



## Article Original: Toxicologie

# Niveaux des métaux lourds et des oligoéléments dans des échantillons de cheveux d'enfants autistes : une étude cas-témoins

Zebbiche Y.<sup>1,2</sup>, Boughazi H.<sup>2</sup>, Bencherif M.<sup>2</sup>, Aries S.<sup>1</sup>, Amziane. A.<sup>1,2</sup>, Djidjik R.<sup>2,3</sup>, Hadjadj. Aoul F. Z.<sup>1,2</sup>, Alamir B.<sup>1,2</sup>

1 Centre National de Toxicologie

2 Faculté de médecine, département de pharmacie d'Alger

3 Laboratoire d'immunologie CHU Beni Messous Alger

### Résumé

La prévalence de l'autisme est en pleine flambée ces dernières décennies, ceci pourrait être dû à une exposition plus importante à la pollution environnementale et donc une exposition plus importante aux métaux. Ces dernières années, il a été suggéré que les enfants autistes étaient de mauvais excréteurs et donc éliminaient de manière moindre les métaux dans leurs cheveux « théorie des mauvais excréteurs ».

Le but de ce travail est de comparer la concentration de métaux et de métalloïdes (toxiques et essentiels) dans les cheveux des enfants autistes et non autistes. Les concentrations d'arsenic, de cadmium, de chrome, de sélénium et de cuivre ont été mesurées par ICP-MS dans un échantillon de cheveux de 30 enfants autistes âgés de 3 à 9 ans et comparés à un groupe témoin

Après comparaison des résultats des deux groupes, des concentrations moindres des métaux toxiques Pb, Cd et Cr ont été retrouvées dans les cheveux des enfants autistes. Les différences étaient statistiquement significatives ; le plomb ( $p=0.010$ ), le cadmium ( $p=0.064$ ) et le chrome ( $p=0.016$ ), l'arsenic était quant à lui plus élevé chez les autistes mais cette fois-ci la différence n'était pas significative ( $p=0.725$ ). Des concentrations plus importantes en oligoéléments ont été retrouvées dans les cheveux des enfants autistes pour le sélénium ( $p=0.010$ ) et le cuivre ( $p=0.033$ ) toutes deux statistiquement significatives.

**Mots clés :** TSA, Autisme, Environnement, Métaux, Oligoélément, Cheveux, ICP-MS

### Levels of Heavy Metals and Essential Minerals in Hair Samples of Children with Autism: a Case-Control Study. Abstract

Reported rates of autism have increased sharply all over the world, one possible factor underlying these increases is a higher exposure to environmental pollution therefore a higher exposure to metals. In recent years, it has been theorized that children with autism may be poor detoxifiers compared to normally developing children. The theory is sometimes referred to as the "poor excretors theory."

The aim of this work is to compare the concentration of metals and metalloids (toxic and essentials) in the hair of autistic and non autistic children. Arsenic, Cadmium, Chromium, Selenium and Copper concentrations were measured by ICP-MS in hair sample of 30 autistic children, aged 3 to 9 years, and compared to a control group.

By comparing hair concentration of autistic vs non-autistic children, lower hair concentrations were found among the autistic children for the following toxic metals lead ( $p=0.010$ ), cadmium ( $p=0.044$ ) and chromium ( $p=0.016$ ) the differences were statistically significant. The difference was not statistically significant for the arsenic ( $p=0.725$ ) and the concentrations were higher in the autistic children's hair. Higher hair concentrations of the essential minerals selenium ( $p=0.010$ ) and copper ( $p=0.033$ ) were found, the differences were both statistically significant.

