

Autisme et schizophrénie : désordres intestinaux

Robert Cade , Malcom Privette , Melvin Fregly, Neil Rowland,
Zhongjie Sun, Virginia Zele, Hebert Wagemaker et Charlotte Edelstein

**Département de la Médecine, physiologie, psychologie et
psychiatrie, Université de Floride, Gainesville, FL 32610-0204,
USA**

Traduction par l'Association Stelior

(Reçu le 12 février 1999)

Nous avons examiné l'hypothèse de Dowan selon laquelle la maladie de la schizophrénie est associée avec l'absorption d'exorphines contenues dans le gluten et la caséine. De même , se basant sur les travaux de Reichelt et al (Reichelt K.L., Saelid, G., Lindback, J. and Orbeck, H. (1986) *Biological Psychiatry* 21 :1279-1290) et Rodriguez et al. (Rodriguez, Trav, A.L., Barreiro Marin, P., Galvez, A. (1994) *Journal of Nervous and Mental Disease* Aug; 182(8): 478-479), nous avons conduit une étude similaire sur un groupe d'enfants atteint d'autisme. Dans les deux syndromes nous avons mis en évidence des profils de pics chromatographiques représentant des peptides (positifs à la Ninhydrine) après criblage moléculaire sur Sephadex G-15.

Nous avons fait un bioassay des immunoglobines IgA et IgG contre la gliadine et la caséine dans le sérum. Des titres (dosages) élevés d'anticorps IgG anti-gliadine ont été trouvé dans 87 % des patients autistes, 86 % des patients schizophrènes, et des titres élevés d'anticorps IgG anti-caséine bovine chez 90 % des autistes, et 93 % des patients schizophrènes. Des titres élevés d'anticorps IgA anti-gluten ou caséine ont été trouvés chez 30 % des enfants atteints d'autisme, tandis que 86 % de patients schizophrènes avaient un titre élevé d'anticorps IgA anti-gluten et 67 % anti-caséine ; quelques enfants et adultes ont ces anticorps, mais seulement en quantité infinitésimale. Lorsque les patients schizophrènes furent soumis au traitement de la dialyse, ou un changement alimentaire sans gluten ni caséine, ou les deux en même temps,(Cade, R., Wagemaker, Hm, Frivette, R.M., Fregly, M., Rogers, J. et Orlando, J. (1990) *Psychiatry : A World Prospective* 1:494-500) la peptidurie ainsi que le score du test « Brief Pshychiatric Rating » diminuèrent. Une amélioration fut remarquée pour toutes les catégories du comportement chez 81 % des enfants autistes dans les 3 mois qui suivirent le changement alimentaire sans gluten ni caséine. Nos observations sur cette étude corroborent le postula que les patients atteints de schizophrénie ou autisme souffrent de ces pathologies à cause de l'absorption d'exorphines formées dans l'intestin par une digestion incomplète du gluten et de la caséine.

Mots clef : gluten, caséine, schizophrénie, autisme, gliadorphine, beta-casomorphine, changement alimentaire.

AUTISME ET SCHIZOPHRENIE

Dohan (1966), suite à une étude du comportement alimentaire de gens de Nouvelle-Guinée et d'autres îles du sud Pacifique, rapporta que la schizophrénie est très rare, voire très faible parmi ces populations qui ne consomment pas le blé, l'orge, l'avoine, et le seigle. Au contraire, il trouva que la schizophrénie est courante et sévère chez les communautés dans le monde qui consomment des graines contenant du gluten dans leur mode alimentaire journalier. En conclusion, Dohan souleva l'hypothèse qu'une surcharge de peptides dérivés du gluten, ou de la caséine, cause la schizophrénie. Notre étude a été structurée afin de répondre aux questions soulevées par Dohan et d'en établir le rapport avec l'autisme (Reichelt et al., 1981 ; Rodriguez et al., 1994). Ces questions sont les suivantes :

- (1) Y-a-t-il une concentration anormale importante de peptides dans le sang et les urines de patients schizophrènes et autistes ? (Reichelt et al., 1981 ; Cade et al., 1990).
- (2) Si ces peptides entrent dans le sang, peuvent-ils pénétrer la barrière hémato-encéphale ? (Sun and Cade, 1999a).
- (3) Quelles structures pénètrent-elles ? (Sun et Cade, 1999a).
- (4) Est-ce que les structures du cerveau pénétrées par ces peptides peuvent être en relation avec l'autisme et de la schizophrénie ? (Sun et Cade, 1999b).
- (5) Est-ce que les signes et les symptômes de la maladie diminuent et disparaissent si les peptides sont enlevés ou fortement diminués en concentration ? (Cade et al., 1990), (Knivsberg et al., 1995).
- (6) Est-ce qu'un animal en bonne santé présentera les symptômes similaires à la schizophrénie ou l'autisme après injection de ces peptides ? (Sun et Cade, 1999b).

Bien que plusieurs questions soulevées par ces problèmes aient été abordées par plusieurs laboratoires (Reichelt, 1996 ; Reichelt et al., 19981 ; 1996 ; Shattock et Lowdon, 1991 ; Shattock et al., 1990 ; Knivsberg et al., 1990 ; 1995 ; Whitely et al., 1997) avec diverses méthodes d'investigation, aucun laboratoire n'a encore entrepris une approche globale, prenant en compte toutes ces questions en même temps.

