



HAL
open science

État actuel des connaissances sur l'excrétion de l'ARNm et de la spike produite par les vaccins à ARNm anti-Covid-19 ; possibilité de contamination de l'entourage des personnes vaccinées par ces produits

Hélène Banoun

► To cite this version:

Hélène Banoun. État actuel des connaissances sur l'excrétion de l'ARNm et de la spike produite par les vaccins à ARNm anti-Covid-19 ; possibilité de contamination de l'entourage des personnes vaccinées par ces produits. 2022. hal-03891675

HAL Id: hal-03891675

<https://hal.science/hal-03891675v1>

Submitted on 9 Dec 2022

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.

État actuel des connaissances sur l'excrétion de l'ARNm et de la spike produite par les vaccins à ARNm anti-Covid-19 ; possibilité de contamination de l'entourage des personnes vaccinées par ces produits

Résumé

La campagne massive de vaccination contre le COVID-19 est la première utilisation de vaccins à ARNm à l'échelle mondiale. Les vaccins à ARNm correspondent exactement à la définition de la thérapie génique des agences réglementaires américaines et européennes. La réglementation exige des études d'excrétion de ces médicaments et de leurs produits (les protéines traduites). Ces études n'ont pas été faites pour les vaccins à ARNm (ni pour les vaccins à adénovirus). De nombreux témoignages font état de symptômes et de pathologies identiques aux effets indésirables des vaccins à ARNm chez des personnes non vaccinées en contact avec des personnes fraîchement vaccinées. Il est donc important de faire le point sur l'état des connaissances concernant l'excrétion éventuelle des nanoparticules vaccinales ainsi que de l'ARNm et de son produit, la protéine spike.

Les nanoparticules lipidiques porteuses de l'ARNm du vaccin se répandent après l'injection dans tout le corps selon les études animales disponibles et l'ARNm du vaccin (nu ou dans les nanoparticules ou dans des exosomes naturels) est retrouvé dans la circulation sanguine ainsi que la spike vaccinale sous forme libre ou encapsulée dans des exosomes (démonstré dans des études humaines). Il a été démontré que les nanoparticules lipidiques (ou leur équivalent naturel, les exosomes ou vésicules extracellulaires VEs) sont capables d'être excrétées par les fluides corporels (sueur, expectoration, lait maternel) et de passer la barrière transplacentaire. Ces VEs sont également capables de pénétrer par inhalation et à travers la peau (saine ou lésée) ainsi que par voie orale via le lait maternel (et pourquoi pas lors des rapports sexuels via le sperme, car cela n'a pas été étudié). Il est urgent de faire respecter la législation sur la thérapie génique qui s'applique aux vaccins à ARNm et de mener des études sur ce sujet alors que la généralisation des vaccins à ARNm est envisagée.

Publié 14 novembre 2022 *Infectious Diseases Research* <https://doi.org/10.53388/IDR20221125022>

Mots-clés : Vaccin COVID-19, excrétion vaccinale, effets indésirables du vaccin Covid, nanoparticules lipidiques, LNP, vaccin ARNm, exosome, voie d'excrétion des exosomes, thérapie génique, protéine spike, voies d'excrétion des LNP, pénétration des exosomes.

Hélène Banoun PhD
Pharmacien biologiste
Ancien chercheur Inserm
Membre du Conseil Scientifique Indépendant (France)

*Correspondance : Hélène Banoun, Pharmacien biologiste, Ancien chercheur Inserm, helene.banoun@laposte.net.

L'auteur ne déclare aucun conflit d'intérêt.

Aucun soutien financier n'a été obtenu.

Abréviations

VE : vésicules extracellulaires ou exosomes

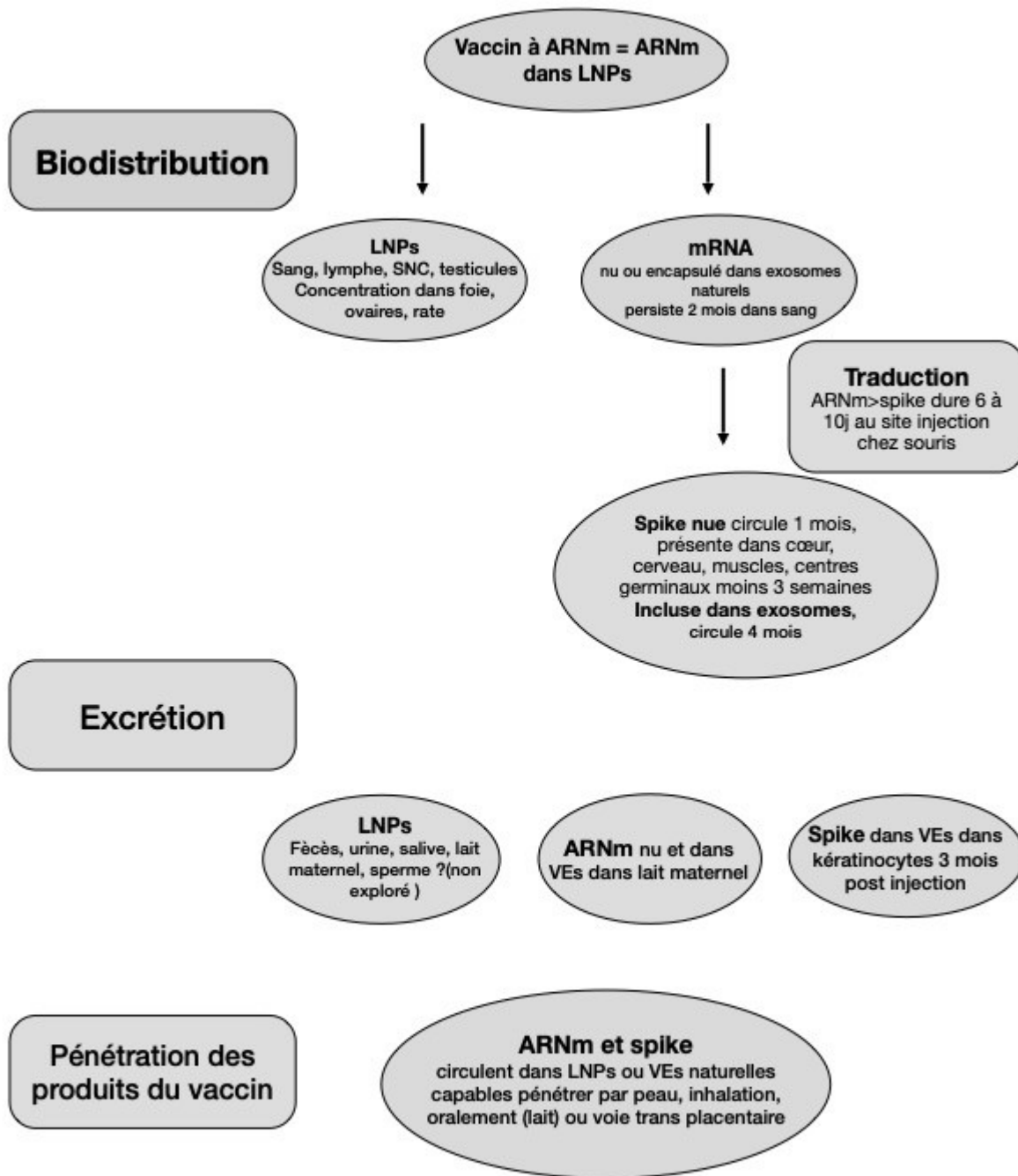
LNP : nanoparticule lipidique synthétique

PEG : polyéthylène glycol

siRNA small interfering RNA, miRNA : microRNA, contrôlent expression des gènes

RBD : receptor binding domain (de spike protéine)

État des connaissances sur l'excrétion des vaccins à ARNm



Introduction

Pourquoi s'intéresser à cette hypothèse, qui peut paraître conspirationniste ?

L'expression " excrétion vaccinale " désigne classiquement l'excrétion éventuelle d'un virus par une personne fraîchement vaccinée contre ce virus ; ceci n'est valable que pour les vaccins à virus vivants atténués (ROR, varicelle, rotavirus, grippe par pulvérisation nasale).

Aucun vaccin COVID-19 n'utilise cette formule. Par conséquent, il n'y a aucun risque qu'une personne vaccinée transmette un virus vaccinal. Cependant, les vaccins COVID-19 à base d'ARNm sont les premiers à être utilisés commercialement chez l'homme à l'échelle mondiale et aucune étude n'a été menée concernant l'excrétion éventuelle du vaccin lui-même (nanoparticules lipidiques contenant l'ARNm) de l'ARNm du vaccin ou du produit du vaccin, la protéine spike traduite par les cellules du vacciné.

La vaccination anti- Covid a débuté en décembre 2020. Le premier témoignage publié d'excrétion vaccinale que j'ai vu date de décembre 2021, celui du Dr Ray Sahelian [1] : il rapportait des cas de collègues médicaux ou scientifiques ayant observé des symptômes proches de ceux des effets indésirables du vaccin après avoir été en contact avec des personnes fraîchement vaccinées ; il proposait une excrétion des produits du vaccin par la peau et les voies respiratoires et demandait des études complémentaires.

Au début, ce type de témoignage ne me paraissait pas très crédible, mais ils se sont accumulés et en octobre 2021 j'ai reçu un témoignage d'un groupe de soignants français : ils ont observé un accident vasculaire cérébral chez un enfant de 7 ans sans facteur de risque et dont les parents avaient été fraîchement vaccinés. Il existe des groupes Telegram répertoriant des témoignages de patients et de médecins. Tous ces témoignages font état de symptômes ou d'affections signalés dans les bases de données d'effets indésirables des vaccins COVID-19 : les effets indésirables des vaccins ARNm contre la COVID-19 sont désormais reconnus par les agences réglementaires (voir les bases de données VAERS et Eudravigilance, ainsi que l'ANSM, France).

Les vaccins sont tous basés sur la protéine spike qui a depuis été reconnue comme la principale responsable de la pathogénicité du SRAS-CoV-2 [2,3,4,5,6]. Par conséquent, dans le cas où le vaccin ou son produit (la spike) passerait du vacciné au non-vacciné, les effets indésirables du vaccin devraient être retrouvés chez certaines personnes non vaccinées en contact avec des personnes vaccinées. L'exploration des pathologies liées au vaccin dans les classes d'âge non vaccinées en contact avec des personnes vaccinées pourrait donner des indications dans le sens d'une excrétion vaccinale mais elle ne donne pas de résultats significatifs (non publié). Comme il y a plus de 400 pathologies liées aux effets indésirables des vaccins dans les bases de données de déclaration de pharmacovigilance (voir par exemple les données britanniques, les données de notification spontanée pour le vaccin Pfizer en mai 2021 [7]), ce grand nombre dilue les signaux qui pourraient apparaître dans les groupes d'âge non vaccinés.

