

15.3 mars 2006

Porphyries urinaires et autisme infantile : l'incidence d'une intoxication environnementale

Robert Nataf ^a, Corinne Skorupka ^b, Lorene Amet ^b, Alain Lam ^a,
Anthea Springbett ^c, Richard Lathe ^{d*}

^aLaboratoire Philippe Auguste, Paris, France ; ^bAssociation ARIANE, Clichy, France ;
^cDépartement Statistiques du Roslin Institute, Roslin , Royaume-Uni et ^dPieta Research,
Edimbourg, Royaume-Uni.

*Contacts : Pieta Research, PO Box 27069, Edinburgh EH10 5YW, UK.

Courriel : rlathe@pieta-research.org.

Résumé

Afin de mesurer l'incidence possible de facteurs environnementaux dans l'étiologie de l'autisme, nous avons mené une étude rétrospective sur les porphyrines urinaires - marqueurs biologiques d'une toxicité environnementale - de 269 enfants atteints de troubles du développement neurologique et associés, dont 106 enfants présentant un syndrome autistique. Ces enfants ont été suivis par un cabinet médical parisien entre 2002 et 2004. Leurs niveaux de porphyrines urinaires, déterminés par chromatographie liquide hautes performances, ont été comparés entre les différents groupes de diagnostics, dont des groupes de contrôle interne et externe. Les niveaux de coproporphyrines étaient plus élevés chez les enfants atteints d'autisme que chez ceux des groupes de contrôle. Cette élévation persiste avec le même degré de signification statistique ($p < 0,001$), après normalisation par rapport à l'âge et à l'uroporphyrine, métabolite de la même voie de biosynthèse, mesurée sur le même échantillon. Les niveaux de porphyrines étaient en revanche normaux chez les sujets Asperger, qui se différenciaient en cela des sujets atteints d'autisme. La précoproporphyrine, molécule atypique spécifiquement révélatrice d'une intoxication aux métaux lourds, était également élevée chez les sujets autistes ($p < 0,001$) mais pas de manière significative chez les sujets Asperger. Un sous-groupe de patients atteints d'autisme a été traité au DMSA oral (acide dimercaptosuccinique) afin de permettre l'élimination des métaux lourds. Ce traitement au DMSA s'est assorti d'une diminution nette ($p = 0,002$) de l'excrétion de porphyrines urinaires. Ces données suggèrent donc l'incidence d'une intoxication d'origine environnementale dans les troubles de l'autisme infantile.

Mots-clés : autisme, Asperger, porphyrines, mercure, troubles envahissants du développement.

Introduction

L'autisme est un trouble de l'interaction sociale, du comportement, du langage et de la communication. Le phénotype allant du handicap manifeste au développement excessif de certaines compétences, l'expression de «spectre autistique » (Autistic Spectrum Disorder - ASD) (Wing, 1996 ; Gillberg et al., 2000) est aujourd'hui communément employée pour désigner l'ensemble des troubles envahissants du développement neurologique dont l'autisme, le syndrome d'Asperger, le syndrome de Rett ainsi que les troubles envahissants du développement non spécifiés (TED-NS) décrits dans le manuel DSM-IV (Association Américaine de Psychiatrie, 1994). Ces troubles sont en partie imputables à des causes génétiques identifiées, mais l'augmentation apparente du nombre de sujets atteints notée par les services médico-sociaux californiens (California Department of Human Developmental Services, 2003 ; Smeeth et al., 2004 ; Barbaresi et al., 2005), augmentation reconfirmée (Blaxill, 2004), suggère l'incidence de facteurs environnementaux. Une meilleure connaissance de ces troubles alliée à la modification des critères de diagnostic peut expliquer en partie cette augmentation (Croen et al., 2002 ; Rutter, 2005), mais une réelle augmentation de la prévalence ne saurait être exclue (Rutter, 2005). Un nombre de cas plus élevé dans les environnements urbains plutôt que ruraux (Deb et al., 1994 ; Palmer et al., 2006 ; Williams et al., 2006) étayent l'hypothèse environnementale. Plusieurs études isolées ont par ailleurs suggéré un lien entre l'exposition aux métaux lourds et les troubles du spectre autistique (Cohen et al., 1982 ; Accardo et al., 1988 ; Shannon et al., 1996 ; Lidsky et al., 2005). Des similitudes entre les symptômes de l'intoxication mercurielle et ceux du spectre autistique ont laissé envisager le rôle éventuellement joué par l'exposition au mercure (Bernard et al., 2001), hypothèse étayée par la prévalence de l'autisme dans les écoles du Texas et les émissions de mercure dans cet état (Palmer et al., 2006).

Afin de rechercher l'incidence de l'environnement dans l'étiologie des troubles autistiques, plusieurs études se sont intéressées aux surcharges en métaux lourds dans l'organisme. Les résidus de métaux étant immobilisés dans les tissus, les analyses de sang ne

permettent guère de mesurer l'exposition. Une mobilisation des métaux par des agents chélateurs permet de les libérer et donc d'obtenir des indications plus fiables sur l'exposition (Markowitz et al., 1991). Une étude a pu démontrer que l'excrétion de métaux lourds pendant la chélation était supérieure chez les sujets atteints de troubles autistiques par rapport à ceux d'un groupe de contrôle (Lonsdale et al., 2002; Bradstreet, 2003), ce qui vient corroborer la thèse d'une surcharge anormale en métaux lourds. L'évacuation de métaux lourds par la chélation est potentiellement toxique (Markowitz et al., 1990), et la chélation peut ne pas être la méthode la plus appropriée pour évaluer les surcharges en métaux. L'analyse d'échantillons de cheveux constitue une alternative, mais bien que des résultats plus élevés aient pu être constatés chez des sujets atteints de troubles autistiques (Fido et al., 2005), certains enfants atteints d'autisme régressif semblent présenter un déficit d'excrétion des métaux par ce tissu (Holmes et al., 2003 ; Hu et al., 2003), ce qui rend les analyses complexes.

Nous nous sommes donc intéressés à une autre méthode, non invasive, pour évaluer un éventuel impact toxique de l'environnement sur des enfants atteints de troubles autistiques. Les porphyrines, produits de la voie de synthèse de l'hème, sont des indicateurs biologiques d'exposition à de nombreux toxiques (Brewster, 1988). La production de porphyrines a lieu essentiellement dans le foie, les reins, et les cellules érythropoïétiques. La synthèse des porphyrines, partagée entre cytoplasme et mitochondrie, démarre par l'association de deux molécules simples, succinyl-CoA et glycine, pour déboucher sur une molécule cruciforme, l'uroporphyrinogène qui, par décarboxylations successives, va donner naissance aux -heptacarboxy, -hexacarboxy, -pentacarboxy et coproporphyrinogène qui est la tétracarboxyporphyrine, et finalement en hème (Fig. 1). L'excès de métabolites porphyrinogènes est excrété dans les urines sous forme de porphyrines oxydées, en particulier l'uroporphyrine et la coproporphyrine. Ces dernières correspondent aux molécules les plus abondantes et les plus solubles dans le cortex rénal des rats (Woods et al, 1993b) : plus hydrosolubles, elles sont excrétées dans l'urine, alors que les protoporphyrines, métabolites distaux hydrophobes, sont éliminées de préférence dans la bile et les selles.

Une excrétion excessive de porphyrines urinaires résulte d'un blocage d'étapes enzymatiques essentielles chez des sujets souffrant, pour des raisons génétiques, d'un déficit enzymatique compromettant la production d'hème (Sarkany, 1999), d'une maladie hépatique, rénale ou érythropoïétique (Gross et al., 2000), ainsi que d'une inhibition toxique des enzymes de la voie de synthèse de l'hème. Qu'ils s'agisse d'animaux de laboratoire ou d'humains exposés à des métaux lourds, les niveaux de porphyrines excrétées dans les urines sont élevés (Bowers et al., 1992 ; Woods, 1996). Les principales enzymes inhibées par les métaux lourds du segment métabolique étudié ici sont l'uroporphyrine décarboxylase (UROD) (Woods et al., 1983) et la coproporphyrinogène oxydase (CPOX) (Woods et al., 2005) (Fig. 1), qui entraînent une augmentation spécifique de la coproporphyrine et de la pentacarboxyporphyrine dans les urines. Une relation de cause à effet entre l'inhibition par les métaux lourds de la voie de synthèse des porphyrines et l'augmentation urinaire des porphyrines a été démontrée : tant chez des rats exposés au mercure (Pingree et al., 2001) que chez des humains exposés au plomb (Rosen et al., 1993), l'éviction des métaux lourds au moyen d'agents chélateurs (DMPS ou acide dimercaptopropanesulfonique, et ETDA ou acide éthylènediamine tétra-acétique) a réduit les niveaux de porphyrines urinaires à des niveaux moyens. Bien que des agents toxiques autres que les métaux lourds puissent perturber la synthèse de l'hème et donc augmenter les niveaux de porphyrines urinaires (Daniell et al., 1997), la précoproporphyrine (également connue sous le nom de céto-isocoproporphyrine) est produite *in vivo* par la transformation de la pentacarboxyporphyrinogène sous l'influence des métaux lourds (Woods et al., 2005 ; Heyer et al., 2006). La précoproporphyrine est donc un marqueur des porphyrines spécifique de l'intoxication aux métaux lourds, dont le mercure.

Pour étudier la charge en métaux lourds d'enfants atteints d'un syndrome autistique, nous avons analysé à posteriori les niveaux de porphyrines urinaires spécifiques d'un grand groupe d'enfants français présentant un diagnostic initial d'autisme ou d'autres troubles envahissants du développement. Aucune autre étude de ce type n'avait encore été menée sur

les niveaux de porphyrines des enfants atteints de troubles autistiques. Notre analyse s'est intéressée aux marqueurs urinaires de l'inhibition de la voie de synthèse de l'hème, dont la coproporphyrine ; nous avons également examiné le marqueur spécifique de l'intoxication aux métaux lourds qu'est la précoproporphyrine. Nous avons pu noter une franche augmentation de ces porphyrines urinaires chez les enfants présentant un trouble du spectre autistique.

