GERMMAD)
DE L'ASSOCIATION FRANCAISE CONTRE LES MYOPATHIES**

Département de pathologie
Hôpital Henri Mondor
94010 CRETEIL CEDEX

TITRE DE L'ETUDE

ETUDE EPIDEMIOLOGIQUE EXPLORATOIRE DE LA MYOFASCIITE A MACROPHAGES

CONCEPTION ET REALISATION

AGENCE FRANCAISE DE SECURITE SANITAIRE DES PRODUITS DE SANTE

143/147, Boulevard Anatole-France

93285 SAINT-DENIS CEDEX

INSTITUT NATIONAL DE VEILLE SANITAIRE

12, rue du Val d'Osne

94415 SAINT-MAURICE CEDEX

GROUPE D'ETUDE ET DE RECHERCHE SUR LES MALADIES MUSCULAIRES ACQUISES ET DYSIMMUNITAIRES (GERMMAD) DE L'ASSOCIATION FRANCAISE CONTRE LES MYOPATHIES

Département de pathologie

Hôpital Henri Mondor

94010 CRETEIL CEDEX

ANALYSE

AGENCE FRANCAISE DE SECURITE SANITAIRE DES PRODUITS DE SANTE

143/147, Boulevard Anatole-France

93285 SAINT-DENIS CEDEX

FINANCEMENT

AGENCE FRANCAISE DE SECURITE SANITAIRE DES PRODUITS DE SANTE

RESUME

La myofasciite à macrophages (MFM) est une affection de découverte récente caractérisée par la présence d'une lésion histologique très particulière. Des résultats préliminaires montrent qu'une proportion importante des patients porteurs de cette lésion histologique présentent des manifestations cliniques à type d'arthromyalgies diffuses invalidantes associées à un syndrome de fatigue chronique. Une centaine de patients ont été identifiés jusqu'à présent. Les données actuellement disponibles sont en faveur de l'hypothèse d'une relation avec l'aluminium contenu comme adjuvant dans certaines vaccins (voir tableau 7 en annexe, vaccins contenant un adjuvant aluminique commercialisés en France). Cependant, l'absence de comparaison à des témoins dans les travaux antérieurs justifie la réalisation d'une étude épidémiologique pour évaluer cette hypothèse.

L'étude a 3 objectifs principaux. Ils visent à établir l'existence des 3 associations suivantes :

- I - L'existence de la lésion histologique caractéristique de la MFM et la présence d'un syndrome clinique spécifique,
- II - L'existence de la lésion histologique caractéristique de la MFM et des antécédents de vaccination avec des vaccins contenant un adjuvant aluminique,
- III - La présence de ce syndrome clinique spécifique et des antécédents de vaccination avec des vaccins contenant un adjuvant aluminique.

Différents niveaux de définition du syndrome clinique, suggérés par les résultats préliminaires de l'étude préliminaire réalisée par l'InVS, seront utilisés dans l'analyse statistique.

L'ensemble des patients inclus sera sélectionné à partir d'une cohorte de patients suivis par les membres du *Groupe d'Etude et de Recherche sur les Maladies Musculaires Acquisées et Dysimmunitaires* (GERMMAD) de *L'Association Française contre les Myopathies* (AFM). Cette cohorte rassemble 1400 patients chez lesquels a été réalisée une biopsie musculaire avant que la possibilité d'une association entre la MFM et la vaccination ait été envisagée. Elle comprend en particulier 36 patients chez qui a été identifiée la présence de la lésion histologique caractérisant la MFM. Le choix de cette cohorte permet de minimiser la possibilité d'un biais de sélection entraîné par un effet « notoriété » qui pourrait être craint dans une étude avec un recrutement prospectif.

Au sein de cette cohorte seront sélectionnés deux groupes de patients :

- Le groupe des 36 patients chez qui a été déjà identifiée la lésion histologique caractéristique de la MFM,
- un groupe de 700 patients tirés au sort parmi l'ensemble des patients de la cohorte, indépendamment de la présence ou non de la lésion histologique.

Chaque patient sera interrogé de façon standardisée en utilisant le questionnaire joint en annexe par des enquêteurs ne connaissant pas les hypothèses principales de l'étude.

Dans une première étape 2 analyses seront réalisées en comparant les 36 patients porteurs de la lésion histologique et les patients non porteurs de cette lésion : l'étude de l'association entre la présence de la lésion histologique et les antécédents de vaccination par un vaccin contenant un adjuvant aluminique, et l'étude de l'association entre la présence de la lésion et l'existence d'un syndrome clinique particulier.

Dans une seconde étape, dans une approche du type cas-témoins menée chez les patients tirés au sort, les patients avec le syndrome clinique et sans le syndrome clinique seront comparés pour leurs antécédents de vaccination par un vaccin contenant un adjuvant aluminique.

Les patients porteurs de la lésion histologique constitueront l'un des 2 groupes comparés dans la première étape, tandis que leur participation éventuelle à la deuxième sera déterminée par le résultat du tirage au sort réalisé sur l'ensemble de la cohorte.

Dans les analyses pour étudier les associations de la lésion ou du syndrome clinique avec les vaccins, plusieurs fenêtres de temps seront considérées pour l'exposition à la vaccination avec un vaccin contenant un adjuvant aluminique :

- entre 0 et 1 an,
- entre 0 et 4 ans,
- entre 0 et 10 ans.

L'inclusion dans cette étude de 36 patients porteurs de la lésion et 700 patients non porteurs devrait assurer une puissance supérieure à 80 % pour mettre en évidence :

- un odds-ratio de l'ordre de 3 dans la comparaison du syndrome clinique des patients porteurs et non porteurs de la lésion, sous l'hypothèse que la prévalence du syndrome clinique chez les patients porteurs de la lésion soit comprise entre 50 % et 75 %,
- un odds-ratio de l'ordre de 2, pour la comparaison des antécédents de vaccination des patients avec et sans le syndrome clinique, sous l'hypothèse que dans l'échantillon des 700 patients tirés au sort figurent au moins 110 cas correspondant à la définition du syndrome clinique.