EQUIPEMENT ET METHODE

Patients et traitements

270 patients atteints soit d'autisme ou de schizophrénie ont été recommandés par leurs parents ou médecins traitants pour être enrôlés dans cette étude. 83 patients schizophrènes de sexe masculin (âge : 17-49 ans) et 37 patientes schizophrènes de sexe

féminin (âge : 18-46 ans), 128 garçons atteints d'autisme (âge : 3,5-16 ans) et 22 filles autistes (âge : 3,5-14 ans). Après consultation par notre psychiatre (H.W.) tous les patients et patientes rentraient dans les normes pour les critères de leur maladie selon le code DSM III (APA, DSM III, 1987). Les certificats médicaux de ces patients certifiaient le caractère chronique de leur maladie. Aucune de ces personnes n'avaient bénéficié d'une période de rémission, voire d'une amélioration ou réponse à un traitement par médicaments au cours de leur maladie pendant au moins 3 ans, avant d'être enrôlées dans notre étude. Tous les patients autistes étaient malades depuis au moins un an avant le début de notre étude. Les parents et médecins traitants nous avaient certifié qu'aucun de ces patients n'avaient démontré une amélioration soutenue dans le temps, ou réponse positive à un traitement quelconque. Ces patients ont tous été examinés et questionnés par nos psychiatres (H.W.), et déclarés correspondre aux critères du code DSM III. Les déterminations des valeurs négatives pour le contrôle des tests de laboratoire ont été obtenues de personnes saines de même sexe, et de même âge, chez qui aucun signe de la maladie n'était détectable.

Chaque patient fut recommandé par un adulte responsable, le plus souvent un parent ou un médecin traitant. En plus d'un entretien dans le cadre d'un examen psychiatrique, chaque patient fut évalué selon les critères du MMPI (Cade et al., 1990) et du code Brief Psychiatric Rating Scale (Hedlung et Vieweg, 1980). Les degrés de sévérité de 18 symptômes psychiatriques furent évalués indépendamment par 3 observateurs expérimentés ; 2 psychiatres et un médecin assistant, sur une échelle de 1 (valeur normale) à 7 (pathologie très sévère), et les moyennes furent ensuite calculées. Les variations entre le score le plus haut et le plus bas pour les 3 examinateurs d'un patient avoisinaient en moyenne 8 %, et n'étaient jamais supérieures à 13 %. Le test BPRS fut donné à chaque visite pour une dialyse du groupe de patients schizophrènes durant toute la durée de l'étude, et le test MMPI à intervalles de 4 à 6 mois. Les observations des patients sur dialyse, et soumis à un changement alimentaire sans gluten, ne furent pas conduites en mode « aveugle », du fait qu'il fût impossible de garder l'anonymat aux patients enfants qui se faisaient connaître.

Les enfants autistes ne furent admis dans l'étude, que s'ils avaient été au préalable diagnostiqués comme souffrant d'autisme ou du syndrome Asperger (Asperger, 1961) par leur pédiatre ou psychiatre, et, à condition que dans le cadre de nos critères de psychiatrie (H.W.), ils remplissent la condition des critères du code DSM III pour ces pathologies.

Durant la durée de l'étude, les enfants autistes furent évalués régulièrement par leurs parents et leurs pédiatres ou psychiatres, indépendamment, et en plusieurs occasions, par leurs enseignants (sur une échelle de 0 à 4), afin d'établir la présence et le degré de sévérité de l'autisme tel qu'il est décrit dans la table No IV. Les évaluations des parents et des médecins furent exprimées sous forme de moyenne. La variation des scores attribués par les observateurs ne dépassaient pas 10 %. Ce résultat peut s'expliquer par le fait que la plupart des constats des médecins s'est faite à partir des observations des parents sur le comportement de leurs enfants à la maison, ou les observations des enseignants pour le comportement des enfants à l'école. Cette évaluation fût répétée après un mois de traitement, et ensuite, chaque trimestre pendant une année. Le traitement par médicament des patients schizophrènes et autistes fût

arrêté avant le commencement du traitement du changement alimentaire ou de la dialyse, et ils furent, pour autant que nous puissions le contrôler, mis à l'écart de toute prise de médicament. L'arrêt de traitement par médicaments pour lesquels on n'avait, au préalable, pas constaté d'amélioration clinique, ne fut pas considéré comme une décision hasardeuse. Le comité de contrôle sur les expériences faites sur les humains approuva le protocole établi pour notre étude et tous les parents concernés donnèrent leur accord.

57 patients schizophrènes acceptèrent de subir une hémodialyse hebdomadaire par membrane polysulfone Fresenius de 0,75 m², de 6 à 8 h, selon leur poids corporel, pour une durée de 1 à 14 ans. 5 de ces patients furent traités par dialyse, plus un changement alimentaire sans gluten ni caséine, et 7 autres patients furent traités seulement par changement alimentaire sans gluten ni caséine. Tous les enfants autistes, à l'exception d'une fille de 13 ans qui fût dialysée et guérie après 7 semaines de traitement, furent soumis au changement alimentaire sans gluten ni caséine.

Le changement alimentaire sans gluten ni caséine donné aux enfants autistes et schizophrènes est une synthèse de la méthode « La cuisine sans lait » de la société Kidder (1988) et « Le plat gourmet sans gluten » de la société Hagman (1990). Le choix des aliments des enfants était fréquemment surprenant avant le début de l'étude. La plupart avaient un immense désir pour les produits contenant du lait ou du gluten, et beaucoup firent l'expérience d'un « état de manque » de ces substances opioïdes contenues dans le gluten et la caséine quand le changement alimentaire fût commencé. Quand leurs enfants entrèrent dans l'étude, leurs parents firent en général un sérieux effort pour favoriser une diète équilibrée sans gluten ni caséine. Quelques enfants ajoutèrent de nouveaux aliments dans leurs repas. Pour la plupart, toutefois, il fallut compter 2 à 3 mois pour suivre un changement alimentaire équilibré.