Méthodologie

Cohorte : cette étude a porté sur une cohorte de 269 enfants reçus au cabinet du Dr Skorupka, Paris (CS) entre août 2002 et décembre 2004. Environ 70% de ces enfants avaient été préalablement examinés dans des centres de dépistage spécialisés en France. Les autres, pour l'essentiel les plus jeunes, avaient été initialement examinés par des pédopsychiatres choisis par les parents avant d'être adressés au cabinet. Un deuxième diagnostic (réalisé au cabinet du Dr Skorupka) a été effectué à l'issue de la prise de contact avec le médecin ; chaque enfant a été vu par au moins deux praticiens indépendants. L'évaluation finale était conforme à l'ADI-R (Autism Diagnostic Interview-Revised) (Lord et al., 1994) basé sur le manuel DSM-IV (Association américaine de pédiatrie, 1994) et l'ICD-10 (WHO, 1992) adapté pour la France (CS). Les sous-groupes de troubles envahissants du développement (également qualifiés de troubles du spectre autistique) (Wing, 1996 ; Gillberg et al., 2000) étaient les suivants : *Autisme* (syndrome autistique) ; *TED-NS* (trouble envahissant du développement non spécifié ; autisme atypique ou troubles autistiques) ; *Asperger* (syndrome d'Asperger) ; *Rett* (syndrome de Rett). Autres troubles : *déficit d'attention* (déficit d'attention sans hyperactivité), *hyperactivité* (troubles de l'activité et de l'attention, déficit d'attention avec hyperactivité), *IMC* (insuffisance motrice cérébrale), *retard mental* (chez les sujets étudiés, le retard mental s'accompagnait d'épilepsie) et *retard psychomoteur*. En complément de la classification DSM-IV, il faut mentionner l'inclusion à part d'un sous-groupe atteint d'*autisme + épilepsie*, assimilable aux cas d'autisme, mais avec la co-morbidité connue de l'épilepsie, cette catégorie ayant été ajoutée afin d'éviter des confusions évidentes (effet des neuroleptiques). D'autres diagnostics (voir le texte) entraient également dans le cadre du DSM-IV et de l'ICD-10. Les enfants étaient âgés de 1 à 16 ans, avec une plage 2-15 ans pour les enfants atteints de troubles autistiques. La cohorte des 269 sujets suivis entre 2002 et 2004 est présentée au tableau 1.

Aucun enfant ne présentait un historique évident d'exposition aux métaux lourds ou de comportement de pica susceptible d'avoir entraîné une intoxication aux métaux lourds.

Aucun des enfants sans terrain épileptique n'avait suivi de traitement neuroleptique pendant la période étudiée. Les sujets atteints d'épilepsie, y compris ceux du sous-groupe autisme + épilepsie, avaient reçu une médication anticonvulsivante. Le diagnostic des deux sujets atteints d'un syndrome de Rett a été confirmé par une analyse du gène MECP2 ; aucun des enfants présentant un syndrome autistique (n=191 ; Asperger, autisme +/- épilepsie, TED-NS, Rett) ne présentait de syndrome de l'X fragile.

Un groupe de contrôle témoin a été constitué comme suit : parmi les enfants adressés au cabinet pendant la même période, tous ceux présentant un diagnostic autre que ceux ci-dessus ont été inclus moyennant 6 exceptions : 3 enfants présentant plusieurs diagnostics et ne pouvant être inclus dans aucune catégorie, ainsi que 3 autres (maladie de Behçet, n=1 ; détresse foetale, n=2), non représentatifs du fait de leurs valeurs d'uroporphyrine et de coproporphyrine anormales. Le groupe de contrôle interne était ensuite composé d'enfants souffrant de douleurs abdominales (n=1), d'arthrite juvénile avec allergies (1), d'anorexie (1), de boulimie (2), de dyslexie (1), de fibromyalgie (1), de retard de croissance (3), de leukodystrophie (1) ainsi que du frère d'un des sujets, dont les urines avaient été analysées en guise de contrôle.

Les valeurs de référence en fonction de l'âge du groupe de contrôle externe (COPRO et URO uniquement) ont été aimablement communiquées par l'équipe de Minder à partir d'une cohorte d'enfants suisses (n=107), sexe non spécifié, moyenne d'âge 6,6 ans (Minder et al., 1996).

Analyse des porphyrines urinaires. Les porphyrines ont été analysées (RN, AL ; Laboratoire Philippe Auguste) sans communication préalable du diagnostic. Les premières urines du matin (10 ml) ont été stockées dans l'obscurité (<2 j, à température ambiante, conditions dans lesquelles les porphyrines demeurent stables (Minder et al., 1996) puis congelées (-20°C). L'analyse a été réalisée par la technique de Chromatographie Liquide Haute Performance (CLHP) détection par **spectrophométrie** fluorescence (Bowers et al., 1992). Après

centrifugation (3000g, 5 min.) 1 ml de liquide surnageant a été acidifié par 40 μ l d'une solution molaire d'HCl, recentrifugé, puis 50 μ l ont été injectés (Econosphère colonne C18, particules de 5 μ m, 250 x 46 mm ; Alltech, Templemars, France). L'élution a été réalisée avec un gradient (phase A : 50 mM KH₂PO₄ pH 3,5 avec CH₃COOH ; phase B : CH₃OH), 1 ml/min, comme suit : temps 0, phase A:phase B, 50:50 ; durée 3 min, 35:65 ; 8 min., 15:85 ; 18 min, 1:99 ; 28 min, 50:50. La détection par fluorescence (excitation, λ =405 nm ; émission, λ =618 nm) utilisait une détection double en ligne (UV, modèle 310 ; fluorescence, modèle 363, tous deux de chez Varian, Les Ulis, France). Les durées de rétention des uroporphyrines (I et III), hepta-, hexa-, penta-carboxyporphyrine, coproporphyrine (I+III) et mésoporphyrine ultérieure IX étaient de 7,93, 9,19, 11,25, 13,11, 15,07 et 19,58 min. respectivement ; l'élution de la précoproporphyrine métabolite atypique était à 13,92. Les sous-espèces I/III sont mal identifiées et non pas été consignées séparément. La détection a été normalisée selon un échantillon de porphyrines mixtes de référence (CMKIE, produits porphyrines, Logan, Utah) et de coproporphyrines III purifiées (Sigma, France). Les niveaux de créatinine urinaire (CRT) ont été déterminés par essai spectrophotométrique « enzyme-linked » conformément aux indications du fournisseur (Crea-Vitros Technical Bulletin ; Ortho-Clinical Diagnostics, Johnson and Johnson, High Wycombe, RU) ; la norme de référence pour la créatinine urinaire était issue de la même source. Les niveaux de porphyrines étaient étalonnés sur la créatinine. Les protocoles de détection ont été validés de manière indépendante selon la norme ISO 9001 (édition 2000), le COFRAC (Comité Français d'Accréditation), et l'organisme de certification AB, Champlan, France. Les procédures d'échantillonnage, de stockage et d'analyse (<2 jours, -20°C, HPLC) utilisées dans la présente étude étaient comparables à celles retenues pour le groupe de contrôle externe (Minder et al., 1996).

Valeurs de référence des porphyrines. Les valeurs moyennes de la littérature pour la COPRO urinaire des enfants suisses de 2 à 16 ans étaient de 11,4 μ mol/mol de créatinine urinaire

(Minder et al., 1996), légèrement en excès (34%) par rapport à la COPRO moyenne de notre groupe de contrôle, qui était de 8,5 μ mol/mol de créatinine. Les valeurs sont légèrement supérieures chez les sujets masculins que chez les sujets féminins, mais l'amplitude de la différence (~17,5%) (Bloom et al., 1991) n'est pas surprenante. Cependant, le regroupement par classes d'âges (1-2, 3-6, 7-9, 10-16), malgré des variations locales (Minder et al., 1996), ne présentait pas de différences significatives d'une classe d'âge à l'autre pour l'ensemble des valeurs de COPRO ou d'URO normalisées selon la créatinine urinaire. Il convient toutefois de mentionner une diminution des niveaux moyens d'URO et de COPRO corrélée à l'augmentation de la créatinine au fil des ans. Les résultats initiaux présentés ici n'ont donc pas été ajustés en fonction de l'âge.

Normalisation en fonction de l'évolution de la créatinine (CRT) selon l'âge. On a recouru à une seconde normalisation afin de prendre en compte les artefacts éventuellement introduits par les changements de CRT. La CRT urinaire est environ multipliée par deux entre 3 et 17 ans (Bloom et al., 1991 ; Remer et al., 2002 ; Skinner et al., 1996), quel que soit le sexe. En faisant la moyenne de toutes nos données, le niveau moyen de CRT n'était pas différent de manière significative entre les filles et les garçons, mais a doublé entre 2 et 15 ans pour passer, de manière linéaire, de 640 mg/L (2-3 ans) à 1316 à l'âge de 14-15 ans (5,66-11,65 mM). Ces résultats donnent la courbe de normalisation suivante : les facteurs employés (pour les sujets âgés d'environ 10 ans) ont augmenté de manière linéaire pour passer de 0,63 à l'âge de 2 ans, à 1,23 à l'âge de 15 ans ; les valeurs d'âge effectives à la date de l'analyse ont été retenues. Malgré l'absence de différences significatives pour les valeurs de COPRO en fonction de l'âge, qu'il s'agisse du grand groupe de contrôle externe ou de la cohorte au complet (tous groupes d'enfants confondus), on a pu observer une légère baisse des niveaux de COPRO en fonction de l'âge chez l'ensemble des enfants après normalisation en fonction des changements de CRT. Cette baisse correspondait à une diminution linéaire moyenne de 2,9 % par an ; des analyses comparatives distinctes ont permis de confirmer cette évolution.

Rapports internes. Les niveaux de précoproporphyrine (PRECOPRO), une porphyrine anormalement présente dans les urines de rats ou de sujets humains exposés au mercure (Woods et al., 1993b ; Gonzalez-Ramirez et al., 1995 ; Pingree et al., 2001), et qualifiée de céto-isocoproporphyrine (Woods, 1995 ; Woods et al., 2005 ; Heyer et al., 2006), sont classiquement augmentés en même temps que la coproporphyrine (COPRO) dans le cas d'intoxications aux métaux lourds, tandis que les concentrations d'URO sont beaucoup moins élevées (et ce de manière non significative) (Woods et al., 1993a ; Woods, 1996). La pentacarboxyporphyrine est également élevée dans le cas d'une intoxication au mercure (Woods et al., 1993a). Les ratios de porphyrines ont été soit directement calculés soit tracés sous forme de courbes (Excel, Microsoft Corp.) ; pour ce qui est des tracés de PRECOPRO/URO, deux sujets (troubles autistiques) présentant des niveaux d'uroporphyrines inhabituels ont été exclus du fait d'un diagnostic ultérieur de mononucléose. Les valeurs moyennes des ratios différaient légèrement mais de manière non significative de celles issues de tracés de régression passant nécessairement par l'origine. Aucune différence significative n'a été relevée dans les tracés selon l'âge ou le sexe : quelles que soient les tranches d'âge (1-2, 3-6, 7-9, 10-16) ou le sexe, les valeurs de référence (Minder et al., 1996) ne révèlent pas de différences significatives sur le plan des ratios COPRO/URO (niveaux de PRECOPRO non déterminés dans cette étude) ; le rapport COPRO/URO moyen établi à partir d'échantillons de tranches d'âges équivalentes pour cette étude (n=107) était de 6,1 +/- 5,3, soit légèrement inférieur à notre valeur moyenne pour l'ensemble des échantillons (n=269 incluant tous les sujets affectés) qui était de 10,7 +/- 9,3, mais rigoureusement équivalente à la valeur interne 5,35 +/- 3,6 de notre groupe de contrôle interne. Des comparaisons statistiques ont été réalisées tant pour les valeurs internes (groupe de contrôle) qu'externes (Minder et al., 1996).