**Key words:** ASD, Autism, Environment, Metals, Essential elements, Hair, ICP-MS.

### I. INTRODUCTION

L'autisme est un trouble du développement caractérisé par un défaut qualitatif de communication et d'interaction sociale chez l'enfant. Son étiologie multifactorielle reste à élucider, il a été suggéré que les facteurs génétiques et environnementaux joueraient un rôle dans la survenue des *Troubles de Spectre Autistique (TSA)* qui apparaissent chez l'enfant entre la période prénatale et la petite enfance (<2ans). Un intérêt particulier a été porté au facteur environnemental ces dernières années du fait de l'augmentation grandissante des chiffres de l'autisme à travers le monde, une augmentation qui préoccupe les autorités de santé. (Langlois, 2015) Il est connu que l'exposition aux métaux lourds cause des effets toxiques même à faibles doses, sur plusieurs systèmes biologiques y compris les systèmes neurobiologiques et enzymatiques

générant un stress oxydatif cellulaire à long terme qui peut conduire vers un défaut de communication cellulaire et même à l'apoptose. De leur part les oligoéléments jouent un rôle protecteur contre le stress oxydatif et interviennent dans les réactions enzymatiques et hormonales. (Klaassen, 2008). Plusieurs hypothèses suggèrent que le taux des métaux toxiques dans les cheveux des enfants autistes est plus élevé et qu'il reflète directement le taux d'imprégnation de l'organisme en ces éléments. D'autres se basent sur « la théorie des mauvais excréteurs » et suggèrent que les cheveux sont un milieu d'élimination des métaux et que les taux sont plus faibles chez les enfants autistes. Les questions qui se posent sont les suivantes : est ce qu'il existe un lien entre les concentrations des métaux lourds et des oligoéléments dans l'organisme des enfants et le développement des TSA ? L'objectif principal de cette étude et de comparer la concentration des métaux et métalloïdes (toxiques et essentiels) dans les cheveux d'enfants autistes et d'enfants témoins.

## II. MATERIEL ET METHODES :

### 1. Population

Il s'agit d'une étude cas-témoins menée au niveau de l'hôpital psychiatrique « Mahfoud Boucebci » à Cheraga dans la Wilaya d'Alger sur un échantillon de 30 enfants (âgés de 2 à 9 ans) diagnostiqués de TSA, selon les critères du DSM-IV et qui procédait une longueur suffisante de cheveux (>5 mm) avec une bonne hydratation. Les enfants étaient suivis à l'hôpital du jour ou reçus pour une consultation de routine, recrutés entre le mois de mai et juillet 2017. Des volontaires sains de tout trouble du développement (âgés de 3 à 10 ans) ont été recrutés sur la même période et prélevés par le même personnel constituent la population des témoins. Les enfants portant des amalgames dentaires, subissant un traitement chélateur ou présentant un handicap physique n'étaient pas inclus dans cette étude. Les tuteurs des enfants ont, tous, signé un consentement éclairé en deux versions : arabe et française, précisant les conditions du déroulement de l'étude, son intérêt et le caractère strictement anonyme des résultats.

### 2. Questionnaire

Les données relatives à la population de l'étude ont été collectées en utilisant un questionnaire. Les questions, posées au tuteur de chaque enfant (autiste et témoin), ont pris en considération les variables suivantes : âge, sexe, poids, taille, degré d'exposition des enfants aux métaux en fonction de la zone d'habitat (zone industrielle, urbaine, rurale...), de l'état de la maison (peinture, tuyauterie...), ainsi que des habitudes de l'enfant et ceux de la maman pendant sa grossesse (médicaments et suppléments minéraux, consommation d'eau, consommation de poissons, de produits en conserve...).

### 3. Analyse des métaux dans les cheveux

#### 3.1 Prélèvements des cheveux :

Les prélèvements ont été effectués au service de psychiatrie infanto-juvénile de l'hôpital psychiatrique de Cheraga et au service d'immunologie du CHU « Isaad Hassani » à Beni Messous. Les recommandations de la *Society of Hair Testing (SoHT)* ont été suivies lors du prélèvement des cheveux, qui s'est fait au niveau de la région du vortex postérieur de la tête des enfants, le plus près du cuire chevelu. Des ciseaux en acier inoxydable ont servi au recueil des cheveux qui ont été mis dans des enveloppes en papier transportés et conservés dans les mêmes conditions au Centre National de Toxicologie d'Alger (CNT) où l'analyse a eu lieu.