Méthodes de laboratoire

Dès le début de l'étude une prise de sang fût faite afin de détecter et quantifier la présence d'anticorps IgA (Reichelt et Landmark, 1995), IgG anti-gluten et anti-caséine bovine (Scott et al., 1985). L'urine de 24 h, refroidie et acidifiée avec 6 N NaCl à pH 4 durant la récolte, fût précipitée en y ajoutant 10% d'alcool éthylique saturé avec de l'acide benzoïque. Le pH fut de nouveau ajusté à pH 4, le flacon de récolte bouché et laissé reposer dans un frigo pendant 24 h. Le surnageant fût ensuite décanté. Le précipité fût lavé avec de l'éthanol et de nouveau centrifugé, puis décanté. La procédure du lavage du précipité, suivie d'un deuxième relavage, fût faite 2 à 3 fois jusqu'à ce que la densité optique du surnageant (mesurée à 280 nanomètres par rayons ultraviolets dans une cellule photométrique de 1 cm de diamètre) atteigne la valeur de 0,3 OD. Un échantillon de ce surnageant fût ensuite filtré sur un tamis moléculaire Sephadex G-15 équilibré dans un solvant de 0,6 M NH₄CO₃, avec un débit de 1,8 ml/min, à la température de 17 ° Fahrenheit. Le volume du surnageant chargé sur la colonne contenait entre 75 et 750 mg de créatinine suivant l'âge et la taille du patient (Hole et al., 1979 ; Trygstad et al., 1980). Les enfants en bas âge secrètent de petits volumes d'urine et de créatinine, si bien que dans quelques cas, la quantité de créatinine était

très petite. La surface des pics élués de la colonne Sephadex étaient détectés par rayons ultraviolets à 280 et 230 nanomètres, et exprimés comme surface (en cm²) de pic (détecté par ultraviolets à 280 nanomètres), divisée par la quantité en mg de créatinine de l'échantillon. Des aliquots élués de la colonne de filtration Sephadex après 2,4 et 4,02 fois le volume mort de la colonne furent collectés, acidifiés avec de l'acide acétique, ensuite neutralisés par titration avec du KOH, et testés pour la présence de protéine par le test de la réaction à la ninhydrine. Le reste de l'échantillon fût ensuite lyophilisé, et le résidu congelé à - 71 °C.

Chaque échantillon passé sur HPLC (chromatographie liquide à haute pression) contenait 250 micromoles de créatinine. Le protocole fût développé à partir d'une colonne de phase inverse Vydac 18 (0,250 X 4,6 mm) pour un débit de 1ml/min. Une colonne de chauffage Biorad (No. 1250426) fût utilisée pour que le procédé de la chromatographie se fasse à la température de 35 °C. Les échantillons furent scannés à 215 nanomètres (nm), 230 nm, et 280 nm et la surface du pic, détecté par rayons ultraviolets à 215 nm, intégrée à 1000 mV. La colonne fût ensuite nettoyée en faisant passer la phase liquide A pendant 15 à 20 min. Pour beaucoup d'échantillons les photocopies des chromatogrammes furent faites par agrandissement de 2 fois (figure (2c)) de façon à ce que les pics de chromatographie, grands et petits, puissent être vus et examinés facilement. Le procédé chromatographique est basé sur la séparation de peptides d'acides aminés et sels développé par Bohlen et al. (1980), et modifié par Reichelt et al. (1998) et Shattock et Lowdon (1991). Un échantillon d'urine du matin refroidie (conservé dans du Thymol), et mis à part, fût collecté pour analyse directe sur HPLC. Un échantillon de 5 ml fût filtré par filtre à centrifugation d'acétate de cellulose Costar de porosité 0,22 µm et centrifugé à une vitesse de rotation de 3500 rpm (révolutions par minute) pendant 20 min à 4 °C. Un aliquot d'urine contenant 250 nmol (nanomole) de créatinine fût chargé sur la colonne, et le chromatogramme obtenu comme décrit plus haut. 2 pompes furent utilisées pour perfuser le système. La pompe A contenant 0,1 % de TFA (acide tri-fluoro-acétique) et la pompe B 0,1 % TFA dans 95/5 acétonitrile/H₂O. Pendant la durée des premières 15 min, seulement le TFA dans H₂O fût perfusé, ensuite la pompe B injecta 0,1 % TFA dans l'acétonitrile (95 %) H₂O (5 %) et le gradient d'acétonitrile fût augmenté de 5 % toutes les 5 min jusqu'à ce que le ratio de 60/40 fût atteint. Après la séparation des peptides, le système de chromatographie fût nettoyé par injection de TFA acétonitrile / H₂O 60 % pendant une durée de 20 min ; ensuite par retour à la concentration de 1% pendant 5 %. Tous les standards de peptide pour la calibration de l'HPLC furent obtenus chez Nova Biochem, Peninsular Biochem, ou Sigma biochem et stockés à la température de + 4 ° Fahrenheit jusqu'à leur prochain usage.

Evaluation statistique

Le traitement statistique des données pour les enfants autistes et schizophrènes adultes a été établi par la méthode d'analyse Kruskal-Wallis (Shuttle, 1977). Les différences entre valeurs de pré traitement, 1 mois, 3 mois, etc. furent établies par

méthode du test Newman Keuls prenant en compte la nature non-paramétrique des données analytiques.