Protocole de chélation. A la demande des parents, un sous-groupe d'enfants atteints d'autisme ou d'autisme + épilepsie et présentant une augmentation franche des porphyrines urinaires et en particulier des marqueurs de l'exposition aux métaux lourds, ont suivi sous

surveillance médicale (CS) un protocole de chélation au DMSA (acide dimercaptosuccinique ou succimer) (Aposhian et al., 1990). Le DMSA des laboratoires Vitamin Research Products (Carson City, Néveda, Etats-Unis) était donné par voie buccale à raison de 10 mg/kg toutes les 8heures pendant 3jours, suivis d'une période de repos de 11 jours. Ce cycle de deux semaines a été renouvelé cinq fois. Pendant tout ce cycle un apport quotidien destiné à compenser les pertes de minéraux (Flora et al., 1990 ; Mercury detoxification consensus group, 2001) a été prescrit : zinc et préparation multiminéraux sans cuivre, compléments vitaminiques (vitamines C et E) (Flora et al., 2003). Les urines ont été recueillies après au moins un mois d'arrêt de la chélation. D'autres enfants présentant le même diagnostic mais ne suivant pas de protocole de chélation constituaient le groupe de contrôle. Les critères retenus (tant pour le groupe traité que le groupe de contrôle) lors de l'analyse rétrospective ont été les suivants : (a) diagnostic d'autisme ou d'autisme + épilepsie et (b) échantillons indépendants prélevés à au moins 6 mois d'intervalle (ces critères ont conduit à exclure 3 enfants) , ce qui donnait deux groupes (pour le groupe chélaté, n=11, 7 masc./4 fém., âge moyen lors du second test 8,7 ans, plage 5-16 ans, intervalle moyen entre prélèvements 18,6 mois ; et pour le groupe de contrôle, n=10, 8 masc./2 fém., âge moyen 8,6 ans, plage 4-16, intervalle moyen entre prélèvements 13,8 mois). Les valeurs de porphyrines ont été normalisées sur la créatinine urinaire. Les niveaux de métaux contenus dans les urines et les selles n'ont pas été mesurés pendant la chélation.

Analyse statistique. L'analyse statistique (moyennes, écarts types, régression linéaire) a été réalisée sous Excel (Microsoft Corp.) et T test de Student (bilatéral), écarts-types inégaux, approximation Satterthwaite (GenStat ; VSN International, Hemel Hempstead, Herts, RU). La valeur p minimale fournie par ce programme était de $p < 0,001$.

Déontologie. Les prélèvements d'urine analysés rétrospectivement ont été obtenus avec le consentement éclairé des parents ou responsables légaux, et le cas échéant des patients. Les

familles ont été informées de la nature du traitement chélateur avant de l'entreprendre. La présente étude a par ailleurs reçu l'approbation de la commission locale de santé NHS de la région Lothian en Ecosse.

Résultats

Pour identifier l'incidence d'une éventuelle toxicité environnementale dans l'étiologie de l'autisme, nous avons examiné les niveaux de porphyrines urinaires, marqueur fiable de l'exposition, auprès d'un groupe important (n=269) d'enfants français présentant des troubles du développement neurologique et troubles apparentés. L'analyse a été réalisée en aveugle, sans connaissance préalable du diagnostic. 71% des enfants présentaient un diagnostic de troubles du spectre autistique (ASD), dont en majorité (56%) un diagnostic d'autisme infantile (autisme). Les autres catégories de diagnostic de l'étude incluaient le syndrome d'Asperger, le déficit d'attention, l'insuffisance motrice cérébrale (IMC), l'hyperactivité, des TED-NS ainsi qu'une catégorie spécifique supplémentaire pour l'autisme + épilepsie (Méthodologie, Tableau 1). Comme prévu, le nombre de sujets masculins (M) l'emportait dans l'ensemble de la cohorte (M/F=2,76) et en particulier le groupe troubles du spectre autistique (M/F=3,34), à l'exception toutefois du sous-groupe déficit d'attention qui était majoritairement féminin (F) (M/F=0,29, n=9).

Un groupe de contrôle interne (n=12) a été composé à partir d'enfants suivis au cabinet pendant la même période pour des diagnostics sans rapport avec ceux énumérés ci-dessus (Méthodologie). Afin d'être certains de la validité des valeurs du groupe de contrôle interne, nous avons vérifié les données initiales de 107 enfants suisses (Méthodologie). Nous avons ainsi eu confirmation des valeurs de référence du groupe de contrôle interne : il n'y avait aucune différence significative dans les niveaux de porphyrines (ou rapports) entre les groupes de contrôle interne et externe. Le sous-groupe Asperger a par ailleurs apporté une confirmation supplémentaire des données du groupe de contrôle interne (ci-dessous). Afin d'exclure toute ambiguïté liée à des différences dans les protocoles de mesure, présentés ci-après, des comparaisons statistiques distinctes ont été effectuées d'abord avec le groupe de contrôle interne, puis avec le groupe de contrôle externe (uroporphyrine et coproporphyrine uniquement).

Niveaux de porphyrines. Les valeurs moyennes d'uroporphyrine (URO) et de coproporphyrine (COPRO) urinaires ont été comparées entre les différentes catégories de diagnostic ainsi qu'avec les groupes de contrôle. On n'a observé aucune différence significative entre les niveaux d'URO obtenus pour les différents diagnostics. En revanche, on a pu noter les signes d'une COPRO excessivement élevée pour deux des diagnostics (autisme et autisme + épilepsie), pour lesquels les niveaux de COPRO moyens dépassaient de deux fois l'écart-type la valeur moyenne du groupe de contrôle (Fig. 2). L'amplitude de cette élévation (augmentation moyenne de 2,6 fois pour la COPRO) était comparable à celle constatée pour l'exposition à l'arsenic (1,9 fois) et au mercure (3,2 fois) (Wang et al., 2002 ; Woods, 1996).

Cette augmentation était statistiquement significative ($p < 0,001$) pour l'autisme comparé au groupe de contrôle interne, confirmant ainsi le critère retenu pour évoquer une augmentation de l'excrétion des porphyrines urinaires. En revanche, elle demeurait marginale pour l'autisme + épilepsie ($p < 0,1$), aux vues de la taille limitée du groupe. Trois autres diagnostics s'accompagnaient d'une élévation encore supérieure des niveaux de porphyrines, (épilepsie, retard mental avec épilepsie, et syndrome de Rett), sans toutefois permettre d'en tirer des conclusions du fait de la taille limitée des échantillons. La comparaison avec les valeurs de référence du grand groupe d'enfants suisses (Méthodologie), a permis de confirmer la pertinence statistique de ces résultats (autisme et autisme + épilepsie : tous deux $p < 0,001$).

De manière inattendue, on a pu constater que les niveaux de porphyrines des enfants Asperger ne différaient pas de manière significative de ceux des deux groupes de contrôle. La distinction biochimique entre le sous-groupe Asperger et les sous-groupes autisme et autisme + épilepsie était hautement significative d'un point de vue statistique ($p < 0,001$). Parmi les autres troubles associés à une élévation marginale des porphyrines, il faut citer les allergies, le déficit d'attention, l'insuffisance motrice cérébrale, les TED-NS et les retards psychomoteurs, avec toutefois des valeurs statistiques peu significatives ($p > 0,05$). La probabilité statistique pour l'insuffisance motrice cérébrale demeurait faible ($p < 0,1$) par rapport au groupe de contrôle interne.

Les niveaux de porphyrines sont normalisés en fonction des niveaux de créatinine urinaire (CRT), métabolite omniprésente et étroitement dépendante de la consommation et de l'excrétion des liquides. Les niveaux de CRT augmentant lentement avec l'âge chez les enfants, et afin d'exclure ce paramètre comme source de variation, les données ont été renormalisées selon une courbe standard référencée sur des données internes et externes (Méthodologie). La cohérence statistique d'un groupe à l'autre a été maintenue (autisme/groupe de contrôle, $p < 0,001$). Ainsi, les différences d'âges reflétées dans les niveaux CRT n'expliquent pas les excès de porphyrines observés. Malgré une légère tendance non significative à la baisse, selon l'âge, des valeurs de COPRO normalisées sur la CRT (2,9 % par an ; Méthodologie), des ajustements spécifiques réalisés pour tenir compte de cette tendance n'ont pas altéré les différences significatives d'un groupe à l'autre (non illustré) : ceci excluait la composante âge comme facteur sous-jacent de l'excès de porphyrines observé chez les sujets atteints d'autisme.

Afin d'éliminer des variations susceptibles d'être induites par les niveaux de CRT, nous avons déterminé des rapports internes entre les différents types de porphyrines au sein de chaque échantillon. Pour être plus précis, nous avons étudié le rapport existant entre la coproporphyrine (COPRO), marqueur spécifique de l'intoxication aux métaux lourds, et l'uroporphyrine (URO), précurseur indépendant de la toxicité environnementale (Fig. 3). On a ainsi pu identifier une légère augmentation des niveaux d'URO dans les cas d'autisme, mais ces différences n'étaient pas significatives par rapport au groupe de contrôle. Les enfants atteints d'autisme et d'autisme + épilepsie présentaient des rapports COPRO/URO élevés par rapport au groupe de contrôle interne et au groupe Asperger ; les différences de rapports étaient significatives (autisme/groupe de contrôle, $p < 0,001$; autisme + épilepsie/groupe de contrôle, $p = 0,008$; autisme/Asperger, $p = 0,009$), le groupe Asperger ne présentant pas de différences significatives par rapport au groupe de contrôle. En dressant des comparaisons avec les valeurs de référence (groupe de contrôle externe) pour le rapport COPRO/URO des enfants suisses du même groupe d'âge (Minder et al., 1996), la probabilité statistique était maintenue (autisme/groupe de référence : $p < 0,001$).

Les rapports COPRO/URO des enfants du sous-groupe TED-NS (et insuffisance motrice cérébrale) étaient significatifs par rapport au groupe de contrôle externe ($p < 0,05$), mais non par rapport au groupe de contrôle interne (probabilité marginale : $p < 0,1$).

Précoproporphyrines et pentacarboxyporphyrines, marqueurs de l'intoxication aux métaux lourds. Les données révèlent une élévation significative ($p < 0,001$) des niveaux de coproporphyrines (COPRO) dans l'autisme. Afin d'identifier les causes potentielles, nous avons étudié les niveaux de précoproporphyrine (PRECOPRO), métabolite atypique plus spécifiquement associée à l'exposition aux métaux lourds qu'à une intoxication chimique ou d'autres pathologies. Les niveaux de PRECOPRO ont été comparés aux valeurs d'uroporphyrine de base (URO) de chaque échantillon, et des courbes d'infléchissement ont été calculées (Fig. 4). Les valeurs obtenues pour l'autisme et l'autisme + épilepsie étaient près de deux fois supérieures à celles des groupes de contrôle et Asperger. Les rapports ont été comparés : les différences étaient statistiquement significatives (autisme/groupe de contrôle : $p < 0,001$; autisme + épilepsie/groupe de contrôle : $p = 0,011$) ; Asperger/groupe de contrôle : peu de différences). Ces données démontrent une élévation spécifique de la PRECOPRO dans les cas d'autisme et d'autisme + épilepsie. Les niveaux identifiés chez les deux sujets souffrant uniquement d'épilepsie étaient inférieurs à ceux des sujets atteints à la fois d'autisme ou d'autisme + épilepsie (rapport PRECOPRO/URO moyen = 1,17, contre 1,2 pour l'autisme et 1,47 pour l'autisme + épilepsie ; valeurs issues des moyennes, non représentées) mais supérieurs à ceux observés pour les sujets Asperger et les groupes de contrôle (0,69 et 0,6 par valeur ; 0,56 et 0,62 par régression ; Fig. 4).