HYPOTHESES DE RECHERCHE

Introduction

La découverte de quelques patients avec une myopathie inflammatoire de présentation inhabituelle a conduit à l'enregistrement d'un nombre croissant de patients similaires dans les services français de myopathologie. La publication d'une première série de ces cas (Gherardi, Lancet 1998) en a identifié certaines caractéristiques. Dans cette première série, les 14 patients provenaient des centres de myopathologie de Bordeaux, Marseille, Nantes, Paris-Salpêtrière et Paris-Créteil. Tous ces patients avaient été adressés aux centres de myopathologie pour l'exploration d'une pathologie suspectée initialement d'être une polymyosite ou une polymyalgie rhumatoïde.

Ces patients montraient les principaux symptômes suivants :

- des myalgies diffuses (12/14),
- des arthralgies (9/14),
- une asthénie importante (6/14),
- une faiblesse musculaire (5/14),
- une fièvre (4/14).

Ni les analyses biochimiques ni l'électromyogramme n'étaient particulièrement contributifs : l'activité créatine-kinase n'était élevée que chez 6 patients sur 13, la vitesse de sédimentation chez seulement 5 patients sur 11, et l'électromyogramme ne présentait de signe caractéristique de myopathie que chez 4 patients sur 12.

En revanche, l'examen histologique après biopsie musculaire révélait chez tous les patients des lésions myopathologiques, jamais identifiées jusqu'à lors, spécifiques d'une *myofasciite à macrophages* (MFM), caractérisée par les éléments suivants :

- présence d'un infiltrat centripète inflammatoire de l'épi-, péri- et de l'endomysium périfasciculaire, constitué essentiellement de macrophages cohésifs à large cytoplasme basophile contenant des granulations présentant une réaction positive au réactif PAS (acide périodique-Schiff),
- présence au microscope électronique d'inclusions intra-macrophagiques spiculées osmiophiles, analogues à des cristaux d'apatite,
- présence de quelques lymphocytes T CD8 +,
- absence de lésion myocytaire notable, absence de nécrose, absence de cellules épithélioïdes ou géantes.

Ces particularités permettent de distinguer cette lésion de celles usuellement associées à la myopathie sarcoïde et à la panniculite-fasciite.

Parmi ces patients porteurs de la lésion, aucun patient n'était atteint d'une maladie infectieuse pouvant entraîner une histiocytose réactionnelle (en particulier maladie de Whipple, infection à *Mycobacterium avium* intracellulaire ou malakoplakia). Parmi ces patients, 8 avaient présenté une amélioration sous traitement par corticostéroïde avec ou sans antibiothérapie.

Chez 6 patients, cette MFM était associée à une démyélinisation du système nerveux central proche de la sclérose en plaques, tandis que 2 patients étaient atteints de dermatomyosite et 2 patients étaient atteints de myosite à inclusions.

A la suite de la description de cette série de patients, des cas ont également été rapportés en Espagne, Portugal, Royaume-Uni et aux États-Unis <**PRÉCISER**>.

Bien que la lésion ait été principalement découverte à la suite de biopsies deltoïdiennes chez des patients adultes, elle a ensuite également été retrouvée chez 3 jeunes enfants après une biopsie du quadriceps, dans la zone utilisée usuellement pour l'administration des vaccins chez les jeunes enfants.

Concernant la nature des inclusions cristallines découvertes au microscope électronique dans le cytoplasme des macrophages, leur étude par diffraction des rayons X et par spectrométrie d'absorption atomique, a montré qu'elles étaient constituées de phosphate d'aluminium.

Afin d'étudier la distribution dans l'organisme de l'aluminium chez les patients porteurs de la lésion, des mesures d'aluminium ont été réalisées :

- dans le tissu musculaire incluant la lésion (n = 3),
- dans du tissu musculaire prélevé à distance de la lésion (n = 4),
- dans le sérum chez 12 patients.

Ces mesures ont été comparées à celles réalisées chez 14 patients sans MFM. Les résultats montrent que l'accumulation d'aluminium semble essentiellement focale et limitée à la lésion :

Tableau 1 : Mesures des taux d'aluminium chez des patients avec une MFM

	Min-max	Moyennes ± écart-type
Prélèvement avec macrophages lésionnels	77-1428 µg/g	584 ± 735 µg/g
Prélèvement sans macrophages lésionnels	5-431 µg/g	137 ± 199 µg/g
Patients sans MFM	1-58 µg/g	10±17 µg/g

En revanche, les mesures plasmatiques montrent des taux circulants d'aluminium normaux ou modérément élevés (0.1 à 0.9 µmol/l, normale <4 µmol/l).

C'est la découverte de cette accumulation d'aluminium apparemment limitée au niveau du muscle deltoïde (et du quadriceps dans quelques cas), dans des biopsies réalisées aux sites usuels d'administration des vaccins, qui a conduit à considérer l'hypothèse que la lésion de la MFM puisse être la conséquence de l'injection d'aluminium par l'intermédiaire des vaccins en contenant. En effet, l'aluminium est utilisé, dans de nombreux vaccins, pour adsorber la préparation antigénique et augmenter la réponse immunitaire.

Dans la première série de patients, des anticorps anti-HAV ont été retrouvés dans la proportion élevée de 10 cas sur 13, alors que la séroprévalence est estimée dans la population à 20-30 %. Des anticorps anti-HBV ont été retrouvés dans 8/13 cas. Dans 7 des 8 cas porteurs d'anticorps anti-HBV, la présence isolée d'anticorps anti-Hbs montre leur origine vaccinale.