#### 3.2 Prétraitement

Les cheveux ont été décontaminés selon le procédé décrit par *Goullé et al* en faisant passer les cheveux dans trois bains successifs, deux à l'acétone et un à l'eau tiède distillée. L'acétone (Biochem Chemopharma® - Québec - Canada) a servi pour le premier bain d'une durée de 5 min suivi d'un bain d'eau distillée (ELGA®) maintenue à 38°C par une plaque chauffante pendant 5 min et enfin un dernier bain d'acétone de 5 min. Le séchage des cheveux a été fait dans une étuve XHT-686 (Binder® - Allemagne) pendant 1h à 80°C. Les cheveux ont été broyés par un broyeur type MM 200 Retsch® (Haan - Allemagne). Le broyat de cheveux obtenu a été pesé et conservé dans des tubes en polystyrène à température



ambiante. La prise d'essai pour l'analyse a été de 25 mg de poudre de cheveux. Cette quantité a été minéralisée à l'aide de 250 $\mu$ L d'acide nitrique à 65% (Panreac Quimica® ; Barcelone – Espagne) dans une l'étuve XHT-686 (Binder® - Allemagne) pendant 90 min à 85°C (après ajout des étalons internes à raison de 10 ppm chacun). Une dilution finale a été réalisée au 40° avec une eau distillée ( Milli-Q Advantage A10®).

### 3.3 Appareillage

Le dosage des métaux a été effectué par une ICP-MS Perkin Elmer Nexion 300-X®, dotée d'une torche à plasma couplée à un spectromètre de masse. L'appareil est équipé d'une torche en quartz, d'un nébuliseur concentrique en verre borosilicaté de 1 ml, d'une chambre de nébulisation en quartz munie d'un refroidisseur qui régule sa température à 3° C et d'un passeur d'échantillons de type Perkin Elmer S10 Autosampler®. Le gaz plasmagène est l'argon Q4.0 (Linde® - Barcelone- Espagne), le

gaz de la cellule de collision est l'hélium Q6.0 (Linde® - Barcelone- Espagne). Les données de l'analyse sont enregistrées sur une station informatique dotée du logiciel d'analyse Nexion®.

### 3.4 Assurance qualité des résultats :

Le dosage d'un élément dans les cheveux par ICP-MS doit répondre à des critères de performance préétablis. Le protocole de validation recommandé par la Société Française de Biologie Clinique (SFBC) qui répond aux exigences de la norme NF EN ISO 15189 a été appliqué. Le dosage des métaux et métalloïdes dans les cheveux par ICP-MS a été validé suivant le protocole de la SFBC et pour les paramètres choisis, le coefficient de variation calculé pour le paramètre de la fidélité, la justesse, l'exactitude et l'effet de dilution avec une limite acceptable de 20%. Le tableau I résume les résultats de validation pour le reste des métaux.

**Tableau I : Résultats de la validation du dosage des métaux dans les cheveux par ICP-MS**

Paramètres	As75	Cd114	Cr53	Ni58	Pb208
Répétabilité	3.76%	4.01%	3.21%	19.80%	5.79%
	4.72%	4.82%	5.99%	22.92%	9.62%
Reproductibilité	5.91%	6.27%	4.99%	19.28%	8.18%
	6.66%	6.71%	5.18%	20.08%	10.7%
Justesse	3.52%	1.81%	8.14%	22.15%	7.12%
	3.69%	4.19%	10.16%	36.28%	10.34%
Exactitude	1.11%	0.20%	14.53%	29.74%	4.45%
	5.06%	5.29%	1.31%	7.95%	7.25%
Effet de dilution	4.65%	5.12%	7.19%	21.06%	0.42%
	1.45%	1.58%	2.00%	6.16%	0.57%
CV	2.30%	3.18%	10.07%	12.64%	3.33%
	3.99%	8.39%	6.09%	9.78%	7.79%
BR	7.05%	3.19%	3.55%	10.52%	2.33%
	0.23%	3.17%	0.24%	27.54%	4.34%
Contamination interéchantillon (%)	0.65%	1.05%	1.41%	6.12%	1.26%
Rendement d'extraction (%)	107.2%	98.20%	111.39%	102.90%	96.84%
LDD (ppb)	0.0005	8.84.10 <sup>-5</sup>	0.007	0.082	0.011
LDQ (ppb)	0.0018	0.0002	0.023	0.274	0.038