En revanche, l'analyse des données européennes, israéliennes et américaines montre que pour le groupe d'âge 0-14 ans non vacciné, la plupart des associations entre la mortalité et la vaccination chez l'adulte sont positives : la surmortalité dans les groupes d'âge non vaccinés au début des campagnes de vaccination pourrait s'expliquer par un phénomène de transmission du vaccin ou de ses produits. Ce schéma de corrélations positives augmente de la semaine de la vaccination à la semaine 18 après la vaccination, puis disparaît. Il indique des effets négatifs indirects de la vaccination des adultes sur la mortalité des enfants âgés de 0 à 14 ans au cours des 18 premières semaines suivant la vaccination. [8]

Quelle est la plausibilité biologique de la transmission du vaccin ou de ses produits du vacciné au non-vacciné ?

Pour répondre à cette question, il faut explorer la possibilité et les voies d'excrétion du vaccin ou de ses produits et les voies de leur pénétration éventuelle.

En ce qui concerne le vaccin et ses produits, il peut s'agir de la transmission de spike circulant chez le vacciné (sous forme libre ou incluse dans des exosomes ou vésicules extracellulaires - VE), de la transmission de l'ARNm nu circulant ou encapsulé dans les nanoparticules lipidiques (LNP) complètes. Il convient donc d'étudier la capacité des LNPs, de l'ARNm et de la spike vaccinale à être excrétés par différentes voies possibles, puis la capacité des mêmes produits à pénétrer par différentes voies dans l'organisme de personnes non vaccinées en contact étroit avec des personnes vaccinées.

L'excrétion des LNPs contenant de l'ARNm, l'excrétion de l'ARNm modifié codant pour la spike, et l'excrétion de la spike produite par les vaccinés n'ont pas été étudiées dans la phase d'essai des vaccins, contrairement aux recommandations des régulateurs concernant les thérapies géniques. Les études pharmacocinétiques des nanoparticules en général n'ont pas exploré l'excrétion des transporteurs ou des molécules transportées. Ce domaine devrait être exploré.

Les documents de Pfizer obtenus par FOIA [9] montrent que seule l'excrétion de certains composants des LNP (ALC-0315 et ALC-0159) a été étudiée dans l'urine et les fèces de rats injectés par voie IM.

Réglementation concernant l'excrétion des thérapies géniques par les organismes de réglementation.

Avant les vaccins à ARNm, il n'existait pas de réglementation des essais cliniques sur l'ARNm, alors que les produits de thérapie génique font l'objet d'une réglementation stricte. Il est difficile de justifier que les vaccins à ARNm ne soient pas considérés de la même manière que les thérapies géniques en ce qui concerne cette réglementation, en effet la seule différence est qu'ils sont censés protéger contre une maladie et non la guérir. Les thérapies géniques sont destinées à un petit nombre de personnes en mauvaise santé, alors que les vaccins sont utilisés à grande échelle sur des personnes en bonne santé : il serait donc judicieux de leur appliquer des règles plus strictes. Toutefois, la description des produits de thérapie génique fournie par les agences de réglementation inclut de fait les vaccins à ARNm et à adénovirus.

Le document de la FDA de 2015 sur les études d'excrétion des produits géniques [10] concerne les thérapies géniques qui sont définies comme " tous les produits qui exercent leurs effets par transcription et/ou traduction de matériel génétique transféré et/ou par intégration dans le génome de l'hôte et qui sont administrés sous forme d'acides nucléiques, de virus ou de micro-organismes génétiquement modifiés ", en ce sens les vaccins ARNm sont bien des produits de thérapie génique et auraient dû être soumis à ces études d'excrétion.

Des études d'excrétion doivent être menées pour chaque VBGT (produits de thérapie génique à base de virus ou de bactéries), d'abord chez l'animal mais aussi chez l'homme, surtout lorsqu'il existe un risque de transmission à des personnes non traitées. Selon ce document, les études d'excrétion clinique ne sont pas des études autonomes mais sont intégrées dans la conception d'un essai de sécurité ou d'efficacité.

Le terme "excrétion" fait référence à la libération de produits VBGT par le patient par l'une ou l'ensemble des voies suivantes : matières fécales (fèces) ; sécrétions (urine, salive, fluides nasopharyngés, etc.), ou à travers la peau (pustules, lésions, plaies).

Les directives du NIH [11] fournissent des principes de biosécurité spécifiquement pour les " molécules d'acide nucléique synthétiques, y compris celles qui sont chimiquement ou autrement

modifiées mais qui peuvent s'apparier avec des molécules d'acide nucléique naturelles " ; il s'agit de molécules de plus de 100 nucléotides ayant le potentiel d'être transcrites ou traduites. Ce document d'avril 2019 porte sur les acides nucléiques synthétiques modifiés et non modifiés. Toute expérience impliquant le transfert délibéré d'un acide nucléique à un humain doit être précédée de l'approbation du comité de biosécurité institutionnel (ce qui est confirmé ici [12]), mais l'approbation n'a pas été donnée en raison de l'autorisation d'urgence accordée aux vaccins à ARNm.

Sur la base d'un document de l'EMA sur l'excrétion des produits génétiques [13], les vaccins à ARNm répondent à la définition des PGMT (médicaments de thérapie génique), mais leur désignation en tant que "vaccin" leur a permis d'échapper aux exigences des essais cliniques pour les produits génétiques qui concernent en particulier le potentiel d'excrétion, la biodistribution, la pharmacodynamique, la génotoxicité, la mutagenèse insertionnelle (page 36 : Des études pharmacocinétiques doivent être réalisées lorsqu'une protéine est excrétée dans la circulation sanguine). L'expression de la séquence d'acide nucléique (sa traduction en protéine) doit également être étudiée (page 37). L'excrétion est définie comme la dissémination du vecteur par les sécrétions et/ou les fèces et doit être abordée dans des modèles animaux (page 30).

Ainsi, selon la réglementation des agences américaine et européenne, les vaccins à ARNm correspondent à la définition des produits de thérapie génique et auraient dû faire l'objet d'études d'excrétion par tous les fluides sécrétés (urine, salive, expectoration, fluides nasopharyngés, sperme, lait maternel), les fèces et la peau (saine ou lésée). Ces études auraient dû concerner les nanoparticules contenant l'ARNm, l'ARNm nu et le produit du vaccin après traduction (la protéine spike).

Un exemple d'étude d'excrétion correspondant à cette régulation des produits géniques se trouve dans un rapport soumis à l'EMA pour autoriser un médicament destiné à traiter une maladie orpheline ; il s'agit d'un produit à base de LNPs dont la composition est proche de celle des vaccins à ARNm. Ici les LNPs contiennent du siRNA. La réglementation impose des études approfondies pour cette thérapie génique, contrairement à celles des vaccins à ARNm qui sont similaires. Cependant, les études sur l'excrétion de ces LNPs donnent peu d'informations. Chez l'animal, la radioactivité des LNPs se retrouve dans les urines (50%) et dans les fèces (entre 10% et 24%). Chez l'homme, aucune étude avec des LNPs radioactifs n'a été réalisée, mais les composants des LNPs sont retrouvés dans l'urine pour moins de 1% des concentrations plasmatiques. On suppose que l'élimination se fait par les fèces mais cela n'a pas été prouvé. Il n'y a pas eu d'études sur l'excrétion dans le lait ou d'autres fluides corporels[14].

Référence à une éventuelle excrétion du vaccin dans les documents de Pfizer

Le protocole de l'essai de phase I/II/III de Pfizer sur les vaccins à ARNm COVID-19 (qui a débuté en mai 2020) mentionne la possibilité de passage du produit étudié par inhalation ou contact cutané et de passage par le sperme d'un homme exposé par inhalation ou contact cutané et de passage par le lait maternel ; la possibilité d'une réaction indésirable au vaccin suite à ces expositions est également mentionnée.[15] Les données de Pfizer indiquent clairement qu'une femme enceinte peut être exposée à " l'intervention étudiée en raison d'une exposition environnementale. " L'exposition environnementale peut se produire par "inhalation ou contact avec la peau". Voici quelques exemples d'exposition environnementale pendant la grossesse : -Un membre de la famille ou un fournisseur de soins de santé de sexe féminin signale qu'elle est enceinte après avoir été exposée à l'intervention étudiée par inhalation ou par contact cutané. -Un membre de la famille ou un prestataire de soins de santé de sexe masculin qui a été exposé à l'intervention étudiée par inhalation ou contact cutané expose ensuite sa partenaire féminine avant ou autour de la période de conception. "Cela signifie clairement que tout contact, y compris le contact sexuel avec une personne ayant reçu les vaccins, expose ceux qui n'ont pas reçu les vaccins à "l'intervention", c'est-à-dire à l'ARNm. L'exposition pendant l'allaitement devait également être immédiatement notifiée pendant l'essai : on suppose que l'investigateur craint qu'une mère qui allaite puisse transmettre l'ARNm expérimental à son bébé si elle a reçu le vaccin directement

ou si elle est "exposée à l'intervention de l'étude par inhalation ou contact avec la peau."

Structure et fonction des vésicules extracellulaires (VEs) ou exosomes et des nanoparticules lipidiques (LNPs)

Les vésicules extracellulaires naturelles (VE ou exosomes) sont générées par la plupart des cellules vivantes, ce sont des protéolipides bicouches sphériques dont la taille varie de 20 à 4000 nm et elles peuvent contenir diverses molécules (lipides, protéines et acides nucléiques, comme les ARN de signalisation). Les VEs sont des transporteurs naturels dans le corps humain et sont impliquées dans les communications intercellulaires, elles peuvent servir de transporteur pour différentes molécules qui peuvent ainsi passer de cellule en cellule, entraînant une réponse marquée de la part de la cellule cible [16]. Les LNPs synthétiques des vaccins ARNm ont la même structure que les exosomes naturels qu'elles cherchent à imiter [17, 18]. Les exosomes produits naturellement peuvent transporter de l'ARNm du vaccin ou de la spike, comme nous le verrons plus loin. Les LNPs ont la capacité (comme les exosomes naturels) de fusionner avec les membranes cellulaires et de libérer leur chargement dans le cytosol.

Les LNPs utilisés pour les vaccins à ARNm sont des systèmes lipidiques de taille nanométrique (moins de 1 micromètre) composés de 2 ou plusieurs (généralement 4) lipides à des proportions variables. La composition lipidique la plus typique utilisée pour les systèmes ARNm-LNP est constituée d'un lipide cationique/ionisable, d'un "lipide auxiliaire" phospholipidique, de cholestérol et/ou d'un lipide associé au poly(éthylène glycol) (PEG). Les LNPs peuvent être administrés par voie IM, sous-cutanée, intradermique, intratrachéale, orale, ophtalmique et même topique. Les LNPs injectés par toutes ces voies sont capables d'aboutir à la traduction de l'ARNm en protéine pendant plusieurs jours [19]. La taille des LNPs dans les vaccins à ARNm COVID-19 se situerait entre 60 et 100 nm [20].