Par ailleurs, chez des patients atteints de MFM, la scintigraphie au gallium-67 a montré une hyperfixation au niveau des fascias, notamment des membres inférieurs, et des régions périarticulaires, bien corrélée à la topographie des douleurs (Cherin et al, 2000). Cet examen qui est usuellement utilisé pour explorer le métabolisme du fer, met en évidence une surexpression des récepteurs cellulaires de la transferrine au niveau des muscles et des attaches musculaires. Les images obtenues pourraient donc être le reflet d'une interférence de l'aluminium dans le cycle physiologique du fer.

Un tiers des patients présentent une maladie autoimmune caractérisée au moment du diagnostic de MFM, la plus fréquente étant la sclérose en plaques (Authier, 1999)

A l'heure actuelle plus de 100 patients présentant cette myofasciite à macrophages ont été identifiés, avec une vingtaine de nouveaux cas par an.

Enquête préliminaire effectuée par l'Institut National de Veille Sanitaire (InVS)

Cette étude (P. Malfait et D. Levy-Bruhl) a consisté à interroger les patients avec une lésion histologique de MFM afin d'identifier les particularités cliniques et les antécédents de ces patients pour rechercher les causes potentielles de cette MFM.

Au total, parmi les 73 cas présentant une biopsie caractéristique de la MFM identifiés au moment de l'enquête, 53 patients ont pu être interrogés (26 hommes et 27 femmes). L'âge médian au début des symptômes était de 45 ans (7 ans à 69 ans, 67 % des patients étant âgés de 40 ans et plus). Dans 2 cas, les patients appartenaient une même famille (mère - fils).

Chez 38 cas, une vaccination antérieure au début des signes avec un vaccin contenant un adjuvant aluminique a pu être confirmée, dont 32 cas avec un vaccin contre l'hépatite B. Les résultats montrent que l'ensemble des vaccinations reçues par les patients présentant la lésion ont été administrées dans les 10 ans précédant la biopsie ou le début des symptômes. Dans 4 cas parmi les 15 autres patients, l'insuffisance de précision sur la date de vaccination n'a pas permis de situer la vaccination contre l'hépatite B par rapport au début des symptômes. Il n'a pas été retrouvé de maladie particulière dans les antécédents des patients.

L'interrogatoire sur l'utilisation de médicaments dans les 5 ans précédents a retrouvé les antécédents suivants :

Tableau 2 : Utilisation de médicaments dans les 5 ans précédant la biopsie

Médicament	N
Chloroquine	12
Corticostéroïdes	12
Hypocholestérolémiant	7
Pansements gastriques	fréquent
Stéroïdes anabolisants	1

Des antécédents d'hospitalisation dans les 5 années précédant le début des symptômes ont été signalés par 9 patients qui ont rapporté 13 admissions (23 admissions chez 13 patients lorsque les 10 ans précédents étaient considérés) sans prédominance particulière d'un diagnostic ou d'un type de service hospitalier.

Les professions étaient variées mais 16 patients (31 %) avaient des antécédents professionnels, d'une durée de 10 mois à 30 ans (en moyenne 14,5 ans), dans un environnement hospitalier (3 infirmières, 9 aide-soignants et 4 employés dans les services administratifs) ; 13 patients travaillant toujours à l'hôpital lors du début des symptômes.

L'exploration de l'exposition aux produits chimiques a montré, chez 25 patients, une exposition antérieure à des produits chimiques (chlore et iode dans 22 cas, pesticides et herbicides dans 4 cas, métaux pour 5 cas et colles dans 6 cas), tandis que 10 patients ont rapporté avoir été exposés à des rayons X.

Les interrogatoires ont montré des antécédents fréquents de voyage à l'étranger et de pratique sportive :

- 19 personnes (36 %) avaient voyagé dans les 2 années précédant le début des symptômes (7 en Afrique, 4 en Asie, 5 en Europe),
- 27 avaient pratiqué une activité sportive antérieure, dont 20 avec une licence d'une fédération sportive (football, cyclisme, athlétisme, karaté-judo).

En revanche, les interrogatoires n'ont pas révélé d'antécédents particuliers, ni concernant les aspects nutritionnels (types d'aliments consommés, eau, lieux d'achats, habitudes alimentaires particulières...), ni sur les contacts avec les animaux (type d'animal, durée d'exposition...), ni sur les activités spécifiques (chasse, pêche, modélisme).

L'analyse des données portant sur l'habitat n'a pas permis d'identifier de caractéristiques particulières concernant les antécédents environnementaux.

20 patients ont reçu des antibiotiques (13 patients ayant été traités par l'association azithromycine-ofloxacine) tandis que 25 patients ont reçu des corticostéroïdes (14 patients traités avant la biopsie) et 5 patients ont reçu des anti-inflammatoires non-stéroïdiens (28 patients traités avant la biopsie). L'évolution clinique secondaire à ces traitements a été variable selon les patients.