La pentacarboxyporphyrine est un autre marqueur de la toxicité des métaux lourds (Woods et al., 1993a). Les niveaux de cette porphyrine ainsi que de ses précurseurs immédiats (hepta- et hexa-carboxyporphyrines), étaient également élevés dans les urines des enfants atteints de troubles du spectre autistique (en particulier ceux atteints d'autisme et d'autisme + épilepsie) par rapport à ceux des groupes de contrôle (Fig. 5).

Le groupe autisme était nettement plus représenté que les groupes de contrôle tant pour la pentacarboxyporphyrine ($p < 0,001$) que l'hexacarboxyporphyrine ($p < 0,002$), mais ce sans élévation marquée de l'heptacarboxyporphyrine. Les groupes Asperger et TED-NS ne différaient pas de manière significative des groupes de contrôle sur le plan des carboxyporphyrines. Contrairement à l'hexacarboxyporphyrine (6CXP), la pentacarboxyporphyrine (5CXP) ($p < 0,02$) était beaucoup plus élevée dans le groupe autisme + épilepsie, malgré des variations moyennes élevées (9,48) et le peu d'échantillons ($n=9$) (Fig. 5). On n'a pu constater aucune différence significative pour l'heptacarboxyporphyrine (7CXP). D'une manière générale, pour tous ces troubles ce sont les enfants présentant des valeurs d'hexacarboxyporphyrine élevée qui présentaient également des valeurs élevées d'heptacarboxyporphyrine. Parmi les autres troubles pris en compte, seul le retard mental + épilepsie révélait une augmentation significative des trois porphyrines intermédiaires, tandis que seule la pentacarboxyporphyrine était augmentée de manière significative dans le syndrome de Rett (non présenté).

Résultats de la chélation. 11 enfants autistes (autisme ou autisme + épilepsie) ont suivi un traitement chélateur (DMSA, Méthodologie) dans le but d'éliminer les métaux lourds. Les valeurs de porphyrines ont été comparées avant et après la chélation, et mises en perspective avec celles d'un groupe de contrôle ($n=10$) présentant le même diagnostic et pour lequel l'on disposait d'échantillons prélevés à des intervalles comparables (Fig. 6). Une diminution significative des niveaux de coproporphyrine urinaire (COPRO) a pu être observée pour le groupe ayant suivi une chélation au DMSA ($p=0,02$ malgré la faible taille des échantillons), tandis qu'une augmentation (non significative) des valeurs de COPRO a été enregistrée pour le groupe de contrôle. On a pu également noter une diminution notable tant pour les niveaux de précoproporphyrine (PRECOPRO) que le ratio PRECOPRO/URO pour le groupe traité au DMSA (chute du rapport moyen de 1,63 à 0,71), contrairement à ce qui a pu être observé pour le groupe n'ayant pas suivi de chélation (non représenté).

Une analyse statistique approfondie a confirmé ces résultats. Du fait du lien évident entre les moyennes et les variations de ces mesures, les données ont été exprimées sous forme logarithmique. Il n'est apparu aucun signe de différence entre les variations des groupes sous et sans traitement chélateur ; un test t standard a confirmé une différence significative des ratios de COPRO (échantillon 1:échantillon 2) et de PRECOPRO (1:2) respectifs pour le groupe sous DMSA et le groupe non traité ($p < 0,002$, $p < 0,01$ respectivement).

Discussions

Cette étude porte sur l'élévation des porphyrines urinaires observée dans la majorité des cas au sein d'un grand groupe d'enfants français atteints de troubles autistiques. L'excès de coproporphyrine (COPRO) était statistiquement très significatif ($p < 0,001$) comparé aux résultats d'un groupe de contrôle interne d'enfants présentant des troubles sans rapport avec l'autisme, et d'un deuxième groupe de contrôle externe élargi d'enfants suisses. Contre toute attente, les niveaux de porphyrines des sujets Asperger étaient identiques à ceux du groupe de contrôle, ce qui constituait un point de référence supplémentaire.

L'élévation moyenne de la COPRO chez les sujets autistes (2,6 fois) était comparable à celle (3,2 fois) constatée auprès d'un groupe de dentistes américains soumis à une exposition importante d'Hg (Woods, 1996), ou à celle de villageois chinois chroniquement exposés à l'arsenic (1,9 fois) (Wang et al., 2002).

Nous avons également noté que les niveaux de deux autres marqueurs de l'exposition aux métaux lourds, la précoproporphyrine (PRECOPRO) et la pentacarboxyporphyrine, sont élevés chez les sujets autistes. Bien que cet excès ait pu être constaté dans la majorité des cas, les niveaux de porphyrines n'étaient pas franchement élevés chez tous les enfants. La proportion de sujets présentant une élévation des porphyrines dépendait du paramètre considéré, mais il faut noter que les valeurs constatées pour le groupe atteint de troubles autistiques (autisme et autisme + épilepsie, $n=115$), 53% dépassaient la moyenne + 2 x l'écart type du groupe de contrôle interne pour le rapport PRECOPRO/URO.

L'excès de porphyrines des sujets autistes a été considérablement réduit par le traitement de ces enfants au moyen d'un agent chélateur, le DMSA (acide méso-dimercaptosuccinique), qui élimine les métaux lourds, ce qui laisse supposer un lien de causalité.

Du fait des incidences importantes de cette étude, nous avons soigneusement envisagé des possibilités de confusion. Des réserves ont été émises concernant des résultats

différents obtenus dans d'autres centres (Zuijderhoudt et al., 2003), mais quatre étapes de normalisation ont permis d'exclure sérieusement tous risques d'artefacts techniques inhérents au protocole d'analyse : premièrement, la normalisation de notre équipement à chromatographie liquide haute performances (CLHP) avec des standards purifiés identiques à ceux du groupe de contrôle externe (Minder et al., 1996) ; deuxièmement, une comparaison des résultats avec ceux d'un groupe de contrôle interne (troubles non apparentés et syndrome d'Asperger) dont les échantillons ont été traités sur le même équipement ; troisièmement, l'examen du rapport existant entre la coproporphyrine (COPRO, qui s'élève avec l'exposition aux métaux lourds) et l'uroporphyrine (URO, qui demeure largement inchangée en cas d'exposition) déterminées simultanément lors du même passage sur HPLC ; quatrièmement, l'analyse, également lors du même passage sur HPLC, de la molécule atypique que constitue la précoproporphyrine (PRECOPRO), molécule uniquement observée dans des cas de forte intoxication.

La proportion de sujets présentant des niveaux de porphyrines élevés dépendait du paramètre spécifiquement analysé, mais il faut noter que dans le groupe de sujets autistes (autisme et autisme + épilepsie, n=115) 53 % excédaient la moyenne + 2 x l'écart type du groupe de contrôle interne pour le rapport PRECOPRO/URO.

Des incertitudes demeurent pour les groupes de contrôle. Tout d'abord, le groupe de contrôle interne était limité (n=12) mais si l'on considère le nombre élevé de sujets (257 dont 106 sujets atteints de troubles du spectre autistique), une probabilité statistique élevée ($p < 0,001$) a été obtenue en comparant les deux groupes, compte tenu de la taille du groupe suisse. Ensuite, le groupe de contrôle interne a été revalidé par une comparaison attentive avec les résultats d'un groupe de contrôle externe d'enfants suisses (n=107), avec réanalyse des données de départ correspondantes (Méthodologie). Aucune différence ou tendance significative n'a été observée entre les groupes de contrôle interne et externe, ce qui confirme la validité des données du groupe de contrôle interne. Troisièmement, les valeurs du groupe de contrôle interne ont été confirmées de manière inattendue par le fait qu'elles se sont

avérées identiques à celles du groupe Asperger (n=11) ; ce sous-groupe a donc constitué un point de référence interne supplémentaire.

Malgré leur solidité, les données des groupes de contrôle interne et externe sont susceptibles de minimiser l'excès réel des niveaux de porphyrines des enfants affectés. En effet, les deux groupes de contrôle comprenaient des enfants adressés au cabinet pour des analyses et donc susceptibles de ne pas être représentatifs de la population. Il est donc envisageable que ces enfants aient été également exposés à des facteurs environnementaux. En effet, un excès de porphyrines a été constaté chez certains sujets du groupe de contrôle (Minder et al., 1996), ce qui pourrait minimiser artificiellement l'excès de porphyrines identifiés chez les enfants autistes. La portée de l'élévation des porphyrines est donc susceptible d'être supérieure à celle évoquée dans cette étude. On peut toutefois globalement conclure qu'au moins 53 % des enfants présentant des troubles d'ordre autistique excrètent des porphyrines en excès dans leurs urines.

La précision du diagnostic est également une préoccupation, du fait de la difficulté qu'il y a à appliquer des instruments de diagnostic internationaux (en anglais) aux enfants francophones et à leur famille. Même dans les centres de dépistage internationaux les plus réputés, la précision du diagnostic oscille autour de 90% (Smeeth et al., 2004). Nous n'excluons donc pas le risque d'erreurs de classification de certains de sujets dans les sous-groupes de la cohorte. Il faut toutefois rappeler que l'autisme et l'autisme + épilepsie, caractérisés par un excès de porphyrines, se distinguaient sans aucune équivoque du syndrome d'Asperger, qui ne présentait aucun excès.

La distinction biochimique entre les troubles Asperger et l'autisme met l'accent sur la question de savoir s'il s'agit de pathologies clairement distinctes. La nécessité d'une classification distincte a parfois été remise en question (Mayes et al., 2001 ; Macintosh et al., 2004), tandis les tenants du diagnostic distinct arguaient quant à eux que le syndrome d'Asperger diffère des troubles du spectre autistique sur le plan des tests cognitifs (Ghaziuddin et al., 2004) et de l'imagerie cérébrale (Lotspeich et al., 2004). Une étiologie distincte de l'autisme est cohérente avec la diminution, ces 20 dernières années, de la

proportion du syndrome d'Asperger parmi l'ensemble des cas de troubles du spectre autistiques/TED (MIND Institute, 2002). Nos résultats n'excluent pas toutefois une exposition précoce des sujets Asperger à des périodes clés de leur développement.

Au sein des autres catégories de troubles du spectre autistiques, les enfants présentant un diagnostic de trouble envahissant du développement (TED-NS) ne présentaient qu'une augmentation légère (non-significative) de leurs niveaux de porphyrines, tandis que les deux enfants atteints d'un syndrome de Rett présentaient des valeurs extrêmement élevées. Cette dernière observation est tout particulièrement intéressante pour le syndrome de Rett, généralement considéré comme un désordre génétique affectant la protéine MECP2 se liant à l'ADN méthylé (Amir et al., 1999). Il faut toutefois rappeler que les niveaux de précoproporphyrines étaient également élevés chez les sujets atteints d'un syndrome de Rett, ce qui conduit directement à envisager une exposition aux métaux lourds ; toutefois seulement deux sujets ayant été étudiés, il n'est pas possible d'en déduire s'ils étaient représentatifs du trouble. Nous notons toutefois que les sujets atteints n'étaient pas nécessairement typiquement symptomatiques (Naidu et al., 2003) et que bien que la délétion du chromosome X puisse expliquer en grande partie ces troubles, des facteurs environnementaux pourraient les exacerber.