CV : coefficient de variation, BR : biais relatif, LDD : limite de détection, LDQ ; limite de quantification

### 3.5 Tests statistiques

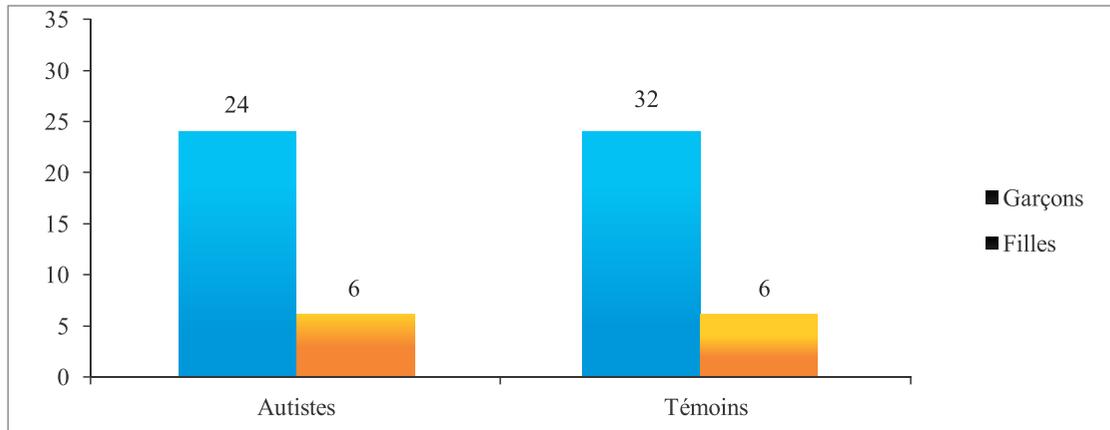
Le test T de Student a été appliqué pour comparer les moyennes des deux échantillons, autistes et témoins, la normalité évaluée en utilisant le logiciel statistique Minitab®18.

## I. RESULTATS

### 1. Population de l'étude

Les trente enfants diagnostiqués de TSA inclus à cette étude sont âgés de 2 à 9 ans (moyenne d'âge  $5.42 \pm 1,34$  ans), parmi

les 30 enfants, il y avait 24 garçons et 6 filles (sex-ratio 1:4). Le groupe d'enfants atteints de TSA a été comparé à un groupe de 38 enfants témoins, sains de tout trouble envahissant du développement, âgés de 3 à 10 ans (moyenne d'âge  $6.72 \pm 2,22$  ans) avec 32 garçons et 6 filles (sex-ratio :1:5)



**Figure 01 : Sex-ratio chez la population d'enfant autistes et témoins**

Les habitudes alimentaires sont l'une des principales sources d'exposition des enfants aux métaux, le questionnaire a révélé que sur les 30 enfants autistes, 13 consommaient de l'eau de robinet et 14 de l'eau embouteillée, la tuyauterie de la plupart des maisons (19 sur 30) était en cuivre, 7 en PVC (plomb) et 4 galvanisée (zinc). La consommation de poisson chez les enfants autistes n'excédait pas en moyenne une fois tous les 15 jours, la consommation de boisson en canette et d'aliments en conserves n'était pas fréquente. Sept enfants ont été sous supplémentation minérale et/ou vitaminique.