Résultats

Séparation sur résine de filtration Sephadex

La figure 1(a)-(c) démontre 3 profils de peptide correspondant aux pics séparés distinctement pendant la filtration de l'urine contrôle issue de donneurs volontaires sains (soit 76 adultes, âge 16-71 ans, 2/3 mâles) et 43 enfants (âges 3-11 ans, 32 garçons et 11 filles) sur la colonne. Le profil I montre un large pic qui élué approximativement à 2,4 fois le volume mort de la colonne (v.v) et un petit pic à 4 X v.v. Le profil II est un petit pic 2,4 X v.v. Le profil III est un large pic, qui est à la fois 2,4 et 4,0 X v.v. Tous les pics sont positifs pour la détection au test de la Ninhydrine, une découverte qui a été aussi mentionnée par Hole et al. (1979,1988).

Les 3 mêmes profils, mais contenant des pic plus larges à 2,4 et 4,0 X v.v apparaissent aussi dans l'urine avant traitement des enfants autistes et patients schizophrènes. Le pourcentage d'incidence de chaque profile dans les deux groupes de patients et dans le groupe normal de contrôle est montré dans la table I. Un profil anormal de type I fût trouvé dans 58% de ces patients autistes avant traitement ; 2% de profile type II pour les échantillons d'urine avant traitement, et 6% pour les échantillons d'urine après 6 mois de changement alimentaire, et le profil de type II dans 36% alors qu'il fût trouvé 4 échantillons associés avec un pré-traitement normal de profil type II. Le profil anormal de type I fût trouvé chez 30% des patients schizophrènes avant traitement, un profil anormal de type II dans 25%, et un profil anormal de type III dans 40%, alors qu'un profil normal fut trouvé chez 5% des patients.

La table II montre la surface (en cm²/mg créatinine) sous les pics qui éluent à 2,4 et 4, X v.v pour les contrôles normaux, pour les enfants autistes avant traitement, et les patients schizophrènes avant traitement. La table II montre le titre des anticorps IgA et IgG anti-gluten et anti-caséine (Scott et al., 1985). On a trouvé parmi les enfants qui avaient un taux (titre) d'anticorps élevé IgA anti-gluten ou caséine 30% des enfants (Reichelt et Landmark, 1995) avec une moyenne de 2,1 anti-gluten et 1,9 anti-caséine sur une échelle de 0 à 6. L'augmentation des anticorps IgG contre le gluten exprimée en score selon la méthode Rast, était élevée chez 87% de ces enfants, et 90% pour la caséine. Les anticorps IgA anti-gluten étaient élevés chez 86% des patients schizophrènes, et 67% pour la caséine. Les anticorps IgG anti gluten étaient élevés chez 86% de ces mêmes patients, et 93% pour la caséine. Les enfants et adultes sains représentant le contrôle normal, ont eu des valeurs égales à zéro pour le titre d'anticorps IgA anti-gluten, inférieur à 120 pour les anticorps IgG anti-gluten, et inférieur à 1600 pour les anticorps anti-caséine. Il est plausible que, se basant sur le rapport de Pratesi et al. (1998), les dégâts causés sur les vaisseaux du cerveau fassent partie des symptômes chroniques.

Séparation par HPLC

La figure 2(a)-(f) montre la résolution initiale des pics de peptides de l'urine d'un enfant autiste de 7 ans avant traitement (changement alimentaire). Un échantillon d'urine fût conservé à + 4°C dans l'attente de son analyse sur HPLC. La figure 2(b) montre le profil HPLC de l'urine du même enfant, obtenu après une année de traitement par changement alimentaire. Sur ce profil, il apparaît clairement que la quantité de peptides, qui éluent entre 30 et 70 min, est beaucoup moins importante dans l'échantillon après le changement alimentaire que dans l'échantillon avant le début du traitement et, ceci en particulier pour les pics de casomorphine, gliadinomorphine, et IAG (indolyl-3-acryloylglycine), qui sont tous beaucoup plus petits. On pense que IAG est un produit de la dégradation du tryptophane qui se produit à l'intérieur de l'intestin. Ce marqueur a été trouvé en grande quantité dans de multiples désordres neurologiques. Plus récemment encore, dans l'autisme et la schizophrénie par Shattock et al. (1990) et Shattock et Lowdon (1991). L'IAG est suspectée d'augmenter la perméabilité intestinale. La figure 2(c) montre le chromatogramme HPLC (élution des pics de l'appareil HPLC) d'un jeune homme atteint de schizophrénie pendant 5 ans, avant le début du traitement. Ce chromatogramme montre que les pics élués entre 30 et 70 min, sont très importants. La figure 2(d) montre le chromatogramme HPLC du même jeune homme après 11 années de traitement. Ce jeune homme a eu des dialyses régulièrement pendant 8 ans, et son état s'est amélioré de manière significative bien qu'il continue d'avoir des rechutes de la maladie. La dialyse a été continuée, avec ensuite un changement alimentaire sans caséine ni gluten, et son état s'améliora encore, mais avec des rechutes chaque fois qu'il enfreignait son régime alimentaire. Nous avons ensuite ajouté à sa diète Creon 10® , un mélange d'enzymes pancréatiques fabriqués par la compagnie Solvay Pharmaceutical, contenant lipase 10'000 USP, amylase 30'000 USP et protéase 30'000 USP unités, un comprimé avec chaque repas et, de même, s'il lui arrivait de manger par inadvertance entre les repas quelque chose contenant du gluten ou de la caséine. Il suit ce triple traitement depuis maintenant 18 mois. ; son BPRS, qui est montré sur les chromatogrammes (c) et (d) de l'analyse HPLC, sont les valeurs obtenues au moment de la collecte de son urine. Ses scores BPRS sont maintenant normaux, comme sont les pics de son urine élués de la colonne Sephadex et de l'HPLC. De plus, il travaille maintenant à plein temps et vit de manière indépendante. La figure 2 (e) montre le chromatogramme HPLC de l'urine d'un jeune homme sain, et la figure 2(f) l'urine d'un enfant sain âgé de 8 ans.