Sur le plan clinique, les symptômes présentés par les patients montrent un tableau d'arthromyalgies associé à une asthénie :

Tableau 3 : Symptômes présentés par les patients avec une MFM

Symptômes	Début		Au moins 1 fois	
Douleurs musculaires	35	66%	43	81%
Asthénie	32	60%	48	91%
Arthralgies	20	38%	30	57%
Céphalées	15	28%	26	49%
Dyspnée	14	26%	27	51%
Douleurs abdominales	13	25%	16	30%
Atteintes oculaires	9	17%	18	34%
Douleurs thoraciques	8	15%	17	32%
Infections urinaires	8	15%	11	21%
Épisode fébrile > 38°C	6	11%	12	23%

Tableau 4 : Caractéristiques des douleurs

	n
Douleurs diffuses à tout le corps	35
Diffuses à plusieurs zones corporelles dès le début	12
Douleurs débutant aux membres inférieurs et s'étendant à tout le corps au cours du temps	17
Douleurs débutant aux membres supérieurs (2) ou une autre zone (4) et s'étendant à tout le corps au cours du temps	6
Douleurs restant limitées au cours du temps	7
Douleurs limitées aux membres inférieurs	6
Douleurs limitées aux membres supérieurs	1
Absence de douleurs ou autres symptômes	11
Total	53

Tableau 5 : Localisations des douleurs

	n
Membres inférieurs	23
Dont :	
Mollets – pieds	11
Cuisses – genoux	5
Membres inférieurs entiers	7
Membres supérieurs	5
Dont :	
Mains – avant-bras	2
Bras – épaules	3
Membres supérieurs entiers	0
Autres localisations	15

La description des douleurs montre une prédominance des douleurs diffuses, soit d'emblée à l'ensemble du corps, soit seulement dans un second temps, après une phase initiale où les douleurs semblent localisées, le plus souvent aux membres inférieurs.

Tableau 6 : Proportion des patients en fonction de la définition clinique

	n	%
Douleurs bilatérales des membres inférieurs, s'étendant progressivement à tout le corps	17	32,1 %
Douleurs bilatérales des membres inférieurs	23	43,4 %
Douleur à l'un des membres au moins	40	75,5 %
Douleur à l'un des membres au moins ou Asthénie inexplicquée	48	90,5 %

Données animales

Des expériences, menées chez le rat Sprague-Dawley, montrent que l'injection IM d'un vaccin contre l'hépatite B contenant de l'hydroxyde d'aluminium induit, aux 21^{ème} et 28^{ème} jours, des lésions au site d'injection similaires à celles de la MFM. Ces lésions sont visibles en microscopie optique et électronique et présentent une accumulation de macrophages PAS+ contenant des cristaux osmiophiles au niveau de l'épi-, péri et endomysium. Les résultats suggèrent que cette réaction ne s'observe qu'après l'administration de vaccin contenant de l'aluminium et pas avec l'adjuvant seul. Trois mois après l'administration du vaccin, les biopsies montrent une régression partielle, sans infiltration cellulaire mais avec une persistance de quelques macrophages.

Programme de recherches en cours

Un programme de recherches fondamentales et animales est en cours de réalisation pour étudier la MFM.

Recherches physiopathologiques

Des recherches physiopathologiques sont en cours de réalisation pour étudier la MFM :

Caractérisation immunopathologique des lésions de MFM :

- Evaluation des facteurs de la persistance macrophagique au niveau de la lésion (recherche d'apoptose par la méthode de *in-situ end labelling* expression tissulaire des protéines régulatrices de l'apoptose : Bcl2/Bax, Bcl-X_L, survivine et GM-CSF).
- Expression tissulaire des cytokines de l'inflammation et de l'immunité (IL-1 α , l'IL-1 β , l'IL-1Ra, IL2, IL4, IL5, IL6, IL10, IL12, IL13, TNF α , TGF β , interféron- γ).

Caractérisation des altérations tissulaires au niveau des zones douloureuses :

- Etude myopathologique des biopsies effectuées au niveau des zones hyperfixantes à la scintigraphie au gallium,
- Expression immunohistochimique des biopsies (HLA-ABC, HLA-DR, CD3, CD4, CD8, CD20, CD68, CD71, C5-b9).

Evaluation du statut immunitaire des patients avec une MFM par :

- la recherche d'autoanticorps,
- l'évaluation de la production systémique de cytokines de l'inflammation et de l'immunité (IL-1 α , l'IL-1 β , l'IL-1Ra, IL2, IL4, IL6, IL10, IL12, IL13, IFN γ , TNF α , récepteurs solubles du TNF α , TGF β , CRP, α 2-macroglobuline, GM-CSF et récepteur soluble de la transferrine).
- le phénotypage des leucocytes sanguins par cytométrie de flux (CD3, CD4, CD8, CD16, CD20, CD68, CD71, DR, CD49d, CD29).

Etude immunogénétique (étude en collaboration avec R. Mantegazza, Milan) pour évaluer le polymorphisme des gènes de l'IL-1 α , l'IL-1 β , l'IL-1Ra et l'IL6 chez les patients atteints de MFM.

Etude *in vitro* des effets de l'hydroxyde d'aluminium sur le macrophage humain (D. Dormont, CEA et Laboratoire Aventis Pasteur)

Cette recherche vise à :

- évaluer l'effet de l'hydroxyde d'aluminium sur l'activité phagocytaire des macrophages, la production de cytokines pro-inflammatoires et anti-inflammatoires et de chimiokines, l'activité oxydante des macrophages,
- comparer les effets de l'hydroxyde et du phosphate d'aluminium ainsi que du phosphate de calcium, utilisés comme adjuvants dans les vaccins,
- évaluer la reproductibilité des réponses macrophagiques envers différents adjuvants aluminiques et de vaccins,
- comparer les macrophages de patients sains et de patients atteints de MFM,
- déterminer la durée de la présence aluminique au sein des macrophages après injection d'adjuvants aluminiques.