Nous avons également constaté de légères élévations des porphyrines urinaires chez certains sujets non atteints d'un syndrome autistique. Ces élévations ne présentaient pour la plupart aucune probabilité statistique, à l'exception toutefois de cas d'épilepsie et de retard mental associé à l'épilepsie, tandis que l'insuffisance motrice cérébrale était presque statistiquement significative (et l'était du moins par rapport au groupe de contrôle externe). L'élévation des porphyrines n'était généralement pas significative dans les cas d'hyperactivité, de déficit d'attention, ou de TED-NS, troubles parfois considérés comme communs à ceux de l'autisme (sachant toutefois que la valeur significative était augmentée par rapport au groupe de contrôle externe).

Les excès de porphyrines identifiés pour les cas d'autisme + épilepsie étaient plus élevés que dans les cas d'autisme seul, ceci laissant envisager que cette élévation puisse être

en partie imputable à l'administration d'antiépileptiques. Il faut toutefois noter que deux sujets atteints d'une épilepsie franche sans diagnostic d'autisme, affichaient des taux de précoproporphyrine inférieurs à ceux constatés dans les cas d'autisme ou d'autisme + épilepsie. Les niveaux étant légèrement élevés par rapport à ceux des groupes de contrôle, les antiépileptiques pourraient contribuer pour partie à l'augmentation des porphyrines urinaires dans les cas d'autisme + épilepsie. L'exposition aux métaux lourds pourrait également contribuer à l'épilepsie (en l'absence d'autisme) : les convulsions sont l'un des signes de l'intoxication aux métaux lourds dont le mercure (Brenner et al., 1980 ; Bernard et al., 2001). Toutefois, les médicaments sont peu susceptibles de contribuer à l'élévation des porphyrines chez les sujets autistes ne présentant aucun signe d'activité épileptique. Tout d'abord, aucun des enfants (à l'exception des enfants présentant un terrain d'épilepsie) ne suivait de traitement antiépileptique. Ensuite, l'augmentation de la précoproporphyrine n'a pas été identifiée dans les cas de toxicité chimique, et la baisse des niveaux de porphyrines chez les enfants suivant une chélation évoque plus une exposition aux métaux lourds que toute autre cause.

Parmi les autres variables, il faut citer les régimes et les maladies. Les enfants atteints de troubles du développement sont généralement sous régime (Millward et al., 2004), et certains peuvent en outre présenter des troubles gastro-intestinaux (White, 2003), d'autant plus notables s'ils s'accompagnent d'ulcères qui peuvent, dans de rares cas, être à l'origine d'une augmentation des niveaux de porphyrines (Sieg et al., 1991). Toutefois, l'élévation de la précoproporphyrine évoque plus une toxicité aux métaux lourds que tout autre trouble, et la baisse des niveaux de porphyrines en cours de chélation va à l'encontre d'une théorie d'ordre diététique ou pathologique.

Nos résultats sont conformes au postulat de départ qui était que l'intoxication aux métaux lourds est susceptible de contribuer à la patho-étiologie de l'autisme (Bernard et al., 2001 ; Holmes et al., 2003) sans pour autant identifier l'agent responsable. L'éventail des porphyrines fournit toutefois des indications : une élévation spécifique de la pentacarboxyporphyrine évoque des interférences avec l'uroporphyrine décarboxylase

(UROD) et les réactions adjacentes (Fig. 1). In vitro, le plomb (Pb) ne bloque pas l'UROD tandis que la même enzyme est inhibée par le mercure (Hg) (Woods, 1995) ainsi que certains autres métaux et métalloïdes (Woods et al., 1987 ; Garcia-Vargas et al., 1994).

Malgré les signes évocateurs d'une corrélation, il n'est pas possible de conclure rigoureusement que les métaux lourds sont seuls responsables de l'autisme. Les enfants exposés aux métaux lourds sont susceptibles d'être également exposés à d'autres toxines environnementales telles que les biphényles polychlorés (PCB) qui peuvent également augmenter les niveaux de porphyrines (Marks et al., 1982; Hill, 1985 ; Danie ll et al., 1997) ; les toxiques chimiques peuvent entrer en synergie avec les métaux lourds en termes de type et d'étendue des dommages (Stewart et al., 2003). Toutefois, la précoproporphyrine est un marqueur spécifique de la toxicité des métaux lourds (Woods et al., 1993b ; Gonzalez-Ramirez et al., 1995; Woods, 1995 ; Pingree et al., 2001), et la diminution des porphyrines durant la chélation évoque bel et bien l'intoxication aux métaux lourds.

Les porphyrines urinaires, non seulement marqueurs d'une toxicité, pourraient jouer un rôle complémentaire dans les manifestations comportementales des troubles autistiques. Elles s'accompagnent de taux sanguins élevés tant pour les porphyrines que pour la molécule précurseur, l'acide 5-aminolévulinique (?ALA), (Costa et al., 1997 ; Opler et al., 2004). Ces métabolites ciblent les récepteurs benzodiazépine du cerveau (Brennan et al., 1979 ; Muller et al., 1977; Verma et al., 1987) et sont associées à des troubles neurologiques, l'épilepsie et l'autisme (Ruscito et al., 2003; Gordon, 1999 ; Millward et al., 2001 ; Marion, 1995). L'excès de telles métabolites pourrait participer des perturbations cérébrales et comportementales chez certains sujets atteints d'autisme.

Se pose ensuite la question de savoir si l'éviction des métaux lourds au moyen de la chélation est susceptible d'alléger ces perturbations comportementales. Des améliorations ont été signalées, particulièrement chez les enfants les plus jeunes (Holmes, 2003), sans avoir été pour autant depuis confirmées. A l'avenir, une évaluation systématique des scores comportementaux avant et après chélation sera nécessaire. La chélation comporte également des risques (Markowitz et al., 1990).

En conclusion, l'élévation des porphyrines, marqueur fiable d'intoxication environnementale, est surreprésentée de manière significative au sein d'une cohorte conséquente d'enfants français atteints d'un syndrome autistique. Nous insistons sur le fait que tous les enfants atteints d'autisme ne présentent pas une augmentation des porphyrines urinaires ; néanmoins, ces enfants dans leur majorité excrètent des porphyrines en excès. Cet excès n'est pas strictement l'apanage des enfants autistes, et les analyses de certains sujets présentant des diagnostics autres ont également révélé des niveaux anormaux de porphyrines urinaires. Cette étude étant la première à s'intéresser aux niveaux de porphyrines chez les enfants atteints d'autisme, nos résultats devront être reproduits par une étude indépendante. Toutefois, si l'on considère que la population est globalement de plus en plus exposée aux métaux lourds, dont le mercure (Ozuah et al., 2003 ; UNEP Global Mercury Assessment Working Group, 2003), l'hypothèse d'une augmentation du nombre de cas d'autisme (Blaxill, 2004), ainsi qu'une corrélation statistique entre les émissions de mercure et les taux d'autisme (Palmer et al., 2006), on peut raisonnablement envisager qu'une toxicité environnementale associée à une susceptibilité génétique (Holmes et al., 2003 ; Woods et al., 2005) puisse être de nature à contribuer à la progression des troubles du spectre autistique, sujet évoqué dans d'autres publications (Lathe, 2006). Nous attendons d'autres études.

Remerciements

Nos remerciements vont au Dr Elisabeth Minder (laboratoire de référence pour les porphyrines, SGK/IFCC, Stadtspital Triemli, Zürich, Suisse) qui nous a fourni ses résultats initiaux pour nous permettre de les réanalyser. Nous remercions également Julia Mizrahi et Martine Clair pour leur aide lors du recueil des données. Nous adressons tout particulièrement nos remerciements à Elisabeth Minder, Boyd Haley, John O. Bishop, Marie-Paule Kieny, Ian Reid et David St. Clair pour leurs critiques constructives lors de la relecture du manuscrit. Les auteurs déclarent n'être mûs par aucun intérêt financier.

TABLEAU 1. Cohorte

Affection/diagnostic	M	F	Total	Age moyen (années)	M/F	% total	% du groupe syndrome autistique
Allergies	5	3	8	7,3	1,67	3	
Asperger	10	1	11	10	10	4,1	5,8
Déficit d'attention	2	7	9	9,4	0,29	2,3	
Autisme (troubles autistiques)	79	27	106	6,4	2,9	39	55,5
Autisme + épilepsie	7	2	9	9,3	3,5	3,3	4,7
Insuffisance motrice cérébrale	6	6	12	8,3	1	4,4	
Epilepsie	2	0	2	10	na	0,7	
Hyperactivité	27	2	29	9,1	13,5	10,7	
Retard mental + épilepsie	1	1	2	6	1	0,7	
TED-NS	51	12	63	6,6	4,3	23,4	33
Retard psychomoteur	1	3	4	7,3	0,33	1,5	
Rett	0	2	2	2,5	0	0,7	1
Groupe de contrôle	7	5	12	10,3	1,4	4,4	
TOTAL	198	71	269	7,4	2,8		

Syndrome autistique =
71% de la cohorte
(M/F = 3,34)

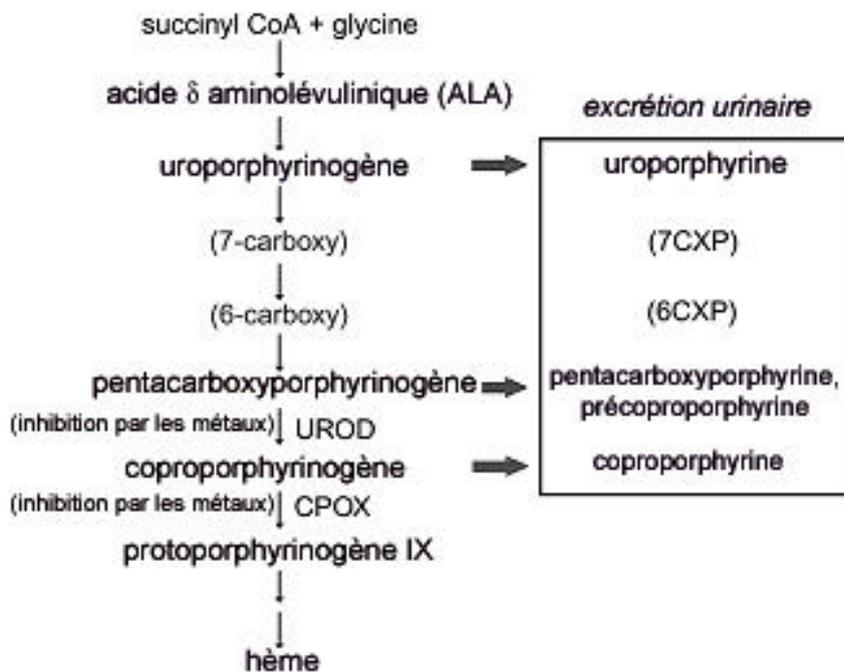


Fig. 1. Voie de synthèse de l'hème, présence de métabolites urinaires majeures, et inhibition par les métaux lourds. Les porphyrinogènes apparaissent dans les urines sous forme de dérivés porphyriques (à droite) : la pentacarboxiporphyrine, la précoproporphyrine et la coproporphyrine sont des indicateurs de l'inhibition de l'UROD (uroporphyrinogène décarboxylase) et/ou de la CPOX (coproporphyrinogène oxydase) ; l'uroporphyrine urinaire n'est pas connue pour altérer les étapes enzymatiques 7carboxy et 6-carboxy, 7CXP et 6CXP , hepta- et hexa-carboxyporphyrinogènes et -carboxyporphyrines respectivement.