Le trafic de VEs naturelles est bidirectionnel pendant la grossesse (les VEs traversent la barrière fœto-maternelle et les cellules utérines sécrètent constamment des exosomes) et les VEs peuvent être utilisées pour délivrer des médicaments au fœtus pendant la grossesse [21].

Les VEs présentent un avantage potentiel pour une utilisation dans les thérapies vaccinales car elles sont les transporteurs naturels d'antigènes du corps et peuvent circuler dans les fluides corporels pour distribuer les antigènes même aux organes distaux [16].

On sait peu de choses sur la pharmacocinétique des vaccins à ARNm.

Les nanoparticules chez les animaux

Selon une étude réalisée par des chercheurs indépendants des fabricants de vaccins à ARNm, chez la souris, les LNPs porteuses d'ARNm injectées par voie IM passent du site d'injection aux ganglions lymphatiques puis à la circulation générale, s'accumulant principalement dans le foie et la rate. Les LNPs passent d'abord dans la circulation lymphatique puis dans la circulation sanguine (les LNPs de moins de 200 nm passent directement dans la lymphe tandis que celles de 200 à 500 nm sont transportées dans la lymphe par les cellules dendritiques). Une injection directe involontaire dans un vaisseau sanguin peut également se produire lors d'une injection IM [22].

Les nanoparticules chez l'homme

L'exposition du corps humain aux nanoparticules peut se produire accidentellement par inhalation, contact avec la peau ou ingestion. En cas d'inhalation, les voies de transfert possibles des nanoparticules sont la circulation sanguine (systémique), les vaisseaux lymphatiques, le tractus gastro-intestinal et le système nerveux central et/ou périphérique [23].

L'excrétion des LNPs enrobées de PEG se fait principalement par les fèces et l'urine et principalement par les fèces lorsqu'elles ont un diamètre > 80 nm. Les LNPs peuvent être excrétées par la salive, la sueur et le lait maternel [24].

Les LNPs de taille <5nm sont rapidement excrétées par le rein. Les nanoparticules dont la taille est comprise entre 5 et 200 nm ont tendance à avoir une circulation sanguine étendue. Les LNPs plus grandes ont une circulation sanguine prolongée et une excrétion rénale faible. En raison de la taille des LNPs, l'inhalation est la voie d'entrée la plus directe dans le système pulmonaire. L'exposition peut être intentionnelle, comme dans le cas des nanoparticules de ciblage ou thérapeutiques, ou non intentionnelle, par inhalation ou exposition cutanée, en raison du nombre croissant d'applications industrielles des nanoparticules [25].

L'ARNm

Persistance de l'ARNm viral après une infection virale

L'ARN viral de certains virus persiste longtemps dans le cerveau, les yeux, les testicules : ceci a été démontré pour le virus de la rougeole, le virus Ebola, Zika et Marburg. Le SRAS-CoV-2 persiste dans les voies respiratoires et l'intestin. Des ARN viraux sont également détectés dans les sécrétions, le sang ou les tissus. L'excrétion prolongée de ces ARN dans les voies respiratoires, les selles, la sueur, le liquide conjonctival et l'urine est courante. Des études ont montré que l'ARN viral complet peut persister à long terme. Cet ARN persistant peut être traduit en protéines même si aucun virus viable ne peut être assemblé. Chez les patients qui développent plus tard un COVID long, l'ARN viral est retrouvé dans le sang dans la phase aiguë de la maladie[26].

Sort de l'ARNm du vaccin

Des quantités énormes d'ARNm sont injectées par rapport à la circulation d'un virus lors d'une infection naturelle : jusqu'à 10 à 7 fois plus, selon le professeur Jean-Michel Claverie [27].

L'ARNm du vaccin est présent dès le premier jour et persiste dans la circulation sanguine pendant au moins 2 semaines après l'injection ; sa concentration commence à diminuer après 4 jours. Cette durée de vie est beaucoup plus longue que ne le prétendaient les fabricants sur la base de brèves études menées sur des rats. L'ARNm transporté est encapsulé dans les LNPs mais se retrouve dans le plasma (c'est-à-dire non associé aux globules blancs). Cet ARNm est capable d'être traduit en protéine spike dans les cellules et les tissus sensibles.[28] L'ARNm emballé dans les LNPs est capable de s'en échapper et de former des vésicules extracellulaires qui le transportent vers d'autres cellules : ces vésicules sont sécrétées après l'endocytose des LNPs chargés d'ARNm. Ces VEs protègent l'ARNm pendant le transport et le distribuent intact aux cellules réceptrices, l'ARNm est fonctionnel et peut alors être traduit en la protéine d'intérêt. La réponse inflammatoire est plus faible après une transfection avec des VEs qu'avec des LNPs. Les voies d'absorption des VEs diffèrent de celles des LNPs et ne sont pas susceptibles de déclencher la voie autophagique-lysosomique, car elles libèrent leur contenu dans le cytoplasme sans vraisemblablement subir de piégeage lysosomal. De plus, en raison de leur petite taille, les VEs peuvent échapper à une phagocytose rapide et transporter et délivrer couramment de l'ARN dans la circulation, traversant l'endothélium vasculaire jusqu'aux cellules cibles[29].

La présence de VEs dans tous les biofluides est attestée. Elles peuvent contenir des acides nucléiques. Dans la sueur, on trouve des VEs contenant des acides nucléiques provenant de bactéries, de virus, de champignons de la peau mais aussi de cellules humaines. Ces VEs peuvent également contenir des virus (hépatite C par exemple). On trouve des petits ARNm (20 à 200 pb) dans ces VEs de la sueur, ils sont fonctionnels (peuvent être traduits), les ARN sont protégés des nucléases cutanées dans les VEs [30].

A noter que l'ARN du vaccin comprend 4284 nucléotides (Pfizer) [31]. Il convient donc d'étudier la possibilité que des ARN de cette taille soient excrétés par la sueur.

Les VEs peuvent contenir des molécules "signaux" telles que les miRNA. Il est possible que les VEs contiennent des ARNm complets ; ceux-ci sont des médiateurs clés de la communication intracellulaire. Les analyses d'ARN du sang et de la sueur sont corrélées : les VEs trouvés dans la sueur reflètent la circulation des VEs dans le plasma. Des ARN nus sont également trouvés dans la sueur (non encapsulés dans les VEs). Les miRNA sont sélectivement sélectionnés et enrichis dans les VEs de la sueur à partir du sang et ne circulent pas passivement dans les fractions du sang ou de la sueur[32]. Une augmentation de la transpiration après le vaccin Covid a été constatée [33] et des personnes ayant reçu le vaccin se sont plaintes d'une augmentation de la transpiration, notamment la nuit [34].

La possibilité d'exsudation de VEs à partir de la peau a été démontrée : Les kératinocytes sont capables d'exsuder des VEs capables de transporter des miRNAs. Dans le psoriasis, les VEs excrétées par les kératinocytes passent de cellule en cellule : de kératinocyte à kératinocyte voisin. Chez les patients atteints de lichen planus (éruption inflammatoire), des VEs transportant des miARN sont excrétées dans la salive[35].

Des nanoparticules sont naturellement présentes dans les expectorations [36] : des exosomes contenant des ARN ont été isolés des expectorations de patients asthmatiques légers [37].

Passage de l'ARNm du vaccin dans le lait

De l'ARNm du vaccin est retrouvé dans le lait de 1/10 des femmes étudiées (4/40) la première semaine après la vaccination avec le vaccin à ARNm (que ce soit après la dose 1 ou après la dose 2). Les quantités peuvent atteindre 2ng/ml de lait. [38]. Cette quantité peut sembler faible par rapport aux 30 microgrammes d'ARNm injectés avec le vaccin, mais elle peut suffire à produire une quantité non négligeable de spike. En effet, un nourrisson fait plusieurs tétées par jour, pour environ 240 à 360 ml par jour et un total sur une semaine de 1680 à 2520ml dans la première semaine. Le nouveau-né, pesant entre 2 et 5kg, pourrait donc être exposé à une dose de 5 µg d'ARNm dans sa première semaine. Cela semble disproportionné comparativement aux 10µg injectés à des enfants de 5 à 11 ans qui pèsent respectivement 18 à 35 kg environ [39]. La méthode utilisée dans cette dernière étude est plus sensible que celle de Golan et al. qui n'ont pas trouvé d'ARNm dans le lait [40]. Cette même équipe avait également exploré le passage de l'ARNm vaccinal dans le lait en recherchant indirectement le PEG contenu dans les LNP. Le PEG a été recherché dans le lait de 13 femmes à différents moments après la vaccination : La figure 1 de l'article montre la détection du PEG du vaccin dans le lait entre 24 heures et une semaine après l'injection. Cependant, les auteurs ont conclu sans préciser que ces quantités n'étaient pas significatives [41].

Une autre étude a cherché à savoir si l'ARNm du vaccin COVID-19 pouvait être détecté dans le lait maternel exprimé de personnes allaitantes ayant reçu la vaccination dans les 6 mois suivant l'accouchement. La présence de l'ARNm a été étudiée sous forme libre et encapsulée dans des VEs. Les VEs ont été isolées par centrifugation du lait. L'ARN du vaccin a été trouvé dans les 48 heures suivant la vaccination et à des concentrations plus élevées dans les VEs que dans le lait entier. La plus forte concentration trouvée était de 17 pg/ml dans les VEs et la plus faible était de 1,3 pg/ml dans le lait entier. La présence prioritaire de l'ARNm dans les VE et non dans le lait entier peut expliquer pourquoi Golan et al. ne l'ont pas trouvé [42].

On sait depuis quelques années que l'ARNm encapsulé dans les VEs est protégé des sucs gastriques et peut transfecter les cellules intestinales [43, 44]. Une étude récente de Melnik et Schmitz confirme que les VEs du lait survivent aux conditions extrêmes du tractus gastro-intestinal, sont internalisées par endocytose, sont biodisponibles et peuvent transfecter des cellules intestinales[45].

Passage transplacentaire des nanoparticules ?

Chez la souris, des LNPs du même type que celles utilisées dans les vaccins ARNm COVID-19 ont montré leur capacité à transfecter l'ARNm après injection dans une veine fœtale ou in utero [46].

Dans un essai d'immunisation des fœtus contre l'herpès néonatal chez des souris gravides par injection de LNPs chargées d'ARNm à la mère, il n'est pas discuté la possibilité que le passage transplacentaire des LNPs expliquerait aussi bien l'immunisation du fœtus que le passage des Ig induites chez la mère [47]. Des études ont montré qu'il est très possible que des nanoparticules de taille comparable à celles utilisées pour les vaccins à ARNm soient capables de passer par voie transplacentaire chez l'homme [48,49].