La figure 3A montre la comparaison du progrès de patients qui ont suivi un traitement par dialyse uniquement, et la dialyse plus changement alimentaire. La moyenne hebdomadaire des scores fût calculée par les mêmes trois personnes mentionnées précédemment dans la rubrique « Sujets et traitements » pour 5 patients schizophrènes à profil de type I, dont les symptômes s'améliorèrent de façon significative, ou disparurent complètement pendant la dialyse, et deux autres patients qui furent traités par dialyse, et changement alimentaire simultanément. Au fur et à mesure que le progrès devenait apparent depuis le début du traitement, on notait

toutefois que l'amélioration devenait plus rapide et complète pour les deux patients qui suivaient les deux thérapies simultanément.

La figure 3B montre les score BPRS de 5 patients avec le profil II de la peptidurie. On note que la rapidité du processus d'amélioration est plus rapide chez les patients avec le profil II et la guérison plus complète (Jorgensen et Cappelen, 1992 ; Reichelt, 1996) que parmi les personnes de profil I ou de profil III, dont les données analytiques sont représentées dans la figure 3C. D'un point de vue moléculaire, les entités chimiques dans le pic II après séparation sur Sephadex, sont plus petites que celles issues du pic I, et sont donc plus facilement éliminées par la dialyse. De même, dans le profil III, l'amélioration de l'état de santé fût plus rapide et complète quand le changement alimentaire et la diète furent faits conjointement. Ainsi, des 57 patients qui furent mis sur dialyse, ou dialyse plus changement alimentaire, 23 patients (40%), ceux représentés dans la figure 3A-C, tous sans exception eurent une amélioration de leur état ou devinrent complètement normaux. 18 patients se retirèrent du programme de notre étude durant les 3-6 premiers mois et 10 autres patients, après 6 mois, bien que tous eurent une amélioration significative de leur état.

Dans la figure 4 nous avons fait le graphique des valeurs de 7 patients schizophrènes traités par changement alimentaire sans gluten ni caséine uniquement. Chacun de ces patients avait un profil de peptidurie de type III. Les patients 1 et 6 bénéficièrent d'une amélioration de leur état après seulement deux mois de changement alimentaire. L'état des 7 patients s'améliora après 4 mois de changement alimentaire et, on nota une amélioration statistiquement significative $p < 0,04$ pour le groupe en entier, en comparaison du groupe de contrôle avec les valeurs expérimentales. Parmi les 5 personnes qui continuèrent le changement alimentaire avec seulement des écarts mineurs de diète, leur amélioration était constante, et 4 d'entre eux atteignirent des scores BPRS normaux, obtinrent des emplois professionnels à plein temps et, d'après les dires de leur parents et congénères, se comportèrent de façon normale. Deux patients (patients 1 et 6) améliorèrent leur état de santé pendant plusieurs mois mais rechutèrent à cause d'un écart répété du changement alimentaire. Le patient 7 a fait des écarts multiples de régime entre le sixième et le dixième mois et souffert d'un comportement anormal pendant cette période avec résurgence d'hallucination. L'évaluation du groupe entier par Kruska-Wallis Anova montra un résultat de $p < 0,17$. Quand on prit en considération le patient numéro 5 qui continua son changement alimentaire, la valeur p devint inférieure à 0,001 ($p < 0,001$). La comparaison des valeurs des personnes avant le début du traitement avec les valeurs expérimentales des patients en cours de traitement, ne montra pas de différence significative pendant les 2 premiers mois. ; après 4 mois la valeur p était $< 0,007$, après 6 mois valeur $p < 0,03$ et resta en dessous de 0,05 pendant 16 mois, quand on pris en considération les 5 patients qui, seuls, se conformèrent au changement alimentaire. Toutefois, la valeur p fût supérieure à 0,05 au 16 eme mois, quand on prit en considération tous les 7 patients ensemble. La filtration moléculaire des peptides sur Sephadex, et la purification sur HPLC des mêmes peptides des 2 patients non-conformistes au changement alimentaire montrèrent une sécrétion élevée d'exorphines multiples dérivées de la caséine. De plus,

les parents de ces patients nous informèrent de l'état d'exacerbation de ces symptômes, quand ils arrêtaient le changement alimentaire sans gluten ni caséine. Bien que nous ne puissions en être certains, ces patients et leurs familles, n'ont tous l'usage de médication neuroleptique durant cette étude.

Nous avons suivi 70 enfants autistes sur changement alimentaire sans gluten ni caséine pendant une période de 1 à 8 ans. Parmi ceux-ci 80% démontrèrent une amélioration significative à partir du 3^{ème} premier mois. Parmi les 13 enfants (19%) dont l'état ne s'améliora pas, 5 d'entre eux, de qui nous reçurent les urines régulièrement, continuèrent de montrer des peptides urinaires élevés comme démontré dans les analyses de séparation sur filtration moléculaire Sephadex et par HPLC. Ils continuèrent de sécréter des bêta-casomorphines et gliadinomorphines qui suggèrent fortement qu'ils ne suivaient pas le changement alimentaire prescrit.