Recherches chez l'animal

Parallèlement à ces investigations biologiques, des recherches sont menées chez l'animal en collaboration entre l'équipe INSERM E0011 (Pr. Gherardi, Créteil), le laboratoire de myologie du *National Institute of Health* (Dr. Dalakas, Bethesda) et le centre de recherche du laboratoire Aventis (Dr. Verdier). Ces recherches visent à :

- mettre au point un modèle animal de MFM chez le rongeur (rat, souris, lapin) et le petit primate,
- évaluer la cinétique d'élimination de l'aluminium et la persistance de la lésion tissulaire induite par la vaccination,
- évaluer l'impact d'un vaccin aluminique sur les marqueurs systémiques et tissulaires de l'inflammation et de l'immunité,
- évaluer la contribution de facteurs génétiques à la MFM en comparant l'impact sur ces marqueurs pour la souche Sprague-Dawley avec des souches Th1-prédominantes (Lewis, Dark-Agouti) et Th2-prédominantes (Brown-Norway).
- Evaluer l'effet d'une vaccination aluminique sur la barrière hémato-encéphalique du rat Lewis par IRM cérébrale au gadolinium et étude neuropathologique.

PROBLEMATIQUE

Les données actuelles permettent de conclure à l'existence chez certains patients d'une lésion histologique particulière, qui n'avait pas été identifiée antérieurement, caractérisée notamment par l'existence d'un infiltrat inflammatoire de l'épi-, péri- et de l'endomysium périfasciculaire, avec présence de macrophages contenant des inclusions, dans lesquelles on a identifié la présence de phosphate d'aluminium.

La découverte de cette lésion particulière dans la région deltoïdienne, précisément celle qui constitue le site d'injection usuel des vaccins suggère l'origine vaccinale du phosphate d'aluminium retrouvé dans les macrophages.

La fréquence apparemment élevée des antécédents de vaccination chez les patients présentant la lésion plaide en faveur de l'origine vaccinale de cet aluminium. Cependant, l'absence de comparaison à des témoins dans les travaux préliminaires permettant une comparaison statistique empêche d'affirmer l'existence d'une association.

Les études préliminaires menées chez l'animal suggèrent aussi la possibilité que les vaccins contenant de l'hydroxyde d'aluminium puissent être responsables de l'apparition de la lésion histologique de la MFM.

Sur le plan mécanistique, l'impact de l'aluminium sur le système immunitaire (production monocyttaire d'IL-1, activation du système du complément, augmentation de la réponse IgG1 et IgE spécifique et non spécifique), paraît également compatible avec cette hypothèse.

Cependant, si le caractère nouveau de la lésion paraît certain et si l'origine vaccinale de l'aluminium retrouvé au niveau de la lésion semble probable, bien que l'absence de témoins dans les travaux antérieurs empêche de l'affirmer, en revanche, la *responsabilité* de la vaccination dans la formation et la persistance de la lésion est incertaine. La possibilité que l'accumulation focale d'aluminium puisse ne constituer qu'un marqueur d'un désordre sous-jacent ne peut, en l'état des données, être exclue.

De même, l'association de la lésion histologique ou de la vaccination à un syndrome clinique particulier, ne sont, à l'heure actuelle, que des hypothèses suscitées par la description des patients porteurs de la lésion, et l'interrogatoire de la série des 53 patients réalisé dans le travail préliminaire de l'InVS. Actuellement, l'absence de patients « contrôles », permettant des comparaisons statistiques, empêche d'affirmer l'existence d'une association.

Plus spécifiquement, l'existence de la MFM pose les questions suivantes :

- Existe-t-il une association entre la présence de la lésion histologique et un syndrome clinique particulier, que les patients porteurs de la lésion exprimeraient plus fréquemment que les patients non porteurs de la lésion ?
- Existe-t-il des patients porteurs de la lésion mais sans expression clinique particulière ? Quelle en est la fréquence dans la population générale ? dans la population des patients porteurs de la lésion histologique ?
- Existe-t-il une association entre la lésion et la vaccination avec des vaccins contenant un adjuvant aluminique ? Est-elle causale ? Est-ce que la lésion survient chez tous les patients vaccinés, ou seulement dans une fraction ? Quelle est sa durée de persistance ?
- Existe-t-il des patients non vaccinés porteurs de la lésion histologique ?
- Est-ce que la lésion pourrait être la conséquence normale de la vaccination et n'être associée aux manifestations systémiques retrouvées chez les patients que de façon fortuite ?
- Est-ce que l'accumulation aluminique au niveau de la lésion pourrait être la conséquence d'une maladie systémique que l'apport exogène d'aluminium permettrait de révéler ?
- Est-ce que la découverte en France de la lésion est liée au fait que les biopsies musculaires sont, en France, réalisées au niveau du deltoïde, à la différence d'autres pays où elles sont usuellement réalisées en d'autres endroits du corps ?

- La MFM permet-elle d'identifier un syndrome clinique tels que les patients avec ce syndrome aient des antécédents de vaccination aluminique plus fréquents que les patients sans ce syndrome ?
- Est ce que l'antigène vaccinal peut être retrouvé dans le muscle lésé ?
- Existe-t-il un lien entre la lésion histologique de la MFM et certaines maladies auto-immunes, comme la sclérose en plaques pour laquelle une relation avec le vaccin contre l'hépatite B a été suspectée ?

Si la réponse à un certain nombre de ces questions relève nettement de la recherche fondamentale, la recherche épidémiologique doit objectiver statistiquement l'existence d'associations entre la présence de la lésion histologique, l'existence d'une symptomatologie particulière et l'exposition aux adjuvants aluminiques contenus dans certains vaccins, associations que les données actuelles suggèrent, mais que l'absence de témoins empêche d'affirmer. Cette nécessité de réaliser des études épidémiologiques pour évaluer les hypothèses générées par les premières données, a été mise en avant par l'*Organisation mondiale de la Santé* (OMS) lorsqu'elle a examiné la question de la MFM en 1999 (Relevé Epidémiologique Hebdomadaire, octobre 1999).