Les questions relatives aux habitudes alimentaires et aux antécédents médicaux des mamans pendant leurs grossesses, en lien avec une éventuelle exposition aux

métaux, ont révélé que 7 mamans sur les 30 avaient pris des médicaments et 3 autres ont été vaccinées. Concernant l'accouchement, 9 mamans ont accouché par césarienne, 2 ont eu recours au forceps et un enfant sur les 30 était prématuré, 11 mamans consommaient de l'eau de robinet pendant leurs grossesses, 18 de l'eau embouteillée et une maman consommait de l'eau de source. La consommation des poissons et fruits de mer n'était pas fréquente chez les mamans et n'excédait pas une fois tous les 15 jours.

### 1. Analyse toxicologique

Les moyennes des concentrations des métaux et métalloïdes (Cr, Cu, As, Se, Cd et Pb) dans les cheveux des enfants autistes et témoins sont représentés dans le tableau II. Ces valeurs ont été comparées aux normes proposées par (Senofonte, 2000).

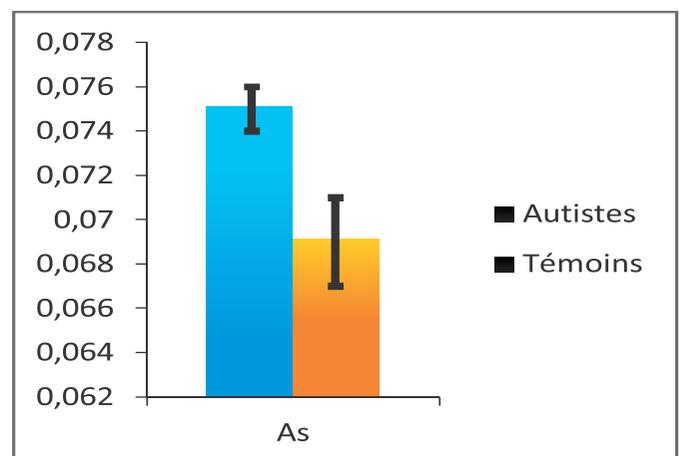
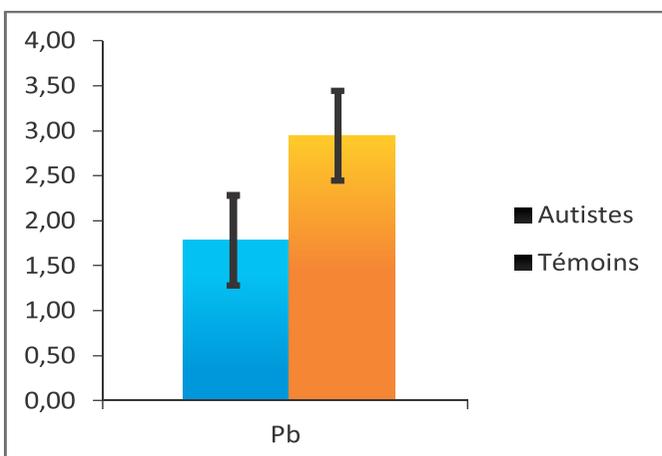
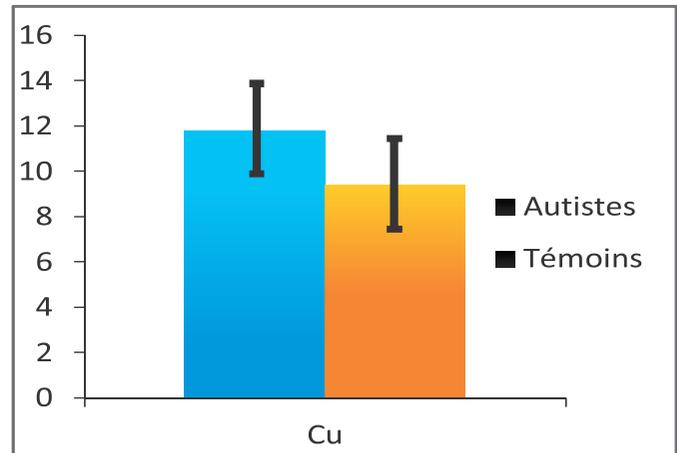
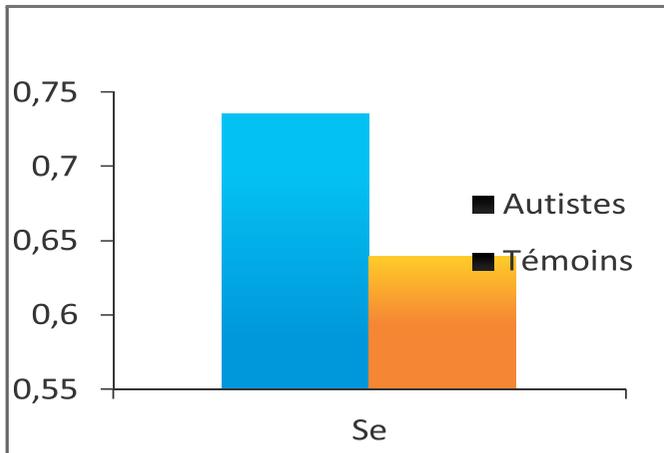