La table IV montre les anomalies du comportement qui furent évaluées chez les patients autistes traités par un changement alimentaire sans gluten ni caséine. Le classement des valeurs pour chaque caractéristique de ces anomalies, avant changement alimentaire, fut entrepris et montré en haut de la table. Les évaluations faites en rapport avec les durées du changement alimentaire à 1, 3, 6 et 12 mois suivent en dessous. La valeur p montrée à chaque réévaluation se réfère à une comparaison entre les valeurs de prétraitement et les valeurs expérimentales obtenues à la période de réévaluation. La valeur p montrée en bas de chaque colonne de données, se réfère à l'analyse de variance pour la caractéristique montrée. Il devient apparent qu'une amélioration significative se produisit pour presque tous les cas, après un mois de changement alimentaire et, dans tous les cas, après 3 mois et, que l'amélioration globale continua pour la première année. Alors que nous fîmes tous les efforts possibles pour contrôler le changement alimentaire de nos patients, ceci ne fut pas toujours possible pour les enfants qui vivaient chez leurs parents sous l'unique surveillance de ceux-ci.

DISCUSSION

Dohan (1966), fut le premier à attirer l'attention sur la relation entre une alimentation élevée en céréales et l'incidence et la sévérité de la schizophrénie. Dohan (1983), Asperger (1961), et Marchi et al. (1974), tous montrèrent l'incidence élevée des désordres émotionnels, schizophrénie incluse et le comportement à caractère autiste chez les enfants atteints de maladie coéliqua, une maladie due à une sensibilité au blé et autres graines contenant du gluten.

Notre étude, tout comme le travail de Shattock et al. (1990), Shattock et Lowdon (1991), Reichelt et al. (1986, 1990) démontre que l'hyper-peptidurie apparaît chez la plupart des patients autistes (Reichelt et al., 1981). Hole et al., (1979), trouva un peptide chez des patients schizophrènes qui induit un comportement bizarre chez des rats après injection du peptide.

(table I, figure 2). Nous avons aussi trouvé, comme le fit Shattock et al., (1990), Shattock et Lowdon (1991) et Reichelt et al. (1986), des fragments de beta-

casomorphine bovine. De la caséine et gliadine intacte (Gardner, 1994 ; Lucarelli et al., 1993) qui montrèrent que le mur de la muqueuse intestinale est extrêmement perméable au lactulose/dextrane dans l'urine (figure 2(a)-(f) à la fois des patients schizophrènes et autistes. Alors que 72% d'adultes normaux, et 54% des enfants contrôlés dans nos données analytiques, ont probablement de la bêta-casomorphine bovine dans leur urine, les concentrations en sont tellement faibles qu'elles sont difficiles à identifier et quantifier, ou à collecter un échantillon adéquat pour identification par spectrométrie de masse. Comparaison de la figure 2(a) et 2(b). La découverte d'un titre bas de bêta-casomorphine dans l'urine contrôle de personnes normales est attendue, d'après le rapport de Husby et al. (1985), qui démontra que de faibles traces de bêta-casomorphine peuvent être trouvées dans le sang de sujets nourrissons normaux, et Stuart et al. (1984), qui trouva de la bêta-casomorphine dans le sang de mères nourricières et chez leurs enfants et, par Gardner (1994) qui démontra que de la caséine et gliadine intacte sont absorbées par l'intestin.

La présence de larges quantités de bêta-casomorphine et gliadinomorphines trouvées dans les urines d'enfants autistes et de patients adultes schizophrènes pourrait être expliquée de différentes manières. :

- 1) une augmentation de la perméabilité de la muqueuse intestinale a été démontrée par Gardner (1994) et D'Eupfemia et al. (1996) qui démontrèrent que 47% d'enfants atteints d'autisme avaient une augmentation du rapport lactulose/mannitol qui résulte de l'augmentation de la perméabilité des « jonctions serrées » (tight junctions) de la muqueuse intestinale.
- 2) Un second mécanisme pourrait se faire à partir d'une enzyme inadéquate ou déficiente pour soit la dégradation dans l'intestin ou dans le sang des gliadinomorphines ou des casomorphines qui permettent aux exorphines en grandes quantités d'avoir accès dans le sang et circuler jusqu'à la prise de ces exorphines par le cerveau.
- 3) Un troisième mécanisme, chez 30% d'enfants autistes et 96% de patients schizophrènes, pourrait être que la fixation des exorphines dans le mur de la muqueuse intestinale par les anticorps IgA endommage les procédés métaboliques intracellulaires qui causent la perméabilité du mur de la muqueuse intestinale. Il a été aussi rapporté par Pratesi et al. (1998) que les anticorps IgA de patients atteints de maladie cœliaque réagissent fortement avec les vaisseaux sanguins du cerveau.
- 4) Une autre possible explication pour l'élévation à la fois des endorphines et des exorphines a été rapportée par Rui et Goldstein (1982), et Hui et al. (1983) qui trouvèrent que les opioïdes et autres peptides inhibent le métabolisme des peptides.