METHODOLOGIE

L'objectif de cette étude épidémiologique est de contribuer à l'évaluation de la myofasciite à macrophages en recherchant l'existence d'une association entre :

- I - L'existence de la lésion histologique caractéristique de la MFM et la présence d'un syndrome clinique spécifique,
- II - L'existence de la lésion histologique caractéristique de la MFM et des antécédents de vaccination avec des vaccins contenant un adjuvant aluminique,
- III - La présence d'un syndrome clinique spécifique et des antécédents de vaccination avec des vaccins contenant un adjuvant aluminique.

Cette étude sera réalisée chez les patients recrutés au sein de la cohorte des 1400 patients suivis par les membres du *Groupe d'Etude et de Recherche sur les Maladies Musculaires Acquises et Dysimmunitaires*, chez lesquels une biopsie a été réalisée avant que la possibilité d'une association avec la vaccination ait été reconnue afin d'éviter l'action d'un biais de notoriété potentiel. L'ensemble de ces 1400 biopsies a été réalisé avant 1999.

Parmi les 1400 patients de cette cohorte, 36 patients porteurs de la lésion histologique caractéristique de la MFM ont été identifiés.

<MONTRER QUE CETTE IDENTIFICATION A ETE REALISEE DANS DES CONDITIONS TELLES QU'UN REEXAMEN DES LAMES N'EST PAS JUSTIFIE (?)>

Au sein de cette cohorte seront sélectionnés deux groupes de patients :

- Le groupe des 36 patients chez qui a été déjà identifiée la lésion histologique caractéristique de la MFM,
- un groupe de 700 patients tirés au sort parmi l'ensemble des patients de la cohorte, porteurs ou non de la lésion histologique.

Chaque patient sera interrogé de façon standardisée à l'aide du questionnaire joint en annexe par des enquêteurs ne connaissant pas les hypothèses principales de l'étude.

Le groupe des 36 patients porteurs de la lésion histologique sera comparé aux patients non porteurs de cette lésion :

- sur la prévalence du syndrome clinique suspecté d'être associé à la MFM,
- sur la prévalence des antécédents de vaccination par un vaccin contenant un adjuvant aluminique.

Puis, dans une approche du type « cas-témoins », dans l'échantillon des 700 patients sélectionnés par tirage au sort, la comparaison des antécédents de vaccination par un vaccin contenant un adjuvant aluminique (liste en annexe) des patients avec le syndrome clinique et sans le syndrome clinique permettra d'étudier l'association entre ce syndrome clinique et les vaccins.

Les patients porteurs de la lésion histologique constitueront l'un des 2 groupes des 2 premières analyses, tandis que leur participation la troisième analyse sera déterminée par le résultat du tirage au sort réalisé sur l'ensemble de la cohorte.

Définition de la lésion histologique caractérisant la MFM

La première analyse visera à comparer le syndrome clinique présenté par les patients porteurs de la lésion histologique et les patients non porteurs.

Les biopsies considérées comme montrant la lésion de la MFM devront présenter les caractéristiques suivantes :

- infiltrat centripète inflammatoire de l'épi-, péri- et de l'endomysium périfasciculaire,
- présence de macrophages cohésifs à large cytoplasme basophile contenant des granulations présentant une réaction positive au réactif PAS (acide périodique-Schiff),
- présence au microscope électronique d'inclusions intra-macrophagiques spiculées osmiophiles, analogues à des cristaux d'apatite,
- absence de lésion myocytaire notable,
- absence de nécrose,
- absence de cellules épithélioïdes ou géantes.

L'identification des lames montrant les signes caractéristiques de la lésion de MFM a déjà été réalisée.

<Est-il nécessaire de relire les lames ?>

Définitions du syndrome clinique de la MFM

En raison de l'incertitude concernant la nature du syndrome clinique potentiellement associé à la MFM, la comparaison de la symptomatologie des patients porteurs ou non de la lésion sera exploratoire, plusieurs définitions opérationnelles du syndrome potentiel seront utilisées dans la comparaison, ainsi que dans la définition du statut cas ou témoin dans la troisième analyse.

Les travaux préliminaires réalisés par l'InVS suggèrent que les analyses pourront utiliser les définitions suivantes :

- La présence d'une douleur **<LA CARACTERISER >** à l'un des membres ayant touché 75.5 % des patients porteurs de la lésion constituera le premier niveau de définition.

<DEVELOPPER, DISCUTER >

Outre ces différents niveaux de définition du syndrome clinique potentiellement associé à la MFM, des analyses exploratoires seront réalisées pour identifier les différences de présentation clinique entre les patients porteurs de la lésion et non porteurs de la lésion.

Sélection des patients

Les 36 patients identifiés au sein de la cohorte seront inclus dans l'étude pour la comparaison des patients porteurs et non porteurs de la lésion.

700 patients seront tirés au sort dans la liste des 1400 patients de la cohorte. Le tirage au sort sera réalisé avec un programme informatique utilisant un générateur de nombres pseudo-aléatoires.

En cas de refus de participation d'un patient, un nouveau patient sera tiré au sort pour le remplacer.

Appariement

Compte tenu de l'absence d'hypothèses *a priori* concernant les facteurs de risque de survenue de la lésion histologique ou du syndrome clinique éventuellement associé, et du fait que les données obtenues chez les patients tirés au sort seront utilisées dans l'analyse comparant les signes cliniques et dans les analyses comparant les antécédents de vaccination, il n'est pas justifié d'apparier les patients lors de l'inclusion.

Date index

Dans les analyses comparant les antécédents de vaccination, 2 dates index alternatives seront utilisées par rapport auxquelles seront définis les antécédents de vaccination :

- La date rapportée d'apparition des premiers symptômes conduisant à la biopsie,
- La date de réalisation de la biopsie.