L'administration de thérapies à base de LNPs pendant la grossesse présente des risques qui doivent être étudiés. La détection du passage transplacentaire dépend de la sensibilité des méthodes de détection : pour certains types de nanoparticules, une embryotoxicité a été observée alors qu'aucune absorption par le fœtus n'a été observée ; cette absorption ne semble pas corrélée avec le type, la taille ou la charge électrique de surface des nanoparticules. La translocation des LNP est susceptible de dépendre des différents stades de la grossesse. Au cours du premier trimestre, la barrière placentaire est très épaisse pour protéger l'embryon en développement et devient mince à terme lorsque de grandes quantités de nutriments sont nécessaires pour soutenir la croissance du fœtus. Cependant, chez les animaux, le transfert placentaire semble être plus élevé en début de grossesse. Il est nécessaire de développer des modèles humains pour les études de transfert placentaire en début de grossesse. La comparaison avec les études animales est essentielle, car le placenta est l'organe le plus spécifique à l'espèce [50,51]. Des LNPs de 240 nm sont capables de traverser la barrière placentaire humaine [52].

Toutes ces publications soulignent la difficulté d'extrapoler les études animales à l'homme concernant le passage transplacentaire des nanoparticules. D'après une revue de 2022 [53], les nanoparticules peuvent transiter par les mécanismes ordinaires de transport transcellulaire placentaire tels que la pinocytose, le transport actif, la diffusion facilitée et la diffusion passive. Les VEs à cargaison d'ARN sont également capables de traverser la barrière placentaire humaine. Les LNPs enrobées de PEG auraient une diffusion moindre à travers la barrière placentaire que les formulations à base de liposomes, mais sont capables de délivrer une partie de leur cargaison au fœtus. [54]

Toutes ces données ne permettent pas d'exclure que les LNPs provenant de vaccins à ARNm soient capables d'atteindre le fœtus d'une mère vaccinée pendant la grossesse.

Excrétion des LNPs dans le sperme ?

Je n'ai pas trouvé d'études concernant la possibilité de passage des LNPs dans le sperme ; cependant, l'effet des nanoparticules sur la fertilité et la qualité du sperme a été largement étudié chez l'animal [55]. La toxicité des nanoparticules sur la fonction reproductive masculine est bien établie, il a été démontré que les nanoparticules d'or agissent uniquement en interagissant avec la surface des spermatozoïdes mais ne les pénètrent pas. Aucune donnée n'est disponible sur l'éventuelle pénétration des LNPs dans les spermatozoïdes.

Selon un document confidentiel de Pfizer obtenu par la FOIA [56] concernant des études pharmacocinétiques chez le rat, les LNPs se concentrent dans les ovaires et dans une moindre mesure dans les testicules.

Devenir de la protéine spike après traduction de l'ARNm

Un site d'information sponsorisé par le CDC, consulté le 21 juillet 2021, note que la durée de vie de la protéine spike dans le sang est " inconnue et pourrait être de quelques semaines. "[57]. L'injection de LNPs contenant de l'ARNm modifié par la pseudouridine par voie IM, sous-cutanée et intradermique entraîne la production de protéines au site d'injection, la durée de traduction active est de 6 à 10 jours chez la souris. L'injection intradermique produit une quantité initiale de protéines plus faible mais sur une période de temps plus longue que la voie IM. Par la voie intradermique, la demi-vie de production des protéines est la plus longue par rapport aux autres voies d'injection (IM, sous-cutanée, IV, intrapéritonéale, intra-trachéale). Par voie IM, la majorité de la traduction cesse dans le

foie au jour 2 post-injection mais dure jusqu'à 8 jours dans les muscles [58].

Chez l'homme, la protéine spike pourrait persister longtemps chez les vaccinés, la surveillance des effets indésirables du vaccin devrait donc être étendue [59]. La comparaison des concentrations de spike atteintes pendant la maladie et après la vaccination montre que pendant l'infection sévère par COVID-19, la concentration médiane observée est de 50 pg/ml avec des maximums à 1ng/ml. Au cours d'une infection sévère à Covid, des concentrations allant jusqu'à 135 pg/ml de spike S1 peuvent être détectées, le plus souvent entre 6 et 50 pg/ml. Après une vaccination avec un vaccin à ARNm, des concentrations allant jusqu'à 150 pg/ml sont couramment observées, mais peuvent atteindre 10 ng/ml chez les individus présentant une thrombocytopénie induite par le vaccin [60]. La même équipe [61] montre également que la protéine spike persiste longtemps sous forme libre : la spike induite par le vaccin circule dans le plasma dès J1 après la vaccination et jusqu'à 14 jours, le pic étant atteint à J5 avec 68 pg/mL de sous-unité S1 détectée ; la spike entière est détectée jusqu'à J15, avec un pic à 62 pg/mL. Après la deuxième dose, la spike libre n'est plus détectée car elle serait liée aux anticorps ; l'étude ne détecte pas de complexes immuns anticorps-spike. Une autre équipe montre également qu'après la vaccination avec l'ARNm, la protéine spike passe dans le sang, persiste pendant plus d'une semaine et est complètement éliminée en 1 mois. L'augmentation de la concentration sanguine de spike après la vaccination est rapide (1 à 3 jours). [62]

Selon une autopsie, la spike vaccinale est retrouvée jusqu'à trois semaines après l'injection dans différents organes (cœur, cerveau, muscles, centres germinaux, ...) et notamment dans l'endothélium des capillaires [63].

Exosomes circulants contenant la protéine spike

Après une infection par COVID-19, la spike circule sous forme d'exosomes (ou VEs). Les VEs sont libérés par les cellules dans l'environnement extracellulaire dans des conditions normales et pathologiques. Les VEs sont un outil important pour la communication intercellulaire, car elles servent de navettes pour le transfert de protéines, de lipides et d'ARN biologiquement actifs. Les VEs peuvent incorporer des protéines pathogènes et/ou des fragments d'ARN viral provenant de cellules infectées pour transporter du matériel vers des cellules cibles, un événement qui joue un rôle important dans les réponses aux infections virales. La protéine spike du SARS-CoV-2 ou les fragments dérivés étaient clairement présents dans les VEs des patients COVID-19. Des fragments dérivés de la spike sont présents dans les VEs de tous les patients COVID-19[64].

La Spike circule également dans les VEs après une vaccination par ARNm chez l'homme. Des auteurs ont proposé qu'après l'internalisation des LNPs et la libération de l'ARNm, le tri et le trafic des antigènes puissent induire la libération de VEs contenant la protéine S. Les événements présentés se produiraient dans les surfaces apicales et/ou basolatérales des cellules polarisées (par exemple, épithéliales). [65] En effet, la spike du vaccin est spontanément enveloppée dans des VEs : La vaccination avec l'ARNm et la traduction de l'ARNm induit la production de VEs portant la spike et circulant dans le sang jusqu'à 4 mois après la vaccination. L'injection de ces VEs à des souris induit la synthèse d'anticorps anti-spike. [66]

La spike du vaccin a été trouvée dans les vésicules de kératinocytes du derme d'un patient présentant des lésions cutanées 3 mois après la vaccination avec le vaccin Pfizer-BioNTech. Ce patient avait une infection par le virus varicelle-zona. Une hypothèse plausible était que la stabilisation de l'ARN par la substitution méthyl-pseudouridine à tous les nucléotides d'uridine du vaccin Pfizer BNT162b2 pourrait entraîner une production à long terme de la spike codée à partir de n'importe quelle cellule, affectant de façon persistante le microenvironnement du système immunitaire protecteur, y compris la peau [67].

Toutes ces données indiquent que les LNPs vaccinales ou les VEs formées naturellement après la vaccination pourraient contenir de l'ARNm ou de la spike et être présentes dans les fluides corporels.

Ces nanoparticules sont-elles capables de passer de ces fluides dans l'organisme de personnes non vaccinées en contact avec des personnes fraîchement vaccinées ?

Capacité des LNP ou des vésicules extracellulaires naturelles (VE ou exosomes) et de l'ARNm à pénétrer par différentes voies.

Utilisation de nanoparticules à des fins thérapeutiques par inhalation, voie transdermique, in utero et par voie conjonctivale.

Dans une revue consacrée à la sécurité des nanoparticules dans les applications biomédicales, on apprend que l'exposition aux LNPs peut se faire par ingestion, injection, inhalation et contact cutané. Certaines expositions ne sont pas intentionnelles, comme l'inhalation pulmonaire de NPs présentes dans l'environnement ou sur les sites de fabrication. [68]

Les nanosystèmes sont de plus en plus exploités pour l'administration topique et cutanée, notamment les peptides thérapeutiques, les protéines, les vaccins, les fragments de gènes ou les particules porteuses de médicaments [69]. Il a été démontré que l'administration intradermique d'ARNm codant pour le facteur de croissance endothélial vasculaire (VEGF) entraîne l'expression fonctionnelle de la protéine dans la peau, même en l'absence de nanoparticules lipidiques [70]. [70] Selon Palmer et al [71], dans une formulation de nanoparticules lipidiques, les liposomes augmentent le passage transdermique des molécules utilisées pour traiter les maladies de la peau. La pénétration cutanée des siRNA a été démontrée sous la forme de nanocarriers, ces siARNs transfectent les cellules et expriment le gène d'intérêt ciblé. Des nanocarriers ont été testés pour une utilisation en vaccination transdermique [72].

Les VEs sont utilisées pour délivrer des thérapies autres que les vaccins : des études cliniques sont en cours par voie locale (péridontite, ulcères, épidermolyse bulleuse) et par inhalation (essai en cours contre la maladie d'Alzheimer) [73]. Les LNPs avec une bicouche lipidique sont capables de passer la barrière cutanée et de transporter du matériel génétique. Ces particules peuvent pénétrer dans la peau par les follicules pileux ou directement dans les kératinocytes en raison de leur similitude avec les membranes cellulaires [74].

L'administration intranasale, orale, intraoculaire et sous-conjonctivale de VEs capables de transporter des médicaments a été testée avec succès. L'administration intranasale représente la deuxième voie la plus fréquemment rapportée. Elle est efficace pour transporter des médicaments dans le système nerveux central et les poumons. La plupart des effets protecteurs ont été obtenus de manière similaire pour l'administration intraveineuse et intranasale. L'administration orale a été décrite pour les VEs du lait bovin dans un modèle de souris. Six heures après l'administration, les VEs étaient localisées dans le foie, le cœur, la rate, les poumons et les reins. L'injection intraoculaire et sous-conjonctivale de VEs dérivées de MSC (cellules souches) a permis de délivrer des VEs dans la rétine dans un modèle de lapin de rétinopathie induite par le diabète. [75]

Les nanovésicules produites naturellement par les plantes sont morphologiquement et fonctionnellement identiques à leurs analogues mammaliens. Une revue sur les nanovésicules végétales rassemble les connaissances sur les mécanismes transdermiques, transmembranaires et de ciblage de ces vésicules. Des expériences sur des souris ont montré qu'il est possible de délivrer de l'ARN dans une tumeur cérébrale via ces nanovésicules introduites par voie intranasale. Ces nanovésicules seraient également capables de transporter efficacement leur chargement à travers la peau et dans les cellules cutanées. [76]

Les LNP sont un vecteur potentiel pour délivrer des molécules dans la chambre postérieure de l'œil : elles ont démontré d'excellentes caractéristiques de perméation oculaire et des capacités d'amélioration de la pénétration, tout en présentant une charge médicamenteuse élevée et des efficacités

de piégeage. [77]

Nanoparticules dans les essais de vaccination et de thérapie génique (LNPs contenant des acides nucléiques) par voie respiratoire.