Des désordres gastro-intestinaux ont été rapportés chez des patients schizophrènes et autistes par Coleman (1976) et par Goodwin et al. (1971). Les enfants atteints de maladie coéliqua causée par une sensibilité au gluten, ont aussi une plus grande incidence de la schizophrénie telle qu'elle apparaît dans la population en général (Dohan, 1983). La démonstration de taux élevés d'anticorps IgA et IgG anti gliadorphine et casomorphine peuvent sûrement être considérée comme une mesure de défense pour se protéger contre l'attaque d'une protéine nocive. Pour ce qui concerne nos observations présentes, la présence d'anticorps IgG contre le gluten et la caséine est une autre indication que les peptides étrangers parviennent dans la circulation du sang intacts, et en grandes quantités suffisantes pour stimuler une réponse immunitaire via les IgG, et qui sont ensuite disponibles pour le passage dans le cerveau. Comme mentionné plus haut, la découverte des anticorps IgA suggèrent un possible mécanisme pour l'augmentation de la perméabilité et aussi, peut-être, pour quelques uns des symptômes de l'autisme et de la schizophrénie.

Traitement par hémodialyse des patients schizophrènes

Approximativement 40% des patients schizophrènes, seulement traités par hémodialyse pendant une année, améliorèrent leur état de santé de manière significative ou se sentirent mieux pendant les dialyses hebdomadaires. Tous les 5 patients traités par hémodialyse, plus un changement alimentaire sans gluten ni caséine (voir table III), améliorèrent leur état de santé ou se sentirent mieux. Les profils I et II des patients par hémodialyse et changement alimentaire améliorèrent leur état de santé plus rapidement et complètement que ceux traités par hémodialyse ou changement alimentaire seulement. 5 des 7 patients schizophrènes que nous avons traités avec seulement le changement alimentaire améliorèrent leur état de santé de façon significative, ou se sentirent complètement bien. La moyenne de l'amélioration de ces patients, toutefois, fût plus lente que la moyenne de l'amélioration du traitement combiné. Ceci est en accord avec le rapport de Dohan (Dohan et Graberger, 1973) qui hospitalisèrent des patients schizophrènes pour un changement alimentaire sans gluten ni caséine, avec en plus la prise de médicaments habituelle, et purent être renvoyés de l'hôpital plus tôt que lorsque le traitement consistait de prise de médicaments sans changement alimentaire. Il est aussi intéressant de noter que les 2 patients schizophrènes (figure 4) qui n'améliorèrent pas leur état de santé par le changement alimentaire seulement, s'améliorèrent de belle manière quand ils prirent à cœur la décision de changer leur attitude alimentaire et, rechutèrent quand ils reprirent l'habitude d'ingérer des aliments contenant du gluten et de la caséine.

Carpenter et al. (1983) rapporta qu'il n'y avait pas d'amélioration statistiquement significative parmi 15 patients schizophrènes, pour une étude conduite en mode aveugle à double croisement, dans laquelle les patients reçurent une dialyse réelle, ou simulée, pendant une période de 2 fois 8 semaines. L'examen de nos données présentes ainsi que celle de Wagemaker et Cade (1977) donne une explication pour ces résultats discordants, comme le fait le rapport de Reichelt (1996) et Jorgenson et Cappelen (1992) qui présentent des résultats très similaires aux nôtres. Dans la figure 3A-C nous

avons montré les scores BPRS pour les patients ayant les profils peptidurie de type I, II, et III pendant leurs dialyses. Quand le profil peptidurie de type I était présent, l'amélioration de l'état de santé fût très rapide et complet. Le profil de peptidurie de type II fut trouvé chez 25% de nos patients schizophrènes avant traitement. Quand le profil peptidurie de type I était présent (chez 30% des patients) une amélioration discutable avait eu lieu après 14 semaines de traitement par hémodialyse. Les patients avec le type peptidurie III (figure 3C) améliorèrent évidemment leur état de santé dès la première dialyse ; une amélioration statistiquement significative, qui toutefois n'était pas mise en évidence jusqu'à la dixième semaine de traitement. Ces distinctions sont importantes parce que la façon dont elles apparaissent dans la filtration moléculaire sur Sephadex, les particules trouvées dans le pic II, sont beaucoup plus petites que celles du pic I, et peuvent être ainsi éliminées plus efficacement par hémodialyse. Si seulement ¼ des patients du groupe de Carpenter avaient eu le profile peptiduri type II, l'amélioration qu'ils virent, serait obscurcie par le profil I et II des patients dans l'étude, qui, d'après nos données analytiques, n'auraient attendu d'amélioration que bien plus tardivement. Aussi, compte tenu du petit volume des échantillons de nos patients, il est possible qu'aucun profil peptidurie type II n'ait été inclus dans l'étude de ce groupe. Ainsi, l'étude de Carpenter comporte deux problèmes sérieux ; la courte période de dialyse, et le petit nombre de patients qui, presque certainement, représente un manque de distribution des trois profils de peptides urinaires.

Nous étions incapables de réduire le degré de l'hyper-peptidurie dans notre étude de l'effet de la dialyse sur les profils I et III des patients schizophrènes de façon suffisante, ou pour des périodes de temps assez longues, avec l'usage de la dialyse comme seul facteur de traitement (Cade et al., 1990), tandis que pour la dialyse associée avec le changement alimentaire sans gluten ni caséine, la peptidémie du sang et la peptidurie de l'urine diminua progressivement, et l'état de santé des patients s'améliora pendant que leur peptidurie diminuait (Cade et al., 1990). Nous pensons que l'échec fréquent du traitement par seulement la dialyse, est dû à l'absorption de telles grandes quantités de bêta-casomorphines et alpha-gliadinomorphines, que la dialyse était incapable de réduire suffisamment la concentration des exorphines, ou sur une durée assez longue pour avoir un net effet bénéfique.