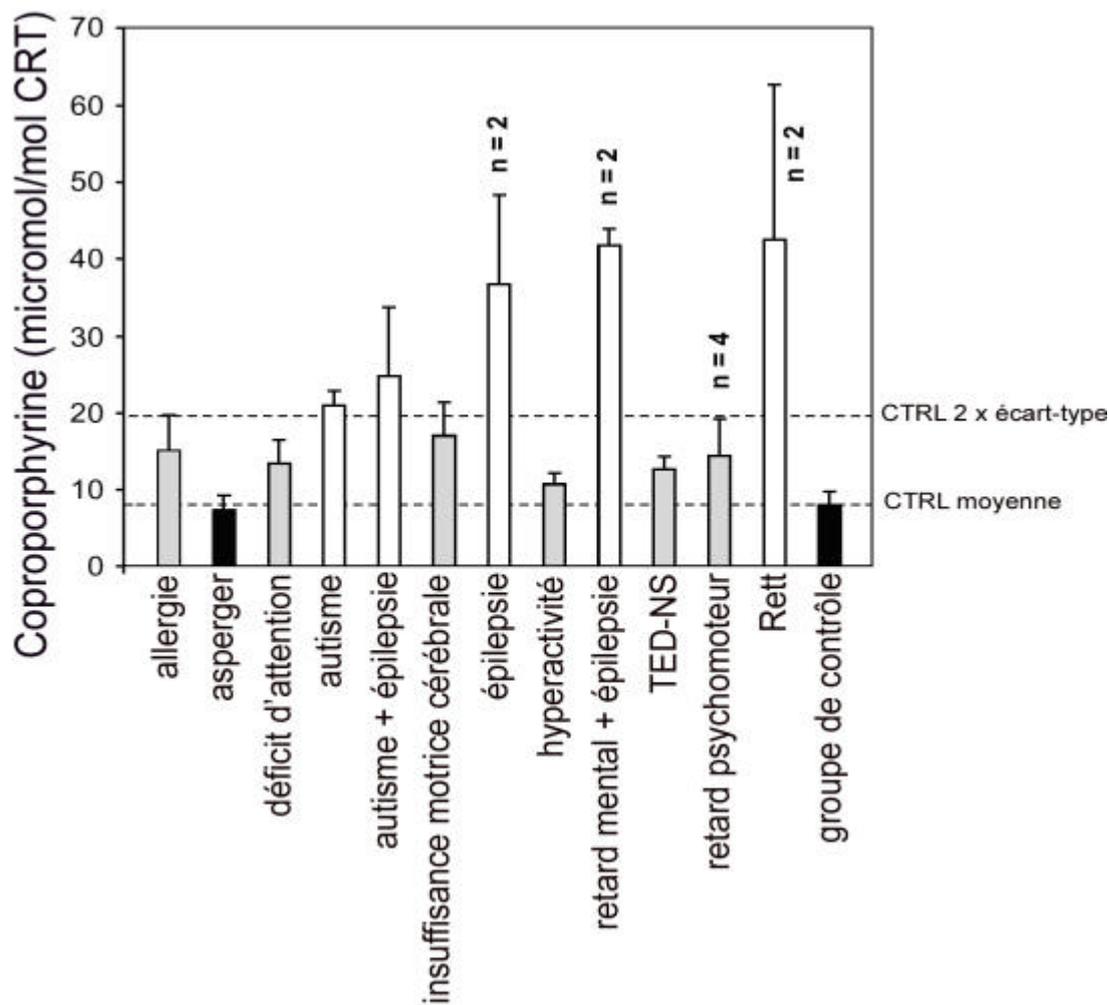


Fig. 2. Niveaux de coproporphyrines observés dans les urines d'enfants affectés de troubles du développement et associés (voir le Tableau 1 pour plus de précisions) ; le groupe de contrôle était composé d'enfants atteints de troubles sans rapport avec ceux étudiés. La marge d'erreur correspond aux écarts types de la moyenne. Les traits horizontaux en pointillés représentent la moyenne du groupe de contrôle (CTRL) ainsi que la moyenne plus 2 x l'écart type (ET). Les valeurs N correspondent aux groupes composés de moins de 8 sujets. RM, retard mental ; TED-NS, trouble envahissant du développement non spécifié.

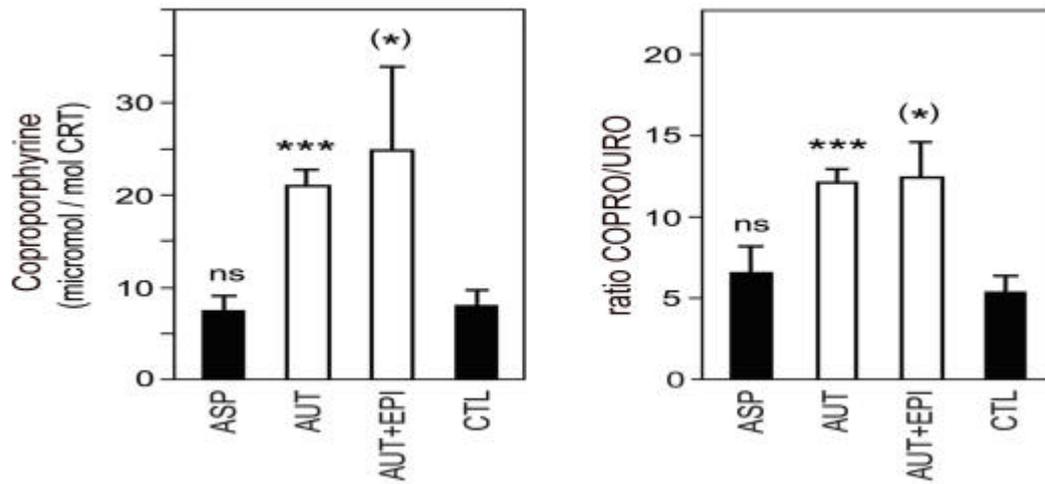


Fig. 3. Les niveaux de coproporphyrines urinaires élevés (COPRO) relevés chez les sujets atteints d'un trouble du spectre autistique sont exprimés sous la forme de valeurs absolues normalisées en fonction de la créatinine (à gauche) ou sous forme de ratio interne avec l'uroporphyrine (URO), déterminé par le même tracé HPLC (à droite). Les valeurs indiquées sont des moyennes +/- SEM (écart-type moyen). ASP : syndrome d'Asperger ; AUT : autisme ; AUT+EPI : autisme + épilepsie ; CTL : groupe de contrôle interne. La probabilité statistique des différences par rapport au groupe de contrôle était ***, p<0,001 ; *, p<0,1 ; ns, non significatif.

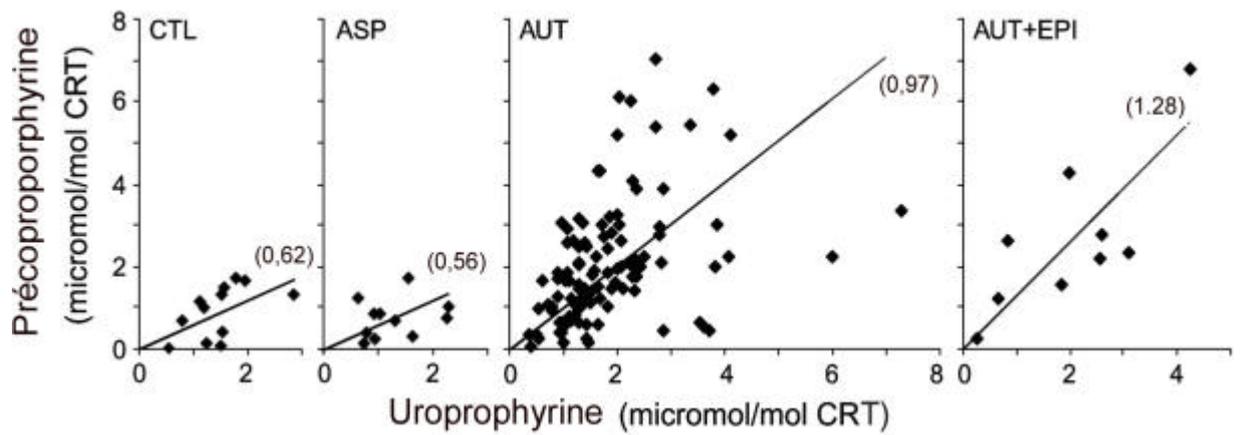


Fig. 4. Les niveaux de précoporphyrine, marqueur d'intoxication aux métaux lourds, tracés par rapport aux valeurs d'uroporphyrine de base ; ce ratio est indépendant de l'évolution de la créatinine de référence selon l'âge. Les groupes étaient CTL : groupe de contrôle ; ASP : syndrome d'Asperger ; AUT : autisme (à deux exceptions près, voir la section Méthodologie) ; AUT+EPI : autisme avec épilepsie associée. Les valeurs entre parenthèses correspondent au taux de régression linéaire (ajustée au plus près).