Fenêtre d'exposition pour les vaccins contenant un adjuvant aluminique

Les analyses de l'enquête préliminaire de l'InVs ont montré que l'ensemble des vaccinations reçues par les patients présentant la lésion avaient été administrées dans les 10 ans précédant la biopsie ou le début des symptômes. Dans les analyses comparant les antécédents de vaccination, plusieurs fenêtres de temps seront considérées pour l'exposition à la vaccination avec un vaccin contenant un adjuvant aluminique :

- entre 0 et 1 an,
- entre 0 et 4 ans,
- entre 0 et 10 ans.

Interrogatoire

Un courrier avec une note d'information sera envoyé aux patients sélectionnés afin de les informer de la réalisation de l'étude, et les inviter à participer. Le consentement écrit des patients inclus sera obtenu. Les patients seront ensuite contactés par téléphone afin de convenir des modalités de l'interrogatoire. Les objectifs spécifiques de l'étude ne seront pas dévoilés aux patients interrogés ni aux enquêteurs. L'interrogatoire aura lieu au domicile du patient, ou par entretien téléphonique en fonction de la préférence exprimée par le patient.

L'interrogatoire sera standardisé en utilisant le questionnaire joint en annexe. L'interrogatoire sera en aveugle du statut cas ou témoin, puisque plusieurs définitions de la maladie seront utilisées au moment de l'analyse statistique.

<Interrogatoire des patients lésion + ???>

Validation des signes cliniques

<Faut il revenir au dossier clinique pour valider l'histoire clinique ?>

Validation de l'exposition

La nature des vaccins reçus et la date des vaccinations seront validées à l'aide des données du carnet de santé. En cas d'absence du carnet de santé, le médecin ayant effectué la vaccination sera contacté afin d'obtenir une confirmation des données relatives aux vaccinations.

PUISSANCE, TAILLE DE L'ECHANTILLON

Le tableau 8 montre les estimations de puissance et de nombre de sujets nécessaires pour la comparaison de la prévalence du syndrome clinique des patients porteurs et non porteurs de la lésion histologique, sous différentes hypothèses de prévalence du syndrome clinique et d'odds-ratio. Les estimations montrent que la puissance de cette comparaison ne dépasserait pas 43 % pour mettre en évidence un odds-ratio de l'ordre de 2, et ce même en incluant la totalité de la cohorte des 1400 patients. La mise en évidence d'un odds-ratio aussi faible doit donc être considéré comme hors de portée.

En revanche, la puissance monte rapidement avec l'odds-ratio, et elle atteint 80 % pour un odds-ratio de l'ordre de 2.8. Elle reste à un niveau élevé, même lorsque le nombre de patients non porteurs de la lésion diminue.

Ainsi, pour cette comparaison, l'inclusion de 36 patients porteurs de la lésion et de 400 patients non porteurs devrait assurer une puissance correcte pour mettre en évidence un odds-ratio de l'ordre de 3, sous l'hypothèse que la prévalence du syndrome clinique chez les patients porteurs de la lésion soit comprise entre 50 % et 75 %.

Le tableau 9 montre les estimations de puissance dans l'approche cas-témoins comparant les antécédents de vaccination des patients présentant le syndrome clinique ou non, sous des hypothèses d'antécédents de vaccination chez les témoins compris entre 30 % et 70 %.

Un échantillon de l'ordre de 700 patients assurerait une puissance de 80 % pour mettre en évidence un odds-ratio de l'ordre de 2, à condition que dans l'échantillon des 700 patients tirés au sort figurent au moins 110 cas correspondant à la définition du syndrome clinique.

Un nombre inférieur à 700 patients rend nécessaire l'hypothèse d'une proportion de cas parmi ces patients qui semble moins réaliste.

L'effectif choisi de 700 patients est un compromis entre la faisabilité de l'étude et la nécessité d'obtenir une puissance suffisante pour les 2 approches.

ANALYSE

Les données feront l'objet d'une double saisie sur un masque de saisie utilisant le logiciel Epi-Info 6.04.

Les analyses seront conduites au moyen de régressions logistiques. Des analyses multivariées seront réalisées pour prendre en compte les éventuels facteurs de confusion. Les facteurs modifiant d'au moins 10 % la valeur de l'odds-ratio mesurant l'association d'intérêt (présence de la lésion et syndrome clinique, présence de la lésion et antécédents de vaccination, ou syndrome clinique et antécédents de vaccination) seront intégrés dans le modèle final.

Les données seront analysées en utilisant le logiciel SAS® version 8. La validité des estimations asymptotiques sera évaluée par comparaison avec les résultats des analyses exactes (LogXact® et StatXact®).

L'ensemble des analyses sera effectué en situation bilatérale au seuil α de 5 %. Les intervalles de confiance à 95 % des estimations seront estimés. Comme l'étude reste essentiellement à visée exploratoire pour l'étude du syndrome clinique, aucun ajustement pour la multiplicité des analyses ne sera effectué.

LIMITATIONS DE L'ETUDE

Cette étude vise à objectiver l'existence d'associations entre (1) la présence de la lésion caractéristique de la MFM, (2) l'existence d'une symptomatologie spécifique et (3) l'administration de vaccins contenant un adjuvant aluminique. Elle sera réalisée sur la cohorte des patients à partir de laquelle ont été identifiés les cas de MFM. C'est à partir de ces cas qu'a été élaborée l'hypothèse de la responsabilité vaccinale et la description du syndrome clinique potentiellement relié à la MFM.

Les résultats de cette étude comparative permettront de marquer un progrès dans l'évaluation de la MFM, car à l'heure actuelle, l'absence de comparaison à des témoins constitue la principale faiblesse des données disponibles. Cependant, la conduite de cette étude sur la même population que celle qui a servi à générer les hypothèses doit faire considérer cette étude comme exploratoire, en particulier pour ce qui concerne la symptomatologie potentiellement associée à la MFM.