Alors que cette découverte ne fut pas incluse dans notre étude, 5 mamans de nos patients annoncèrent que leurs enfants autistes avaient fréquemment des crises d'épilepsie (Volkmar et Nelson, 1995 ; Olsson et al., 1988) avant le commencement du changement alimentaire sans gluten ni caséine. La fréquence des crises d'épilepsie avait diminué de façon significative chez 3 enfants, et s'était complètement arrêtés chez 2 enfants. Nous pensons que ceci suggère que tous les enfants atteints de crises d'épilepsie inexplicables devraient être examinés pour la présence d'exorphines (Pratesi et al., 1998).

Dans une autre étude en parallèle (Sun et Cade, 1999a) nous avons injecté de la bêta-casomorphine-7 IV, et un pic isolé de l'urine et du sang de sujets autistes et schizophrènes que nous avons identifiés sur le critère de mobilité de pics HPLC comme

étant de la bêta-casomorphine-7, et démontré que ce peptide opioïde est réceptionné par le système de récepteur de type morphinique dans la partie médiane et latérale du nucleus géniculat du cerveau, les cortex occipital et temporal, et de multiples autres endroits du cerveau incluant : le nucleus accumbens, l'hypothalamus, le cortex entorhinal, une section dopaminergique, et le cortex pariétal, plusieurs endroits des lobes frontal et pré-frontal, notamment un placé juste avant la fissure sylvan qui est la partie du cerveau appelée Broca ou naît le langage. De plus, le nucleus caudate, et le site ventral tegmental, qui sont le site d'une autre voie métabolique dopaminurgique, montrent une haute affinité pour l'assimilation de la beta-casomorphine-7. Ces découvertes montrent que la bêta-casomorphine ne peut pas pénétrer la barrière hémato-encéphalique, mais qu'elle est rapidement assimilées par les récepteurs opioïdes (Sun et Cade, 1999a) dans les endroits du cerveau où les fonctions anormales pourraient produire tous les symptômes qui ont lieu chez les patients autistes ou schizophrènes. Spécifiquement les hallucinations se produisent parce que le nucleus géniculat pourrait envoyer de fausses informations visuelles et auditives au cortex temporal et occipital ou les cortex eux-mêmes impliqués pourraient mal interpréter le message. Ces sites de fonctions cérébrales connues du cerveau (Sun et Cade, 1999a) suggèrent que toutes les anomalies du comportement, par association, pourraient être expliquées par l'altération de ces sites.

Nos études montrent aussi que la réduction des peptides dans le sang et l'urine par le changement alimentaire ou par la dialyse (Cade et al., 1990), est accompagnée par une amélioration dans le score BPRS, et de l'état clinique du patient, alors que les espaces de temps entre les diètes et les dialyses conduisent à une remontée des signes cliniques et des scores BPRS. Dans une autre étude chez le rat (Sun et Cade, 1999b), nous avons donné de la bêta-casomorphine à des rats normaux. 57 secondes plus tard, les rats commencèrent à courir dans tous les sens, grinçant des dents, et bavant. Ils devinrent ensuite hostiles et sur la défensive, attaquant leurs compagnons de cage, s'ils s'approchaient d'eux. La sensation de douleur était très diminuée pour ces rats, une découverte fréquemment remarquée chez beaucoup de patients autistes et schizophrènes. On nota aussi que ces rats ne faisaient aucunement attention quand on sonnait une cloche au dessus de leur cage, alors que les rats normaux, invariablement, regardent au dessus de leur tête pour localiser le lieu d'origine du bruit. Cette observation est d'un grand intérêt car la plupart des mères d'enfants autistes pensent que leurs enfants sont sourds. Nos études sur le comportement des rats, à qui on donne de la bêta-casomorphine, ont beaucoup de corrélation avec les découvertes de Panksepp (1978) et Panksepp et al. (1980). Ainsi, les 6 questions soulevées au début de notre étude apportent des réponses affirmatives. De plus, nous pensons que les données analytiques de notre étude montrent tellement de similarités entre l'autisme et la schizophrénie, qu'il est raisonnables de se demander si les deux pathologies sont causées par le même principe défectueux de base. Le traitement par le changement alimentaire sans gluten ni caséine, ou par hémodialyse complété avec changement alimentaire sans gluten ni caséine ; les 2 approches diminuent le degré de peptidurie dans la schizophrénie et l'autisme, et cette diminution est en relation linéaire directe avec l'amélioration (Cade et al., 1990) des scores BPRS, et du comportement clinique de

la schizophrénie (Cade et al., 1990), et avec les manifestations cliniques chez les enfants autistes (Cade et al., 1990).

Bien que la suppression du gluten et de la caséine de la diète alimentaire soit une tâche difficile pour les parents , nous croyons que nos résultats présentés ici plaident en faveur d'un effort pour atteindre ce but.

Remerciements

La réalisation de ce travail a été permise grâce à un financement par la fondation Mary et Robert Cade et par le compte #5901 de la fondation de l'Université de la Floride, Gatorade Royalties.

Les auteurs de cet article remercient Mme Jacqueline D. Harris pour sa collaboration enthousiaste et déterminée, et son aide précieuse dans l'élaboration de ce manuscrit, et M. Kelly W. Campbell et M. Tom Connor pour leur travail enthousiaste et leur patience lors de l'étude des antigènes du sang, et des peptides urinaires. Nous sommes aussi reconnaissants à M. Sidney Cassin, et Dr James McGuigan pour leur aide de grande valeur pour les remarques critiques lors de la lecture de ce manuscrit.