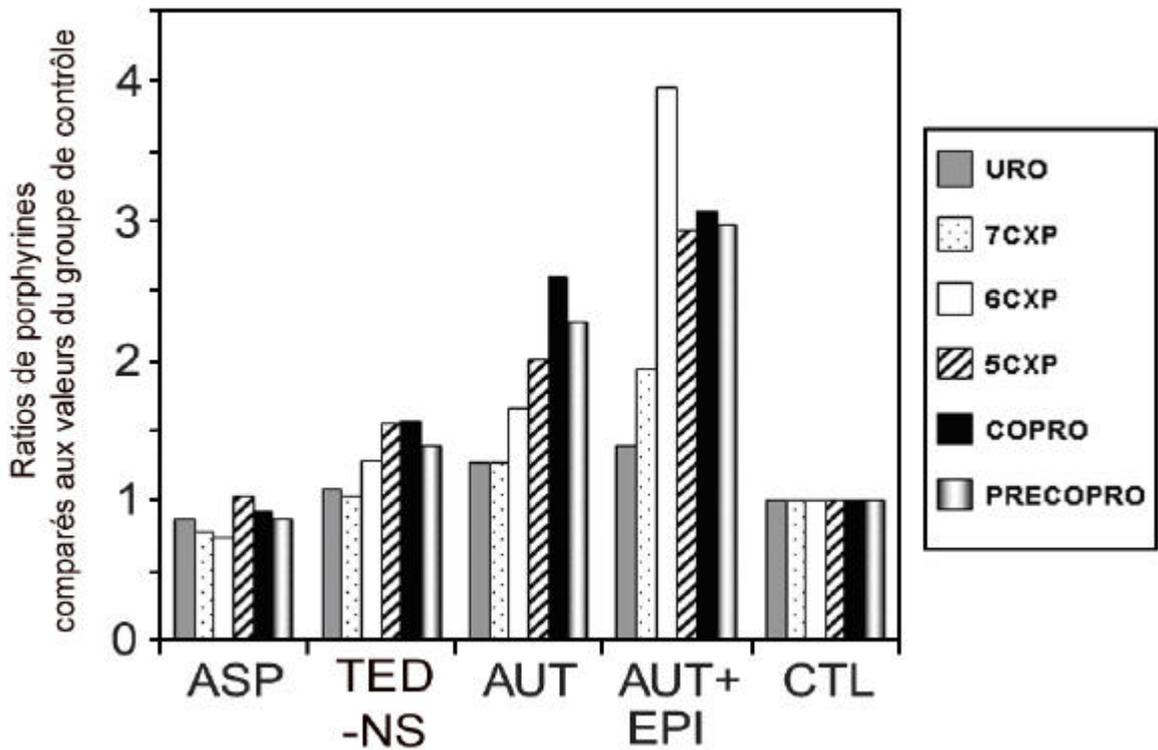


Fig. 5. Différents excès de porphyrines (normalisés par rapport à la créatinine), exprimés sous forme de rapport des valeurs du groupe de contrôle (CTL) pour les différentes catégories de porphyrines - uroporphyrine (URO), hepta-, hexa- et pentacarboxyporphyrine (7-, 6-, 5CXP), coproporphyrine (COPRO) et précoproporphyrine (PRECOPRO) dans des contextes différents - pour les différents sous-groupes : ASP (syndrome d'Asperger), TED-NS (trouble envahissant du développement non spécifique), AUT (autisme), AUT+EPI (autisme + épilepsie).

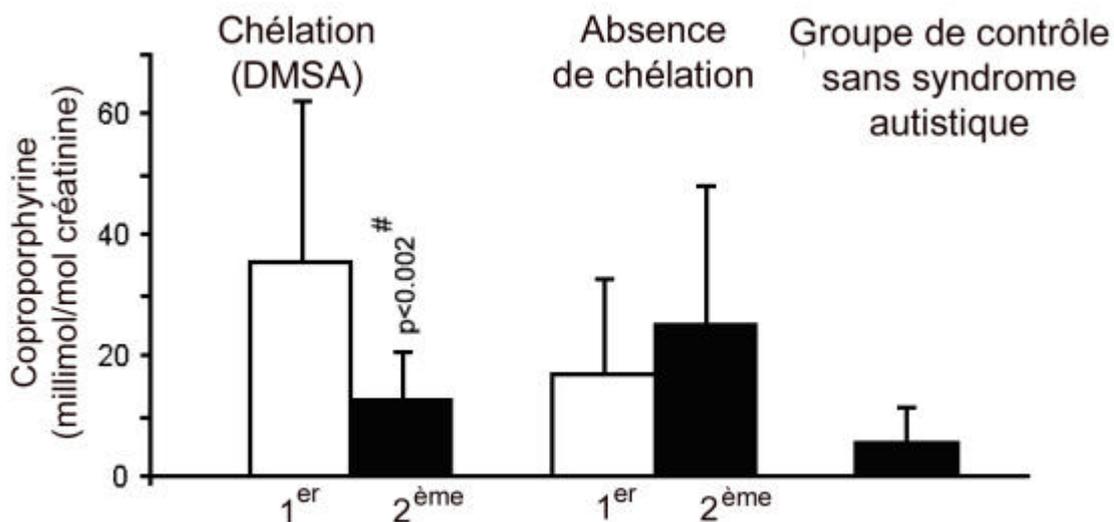


Fig. 6. Diminution des coproporphyrines par la chélation au DMSA. Des enfants présentant un diagnostic d'autisme ou d'autisme + épilepsie (n=11, moyenne d'âge 8,7 ans pour le second échantillon) et un excès évident de porphyrines ont été traités, à la demande de leurs parents (DMSA oral, voir la section Méthodologie), et leurs urines ont été comparées avant et après la chélation (intervalle moyen entre échantillons, 18,6 mois). Le groupe de contrôle non-sélectionné (n=10, moyenne d'âge 8,6 ans pour le deuxième échantillon), représentait l'ensemble des enfants présentant le même diagnostic et pour lesquels deux échantillons d'urines avaient été prélevés indépendamment l'un de l'autre à plus de 6mois d'intervalle (intervalle moyen entre échantillons, 13,8 mois). La barre de référence (groupe de contrôle sans syndrome autistique) constituait le groupe de contrôle interne. Les valeurs correspondent à des moyennes avec un écart-type +/- afin de mettre en évidence les variations. La chute des niveaux de coproporphyrines à la suite du traitement au DMSA (#) était significative d'un point de vue statistique.

Bibliographie

- Accardo, P., Whitman, B., Caul, J., Rolfe, U. 1988. Autism and plumbism. A possible association. *Clin.Pediatr.(Phila)* 27, 41-44.
- American Psychiatric Association 1994. Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders (DSM-IV). Washington.
- Amir, R.E., Van den Veyver, I.B., Wan, M., Tran, C.Q., Francke, U., Zoghbi, H.Y. 1999. Rett syndrome is caused by mutations in X-linked MECP2, encoding methyl-CpG-binding protein 2. *Nat.Genet.* 23, 185-188.
- Aposhian, H.V., Aposhian, M.M. 1990. meso-2,3-Dimercaptosuccinic acid: chemical, pharmacological and toxicological properties of an orally effective metal chelating agent. *Annu.Rev.Pharmacol.Toxicol.* 30, 279-306.
- Barbarese, W.J., Katusic, S.K., Colligan, R.C., Weaver, A.L., Jacobsen, S.J. 2005. The incidence of autism in Olmsted County, Minnesota, 1976-1997: results from a population-based study. *Arch.Pediatr.Adolesc.Med.* 159, 37-44.
- Bernard, S., Enayati, A., Redwood, L., Roger, H., Binstock, T. 2001. Autism: a novel form of mercury poisoning. *Med.Hypotheses* 56, 462-471.
- Blaxill, M.F. 2004. What's going on? The question of time trends in autism. *Publ.Health Repts.* 119, 536-551.
- Bloom, K.E., Zaider, E.F., Morledge, L.J., Poh-Fitzpatrick, M.B. 1991. Urinary porphyrin excretion in normal children and adults. *Am.J.Kidney Dis.* 18, 483-489.
- Bowers, M.A., Aicher, L.D., Davis, H.A., Woods, J.S. 1992. Quantitative determination of porphyrins in rat and human urine and evaluation of urinary porphyrin profiles during mercury and lead exposures. *J.Lab Clin.Med.* 120, 272-281.
- Bradstreet, J. 2003. A case control study of mercury burden in children with autistic spectrum disorders. *J.Am.Phys.Surg.* 8, 76-79.
- Brennan, M.J., Cantrill, R.C. 1979. The effect of delta-aminolaevulinic acid on the uptake and efflux of [3H]GABA in rat brain synaptosomes. *J.Neurochem.* 32, 1781-1786.
- Brenner, R.P., Snyder, R.D. 1980. Late EEG findings and clinical status after organic mercury poisoning. *Arch.Neurol.* 37, 282-284.
- Brewster, M.A. 1988. Biomarkers of xenobiotic exposures. *Ann.Clin.Lab Sci.* 18, 306-317.
- California Department of Human Developmental Services 2003. Autistic spectrum disorders, changes in the California caseload; an Update: 1999 through 2002. California Health

- and Human Services Agency, Sacramento, CA; online at <http://www.dds.cahwnet.gov/autism/pdf/AutismReport2003.pdf>.
- Cohen, D.J., Paul, R., Anderson, G.M., Harcherik, D.F. 1982. Blood lead in autistic children. *Lancet* 2, 94-95.
- Costa, C.A., Trivelato, G.C., Pinto, A.M., Bechara, E.J. 1997. Correlation between plasma 5-aminolevulinic acid concentrations and indicators of oxidative stress in lead-exposed workers. *Clin.Chem.* 43, 1196-1202.
- Croen, L.A., Grether, J.K., Hoogstrate, J., Selvin, S. 2002. The changing prevalence of autism in California. *J.Autism Dev.Disord.* 32, 207-215.
- Daniell, W.E., Stockbridge, H.L., Labbe, R.F., Woods, J.S., Anderson, K.E., Bissell, D.M., Bloomer, J.R., Ellefson, R.D., Moore, M.R., Pierach, C.A., Schreiber, W.E., Tefferi, A., Franklin, G.M. 1997. Environmental chemical exposures and disturbances of heme synthesis. *Environ.Health Perspect.* 105 Suppl 1, 37-53.
- Deb, S., Prasad, K.B. 1994. The prevalence of autistic disorder among children with a learning disability. *Br.J.Psychiatry* 165, 395-399.
- Fido, A., Al Saad, S. 2005. Toxic trace elements in the hair of children with autism. *Autism* 9, 290-298.
- Flora, S.J., Pande, M., Mehta, A. 2003. Beneficial effect of combined administration of some naturally occurring antioxidants (vitamins) and thiol chelators in the treatment of chronic lead intoxication. *Chem.Biol.Interact.* 145, 267-280.
- Flora, S.J., Tandon, S.K. 1990. Beneficial effects of zinc supplementation during chelation treatment of lead intoxication in rats. *Toxicology* 64, 129-139.
- Garcia-Vargas, G.G., Del Razo, L.M., Cebrian, M.E., Albores, A., Ostrosky-Wegman, P., Montero, R., Gonshebbat, M.E., Lim, C.K., De Matteis, F. 1994. Altered urinary porphyrin excretion in a human population chronically exposed to arsenic in Mexico. *Hum.Exp.Toxicol.* 13, 839-847.
- Ghaziuddin, M., Mountain-Kimchi, K. 2004. Defining the intellectual profile of Asperger Syndrome: comparison with high-functioning autism. *J.Autism Dev.Disord.* 34, 279-284.
- Gillberg, C., Coleman, M. 2000. *The Biology of the Autistic Syndromes*. MacKeith-Cambridge University Press, Cambridge.
- Gonzalez-Ramirez, D., Maiorino, R.M., Zuniga-Charles, M., Xu, Z., Hurlbut, K.M., Junco-Munoz, P., Aposhian, M.M., Dart, R.C., Diaz Gama, J.H., Echeverria, D. 1995. Sodium 2,3-dimercaptopropane-1-sulfonate challenge test for mercury in humans: II. Urinary mercury, porphyrins and neurobehavioral changes of dental workers in Monterrey, Mexico. *J.Pharmacol.Exp.Ther.* 272, 264-274.
- Gordon, N. 1999. The acute porphyrias. *Brain Dev.* 21, 373-377.