Les nanoparticules cargo d'acides nucléiques sont capables de transfecter les cellules des voies respiratoires chez l'animal et l'homme par administration locale (instillation ou nébulisation). Le projet DEFUSE [78], soumis par Eco Health Alliance en réponse à un appel à propositions de la DARPA, porte sur l'administration transcutanée de vaccins chez l'animal à l'aide de nanoparticules. À des fins thérapeutiques, la formulation des LNPs a été optimisée pour une pénétration pulmonaire par inhalation et il a été vérifié que l'ARNm est efficacement traduit dans le poumon après nébulisation (testé sur des souris) [79].

La voie intranasale a également été étudiée pour la vaccination avec des LNPs cargo d'ARNm ainsi que pour la thérapie génique de la fibrose kystique avec des ARNm encapsulés dans des LNPs par voie intranasale par instillation dans les narines des souris : l'ARNm transfectant les cellules nasales exprime la protéine d'intérêt dans les cellules qui ne l'exprimaient pas à cause d'un défaut génétique. [80]

Chez l'homme, des nanoparticules liposomales contenant de l'ADN administrées localement par nébulisation ont transfecté des cellules des voies respiratoires. Un récent essai de phase 2b sur l'administration de l'ADN du CFTR (cystic fibrosis transmembrane conductance regulator) à l'aide d'un système d'administration liposomal a montré qu'après des nébulisations mensuelles répétées pendant un an, les groupes de patients atteints de mucoviscidose ont connu une stabilisation de la fonction pulmonaire, tandis que le groupe placebo a connu un déclin[81].

Des essais cliniques pour la prévention de la grippe ont montré l'efficacité et la sécurité des vaccins à ARNm inhalés : L'ARNm nu ou l'ARNm enveloppé dans des particules lipidiques (notamment à base de PEG comme dans les vaccins ARNm anti-Covid), peut être inhalé sous forme d'aérosol et transfecter les cellules épithéliales pulmonaires [82]. L'administration *in utero* de formulations de nanoparticules lipidiques contenant de l'ARNm peut être appliquée pour délivrer l'ARNm à des fœtus de souris, avec pour conséquence l'expression de la protéine dans le foie, les poumons et les intestins du fœtus [70].

Essai de LNPs pour une vaccination transcutanée

Dans une revue [72] sur la possibilité de vaccination transcutanée par LNPs, on apprend que la peau humaine non endommagée est imperméable aux micro et nanoparticules mais il existe des preuves d'une certaine pénétration cutanée dans les tissus viables (principalement dans le *stratum spinosum* de la couche épidermique, mais aussi éventuellement dans le derme) pour les très petites particules (moins de 10 nm). Lorsque l'on utilise des protocoles de pénétration de la peau intacte, il n'y a pas de preuve concluante de la pénétration de la peau dans les tissus viables pour les particules d'une taille primaire d'environ 20 nm et plus. Mais il n'y a pas d'informations appropriées pour la peau dont la fonction de barrière est altérée, par exemple la peau atopique ou la peau brûlée par le soleil. Quelques données sont disponibles sur la peau psoriasique. Il existe des preuves que certains effets mécaniques (par exemple, la flexion) sur la peau peuvent avoir un effet sur la pénétration des nanoparticules. Mais il a été montré que les nanoparticules s'accumulent dans les ouvertures folliculaires, les glandes sébacées ou les plis cutanés. Une suspension aqueuse de nanoparticules ainsi qu'une formulation d'hydrogel de ces particules, appliquée sur la peau d'oreille de porc *in vitro*, pénétrait profondément dans les follicules pileux. Ces particules peuvent libérer différents composés encapsulés qui pénètrent ensuite dans la peau.

Il existe des preuves dans la littérature que la voie trans-folliculaire peut être utilisée : l'application topique de vecteurs d'expression plasmidiques nus sur la peau intacte de souris a induit des réponses

immunitaires spécifiques de l'antigène. Les réponses cellulaires et en anticorps spécifiques de l'Ag HBs ont été induites dans le même ordre de grandeur que celles produites par l'injection i.m. du vaccin polypeptidique recombinant de l'Ag HBs. En revanche, aucune réponse immunitaire n'a pu être induite chez les souris nues : la présence de follicules pileux normaux était une condition préalable à l'induction d'une réponse. Les particules avaient une taille d'environ 150 nm. Les LNPs des vaccins ARNm mesurent entre 100 et 400 nm [22].

Un système qui a fait l'objet de tests cliniques par voie transdermique est le patch DermaVir contre le VIH-1/sida. Il contient un vaccin à ADN plasmidique (ADNp) codant pour tous les principaux antigènes du VIH-1 et pour la formation de particules de type viral. L'ADNp est formulé sous la forme de nanoparticules de polyéthylèneimine mannosylées (80-400 nm) semblables à celles des agents pathogènes. Cette étude a porté sur 12 personnes immunisées avec le vaccin : elles ont développé des niveaux plus élevés et plus larges de cellules T CD8+ par rapport au placebo, bien qu'il n'ait eu aucun effet sur le nombre de cellules T CD4+. [72]

L'ARN nu pourrait également être utilisé par passage cutané et par inhalation

Les oligonucléotides ARN peuvent pénétrer la peau intacte et conserver leur activité biologique, la pénétration à travers la peau ne dépend pas de la taille de la molécule étudiée (12,5 à 29,3 kDA) [83]. La faisabilité de l'ARN inhalé pour la transfection passive a également été démontrée dans un certain nombre d'études. L'ARN inhalé peut conduire à la synthèse de protéine spike après transfection et conduit ainsi à l'immunisation de l'individu. [84]

LNPs thérapeutiques et vaccinales dans la COVID-19

Étant donné que les LNPs vaccinales sont des VEs synthétiques, il n'est pas surprenant que des thérapeutiques et des vaccins COVID avec des VEs naturelles servant de vecteurs soient en expérimentation. La nébulisation de VEs pour une thérapie par inhalation a été testée pour la COVID-19. Actuellement, plus de soixante essais cliniques sont en cours pour étudier les effets des CSM (cellules souches mésenchymateuses) et des VEs (contenant ces CSM) chez les patients atteints de COVID-19. Un essai clinique de phase 1 visant à évaluer la sécurité et l'efficacité des VEs inhalées dérivées de CSM adipeuses allogéniques pour le traitement de la pneumonie COVID-19 a été achevé. 3 essais cliniques utilisent l'aérosol comme voie d'administration. En 2022, cette technique a montré son efficacité pour la thérapie par nébulisation chez les patients atteints de COVID-19. [85]

Vaccins à exosomes naturels contre le SARS-CoV-2 : voie plantaire ou inhalation

Des vaccins à base de VEs porteuses d'ARNm ont été envisagés contre le SRAS-CoV-2 [86]. Des essais de vaccins injectés sous forme de VEs dans le coussinet plantaire de souris ont montré l'induction d'anticorps contre le spike [87]. Des VEs vectrices du RBD (domaine de liaison) de la spike sont capables de faire pénétrer par nébulisation et inhalation l'antigène dans les cellules pulmonaires de souris et d'induire une réponse immune. Ce sont des particules proches des virus (VLP-Virus Like Particles) obtenues naturellement à partir de cellules de poumon et qui transportent l'ARN de leur cellule mère ainsi que différentes protéines exprimées à leur surface. Par inhalation également, les VEs contenant de l'ARNm de la protéine spike sont capables d'immuniser des souris ou des primates non humains contre le SARS-CoV-2 et les VEs naturelles sont plus efficaces que les VEs synthétiques [89].

Observations réalisées après la campagne massive de vaccination pouvant soutenir l'excrétion du vaccin

Les scientifiques ont comparé des enfants non vaccinés vivant avec des parents non vaccinés avec des enfants également non vaccinés mais vivant avec des parents vaccinés. Les enfants de parents

vaccinés ont des IgG anti-Covid dans le nez et la différence avec les enfants de parents non vaccinés est significative. Les auteurs pensent que cela est dû à l'excrétion d'anticorps par les gouttelettes : ce qui est transféré serait l'anticorps IgG lui-même dans les gouttelettes de salive. Mais il est possible que les enfants développent des IgG intranasales parce que d'autres sous-produits du vaccin ou exosomes sont excrétés par leurs parents vaccinés. Cela pourrait être dû aux nanoparticules lipidiques d'ARNm qui pourraient être excrétées et transférées par la salive, par expectoration ou par la peau. Les enfants développeraient une réaction immunitaire aux nanoparticules (ou sous-produits du vaccin) au lieu que les IgG soient transférées directement par les parents aux enfants. Les anticorps recherchés sont les IgG et IgA contre le RBD de la spike et pas contre la nucléocapside du virus, c'est dommage car les auteurs ont développé les 2 types de test [91] : cela ne permet pas de distinguer les enfants qui auraient été infectés naturellement par le virus (et auraient des anticorps anti-RBD et anti-N) des enfants qui auraient développé des anticorps suite à la vaccination de leurs parents (et n'auraient que des anti-RBD et pas d'anti-N car non induits par le vaccin).

Conclusion

Il existe de nombreux témoignages de personnes non vaccinées ayant présenté des symptômes identiques aux effets indésirables du vaccin après avoir été en contact avec des personnes fraîchement vaccinées. Une étude montre un excès de mortalité dans les classes d'âge non vaccinées au début des campagnes de vaccination, qui pourrait s'expliquer par un phénomène de transmission du vaccin ou de ses produits. Il est important de ne pas négliger ces témoignages car les études requises de pharmacocinétique et notamment d'excrétion du vaccin et de ses produits n'ont pas été réalisées malgré la réglementation en vigueur pour les thérapies géniques, qui incluent les vaccins à ARNm selon la définition de ces produits géniques. De plus, le doute sur la possible transmission du vaccin crée un climat malsain de suspicion des non-vaccinés envers les vaccinés : une clarification serait donc la bienvenue. Les vaccins sont tous basés sur la protéine spike, reconnue depuis comme la principale responsable de la pathogénicité du virus SRAS-CoV-2 : si la transmission du vaccin ou du spike est possible, il est logique de retrouver les effets indésirables du vaccin chez des personnes non vaccinées en contact avec des personnes vaccinées.

On sait peu de choses sur la pharmacocinétique du vaccin. Les LNPs du vaccin sont très similaires aux VEs naturels ou exosomes, dont les scientifiques ont essayé d'imiter la structure et la fonction le plus fidèlement possible. D'après le peu d'études effectuées par les fabricants et des chercheurs indépendants, les LNPs des vaccins ARNm circulent dans le sang et s'accumulent dans la rate et le foie chez souris (et dans une moindre mesure dans de nombreux organes dont les ovaires et les testicules, la moelle osseuse,...). La traduction en protéine spike persiste 6 à 10 jours chez la souris au site d'injection et 8 jours dans les muscles.