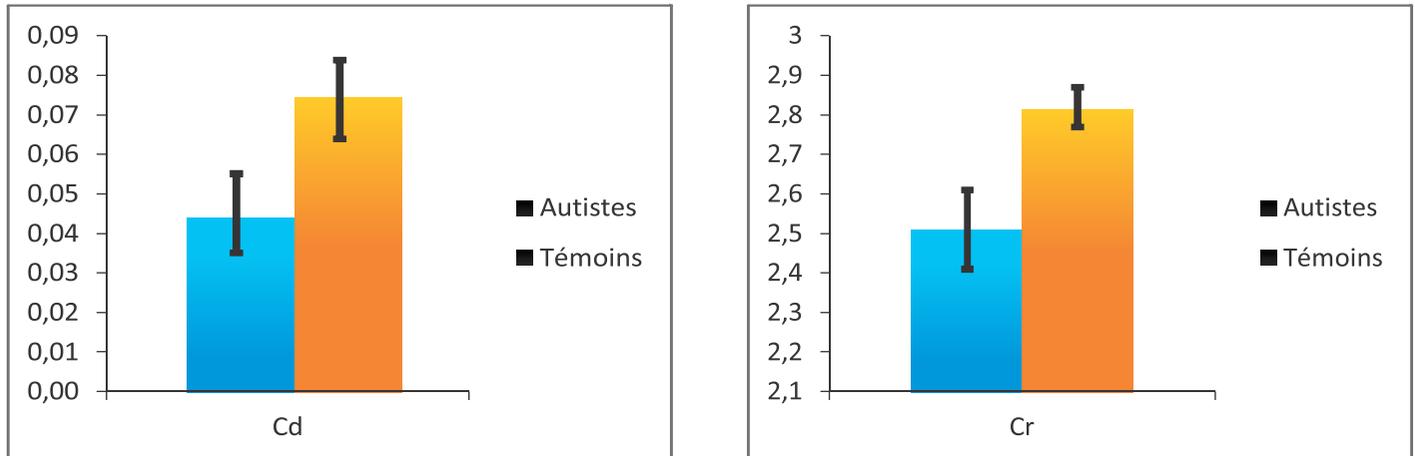
**Tableau II : Concentrations moyennes des six métaux analysés dans les cheveux des enfants autistes et témoins en  $\mu\text{g/g}$ .**

Métal	Concentration moyenne ( $\pm$ écart type) en $\mu\text{g/g}$ de cheveux		Valeurs normales en $\mu\text{g/g}$ de cheveux (Senofonte, 2000)
	Autistes	Témoins	
<b>Chrome</b>	2.51 $\pm$ 1.91	2.82 $\pm$ 1.75	0.001 – 4.56
<b>Cuivre</b>	11.90 $\pm$ 10.25	9.47 $\pm$ 2.73	7.2 – 82.7
<b>Arsenic</b>	0.075 $\pm$ 0.022	0.069 $\pm$ 0.032	0.0003 – 0.24
<b>Sélénium</b>	0.73 $\pm$ 0.12	0.64 $\pm$ 0.13	0.03 – 1.51
<b>Cadmium</b>	0.045 $\pm$ 0.022	0.071 $\pm$ 0.080	0.0003 – 0.61
<b>Plomb</b>	1.80 $\pm$ 2.00	2.66 $\pm$ 3.34	0.008 – 19.8