- Gross, U., Hoffmann, G.F., Doss, M.O. 2000. Erythropoietic and hepatic porphyrias. *J.Inherit.Metab Dis.* 23, 641-661.
- Heyer, N.J., Bittner, A.C., Jr., Echeverria, D., Woods, J.S. 2006. A cascade analysis of the interaction of mercury and coproporphyrinogen oxidase (CPOX) polymorphism on the heme biosynthetic pathway and porphyrin production. *Toxicol.Lett.* 161, 159-166.
- Hill, R.H. 1985. Effects of polyhalogenated aromatic compounds on porphyrin metabolism. *Environ.Health Perspect.* 60, 139-143.
- Holmes, A.S. 2003. Chelation of Mercury for the Treatment of Autism. <http://www.healing-arts.org/children/holmes.htm>.
- Holmes, A.S., Blaxill, M.F., Haley, B.E. 2003. Reduced levels of mercury in first baby haircuts of autistic children. *Int.J.Toxicol.* 22, 277-285.
- Hu, L.-W., Bernard, J.A., Che, J. 2003. Neutron activation analysis of hair samples for the identification of autism. *Trans.Am.Nuclear Soc.* 89, 16-20.
- Lathe, R. 2006. *Autism, Brain and Environment*. Jessica Kingsley Publishers, London.
- Lidsky, T.I., Schneider, J.S. 2005. Autism and autistic symptoms associated with childhood lead poisoning. *J.Appl.Res.* 5, 80-87.
- Lonsdale, D., Shamberger, R.J., Audhya, T. 2002. Treatment of autism spectrum children with thiamine tetrahydrofurfuryl disulfide: a pilot study. *Neuro.Endocrinol.Lett.* 23, 303-308.
- Lord, C., Rutter, M., Le Couteur, A. 1994. Autism Diagnostic Interview-Revised: a revised version of a diagnostic interview for caregivers of individuals with possible pervasive developmental disorders. *J.Autism Dev.Disord.* 24, 659-685.
- Lotspeich, L.J., Kwon, H., Schumann, C.M., Fryer, S.L., Goodlin-Jones, B.L., Buonocore, M.H., Lammers, C.R., Amaral, D.G., Reiss, A.L. 2004. Investigation of neuroanatomical differences between autism and Asperger syndrome. *Arch.Gen.Psychiatry* 61, 291-298.
- Macintosh, K.E., Dissanayake, C. 2004. Annotation: The similarities and differences between autistic disorder and Asperger's disorder: a review of the empirical evidence. *J.Child Psychol.Psychiatry* 45, 421-434.
- Marion, R. 1995. The girl who mewed: acute intermittent porphyria. *Discover* 16, 38-40.
- Markowitz, M.E., Rosen, J.F. 1991. Need for the lead mobilization test in children with lead poisoning. *J.Pediatr.* 119, 305-310.
- Markowitz, M.E., Weinberger, H.L. 1990. Immobilization-related lead toxicity in previously lead-poisoned children. *Pediatrics* 86, 455-457.
- Marks, G.S., Zelt, D.T., Cole, S.P. 1982. Alterations in the heme biosynthetic pathway as an index of exposure to toxins. *Can.J.Physiol Pharmacol.* 60, 1017-1026.

- Mayes, S.D., Calhoun, S.L., Crites, D.L. 2001. Does DSM-IV Asperger's disorder exist? *J.Abnorm.Child Psychol.* 29, 263-271.
- Mercury detoxification consensus group 2001. Detoxification position paper. Autism Research Institute, San Diego, CA.
- Millward, C., Ferriter, M., Calver, S., Connell-Jones, G. 2004. Gluten- and casein-free diets for autistic spectrum disorder. *Cochrane.Database.Syst.Rev.* CD003498.
- Millward, L.M., Kelly, P., Deacon, A., Senior, V., Peters, T.J. 2001. Self-rated psychosocial consequences and quality of life in the acute porphyrias. *J.Inherit.Metab Dis.* 24, 733-747.
- MIND Institute 2002. Report to the legislature on the principal findings from the epidemiology of autism in California: A comprehensive pilot study.
http://www.dds.cahwnet.gov/autism/pdf/study_final.pdf.
- Minder, E.I., Schneider-Yin, X. 1996. Age-dependent reference values of urinary porphyrins in children. *Eur.J.Clin.Chem.Clin.Biochem.* 34, 439-443.
- Muller, W.E., Snyder, S.H. 1977. delta-Aminolevulinic acid: influences on synaptic GABA receptor binding may explain CNS symptoms of porphyria. *Ann.Neurol.* 2, 340-342.
- Naidu, S., Bibat, G., Kratz, L., Kelley, R.I., Pevsner, J., Hoffman, E., Cuffari, C., Rohde, C., Blue, M.E., Johnston, M.V. 2003. Clinical variability in Rett syndrome. *J.Child Neurol.* 18, 662-668.
- Opler, M.G., Brown, A.S., Graziano, J., Desai, M., Zheng, W., Schaefer, C., Factor-Litvak, P., Susser, E.S. 2004. Prenatal lead exposure, delta-aminolevulinic acid, and schizophrenia. *Environ.Health Perspect.* 112, 548-552.
- Ozuah, P.O., Lesser, M.S., Woods, J.S., Choi, H., Markowitz, M. 2003. Mercury exposure in an urban pediatric population. *Ambul.Pediatr.* 3, 24-26.
- Palmer, R.F., Blanchard, S., Stein, Z., Mandell, D., Miller, C. 2006. Environmental mercury release, special education rates, and autism disorder: an ecological study of Texas. *Health Place* 12, 203-209.
- Pingree, S.D., Simmonds, P.L., Rummel, K.T., Woods, J.S. 2001. Quantitative evaluation of urinary porphyrins as a measure of kidney mercury content and mercury body burden during prolonged methylmercury exposure in rats. *Toxicol.Sci.* 61, 234-240.
- Remer, T., Neubert, A., Maser-Gluth, C. 2002. Anthropometry-based reference values for 24-h urinary creatinine excretion during growth and their use in endocrine and nutritional research. *Am.J.Clin.Nutr.* 75, 561-569.
- Rosen, J.F., Markowitz, M.E. 1993. Trends in the management of childhood lead poisonings. *Neurotoxicology* 14, 211-217.
- Ruscito, B.J., Harrison, N.L. 2003. Hemoglobin metabolites mimic benzodiazepines and are possible mediators of hepatic encephalopathy. *Blood* 102, 1525-1528.

- Rutter, M. 2005. Incidence of autism spectrum disorders: changes over time and their meaning. *Acta Paediatr.* 94, 2-15.
- Sarkany, R.P. 1999. Porphyrin. From Sir Walter Raleigh to molecular biology. *Adv.Exp.Med.Biol.* 455, 235-241.
- Shannon, M., Graef, J.W. 1996. Lead intoxication in children with pervasive developmental disorders. *J Toxicol Clin Toxicol* 34, 177-181.
- Sieg, I., Beckh, K., Kersten, U., Doss, M.O. 1991. Manifestation of acute intermittent porphyria in patients with chronic inflammatory bowel disease. *Z.Gastroenterol.* 29, 602-605.
- Skinner, A.M., Addison, G.M., Price, D.A. 1996. Changes in the urinary excretion of creatinine, albumin and N-acetyl-beta-D-glucosaminidase with increasing age and maturity in healthy schoolchildren. *Eur.J.Pediatr.* 155, 596-602.
- Smeeth, L., Cook, C., Fombonne, E., Heavey, L., Rodrigues, L.C., Smith, P.G., Hall, A.J. 2004. Rate of first recorded diagnosis of autism and other pervasive developmental disorders in United Kingdom general practice, 1988 to 2001. *BMC Medicine* 2, <http://www.biomedcentral.com/1741-7015/2/39>.
- Stewart, P.W., Reihman, J., Lonky, E.I., Darvill, T.J., Pagano, J. 2003. Cognitive development in preschool children prenatally exposed to PCBs and MeHg. *Neurotoxicol.Teratol.* 25, 11-22.
- UNEP Global Mercury Assessment Working Group 2003. Global Mercury Assessment. United Nations Environment Program, Geneva.
- Verma, A., Nye, J.S., Snyder, S.H. 1987. Porphyrins are endogenous ligands for the mitochondrial (peripheral-type) benzodiazepine receptor. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 84, 2256-2260.
- Wang, J.P., Qi, L., Zheng, B., Liu, F., Moore, M.R., Ng, J.C. 2002. Porphyrins as early biomarkers for arsenic exposure in animals and humans. *Cell Mol.Biol.(Noisy-le-grand)* 48, 835-843.
- White, J.F. 2003. Intestinal pathophysiology in autism. *Exp.Biol.Med.(Maywood.)* 228, 639-649.
- WHO 1992. The ICD-10 Classification of Mental and Behavioural Disorders. World Health Organization, Geneva.
- Williams, J.G., Higgins, J.P., Brayne, C.E. 2006. Systematic review of prevalence studies of autism spectrum disorders. *Arch.Dis.Child* 91, 8-15.
- Wing, L. 1996. Autistic spectrum disorders. *Brit.Med.J.* 312, 327-328.
- Woods, J.S. 1995. Porphyrin metabolism as indicator of metal exposure and toxicity. In *Handbook of Experimental Pharmacology*, Vol. 115 (R. A. Goyer, and M. G. Cherian, Eds.), pp. 19-52. Springer-Verlag, Berlin.

- Woods, J.S. 1996. Altered porphyrin metabolism as a biomarker of mercury exposure and toxicity. *Can.J.Physiol Pharmacol.* 74, 210-215.
- Woods, J.S., Echeverria, D., Heyer, N.J., Simmonds, P.L., Wilkerson, J., Farin, F.M. 2005. The association between genetic polymorphisms of coproporphyrinogen oxidase and an atypical porphyrinogenic response to mercury exposure in humans. *Toxicol.Appl.Pharmacol.* 206, 113-120.
- Woods, J.S., Fowler, B.A. 1987. Metal alteration of uroporphyrinogen decarboxylase and coproporphyrinogen oxidase. *Ann.N.Y.Acad.Sci.* 514, 55-64.
- Woods, J.S., Kardish, R.M. 1983. Developmental aspects of hepatic heme biosynthetic capability and hematotoxicity-II. Studies on uroporphyrinogen decarboxylase. *Biochem.Pharmacol.* 32, 73-78.
- Woods, J.S., Martin, M.D., Naleway, C.A., Echeverria, D. 1993a. Urinary porphyrin profiles as a biomarker of mercury exposure: studies on dentists with occupational exposure to mercury vapor. *J.Toxicol.Environ.Health* 40, 235-246.
- Woods, J.S., Miller, H.D. 1993b. Quantitative measurement of porphyrins in biological tissues and evaluation of tissue porphyrins during toxicant exposures. *Fundam.Appl.Toxicol.* 21, 291-297.
- Zuijderhoudt, F.M., Weykamp, C.W., Willems, H.L. 2003. Measurement of urinary porphyrins and porphyrin precursors in Dutch hospital laboratories: a review of quality control over 5 years. *Ann.Clin.Biochem.* 40, 417-418.

Traduit par é.t.i.c