La voie d'excrétion des LNPs varie en fonction de leur taille, dans le cas des LNP de vaccins ARNm l'excrétion devrait se faire principalement par les fèces mais aussi par l'urine. Les résultats quantitatifs de ces études suggèrent que d'autres voies d'excrétion que les fèces et l'urine devraient être explorées. Des études antérieures aux vaccins à ARNm suggèrent que l'excrétion des VEs est possible par la salive, la sueur et le lait maternel.

Des études ont montré qu'il est très possible que des nanoparticules de taille comparable à celles utilisées pour les vaccins à ARNm soient capables de passage transplacentaire chez l'homme.

Les nanoparticules (VEs) sont naturellement présentes dans tous les fluides corporels (y compris les expectorations, la salive et la sueur) et dans les kératinocytes et peuvent transporter des acides nucléiques qui sont ainsi protégés des nucléases. Certains types d'ARN (miRNA) sont sélectivement sélectionnés et enrichis dans les VEs de la sueur à partir du sang.

Aucune étude n'a été trouvée concernant la possibilité de passage des LNPs dans le sperme ; étant

donnée la biodistribution dans tous les organes et fluides, un tel passage est *a priori* possible et devrait être exploré.

L'ARN viral de nombreux virus est présent dans le sang, les sécrétions et les tissus. L'ARNm des vaccins est injecté en quantités plusieurs fois supérieures à l'ARN viral produit lors de l'infection naturelle. Cet ARNm est retrouvé dans le sang dès le premier jour après l'injection et persiste jusqu'à 15 jours, il est capable de s'échapper des LNPs et d'être encapsulé dans des VEs, il est fonctionnel et peut être traduit en protéine. L'ARNm du vaccin nu ou encapsulé dans les VEs se retrouve dans le lait maternel dès la première semaine après l'injection ; il est protégé des sucs gastriques et peut transfecter les cellules néonatales. L'ARN incorporé dans les VEs ou même nu est capable de transfecter des cellules par inhalation ou passage transdermique. L'administration intranasale, orale, transdermique intraoculaire et sous-conjonctivale de VEs porteuses de médicaments a été testée : Les LNPs peuvent être administrées par voie cutanée, intranasale, intraconjonctivale et par inhalation ; des expériences ont montré que l'ARNm inclus dans ces LNPs est capable de transfecter des cellules. Des essais de vaccination contre la COVID par inhalation de VEs contenant de l'ARNm ou de la spike ont donné des résultats positifs chez les souris et les primates non humains. Les VEs naturelles sont plus efficaces que les VEs synthétiques.

La protéine spike traduite à partir de l'ARNm du vaccin persiste pendant des mois en grandes quantités chez les vaccinés ; on la trouve sous forme libre dans le plasma et encapsulée dans les VEs qui se forment spontanément à partir des cellules où elle a été produite. Ces VEs peuvent délivrer leur cargaison à différents types de cellules, en particulier aux cellules fœtales des mères vaccinées. La spike peut être trouvée dans les kératinocytes de la peau.

Spécifiquement contre les coronavirus, des essais de thérapie génique et de vaccination (notamment avec des ARNm) ont montré la possibilité de transfecter des cellules par voie transcutanée, nasale et par nébulisation à partir de LNPs et même d'ARNm nus. Des exosomes vecteurs de RBD (domaine de liaison) de la spike ou d'ARNm ont été testés par inhalation chez l'animal pour une immunisation anti-COVID-19.

Toutes ces études montrent que les VEs porteuses d'ARNm et de spike pourraient donc être excrétées par différents fluides corporels et pourraient pénétrer par voie transcutanée ou par inhalation chez des individus non vaccinés (ainsi que par le lait maternel chez les nourrissons et par passage transplacentaire chez les fœtus et pourquoi pas par le sperme). L'ARNm nu pourrait également être excrété et pénétrer.

Les vaccins à ARNm (et adénovirus) correspondent exactement à la définition de la thérapie génique donnée par les agences sanitaires (FDA, NIH et EMA). Selon les réglementations de ces agences, ces produits devraient faire l'objet d'études pharmacocinétiques supplémentaires (en particulier des études d'excrétion) de toute urgence au fur et à mesure que la généralisation de la technologie ARNm semble vouloir s'imposer. En effet, Sanofi lance l'essai clinique du premier candidat vaccin contre la grippe saisonnière à base d'ARNm [92] et Moderna lance l'essai de phase 3 du vaccin contre la grippe à base d'ARNm [93]. Pour ces vaccins anti-grippaux, l'autorisation d'urgence ne devrait pas pouvoir s'appliquer et l'obligation de ces études supplémentaires ne devrait pas être outrepassée.

Références

1 Covid Vaccine Side Effects Ray Sahelian

<https://raysahelian.com/covidvaccinesideeffects.html>, accessed November 3, 2022

2 Moghaddar M, Radman R, Macreadie I. Severity, Pathogenicity and Transmissibility of Delta and

Lambda Variants of SARS-CoV-2, Toxicity of Spike Protein and Possibilities for Future Prevention of COVID-19. *Microorganisms*. 2021; 9(10):2167.

<https://doi.org/10.3390/microorganisms9102167>

3 Almejdi, A.M., Khoder, G., Alchakee, A.S. et al. SARS-CoV-2 spike protein: pathogenesis, vaccines, and potential therapies. *Infection* 49, 855-876 (2021).

<https://doi.org/10.1007/s15010-021-01677-8>

4 Lei Y, Zhang J, Schiavon CR, He M et al. SARS-CoV-2 Spike Protein Impairs Endothelial Function via Downregulation of ACE2. *Circ Res*. 2021 Apr 30;128(9):1323-1326. doi:

10.1161/CIRCRESAHA.121.318902. Epub 2021 Mar 31

<https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.121.318902>

5 Letarov, A.V., Babenko, V.V. & Kulikov, E.E. Free SARS-CoV-2 Spike Protein S1 Particles May Play a Role in the Pathogenesis of COVID-19 Infection. *Biochemistry Moscow* 86, 257-261 (2021).

<https://doi.org/10.1134/S0006297921030032>

6 Gao X, Zhang S, Gou J, Wen Y, Fan L, Zhou J, Zhou G, Xu G, Zhang Z. Spike-mediated ACE2 down-regulation was involved in the pathogenesis of SARS-CoV-2 infection. *J Infect*. 2022

Oct;85(4):418-427. doi: 10.1016/j.jinf.2022.06.030. Epub 2022 Jul 3.

<https://doi.org/10.1016/j.jinf.2022.06.030>

7 Coronavirus vaccine - summary of Yellow Card reporting, Updated 7 October 2022, accessed November 3, 2022

<https://www.gov.uk/government/publications/coronavirus-covid-19-vaccine-adverse-reactions/coronavirus-vaccine-summary-of-yellow-card-reporting#annex-1-vaccine-analysis-print>

8 Pantazakos S and Seligmann H, COVID vaccination and age-stratified all-cause mortality risk

https://www.researchgate.net/publication/355581860_COVID_vaccination_and_age-stratified_all-cause_mortality_risk October 2021

9 Internet Archives <https://archive.org/details/pfizer-confidential-translated> SARS-CoV-2 mRNA Vaccine (BNT162, PF-07302048) 2.6.4 Summary statement of the pharmacokinetic study

<https://ia902305.us.archive.org/28/items/pfizer-confidential-translated/pfizer-confidential-translated.pdf> accessed November 3, 2022

10 FDA, Design and Analysis of Shedding Studies for Virus or Bacteria-Based Gene Therapy and Oncolytic Products, August 2015, accessed November 3, 2022

Guidance for Industry <https://www.fda.gov/regulatory-information/search-fda-guidance-documents/design-and-analysis-shedding-studies-virus-or-bacteria-based-gene-therapy-and-oncolytic-products>

11 NIH Guidelines, NIH GUIDELINES FOR RESEARCH INVOLVING RECOMBINANT OR SYNTHETIC NUCLEIC ACID MOLECULES (NIH GUIDELINES) APRIL 2019

https://osp.od.nih.gov/wp-content/uploads/NIH_Guidelines.pdf page 18, accessed November 3, 2022

12 mRNA Clinical Trials: Key Regulatory Considerations, Daniel Eisenman, April 19, 2022

<https://www.advarra.com/blog/mrna-clinical-trials-key-regulatory-considerations/> accessed November 3, 2022

13 European Medicines Agency, Guideline on the quality, non-clinical and clinical aspects of gene therapy medicinal products GTMPs, March 2018, accessed November 3, 2022

https://www.ema.europa.eu/en/documents/scientific-guideline/guideline-quality-non-clinical-clinical-aspects-gene-therapy-medicinal-products_en.pdf

14 EMA/554262/2018 Committee for Medicinal Products for Human Use (CHMP) Assessment report , Onpattro , International non-proprietary name: patisiran Procedure No. EMEA/H/C/004699/0000 26 July 2018, accessed November 3, 2022

https://www.ema.europa.eu/en/documents/assessment-report/onpattro-epar-public-assessment-report_.pdf

15 Pfizer, A Phase 1/2/3, placebo controlled, randomized, observer-blind, dose-finding study to evaluate the safety, tolerability, immunogenicity, and efficacy of SARS-CoV-2 RNA vaccine candidates against Covid-19 in healthy individuals, Page 69, accessed November 3, 2022

https://cdn.pfizer.com/pfizercom/2020-11/C4591001_Clinical_Protocol_Nov2020.pdf

16 Machhi, J., Shahjin, F., Das, S. et al. A Role for Extracellular Vesicles in SARS-CoV-2 Therapeutics and Prevention. *J Neuroimmune Pharmacol* 16, 270-288 (2021).

<https://doi.org/10.1007/s11481-020-09981-0>

17 Aday S, Hazan-Halevy I, Chamorro-Jorganes A et al. Bioinspired artificial exosomes based on lipid nanoparticles carrying let-7b-5p promote angiogenesis in vitro and in vivo. *Mol Ther*. 2021 Jul 7;29(7):2239-2252. doi: 10.1016/j.ymthe.2021.03.015.

<https://doi.org/10.1016/j.ymthe.2021.03.015>

18 Exosomes - The Good, Bad, Ugly and Current State, April 26,2021, American Pharmaceutical Review, Thomas Krol, James West, Joy Hayden, Mei Hei

<https://www.americanpharmaceuticalreview.com/Featured-Articles/575432-Exosomes-The-Good-Bad-Ugly-and-Current-State/> , accessed November 3, 2022

19 Pilkington EH, Suys EJA, Trevaskis NL et al. From influenza to COVID-19: Lipid nanoparticle mRNA vaccines at the frontiers of infectious diseases. *Acta Biomater*. 2021 Sep 1;131:16-40. doi: 10.1016/j.actbio.2021.06.023.