La moyenne des concentrations du sélénium dans les cheveux des enfants autistes est supérieure à celle des témoins. Cette différence est statistiquement significative ( $p=0.010$ ). La moyenne des concentrations du cuivre dans les cheveux des enfants autistes est supérieure à celles des témoins la différence est significative ( $p=0.033$ ).

La moyenne des concentrations de l'arsenic dans les cheveux des enfants autistes est supérieure à celle des témoins. La différence est non significative ( $p=0.725$ ). La moyenne des concentrations du plomb, du cadmium et du chrome dans les cheveux des enfants autistes est inférieure à celle des témoins. La différence est significative ( $p$  respectif 0.045, 0.044, 0.016).





**Figure 2 : Comparatif des moyennes en µg du des métaux et des oligo-éléments dans les cheveux des enfants autistes et témoins**

## I.DISCUSSION

Sur les trente enfants autistes inclus dans cette étude, la moyenne d'âge était de  $5.42 \pm 1.34$  ans, avec une tranche d'âge allant de 3 à 9 ans, diagnostiqués de TSA à partir de l'âge de 2 ans en moyenne, ce qui concorde avec l'âge d'apparition des symptômes de TSA et donc de son diagnostic qui se fait entre 2 et 4 ans. La majorité des enfants recrutés était des garçons avec un sex-ratio de 4 :1 (G/F) confirmant que la survenue des TSA est plus fréquente chez les garçons que les filles.

Les métaux et métalloïdes toxiques (As, Pb, Cr, Cd) généralement suspectés comme facteur de risque environnemental dans les TSA ont été dosés dans les cheveux des enfants autistes et témoins, cette matrice alternative est le milieu biologique le plus représentatif de l'imprégnation de l'organisme aux métaux, elle présente aussi l'avantage d'être non-invasive, non douloureuse et pratique surtout pour une population non-coopérative telle que celle des autistes.

Pour ce faire, une technique d'identification et de quantification multiélémentaire des métaux et métalloïdes dans les cheveux par ICP-MS a été optimisée et validée en suivant les recommandations de la SFBC conformément aux exigences de la norme NF EN ISO 15189.

Dans le cadre de cette étude descriptive, analytique, cas-témoins l'analyse des cheveux de 30 enfants autistes et de 38 enfants sains a montré des concentrations des métaux

toxiques plus faibles et une concentration des oligoéléments plus élevée chez les autistes par rapport aux témoins.

Une différence statistiquement significative a été retrouvée avec le sélénium ( $p=0.01$  pour  $n=30$ ), le plomb ( $p=0.045$  pour  $n=29$ ), le cadmium ( $p=0.044$  pour  $n=29$ ), le chrome ( $p=0.016$  pour  $n=27$ ) et le cuivre ( $p=0.033$  pour  $n=26$ ).

Les faibles concentrations de métaux toxiques (Pb, Cd et Cr) chez les autistes, par rapport aux enfants témoins, pourraient être expliquées par un défaut d'élimination de ces métaux, selon la «*poor excretors theory*» évoquée pour la première fois par [Holmes et al. en 2003](#) et confirmée par plusieurs autres études ultérieures ([Kern et al. 2007...](#)). Cela suggère qu'il y aurait une accumulation de ces métaux dans l'organisme des enfants causant un trouble de l'homéostasie de tous les minéraux. Les taux élevés des oligoéléments est probablement secondaire à l'occupation de leurs sites physiologiques par les métaux toxiques, on les retrouve, donc, à de plus fortes concentrations dans les cheveux des enfants autistes par rapport aux témoins. Il a été suggéré par [Blaurock-Busch et al](#) que les métaux toxiques influent sur l'absorption des oligoéléments, et l'interaction entre métaux toxiques et oligoéléments pourrait modifier le seuil et les effets toxiques, ce déséquilibre pourrait causer des troubles d'ordre neurobiologique, par exemple le plomb interagit avec le métabolisme du calcium qui joue un rôle dans le développement cognitif, le sélénium a des effets antioxydants bien connus, ils diminuent le stress oxydatif cellulaire, protègent