Une étude sur un échantillon de patients, indépendant du premier groupe de patients, permettrait des conclusions plus fortes, cependant l'absence d'un tel échantillon en France, la nécessité de disposer rapidement de résultats comparatifs et la possibilité d'un recrutement biaisé dans une étude prospective rendent nécessaire la réalisation de cette étude.

Bien qu'un biais de rappel est toujours possible lorsque il est fait appel à la mémoire des sujets, cette possibilité sera minimisée dans cette étude par le fait que, lors de l'interrogatoire le statut cas ou témoin ne sera pas connu, puisqu'il sera défini seulement lors de l'analyse. En outre, cette possibilité sera minimisée par la procédure de validation des antécédents de vaccination. De plus, pour éviter la possibilité d'un biais dans le recueil des données lié à l'enquêteur, les principales hypothèses de l'étude ne seront pas révélées aux enquêteurs et ceux-ci auront l'instruction de ne pas solliciter le résultat de la biopsie.

Une limitation possible de cette étude réside dans le fait que si la présence de la lésion histologique peut être considérée comme certaine lorsqu'elle est identifiée, son absence ne peut pas être affirmée lorsqu'elle n'est pas retrouvée, la biopsie ayant pu être réalisée à distance de la lésion. Ce manque de sensibilité de la biopsie tend certainement plus à amoindrir la force de la relation, si elle existe, qu'à l'augmenter.

L'absence de signes cliniques extrêmement spécifique potentiellement associés à la lésion histologique est également une difficulté, qui tend à amoindrir la force de la liaison si elle existe.

D'autres approches seraient théoriquement envisageables :

Une étude de cohorte qui comparerait des personnes vaccinées et non vaccinées se heurterait à la rareté probable du syndrome clinique, au risque d'un phénomène de notoriété induisant un biais de sélection et à l'impossibilité de réaliser la biopsie musculaire, examen invasif, chez les patients dont la situation clinique ne le justifie pas. De

plus, en l'absence de définition préalable très précise du syndrome clinique associé à la MFM, une telle étude n'est pas envisageable.

Une approche cas-témoins prospective qui sélectionnerait des patients porteurs de la lésion ou avec un syndrome clinique particulier risquerait d'être biaisée à cause de la notoriété faite à l'hypothèse de l'association avec la vaccination entraînant un risque de recrutement préférentiel des patients vaccinés.

LOI INFORMATIQUE ET LIBERTES

En vertu des dispositions de la Loi n° 78-17 du 6 janvier 1978 relative à l'informatique, aux fichiers et aux libertés, et de la Loi n° 94-548 du 1er juillet 1994, ce protocole d'étude sera soumis au un comité consultatif sur le traitement de l'information en matière de recherche dans le domaine de la santé, puis sera soumis pour autorisation auprès de la Commission nationale de l'informatique et des libertés.

CALENDRIER

Date de début de l'étude :

Date estimé de fin des interrogatoires :

Date estimée de fin des analyses et d'écriture du rapport :

COMMUNICATION DES RESULTATS

CLASSEMENT, ARCHIVAGE

BUDGET

Tableau 7 : Vaccins contenant de l'hydroxyde d'aluminium commercialisés en France

VAXICOQ®
DT-COQ®
INFANRIX POLIO®
TETRACOQ®
TETRAVAC ACELLULAIRE®
VACCIN DTCP PASTEUR®
DIFTAVAX®
VACCIN DTCP PASTEUR®
AVAXIM®
HAVRIX®
ENGERIX B®
GENHEVAC B®
TWINRIX®
INFANRIX POLIO HiB®
PENTACOQ®
PENTAVAC®
TICOVAC®
VACCIN TETANIQUE PASTEUR®
HBVAXDNA®

Tableau 8 : Estimations de la puissance et du nombre de sujets nécessaires dans la comparaison de la prévalence du syndrome clinique des patients porteurs et non porteurs de la lésion

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Prévalence du syndrome clinique chez les patients non porteurs de la lésion	0.100	0.500	0.600	0.600	0.600	0.600	0.520	0.516	0.510	0.370	0.275	0.270
Prévalence du syndrome clinique chez les patients porteurs de la lésion	0.75	0.75	0.75	0.75	0.75	0.75	0.75	0.75	0.75	0.60	0.50	0.50
Odds-ratio	27.00	3.00	2.00	2.00	2.00	2.00	2.77	2.81	2.88	2.55	2.64	2.70
Puissance	99	81	40	42	43	43	81	81	81	80	81	80
N1 non porteurs de la lésion	30	180	250	500	1000	1364	1364	682	364	1364	1364	364
N2 porteurs de la lésion	15	36	36	36	36	36	36	36	36	36	36	36
N2/N1	0.500	0.200	0.144	0.072	0.036	0.026	0.026	0.053	0.099	0.026	0.026	0.099
N1+N2	45	216	286	536	1036	1400	1400	718	400	1400	1400	400

Tableau 9 : Estimations du nombre de sujets nécessaires dans l'approche cas/témoins comparant les antécédents de vaccination des patients avec et sans le syndrome clinique

	1	2	3	4	5	6
Antécédents de vaccination chez les témoins	0.300	0.300	0.300	0.700	0.700	0.700
Antécédents de vaccination chez les cas	0.465	0.465	0.465	0.825	0.825	0.825
Odds-ratio	2.028	2.028	2.028	2.020	2.020	2.020
Puissance	80	80	80	80	80	80
N1 témoins	200	246	393	277	345	564
N2 cas	100	91	79	139	128	113
N2/N1	0.500	0.370	0.200	0.500	0.370	0.200
N1+N2	300	336	471	416	472	676

*Toutes les estimations de nombre de sujets nécessaires sont faites en situation bilatérale au niveau de signification de 5 %.