<https://doi.org/10.1016/j.actbio.2021.06.023>

20 Schoenmaker L, Witzigmann D, Kulkarni JA et al. mRNA-lipid nanoparticle COVID-19 vaccines: Structure and stability. *Int J Pharm*. 2021 May 15;601:120586. doi: 10.1016/j.ijpharm.2021.120586.

<https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2021.120586>

21 Shepherd MC, Radnaa E, Tantengco OA et al. Extracellular vesicles from maternal uterine cells exposed to risk factors cause fetal inflammatory response. *Cell Commun Signal*. 2021 Oct 7;19(1):100.

doi: 10.1186/s12964-021-00782-3 <https://doi.org/10.1186/s12964-021-00782-3>

22 Di, J., Du, Z., Wu, K. et al. Biodistribution and Non-linear Gene Expression of mRNA LNPs Affected by Delivery Route and Particle Size. *Pharm Res* 39, 105-114 (2022).

<https://doi.org/10.1007/s11095-022-03166-5>

- 23 Brohi RD, Wang L, Talpur HS et al. Toxicity of Nanoparticles on the Reproductive System in Animal Models: A Review. *Front. Pharmacol.* 2017;8:606.
<https://doi.org/10.3389/fphar.2017.00606>
- 24 Li, M., Al-Jamal, K. T., Kostarelos, K., and Reineke, J. (2010). Physiologically based pharmacokinetic modeling of nanoparticles. *ACS Nano* 4, 6303-6317.
<https://doi.org/10.1021/nn1018818>
- 25 Yongfeng Zhao, Deborah Sultan, Yongjian Liu, - Biodistribution, Excretion, and Toxicity of Nanoparticles, Editor(s): Wenguo Cui, Xin Zhao, In *Micro and Nano Technologies, Theranostic Bionanomaterials*, Elsevier, 2019, Pages 27-53, ISBN 9780128153413,
<https://doi.org/10.1016/B978-0-12-815341-3.00002-X>
- 26 Griffin DE (2022) Why does viral RNA sometimes persist after recovery from acute infections? *PLoS Biol* 20(6): e3001687. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.3001687>
- 27 Les vaccins à ARN messagers (ARNm) sont-ils surdosés ? Are messenger RNA (mRNA) vaccines overdosed? Claverie JM, May, 2022 <https://tkp.at/wp-content/uploads/2022/05/Jean-Michel-Claverie.pdf> , accessed November 3, 2022
- 28 Fertig, T.E.; Chitoiu, L.; Marta, D.S. et al. Vaccine mRNA Can Be Detected in Blood at 15 Days Post-Vaccination. *Biomedicines* 2022, 10,1538.
<https://doi.org/10.3390/biomedicines10071538>
- 29 Maugeri, M., Nawaz, M., Papadimitriou, A. et al. Linkage between endosomal escape of LNP-mRNA and loading into EVs for transport to other cells. *Nat Commun* 10, 4333 (2019).
<https://doi.org/10.1038/s41467-019-12275-6>
- 30 Bart, Genevieve, Daniel Fischer, Anatoliy Samoylenko, Artem Zhyvolozhnyi, Pavlo Stehantsev, Ilkka Miinalainen, Mika Kaakinen, et al. "Characterization of nucleic acids from extracellular vesicle-enriched human sweat." *BMC Genomics* 22, no. 1 (June 9, 2021): 425.
<https://doi.org/10.1186/s12864-021-07733-9>
- 31 Reverse Engineering the source code of the BioNTech/Pfizer SARS-CoV-2 Vaccine Hubert B, December 25, 2022 <https://berthub.eu/articles/posts/reverse-engineering-source-code-of-the-biontech-pfizer-vaccine/> , accessed November 3, 2022
- 32 Sira K, Sievänen T, Karppinen JE, Hautasaari P et al. "MicroRNAs in Extracellular Vesicles in Sweat Change in Response to Endurance Exercise". *Frontiers in Physiology* 11 (2020): 676.
<https://doi.org/10.3389/fphys.2020.00676>
- 33 Package leaflet: Information for the recipient , COVID-19 mRNA Vaccine BNT162b2 concentrate for solution for injection tozinameran
https://assets.publishing.service.gov.uk/government/uploads/system/uploads/attachment_data/file/1043779/Temporary_Authorisation_Patient_Information_BNT162_18_0_UK_Clean.pdf accessed November 3, 2022
- 34 Should I sweat after my COVID vaccine, June 1, 2021

<https://wicked sheets.com/night-sweats/should-i-sweat-after-my-covid-vaccine/> accessed November 3, 2022

35 Shao S, Fang H, Li Q, Wang G. Extracellular vesicles in Inflammatory Skin Disorders: from Pathophysiology to Treatment. *Theranostics*. 2020 Aug 7;10(22):9937-9955. <https://doi.org/10.7150/thno.45488>

36 Bar-Shai A, Rotem M, Shenhar-Tsarfaty S, Ophir N, Fireman E, Nanoparticles in sputum - a new window to airway inflammation *European Respiratory Journal* Sep 2017, 50 (suppl 61) PA1008; <https://doi.org/10.1183/1393003.congress-2017.PA1008>

37 Sánchez-Vidaurre S, Eldh M, Larssen P, Daham K et al. RNA-containing exosomes in induced sputum of asthmatic patients. *J Allergy Clin Immunol*. 2017 Nov;140(5):1459-1461.e2. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2017.05.035>

38 Low JM, Gu Y, Ng MSF et al. Codominant IgG and IgA expression with minimal vaccine mRNA in milk of BNT162b2 vaccinees. *NPJ Vaccines*. 2021 Aug 19;6(1):105. <https://doi.org/10.1038/s41541-021-00370-z>

39 New growth curves for French boys, French Association of Ambulatory Pediatrics, Nouvelles courbes de croissance des garçons français, Association Française de Pédiatrie Ambulatoire, <https://afpa.org/outil/courbes-de-croissance-garcons-francais/>, accessed November 3, 2022

40 Golan Y, Prahm M, Cassidy A, Lin CY, Ahituv N, Flaherman VJ, Gaw SL. Evaluation of Messenger RNA From COVID-19 BNT162b2 and mRNA-1273 Vaccines in Human Milk. *JAMA Pediatr*. 2021 Oct 1;175(10):1069-1071. <https://doi.org/10.1001/jamapediatrics.2021.1929>

41 Golan Y, Prahm M, Cassidy AG et al. COVID-19 mRNA Vaccination in Lactation: Assessment of Adverse Events and Vaccine-Related Antibodies in Mother-Infant Dyads. 2021 *Front. Immunol*. 12:777103. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2021.777103>

42 Hanna N, Heffes-Doon A, Lin X, et al. Detection of Messenger RNA COVID-19 Vaccines in Human Breast Milk. *JAMA Pediatr*. Published online September 26, 2022. <https://doi.org/10.1001/jamapediatrics.2022.3581>

43 Kahn S, Liao Y, Du X, Xu W, Li J, Lönnerdal B. Exosomal MicroRNAs in Milk from Mothers Delivering Preterm Infants Survive in Vitro Digestion and Are Taken Up by Human Intestinal Cells. *Mol Nutr Food Res*. 2018 Jun;62(11):e1701050. <https://doi.org/10.1002/mnfr.201701050>

44 Lönnerdal, B., Du, X., Liao, Y. and Li, J. (2015), Human milk exosomes resist digestion in vitro and are internalized by human intestinal cells. *The FASEB Journal*, 29:121.3. https://doi.org/10.1096/fasebj.29.1_supplement.121.3

45 Melnik, B.C.; Schmitz, G. Milk Exosomal microRNAs: Postnatal Promoters of β Cell Proliferation but Potential Inducers of β Cell De-Differentiation in Adult Life. *Int. J. Mol. Sci*. 2022, 23, 11503. <https://doi.org/10.3390/ijms231911503>

46 Riley RS, Kashyap MV, Billingsley MM et al.. Ionizable lipid nanoparticles for in utero mRNA delivery. *Sci Adv*. 2021 Jan 13;7(3):eaba1028. <https://doi.org/10.1126/sciadv.aba1028>

- 47 LaTourette PC 2nd, Awasthi S, Desmond A et al. Protection against herpes simplex virus type 2 infection in a neonatal murine model using a trivalent nucleoside-modified mRNA in lipid nanoparticle vaccine. *Vaccine*. 2020 Nov 3;38(47):7409-7413. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2020.09.079>
- 48 Kulvietis V, Zalgevičienė V, Didziapetriene J, Rotomskis R Transport of Nanoparticles through the Placental Barrier, *The Tohoku Journal of Experimental Medicine*, 2011, Volume 225, Issue 4, Pages 225-234, Released on J-STAGE November 03, 2011, Online ISSN 1349-3329, Print ISSN 0040-8727, <https://doi.org/10.1620/tjem.225.225>
- 49 Saunders, M. (2009), Transplacental transport of nanomaterials. *WIREs: Nanomed Nanobiotech*, 1: 671-684. <https://doi.org/10.1002/wnan.53>
- 50 Muoth, C., Aengenheister, L., Kucki, M., Wick, P., & Buerki-Thurnherr, T. (2016). Nanoparticle transport across the placental barrier: pushing the field forward! *Nanomedicine*, 11(8), 941-957. <https://doi.org/10.2217/nnm-2015-0012>
- 51 Keelan JA, Leong JW, Ho D, Iyer KS. Therapeutic and safety considerations of nanoparticle-mediated drug delivery in pregnancy. *Nanomedicine (Lond)*. 2015 Jul;10(14):2229-47 <https://doi.org/10.2217/nnm.15.48>
- 52 Wick P, Malek A, Manser P et al. Barrier capacity of human placenta for nanosized materials. *Environ Health Perspect*. 2010 Mar;118(3):432-6. <https://doi.org/10.1289/ehp.0901200>
- 53 Bertozzi S., Corradetti B., Seriau L. et al. Nanotechnologies in Obstetrics and Cancer during Pregnancy: A Narrative Review. *J. Pers. Med.* 2022, 12,1324. <https://doi.org/10.3390/jpm12081324>
- 54 Soinenen SK, Repo JK, Karttunen V, Auriola S, Vähäkangas KH, Ruponen M. Human placental cell and tissue uptake of doxorubicin and its liposomal formulations. *Toxicol Lett*. 2015 Dec 3;239(2):108-14. <https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2015.09.011>
- 55 Falchi L, Khalil WA, Hassan M, Marei WFA. Perspectives of nanotechnology in male fertility and sperm function. *Int J Vet Sci Med*. 2018 Sep 12;6(2):265-269. <https://doi.org/10.1016/j.ijvsm.2018.09.001>
- 56 SARS-CoV-2 mRNA Vaccine (BNT162, PF-07302048) 2.6.4 Summary statement of the pharmacokinetic study <https://ia902305.us.archive.org/28/items/pfizer-confidential-translated/pfizer-confidential-translated.pdf> and Nonclinical Evaluation Report BNT162b2 [mRNA] COVID-19 vaccine from the TGA- Therapeutic Goods Administration- Dept of Health -Australian Government- January 2021 <https://www.tga.gov.au/sites/default/files/foi-2389-06.pdf> , accessed November 4, 2022
- 57 Vaccine FAQ, CDC and IDSA, september 20, 2022 <https://www.idsociety.org/covid-19-real-time-learning-network/vaccines/vaccines-information--faq/> accessed November 4, 2022
- 58 Pardi N, Tuyishime S, Muramatsu H et al. Expression kinetics of nucleoside-modified mRNA delivered in lipid nanoparticles to mice by various routes. *J Control Release*. 2015 Nov 10;217:345-51.