l'organisme contre les agressions extérieures et détoxifie l'organisme, des taux faibles en sélénium sont associés à des difficultés d'adaptation aux changements.

La prévalence de l'autisme en Algérie reste méconnue et aucune étude publiée sur le lien entre les métaux et l'autisme n'a précédé ce travail à ce jour, de ce fait le calcul d'une taille échantillonnale minimale n'a pas été possible.

Le problème du dosage du mercure par ICP-MS a empêché d'inclure ce métal dont le lien avec les TSA a été mis en avant par plusieurs études. Dans les perspectives de recherches ultérieures, un plus grand nombre d'échantillon est recommandé pour établir une association significative, l'analyse des cheveux avec d'autres matrices, comme les urines et le sang, donnerait une idée complémentaire sur l'imprégnation et la distribution des métaux toxiques et essentiels dans l'organisme et leur homéostasie. Il serait plus intéressant de comparer également les quantités des métaux chez les enfants avec leurs mamans qui donneraient une idée sur le rôle de l'imprégnation de la maman dans la survenue des TSA. La corrélation entre les taux des métaux dans l'organisme et la sévérité de l'autisme est aussi un terrain à explorer par ces recherches.

## II. CONCLUSION

Cerner l'étiologie des TSA ne peut s'affranchir d'études multidisciplinaires qui incluraient les mécanismes génétiques, épi-génétiques, immunologiques, biochimiques et microbiologiques avec les facteurs environnementaux. Cette étude des métaux comme facteurs environnementaux dans la physiopathologie des TSA est la première du genre en Algérie, motivée par le fait que l'exposition

environnementale est propre à chaque zone géographique ce qui ne permet pas d'extrapoler des résultats d'études étrangères à la population autistique algérienne. Toutefois les résultats de toutes ces études y compris la nôtre convergent vers l'incrimination des métaux dans l'apparition des troubles du spectre autistique.

## IV. BIBLIOGRAPHIE

- **Langlois, D.** (2015). *Position d'Autisme France Plan Autisme 4*. Consulté le Juillet 2017, sur Autisme France: <http://www.autisme-france.fr>
- **Klaassen, P. Curtis D.** (2008). *Casarett and Doull's TOXICOLOGY: The Basic Science of Poisons*. Kansas: McGraw-Hill Education.
- **SoHT.** (2005). Recommandations pour les analyses de cheveux dans les expertises médico-légales. *Annales de Toxicologie Analytique*, vol. XVTI, n°4, , 217-219.
- **Jean-Pierre Goullé.** (2003). Validation d'une technique de dosage multiélémentaire des métaux par ICP-MS dans les milieux biologiques. *Annales de Toxicologie Analytique*, 271-280.
- **NF EN ISO 15189.** Laboratoire de biologie médicale – Exigences concernant la qualité et la compétence -
- **Senofonte, O. V.** (2000). Assessment of reference values for in human hair of urban schoolboys. *Journal of trace elements in medicin and biology*, 6-13.
- **Holmes, A. B.** (2003). Reduced Levels of Mercury in First Baby Haircuts of Autistic Children. *International Journal of Toxicology*, 277-285.
- **Kern JK, G. B.** (2007). Sulfhydryl-reactive metals in autism. *Journal of Toxicology and Environmental Health, Part A* , 715–721.
- **Blaurock-Busch.** (2012). Toxic Metals and Essential Elements in Hair and Severity of Symptoms among Children with Autism. *Journal of Clinical Medicine*, 39-48.