<https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2015.08.007>

59 Cosentino M, Marino F. The spike hypothesis in vaccine-induced adverse effects: questions and answers. *Trends Mol Med.* 2022 Aug 22;S1471-4914(22)00189-7.

<https://doi.org/10.1016/j.molmed.2022.07.009>

60 Ogata AF, Maley AM, Wu C et al. Ultra-Sensitive Serial Profiling of SARS-CoV-2 Antigens and Antibodies in Plasma to Understand Disease Progression in COVID-19 Patients with Severe Disease. *Clin Chem.* 2020 Dec 1;66(12):1562-1572. <https://doi.org/10.1093/clinchem/hvaa213>

61 Ogata AF, Cheng CA, Desjardins M et al. Circulating Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2 (SARS-CoV-2) Vaccine Antigen Detected in the Plasma of mRNA-1273 Vaccine Recipients, *Clinical Infectious Diseases*, Volume 74, Issue 4, 15 February 2022, Pages 715-718, <https://doi.org/10.1093/cid/ciab465>

62 Cognetti JS, Miller BL. Monitoring Serum Spike Protein with Disposable Photonic Biosensors Following SARS-CoV-2 Vaccination. *Sensors.* 2021; 21(17):5857.

<https://doi.org/10.3390/s21175857>

63 Mörz, M. A Case Report: Multifocal Necrotizing Encephalitis and Myocarditis after BNT162b2 mRNA Vaccination against COVID-19. *Vaccines* 2022, 10, 1651.

<https://doi.org/10.3390/vaccines10101651>

64 Pesce E, Manfrini N, Cordiglieri C et al. Exosomes Recovered From the Plasma of COVID-19 Patients Expose SARS-CoV-2 Spike-Derived Fragments and Contribute to the Adaptive Immune Response. *Front Immunol.* 2022 Jan 17;12:785941. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2021.785941>

65 Trougakos IP, Terpos E, Alexopoulos H et al. Adverse effects of COVID-19 mRNA vaccines: the spike hypothesis. *Trends Mol Med.* 2022 Jul;28(7):542-554.

<https://doi.org/10.1016/j.molmed.2022.04.007>

66 Bansal S, Perincheri S, Fleming T et al. Cutting Edge: Circulating Exosomes with COVID Spike Protein Are Induced by BNT162b2 (Pfizer-BioNTech) Vaccination prior to Development of Antibodies: A Novel Mechanism for Immune Activation by mRNA Vaccines. *J Immunol.* 2021 Nov 15;207(10):2405-2410. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.2100637>

67 Yamamoto, M, Kase, M, Sano, H, Kamijima, R, Sano, S. Persistent varicella zoster virus infection following mRNA COVID-19 vaccination was associated with the presence of encoded spike protein in the lesion. *J Cutan Immunol Allergy.* 2022; 00: 1- 6.

<https://doi.org/10.1002/cia2.12278>

68 Najahi-Missaoui, W.; Arnold, R.D.; Cummings, B.S. Safe Nanoparticles: Are We There Yet? *Int. J. Mol. Sci.* 2021, 22, 385. <https://doi.org/10.3390/ijms22010385>

69 Roberts MS, Mohammed Y, Pastore MN et al. Topical and cutaneous delivery using nanosystems. *J Control Release.* 2017 Feb 10;247:86-105. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2016.12.022>

70 Hou, X., Zaks, T., Langer, R., et al. Lipid nanoparticles for mRNA delivery. *Nat Rev Mater* 6,

1078-1094 (2021). <https://doi.org/10.1038/s41578-021-00358-0>

71 Palmer BC, DeLouise LA. Nanoparticle-Enabled Transdermal Drug Delivery Systems for Enhanced Dose Control and Tissue Targeting. *Molecules*. 2016 Dec 15;21(12):1719. <https://doi.org/10.3390/molecules21121719>

72 Hansen S, Lehr CM. Nanoparticles for transcutaneous vaccination. *Microb Biotechnol*. 2012 Mar;5(2):156-67. <https://doi.org/10.1111/j.1751-7915.2011.00284.x>

73 Klyachko NL, Arzt CJ, Li SM, Gololobova OA, Batrakova EV. Extracellular Vesicle-Based Therapeutics: Preclinical and Clinical Investigations. *Pharmaceutics*. 2020 Dec 1;12(12):1171. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics12121171>

74 Gu TW, Wang MZ, Niu J, Chu Y, Guo KR, Peng LH. Outer membrane vesicles derived from *E. coli* as novel vehicles for transdermal and tumor targeting delivery. *Nanoscale*. 2020 Sep 28;12(36):18965-18977. <https://doi.org/10.1039/D0NR03698F>

75 de Jong B, Barros ER, Hoenderop JGJ, Rigalli JP. Recent Advances in Extracellular Vesicles as Drug Delivery Systems and Their Potential in Precision Medicine. *Pharmaceutics*. 2020 Oct 22;12(11):1006. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics12111006>

76 Dad HA, Gu TW, Zhu AQ, Huang LQ, Peng LH. Plant Exosome-like Nanovesicles: Emerging Therapeutics and Drug Delivery Nanoplatfroms. *Mol Ther*. 2021 Jan 6;29(1):13-31. <https://doi.org/10.1016/j.ymthe.2020.11.030>

77 Jacob S, Nair AB, Shah J et al. Lipid Nanoparticles as a Promising Drug Delivery Carrier for Topical Ocular Therapy-An Overview on Recent Advances. *Pharmaceutics*. 2022; 14(3):533. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics14030533>

78 The DEFUSE PROJECT Documents, Drastic Research, page 19 <https://drasticresearch.org/2021/09/21/the-defuse-project-documents/> accessed November 4, 2022

79 Zhang H, Leal J, Soto MR, Smyth HDC, Ghosh D. Aerosolizable Lipid Nanoparticles for Pulmonary Delivery of mRNA through Design of Experiments. *Pharmaceutics*. 2020; 12(11):1042. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics12111042>

80 Robinson E, MacDonald KD, Slaughter K et al. Lipid Nanoparticle-Delivered Chemically Modified mRNA Restores Chloride Secretion in Cystic Fibrosis. *Mol Ther*. 2018 Aug 1;26(8):2034-2046. <https://doi.org/10.1016/j.ymthe.2018.05.014>

81 Alton EFWF, Armstrong DK, Ashby D et al, UK Cystic Fibrosis Gene Therapy Consortium. Repeated nebulisation of non-viral CFTR gene therapy in patients with cystic fibrosis: a randomised, double-blind, placebo-controlled, phase 2b trial, *Lancet Respir. Med*, 3 (2015), pp. 684-691 [https://doi.org/10.1016/S2213-2600\(15\)00245-3](https://doi.org/10.1016/S2213-2600(15)00245-3)

82 Chow MYT, Qiu Y, Lam JKW. Inhaled RNA Therapy: From Promise to Reality. *Trends Pharmacol Sci*. 2020 Oct;41(10):715-729. <https://doi.org/10.1016/j.tips.2020.08.002>

- 83 Lenn JD, Neil J, Donahue C et al. RNA Aptamer Delivery through Intact Human Skin. *J Invest Dermatol.* 2018 Feb;138(2):282-290. <https://doi.org/10.1016/j.jid.2017.07.851>
- 84 Yeo WS, Ng QX. Passive inhaled mRNA vaccination for SARS-Cov-2. *Med Hypotheses.* 2021 Jan;146:110417. <https://doi.org/10.1016/j.mehy.2020.110417>
- 85 Chu M, Wang H, Bian L et al. Nebulization Therapy with Umbilical Cord Mesenchymal Stem Cell-Derived Exosomes for COVID-19 Pneumonia. *Stem Cell Rev Rep.* 2022 Aug;18(6):2152-2163. <https://doi.org/10.1007/s12015-022-10398-w>
- 86 Sabanovic B, Piva F, Cecati M, Giuliatti M. Promising Extracellular Vesicle-Based Vaccines against Viruses, Including SARS-CoV-2. *Biology (Basel).* 2021 Jan 27;10(2):94. <https://doi.org/10.3390/biology10020094>
- 87 Kuate S, Cinatl J, Doerr HW, Uberla K. Exosomal vaccines containing the S protein of the SARS coronavirus induce high levels of neutralizing antibodies. *Virology.* 2007 May 25;362(1):26-37. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2006.12.011>
- 88 Wang, Z., Popowski, K.D., Zhu, D. et al. Exosomes decorated with a recombinant SARS-CoV-2 receptor-binding domain as an inhalable COVID-19 vaccine. *Nat. Biomed. Eng* 6, 791-805 (2022). <https://doi.org/10.1038/s41551-022-00902-5>
- 89 Popowski KD, Moatti A, Scull G et al. Inhalable dry powder mRNA vaccines based on extracellular vesicles. *Matter.* 2022 Sep 7;5(9):2960-2974. <https://doi.org/10.1016/j.matt.2022.06.012>
- 90 Kedl RM, Hsieh E, Morrison TE et al. Evidence for Aerosol Transfer of SARS-CoV2-specific Humoral Immunity medRxiv 2022.04.28.22274443; <https://doi.org/10.1101/2022.04.28.22274443>
- 91 Schultz JS, McCarthy MK, Rester C, et al. Development and Validation of a Multiplex Microsphere Immunoassay Using Dried Blood Spots for SARS-CoV-2 Seroprevalence: Application in First Responders in Colorado, USA. *J Clin Microbiol.* 2021 May 19;59(6):e00290-21. <https://doi.org/10.1128/JCM.00290-21>
- 92 Capital, June 22, 2022 Sanofi launches clinical trial of first mRNA-based seasonal flu vaccine candidate (Sanofi lance l'essai clinique du premier candidat-vaccin à base d'ARNm contre la grippe saisonnière) <https://www.capital.fr/entreprises-marches/sanofi-lance-lessai-clinique-du-premier-candidat-vaccin-a-base-darnm-contre-la-grippe-1407163> accessed November 4, 2022
- 93 Biopharma Reporter, Moderna takes mRNA influenza candidate into Phase 3 trials, June 7, 2022 <https://www.biopharma-reporter.com/Article/2022/06/07/moderna-takes-mrna-influenza-candidate-into-phase-3-trial> accessed November 4, 2022